

**Etablierung
der Chromatin-Immunopräzipitation
für *in vivo* Untersuchungen der Genregulation
durch Transkriptionsfaktoren
bei der Honigbiene *Apis mellifera***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Fabian Büttner

Saarbrücken, Oktober 2011

Tag des Kolloquiums:	02.02.2012
Dekan:	Prof. Dr. W. F. Maier
1. Gutachter:	Prof. Dr. U. Müller
2. Gutachter:	Prof. Dr. U. Walldorf
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. V. Helms
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. G.-W. Kohring

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Stress	1
1.1	Stressantwort.....	3
1.2	Stress bei Bienen.....	5
2	Genregulation durch Kontrolle der Transkription.....	5
2.1	Mechanismen der Genregulation.....	6
2.1.1	Regulation der Genexpression durch Chromatinumstrukturierung.....	6
2.1.2	Regulation der RNA-Polymerase II.....	8
2.2	Genregulation durch spezifische Transkriptionsfaktoren.....	9
2.2.1	Rekrutierung von Co-Faktoren durch Transkriptionsfaktoren	9
2.2.2	Regulation und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	10
2.2.3	DNA-Bindungen von Transkriptionsfaktoren	11
2.3	Activating-Transcription-Factor-2 (ATF2).....	12
2.4	Regulierende DNA-Elemente	14
2.5	Techniken zur Untersuchung der Genregulation.....	15
3	Ziel der Arbeit.....	17
B	Methoden und Material	18
1	Methoden	18
1.1	Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine	18
1.1.1	Herstellung von cDNA-Inserts.....	19
1.1.2	Klonierung und Transformation von Bakterienzellen.....	19
1.1.3	Expression von rekombinanten Proteinen.....	20
1.1.4	Lyse und Aufreinigung rekombinanter Bakterien.....	21
1.2	Herstellung von Antikörpern.....	23
1.2.1	Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	24
1.2.2	Monoklonale Antikörper.....	26
1.3	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	27
1.3.1	Behandlung der Bienen mit UV-Licht.....	28
1.3.2	Fixierung der TF-DNA-Komplexe	28
1.3.3	Sonifikation	29
1.3.4	Immunopräzipitation.....	29
1.3.5	Auflösen der Fixierung und DNA-Aufreinigung.....	30
1.4	ChIP-seq	30
1.4.1	Herstellung der ChIP-Proben.....	30
1.4.2	Whole-Genome-Amplification (WGA)	31
1.4.3	FLX-Sequenzierung	32

1.4.4	Auswertung der ChIP-seq.....	34
1.5	Präparation des Bienengehirns	35
1.6	Quantitative Real-Time-PCR	36
1.6.1	(Real-Time)-qPCR-Primer	36
1.6.2	Standards.....	37
1.6.3	Proben	37
1.6.4	Experimentelle Durchführung.....	38
1.6.5	Qualitätskontrolle und Berechnung der Probenmengen	38
1.6.6	Analyse der Proben	40
1.7	Molekularbiologische Methoden	42
1.7.1	DNA-Extraktion und -Aufreinigung	42
1.7.1.1	Gelextraktion	42
1.7.1.2	Plasmidpräparation	42
1.7.1.3	Präparation genomischer DNA (Phenol-Chloroform-Extraktion)..	42
1.7.1.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	43
1.7.2	RNA-Extraktion.....	43
1.7.2.1	TRizol-Extraktion	44
1.7.2.2	RNA-Extraktion mit dem „RNeasy mini Kit“	44
1.7.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	45
1.7.3.1	Photometrische Bestimmung.....	45
1.7.3.2	DNA-Quantifikation im Agarosegel	45
1.7.3.3	PicoGreen-Messung von DNA.....	46
1.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	46
1.7.4.1	DNA-Gelelektrophorese	46
1.7.4.2	RNA-Gelelektrophorese	47
1.7.5	Primerdesign	47
1.7.6	PCR Techniken.....	48
1.7.6.1	Standard PCR.....	48
1.7.6.2	Kolonie-PCR	49
1.7.6.3	Reverse Transkription mit DNA-Verdau	49
1.7.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA	51
1.7.8	Sequenzabgleich	51
1.7.9	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	52
1.7.10	<i>In silico</i> Analyse genomischer DNA auf <i>cis</i> -Elemente	52
1.8	Proteinbiochemische Methoden	52
1.8.1	Bradford-Assay zur Proteinbestimmung	52
1.8.2	Dialyse	52
1.8.3	Kompetitions-Assay	53
1.8.4	SDS-PAGE	54

1.8.5	Coomassie-Färbung	55
1.8.6	Western-Blotting	55
1.8.7	Immunhistologie	57
1.9	Mikrobiologische Methoden	58
1.9.1	Nährmedien und Agarplatten	58
1.9.2	Spezielle Nährmedien	58
1.9.3	Glycerinkultur	59
1.9.4	Blue/White-Screening	59
1.10	Stochastik.....	59
2	Material.....	60
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Kits	60
2.2	Puffer und Lösungen	63
2.3	Antikörper.....	67
2.4	Primer	68
2.5	Verbrauchsmaterialien.....	71
2.6	Tiere	71
2.7	Geräte.....	72
2.8	Software	73
2.9	Datenbanken	74
C	Ergebnisse	75
1	Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren.....	75
1.1	Spezifität von Antikörpern gegen TFs der Biene.....	75
1.2	Herstellung von Antikörpern mittels rekombinanter Proteine	76
1.2.1	Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	77
1.2.1.1	Herstellung von cDNA-Inserts	77
1.2.1.2	Klonierung und Transformation von Bakterienzellen	78
1.2.1.3	Proteinexpression	80
1.2.1.4	Proteinaufreinigung	81
1.2.2	Herstellung und Aufreinigung von c-Jun- und Creb-Antikörpern	83
1.2.2.1	Polyklonale c-Jun- und Creb-Antikörper.....	83
1.2.2.2	Monoklonale Creb-Antikörper.....	85
2	Etablierung der Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) für <i>in vivo</i> Experimente mit der Biene	88
2.1	Sonifikation der DNA.....	89
2.2	Ermittlung von TF-DNA-Bindungsstellen (TFBSs).....	90
2.3	Fixierung der TF-DNA-Komplexe.....	92
2.4	Elution der TF-DNA-Komplexe	93
2.5	Überprüfung der ChIP-Methode	94
2.6	Normalisierung der ChIP-Proben.....	95

3	Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Genregulation	98
3.1	Bindung von Transkriptionsfaktoren nach UV-Strahlung	98
3.2	ChIP-Sequenzierung – Untersuchung von Atf-2-DNA-Bindungen im gesamten Bienengenom nach UV-Strahlung.....	100
3.2.1	Hochdurchsatz-Sequenzierung	100
3.2.2	Atf-2-Bindungen im Bienengenom nach UV-Strahlung.....	102
3.2.2.1	Bindung von Atf-2 an DNA-Elemente	102
3.2.2.2	Bindung von Atf-2 an Gene und DNA-Sequenzen.....	104
3.2.2.3	Ontologie der Gene	105
3.2.2.4	Bindungshäufigkeit von Atf-2 an TFBSs.....	107
3.3	Validierung von Atf-2-Bindungsstellen aus der ChIP-seq mittels ChIP mit Real-Time-qPCR (ChIP-qPCR)	108
3.4	mRNA-Expression nach UV-Strahlung.....	111
D	Diskussion	112
1	Vergleich der ChIP-Methode mit anderen Techniken zur Untersuchung der Genregulation	112
1.1	<i>In vitro</i> Protein-DNA-Bindungsassays und <i>in silico</i> Analysen	112
1.2	Reporter-Assays und Genkonstrukte	115
1.3	<i>In vivo</i> Methoden zur Identifikation von regulatorischen <i>cis</i> -Elementen.....	116
2	Betrachtung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	119
2.1	ChIP-Antikörper	119
2.2	Normalisierung der ChIP-Proben.....	120
2.3	ChIP in Zellkulturen (<i>in vitro/ ex vivo</i>) und Organismen (<i>in vivo</i>)	121
2.4	Untersuchung genomweiter TFBSs durch ChIP-seq	122
3	Genomweite Bindungsstellen von Atf-2 im Gehirn der Biene	123
3.1	Verteilung der Bindungsereignisse von Atf-2 im Genom	123
3.2	Bindung von Atf-2 an Gene und TFBSs nach UV-Strahlung	126
3.3	Ontologie nach UV-Strahlung.....	127
4	Regulation der mRNA-Expression durch DNA-Bindungen von Transkriptionsfaktoren nach UV-Strahlung	129
4.1	mRNA-Expression nach UV-Strahlung.....	129
4.2	Regulation der Genexpression durch TF-Bindungen an die DNA.....	130
5	Ausblick	135
E	Zusammenfassung	137
F	Summary	138
G	Anhang	139

H	Abkürzungsverzeichnis	149
I	Literatur.....	152
J	Danksagung	178
K	Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang.....	179

A Einleitung

Individuen einer jeden Spezies besitzen den gleichen Genpool und dennoch unterscheiden sie sich in ihrem Phänotyp, wie Aussehen und Verhalten. Während der Entwicklung von multizellulären Eukaryoten differenzieren sich die Zellen zu unterschiedlichen Zelltypen, in denen viele Proteine zellspezifisch exprimiert werden. Diese Möglichkeit der Differenzierung von Zellen und die Entwicklung von Geweben, Organen und ganzer Organismen, sowie ihre Reaktionen auf in- und extrinsische Signale, werden erst durch die Regulation von Genen ermöglicht. Hierdurch kann das Genom einer jeden Zelle individuell programmiert werden, um die Gene zu determinieren, die zu einem gegebenen Zeitpunkt und einem spezifischen Stimulus exprimiert werden sollen.^[24,25] Die gezielte Änderung der Expressionsstärke der Zielgene wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert, die letztendlich die transkriptionelle Aktivität der RNA-Polymerasen kontrollieren. Koordiniert werden diese Mechanismen der Transkriptionsmaschinerie insbesondere durch spezifische Transkriptionsfaktoren (TFs), Proteine die an bestimmte DNA-Sequenzen binden.^[27] Wie wichtig die Genregulation auch in adulten Organismen ist, haben jüngste Forschungen gezeigt. Beim Menschen sind Fehlregulationen der Transkription von 164 TFs direkt verantwortlich für 277 Erkrankungen oder Syndrome.^[6] Die meisten Gene, die mit mentalen Erkrankungen und den daraus resultierenden Lernschwächen assoziiert sind, beteiligen sich an der Umstrukturierung des Chromatins, die essentiell für die Regulation der Gene ist.^[28,29] Darüber hinaus wurden Chromatinänderungen beobachtet, die in Prozessen der neuronalen Plastizität und langfristiger Änderungen der Gehirnfunktion involviert sind. Diese Erkenntnisse haben die Regulation der Transkription verstärkt in den Fokus von Neurowissenschaft und Neuropathologie gerückt. Hierbei ist Stress ein bedeutender Faktor, der sich auf mentale Erkrankungen und Genregulation auswirkt.

1 Stress

Stress wird allgemein als Reaktion auf einen Reiz aus der Umwelt definiert, an den sich ein Organismus anzupassen versucht. Das Gehirn ist das zentrale Organ der Stressantwort und entscheidet darüber, was eine Stresssituation ist und wie darauf reagiert werden soll, im Verhalten, wie auch physisch.^[30] Ein bekanntes Beispiel für Stress ist die „fight or flight“-Reaktion.^[31] In einer Gefahrensituation muss schnell reagiert werden. Das Gehirn verarbeitet dabei aktuelle Informationen aus der Umwelt mit gespeicherten Erfahrungen und bewirkt eine entsprechende Verhaltensreaktion. Darüber hinaus erfährt der Körper physiologische Veränderungen. Herzschlag, Blutdruck und Atemfrequenz nehmen zu, um den Körper schnell mit Sauerstoff zur

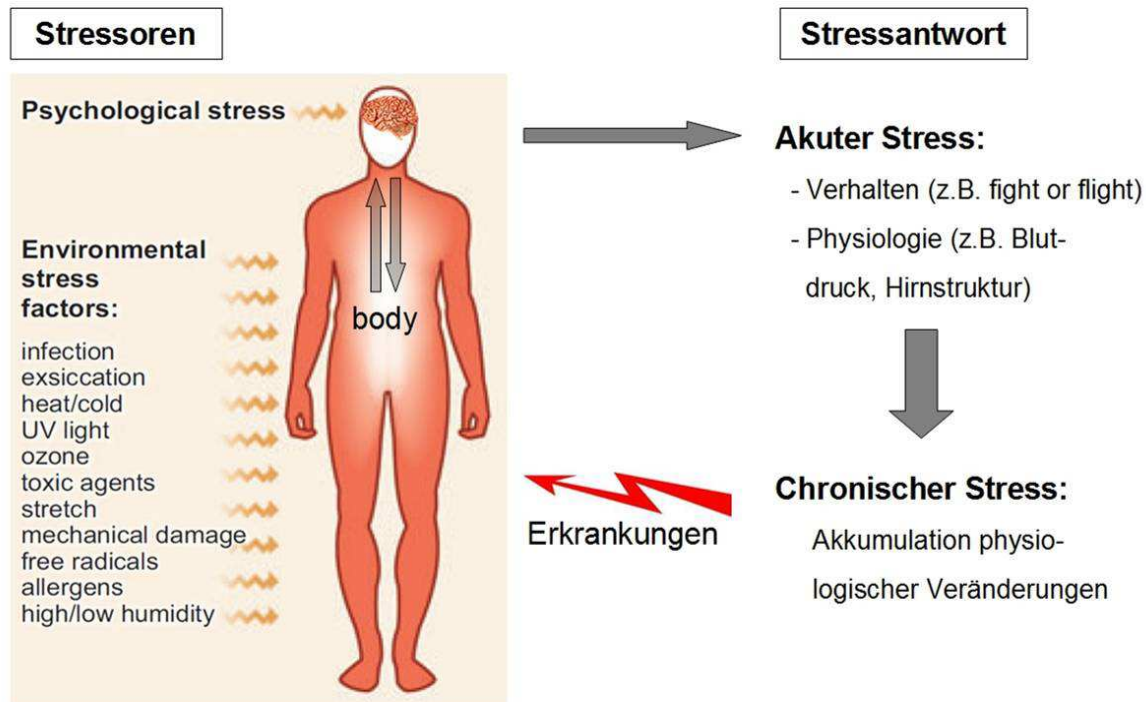


Abb. 1: Stress

Es gibt verschiedene Stressfaktoren (Stressoren) aus der Umwelt oder dem Körper, die im Gehirn verarbeitet werden und entsprechende Stressantworten auslösen. Akuter Stress ist einmalig und von kurzer Dauer. Wirkt ein Stressor wiederholt oder über einen längeren Zeitraum auf ein Individuum, kann der Stress chronisch werden und zu Erkrankungen und Schädigungen von Organen und Zellen führen. Abb. verändert nach Arck et al. (2006)^[8]

Energiegewinnung zu versorgen. Diese und andere Stresssituationen können auch zu langfristigen Veränderungen führen. So kann z. B. Stress in einer Gefahrensituation das Gedächtnis so modulieren, dass dieses Ereignis über Jahre gespeichert wird.^[32,33] Diese abrufbare Erfahrung kann in zukünftigen Gefahrensituationen sogar ein lebensentscheidendes Verhalten auslösen. Dieses Beispiel zeigt, dass Stress durchaus positiv sein kann. In unserer heutigen Gesellschaft allerdings ist der Begriff Stress eher negativ besetzt. Damit ist besonders **chronischer Stress** gemeint, der zu Erkrankungen führen kann.^[30,34] Chronischer Stress entsteht, wenn sich einzelne Stresssituationen (**akuter Stress**) oft wiederholen oder ein Stressstimulus (**Stressor**) über einen längeren Zeitraum wirkt (Abb. 1). Die physiologischen Veränderungen durch die Stressantwort, wie z. B. die Regulation des Blutdrucks oder des Herzschlags bei der „fight or flight“-Reaktion, akkumulieren sich bei chronischem Stress und können dann zu einem Schlaganfall oder einer Herzattacke führen. Stressreaktionen sind nicht nur von der Dauer und Häufigkeit eines Stimulus abhängig, sondern auch von dessen Art und Intensität. So gibt es Stressoren die zu direkter Schädigung von Zellen und Organen führen können, wie Ultraviolette Strahlung, Allergien oder Infektionen.^[21] Andere Stressoren wirken psychologisch und können zu geistigen und körperlichen Erkrankungen führen. Besonders in den Industrienati-

onen haben Stressoren aus Umweltverschmutzung und moderner Lebensweise stark zugenommen. Hierzu gehören die Belastung durch Arbeit und Zeitmangel, was auf Dauer zu Herzbeschwerden oder Depressionen führen kann. Die Bekämpfung von Stress bedingten Erkrankungen ist sowohl aus medizinischer Sicht erstrebenswert, als auch aus wirtschaftlicher. In Europa sind über 40 Millionen Menschen von arbeitsbedingtem Stress betroffen. Durch Fehlzeiten und Arztrechnungen entstehen so jährlich 20 Milliarden Euro an Unkosten.^[35]

Um einen Fortschritt in der Behandlung von Stress bedingten Erkrankungen zu erzielen, bedarf es detaillierter Kenntnisse der molekularen Stressantworten.

1.1 Stressantwort

Stressoren werden über sensorische Systeme wie die Sinnesorgane oder Sensoren der Homöostase wahrgenommen und im Gehirn verarbeitet.^[36] Dieses rekrutiert das neurale und neuroendokrine System um eine Verhaltens- oder physiologische Antwort auf den Stress zu induzieren. Für eine schnelle Antwort, wie sie bei „fight or flight“ notwendig ist, wird das autonome Nervensystem herangezogen (ANS). Die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse kann in Sekunden über die Freisetzung der Hormone Adrenalin und Noradrenalin das Kardiovaskularsystem erregen um den Herzschlag und den Blutdruck zu erhöhen.^[37] Die langsamere Stressantwort benötigt einige Minuten.^[38] Hierbei wird die **Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse** (HPA, *engl.* hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis) aktiviert (Abb. 2a).^[23,36] Die HPA reguliert über das neuroendokrine System die Synthese und Freisetzung von **Glucocorticoiden** (GCs). Diese beteiligen sich an der Regulation des Energiestoffwechsels, speziell des Metabolismus von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten.^[21] Außerdem sind sie an der Immunantwort und Entzündungsreaktionen beteiligt. Hierbei ist eine aktivierende^[39,40] oder reprimierende^[41,42] Wirkung der GCs von ihrer Konzentration und der Wirkungszeit abhängig, was wiederum mit der Art des Stressors und akutem oder chronischem Stress zusammenhängt. Um solche Reaktionen hervorzurufen, binden GCs als Liganden im Zytosol von Zellen an den **Mineralcorticoidrezeptor** (MR) oder den **Glucocorticoidrezeptor** (GR) (Abb. 2b), wodurch diese aktiviert werden. Diese Rezeptoren können das extrazelluläre Signal genetisch oder nicht genetisch weiterleiten. MRs z. B. können nach Stress die Glutamataufreisetzung in Präsynapsen verstärken.^[43] Als Transkriptionsfaktoren wirken beide Rezeptoren regulierend auf die Genexpression. Da die beiden Rezeptortypen in verschiedenen Hirnbereichen unterschiedlich stark exprimiert werden,^[26,30] werden dort dementsprechend verschiedene Zielgene reguliert.^[44,45] Eine weiterer Signalweg der Stressantwort ist die **Mitogen Aktivated Protein Kinase** (MAPK)-Signalkaskade. Diese steuert ebenfalls die Genexpression, über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.^[46]

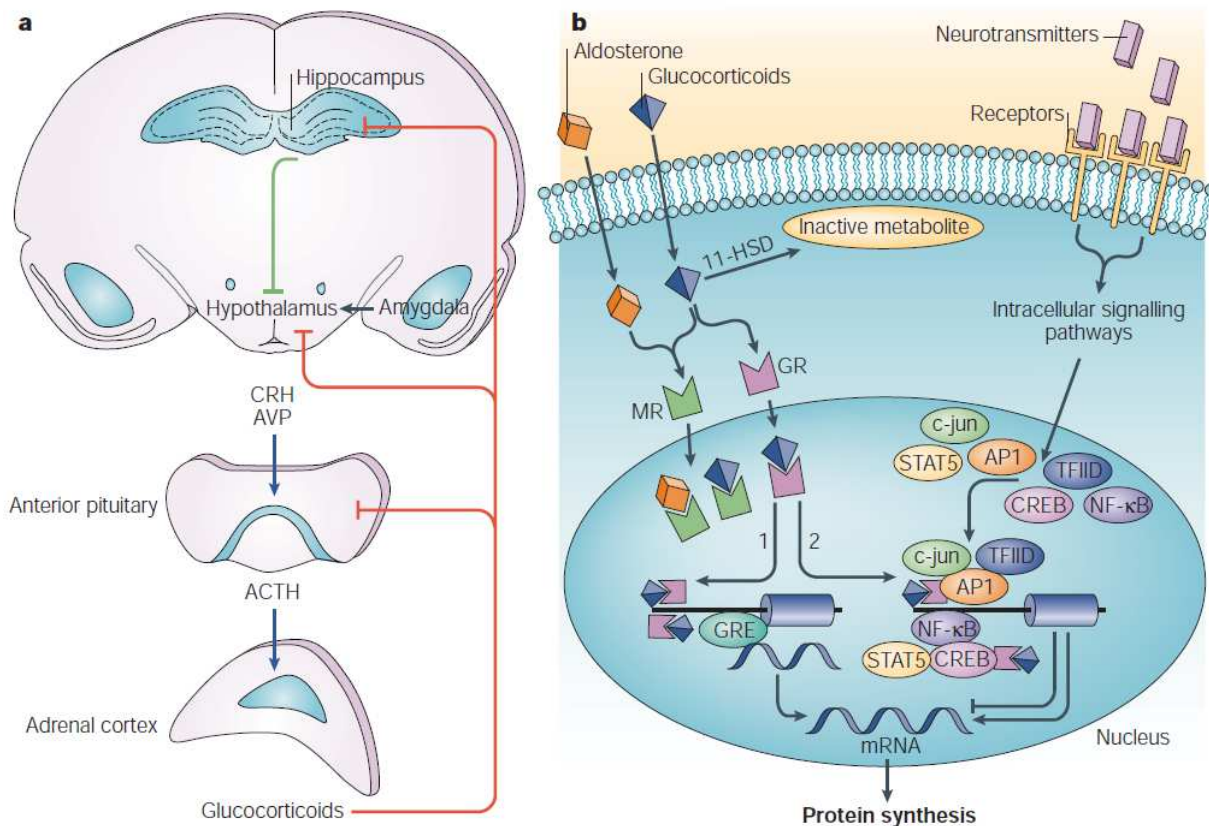


Abb. 2: Neuroendokrine Stressantwort durch Glucocorticoide

(a) Stressantwort über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA, engl. hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis): Ein Stressstimulus wird im Gehirn verarbeitet und löst eine entsprechende Antwort aus. Hierbei wirken u. a. der Hirnstamm^[7] und die limbischen Gehirnregionen Amygdala und Hippocampus regulierend auf den paraventriculären Nukleus des Hypothalamus.^[17] Dieser sezerniert die beiden Peptidhormone Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und Arginine Vasopressin (AVP), welche ihrerseits die Produktion und Freisetzung des Adrenocorticotropin Hormons (ACTH) in der Adenohypophyse induzieren. Über den Blutkreislauf gelangt ACTH an die Nebennierenrinde und initiiert die Synthese und Absonderung von Glucocorticoidhormonen. Zur Kontrolle der HPA-Achse wirken Glucocorticoide in einem negativen Feedback-Mechanismus (rote Linien) u. a. auf den Hippocampus,^[18] der im Allgemeinen inhibierend auf die HPA-Achse wirkt.^[21,22] Abb. aus Sandi (2004)^[23]

(b) Genregulation durch Glucocorticoide (GCs):^[23,26] GCs sind Steroidhormone und können wegen ihrer lipophilen Eigenschaft sowohl die Bluthirnschranke, als auch Zellmembranen passieren. Im Zytosol können GCs durch die 11- β -hydroxysteroid Dehydrogenase (11-HSD) abgebaut werden oder an einen der beiden intrazellulären Corticosteroidrezeptoren binden, dem Mineralcorticoidrezeptor (MR) und dem Glucocorticoidrezeptor (GR). Hierdurch werden Konformationsänderungen an den Rezeptoren induziert, welche daraufhin Homodimere bilden und als Transkriptionsfaktoren fungieren. Sie können nun in den Zellkern wandern, um dort die Genexpression zu regulieren. Hierzu binden sie direkt an eine spezifische DNA-Sequenz, dem Glucocorticoid Response Element (GRE) oder interagieren mit anderen Transkriptionsfaktoren (Ovale). Abb. aus Sandi (2004)^[23]

1.2 Stress bei Bienen

Vieles was über Lernen und Gedächtnisbildung bekannt ist, wurde an der Honigbiene erforscht.^[47-50] Gerade ihr einfacher Gehirnaufbau, im Vergleich zu Säugern, erleichtert die Handhabung einfacher Verhaltensexperimente. Ebenso gut geeignet ist sie für molekularbiologische Untersuchungen am Gehirn, da viele bekannte Signalkaskaden bei der Biene hoch konserviert und vereinfacht sind. So ist bekannt, dass Stress und Lernen auf die gleichen MAPK-Signalkaskaden wirken.^[2] Bei Alarmstress wurde gezeigt, dass das freigesetzte Pheromon Isopentyl Acetate (IPA) einen Anstieg der Expression des Transkriptionsfaktors c-Jun bewirkt.^[51] Andere Untersuchungen an der Biene wurden zu oxidativem Stress durchgeführt,^[52,53] der sich schädigend auf das Gehirn^[54] und das Altern auswirken könnte.^[55] Bei der molekularen Stressantwort scheint, ebenso wie bei Säugern (siehe oben), ein Hormon eine zentrale Rolle einzunehmen, das Juvenilhormon. Dieses wirkt sich auf die Expression von Vitellogenin, einem antioxidantischem Protein aus.^[56,57]

Die Forschungen an Säugern und Bienen haben gezeigt, dass Stress physiologische Änderungen im Organismus bewirken kann, speziell im Gehirn, die sowohl schädigend als auch protektiv ausfallen können, wie z. B. bei der Gedächtnisbildung. Hierfür sind nicht nur schnelle Reaktionen auf einen Stressstimulus wichtig, sondern auch lang anhaltende Stressantworten, welche die Expression neuer Proteine und somit die Regulation der Gene notwendig machen.

2 Genregulation durch Kontrolle der Transkription

Um die Expressionsstärke bestimmter Gene zu kontrollieren gibt es verschiedene Mechanismen, die direkt oder indirekt auf die transkriptionelle Aktivität der RNA-Polymerasen wirken (Abb. 3). Dieses kann über **Chromatinumstrukturierung** erfolgen, wodurch die Zugänglichkeit der RNA-Polymerasen und der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs, *engl.* general transcription factors) an die DNA reguliert wird oder durch Kontrolle der **Transkriptionsaktivität** der **RNA-Polymerasen**.^[27] Im Mittelpunkt der Genregulation stehen die spezifischen Transkriptionsfaktoren. Sie koordinieren als Reaktion auf in- oder extrinsische Signale die Lokalisation der Proteine und Enzyme von verschiedenen Regulationsmechanismen an die DNA, so dass diese zu einem bestimmten Zeitpunkt die Transkriptionsstärke ausgewählter Gene verändern können.

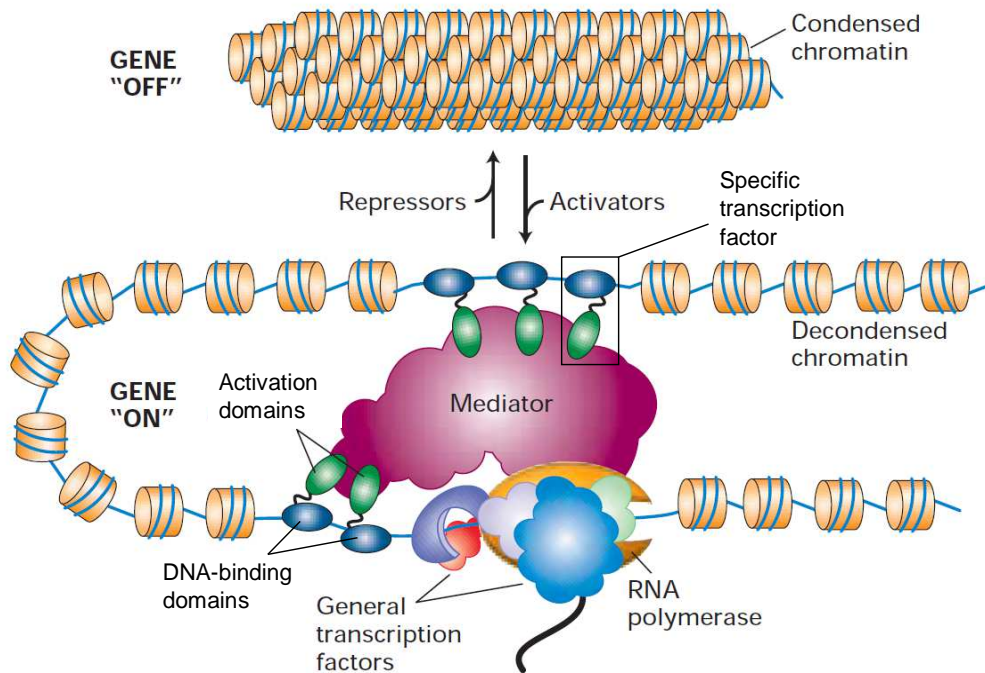


Abb. 3: Genregulation in multizellulären Eukaryoten

Die Zugänglichkeit der RNA-Polymerase und der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs, *engl. general transcription factors*) an die DNA wird u. a. über die Dichte der Chromatinstruktur reguliert. Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (TFs) binden dazu an DNA-Bindungsstellen und kondensieren oder decondensieren das Chromatin selbst oder durch gebundene Co-Faktoren. Außerdem koordinieren die TFs die Bildung des Prä-initiationskomplexes durch Protein-Protein-Interaktionen mit den GTFs und der RNA-Polymerase. Diese Interaktionen können direkt oder über andere Proteine erfolgen, wie dem Mediator-Komplex. Verschiedene TFs können über die genannten Mechanismen aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken. Abb. verändert nach Lodish et al. (2004)^[19,20]

2.1 Mechanismen der Genregulation

Im Folgenden soll die Genregulation von Protein kodierenden Genen bei höheren Eukaryoten beschrieben werden, welche durch die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert werden. Für andere Organismen und andere RNA-Polymerasen sind teilweise abweichende Regulationsmechanismen bekannt.

2.1.1 Regulation der Genexpression durch Chromatinstrukturierung

Die Expressionsstärke von Genen kann über die Struktur des Chromatins reguliert werden. Hierbei hängt die Genexpression davon ab, ob das Chromatin offen (decondensiert) oder geschlossen (kondensiert) ist. Nur bei offener Chromatinstruktur ist die DNA zugänglich für die Proteine des Transkriptionsapparates.^[27,58] Das Chromatin kann reversibel durch unterschiedliche Modifikationen umstrukturiert werden (Abb. 4). Hierzu gehören u. a. DNA-Methylierung, Chromatin-Remodelling, Histonmodifikationen und Austausch von Histonvarianten in Nukleosomen.^[27,59,60]

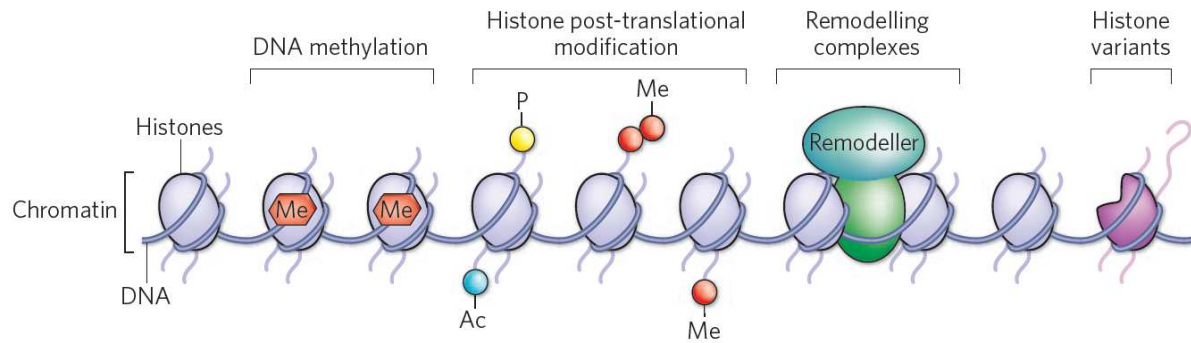


Abb. 4: Mechanismen der Chromatinstrukturierung

Verschiedene Mechanismen interagieren miteinander um die Chromatinstruktur zu verändern. Hierzu gehören DNA-Methylierung, Histonmodifikation, Chromatin-Remodelling und Histon austausch. Ac, Acetyl; Me, Methyl; P, Phosphat. Abb. verändert nach Dulac (2010)^[5]

Die **DNA-Methylierung** bewirkt eine stabile, lang anhaltende Repression der Genexpression,^[61] wie z. B. bei der Inaktivierung des X-Chromosoms und gewebespezifischer Genexpression.^[61-63] Bei der DNA-Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppe kovalent an einen Cytosinrest der DNA gebunden.^[62,64,65] Proteinkomplexe wie der Nucleosom-Remodelling- und Histondeacetylase-Repressor-Komplex (NuRD) binden an bestehende Methyl-CpGs und kombinieren verschiedene Mechanismen zur Chromatinkondensation.^[66-70]

Chromatin-Remodelling, auch Nucleosom-Remodelling genannt, ist die Umstrukturierung des Chromatins durch spezielle Chromatin-Remodelling-Komplexe (Remodellers). Sie sind beteiligt an der DNA-Replikation und -Reparatur, sowie an der Genregulation.^[71] Remodellers verändern den Packungsstatus des Chromatins, indem sie Nucleosomen bewegen, auflösen oder umstrukturieren.^[72,73] Rekrutiert werden die Remodellers von TFs.^[74,75]

Die unterste Ebene der Chromatinverpackung bilden die Nucleosomen. Sie werden aus DNA gebildet, die sich um ein Oktamer aus verschiedenen Histondimeren winden.^[76,77] Die aminoterminalen Domänen (NTDs) der Histone ragen aus diesem Komplex heraus und können auf verschiedene Weise verändert werden.^[77,78] Diese **Histonmodifikationen** tragen zur Genregulation bei, indem sie die Stärke der DNA-Histonbindung verändern und/oder Proteine oder Proteinkomplexe rekrutieren, die sich an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligen. Histonacetyltransferasen (HATs) z. B. können durch Histonacetylierung die Transkription aktivieren.^[79-81] HATs werden auch als Co-Aktivatoren bezeichnet, da sie meist nicht direkt an die DNA binden, sondern durch TFs rekrutiert werden.^[60,82] So wurde durch Pulldown-Assays mit Hefezellen die Rekrutierung verschiedener HATs durch die TFs VP16 und Gcn4 nachgewiesen, sowie eine anschließende Histonacetylierung *in vitro*.^[82]

2.1.2 Regulation der RNA-Polymerase II

Die Transkriptionsaktivität der Pol II kann bei der Initiation, Elongation und Termination der Transkription reguliert werden.^[83,84] Nachdem eine offene Chromatinstruktur den Zugang von Proteinen an die DNA erlaubt (siehe oben), kann der **Präinitiationskomplex** (PIC, *engl.* preinitiation complex) aus GTFs und Pol II gebildet werden. Dazu konnte in vielen *in vitro* Studien gezeigt werden, dass TFs in den meisten Genen mit GTFs, wie den TATA-binding-Protein (TBP), TFIID, TFIIA und TFIIB interagieren.^[85] Hierbei könnten diese Protein-Protein-Interaktionen Bindungen der GTFs an den Promotor verbessern oder den PIC stabilisieren, um die Pol II effizienter zu rekrutieren um so die Expression zu erhöhen. TFs können hierzu auch Co-Faktoren wie Mediator Komplexe rekrutieren, die mit den GTFs interagieren.^[86,87] Dieses konnte bisher *in vitro* und in Zellkultur gezeigt werden.^[88,89] Nach der Bildung des PIC muss die **Transkription initiiert** werden, indem die DNA an der Transkriptionsstartseite (TSS) entwunden wird. Hierbei könnten wiederum TFs über Co-Faktoren einen offenen DNA-Komplex formen. So ist bekannt, dass ein Mediator *in vitro*, sowie in Hefezellen mit den GTFs TFIIE und TFIIH interagiert, die am Entwinden der DNA beteiligt sind.^[86,90] Nachdem ein offener Komplex gebildet worden ist, muss die Pol II noch vom PIC gelöst werden. Durch die Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne (CTD) der Pol II durch den TFIIH, werden dazu Kontakte zwischen der Pol II und einigen Promotor gebundenen Faktoren unterbrochen.^[91] Ein TF kann die CTD-Phosphorylierung *in vitro* begünstigen.^[92]

Bei einigen Genen, wie z. B. dem Hitzeschock-Protein *Hsp70* bei *Drosophila*,^[93] wurde beobachtet, dass die Pol II nach der Initiation nur 20 bis 50 Basenpaare transkribiert und dann pausiert.^[94] *In vitro* Experimente weisen darauf hin, dass hierbei der TF GAGA-Faktor (GAF) an den Promotor bindet und Remodellers rekrutiert, welche das Chromatin für die initiale Transkription öffnen.^[95] Der Negative-Elongationsfaktor (NELF) interagiert dann mit der Pol II, um die **Elongation** zu stoppen.^[96,97] Die Kinase P-TEFb kann die Transkription durch die Pol II wieder aktivieren.^[98] Für eine erfolgreiche Elongation sind des Weiteren offene DNA-Strukturen notwendig.^[99] Hierzu werden Remodellers und Enzyme der Histonmodifikation durch TFs rekrutiert, welche dann Nukleosomen entfernen oder umstrukturieren (siehe oben).^[100]

Zuletzt können TFs, wie oben erwähnt, mit GTFs interagieren um den unfertigen PIC zu stabilisieren. Dadurch wird es dem Pol II-Komplex ermöglicht sich nach der **Termination** effizient wieder an einem PIC zu beteiligen und so über mehrere Runden ein Gen zu transkribieren.^[101]

2.2 Genregulation durch spezifische Transkriptionsfaktoren

Zuvor wurde beschrieben, dass TFs andere Proteine rekrutieren, die dann über unterschiedliche Mechanismen die Expressionsstärke von Genen modulieren. Aber wie können TFs als Antwort auf unzählige Stimuli, die sich in Qualität, Quantität und Kombination unterscheiden, spezifische Expressionsmuster hervorrufen? Dies wird durch die individuelle Zusammensetzung der TFs aus mehreren Proteindomänen ermöglicht (Abb. 5). Jeder TF besitzt eine DNA-Bindungsdomäne und eine Aktivierungsdomäne. Zusätzlich können TFs regulatorische Domänen, sowie Dimerisierungsdomänen besitzen. Über die verschiedenen Domänen werden die Zielgene und Interaktionspartner bestimmt. Außerdem regulieren sie den Kerntransport der TFs und die Transkriptionsstärke.

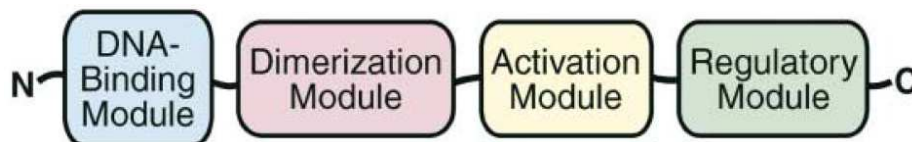


Abb. 5: Domänen von Transkriptionsfaktoren

TFs werden individuell aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt. Abb. aus Kadonaga (2004)^[3]

2.2.1 Rekrutierung von Co-Faktoren durch Transkriptionsfaktoren

TFs besitzen eine oder mehrere **Aktivierungsdomänen**.^[102,103] Über diese interagieren sie direkt oder indirekt durch **Co-Faktoren**, mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, um die Transkriptionsstärke zu erhöhen oder zu vermindern.^[102,104-107] Zu den Co-Faktoren gehören Proteine und Proteinkomplexe, die an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligt sind (z. B. Remodellers, HATs, HDACs) und welche, die mit dem PIC (z. B. Mediator-Komplex) oder der Pol II (z. B. P-TEFb) interagieren. Wie diese Co-Faktoren die Expressionsstärke verändern, ist im vorherigen Abschnitt ausführlich beschrieben. Da die Aktivierungsdomänen sehr spezifisch sind, können sie nur mit bestimmten Co-Faktoren interagieren. Welche Co-Faktoren gebunden werden, hängt von ihrem Kerntransport und der differenziellen Expression in verschiedenen Zelltypen ab,^[108] sowie von ihrer Bindungsaffinität zu einem TF. Umgekehrt wird die Rekrutierung eines Co-Faktors auch durch die Bindungsaffinität gesteuert, die vom TF ausgeht. Diese Bindungsaktivität muss bei manchen TFs erst aktiviert werden. Am TF cAMP response binding protein (CREB) z. B. können die HATs p300 und CREB binding protein (CBP) erst binden, nachdem CREB am Ser-133 phosphoryliert worden ist.^[109,110] Als Antwort auf unterschiedliche externe Stimuli können verschiedene Kinasen, wie die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA), mehrere Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Calci-

um/Calmodulin abhängige Kinasen (CaM) diese Phosphorylierung katalysieren.^[111,112]

2.2.2 Regulation und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Je nachdem welcher TF an ein Gen bindet, kann die Transkription verstärkt oder vermindert werden. Daher wird die Genexpression zunächst über die Molekülanzahl der TFs in einer Zelle reguliert, indem die **Expression der TFs** selbst reguliert wird. Hierzu haben Genexpressionsstudien von 32 menschlichen Geweben gezeigt, dass zwar 161 TFs ubiquitär exprimiert wurden, aber 349 TFs Gewebe spezifisch.^[6] Manche von diesen TFs werden sogar nur in einem Gewebe exprimiert, wie z. B. das Zinkfinger-Protein ZBT323 in den Hoden^[113] oder der Herz spezifische NK2-1 homeobox1 (NKX2-1).^[114] Andere Mechanismen kontrollieren den **Transport der TFs** in den Zellkern (Abb. 6).^[14] Der Glucocorticoidrezeptor (GR) z. B. ist im Zytoplasma an andere Proteine gebunden, bis ein Glucocorticoid-Ligand an die **regulatorische Domäne** bindet und den Rezeptor freisetzt. In Zellkulturen mit rekombinanten Proteinen wurde gezeigt, das GR-Dimere dann in den Nukleus wandern können und dort

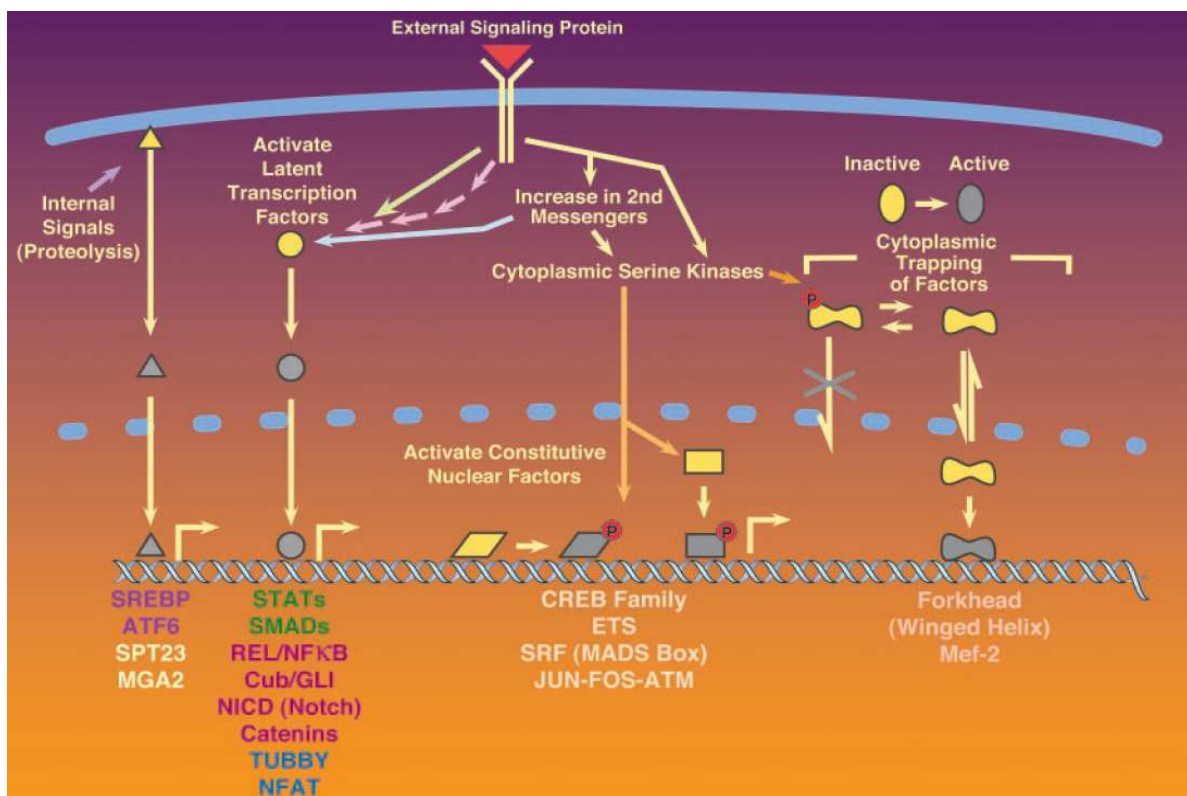


Abb. 6: Mechanismen zur Regulation von Transkriptionsfaktoren

Durch Signaltransduktion verändern extrazelluläre Stimuli über Aktivierung von TFs das Expressionsmuster einer Zelle. Latente TFs im Zytoplasma können modifiziert werden und in den Zellkern wandern (durch Phosphorylierung (grün), Proteolyse (hellblau) und über Second Messenger (hellblau)). Konstitutiv im Kern vorhandene TFs können durch Phosphorylierung aktiviert werden um Co-Faktoren zu binden. Abb. aus Brivanlou und Darnell (2002)^[14]

an die DNA binden.^[115,116] Andere im Zytoplasma ruhende TFs werden reguliert, indem extrazelluläre Signale an Membranrezeptoren übertragen werden. So können die SMAD-TFs direkt am Rezeptor phosphoryliert und so aktiviert werden.^[117] Beim TF NFkappaB wird durch Proteolyse die IkappaB-Untereinheit zerstört, welche den TF darauf hin nicht mehr am Kerneintritt hindern kann.^[118,119] Andere TFs werden über Second-Messenger-Kaskaden aktiviert. Ein Beispiel hierfür ist der TF Nuclear-Factor-of-activated-T-Cells (NFAT) der, wie in Zellkulturen demonstriert wurde, nach Calciumfreisetzung von Calcineurin dephosphoryliert wird und im Zellkern akkumuliert.^[120,121]

2.2.3 DNA-Bindungen von Transkriptionsfaktoren

Mit ihren unterschiedlichen **DNA-Bindungsdomänen** (DBDs) binden TFs sequenzspezifisch an die DNA. Auf Basis dieser charakteristischen Domänen werden die TFs in Haupt- und Unterklassen eingeteilt.^[122-125] Zu den Superklassen gehören die basischen, Zink koordinierten, Helix-turn-Helix- und Beta-Faltblatt-DBDs.^[125] Mittels Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen durchschnittlich 24 Aminosäureresten einer DBD und 12 DNA-Basen, sowie dem DNA-Rückgrat, binden die TFs an spezifische Sequenzmotive der DNA.^[124,126,127] Die DNA-Bindung von TFs ist ein dynamischer Prozess,^[128] bei dem die Kontakte zwischen DNA und TFs zufällig und transient entstehen. So wurde in Zellen durch FRAP-Analysen (Fluorescence Recovery after Photobleaching) gezeigt, dass viele TFs an Chromatin ohne Zielsequenzen gebunden sind.^[129] Durch Einzel-Molekül-Beobachtung in Bakterienzellen wurde weiterhin nachgewiesen, dass der lac-Repressor die meiste Zeit an Chromatin, nicht aber an seine spezifische Zielsequenz gebunden ist.^[130] Weitere FRAP-Experimente mit Mauszellen haben gezeigt, dass TFs stabiler an das Chromatin binden, wenn eine passende DNA-Sequenz gefunden wird.^[131,132] Dabei kann ein TF an verschiedene DNA-Motive binden und unterschiedliche TFs an dasselbe Motiv.^[133] Da die Bindungsaffinitäten der TFs zu Sequenzmotiven unterschiedlich sind, ergibt sich daraus eine Konkurrenz um diese Bindungsstellen. Die Spezifität der TF-Bindung an die DNA wird zusätzlich dadurch erhöht, dass TFs häufig über ihre **Dimerisierungsdomänen** mit unterschiedlichen Partnern Komplexe bilden. Struktur- und thermodynamische Studien belegen, dass dieses sich wiederum auf die Bindungsaffinität auswirkt.^[133,134] Des Weiteren wird die TF-Bindung an die DNA durch Chromatinstrukturierung reguliert. Wie bei den Proteinen des PIC (siehe oben), muss auch für die TFs der Zugang an die DNA offen sein. Um einen kondensierten Genlokus für TFs zu öffnen, müssen erst andere TFs an zugängliche Genbereiche binden. Dort rekrutieren sie Proteine der Chromatinstrukturierung, um eine offene Struktur an dem anderen Lokus zu schaffen. Daraufhin können die anderen TFs binden, um die Transkriptionsrate zu verändern.^[27]

Zusammenfassend kann ein TF differenziell auf die Genexpression wirken, über seine Anzahl im Zellkern, über die Affinität zu spezifischen DNA-Sequenzen und über die Bindung weiterer Proteine der Genregulation. Wie das konkret für einen bestimmten TF aussehen kann, soll am Activating-Transcription-Factor-2 (ATF2) erklärt werden, der an der Stressantwort beteiligt ist.

2.3 Activating-Transcription-Factor-2 (ATF2)

Der TF ATF2^[12,135] (Synonym: CREB-BP1^[136]) wird in allen Organen des Menschen exprimiert, mit der höchsten Expressionsrate im Gehirn.^[137] Eine kleinere Isoform, der ATF2-small (ATF2-sm), wird ebenfalls ubiquitär exprimiert.^[138] Durch alternatives Splicing fehlen dessen mRNA die meisten Exons, die für funktionelle Domänen kodieren. In transfizierten Myometriummzellen sind beide Isoformen überexprimiert worden und es konnte gezeigt werden, dass ATF2-sm transkriptionell aktiv ist und dabei andere Gene reguliert als der Full-Length-ATF2.^[139] ATF2 gehört zur ATF/CREB-Familie der basischen Leucinezipper (bZIP).^[140,141] Die wichtigsten Domänen sind der Leucinezipper, zur Dimerisierung mit anderen TFs, die basische Region zur DNA-Bindung und verschiedene Phosphorylierungsstellen zur Regulation der transkriptionellen Aktivität. Unter Wachstumsbedingungen ohne Stress zeigt ATF2 eine geringe Transaktivierung von Genen. Durch *in vitro* Protein-Interaktions-Assays wurde eine Interaktion der bZIP- und der **Aktivierungsdomäne** demonstriert, wodurch sich ATF2 selbst intramolekular inhibieren könnte.^[142] Über Phosphorylierungen durch Kinasen kann die Verbindung unterbrochen werden, woraufhin ATF2 dimerisiert um die Transkription zu aktivieren.^[141,143,144] In Zellkulturen wurde demonstriert, dass verschiedene Stressstimuli wie Entzündungen, UV-Strahlung, DNA-Schäden oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *engl.* reactive oxygen species) die Transkription über ATF2 induzieren können (Abb. 7).^[145] Dazu phosphorylieren die Jun-N-terminale-Proteinkinase JNK (Synonym: SAPK, Stress-aktivierte-Proteinkinase)^[146-148] oder die p38^[149] die Aminosäurereste Threonin (Thr) 69 und 71. Beide Enzyme gehören zu den MAPKs. Des Weiteren kann ATF2 durch Wachstumsfaktoren über den RAS-ERK-Signalweg aktiviert werden (Phosphorylierung von Thr71). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass der aktivierte ATF2 **Homo- oder Heterodimere** bilden kann, die unterschiedlich stark an die DNA binden. Potenzielle Partner sind TFs der bZIP-Familie, wie Fos, Fra2, c-Jun, CREB und ATF1, deren Aktivitäten ebenso durch unterschiedliche Signalwege reguliert werden.^[150,151] So können einzelne Stimuli zu der Bildung verschiedener ATF2-Komplexe führen und unterschiedliche Genexpressionsmuster hervorrufen.^[152] Die ATF2-Aktivität ist direkt vom Dimerisierungspartner abhängig. In transfizierten Zellen wurde nachgewiesen, dass c-Jun als Partner den Transport von ATF2 in den Zellkern beeinflussen kann.^[153] Mit großer Affinität bindet ATF2 *in vitro* an die **DNA-Motive** Cyclic-AMP-

Response-Element (CRE) und TPA-Response-Element (TRE).^[154] Wie stark ATF2 an welche Motive bindet, hängt u. a. auch vom Dimerisierungspartner ab.^[150] Am Häufigsten wird das ATF2/c-Jun-Dimer gebildet. Dieses führte in Zellkulturexperimenten bei einem Vergleich von Promotorbindungen (ChIP) und mRNA-Expression zu einer Verstärkung der Transkription.^[155] Hieran beteiligen kann sich die HAT p300, die als Co-Faktor an ATF2/c-Jun bindet.^[156-158] Die Zielgene von ATF2 wirken u. a. an der Homöostase, dem Wachstum und der Stressantwort mit.^[12] Eine andere von der Transkription unabhängige Funktion nimmt ATF2 bei der **DNA-Reparatur** ein (Abb. 7). Nach DNA-Schädigung wird ATF2, zumindest *in vitro*, durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase-related-Kinasen (PIKK) ATM-, ATR- oder PI3K-Kinase an Serin 490 und 498 phosphoryliert. In Zellen führte dies an der DNA-Reparaturstelle zu einer Co-Lokalisation von ATF2 mit den Komponenten der DNA-Reparaturmaschinerie Rad50, Nbs1 und Mre11.^[159] Dabei bindet ATF2 nicht an die DNA, wie Versuche mit ATF-2-Mutanten gezeigt haben, bei denen die DNA-Bindungsdomäne deletiert wurde.

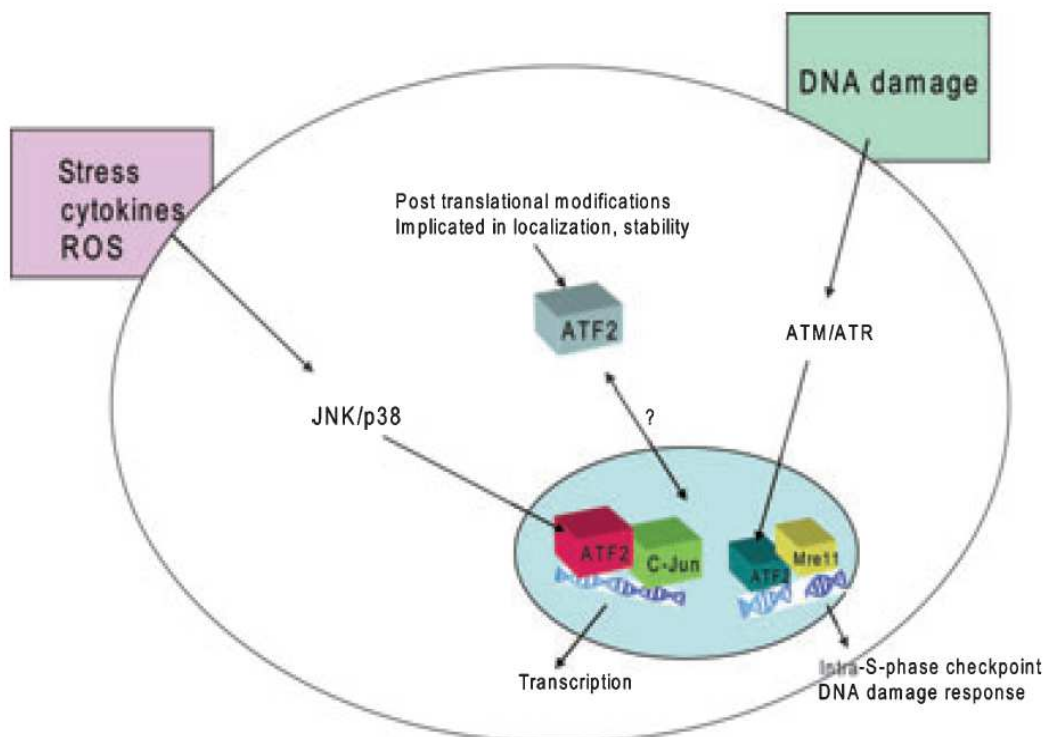


Abb. 7: ATF2-Signalwege und Funktion

ATF2 wird Stimulus abhängig über verschiedene Signalwege aktiviert, um an Transkription oder DNA-Reparatur mitzuwirken. Abb. aus Bhoumik et al. (2007)^[12]

2.4 Regulierende DNA-Elemente

Damit **trans-Elemente**, wie die spezifischen Transkriptionsfaktoren, zielgerichtet an die DNA binden um bestimmte Gene zu regulieren, benötigen sie spezifische Zielsequenzen, die von den Transkriptionsfaktoren erkannt werden können. Deshalb besitzen Protein kodierende Gene von Metazoen neben der Sequenz zur Transkription der Prä-mRNA, auch regulatorische DNA-Elemente, die **cis-Elemente**. Hierzu gehören ein Promotor und distale regulatorische Elemente (siehe Abb. 8).^[4] Der **Promotor** ist ungefähr eintausend Basenpaare groß und unterteilt sich in den Kern- und proximalen Promotor. In der Region des **Kernpromotors** binden die GTFs um den PIC zusammenzusetzen. Durch verschiedene Kernpromotorelemente werden die Transkriptionsstartseite (TSS) und die Richtung der Transkription bestimmt.^[160] Zu diesen Elementen gehört u. a. die TATA-Box, an die TBP bindet. Die Region direkt vor dem Kernpromotor bildet den **proximalen Promotor**, der verschiedene Bindungsseiten für TFs besitzt, wie u. a. durch *in vitro* Mutagenese gezeigt worden ist.^[161] Zu den distalen regulatorischen Elementen gehören Enhancer, Silencer, Insulator und Locus-Control-Region (Abb. 8)^[4] **Enhancer** erhöhen generell die Transkriptionsrate von Genen.^[162-164] Sie sind unabhängig in ihrer Orientierung und Entfernung zu einem Promotor. Enhancer bestehen aus Clustern von TF-Bindungsstellen (TFBSs). *In vitro* Bindungs-Assays und Reporter-Assays mit Zellkulturen haben gezeigt, dass TFs an Enhancern kooperativ arbeiten um die Transkription zu erhöhen.^[106,165] Enhancer können hunderte von Kilobasenpaaren stromaufwärts oder -abwärts von einem Promotor liegen, sowie in Introns oder am 3'-Ende eines Gens.^[166,167] Für die Interaktion eines Enhancers mit einem Promotor wird das

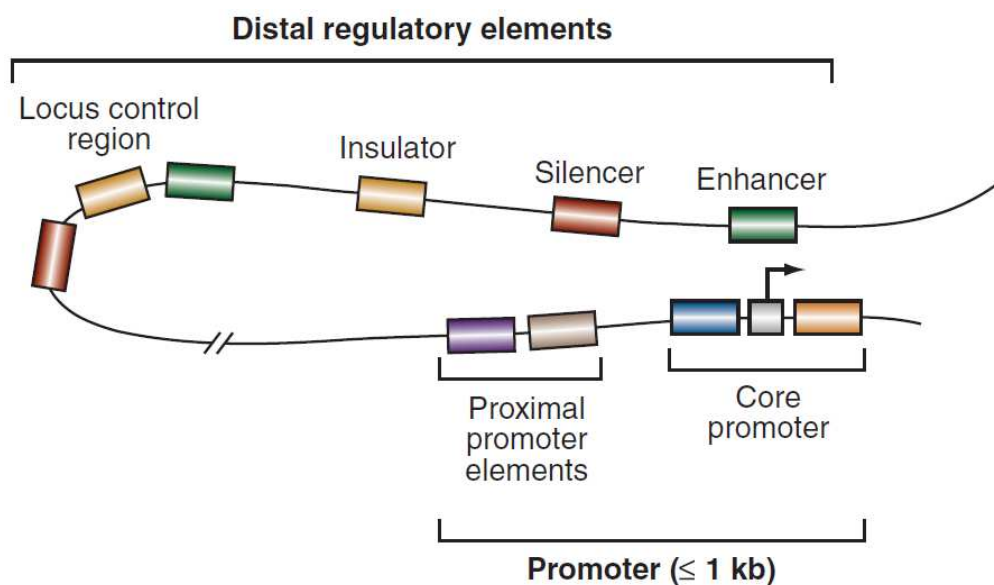


Abb. 8 Regulatorische *cis*-Elemente eines Gens bei Metazoen

Durch Krümmung der DNA (Looping) kontaktieren distale regulatorische Elemente den Promotor eines Gens, um dessen Transkription zu regulieren. Abb. aus Maston et al. (2006)^[4]

Modell des DNA-Loopings favorisiert. Dabei wird die DNA so gekrümmt, dass Enhancer und Promotor sich annähern, um mit anderen Elementen der Transkriptionsmaschinerie zu interagieren.^[168] **Silencer** teilen die meisten Eigenschaften der Enhancer, nur dass sie repressiv auf die Transkription wirken.^[169] Ein weiteres *cis*-Element sind die **Insulators** (auch Boundary-Elements genannt). Sie isolieren Gene vor der Beeinträchtigung durch benachbarte aktive Gene. Insulators können zum einen Enhancer-Promotor-Kontakte blockieren^[170] und zum anderen die Ausbreitung von Heterochromatin verhindern.^[171] Verschiedene *cis*-Elemente, wie Enhancer, Silencer und Insulator können wiederum in Clustern zusammengefasst sein, den **Locus-Control-Regions** (LCRs).^[172] Hieran binden TFs, Co-Faktoren und Chromatin modifizierende Proteine, die kollektiv die Genexpression einzelner Gene oder ganzer Gencluster regulieren.^[173]

Im Mittelpunkt der Genexpression stehen die TFs. Sie koordinieren die Transkriptionsmaschinerie, um bestimmte Expressionsmuster hervorzurufen. Hierfür sind auch die *cis*-Elemente essentiell, um die TFs an bestimmte Gene und DNA-Bereiche zu dirigieren. Besonders in den letzten Jahren ist das Interesse an den Interaktionen zwischen TFs und der DNA in den Fokus der Wissenschaft gerückt, auch deshalb, weil die Forschungstechniken weiterentwickelt worden sind und ganz neue Perspektiven eröffnet haben.

2.5 Techniken zur Untersuchung der Genregulation

Bis vor wenigen Jahren wurden die Bindungen von TFs an die DNA entweder *in vitro* durch Protein-Bindungs-Assays untersucht^[174-176] oder durch Reporterassays mit Zellkulturen^[177] (siehe auch oben). So können über einen Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) potentielle Interaktionen zwischen TFs und *cis*-Elementen untersucht werden. Auch mit Hilfe von Reporterkonstrukten lassen sich mögliche regulatorische Funktionen von TFs beobachten. Neuere Techniken wie die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) oder das DNase-Footprinting haben es ermöglicht, DNA-Protein-Interaktionen *in vivo* zu erforschen. So können mit der ChIP-Technik spezifische DNA-Sequenzen auf die Bindung von TFs untersucht werden (Abb. 9). Seit wenigen Jahren ist es sogar möglich durch ChIP-Sequenzierung (ChIP-seq) TF-Bindungsstellen in kompletten Genomen zu identifizieren. Dabei wird die ChIP-Technik mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung kombiniert, die auch als Next-Generation-Sequencing bezeichnet wird. Besonders aus solchen genomweiten Analysen wird erhofft, die Funktionsweise und das Zusammenspiel zu entschlüsseln, durch die *cis*-Elemente, TFs und andere Elemente der Transkriptionsmaschinerie die Genexpression regulieren.^[178,179] Allerdings waren ChIP-Experimente bisher hauptsächlich auf Zellkulturen beschränkt,^[180,181] da große DNA-Mengen benötigt

werden. Mit Geweben aus nativen Tieren gibt es erst eine Handvoll Studien zu TF-DNA-Bindungen.^[182]

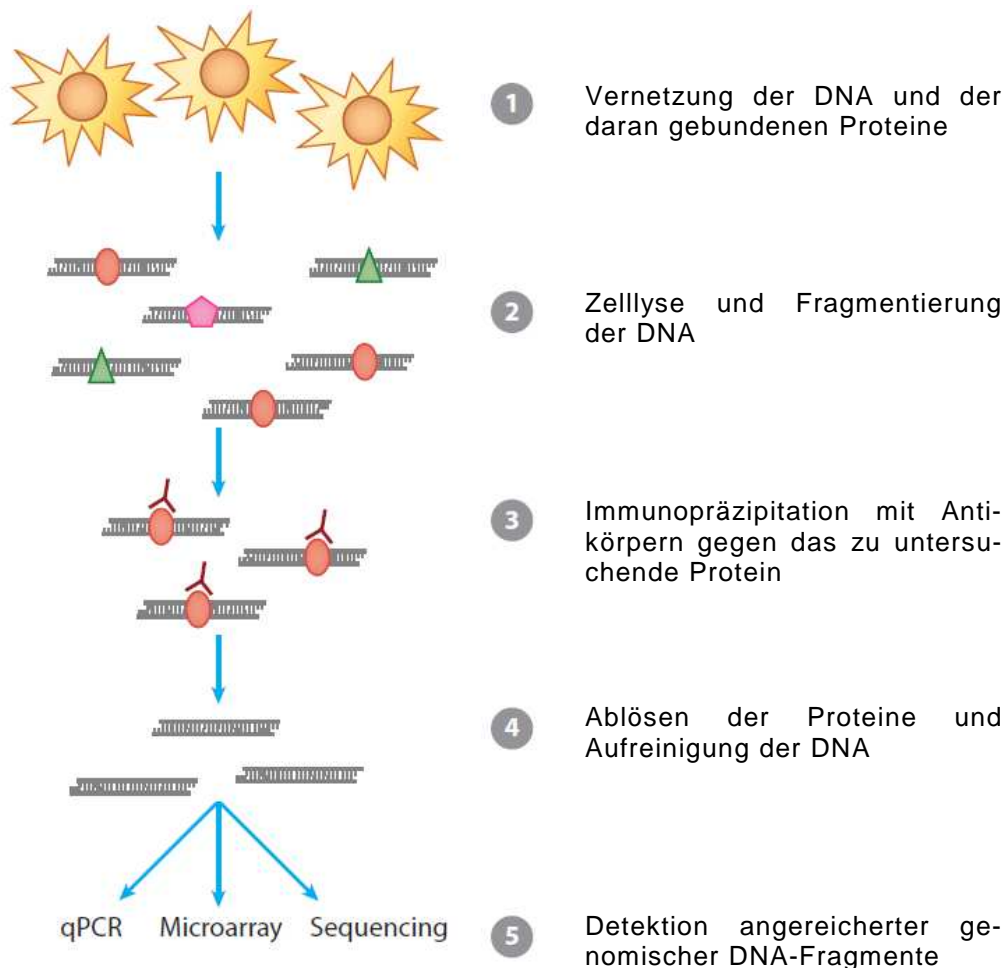


Abb. 9: Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit der ChIP-Technik werden kurze DNA-Fragmente (ca. 200 bis 500 bp) angereichert, an denen ein zu untersuchendes Protein gebunden ist. Die DNA-Probe kann anschließend mit molekularbiologischen Methoden auf Bindungsstellen eines Proteins und der Bindungshäufigkeit untersucht werden. Abb. verändert nach Cheung und Kraus (2010)^[11]

3 Ziel der Arbeit

Die meisten Erkenntnisse darüber, wie TFs mit regulatorischen DNA-Elementen interagieren, um die Genexpression zu regulieren, wurden durch *in vitro* Experimente oder Studien mit Zellkulturen erlangt. Solche Experimente können aber nicht die Genregulation von Metazoen *in vivo* wiedergeben. Im lebenden Organismus interagieren TFs mit anderen Proteinen oder die Chromatinstruktur kann sich so verändern, dass sich auch die Zugänglichkeit von *cis*-Elementen ändert. Auch externe Stimuli beeinflussen die Genregulation. Dies kann in Zellkulturen nicht unbedingt simuliert werden.

Da über die Genregulation durch TF-DNA-Interaktionen *in vivo* wenig bekannt ist, speziell durch distale regulatorische DNA-Elemente, war es Ziel dieser Arbeit, erste Untersuchungen zu diesem Thema durchzuführen. Hierbei sollte Stress eine Veränderung der Genregulation und Expression im Gehirn der Honigbiene *Apis mellifera* induzieren. Daraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

- Etablierung einer *in vivo* ChIP-Methode zur Untersuchung von TF-Bindungsstellen im Bienehirn
- Herstellung von Antikörpern für ChIP-Experimente in der Biene
- Durchführung von ChIP-Experimenten mit der Biene, zur Untersuchung von TF-Bindungen an Promotorbereiche einzelner Gene nach Stress
- Durchführung einer ChIP-Sequenzierung zur Identifikation von Zielgenen und genomweiten TF-Bindungsstellen im Gehirn der Biene nach Stress
- Untersuchung der Auswirkungen von TF-DNA-Interaktionen auf die Transkriptionsstärke im Bienehirn nach Stress

B Methoden und Material

1 Methoden

1.1 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Klonierung und Proteinexpression wurde das pETBlue-2-Perfectly-Blunt-Cloning-Kit (Novagen) verwendet. Dieses enthielt den End Conversion Mix, T4-DNA-Ligase und entsprechende Puffer, den pETBlue-2-Vektor, Nova-Blue-Singles-Competent-Cells, Tuner™(DE3)pLacI-Competent-Cells und SOC-Medium, sowie Positivkontrollen mit Insert-DNA und Plasmiden. Wenn nichts anders angegeben ist, wurde wie im Handbuch beschrieben vorgegangen (TB183). In der Abb. 10 sind die Hauptschritte der Proteinherstellung dargestellt. Diese Übersicht findet sich auch im Ergebnisteil wieder, um dem Verlauf der Proteinherstellung besser folgen zu können.

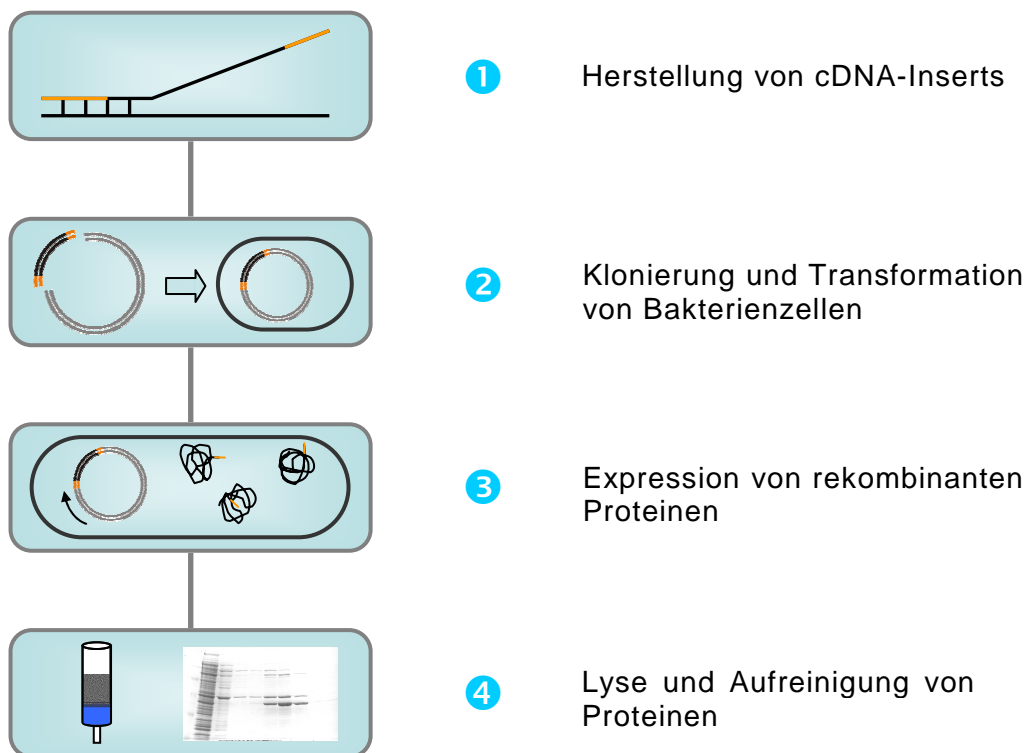


Abb. 10: Herstellung rekombinanter Proteine

(1) Aus extrahierter RNA wird cDNA hergestellt, die dann mit spezifischen Primern amplifiziert wird. **(2)** Das Amplikon (cDNA-Insert) wird in einen Vektor kloniert, mit dem danach Bakterien transformiert werden. Das Plasmid wird vervielfacht, extrahiert und in Expressionsbakterien eingefügt. **(3)** Das rekombinante Protein wird exprimiert, **(4)** lysiert und über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt.

1.1.1 Herstellung von cDNA-Inserts

Durch TRIzol-Extraktion wurde aus Bienenköpfen RNA isoliert und photometrisch quantifiziert. Aus einem Mikrogramm Gesamt-RNA ist unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern, mittels reverser Transkription mit DNA-Verdau, cDNA synthetisiert worden. Zur Herstellung der Inserts für die Klonierung wurde die cDNA dann mit spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Die Primer zur Herstellung von cDNA-Inserts wurden nach dem Handbuch TB183 (Novagen) für den pETBlue-2-Vektor entworfen. Dabei sollte der Forward-Primer möglichst am Startcodon beginnen. Bei beiden Primern musste darauf geachtet werden, dass kein Frameshift entsteht, damit die Aminosäure-Sequenz richtig translatiert wird. Zusätzlich wurden in die reversen Primer Schnittstellen für Proteasen eingebaut, um bei Bedarf die His-Tags abtrennen zu können. Die Amplikons sollten möglichst groß sein, aber maximal 1200 Basenpaare besitzen. Die Länge der Primer sollte zwischen 20 bis 30 Basenpaare liegen und die Schmelztemperatur (T_m) bei 63 bis 65°C. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Vom gereinigten PCR-Produkt/Insert (20 μ l) wurde im Agarosegel über DNA Leitern die Konzentration der DNA-Menge bestimmt und deren Molarität berechnet.

1.1.2 Klonierung und Transformation von Bakterienzellen

Abb. 11 zeigt die detaillierten Schritte zur Herstellung von Expressionsplasmiden. Um die cDNA erfolgreich in den pETBlue-2-Vektor zu inserieren wurde die cDNA im Verhältnis 2,5:1 von Insert zu Vektor eingesetzt. Zuerst wurden die Enden der doppelsträngigen cDNA konvertiert, damit diese sich an die glatten Enden (*engl.* blunt ends) anfügen lassen. Das Anpassen (*engl.* convert) der Insert-Enden und die anschließende Ligation wurden im selben PCR-Reaktionsgefäß im Thermozykler durchgeführt. Danach wurden Nova-Blue-Singles-Competent-Cells (25 μ l) direkt mit dem Ligationsansatz (20 μ l) durch

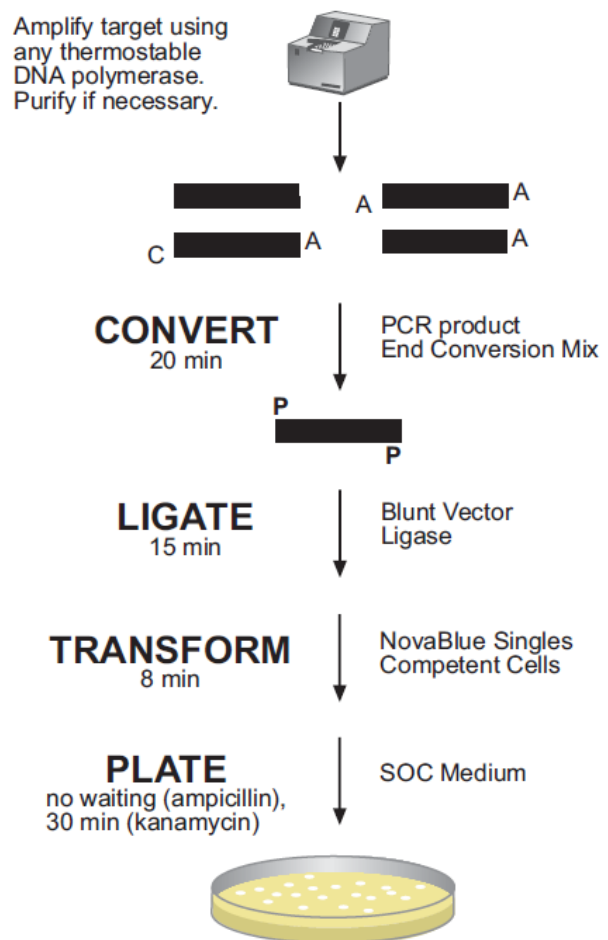


Abb. 11: Herstellung von rekombinanten Plasmiden.

Abb. aus TB183 (Novagen)

Hitzeschock transformiert. Hierzu wurden auf Eis aufgetaute Bakterien und Ligationssansatz vorsichtig im Reaktionsgefäß (1,5 ml) gemischt und für genau 35 Sekunden im Wasserbad (42°C) inkubiert. Der Ansatz wurde dann für eine Minute auf Eis abgekühlt, dann mit warmem SOC-Medium (150 µl) gemischt und für eine Stunde bei 37°C im Inkubationsschüttler (200 rpm) inkubiert. Danach wurden jeweils 50 und 125 Mikroliter der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten^{Amp, Tet} ausplattiert und für ein bis zwei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Positive Klone wurden durch Blue-White-Screening ausgewählt. Dabei wurden sie mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt und direkt nacheinander in einen Reaktionsmix für eine Kolonie-PCR eingerührt, dann auf eine markierte LB-Agarplatte^{Amp, Tet} ausgestrichen und zuletzt in LB-Medium^{Amp, Tet} (3 ml) gegeben. Die Klone auf den Agarplatten wurden hochgezogen. Sie dienten als Backup und wurden vorübergehend bei 4°C gelagert. Durch die Kolonie-PCR mit pETBlueUP- und reversem Klonierungsprimer wurde überprüft, ob die rekombinanten Plasmide jeweils nur ein cDNA-Insert beinhalten, das zudem richtig herum orientiert ist. Von den Klonen, die in der Kolonie-PCR positiv waren, wurden im LB-Medium^{Amp, Tet} Kulturen für die Plasmidpräparation hochgezogen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde dann sequenziert und die Sequenzen durch einen Abgleich mit mRNA-Referenzsequenzen überprüft. Für eine langfristige Lagerung von Klonen wurde Plasmid-DNA in TE-Puffer und Glycerinkulturen mit Bakterien bei -80°C aufbewahrt. Da die Nova-Blue-Singles-Competent-Cells nicht für die Proteinexpression geeignet sind, wurden Tuner™(DE3)pLacI-Competent-Cells (10 µl) mit rekombinanten pETBlue-2-Plasmiden (1 ng) transformiert und im SOC-Medium inkubiert. 20 und 60 Mikroliter der Kulturen wurden auf LB-Agarplatten^{Amp, Cam} ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Klone wurden, wie oben beschrieben, durch Kolonie-PCR überprüft. Positive Klone wurden in Glycerinkulturen langfristig gelagert.

1.1.3 Expression von rekombinanten Proteinen

Die rekombinanten Proteine wurden in den Tuner™(DE3)pLacI-Klonen exprimiert. Der Start der Expression wurde durch IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Dieses wirkt als Laktose-Analogon und inhibiert durch seine Bindung den *lac*-Repressor. Dadurch kann die *E. coli* RNA-Polymerase auf dem DE3-Wirtsvektor an den *lac*-Promotor binden und das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Gen transkribieren. Die exprimierte Polymerase wiederum kann an den T7-Promotor auf dem pETBlue-2-Vektor binden und die inserierte cDNA transkribieren. Dabei wird dem Transkript eine Vektorsequenz angehängt, die für sechs Histidine kodiert (6x-His-Tag). Das His-Tag wird in der Ni-NTA-Aufreinigung benötigt (s. u.).

Vor dem Beginn der Expression wurde LB-Medium^{Amp, Cam} (100 ml) mit Glycerinkultur aus rekombinanten Tuner™(DE3)pLacI-Zellen angeimpft. Über Nacht (16 h) wurde

die Kultur im Inkubationsschüttler (37°C, 220 rpm) hochgezogen. Um eine basale Transkription am T7-Promotor zu unterdrücken, wurde dem Medium vor dem Animpfen ein Prozent Glukose zugegeben.^[183] Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur mit LB-Medium^{Amp, Cam} und einem Prozent Glukose auf einen Liter aufgefüllt und unter gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert. Bei einer Bakterienanzahl mit der optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,3 wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (300 µM Endkonzentration) induziert.

Als Kontrolle für die Expression wurde direkt nach der Induktion (0 h) eine Probe entnommen (Startkultur-Probe, 5 ml). Diese wurde für zehn Minuten zentrifugiert (4°C, 10.000 x g), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 5x SDS-Probenpuffer (200 µl) resuspendiert. Die Probe wurde dann auf Eis sonifiziert (Intervall mit 10 s Ultraschall und 10 s Pause, 40 % Amplitude), bis die Probe zu schäumen anfangt. Anschließend wurde noch dreimal für eine Sekunde beschallt, so dass die Probe nicht mehr zähflüssig war. Dadurch konnten diese besser auf ein Gel aufgetragen werden. Bei -20°C wurden die Proben gelagert.

Die Bakterienkultur wurde nach drei Stunden Expressionszeit geerntet. Um Proben von verschiedenen Zeitpunkten im Proteingel zu vergleichen, müssen die gleichen Proteinmengen aufgetragen werden. Deshalb wurde die Bakteriendichte photometrisch bei der OD₆₀₀ bestimmt und daraus die Probenmengen mit gleicher Bakterienanzahl kalkuliert. Die Bakterienkultur wurde zehn Minuten zentrifugiert (4°C, 10.000 x g) und der Überstand verworfen. Optional wurden die Bakterienpellets bei -20°C gelagert.

1.1.4 Lyse und Aufreinigung rekombinanter Bakterien

Um rekombinante Proteine für die Herstellung von Antikörpern einzusetzen, sollen die Proteine möglichst rein vorliegen. Würden Tiere mit verunreinigten Proteinlösungen immunisiert werden, könnten sich zu viele Antikörper entwickeln, die unspezifisch für das gewünschte Antigen sind.

Lyse der Bakterienzellen

Für die Zelllyse wurde das Bakterienpellet aus der Proteinexpression in 1x Ni-NTA Bindepuffer (2 ml/g Pellet) mit einer Glaspipette (25 ml) resuspendiert. Dazu wurde Lysozym mit einer Endkonzentration von 50 kU/g (\approx 2,5 mg Lysozym/g Pellet) zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf dem Inkubationsschüttler inkubiert (30°C, 75 rpm). Lysozym hydrolysiert Glykosidbindungen in den Zellwänden der Bakterien, wodurch die Zellwände instabil werden. Schließlich wurden die Zellen aufgebrochen, indem das Bakterienlysat dreimal abwechselnd im flüssigen Stickstoff eingefroren und im warmen Wasserbad aufgetaut wurde. Anschließend wurde das Lysat auf Eis zehnmal sonifiziert (Intervall mit 10 s Ultraschall und 10 s Pause, 60 % Amplitude).

Von dem Lysat wurden 15 Mikroliter Probe mit 45 Mikroliter 5x SDS-Probenpuffer gemischt und für die Analyse im Proteingel aufgehoben (3h-Expression-Probe).

Fraktionierung des Lysats

Rekombinante Proteine können in der Bakterienzelle in gelöster Form vorliegen oder als unlösliche Aggregate, den so genannten Inclusion-Bodys. Über verschiedene Zentrifugationsschritte können die Proteine des Bakterienlysats in Fraktionen getrennt werden, wodurch der Anteil der rekombinanten Proteine am Gesamt-Proteinanteil gesteigert wird.

Das frische Lysat wurde 30 Minuten zentrifugiert (4°C, 10.000 x g). Vom Überstand wurden, wie oben beschrieben, 15 Mikroliter Probe entnommen und mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt (Überstand-Probe). Der restliche Überstand, der evt. gelöste rekombinante Proteine enthalten konnte, wurde bei -20°C gelagert. Um mögliche Inclusion-Bodys des Zellpellets zu lösen, wurde das Pellet in Ni-NTA-Denaturierungspuffer/8 M Urea (5 ml) mit einer Glaspipette (25 ml) resuspendiert und 15 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur im Inkubationsschüttler inkubiert (100 rpm), bis sich ein klares Lysat gebildet hat. Wie zuvor wurden 15 Mikroliter Probe entnommen (Pellet-Probe). Das Lysat wurde dann 30 Minuten zentrifugiert (4°C, 10.000 x g). Vom Überstand wurden wieder 15 Mikroliter Probe entnommen (Pellet-Überstand-Probe). Weil Urea für die Ni-NTA-Aufreinigung ungeeignet ist, wurde der Pellet-Überstand über Nacht bei 4°C in 1x PBS dialysiert und optional bei -20°C gelagert. Im ersten Überstand (Überstand-Probe) waren die Proteine im Ni-NTA-Bindepuffer gelöst. Deshalb konnte diese Probe direkt in der Ni-NTA-Aufreinigung eingesetzt werden. Die entnommenen Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Ni-NTA-Proteinaufreinigung

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde Ni-NTA-His-Bind-Resins (Novagen) verwendet. Die Aufreinigung basiert auf dem Protokoll „Batch purification under native conditions“ aus dem Handbuch TB273.^[184] Ni-NTA-His-Bind-Resin reinigt rekombinante Proteine mit His-Tag-Sequenz durch Metall-Chelation-Chromatographie auf (Abb. 12). Die rekombinanten Proteine binden dabei über die Affinität ihrer 6x His-Tags an die Ni²⁺-Kationen, welche am NTA-Resin immobilisiert sind. Der Chelator NTA (*engl.* nitriloacetic acid) ist kovalent an eine Resin-Matrix gebunden. Nachdem ungebundene Proteine ausgewaschen sind, werden die rekombinanten Proteine mit Imidazol eluiert. Imidazol ist ein Chelator, mit einer hohen Affinität zu Ni²⁺-Kationen und konkurriert mit den His-Tags um die Bindung an Ni-NTA.

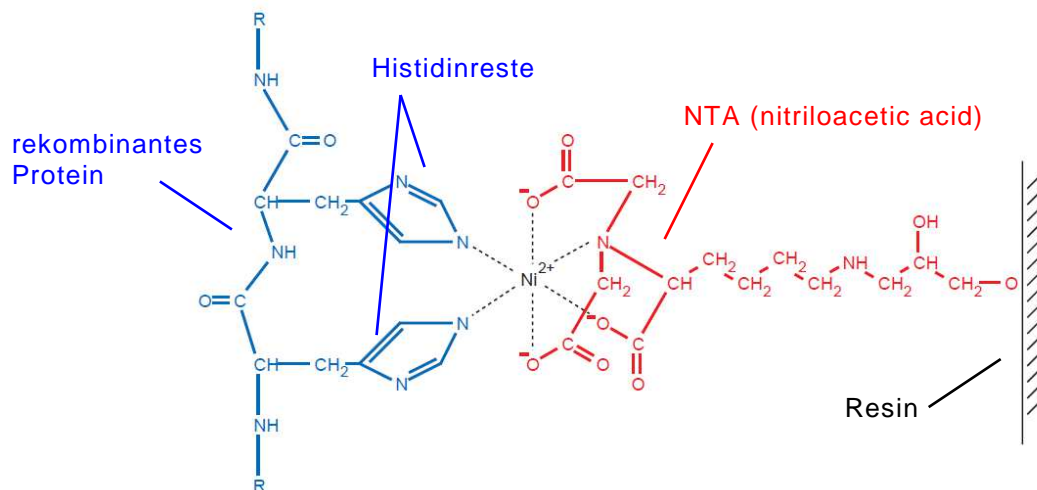


Abb. 12: Bindung von Histidinresten an Ni-NTA-Resin

Abb. verändert nach The QIAexpressionist 06/2003 (Quiagen).

Das Ni-NTA-His-Bind-Resin (2 ml) wurde zunächst mit 1x Ni-NTA-Bindepuffer (8 ml) gewaschen. Dann wurde das Lysat (10 ml) vorsichtig mit dem Resin vermischt und 60 Minuten geschüttelt (200 rpm), damit die rekombinanten Proteine an das Ni-NTA binden. Anschließend wurde der Lysat-Ni-NTA-Resin-Mix auf eine Säule gefüllt. Im Folgenden wurden alle Eluate aufbewahrt. Nachdem das Lysat durchgelaufen war, wurde zweimal mit 1x Ni-NTA-Waschpuffer (8 ml) gewaschen. Dem Bindepuffer (20 mM) und dem Waschpuffer (50 mM) wurden geringe Konzentrationen Imidazol hinzugefügt, um Bindungen von Proteinen ohne His-Tag zu erschweren. Abschließend wurde jeweils mit einem Milliliter Ni-NTA-Elutionspuffer mit aufsteigender Imidazolkonzentration eluiert (dreimal 200 – 300 mM und einmal 500 mM Imidazol). Alle Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Eluate wurden in 1x PBS dialysiert und über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Über den Bradford-Assay zur Proteinbestimmung wurden die Mengen und Konzentration der Proteine berechnet. Proben wurden bei -20°C gelagert.

1.2 Herstellung von Antikörpern

Zur Herstellung von Antikörpern wurden Mäuse und Ratten immunisiert. Dabei wurde den Tieren ein rekombinantes Protein, versetzt mit Adjuvanzen, appliziert. Über einige Monate bekamen die Tiere mehrere Booster-Injektionen (Auffrischung der Antigene) verabreicht. Antikörper der entnommenen Blutseren wurden im Western-Blot mit Bienenhomogenat auf ihre Spezifität überprüft. Von Tieren mit potentiellen Antikörpern wurden polyklonale oder monoklonale Antikörper hergestellt.

1.2.1 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden Blutseren immunisierter Ratten über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde mit Affi-Gel-15-Gel (Bio-Rad) basierend auf dem Handbuch durchgeführt. Dabei werden Antigene (rekombinante Proteine) an N-hydroxy-succinimid-Estern immobilisiert, die wiederum kovalent an Agarosekügelchen gebunden sind. Spezifische Antikörper werden dann an die immobilisierten Antigene gebunden und unspezifische Antikörper werden ausgewaschen. Abschließend werden die spezifischen Antikörper eluiert und auf Western-Blots mit Bienenhomogenat oder rekombinantem Protein auf ihre Spezifität hin getestet.

Um eine Degradation von Proteinen zu vermeiden, wurden alle Puffer auf 4°C gekühlt und danach wurden die pH-Werte eingestellt. Arbeitsschritte mit längeren Inkubationszeiten wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Kopplung des Antigens

Vor der Kopplung des Antigens an das Affi-Gel-15, wurden zwei Milligramm gereinigtes rekombinantes Protein (5,5 ml in 1x PBS) in 100 mM MOPS-Puffer (pH 6,5) dialysiert. Zwei Milliliter Affi-Gel-15-Suspension (in 50 % Isopropanol) wurden auf einen Büchnerfilter gegeben, der an eine Saugpumpe angeschlossen war. Auf dem Filter wurde das Affi-Gel-15 mit Aqua dest. (10 ml) gewaschen und in zehn Milliliter 100 mM MOPS-Puffer (pH 6,5) resuspendiert. Zum Koppeln wurde das Affi-Gel-15 zusammen mit dem rekombinanten Protein in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) gegeben und vier Stunden auf einem Schüttler inkubiert (4°C, 150 rpm). Anschließend wurde der Puffer mehrmals ausgetauscht und das Affi-Gel-15-Proteingemisch wurde zweimal mit zehn Milliliter 100 mM MOPS-Puffer (pH 6,5) und einmal mit zehn Milliliter 10 mM MOPS/1M NaCl (pH 6,5) jeweils für zehn Minuten inkubiert (150 rpm), um nicht gebundene Proteine auszuwaschen. Dann wurden freie N-hydroxy-succinimid-Ester mit neun Milliliter 200 mM Ethanolamin (pH 8,0) über zwei Stunden geblockt (150 rpm). Die Antigen-Affi-Gel-15-Suspension wurde auf eine Säule gefüllt und folgendermaßen bei Raumtemperatur gewaschen (jeweils 10 ml Puffer): zweimal mit 1x PBS, dann mit 10 mM Tris (pH 7,5), danach mit 100 mM Glycin (pH 2,5), darauf zweimal mit 10 mM Tris (pH 8,8), bis der pH-Wert eingestellt war, anschließend mit 100 mM Triethylamin (pH 11,5) und zuletzt zweimal mit 10 mM Tris (pH 7,5), bis der pH-Wert eingestellt war. Es wurden jeweils Proteinproben vor und nach der Kopplung, sowie von den Waschschritten entnommen, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Comassie angefärbt. Hierbei sollte untersucht werden, wie viel Protein an das Affi-Gel 15 gekoppelt wurde.

Antikörperaufreinigung

Zwei Milliliter Blutserum aus immunisierten Ratten wurde für zehn Minuten zentrifugiert (4°C, 25.000 x g). Der Serumüberstand mit den Antikörpern wurde mit 18 Milliliter 10 mM Tris (pH 7,5) gemischt und teilweise auf die Affi-Gel-15-Säule mit dem gekoppelten Antigen gegeben. Der Rest des Serumüberstands wurde in ein Becherglas gefüllt. Die Säule wurde mit einem Gummistopfen verschlossen und an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Die Konstruktion wurde so aufgebaut, dass die Lösung aus der Säule in das Becherglas mit Antikörper läuft und von da wieder in die Säule gepumpt wird. So konnte die Antikörperlösung bei 4°C über Nacht immer wieder an den Antigenen auf der Säule vorbeilaufen, um dort zu binden. Anschließend wurde mit 20 Milliliter 10 mM Tris (pH 7,5) und dann mit 20 ml 10 mM Tris/500 mM NaCl (pH 7,5) gewaschen. Danach wurde das Affi-Gel-15 jeweils für fünf Minuten mit den Elutionspuffern inkubiert und die Antikörper eluiert. Hierbei wurde zunächst achtmal mit je einem Milliliter Glycin (pH 2,5) eluiert. Damit der saure Puffer nicht die Antikörper degradiert, wurden die Eluate zur Neutralisation des pH-Wertes in Reaktionsgefäßen mit 100 Mikrolitern 1 M Tris (pH 8,0) aufgefangen. Dann wurde zweimal mit zehn Milliliter 10 mM Tris (pH 8,8) gewaschen, bis der pH-Wert eingestellt war. Danach wurde achtmal mit einem Milliliter 100 mM Triethylamin (pH 11,5) eluiert und wie zuvor mit 100 Mikroliter 1 M Tris (pH 8,0) neutralisiert. Optional konnte die Säule zweimal mit zehn Milliliter 10 mM Tris (pH 7,5) gewaschen werden, bis der pH-Wert eingestellt war. Überdeckt mit 10 mM Tris/NaAcid konnte die Säule bei 4°C gelagert und dann wieder verwendet werden. Die Antikörperfraktionen wurden in 1x PBS dialysiert. Zuletzt wurde je ein Milliliter Antikörperfraktion mit einer Lösung (100 µl) aus 10 % BSA, 0,2 % NaAcid und 1x PBS gemischt und langfristig bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen konnten Antikörper über Wochen bei 4°C gelagert werden. Von den Antikörpern wurden Proben vor der Bindung an das Antigen-Affi-Gel-15, von den Waschschritten und von den Eluat in Western-Blots auf Bienenhomogenat und rekombinantem Protein getestet.

1.2.2 Monoklonale Antikörper

Für die Herstellung von Monoklonalen Antikörpern wurden Mäuse mit rekombinanten Protein immunisiert (Abb. 13). Aus der Milz wurden B-Lymphozyten isoliert und mit Tumorzellen fusioniert. Die entstandenen Hybridomzellen sezernierten Antikörper in das Medium, das dann entnommen und zentrifugiert wurde. Die Mediumüberstände mit den monoklonalen Antikörpern wurden in Western-Blots auf Bienenhohogenat und rekombinanten Proteinen getestet. Ebenso wurden die Antikörper in der Immunhistologie auf Schnitten von Bienenhirnen getestet.

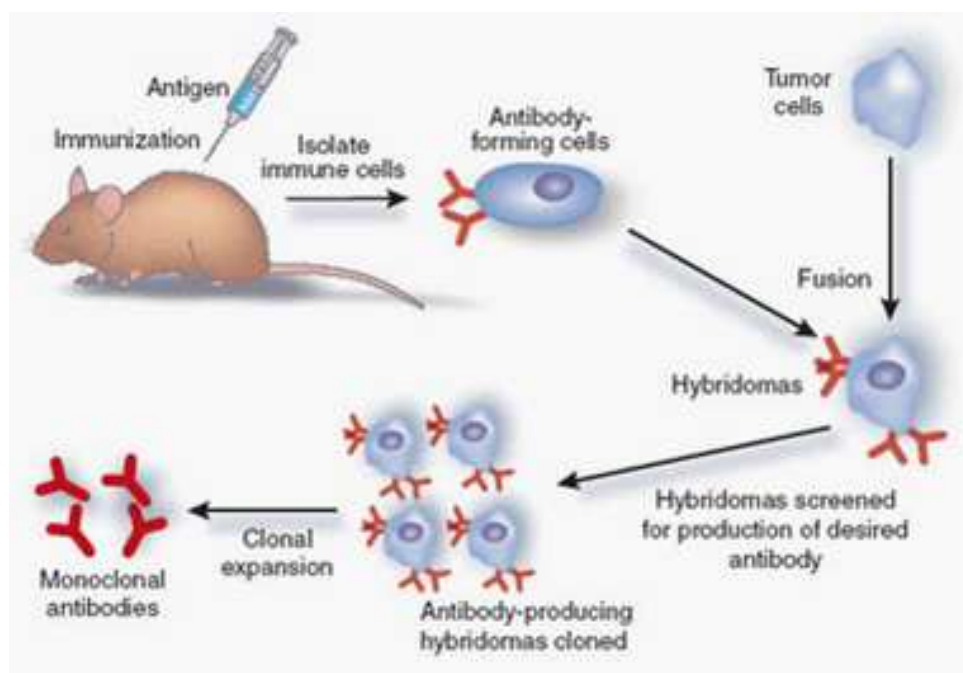


Abb. 13: Herstellung monoklonaler Antikörper

Mäuse werden mit einem bestimmten Antigen immunisiert. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Bildung von Antikörper produzierenden B-Lymphozyten, die sich in der Milz anhäufen. Aus der entnommenen Milz werden die B-Lymphozyten isoliert und mit Tumorzellen fusioniert. Die entstandenen Hybridoma produzieren monoklonale Antikörper, die über Westernblot getestet werden. Abb. aus <http://biological-discoveries.blogspot.com/2009/04/monoclonal-antibodies.html>

1.3 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) werden DNA-Regionen angereichert, an die Proteine wie z. B. Transkriptionsfaktoren (TFs) spezifisch gebunden haben (Abb. 14). Diese DNA-Regionen können dann durch verschiedene Analysetechniken auf ihre Sequenz oder die Quantität der Proteinbindungen untersucht werden. Das ChIP-Protokoll wurde auf der Grundlage des „Cross-Linking Chromatin Immunoprecipitation (X-ChIP) Protocol“ (Abcam) und nach dem Handzettel der Dynabeads-Protein-G (Invitrogen) durchgeführt und abgeändert.

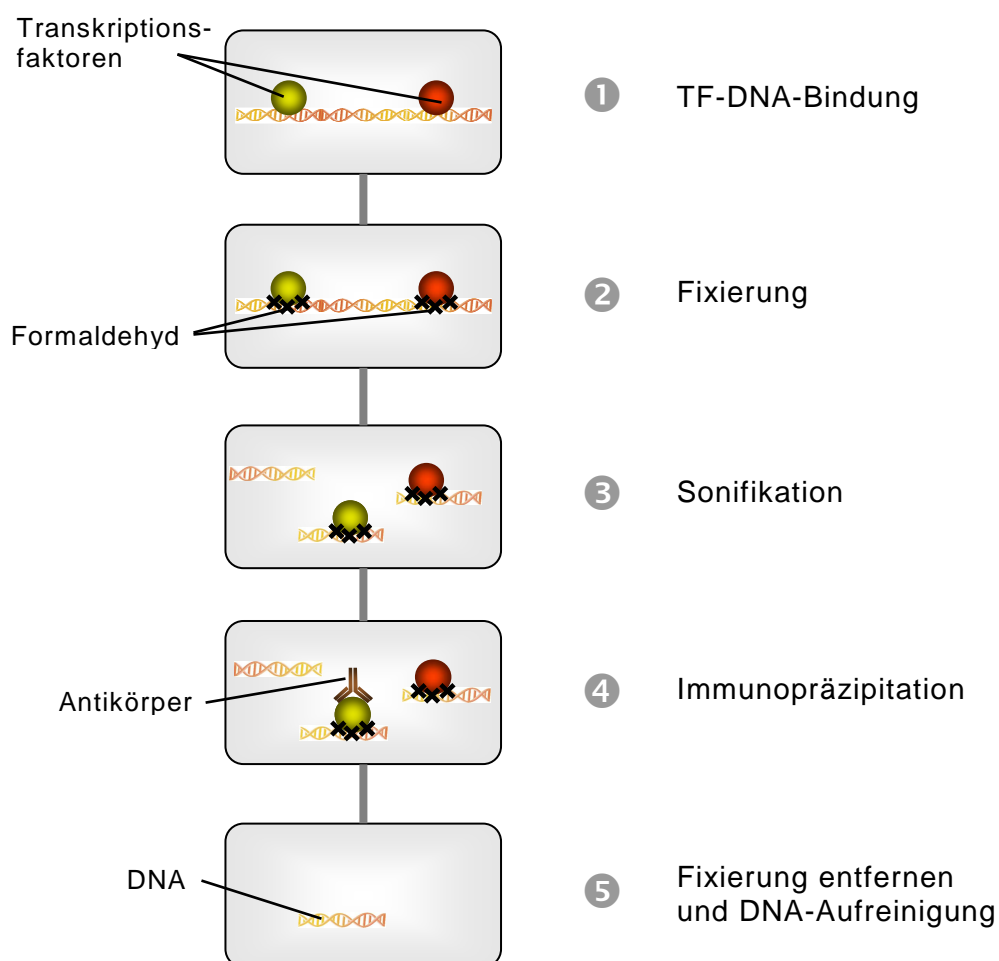


Abb. 14: Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

(1) Transkriptionsfaktoren (TFs), die an DNA gebunden sind, (2) werden mit Formaldehyd daran fixiert. (3) Anschließend wird die DNA durch Sonifikation in 200 – 1000 bp große Fragmente zertrümmert. (4) Bestimmte TF-DNA-Komplexe werden dann mit spezifischen Antikörpern mit der Immunopräzipitation angereichert. (5) Zuletzt muss die Fixierung gelöst und die DNA aufgereinigt werden.

1.3.1 Behandlung der Bienen mit UV-Licht

Transkriptionsfaktoren (TFs) binden spezifisch an die DNA um die Transkription von Genen zu regulieren. Durch den Stressstimulus UV-Licht sollten die Komplexbildungen von TFs (*trans*) und spezifischen DNA-Regionen (*cis*) verändert und im Gehirn der Biene untersucht werden. Hierfür wurden Bienen gefangen, in Röhrchen fixiert, gefüttert und über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden jeweils fünf Röhrchen mit Bienen auf eine Platte mit Vertiefungen gestellt und in einen geschlossenen Holzkasten mit einer UV-Lampe ($\lambda = 365 \text{ nm}$) gestellt (Abb. 15). Ein zweiter Kasten war mit einer Weißlichtlampe bestückt und diente der Behandlung von Kontrolltieren. Die Bienen wurden für 30 Minuten mit UV- oder Weißlicht bestrahlt und aus dem Kasten genommen. Nach unterschiedlichen Zeitspannen wurden die Gehirne herauspräpariert.

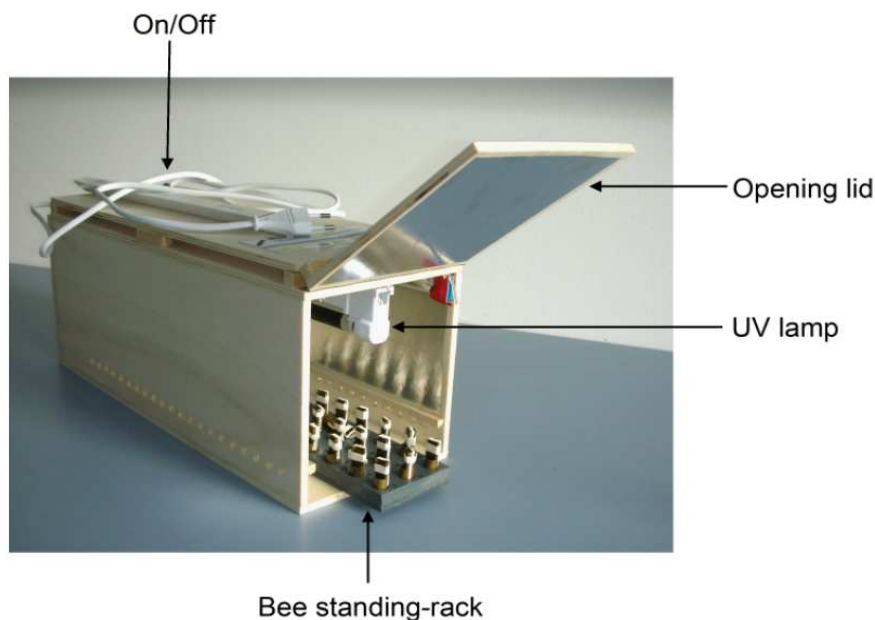


Abb. 15: Kasten mit UV-Lampe

Bienen wurden 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Abb. aus Iqbal (2009)^[2]

1.3.2 Fixierung der TF-DNA-Komplexe

Für eine Probe wurden fünf frisch präparierte Hirne in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit einprozentigem Formaldehyd (475 μl) in 1x PBS gesammelt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler fixiert. Um die Fixierungsreaktion abzustoppen wurden den Proben 2,5 M Glycin (25 μl) mit einer Endkonzentration von 125 Millimolar zugegeben. Die Proben wurden mindestens für zehn Minuten auf Eis geschüttelt, bis alle Gehirne fixiert waren. Danach wurden die Gehirne dreimal mit kaltem 1x PBS (1 ml) gewaschen. Dazu wurden die Hirne abzentrifugiert (1 min, 1000 x g, 4°C) und die Überstände verworfen. Die Gehirne wurden dann zusammen

mit kaltem RIPA-Puffer (500 μ l) in einen Glashomogenisator pipettiert und dort mit einer S-Pistille auf Eis zehnmal vorsichtig homogenisiert, um Schaumbildung zu vermeiden. Mit einer Pasteurpipette wurde das Homogenat in ein frisches Reaktionsgefäß (1,5 ml) transferiert.

1.3.3 Sonifikation

Das frische Hirnhomogenat wurde sofort auf Eis sonifiziert. Die Sonifikation wurde bei einer Amplitude von 40 Prozent mit 20 Zyklen aus 15 Sekunden Beschallung und 15 Sekunden Pause durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben für zehn Minuten zentrifugiert (8.000 x g, 4°C). Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und bei Bedarf mit RIPA-Puffer auf 500 Mikroliter Volumen aufgefüllt. Optional konnten die Proben im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert werden. Die frischen oder aufgetauten Proben wurden gevortexet und für die (Chromatin-) Immunopräzipitationen (ChIP-Probe, 100 μ l) und die Input-Kontrolle (Input-Probe, 40 μ l) aufgeteilt.

1.3.4 Immunopräzipitation

Bindung der Antikörper an TF-DNA-Komplexe

Zu einer ChIP-Probe (TF-DNA-Komplexe) wurden 40 Nannogramm Antikörper (in 2 μ l Volumen) gegeben und 60 Minuten auf dem Thermomixer inkubiert (1.100 rpm, 25°C). Dabei wurde mindestens eine Immunopräzipitation (IP) mit einem Antikörper gegen einen bestimmten Transkriptionsfaktor durchgeführt und eine IP mit einem IgG-Antikörper, der kein Protein binden soll.

Vorbehandlung der Dynabeads-Protein-G

Während der Inkubationszeit wurden die Dynabeads-Protein-G (Invitrogen) vorbehandelt. Die Dynabeads sind superparamagnetische Kügelchen an deren Oberflächen kovalent rekombinantes Protein G gekoppelt ist. Protein G hat eine hohe Affinität, an IgG-Antikörper zu binden. In einem Magnetständer sammeln sich die Dynabeads an der Wand des Reaktionsgefäßes und der Puffer kann abgenommen werden. Für eine IP wurden 10 Mikroliter Dynabeads (\approx 300 μ g) mit zwei Volumen RIPA-Puffer (20 μ l) vorsichtig mit einer Pipette gewaschen (suspensiert und 2 – 3 min inkubiert) und der Puffer verworfen. Um in der IP unspezifische Bindungen von DNA-Fragmenten oder Proteinen an die Dynabeads zu unterdrücken, wurden die Dynabeads mit einzelsträngiger DNA aus Heringssperma (750 ng/ 10 μ l Dynabeads) und BSA (1 μ g/ 10 μ l Dynabeads) in RIPA-Puffer (20 μ l) für 30 Minuten im Thermomixer geblockt (1.100 rpm, 25°C). Im Anschluss wurden die Dynabeads mit RIPA-Puffer (20 μ l) gewaschen, nochmals in frischem RIPA-Puffer (20 μ l) suspensiert, in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und der Puffer verworfen. Für mehrere Immu-

nopräzipitationen wurden die Dynabeads gemeinsam in einem Reaktionsgefäß behandelt und die Mengen entsprechend angepasst.

Bindung der Antikörper-TF-DNA-Komplexe an Dynabeads-Protein-G

Die ChIP-Probe mit Antikörpern (AK-TF-DNA-Komplexe) wurde vorsichtig mit den vorbehandelten Dynabeads vermischt und 60 Minuten im Thermomixer inkubiert (1100 rpm, 25°C). Um DNA und Proteine, die nicht an die Dynabeads-Protein-G gebunden haben, zu entfernen, wurde dreimal mit ChIP-Waschpuffer (100 µl) gewaschen, wobei der letzte Waschschrift in einem neuen Reaktionsgefäß durchgeführt wurde. Dann wurde nochmals mit ChIP-Finalen-Waschpuffer (100 µl) gewaschen und der Überstand verworfen.

Elution der TF-DNA-Komplexe

Um gebundene TF-DNA-Komplexe wieder in Lösung zu bekommen, wurden die Dynabeads (Dynabead-Protein-G-AK-TF-DNA-Komplexe) mit ChIP-Elutionspuffer (50 µl) für 20 Minuten bei 65°C im Thermomixer inkubiert (1100 rpm). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt.

1.3.5 Auflösen der Fixierung und DNA-Aufreinigung

Zur Auflösung der fixierten TF-DNA-Komplexe und für einen Verdau von RNA, wurden die Eluate (50 µl) und Input-Proben (40 µl) mit ChIP-Elutionspuffer (50 µl zu ChIP-Eluaten und 56 µl zu Input-Proben) und Rnase A (20 µg/ml Endkonzentration) gemischt. Über Nacht wurden die Proben bei 65°C im Thermomixer inkubiert (1.100 rpm). Zuletzt wurden alle DNA-Proben mit dem „High Pure PCR Cleanup Mikrokit“ (Roche) aufgereinigt und mit Elutionspuffer (40 µl, aus Kit) eluiert. Proben wurden bei -20°C gelagert.

1.4 ChIP-seq

Bei der ChIP-Sequenzierung (ChIP-seq) wurde genomische DNA aus Bienenhirnen durch die ChIP-Methode angereichert. Anschließend wurde die DNA mit dem „GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit“ vervielfältigt und mit dem „Genome Sequencer FLX System“ (Roche) sequenziert.

1.4.1 Herstellung der ChIP-Proben

Die Proben wurden auf Grundlage der ChIP-Methode hergestellt. Jeweils 50 Bienen wurden 30 Minuten lang mit Weißlicht oder UV-Licht behandelt und eine Stunde danach wurden ihre Gehirne präpariert. Dabei wurden jeweils fünf Hirne vereint, fixiert, gewaschen und sonifiziert. Die jeweiligen UV- und Weißlichtproben wurden dann vereint. Optional konnten die Proben im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei

-70°C über Nacht gelagert werden. Da die Immunopräzipitation im kleineren Volumen durchgeführt werden sollte, wurden die Proben durch Zentrifugal-Filtration mit „Vivaspin 6, MWCO 10“ (VWR) konzentriert. Die Vivaspin besteht aus einem Zentrifugenröhrchen mit einer Membran in der Mitte. Die Probe aus dem oberen Teil des Röhrchens wandert aufgrund von Zentrifugalkräften durch die Membran in die untere Hälfte. Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als zehn Kilodalton können die Membran nicht passieren. TF-DNA-Komplexe bleiben also im oberen Teil des Röhrchens. Auf diese Weise wurden ca. fünf Milliliter Probe durch Zentrifugation (35 min, 10.000 x g, 4°C) mit der Vivaspin 6 auf einen Milliliter konzentriert. Für die Immunopräzipitation (IP) wurde jeweils das Zehnfache der Reagenzien verwendet, die in der ChIP-Methode angegeben sind. Vom ATF2-Antikörper wurden zwei Mikrogramm eingesetzt. Die Elution der IP-Proben wurde wie gehabt mit 50 Mikrolitern IP-Elutionspuffer durchgeführt. Am Ende der ChIP wurde die gereinigte DNA mit 12 Mikrolitern Elutionspuffer eluiert.

1.4.2 Whole-Genome-Amplification (WGA)

Um DNA-Mengen zu erlangen, die für eine FLX-Sequenzierung notwendig sind, wurde die angereicherte ChIP-DNA (10 - 12 µl) mit dem „GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit“ (WGA2, Sigma-Aldrich) gleichmäßig amplifiziert.^[185] Als Positivkontrolle wurde „Control Human Genomic DNA“ (10 ng) amplifiziert, sowie Nuklease freies Wasser als Negativkontrolle. Die Human-DNA wurde nach Herstellerangaben fragmentiert. Die Reaktionsansätze wurden immer gründlich gemischt und durch kurze Zentrifugation im Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt.

Herstellung einer Bibliothek

Zu jeder Probe (10 µl) wurde 1x „Library Preparation Buffer“ (2 µl) und „Library Stabilization Solution“ (1 µl) pipettiert. Nach gründlichem Vortexen wurde der Reaktionsansatz für zwei Minuten bei 95°C im Thermozykler inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe des „Library Preparation Enzyme“ (1 µl) wurde die Probe wie folgt inkubiert:


20 min	16°C
20 min	24°C
20 min	37°C
5 min	75°C
∞	4°C

Amplifikation

Zu den Bibliothek-Produkten (15 µl) wurden

7,5 µl	Amplification Master Mix (10x)	[1x]
47,5 µl	Nuklease freies Wasser	
5 µl	WGA DNA Polymerase	

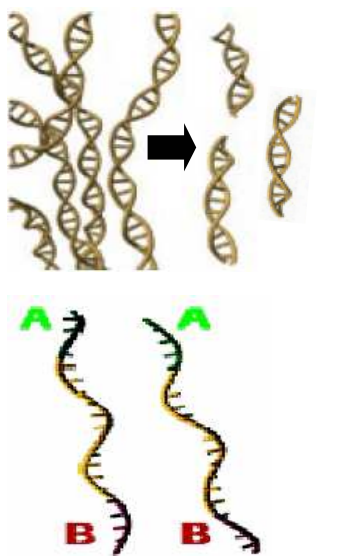
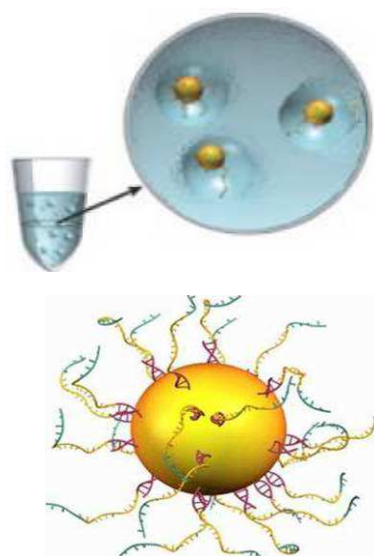
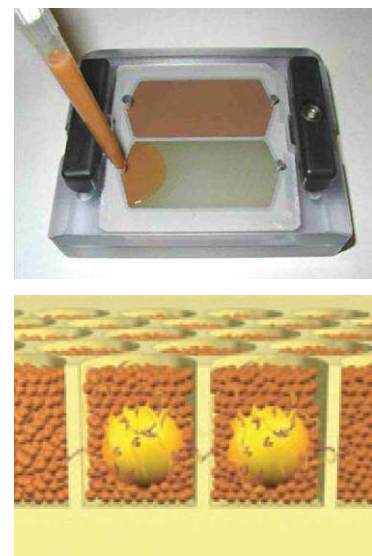
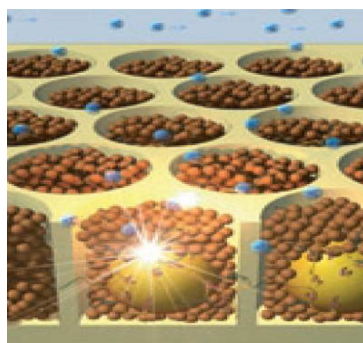
pipettiert und gevortexet. Im Thermozykler wurde der Reaktionsansatz wie folgt inkubiert:

3 min	95°C	 20 Zyklen
15 s	94°C	
5 min	65°C	
∞	4°C	

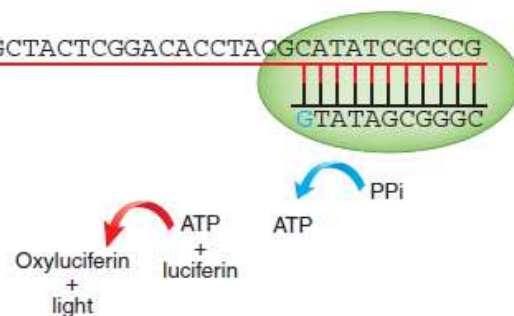
Die WGA-Proben wurden mit dem High Pure PCR Cleanup Mikrokit (Roche) aufgereinigt und zweimal mit je 14 Mikroliter Elutionspuffer eluiert. Durch PicoGreen-Messung wurden die Konzentrationen der Proben und Kontrollen bestimmt. Proben wurden bis zur FLX-Sequenzierung bei -20°C gelagert.

1.4.3 FLX-Sequenzierung

Die Sequenzierung, durch ChIP angereicherter DNA-Fragmente aus dem gesamten Genom (Whole-Genome-Sequencing), wurde in der Genetik (Universität des Saarlandes) mit dem „Genome Sequencer FLX System“ (Roche) durchgeführt (Abb. 16).^[15] Mit dieser Hochdurchsatz-Sequenzierung, auch Next-Generation-Sequencing oder 454-Sequencing genannt, können in einem Lauf innerhalb von zehn Stunden bis zu 400 Megabasenpaare sequenziert werden. Das entspricht einer Million Shotgun- oder 700.000 Amplikon-Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge von 400 Basenpaaren. Für die Durchführung der Sequenzierung sind folgende „GS FLX Titanium Kits“ verwendet worden: „General Library Preparation Kit“, „SV emPCR Kit (Lib-L)v2“, „PicoTiterPlate Kit 70x75“ und „Sequencing Kit XLR70“.

(a) Bibliothek**(b) emPCR****(c) Beladen der PTP****(d) Pyrosequenzierung**

ACGTGGGCCTATAGCTACTCGGACACCTAAGCATATCGCCCG

**Abb. 16: FLX-Sequenzierung**

(a) Aus genomischer DNA wird eine Bibliothek hergestellt. Hierfür wird isolierte DNA fragmentiert (Bild oben, nicht bei der ChIP-seq), an Adaptoren (A und B) legiert und in einzelsträngige DNA (ssDNA) separiert (Bild unten). **(b)** Die ssDNA-Fragmente werden unter bestimmten Bedingungen an Kügelchen gekoppelt, so dass möglichst nur ein Fragment pro Kügelchen gebunden wird. Die Kügelchen werden dann einzeln in Tropfen aus PCR-Reaktionsmix-in-Öl-Emulsion isoliert und kompartimentiert (Bild oben). In jedem Tropfen werden die ssDNA-Fragmente durch eine Emulsions-PCR (emPCR) amplifiziert und die Kopien an die Kügelchen gebunden. Dann werden die Emulsionen aufgebrochen und die DNA-Stränge werden denaturiert, so dass Kügelchen mit zehn Millionen ssDNA-Kopien der Vorlage entstehen (Bild unten). **(c)** Danach werden die Kügelchen auf eine Picotiterplatte (PTP) geladen (Bild oben). Aufgrund ihres Durchmessers passt immer nur ein Kügelchen in ein Loch (Bild unten). Kleinere Kügelchen (braun), mit immobilisierten Enzymen für die Sequenzierung, werden den Löchern zugefügt. **(d)** Mit dem GS-FLX-System wird dann die Pyrosequenzierung durchgeführt. Dabei wird die ssDNA durch eine Polymerase amplifiziert. Im Wechsel wird der PTP immer eines der vier Nukleotide A, T, G und C zugefügt (Bild links, blaue Kreise). Passt die Vorlage, baut die Polymerase ein oder mehrere Nukleotide in den komplementären Strang ein, wobei Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt wird, das durch Sulfurylase zu ATP konvertiert wird (Bild rechts). Luciferase wiederum konvertiert unter ATP-Verbrauch Luciferin zu OxyLuciferin, wobei Licht produziert wird. Die Intensität der Lichtreaktion wird über eine CCD-Kamera für jedes Loch detektiert. So werden für alle DNA-Fragmente die entsprechenden Sequenzen parallel zusammengesetzt. Abb. verändert nach Rothberg und Leamon (2008).^[15]

1.4.4 Auswertung der ChIP-seq

Abgleich der ChIP-Sequenzen mit der genomischen DNA

Die Rohdaten aus DNA-Sequenzen, Reads genannt, wurden zunächst auf ihre Qualität überprüft. Reads wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, wenn die Sequenzen zu kurz waren (< 70 bp) oder wenn mehr als eine Sequenz pro Loch der PTP detektiert wurde. Mit der Herstellersoftware „GS Reference Mapper“ wurden die Reads an die genomische DNA der Biene (Amel 3.0, HGSC)^[186] angeglichen. Überlappende Reads wurden in Contigs (*engl.* contiguous: angrenzend, zusammenhängend) zusammengefasst und definierten Chromosomenabschnitten (Gene Bank AADG0500xxx) zugeordnet, die mehrere 100.000 Basenpaare groß sein konnten.

Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen

Je mehr Reads ein Contig beinhaltet, desto mehr DNA-Fragmente wurden aus der entsprechenden DNA-Region mit der ChIP angereichert. Da nur DNA-Fragmente angereichert werden sollen, an denen ein bestimmter Transkriptionsfaktor (TF) gebunden hat, ist die Wahrscheinlichkeit einer TF-DNA-Bindung um so höher, desto mehr Reads einen Contig bilden. Um Gene zu finden, an denen ein bestimmter TF gebunden hat, wurden von den UV- und Weißlichtproben die Contigs mit den höchsten Read-Anzahlen über BLAST (NCBI) mit dem Bienengenom (Amel_4.0, RefSeq Genomic) abgeglichen. Die am besten übereinstimmende Sequenz aus dem Genom (kleinstes e-Value) wurde im Map-Viewer (NCBI) betrachtet. Dort wurde sie dem am nächsten gelegenen Gen zugeordnet. Danach konnte die Bindungsintensitäten des TF, bzw. die Read-Anzahlen der Contigs, der UV- und der Weißlichtproben, an dieser DNA-Region verglichen werden. Mit der Zugangsnummer des Chromosomenabschnitts (siehe oben), in dem die gefundene Sequenz lag, wurden mit dem Editor Notepad++ Contigs mit der gleichen Zugangsnummer in der jeweiligen anderen Probe gesucht. Da die Basenpaare der Chromosomenabschnitte durchnummeriert sind, konnte festgestellt werden, ob Contigs beider Proben der gleichen DNA-Region zuzuordnen sind. Dann wurden die Read-Anzahlen beider Proben miteinander verglichen, um zu sehen ob sich die Bindungsintensität des TF verändert hat.

Analyse der gesamten Contigs

Mit einem von Andreas Wagenmann (Lehrstuhl für Computational Biology, Universität des Saarlandes) entwickeltem Computerprogramm wurden, wie oben beschrieben, alle Contigs untersucht. Für den Abgleich mit der genomischen Sequenz wurde die Datenbank Amel_2.0 verwendet.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Contigs an Exons, Introns, Promotor- oder intergenetische **DNA-Elemente** binden. Hierfür wurden die Contig- und genomischen

Sequenzen mit einer mRNA-Datenbank (FTP Data: cDNAs, HGSC) abgeglichen. Gene mit einem oder mehreren Contigs wurden auf ihre biologischen Prozesse hin untersucht und in Kategorien eingeteilt (**Ontologie der Gene**). Hierfür wurden die Gene mit den Programmen „Ontology Tools“ (Lewis-Sigler Institut, Princeton University, USA) und der Gene-Ontology (GO)-Datenbank untersucht.

Definition einer TF-DNA-Bindungsstelle (TFBS)

Da in den ChIP-Proben auch unspezifisch gebundene DNA-Fragmente sein konnten, sollte für die Contigs eine Mindestanzahl von Reads festgelegt werden, um die Contigs als TF-DNA-Bindungsstellen zu definieren. Die Wahrscheinlichkeit (p), dass von den gesamten Reads (R) einer Probe zwei zufällige Reads aus dem gleichen DNA-Bereich des Genoms (G) stammen, sollte unter 0,001 liegen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Read in einer bestimmten DNA Region liegt, ergibt sich aus:

$$p = \frac{R_{\text{Anzahl}} \times R_{\text{Größe}} [bp]}{G_{\text{Größe}} [bp]}$$

Nun musste berechnet werden, ab wie vielen Reads (R_x) die Wahrscheinlichkeit (p) unter 0,001 liegt, dass diese zufällig aus der gleichen genomischen Region stammen. Nach R_x freigestellt ergab sich folgende Rechnung:

$$R_x = \frac{\lg 0,001}{\lg p}$$

1.5 Präparation des Bienenhirns

Bienen wurden mit einer Fangpyramide im botanischen Garten oder mit Plastikröhrchen im Bienenhaus gefangen und auf Eis betäubt. Für Versuche wurden die Bienen mit Klebeband in kleinen Plastikröhrchen fixiert und bei Raumtemperatur in feuchten, abgedunkelten Plastikschrüsseln aufbewahrt. Für die Präparation wurde den Bienen mit einer Rasierklinge der Kopf abgetrennt und dieser mit Hilfe eines LötKolbens in ein Schälchen mit Wachs eingebettet. Die Kopfkapsel wurde mit einem Skalpell zwischen den Antennen und den Ocellen geöffnet (Abb. 17). Drüsen wurden mit einer feinen Pinzette entfernt. Zur Anfertigung von Hirnhomogenat wur-

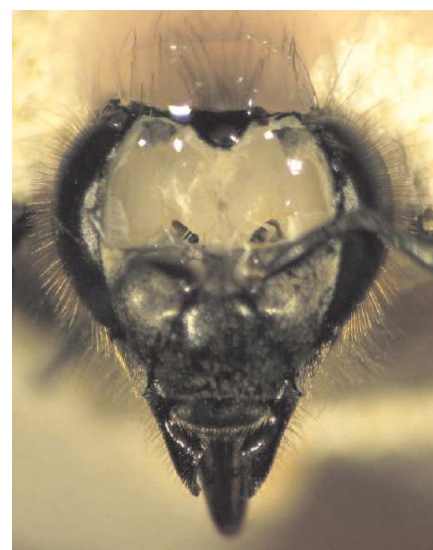


Abb. 17: Biene mit geöffneter Schädelkapsel

Abb. aus Laeger (2007)^[1]

den die optischen Loben abgetrennt, das Gehirn herauspräpariert und sofort im Homogenisierungspuffer mit einem Glas-Homogenisator auf Eis homogenisiert.

Für die Anfertigung histologischer Präparate wurde das Gehirn in der Kopfkapsel 30 Minuten in vierprozentiger Formaldehydlösung vorfixiert, dann herauspräpariert und in dieser Lösung nochmals 3,5 Stunden auf Eis fixiert.

1.6 Quantitative Real-Time-PCR

Mit der quantitativen Real-Time-PCR (Real-Time-qPCR) wurden sowohl DNA-Fragmente der ChIP-Proben, als auch mRNAs quantifiziert. Um verschiedene Proben quantitativ vergleichen zu können, mussten PCR-Produkte während der exponentiellen Phase einer PCR-Reaktion gemessen werden. Bei der herkömmlichen PCR und der Analyse der PCR-Endprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese, muss diese Phase aufwendig ermittelt werden. In der Real-Time-qPCR dagegen wurden die PCR-Produkte der Proben nach jedem PCR-Zyklus quantifiziert. Ein weiterer Vorteil der Real-Time-qPCR war das Verfahren der Quantifikation. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green-I (Sigma-Aldrich) verwendet. Dieser interkaliert in dsDNA und dessen Emission kann daraufhin detektiert werden. Diese Messtechnik ist viel genauer als die Analyse durch Agarosegele.

Die Real-Time-qPCRs wurden mit dem „Mx3000P QPCR System“ (Stratagene) in der Genetik (Universität des Saarlandes) oder dem „MyiQ2 Two-Color Real-Time-PCR Detection System“ (Bio-Rad) in der Botanik (Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die experimentelle Durchführung und Auswertung beruhte auf dem Protokoll von Klätte und Bauer (2009),^[187] sowie den Herstellerangaben. Für die Analyse wurde die entsprechende Herstellersoftware „MxPro QPCR Software für Mx3000P“ (Version 4.1.0.0, Stratagene) und „iQ5 Optical System Software“ (Version 2.1, Bio-Rad), sowie MS-Excel verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden nur sterile RNase und DNase freie Materialien, sowie Filterspitzen für die Pipetten verwendet. Es wurde immer mit Handschuhen gearbeitet. Bei Arbeitsschritten mit SYBR-Green wurde direktes Licht vermieden. Alle Komponenten wurden stets auf Eis gekühlt.

1.6.1 (Real-Time)-qPCR-Primer

Von den (Real-Time)-qPCR-Primern zur Quantifikation von mRNA, bzw. cDNA, sollte mindestens ein Primer Intron überspannend sein. Solch ein Primer bindet an zwei angrenzende Exons. Dadurch wird die Amplifikation von DNA unterbunden, da diese ein Intron zwischen den Exons besitzt und der Primer nicht binden kann. Alle Primer für die Real-Time-qPCR sollten 18 – 25 bp groß sein, eine $T_m = 61 – 63^\circ\text{C}$ besitzen und eine Sequenz von 120 – 150 bp umspannen. Die Primer sollten durch HPLC aufgereinigt sein.

1.6.2 Standards

Um die Effizienz der Real-Time-qPCR zu berechnen und Proben aus verschiedenen PCR-Läufen miteinander vergleichen zu können, wurde in der PCR eine Verdünnungsreihe aus DNA mit bekannter Konzentration mit amplifiziert und eine Standardgerade berechnet.

Als Standards wurden dsDNA-Moleküle verwendet, die durch Amplifikation von DNA (für ChIP-Standards) oder cDNA (für mRNA-Standards) hergestellt wurden. Die Standard-Primer sollten eine Sequenz von 950 – 1050 bp umspannen, innerhalb derer die qPCR-Primer liegen sollten, die ihrerseits mindestens 50 bp von den Enden der Standard-Amplikons entfernt liegen sollten. Außerdem sollten die Standard-Primer 20 – 30 bp groß sein und eine $T_m = 62,5 - 64^\circ\text{C}$ besitzen. Die Standard-PCR-Produkte (2 x 50 μl Ansätze) wurden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Durch PicoGreen-Messung wurden die Standards quantifiziert. Nach folgender Formel wurde dann die Konzentration (Konz) der DNA-Moleküle (Mk) berechnet (Avogadro-Konstante: $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$):

$$DNA_{Konz} [Mk / \mu\text{l}] = \frac{N_A [Mk / mol] \times DNA_{Konz} [g / \mu\text{l}]}{660 [g / mol] \times DNA_{Größe} [bp]}$$

Von den Standards wurden gewünschte Konzentrationen hergestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für die Real-Time-qPCR wurden Standards der zu untersuchenden Gene auf Eis aufgetaut und durch 1:10 Verdünnungen mit HPLC- H_2O wurden Standardreihen von $10^2 - 10^7$ Molekülen pro PCR-Reaktion hergestellt.

1.6.3 Proben

ChIP-Proben

Für die Quantifikation von ChIP-Proben wurden jeweils fünf Bienengehirne homogenisiert (siehe ChIP-Methode). Aus jedem Hirnhomogenat wurden ChIP-Proben aus einer ChIP mit Antikörpern gegen Transkriptionsfaktoren hergestellt und aus einer ChIP mit IgG-Antikörpern (Negativkontrolle). Zur Normalisierung der ChIP-Proben wurde aus demselben Homogenat eine Input-Probe angefertigt. Alle Proben aus dem jeweiligen Hirnhomogenat wurden mit der Real-Time-qPCR quantifiziert.

mRNA-Proben

Zur Quantifikation der mRNA wurde mit dem „RNeasy mini Kit“ (Qiagen) pro Probe die RNA aus drei Bienenhirnen extrahiert. Von der RNA wurden photometrisch die Reinheit und die Menge bestimmt. Über Gelelektrophorese mit einem RNA-Gel wurde eine mögliche Degradation der RNA überprüft. Aus den Hirnen konnten drei bis

fünf Mikrogramm RNA extrahiert werden. Aus einem Mikrogramm RNA wurden mit dem „RevertAid H⁺ First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) 40 Mikroliter cDNA hergestellt.

1.6.4 Experimentelle Durchführung

Auf 96-Well-Platten wurden für jedes zu untersuchende Gen Proben als Tripletts, Standardreihen des Gens als Dupletts, sowie Kontrollen ohne DNA (no template control, NTC) als Tripletts, zusammen mit den Primern des entsprechenden Gens, aufgetragen. Für die PCR wurde der „Premix Ex Taq (Perfect Real Time)“ (Takara) verwendet. Folgende Komponenten wurden pro Reaktionsansatz eingesetzt:

8 µl	Premix Ex Taq (2x)	[0,8x]
0,3 µl	ROX II (50x)	[0,75x]
0,3 µl	Forward qPCR-Primer (10 µM)	[0,15 µM]
0,3 µl	Reverse qPCR-Primer (10 µM)	[0,15 µM]
1 µl	SYBRGreen (2x)	[0,1x]
x µl	Probe oder Standard	
ad 20 µl	HPLC-H ₂ O	

Von CHIP-Proben wurden zwei Mikroliter und von cDNA-Proben ein Mikroliter eingesetzt. Die 96-Well-Platten wurden dann mit Flachdeckelstreifen verschlossen und kurz zentrifugiert, so dass die Reaktionsansätze blasenfrei auf den Böden der Löcher vorlagen. Dann wurde die PCR durchgeführt:

3 min	95°C	40 Zyklen	PCR
10 s	95°C		
18 s	58°C		
18 s	72°C		
10 s	95°C	Dissoziationskurve	
18 s	58°C		
30 s	95°C		

1.6.5 Qualitätskontrolle und Berechnung der Probenmengen

Dissoziationskurve und No-Template-Control (NTC)

Nach der PCR wurden die Daten mit der Herstellersoftware ausgewertet. Durch die Dissoziationskurven wurden die Proben auf Kontaminationen und der Bildung von Primerdimeren überprüft. Zur Erstellung einer Dissoziationskurve wurde nach der PCR die dsDNA erhitzt und die Temperatur schrittweise um 1°C erhöht. Über die Fluoreszenz der dsDNA konnte so die Schmelztemperatur (T_m) der Amplikons ermit-

telt werden, die in der Dissoziationskurve als Peak angezeigt wird. Wurden in der PCR andere DNA-Fragmente oder cDNAs amplifiziert oder hatten sich Primerdimere gebildet, war ein entsprechender Peak in der Dissoziationskurve zu sehen und die Probe wurde von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. In der Kontrolle ohne DNA (NTC) durfte kein Peak sein, ansonsten wurde die gesamte Real-Time-qPCR wegen Kontamination nicht ausgewertet.

Ermittlung des Cycle-of-Threshold (C_t)

Die relativen Probenmengen wurden über den Cycle-of-Threshold (C_t) ermittelt (Abb. 18). Der C_t gibt die Anzahl der PCR-Zyklen an, die notwendig sind, um aus einer Probe eine bestimmte Menge dsDNA-Amplikons zu synthetisieren, bzw. um eine bestimmte Fluoreszenzintensität ($\log\Delta R_n$) zu erreichen.

Über den Farbstoff Rox-II, dessen Fluoreszenzintensität vom Probenvolumen abhängt, wurden zunächst Probenschwankungen ausgeglichen. Dann wurde im linearen Bereich die Baseline definiert ($\text{linear}\Delta R_n$). Diese subtrahiert von den Amplifikationskurven die Fluoreszenzintensität des Hintergrundrauschens. Dieses ist der Bereich vom Beginn der PCR (ab dem dritten Zyklus) bis zum Zyklus vor der ersten Amplifikation. Danach wurde der Threshold in der logarithmischen Ansicht ($\log\Delta R_n$) so gelegt, dass er die Amplifikationskurven in der exponentiellen Phase schneidet (Abb. 18). Dabei sollten die Kurven bei einem ΔR_n geschnitten werden, bei dem die einzelnen Triplets der Proben und Dupletts der Standards möglichst dicht zusam-

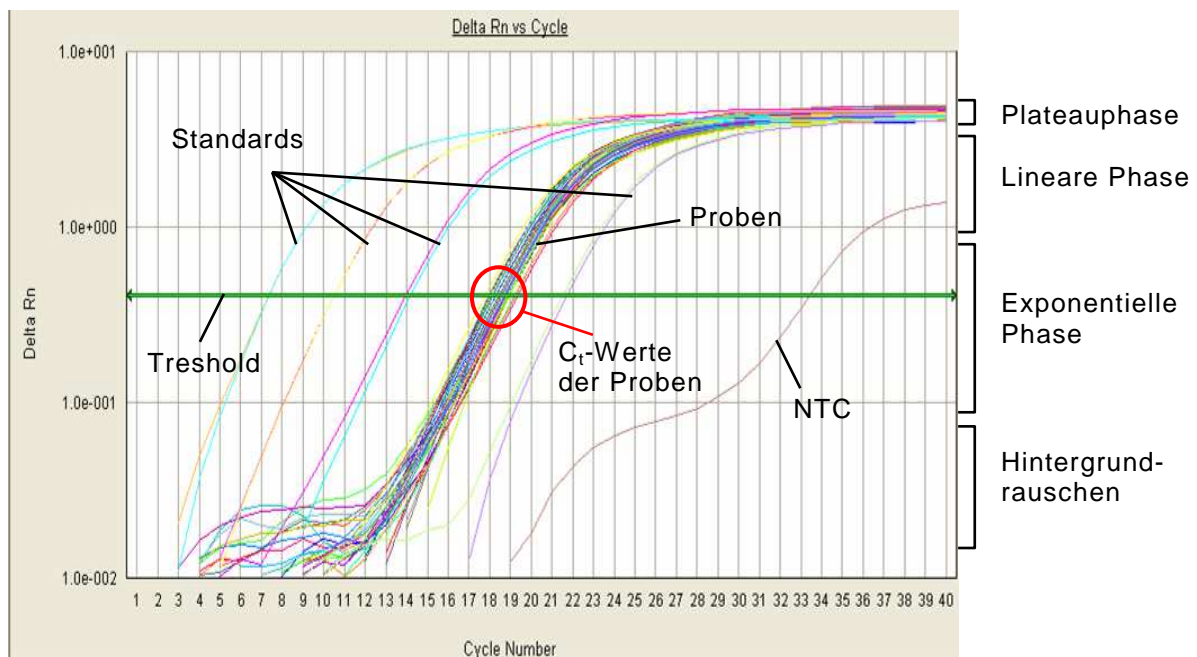


Abb. 18: Amplifikationskurven

Es sind die Amplifikationskurven der Proben, Standards und der No-Template-Control (NTC) zu sehen. Dabei sind die Signalstärken ($\log\Delta R_n$) auf der y-Achse gegen die Anzahl der PCR-Zyklen auf der x-Achse aufgetragen. Die Amplifikationskurven durchlaufen verschiedene PCR-Phasen (Hintergrund, exponentiell, linear, stationär).

men lagen. Die C_t -Werte sind die Schnittpunkte des Treshold und der Amplifikationskurven. Von den Proben-Triplets wurden jeweils die Mittelwerte gebildet. Bei mRNA-Proben durften die C_t -Werte nicht weiter als 0,5 Zyklen auseinander liegen ($\Delta C_t \leq 0,5$), bei ChIP-Proben einen Zyklus ($\Delta C_t \leq 1$).

Berechnung der Probenmengen über die Standardgerade

An die C_t -Werte der Standard-Proben wurde eine Standardgerade gelegt. Einzelne Standards, die zu weit von der Geraden abwichen, wurden ausgeschlossen. Über die lineare Gleichung der Standardgeraden konnten aus den C_t -Werten die absoluten DNA/cDNA-Mengen der Proben berechnet werden. Hierbei ist die Steigung der Geraden abhängig von der Effizienz der Amplifikation. Aus einer Verdoppelungsrate von zwei pro PCR-Zyklus ergibt sich eine Effizienz von 100 %. Normal sollte diese zwischen 90 und 110 % liegen. Die Daten der DNA-, bzw. cDNA-Mengen der Proben wurden dann nach MS-Excel exportiert.

1.6.6 Analyse der Proben

ChIP-Proben

Um mögliche Unterschiede in den DNA-Mengen der Hirnhomogenate auszugleichen, wurden die ChIP-Proben durch die Input-Proben normalisiert. Die DNA-Mengen der Input-Proben (vor der Immunopräzipitation) wurden gleichgesetzt. Dann wurden die Anteile der DNA-Mengen der ChIP-Proben an den jeweiligen Input-Proben in Prozent berechnet. Um zu untersuchen, ob ein Transkriptionsfaktor an eine bestimmte DNA-Sequenz gebunden hat, bzw. ob DNA-Fragmente dieser DNA-Region im ChIP-Experiment angereichert worden sind, wurden die ChIP-Proben einer ChIP mit Antikörpern gegen TFs, mit den ChIP-Proben einer ChIP mit IgG-Antikörpern, der Negativkontrolle, verglichen. Die Wahrscheinlichkeit (p), dass kein Unterschied der DNA-Mengen vorliegt, wurde mit dem studentischen t-Test in MS-Excel berechnet. Mit dem gleichen Test wurden dann auch die Wahrscheinlichkeiten berechnet, dass in den Weiß- und UV-Lichtproben die gleichen DNA-Mengen vorhanden sind.

mRNA-Proben

Die cDNA-Mengen der mRNA-Proben wurden zunächst durch Haushaltsgene normalisiert, um mögliche Unterschiede der cDNA-Mengen verschiedener Proben auszugleichen. Es wird angenommen, dass die mRNA-Expression eines Haushaltsgens unter den meisten Versuchsbedingungen konstant bleibt, und dass die Menge der mRNA-Transkripte mit der Menge der Gesamt-RNA einer Probe korreliert. Daher wurden über spezifische Primer die Expressionsmengen verschiedener Haushaltsgene in der Real-Time-qPCR quantifiziert. Mit dem Programm geNorm^[188] wurden

von den Haushaltsgenen die Stabilität der Expressionsraten ermittelt und es wurde überprüft, ob sich diese als Referenzgene zur Normalisierung eignen. Zwei bis drei der Referenzgene (Haushaltsgene) wurden dann zur Normalisierung der mRNA-Proben eingesetzt. Dazu wurde zunächst der Normalisierungsfaktor berechnet. Für jedes Referenzgen wurde der Mittelwert der Weißlicht-Proben (Kontrollen) gebildet. Dann wurden für jedes Referenzgen die Quotienten aus dem Weißlicht-Mittelwert und den einzelnen Proben gebildet, für die UV- als auch für die Weißlichtproben. Der Normalisierungsfaktor für jede Probe ergab sich dann aus dem Mittelwert dieser Quotienten der entsprechenden Proben. Alle Proben wurden dann normalisiert, indem sie mit den entsprechenden Normalisierungsfaktoren multipliziert wurden.

n = Anzahl der Proben i ; v = Anzahl der Gruppen j ; w = Anzahl der Gene g ; P = cDNA-Menge einer Probe

- (1) Mittelwert der Weißlichtproben (W) für ein Referenzgen (R) (mit $j = W$ und $g = R$):

$$\bar{P}_{WR} = \frac{\sum_{i=1}^n P_{iWR}}{n}$$

- (2) Normalisierungsfaktor (N) aus mehreren Referenzgenen ($g = R$) für eine Probe (i):

$$N_i = \frac{\sum_{R=1}^w \bar{P}_{WR}}{P_{iR}}$$

- (3) Normalisierung der Proben (i) für einzelne Gene (g):

$$P_{ig}^N = N_i \times P_{ig}$$

Abschließend wurden für jedes Gen und jeden Zeitpunkt die Mittelwerte der normalisierten Weißlicht- (Kontrollen) und UV-Werte (Behandlungsgruppe) gebildet und miteinander verglichen.

1.7 Molekularbiologische Methoden

1.7.1 DNA-Extraktion und -Aufreinigung

1.7.1.1 Gelextraktion

Die Gelextraktion wurde nach Herstellerangaben mit dem „peqGOLD Gel Extraction Kit“ (Peqlab) durchgeführt. Dabei wurden die gewünschten Gelbanden unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und im Bindepuffer auf dem Thermomixer bei 60°C in ca. fünf Minuten geschmolzen. Die Lösung wurde dann auf DNA-Säulen mit Silikamembran gegeben. Dort wurde die DNA gebunden, gewaschen und mit Elution-Buffer (50 µl) eluiert. Wenn nichts Genaues angegeben war, wurde mit 16.100 x g zentrifugiert.

1.7.1.2 Plasmidpräparation

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II“ (Peqlab) verwendet. Die Zellen wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen, Zellreste durch Zentrifugation pelletiert und der Lysatüberstand auf eine Säule mit Silikamembran gegeben. An der Membran wurde die DNA gebunden, gewaschen und eluiert. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Eluiert wurde mit 50 Mikroliter Elution-Buffer. Nach der Präparation wurden die Plasmidkonzentrationen photometrisch bestimmt.

1.7.1.3 Präparation genomischer DNA (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Homogenisation

Mit der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde genomische DNA aus Bienenhirnen isoliert. Zunächst wurden ca. 50 Bienenhirne präpariert und direkt in ein Reaktionsgefäß transferiert, das im flüssigen Stickstoff gekühlt wurde. Um die Zellen zu lysieren und Proteine, sowie RNA zu verdauen, wurden die Hirne mit einem Plastikpistell zerrieben und über Nacht bei 50°C mit DNA-Extraktionspuffer (1,2 ml/ 100 mg Gewebe \approx 600 µl) im Thermomixer (1000 rpm) inkubiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Um die DNA zu extrahieren, wurde dem Lysat ein Volumen (600 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1, pH 8,0) zugegeben und für 20 Minuten im Thermomixer gemischt (25°C, 1200 rpm). Danach wurde die Probe 15 Minuten zentrifugiert (RT, 3000 x g) und die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde dann wiederholt. Anschließend wurde die Probe mit einem Volumen (600 µl) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) aufgefüllt und 20 Minuten im Thermomixer (25°C, 1200

rpm) gemischt, dann 15 Minuten zentrifugiert (RT, 3.000 x g) und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

NaAcetat-Fällung

Durch Natriumacetat-Fällung (NaAcetat) wurde die DNA konzentriert und gereinigt. Hierfür wurden zu der Probe 1/10 Volumen (60 µl) 3 M NaAcetat und 2,5 Volumen (1,5 ml) reiner Ethanol zugegeben. Über Nacht wurde die DNA bei -20°C ausgefällt. Durch 30minütige Zentrifugation (4°C, 16.000 x g) wurde die DNA pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol (150 µl) gewaschen und zehn Minuten zentrifugiert (4°C, 16.000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für fünf bis zehn Minuten an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 25 Mikroliter H₂O_{dd} oder TE-Puffer resuspendiert.

Konzentration und Reinheitsgrad der DNA-Proben wurden photometrisch bestimmt. Mögliche Degradationen wurden mit der Agarose-Gelelektrophorese (0,5 µg DNA) überprüft. Bei degradierter genomischer DNA ist ein Schmier zu sehen, bei unversehrt genomischer DNA sind distinkte Banden im oberen Gelbereich zu erkennen. Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert. Da Phenol sehr giftig ist, wurde mit Handschuhen und unter einem Abzug gearbeitet.

1.7.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das „High Pure PCR Cleanup Mikrokit“ (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Vorteile des Kits sind, dass DNA-Fragmente unter 50 bis 100 Basenpaaren entfernt werden, und dass sich die DNA in besonders kleinen Volumen von bis zu zehn Mikrolitern eluieren lässt, wodurch sich die DNA-Konzentration erhöht.

100 Mikroliter DNA-Probe wurden mit 400 Mikroliter Bindepuffer gemischt und auf eine Säule mit Silikamembran geladen und gebunden. Die DNA wurde auf der Säule gewaschen, getrocknet und zweimal mit jeweils 20 Mikroliter Elutionspuffer eluiert. Wenn nichts anderes angegeben war, wurde für eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert.

1.7.2 RNA-Extraktion

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen, wurden beim Arbeiten mit RNA immer saubere Handschuhe getragen. Es wurden RNase freie Verbrauchsmaterialien verwendet und Spitzen mit Filtern zum Pipettieren. Glaswaren und Porzellan wurden in Alufolie gewickelt und bei 180°C im Inkubator gebacken. Geräte und Werkbänke wurden mit 0,1 M NaOH/1 mM EDTA oder alternativ mit RNase-Exitus-Plus inkubiert und mit DEPC-Wasser abgewaschen. RNA-Proben sollten möglichst auf Eis gekühlt werden.

1.7.2.1 TRIzol-Extraktion

Homogenisation

Bienen wurden auf Eis betäubt und mit einer Rasierklinge wurden ihnen die Köpfe abgetrennt. Diese wurden mit einem Porzellanpistill in einem Stößel mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. 100 Milligramm Probe wurde in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) zu einem Milliliter TRIzol gegeben und unter dem Abzug eine Minute gevortexet.

TRIzol-Extraktion

Die Probe wurde mit Chloroform (200 µl) versetzt, gevortexet und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde sie 15 Minuten zentrifugiert (4°C, 12.000 x g). Der Überstand (ca. 500 µl) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß zu einem Volumen Chloroform (500 µl) gegeben, vorsichtig gemischt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde dann fünf Minuten zentrifugiert (4°C, 12.000 x g).

RNA-Präzipitation

Der Überstand (ca. 500 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß zu einem Volumen Isopropanol (500 µl) transferiert, vorsichtig gemischt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss zehn Minuten zentrifugiert (4°C, 12.000 x g). Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet mit einem Milliliter 70prozentigem Ethanol gewaschen und fünf Minuten lang abzentrifugiert (4°C, 7.500 x g). Der Waschschrift wurde wiederholt und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, in 22 Mikroliter DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C maximal sechs Monate gelagert.

1.7.2.2 RNA-Extraktion mit dem „RNeasy mini Kit“

Für die Real-Time-qPCR wurde Gesamt-RNA aus Bienenhirnen mit dem „RNeasy mini Kit“ (Qiagen) isoliert. Die RNA-Extraktion mit DNA-Verdau wurde nach dem Herstellerprotokoll „RNeasy Mini Protocol - Isolation of Total RNA from Animal Tissues“ durchgeführt. Es wurden Nuklease freie Geräte und Materialien verwendet.

Drei Bienenhirne pro Probe wurden präpariert und jedes sofort mit einer S-Pistille im selben Homogenisator mit RLT-Puffer (350 µl) auf Eis dreimal homogenisiert und nach dem dritten Gehirn nochmals 20mal. Das Homogenat wurde mit einer Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß überführt und für drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (16.300 x g). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Optional wurde die Probe bei -70°C gelagert. Die RNA wurde an die Silikamembran einer Minisäule gebunden und gewaschen. Auf

der Säule wurde die DNA mit der DNase I („Rnase-Free DNase Set“, Qiagen) verdaut. Danach wurde die RNA gewaschen und getrocknet. Abschließend wurde die Säule für zwei Minuten mit 50 Mikroliter RNase freiem Wasser inkubiert und dann wurde die RNA eluiert. Wenn nichts anderes angegeben war, wurden die Zentrifugationsschritte für 30 Sekunden bei 8100 x g durchgeführt. Bei „full speed“ wurde mit 16.300 x g zentrifugiert.

1.7.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

1.7.3.1 Photometrische Bestimmung

Für die photometrische Bestimmung größerer DNA- oder RNA-Mengen wurden die Proben mit einem Volumen von mindestens 70 Mikrolitern gut gemischt, in eine UV-Licht durchlässige Küvette pipettiert und im Gerät gemessen. Die optische Dichte (OD) der Nukleinsäuren wurde bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm für doppelsträngige DNA bestimmt. Für eine genaue Konzentrationsbestimmung sollte die OD der Proben zwischen 0,1 und 1 liegen. Aus den photometrischen Messungen ergeben sich folgende Konzentrationen:

$$OD_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g/ml doppelsträngige DNA}$$

$$OD_{260} = 1 \approx 40 \mu\text{g/ml einzelsträngige RNA}$$

Die Reinheit der Proben kann durch die Ratio der ODs von Nukleinsäure zu Protein bestimmt werden. Die OD von Proteinen wird bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm gemessen. Folgende Werte geben reine Nukleinsäuren an:

$$OD_{260}/OD_{280} = 1,8 \text{ ist eine reine DNA-Probe}$$

$$OD_{260}/OD_{280} = 2,0 \text{ ist eine reine RNA-Probe}$$

$$OD_{260}/OD_{280} < 1,8 \text{ ist eine mit Proteinen verunreinigte DNA- oder RNA-Probe}$$

1.7.3.2 DNA-Quantifikation im Agarosegel

Proben mit geringem DNA-Gehalt, deren Konzentrationen photometrisch nicht mehr zu bestimmen waren, konnten im Agarosegel quantifiziert werden. Dazu wurden DNA-Leitern („MassRuler DNA ladder“) mit bekannter Konzentration und DNA-Proben in unterschiedlichen Mengen auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Banden der Proben wurden mit Banden der DNA-Leitern gleicher Größe verglichen. Von der Marker-Bande mit der gleichen Intensität wie bei der Probe, wurde dann die Konzentration abgelesen. Über folgende Formel lässt sich die Molarität doppelsträngiger DNA berechnen:

$$DNA_{Menge} [mol] = \frac{DNA_{Masse} [g]}{660 [g / mol] \times DNA_{Größe} [bp]}$$

1.7.3.3 PicoGreen-Messung von DNA

Kleine DNA-Mengen, die photometrisch nicht mehr messbar sind, konnten durch Fluoreszenzdetektion bestimmt werden. Hierfür wurde das „Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit“ (Invitrogen) verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen bindet an doppelsträngige DNA (dsDNA), wodurch sich das Absorptionsmaximum der Emission verschiebt. Diese wird mit einem Spektrofluorometer gemessen, wobei sich die Intensität der Emission linear zur Menge an dsDNA verhält.^[189] Wenn nichts anderes angegeben war, wurde nach der Anleitung des Herstellers (MP 07581) verfahren.

25 Mikroliter Probe wurde mit 25 Mikroliter 1x PicoGreen auf einer schwarzen 384-Well-Platte gut vermischt. Zusammen mit einer Nullkontrolle mit Puffer und einer DNA-Standardreihe (1000, 333, 111, 37 und 12 ng/ml Lambda-DNA) wurde die abgedunkelte Platte fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit dem Spektrofluorometer Safire2 (Tecan) gemessen. Dabei wurde das PicoGreen mit einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und die Emission bei 520 nm gemessen. Die Bandbreiten wurden jeweils auf 10 nm eingestellt, der Signalverstärker (gain) auf 78 und die Messtiefe (Z-Position) auf 9500 μM . Die genauen Werte wurden zuvor an Standardproben optimiert.

Mit MS-Excel wurden dann Konzentrationen und DNA-Mengen der Proben berechnet. Die Nullkontrolle wurde von den Messwerten subtrahiert und durch die Werte der Standardreihe wurde eine Gerade gelegt. Über deren Steigung ließen sich die DNA-Konzentrationen berechnen.

1.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund ihrer Ladung und ihrer Größe wandern sie unterschiedlich schnell in der Agarosematrix.

1.7.4.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden ein bis zweiprozentige Agarosegele verwendet. Je kleiner die Fragmente sind, desto höher sollte die Agarosekonzentration des Gels gewählt werden. Entsprechende Mengen Agarose wurden mit 1x TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Die Agarose wurde bei Raumtemperatur auf ca. 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (EtBr, Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) gemischt. Anschließend wurde das Gel in Kammern abgegossen, mit einem Probenkamm versehen und abgekühlt, bis es erhärtet war. Das Gel wurde horizontal in eine Gelkammer gelegt, die dann mit 1x TAE-Puffer befüllt wurde. Die Proben wurden mit Probenpuffer (6 x „Orange Loading Dye Solution“) gemischt und auf das Gel aufgetragen. In der Gelkammer

wurden die Proben bei 8 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Anschließend wurden im Gel die DNA-Fragmente mittels interkaliertem EtBr durch UV-Licht ($\lambda = 254 - 366$ nm) sichtbar gemacht. Die Gele wurden mit einer Digitalkamera fotografiert.

1.7.4.2 RNA-Gelelektrophorese

Durch die RNA-Gelelektrophorese wurden die RNA-Proben auf Degradationen überprüft. Die RNA (0.5 μ g) wurde nach Zugabe von 0,2 Volumen 5x RNA-Probenpuffer für fünf Minuten bei 70°C im Heizblock erwärmt, um die RNA zu denaturieren. Die Proben wurden dann direkt auf ein RNA-Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1x MOPS-Puffer überdeckt und im elektrischen Feld (60 V) aufgetrennt. Da der Probenpuffer EtBr enthielt, konnte das Gel direkt unter UV-Licht analysiert werden. Bei der ribosomalen RNA der Biene ist im RNA-Gel nur eine Bande bei zwei bis drei Kilobasenpaaren zu sehen.^[190]

1.7.5 Primerdesign

Primer für die Amplifikation von mRNA bzw. cDNA wurden manuell gesucht und entworfen. Hierfür wurden mRNA- und DNA-Sequenzen abgeglichen und in dem Programm Jalview dargestellt und untersucht. CHIP-Primer wurden mit dem Programm Primer3Plus^[191] gesucht. Alle Primerpaare wurden auf ihre Schmelztemperaturen (T_m) und die Bildung von Sekundärstrukturen, Homo- und Heterodimeren untersucht. Hierfür wurden die Programme Oligo-Calculator^[192], OligoAnalyzer-3.0 und DNA-Calculator verwendet. Die Spezifität der Primer wurde mit BLAST in den Referenzsequenzen (RefSeq) von mRNA oder genomischer DNA von *Apis mellifera* untersucht. Primer sollten einen Guanidin- und Cytosin-Gehalt (G+C) von 40 bis 60 Prozent haben und nicht mehr als vier bis fünf gleiche Basen nacheinander enthalten. Am 3'-Ende sollten ein bis zwei G oder C sitzen. Weitere Besonderheiten von Primern sind bei den entsprechenden PCR-Techniken aufgeführt. Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich synthetisiert. Für die Real-Time-qPCR wurden diese HPLC gereinigt, alle anderen Primer nur entsalzt. 100 μ M und 10 μ M Stocklösungen wurden bei -20°C gelagert. Die Primer wurden mit genomischer DNA oder cDNA durch PCR und Agarose-Gelelektrophorese oder in der Real-Time-qPCR getestet.

1.7.6 PCR Techniken

1.7.6.1 Standard PCR

“AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity”

DNA Inserts für die Klonierung wurden folgendermaßen hergestellt:

5 µl	PCR buffer I (10 x)	[1 x]
1 µl	Primer for (10 µM)	[0,2 µM]
1 µl	Primer rev (10 µM)	[0,2 µM]
1 µl	cDNA	
0,2 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	[1 U]
ad 50 µl	H ₂ O	

vorsichtig mischen und amplifizieren bei

2 min	94°C	← 35 Zyklen
30 s	94°C	
30 s	54°C	
1:30 min	68°C	
5 min	68°C	
∞	4°C	

„Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase“

Mit der folgenden PCR wurden Standards für die Real-Time-qPCR hergestellt und CHIP-Versuche mit CHIP-Creb Primern durchgeführt:

5 µl	Hot Start PCR Puffer (10 x)	[1 x]
1 µl	dNTP Mix (10 mM jedes)	[0,2 mM]
1 µl	Primer for (10 µM)	[0,2 µM]
1 µl	Primer rev (10 µM)	[0,2 µM]
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)	[2 mM]
x µl	genomische DNA (150 ng) oder CHIP-DNA (2 µl)	
0,4 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	[1 U]
ad 50 µl	H ₂ O	

vorsichtig mischen und amplifizieren bei

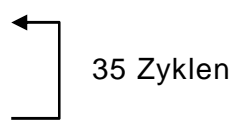
4 min	95°C	← 35 Zyklen
45 s	95°C	
45 s	60°C	
1 - 1:30 min	72°C	
10 min	72°C	
∞	4°C	

1.7.6.2 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR wurden Plasmide aus Bakterien auf den richtigen Einbau von cDNA-Inserts untersucht. Dabei wurden die Bakterienklone direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Mit einem Vektorprimer und einem insert-spezifischen Primer wurde die Plasmid-DNA amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Größe untersucht. Ist das Insert verkehrt herum orientiert oder nicht vorhanden, gibt es kein PCR-Produkt. Für die Kolonie-PCR wurde der“ REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix“ (Sigma-Aldrich) verwendet.

12,5 µl	REDTaq ReadyMix (2 x)	[1 x]
1 µl	pETBlue UP Primer (10 µM)	[0,4 µM]
1 µl	Insert spezifischer reverser Primer (10 µM)	[0,4 µM]
ad 25 µl	H ₂ O _{dest}	

wurden vorsichtig gemischt und im PCR-Zykler amplifiziert:

3 min	94°C	
1 min	94°C	
2 min	50°C	
3 min	72°C	
10 min	72°C	

1.7.6.3 Reverse Transkription mit DNA-Verdau

Um mRNA zu amplifizieren, wurde von dieser zunächst durch reverse Transkriptase (RTase) komplementäre DNA (cDNA, *engl.* complementary DNA) hergestellt.

1.7.6.3.1 c-DNA-Synthese für die Klonierung

Bei der reversen Transkription entstehen bei der Verwendung von Random-Hexamer-Primern (Fermentas) zufällige Transkripte unterschiedlicher Größe. Da RNA aus der TRIzol-Extraktion evt. mit DNA kontaminiert sein konnte, wurde diese durch DNase verdaut. Die Reaktionsansätze wurden in PCR-Reaktionsgefäßen (200 µl) zusammen pipettiert und im Thermozykler inkubiert.

DNA-Verdau

x µl	Gesamt-RNA	[1 µg]
1 µl	DNase I buffer (10 x)	[1 x]
0,25 µl	RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	[10 U]
1 µl	DNase I (1 U/µl)	[1 U]
ad 10 µl	DEPC-H ₂ O	

vorsichtig mischen und 30 Minuten bei 37°C inkubieren, dann auf 4°C abkühlen und abzentrifugieren.

Deaktivierung der DNase und auflösen sekundärer RNA-Strukturen

1 µl	EDTA (25 mM)	[2,08 mM]
1 µl	Random Hexamer Primer (24 µg/100 µl)	[0,2 µg]

dazugeben und vorsichtig mischen. Reaktionsmix zehn Minuten bei 65°C inkubieren, dann auf 4°C abkühlen.

cDNA-Synthese

4 µl	RT buffer (5 x)	[1 x]
0,25 µl	RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	[10 U]
2 µl	dNTP mix (10 mM each)	[1 mM]
ad 19 µl	DEPC-H ₂ O	

dazugeben, vorsichtig mischen und fünf Minuten bei 25°C inkubieren (Annealing).

1 µl	RevertAid™ H ⁻ M-MuLV RTase (200u/µl)	[200 U]
------	--	---------

dazugeben und inkubieren bei:

10 min	25°C	(Annealing)
60 min	42°C	(Reverse Transkription)
10 min	70°C	(Inaktivierung der RTase)
∞	4°C	

1.7.6.3.2 cDNA-Synthese für die Real-Time-qPCR

Für die Real-Time-qPCR wurde aus Gesamt-RNA (RNeasy-Extraktion) mit dem „RevertAid H⁻ First Strand cDNA Synthese Kit“ (Fermentas) cDNA hergestellt. Um cDNA nur von mRNA-Transkripten zu synthetisieren, wurden für die RT-PCR Oligo-(dT)₁₈-Primer verwendet. Alle RNA-Proben die miteinander verglichen werden sollten, wurden in derselben RT-PCR eingesetzt, um Abweichungen in den Probenmengen gering zu halten. Die RT-PCR wurde nach dem Herstellerprotokoll „RT-PCR, First Strand cDNA Synthesis“ durchgeführt.

Folgende Komponenten wurden in Nuklease freien PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis zusammen pipettiert:

x µl	Gesamt-RNA (RNeasy)	[1 µg]
1 µl	Oligo (dT) ₁₈ Primer (100 µM)	[5 µM]
ad 12 µl	H ₂ O, Nuklease frei	

Zum Auflösen möglicher Sekundärstrukturen der RNA, wurde der Reaktionsansatz fünf Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden folgende Komponenten hinzugefügt und gemischt:

4 µl	Reaction Buffer (5x)	[1x]
1 µl	RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)	[20 u]
2 µl	dNTP Mix (10 mM)	[1 mM]
1 µl	RevertAid H ⁻ M-MuLV RTase (200u/µl)	[200 u]

Die RT-PCR wurde 60 Minuten bei 42°C durchgeführt und dann abgebrochen, indem der Reaktionsansatz für fünf Minuten bei 70°C inkubiert wurde. Der Ansatz wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 40 Mikroliter aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

1.7.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus der Klonierung wurde von „Eurofins MWG Operon“ sequenziert. Dazu wurden

120 ng/µl	Plasmid-DNA
2 pmol/µl	pETBlueUP Primer
ad 15 µl	H ₂ O _{dest}

im 1,5 ml Reaktionsgefäß eingeschickt. Die Sequenzen wurden mit dem Programm „Chromas Lite 2.01“ (Technelysium) auf ihre Qualität überprüft und als Fasta-Dateien für einen Sequenzabgleich exportiert.

1.7.8 Sequenzabgleich

Beim Sequenzabgleich (*engl.* Alignment) werden zwei oder mehr unterschiedliche Sequenzen von Nukleinsäuren oder Proteinen/Peptiden mit der besten Übereinstimmung aufeinander abgeglichen. Hierdurch können z. B. übereinstimmende Sequenzabschnitte für die Primer- oder Antikörpersuche gefunden werden oder Gene mit einzelnen Elementen wie Introns/Exons, TSS, Start- und Stopcodon usw. dargestellt werden. Für die Sequenzabgleiche wurden die Programme Align, ClustalW2^[193], Kalign^[194] (EMBL-EBI) und Jalview 2.6.1 (Barton Group, University of Dundee)^[195] verwendet.

1.7.9 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

BLAST (NCBI) ist ein Programm, das über einen Algorithmus ähnliche Regionen zwischen biologischen Sequenzen sucht und diese abgleicht. Hierbei können Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen in allen Kombinationen mit einer Vielzahl von Sequenz-Datenbanken verglichen werden. Mit diesem Programm wurden z. B. Homologien oder die Spezifität von Primern untersucht, Klon-Sequenzierungen überprüft oder die Sequenzen der ChIP-seq analysiert.

1.7.10 *In silico* Analyse genomischer DNA auf *cis*-Elemente

Bei der *in silico* Suche von *cis*-Elementen in genomischer DNA wird eine gewichtete Matrix oder eine Konsensussequenz, erstellt aus bekannten *cis*-Elementen, über einen Algorithmus mit einer DNA-Sequenz abgeglichen. Je besser eine Übereinstimmung ist, desto höher sollte die Wahrscheinlichkeit sein, dass die gefundene Region auch *in vivo* Proteine binden kann. Für die Analyse wurden die Programme Cister^[196] und TESS^[197] verwendet.

1.8 Proteinbiochemische Methoden

1.8.1 Bradford-Assay zur Proteinbestimmung

Für den Bradford-Assay wurde das Bradford-Reagent (Sigma-Aldrich) verwendet. Der Assay wurde nach dem „96 Well Plate Assay Protocol“ des technischen Merkblatts durchgeführt. Proteinproben (5 µl) wurden dabei mit dem Bradford-Reagent (250 µl) auf einer 96-Well-Platte gemischt und für ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet der Farbstoff Brilliant-Blue-G an die Proteine, wodurch sich das Maximum der Absorption des ungebundenen Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Menge an Protein ist proportional zur Intensität der Absorption. Diese wurde mit dem Multireader Safire2 bei einer Wellenlänge von 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 815 nm gemessen. Um die genauen Proteinmengen zu berechnen, wurde eine Standardreihe aus BSA-Lösungen im Bereich von 0,125 bis zwei Milligramm BSA in 1x PBS pro fünf Mikroliter gemessen. 1x PBS wurde als Blank (Nullwert) bei der Auswertung mit Excel von den Probenwerten abgezogen. An die BSA-Werte wurde eine lineare Standardgerade angepasst und die Steigung berechnet, über die dann die Proteinmengen berechnet werden konnten.

1.8.2 Dialyse

Die Dialyse kann für die Entsalzung oder Umpufferung einer wässrigen Probe eingesetzt werden. Dabei wird eine Proteinprobe in einen Schlauch aus Dialysemembran gefüllt, der verschlossen und in ein Gefäß mit dem gewünschten Puffer gegeben wird. Die Membran hat feine Poren, durch die Salze diffundieren können, aber aufgrund ihrer Größe keine Proteine. Über ihren Konzentrationsgradienten diffundieren

die Salze zwischen den Puffern innerhalb und außerhalb des Dialyseschlauches bis sich ein Gleichgewicht einstellt.

Da Dialysemembranen oft verunreinigt sind, wurden sie fünf Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (1 l) gekocht, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült, nochmals für fünf Minuten gekocht, diesmal in einem Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ mit einem gestrichenen Löffel EDTA. Anschließend wurden die Membranen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen. In einem Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ mit einer Spatelspitze NaAcid können die Membranen mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

Proben wurden in den gereinigten Dialyseschlauch gefüllt, der dann verknotet wurde. Proben mit einem Volumen von einem Milliliter oder weniger wurden in 1,5 Milliliter Reaktionsgefäße gefüllt, deren Öffnungen dann mit Dialysemembranen überspannt wurden. Proteinlösungen wurden bei 4°C in Bechergläsern mit 1x PBS unter Rühren dialysiert. Je mehr sich die Konzentrationsgefälle der Salze ausgleichen, desto weniger werden sie ausgetauscht. Daher wurde das 1x PBS im Becherglas nach ein, zwei und vier Stunden Dialyse ausgetauscht und zuletzt über Nacht dialysiert. Die Proteinlösungen wurden in frische Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.

1.8.3 Kompetitions-Assay

Zum Nachweis der Spezifitäten von Antikörpern, wurden Kompetitions-Assays durchgeführt. Hierbei werden Antikörper mit einem Antigen inkubiert. Wenn die Antikörper spezifisch für das Antigen sind, werden sie maskiert (kompetiert) und können bei einer Immunodetektion das entsprechende Antigen nicht mehr detektieren.

Vom Antigen sollte die 200fache molare Menge der Antikörper (Ak) für die Kompetition eingesetzt werden. Mit den Molekulargewichten (MW) von IgG-Antikörpern (Ak^{IgG}) und Antigen (Ag) wurde die benötigte Menge an Antigen berechnet:

$$Ag_{\text{Menge}} [\mu\text{g}] = Ak_{\text{Menge}} [\mu\text{g}] \times 200 \times \frac{Ak_{\text{MW}}^{\text{IgG}} [\text{kDa}]}{Ag_{\text{MW}} [\text{kDa}]}$$

Für ein Mikrogramm Antikörper der Creb-mAk (MW = 144 kDa) wurden 66 Mikrogramm rekombinantes Protein Creb-1 (~ 45 kDa) in einem Milliliter Volumen eingesetzt. Antikörper und Antigen wurden in drei Milliliter Blockingpuffer (Western-Blot) über Nacht bei 4°C langsam geschüttelt. Für den Test wurde Homogenat von Bienenhirn in der SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot mit den zu untersuchenden Antikörpern durchgeführt. Parallel zum ersten Antikörper wurden Blotstreifen mit kompetierten Antikörpern und mit Protein allein inkubiert. Es wurde weiter wie beim Western-Blot verfahren.

1.8.4 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) werden Proteine ihrer Größe nach in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Probenvorbereitung

Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt und fünf Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt. Durch die Hitze werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst und das β -Mercaptoethanol im Probenpuffer reduziert mögliche Disulfidbrücken, so dass die Proteine als Aminosäureketten vorliegen. Das SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Tensid, bindet an die Proteine und überdeckt deren Eigenladung, so dass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Spezielle Proben wurden wie folgt vorbereitet:

Homogenat aus Bienenhirnen

Von zwei Bienen wurden die Gehirne präpariert und mit Homogenisierungspuffer (300 μ l) in einen Glashomogenisator gefüllt. Dort wurden sie auf Eis mit einer S-Pistille zehnmal homogenisiert und anschließend zehnmal für eine Sekunde bei einer Amplitude von 40 % auf Eis sonifiziert. Das Homogenat wurde mit 5x SDS-Probenpuffer (100 μ l) vermischt und fünf Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt. Für ein ganzes Polyacrylamidgel wurden 200 Mikroliter Probe aufgetragen, was einem Gehirn entspricht.

Homogenat von Mäusehirn

Von Mäusehirn, gelagert im flüssigen Stickstoff, wurden auf Eis ca. ein bis drei Kubikmillimeter mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Mäusehirn wurde wie die Bienenhirne aufbereitet und 200 Mikroliter Probe für ein Gel eingesetzt.

Rekombinantes Protein

Für ein Gel wurden ein bis fünf Mikrogramm gereinigtes Protein mit 1x PBS auf ein Volumen von 150 Mikroliter aufgefüllt, mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt, erhitzt und aufgetragen.

Polyacrylamidgel

Die Proben wurden auf ein vertikales Gel mit einer Matrix aus Polyacrylamid aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (10 x 10 cm) aufeinander gelegt, die an drei Seiten durch Spacer (0,5 mm hoch) getrennt wurden. Mit kochender Agarose (0,5 %) wurden die Ränder abgedichtet. Die vertikal stehenden Glasplatten wurden zu zwei Drittel mit Trenngelpuffer befüllt und mit einer dünnen Butanolschicht luftdicht abgeschlossen. In den Trenngelen wurden acht bis zwölf Prozent Polyacrylamid eingesetzt, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine. Nachdem

das Trenngel polymerisiert war, wurde das Butanol mit Wasser ausgewaschen, die Glasplatten getrocknet und der Sammelgelpuffer eingefüllt. Es wurde dann sofort ein Kamm in das Gel gesteckt, durch den die Probestaschen gebildet wurden. Nach der Polymerisation des Gels wurden der Kamm und der untere Spacer entfernt und das Gel in der Gelkammer befestigt.

Elektrophorese

Oben und unten wurden in die Kammern 1x Glycin-Laufpuffer gefüllt, der als Leiter für den elektrischen Strom dient. Die vorbereiteten Proben wurden dann in die Gel-taschen pipettiert. Über das Gel wurde für ca. 40 – 60 Minuten ein elektrisches Feld gelegt (20 mA). Im Sammelgel wurden die Proteinproben zunächst auf einer Höhe gesammelt und anschließend im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt. Wegen des SDS haben alle Proteine eine negative Ladung. Kleineren Proteinen bietet die Polyacrylamidmatrix weniger Widerstand, wodurch diese schneller wandern als große Proteine. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „SeeBlue Plus2 Pre-Stained“ (Invitrogen) verwendet.

1.8.5 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Farbstoff der sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und so Proteine blau färbt. Ein Polyacrylamidgel wurde für zwei bis drei Minuten in einer Schale mit Coomassie-Färbelösung vorsichtig geschüttelt. Die Färbelösung wurde abgegossen und das Gel mit Wasser abgespült. Coomassie, das nicht an Proteinen gebunden war, wurde gewaschen. Hierzu wurde das Gel in einem Schälchen mit Entfärberlösung geschüttelt, bis das Gel durchsichtig und die Proteinbanden gut zu erkennen waren. Der Entfärber wurde mehrmals gewechselt und der Farbstoff mit Wasser weggespült. Abschließend wurden die Gele gescannt.

1.8.6 Western-Blotting

Im Western-Blotting werden Proteine durch SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Dann werden die Proteine durch Elektroblothing vom Gel auf eine Membran transferiert und durch Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern werden bestimmte Proteine nachgewiesen.

Elektroblothing

Für den Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran wurde in einer Semidry-Blotting-Kammer wie folgt geschichtet: (Kathode) > 3 Lagen Filterpapier > Nitrocellulose-Membran > Gel > 3 Lagen Filterpapier > (Anode). Das Filterpapier wurde in Blotting-Puffer getränkt, um den Strom zu leiten. Deshalb musste

der Stapel auch Luftblasen frei zusammengesetzt werden. Überschüssiger Puffer wurde aus der Kammer entfernt. Dann wurde an die Kammer für 40 Minuten ein elektrisches Feld gelegt ($U = 20 \text{ V}$, $I = 0,4 \text{ A/ Gel}$, $P = 8 \text{ W}$), um die Proteine vom Gel auf die Membran zu transferieren.

Immunodetektion

Die frisch geblottete Membran wurde in einer Schale mit Blocking-Puffer überdeckt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (50 rpm) inkubiert. Das BSA im Puffer bindet dabei überall an die Membran, wo kein Protein gebunden ist. Da Proteine gut an Nitrozellulose binden, wird hierdurch eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran unterbunden. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären Antikörper in Blocking-Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Um verschiedene Antikörper verwenden zu können, wurde die Membran in Streifen geschnitten, welche dann mit Antikörpern (2 – 3 ml) in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) langsam geschüttelt wurden. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden Antikörper 1:1000 verdünnt. Die Antikörper konnten im Anschluss bei 4°C gelagert und zwei- bis dreimal wieder verwendet werden. Damit sich keine Bakterien entwickeln konnten, wurde der Blocking-Puffer mit NaAcid (0,2 % Endkonzentration) versetzt. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden nicht gebundene Antikörper unter fließendem Wasser und durch dreimaliges Waschen (5 min, RT, 50 rpm) mit 1x PBS von den Membranen entfernt. Anschließend wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper im Blocking-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (50 rpm) inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper und verstärkt das Signal der Proteindetektion. Es wurden Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper mit Verdünnungen zwischen 1:10.000 – 1:50.000 eingesetzt. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen (5 min, RT, 50 rpm) mit 1x PBS entfernt.

Für die Proteindetektion durch Chemilumineszenz wurden die einzelnen Membranstreifen wieder zusammengeklebt. Je ein Milliliter Luminol-Reagenz und Peroxid-Lösung (Millipore) wurden gemischt, auf die Membran aufgetragen und ein bis zwei Minuten inkubiert. Durch das Wasserstoffperoxid wird das Luminol oxidiert. Katalysiert wird die Reaktion über die Peroxidase des sekundären Antikörpers. Die feuchte Membran wurde in eine durchsichtige, nicht elektrostatische Plastikhülle gesteckt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und für 30 Sekunden bis fünf Minuten belichtet. Die bei der Chemilumineszenzreaktion freigesetzten Photonen werden vom Röntgenfilm absorbiert und führen zu einer schwarz Färbung der entsprechenden Stellen. Nach der Belichtung wurde der Film zwei Minuten

lang entwickelt, kurz mit Wasser abgespült, zwei Minuten fixiert, erneut abgespült und getrocknet.

1.8.7 Immunhistologie

Präparierte und fixierte Bienenhirne wurden dreimal für 15 Minuten mit 0,1 M Phosphat-Puffer ausgewaschen und anschließend mit 60 % Isopropanol auf dem Schüttler inkubiert, entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Hirne erst mit 90 %, dann mit 100 % Isopropanol jeweils für eine Stunde behandelt. Dann wurden die Hirne jeweils für eine Stunde bei 45°C in absolutem Isopropanol und bei 70°C in einem Paraffin-Isopropanolgemisch (1:1) inkubiert. Anschließend wurden die Hirne über Nacht bei 60°C mit Paraffin behandelt. Danach wurden die Hirne für zwei Stunden in frischem Paraffin inkubiert und ausgeblockt. Mit dem Mikrotom wurden sieben Mikrometer dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger transferiert. Dort wurden die Schnitte bei 40°C auf einer Heizplatte gestreckt, getrocknet und anschließend über Nacht bei 45°C im Trockenschrank inkubiert.

Für eine Immundetektion mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Objektträger in Xylol (2 x 5 min), dann in einer Ethanolreihe mit absteigender Konzentration inkubiert (96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 % für je 2 min). Zur Demaskierung wurden die Objektträger eine Minute in 0,1 M Na-Citratpuffer (pH 6) gekocht und weitere neun Minuten unter dem Siedepunkt inkubiert. Nach 20minütigem Abkühlen wurden die Objektträger fünf Minuten lang mit Aqua dest. gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit Blockpuffer-Tx behandelt. Der primäre Antikörper wurde in Blockpuffer-Tx (1:200) aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Abspülen des primären Antikörpers wurden die Schnitte mit PBS-Tx gewaschen (3 x 5 min) und anschließend mit dem entsprechenden sekundären IgG-Alkaline-Phosphatase-Antikörpern in Blockpuffer-Tx (1:400) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum mit PBS-Tx gewaschen (3 x 5 min) und die Färbelösung aufgetragen. Nach erfolgreicher Färbung wurde mit PBS-Tx gewaschen (3 x 5 min).

Sämtliche Behandlungen, ab der Blockierung der Schnitte, erfolgten in einer dunklen Schale. Zum Eindecken und Konservieren der gefärbten Schnitte wurden diese kurz mit Aqua dest. gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe inkubiert (50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 % für je 2 min). Zum Schluss wurden die Schnitte fünf Minuten in Rotihistol inkubiert. Dann wurde ein Tropfen Roti-Histokitt auf die Schnitte pipettiert und anschließend alles mit Deckgläschen abgedeckt.

1.9 Mikrobiologische Methoden

Beim Arbeiten mit Bakterien wurde auf äußerste Sterilität geachtet, um Kontaminationen mit Bakterien aus der Luft zu vermeiden. Es wurde steriles Verbrauchsmaterial verwendet, Geräte und Materialien wurden im Autoklaven sterilisiert, mit Ethanol abgewischt oder abgeflammt.

1.9.1 Nährmedien und Agarplatten

Folgende Nährmedien wurden hergestellt:

LB-Medium

10 g	NaCl	[1 %]
10 g	Trypton	[1 %]
5 g	Hefeextrakt	[0,5 %]
ad 1 l	H ₂ O _{dest}	

LB-Agar

20 g	Agar-Agar	[2 %]
1 l	LB-Medium	

Die Nährmedien wurden direkt für 30 Minuten bei 121°C (1,0 bar) autoklaviert. Der Agar wurde bei Raumtemperatur auf 55°C abgekühlt und nach Bedarf mit Antibiotika oder anderen Substanzen versetzt. Dann wurde der LB-Agar in Petrischalen gegossen und ausgehärtet. LB-Agar und LB-Medien wurden gut verschlossen bei 4°C gelagert. SOC-Medium war im „pETBlue-2 Perfectly Blunt Cloning Kit“ (Novagen) enthalten.

1.9.2 Spezielle Nährmedien

Für die Selektion von Nova-Blue-Singles-Competent-Cells wurden dem LB-Agar und dem LB-Medium Carbenicillin (Amp, 50 µg/ml) und Tetracyclin (Tet, 12,5 µg/ml) zugefügt. Die Tuner™(DE3)pLacI-Competent-Cells wurden auf LB-Agar oder LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (Cam, 34 µg/ml) selektiert. Zusätzlich wurde 1 % Glukose hinzugefügt, die eine basale Expression verhindert und somit das Wachstum fördert. Der pETBlue-2-Vektor besitzt einen Ampicillin/Carbenicillin-Resistenzmarker. Spezifische Plasmide der entsprechenden kompetenten Zellen besitzen Resistenzmarker gegen Tetracyclin oder Chloramphenicol.

1.9.3 Glycerinkultur

In Glycerin können Bakterien über Monate bei -80°C gelagert werden. Hierfür wurden frische Bakterienkultur (700 μl) mit Glycerin (300 μl) vermischt und in Kryoröhrchen eingefroren.

1.9.4 Blue/White-Screening

Beim Blue/White-Screening werden Bakterienklone mit pETBlue-2-Vektoren ohne Insert blau gefärbt. Klone mit Insert im Vektor bleiben dagegen weiß. Der blaue Phänotyp entsteht durch die Expression von β -Galactosidase, die das chromogene Substrat X-gal spaltet, welches dadurch die blaue Färbung hervorruft. Eine aktive β -Galactosidase benötigt das *lacZ*- α -Peptid, für das der pETBlue-2-Vektor kodiert. In diese DNA-Sequenz wird aber die cDNA inseriert. Dadurch kann kein funktionelles *lacZ*- α -Peptid mehr exprimiert werden und es entsteht der weiße Phänotyp. Für die Färbereaktion wurden dem LB-Agar X-gal (70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) und IPTG (80 μM Endkonzentration) für die Induktion der Expression zugefügt.

1.10 Stochastik

Die Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen Weiß- und UV-Lichtbehandlung gibt, wurde durch den **studentischen t-Test** mit MS-Excel berechnet. Mit diesem lassen sich immer nur zwei Gruppen miteinander vergleichen.

Die **Korrelationen** der DNA-Mengen von Input- und ChIP-Proben wurden mit MS-Excel über den Pearson-Maßkorrelationskoeffizient (r) berechnet. Die Wahrscheinlichkeit (p) der Hypothese, dass keine Korrelation vorliegt, wurde in MS-Excel mit der Funktion TVERT berechnet. Dabei wird der Wert der Verteilung ($tvers$), die Freiheitsgrade (Stichprobenumfang (n) $-$ 2) und die Anzahl der Endflächen (zweiseitig) eingegeben. Der Wert der Verteilung berechnet sich aus:

$$tvers = \frac{\sqrt{r \times (n - 2)}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$$

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien

1-Butanol (wassergesättigt)	Z-Chem
2-Mercaptoethanol	Merck
Agar Agar	Z-Chem
Agarose	Roth
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Z-Chem
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	AppliChem
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonphthalein-Na-Salz)	AppliChem
BSA (Rinder Albumin Fraktion V)	Roth
Chloroform	Z-Chem
Coomassie Brilliant Blue R250	Diagonal
DEPC (di-ethyl-propyl carbonat)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem
EDTA Na ₂ 2H ₂ O	Z-Chem
Eisessig (99,7 % Essigsäure)	Z-Chem
Essigsäure	Z-Chem
Ethanol	Z-Chem
Ethanolamin	Z-Chem
Formaldehyd	Z-Chem
Glukose	Z-Chem
Glycerin	Z-Chem
Glycin	Roth
H ₂ NaPO ₄ 2H ₂ O (Natriumdihydrogenphosphat-2-Hydrat)	Z-Chem
Hefeextrakt	Fluka
Imidazole	Sigma-Aldrich
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Fluka
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Z-Chem
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
Methanol	Z-Chem
MgCl ₂ 6H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat)	Z-Chem
NaAcetat 3H ₂ O	Z-Chem
NaAcid	Z-Chem
NaCitrat	Z-Chem

NaCl (Natriumchlorid)	Z-Chem
NaDeoxycholate	AppliChem
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Z-Chem
NaOH (Natriumhydroxid)	Z-Chem
NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)	AppliChem
NP-40	AppliChem
Paraffinwachs	Fluka
Para-Formaldehyd	Z-Chem
Phenol	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Roti-Histokitt	Roth
Rotihistol	Roth
Rotiphorese Gel 30 (0,8 % Bisacrylamid, 30 % Acrylamid)	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	AppliChem
Triethylamin	Fluka
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton X-100 (Polyethylen-glycol-tert-octylphenylether)	AppliChem
TRIZOL	Invitrogen
Trypton	Fluka
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	AppliChem
Urea	Sigma-Aldrich
Wasser DEPC behandelt, steril, autoklaviert	Roth
Wasser UltraPure DNase/Rnase frei	Fisher Scientific
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Beta-D-Galactopyranosid)	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	AppliChem
Xylol	Z-Chem

Sonstige Reagenzien und Enzyme

6x Orange Loading Dye Solution	Fermentas
AccuPrime Taq DNA Polymerase System	Invitrogen
Affi-Gel 15 Gel	Bio-Rad
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth
Chloramphenicol	Roth
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Deoxyribonuclease I, Rnase-free	Fermentas
dNTP Mix, 10mM each	Fermentas
Dynabeads Protein G	Invitrogen
EDTA (25 mM)	Fermentas
EtBr (Ethidium Bromid)	AppliChem

Flüssiger Stickstoff	Air Liquide
Heringssperma DNA	Promega
Luminol-Reagenz und Peroxid-Lösung	Millipore
Lysozyme Solution	Sigma-Aldrich
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase	Fermentas
MgCl ₂ 25mM	Fermentas
Ni-NTA His-Bind Resins	Novagen
Premix Ex Taq (Perfect Real Time)	Takara
Proteinase K, rekombinant	AppliChem
Random hexamer primer, 6-mer	Fermentas
Random Hexamer Primer, 6-mer	Fermentas
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich
RevertAid H Minus M-MuLV Rtase	Fermentas
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	Fermentas
Ribonuclease A (DNase-free)	Fermentas
Ribonuklease A (DNase-frei)	AppliChem
Rnase-Free DNase Set	Qiagen
Röntgenfilm-Entwickler REF 103482	Tetenal
Röntgenfilm-Fixierer REF 103655	Tetenal
SYBR-Green I	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	Roth

Molekulargewichtsmarker

GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
MassRuler DNA ladder, Low Range	Fermentas
O'Range Ruler 100bp+500bp DNA Ladder	Fermentas
O'Range Ruler 200bp DNA Ladder	Fermentas
O'RangeRuler 50bp DNA Ladder	Fermentas
See Blue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen

Kits

GenomePlex Complete WGA Kit (WGA2)	Sigma-Aldrich
GS FLX Titanium General Library Preparation Kit	Roche
GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit 70x75	Roche
GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70	Roche
GS FLX Titanium SV emPCR Kit (Lib-L)v2	Roche
High Pure PCR Cleanup Mikrokit	Roche
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab
pETBlue-2 Perfectly Blunt Cloning Kit	Novagen

Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	Fermentas
Rneasy mini Kit	Qiagen

2.2 Puffer und Lösungen

ChIP-Puffer

RIPA	50 mM	1 M Tris (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	2 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	1 %	NP-40
	0,5 %	NaDeoxycholate
	0,1 %	SDS
	1 x	Protease Inhibitor
Waschpuffer	0,1 %	SDS
	1 %	Triton X-100
	2 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	20 mM	1 M Tris (pH 8,0)
Finaler Waschpuffer	0,1 %	SDS
	1 %	Triton X-100
	2 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	500 mM	NaCl
	20 mM	1 M Tris (pH 8,0)
Elutionspuffer	1 %	SDS
	100 mM	NaHCO ₃

Coomassie

Färbelösung	0,2 %	Coomassie Brilliant Blue R250
	40 %	Methanol
	über Nacht unter Rühren lösen	
	7,5 %	Eisessig (99,7 %)
	ad	H ₂ O
	durch Faltenfilter filtrieren (S+S 595 ½)	
Entfärber	20 %	Isopropanol

	7,5 %	Essigsäure (60 %)
Immunohistologie		
Fixierungspuffer	0,1 M 4 %	0,2 M Phosphatpuffer Paraformaldehyd
Phosphatpuffer	40 mM 0,16 M	0,2 M KH_2PO_4 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Blockpuffer-Tx	1 x 0,5 % 0,1 %	PBS BSA Triton X-100
Waschpuffer PBS-Tx	0,1 % 137 mM 2,7 mM 10,1 mM 1,8 mM	Triton-X100 NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4
Färbelösung (10 ml)	1 mg 2 mg	NBT in 10 ml RxN Puffer BCIP in 50 μl DMSO
RxN Puffer	0,1 M 1 mM	1 M Tris (pH 8,7) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Ni-NTA-Proteinaufreinigung		
Bindepuffer (pH 8,0)	300 mM 50 mM 20 mM	NaCl H_2NaPO_4 Imidazole
Denaturierungspuffer (pH 8,0)	8 M 100 mM 10 mM	Urea H_2NaPO_4 Tris
Waschpuffer (pH 8,0)	300 mM 50 mM 50 mM	NaCl H_2NaPO_4 Imidazole

Elutionspuffer (pH 8,0)	300 mM	NaCl
	50 mM	H ₂ NaPO ₄
	200 - 500 mM	Imidazole

RNA-Gelelektrophorese

RNA-Probenpuffer 5x	25 %	Glycerin
	0,2 %	Bromphenolblau
	0,2 %	Xylencyanol
	0,5 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	0,5 µg/ml	EtBr

MOPS-Puffer 10x (pH 7,0):	200 M	MOPS
	50 mM	NaAcetat
	10 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)

RNA-Minigel (40 ml)	0,4 g	Agarose
	4 ml	10x MOPS-Puffer
	30 ml	H ₂ O
	aufkochen und abkühlen auf ca. 50°C	
	6,8 ml	Formaldehyd

SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer 5x	0,2 M	1 M Tris (pH 6,8)
	10 mM	2-Mercaptoethanol
	10 %	SDS
	30 %	Glycerin
	0,05 %	Bromphenolblau

Trenngel 10 %	375 mM	1,5 M Tris (pH 8,8)
	0,1 %	SDS
	10 %	Rotiphorese Gel 30
	0,25 %	Temed
	0,05 %	APS

Sammelgel 4 %	300 mM	0,5 M Tris (pH 6,8)
	0,25 %	SDS
	4 %	Rotiphorese Gel 30

	0,25 %	Temed
	0,05 %	APS
Glycin-Laufpuffer 10x	2 M	Glycin
	1 %	SDS
	0,25 M	Tris
Sonstige Puffer		
Blocking-Puffer (Western-Blot)	1 x	PBS
	2 %	BSA
	0,1 %	Tween
Blotting-Puffer	0,2 M	Glycin
	20 %	Methanol
	0,25 M	Tris
DNA-Extraktionspuffer	100 mM	NaCl
	10 mM	1M Tris HCl (pH 8,0)
	50 mM	0,5 M EDTA, (pH 8,0)
	0,5 %	SDS
	20 µg/ml	10 mg/ml RNase A
	0,1 mg/ml	20 mg/ml Proteinase K
Homogenisierungspuffer	1 x	PBS
	200 mM	EDTA
PBS 10x	2,7 mM	KCl
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	137 mM	NaCl
	10,1 mM	Na ₂ HPO ₄
TAE 50x	2 M	Tris
	50 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	1 M	Eisessig
TE	10 mM	1 M Tris (pH 7,2)
	5 mM	0,5 M EDTA (pH 8,0)

2.3 Antikörper

Tabelle 1: Antikörper

Wenn nicht anders angegeben ist, wurden für Western-Blots (WB) die Verdünnungen aus der Tabelle angewendet.

primäre Antikörper	Herkunft	Klon	Hersteller	Verdünnung im WB
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	rabbit	polyklonal	Cell Signaling	1:1000
ATF2	rabbit	polyklonal	abcam	1:500
ATF-2 (N-96)	rabbit	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
c-Jun	rabbit	polyklonal	abcam	1:500
AP-1	rabbit	polyklonal	Sigma-Aldrich	1:200
phospho-c-Jun (pSer73)	rabbit	polyklonal	Cell Signaling	1:1000
CREB (48H2)	rabbit	monoklonal	Cell Signaling	1:1000
phospho-CREB (pSer133)	rabbit	polyklonal	Sigma-Aldrich	1:1000
Creb	rat	polyklonal	Zoologie Saarbrücken	
Creb-mAk	mouse	monoklonal	Zoologie Saarbrücken	
NF-κB p65	rabbit	polyklonal	Cell Signaling	1:1000
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1)	rabbit	monoklonal	Cell Signaling	1:1000
Histone H3 (tri methyl K4)	rabbit	polyklonal	abcam	
Histone H3	rabbit	polyklonal	Sigma-Aldrich	
Normal Rabbit IgG	rabbit	polyklonal	Cell Signaling	1:1000
sekundäre Antikörper				
anti-Rat IgG –Peroxidase conjugate	rabbit	polyclonal	Sigma-Aldrich	1:20.000
anti-Mouse IgG Peroxidase coniugate	rabbit	polyklonal	Sigma-Aldrich	1:30.000
anti-Rabbit IgG Peroxidase coniugate	goat	polyklonal	Sigma-Aldrich	1:10.000
anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate	goat	polyklonal	Sigma-Aldrich	

2.4 Primer

Tabelle 2: Primer

Klonierungs-Primer	Sequenz (5' - 3')	RefSeq (NCBI)
Jun-like for	AATGGAGCAAACGTTCTACGAGGAC	XM_003250988.1
Jun-like rev	TGACGACCTTCGATGAACTGACCCGAAACTGCCATG	
Creb for	AATGGAAAGTATGGTTGAGGAAAATGG	XM_623343.3
Creb rev	TGACGACCTTCGATGTCAGTTTTTCGGTTCGCATAGTTG	
Atf2 for	TACTGAGAAAATGTTTGTTTGCTCTTCG	XM_003249269.1
Atf2 rev	TGCTTATCATCATCATCTGGGCCGAGTATTATACCATTTCC	
Fos for	AATGAAGCTCGACGTGTCGGATG	724169
Fos rev	TGACGACCTTCGATATTCGAACGCTCATCGGTAATCAC	
Myef2 for	AATGGGTCGGAAGAAGATTCAAATTTTCG	XM_397383.3
Myef2 rev	TGCTTATCATCATCATCATGATGTGGAGGTGGTGCACC	

Vektor-Primer	
pETBlueUP Primer	TCACGACGTTGTAAAACGAC

RT-PCR-Primer	
Random hexamer primer	D(NNNNNN) N = G, A, T oder C
Oligo (dT) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT

ChIP-Primer	Gene ID (NCBI)
PCR	
ChIP Creb-Positiv for	409401
ChIP Creb-Positiv rev	
ChIP Creb-Negativ for	
ChIP Creb-Negativ rev	
Real-Time-qPCR	
ChIP qPCR Jun-like for	726289
ChIP qPCR Jun-like rev	
ChIP qPCR Nos for	503861

ChIP-Primer	Sequenz (5' - 3')	Gene ID (NCBI)
ChIP qPCR Nos rev	CACCTGTTACCGTTTCGCTT	
ChIP qPCR Egr1 for	TGTTTCATCGCGAAGGGAGAC	726302
ChIP qPCR Egr1 rev	CCCTAGCTCCCCCTCATTCT	
ChIP qPCR Camkii for	TCGAATATGGGACGTGGAGA	551691
ChIP qPCR Camkii rev	TTTTCGCGACAATTCAAAGC	
ChIP qPCR Dop3 for	AGGGAGTGTTTGCCTAGTGGGA	408995
ChIP qPCR Dop3 rev	GGAACGGCATGTTTGTATTCATC	
ChIP qPCR Gucy1b3 for	AATTCACAAAACCGTACTGCACA	408880
ChIP qPCR Gucy1b3 rev	TCGATTCCGTTACACTCGTA	
ChIP qPCR Oa1 for	TGTCGAGGGTGAATGGTAAATC	406068
ChIP qPCR Oa1 rev	CAACTGATCGATGTTTCAGAGGAA	
ChIP qPCR RasGef1b for	GCGTTTAACTCGATTCTCATTCC	412801
ChIP qPCR RasGef1b rev	AGATGCGTTAAACGGAAGTCG	
ChIP qPCR Erka for	AAACCTGTTGAAAGTTTTGCAGAGT	409523
ChIP qPCR Erka rev	GAGGAGCACAAATTTATCATGGAA	
Standards		
ChIP St Jun-like for	GTAGCGCCGATTGTCTGACC	
ChIP St Jun-like rev	CCCATGTTGTTCTCGCGATT	
ChIP St Nos for	AGCAATGGCCGAACATATGGC	
ChIP St Nos rev	ACATACTTGACCAGAGCACAAATGTT	
ChIP St Egr1 for	TCACTGAGAGAGAGGCGTCG	
ChIP St Egr1 rev	TTATCGTGCGCCTCGGTAGA	
ChIP St Camkii for	GCTCCCCTGTAAAACGTCACTTTAG	
ChIP St Camkii rev	GGCTTAAGTGTACCGTGGTGGATAC	
ChIP St Dop3 for	GAGAAACTGGTGGTTGATCAGAGAA	
ChIP St Dop3 rev	AGCATAATAGAGAACATAGCGCACACT	
ChIP St Gucy1b3 for	GCGAGATTGTAACCGCTTTAACTTT	
ChIP St Gucy1b3 rev	AAACGTTGGATCGTGCAATAAGTAG	
ChIP St Oa1 for	CCTGAATCAAGTGAACGAGTCAAAT	
ChIP St Oa1 rev	TGTGATAGACAGCGAGTATCACGAG	

ChIP-Primer	Sequenz (5' - 3')	Gene ID (NCBI)
ChIP St RasGef1b for	ATTAGACGTGGTACGAATCACTGTTG	
ChIP St RasGef1b rev	CTTCCTCCTCCTGTTGTTCCATAA	
ChIP St Erka for	TTTACACGAAACAGAAGATTGTCCAC	
ChIP St Erka rev	ACGCCTTGGACTAATTCTAATCTTGA	

mRNA-Primer		RefSeq (NCBI)
Real-Time-qPCR		
mRNA qPCR Erka for	GTTTATTTCCAAATGCCGATTTGC	XM_393029.4
mRNA qPCR Erka rev	TGCAACCGGTTTCATCAGCAG	
mRNA qPCR Dop3 for	TGCAAGAAGGACAAGAAGAATGC	NM_001014983.1
mRNA qPCR Dop3 rev	CAGAAACACACCAAGAACAATGG	
mRNA qPCR Jun-like for	CCAGAATTGGAGAAGTTCATTATCG	XM_003250988.1
mRNA qPCR Jun-like rev	AACTCGTTCAAAGCGTCGACG	
mRNA qPCR EF1-alpha for	CCTCTTCAGGACGTATATAAAATCG	NM_001014993.1
mRNA qPCR EF1-alpha rev	AGCTTCGTGATGCATTTCAACAG	
mRNA qPCR Ppi for	CTTTCCATGGCTAATGCTGGTC	XM_393381.4
mRNA qPCR Ppi rev	CCATAGCCTCCAATTTTCTAACAAC	
mRNA qPCR RpS18 for	AAGCGTGCTGGAGAATGTTTCAG	XM_625101.3
mRNA qPCR RpS18 rev	CCAAATAAGAACTAGTGAGCTGTG	
Standards		
mRNA St Erka for	GCACCTACTATAGAACAAATGAAAGATG	
mRNA St Erka rev	CTTTCTTGCTTTGATCGTAGACAAC	
mRNA St Dop3 for	GGTTGACGATACTGTTGGTCTGG	
mRNA St Dop3 rev	CAGCTTCGTGCAAATAGCGTCC	
mRNA St Jun-like for	GGAGCAAACGTTCTACGAGGAC	
mRNA St Jun-like rev	CGACCATAGACACCATCAGACG	
mRNA St EF1-alpha for	GTTATTGGACACGTCGACTCTGG	
mRNA St EF1-alpha rev	CCATTGCTGATTTGACCAGGGTG	
mRNA St Ppi for	TGGCGTTGAGATCGATCTGCC	
mRNA St Ppi rev	GATAGCAACAGTTGTATGCAACAGC	

mRNA-Primer	Sequenz (5' - 3')	RefSeq (NCBI)
mRNA St RpS18 for	ACATATTCTTCGTGTCATGGGCAC	
mRNA St RpS18 rev	TTCGATACACCCACTGTACGTCC	

2.5 Verbrauchsmaterialien

384-well-Platten (schwarz)	Nunc
8er Flat Caps Strips, opticalclear (621816)	Biozym
Deckgläser (24 x 50 mm)	Roth
Dentalwachs (medium)	Ubert
Dialyseschlauch Visking 27/32	Roth
DNA-Exitus Plus	AppliChem
Filterspitzen	Biozym
UV-Küvette Mikro	Brand
Multiplate 96 (621820) für Real-Time-qPCR	Biozym
Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85)	Schleicher und Schuell
Objektträger Super Frost weiß	Roth
Pasteurpipetten	Roth
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
RNase-Exitus Plus	AppliChem
Röntgenfilm BioMax Xar Film	Kodak
Tafelzucker (Sucrose)	Geschäft
Vivaspin 6, MWCO 10	VWR
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell
Zahnstocher	Drogerie
Zellkulturplatten 96-well, farblos	TPP
Zentrifugenröhrchen (15 ml + 50 ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen mit Eindrückstopfen (62515.006)	Sarstedt

2.6 Tiere

Honigbiene (*Apis mellifera*)

Bienen wurden im Sommer in Bienenstöcken im Botanischen Garten (Universität Saarland) gehalten. Im Winter standen die Bienenstöcke im Bienenhaus des Botanischen Gartens bei einer Temperatur von 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 %. Gefangen wurden ausschließlich Sammlerbienen. Gefangene Bienen wurden bis zur Sättigung mit 1 M Sucroslösung gefüttert.

Hausmaus (*Mus musculus*) und Wanderratte (*Rattus norvegicus*)

Ratten und Mäuse wurden im Tierstall (Geb. A2.4, Universität des Saarlandes) gehalten.

2.7 Geräte

Bechergläser	Schott
Bienenröhrchen (Plastik)	eigene Herstellung
Binokular S6D	Leica
Block-Heizgerät (Accu Block)	Labnet
Brutschrank	Binder
Büchnerfilter	Z-Chem
Fangpyramide	eigene Herstellung
Folienschweißgerät	Severin
Vertikales Elektrophoresesystem	Owl
Genome Sequencer FLX System	Roche
Glashomogenisator (1ml) mit Glas-S-Stößel	Braun
Glaspipette (25 ml)	Schott
Horizontal Electrophoresis System	Owl
Inkubationsschüttler Th15	Johanna Otto
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott
Kasten mit UV-Licht Lampe	eigene Herstellung
Kasten mit Weißlicht Lampe	eigene Herstellung
LötKolben	eigene Herstellung
Magnetic Separation Stand (12 position), 1,5 ml	Promega
Mastercycler Personal	Eppendorf
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand
Mikroskop Leitz DMRB	Leica
Mikrotom Autocut 2040	Reichert-Jung
Multimode Reader Safire2	Tecan
8-Kanal Pipette Discovery	Abimed
Mx3000P QPCR System	Stratagene
MyiQ2 Two-Color Real-Time-PCR Detection System	Bio-Rad
Peristaltikpumpe P-1	Pharmica Biotech
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW
Einkanalpipetten Discovery (10, 100, 200, 1000 µl)	Abimed
Platte für Bienenröhrchen	eigene Herstellung
Porzellan Mörser und Pistell	Z-Chem
Powerstation 300 PLUS	Labnet
Rührheizgerät IKA RCT basic	IKA-Labortechnik
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik

Semi Dry Electroblothing	Owl
Spectrophotometer BioMate 3	Thermo Scientific
Multipette Plus	Eppendorf
Switching Power DPS-4005 PFC	Voltkraft
Thermomixer MB-102	BIOER
Ultraschalgerät HTU SONI 130	Heinemann
UV-Licht Lampe (Nu-8 KL)	Benda
Vortex VX 100	Labnet
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius
Wasserbad	Labnet
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge (Spectrafuge 24D)	Labnet
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf

2.8 Software

Align	EMBL-EBI	http://www.ebi.ac.uk/Tools
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	NCBI	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ChIP-seq Auswertung	eigene Herstellung	
Chromas Lite 2.01	Technelysium	http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html
Cister	Zlab	http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml
ClustalW2	EMBL-EBI	http://www.ebi.ac.uk/Tools
DNA Calculator	Sigma-Aldrich	http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp
Excel	Microsoft	
geNorm	Center for Medical Genetics	http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/
GS Reference Mapper	Roche	
iQ5 optical system software v2.1	Bio-Rad	
Jalview 2.6.1	Barton Group, University of Dundee	http://www.jalview.org/
Kalign	EMBL-EBI	http://www.ebi.ac.uk/Tools
Map Viewer	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
MxPro QPCR software for Mx3000P v4.1.0.0	Stratagene	

Notepad++	Notepad++team	http://notepad-plus-plus.org/
Oligo Calculator	Northwestern University	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
OligoAnalyzer 3.0	Integrated DNA Technologies, Inc	http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/
Ontology Tools	Lewis-Sigler Institut	http://go.princeton.edu/
Primer3Plus	Free Software Foundation	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
TESS (Transcription Element Search System)	PCBI	http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess
VassarStats: Website for Statistical Computation	Vassar College	http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html

2.9 Datenbanken

Amel_2.0, Amel_3.0, Amel_4.0	HGSC	http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/project-species-i-Apis%20mellifera.hgsc?pageLocation=Apis%20mellifera
FTP Data: cDNAs	HGSC	
GenBank	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Gene	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/
Gene Ontology	the Gene Ontology	http://www.geneontology.org/
RefSeq (Reference Sequences)	NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/
UniProtKB (Protein Knowledge-base)	UniProt Consortium	http://www.uniprot.org/

C Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte am Modellorganismus der Honigbiene *Apis mellifera* untersucht werden, wie die Genexpression nach Stress reguliert wird, durch die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren (TFs) an *cis*-Elemente. Zur Detektion der gebundenen DNA-Sequenzen sollte erstmalig die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) für *in vivo* Experimente bei der Honigbiene etabliert und angewendet werden. Da bei der ChIP-Technik die DNA-TF-Komplexe durch spezifische Antikörper detektiert werden, wurden zunächst geeignete Antikörper gegen TFs benötigt. Die Nomenklatur der Nukleinsäuren und Proteine ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 7).

1 Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren

1.1 Spezifität von Antikörpern gegen TFs der Biene

Zunächst sollten die TFs Atf-2, c-Jun und Creb untersucht werden, die an verschiedenen Stressantworten beteiligt sind.^[145,155,198-200] Da es gegen die TFs der Biene keine kommerziellen Antikörper gibt, sollten für andere Spezies hergestellte Antikörper auf ihre Spezifität gegen homologe Proteine der Biene getestet werden. Hierzu wurden die Aminosäure-Sequenzen der Peptide oder Proteine, die zur Herstellung der Antikörper verwendet wurden, mit den Aminosäure-Sequenzen der entsprechenden TFs der Biene abgeglichen. Die Epitope der Antikörper und die entsprechenden Sequenzen der TFs wiesen dabei eine hohe Sequenzidentität auf (Sequenzabgleiche nicht gezeigt).

Die polyklonalen Antikörper ATF2 und c-Jun wurden im Western-Blot auf Homogenat aus Bienenhirn getestet (Abb. 19a). Beide Antikörper zeigen eine distinkte Bande. Der c-Jun-Antikörper detektiert ein Protein um die 30 kDa, was dem Molekulargewicht des nativen c-Jun-Proteins in der Biene entspricht. Der Antikörper ist somit für Experimente geeignet. Der ATF2-Antikörper markiert ein Protein bei ca. 80 kDa. Da das Molekulargewicht von Atf-2 in der Biene nicht bekannt ist, wurde es aus der Sequenz der mRNA berechnet. Die ermittelte Masse von 301 kDa ist wesentlich größer, als die Massen von Atf-2 anderer Spezies.^[151,201] Daher ist es wahrscheinlich, dass das endgültige Protein über posttranskriptionale Modifikation der mRNA (Splicing) oder des Proteins (Proteolyse) entsteht. Aufgrund dessen, dass der Antikörper in anderen Spezies funktioniert hat und das Epitop, gegen den er synthetisiert wurde, im Atf-2 der Biene konserviert ist, sollte der Antikörper für Experimente verwendet werden. Im Western-Blot mit den beiden Antikörpern CREB(48H2) und phospho-CREB(pSer133) beweisen die Proteinbanden im Homogenat aus Mäusehirn die spezifische Funktionalität der Antikörper (Abb. 19b). Im Bienenhomogenat dagegen detektieren sie nichts. In der Biene sind die Epitope des humanen CREB anscheinend

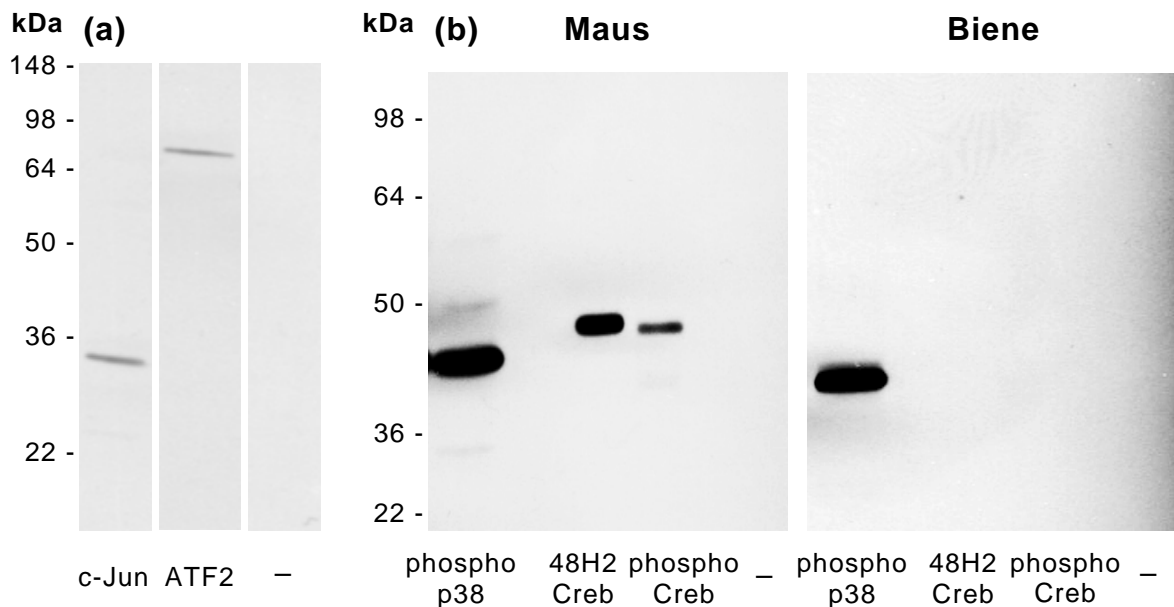


Abb. 19: Spezifität von c-Jun-, ATF2- und Creb-Antikörpern in der Biene

Antikörper wurden auf ihre Antigen-Spezifität hin untersucht. – = Kontrolle ohne primären Antikörper **(a)** Homogenat aus Bienenhirn wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot wurden dann die Antikörper c-Jun und ATF2 getestet. **(b)** Mit SDS-PAGE wurde Homogenat aus Mäusehirn oder Bienenhirn aufgetrennt. Im Westernblot wurden die Antikörper CREB(48H2) und CREB-phospho-SER133 getestet. + = Positivkontrolle mit phospho-p38-Antikörper

nicht so stark konserviert, um von den entsprechenden Antikörpern erkannt zu werden. Des Weiteren wurden die Antikörper ATF2-(N-96), AP1, phospho-c-Jun(pSer73), NF- κ B-p65 und Phospho-NF- κ B-p65 getestet. Alle Antikörper detektieren unspezifische Proteinbanden oder gar keine Proteine (Abb. nicht gezeigt).

Von den getesteten kommerziellen Antikörpern scheinen nur ATF2 und c-Jun für Experimente geeignet zu sein. Um den experimentellen Spielraum zu erweitern, sollten weitere Antikörper gegen TFs selber hergestellt werden.

1.2 Herstellung von Antikörpern mittels rekombinanter Proteine

Es sollten spezifische Antikörper gegen TFs der Biene für die homologen TFs CREB, c-Jun, c-Fos, ATF-2 und MEF-2 des Menschen (*Homo sapiens*) hergestellt werden. Von c-Fos und MEF-2 ist ebenfalls bekannt, dass sie an der Stressantwort beteiligt sind.^[202-205] Die Antikörper sollten durch Immunisierung von Ratten (*Rattus norvegicus*) und Mäusen (*Mus musculus*) mit rekombinanten Proteinen gewonnen werden. B-Lymphozyten aus der Mäusemilz sollten zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden. Polyklonale Antikörper aus den Ratten sollten affinitätsaufgereinigt werden. Stellvertretend für die Herstellung aller Antikörper werden zum Teil nur Abbildungen für einen Antikörper gezeigt.

1.2.1 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurde das „pETBlue-2-System“ (Novagen) verwendet. Hierbei werden den Expressionsproteinen kurze Schwänze aus Histidinresten (His-Tags) angefügt. Mittels einer Affinitätssäule mit „Ni-NTA His•Bind® Resin“ (Novagen), welches spezifisch His-Tags bindet, wurden die Proteine aufgereinigt. Der besseren Übersicht wegen werden die einzelnen Schritte der Proteinsynthese schematisch dargestellt. Eine Erläuterung der Abbildung findet sich im Methodenteil zur Herstellung rekombinanter Proteine wieder.

1.2.1.1 Herstellung von cDNA-Inserts

Zunächst wurden die cDNA-Inserts hergestellt, die für die rekombinanten Proteine kodieren. Durch Trizol-Extraktion wurde aus Bienenköpfen die RNA extrahiert. Mittels reverser Transkription wurde daraus cDNA synthetisiert und die mRNA-Transkripte der gewünschten TFs wurden mit spezifischen Primern ganz oder partiell in der PCR amplifiziert. Die Spezifität der Amplikons wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Alle Inserts besitzen die erwartete Produktgröße (Abb. 20). Die spezifischen Primer für das Creb-Insert können unterschiedlich große Splicevarianten binden. Daher ist im Gel eine breitere Creb-Bande aus verschiedengroßen PCR-Produkten zu sehen.

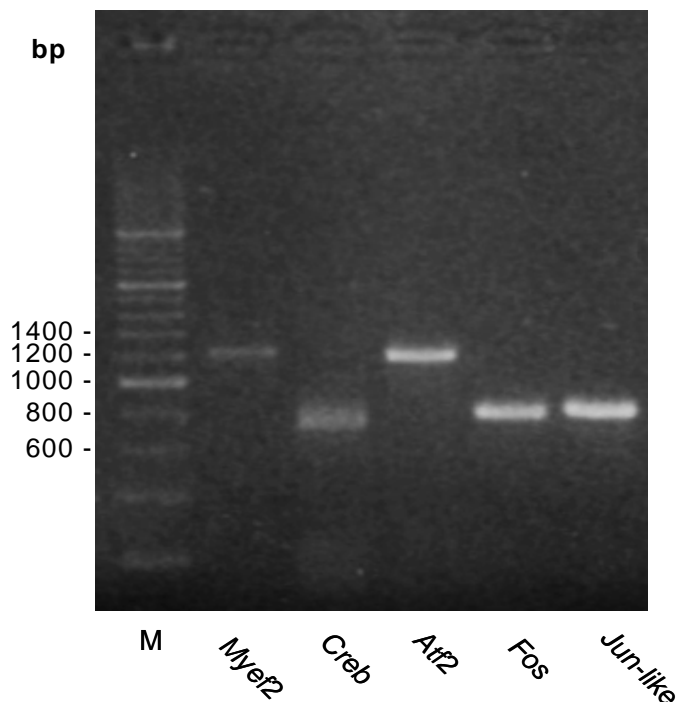
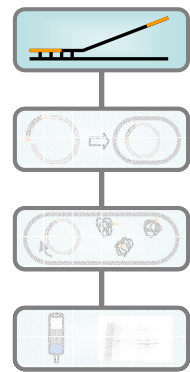


Abb. 20: cDNA-Inserts von mRNAs der TFs

Es wurden jeweils 2 µl PCR-Produkte der cDNA-Inserts im 1,2 % Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. M = 200 bp DNA Marker

1.2.1.2 Klonierung und Transformation von Bakterienzellen

Die cDNA-Inserts wurden aus Agarosegelen extrahiert und durch Klonierung in den pETBlue-2-Vektor (Novagen) integriert. Die NovaBlue-Singles™ Competent-Cells (*E. coli*) wurden dann direkt mit den Plasmiden des Klonierungsansatzes transformiert und auf Kulturplatten ausplattiert. Von den Platten wurden positive Klone mit Plasmid durch Blue-White-Screening selektiert. Mittels Kolonie-PCR wurden die Bakterienzellen auf erfolgreiche Klonierungen und Transformationen überprüft.

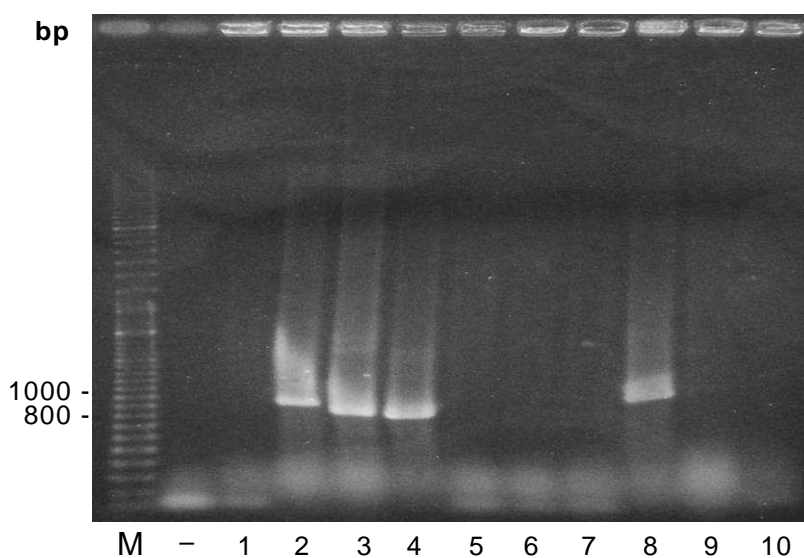
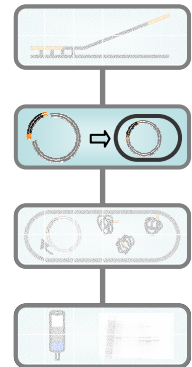


Abb. 21: Kolonie-PCR-Produkte aus Bakterienklonen

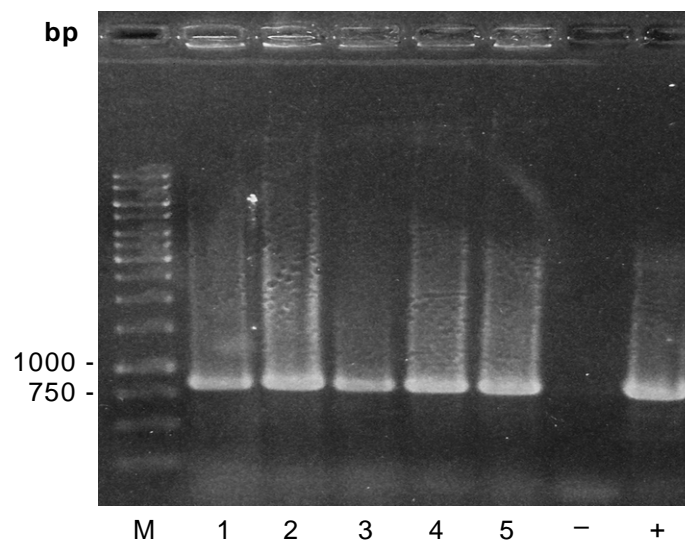
Es wurden jeweils 12,5 µl Produkt der Kolonie-PCRs im 1 % Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. 1 - 10 = *Creb*-Klone; - = PCR ohne DNA; M = 100 + 500 bp DNA Marker

Die Banden der PCR-Produkte sollten aufgrund verschiedener *Creb*-Isoformen zwischen 800 und 1000 bp liegen. Die Klone 2, 4 und 8 sind positiv (Abb. 21). Bei Klon 3 sind noch höhere Banden zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass eventuell mehrere Inserts in den Vektor integriert wurden. Positive Klone wurden sequenziert und mit den Sequenzen der *Creb*-mRNAs der Biene abgeglichen. Alle Proteine, für die die Klone kodieren, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Expressionsproteine der Klone

Protein Name	NCBI RefSeq
cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2-like (Atf-2)	XP_003249317.1
transcription factor AP-1 (c-Jun)	XP_003251036.1
cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 isoform 2 (Creb-1)	XP_623392.3
CREB 8 protein	CAD23073.1
CREB 2 protein	CAD23078.1
kayak (c-Fos), hypothetisches Protein	XP_001119924
myocyte-specific enhancer factor 2 (Mef-2)	XP_397383.3

Weil die NovaBlue-SinglesTMCompetent-Cells nicht für die Proteinexpression geeignet sind, wurden die pETBlue-2-Plasmide der Klone präpariert und die TunerTM(DE3)pLacI-Competent-Cells damit transformiert. Die Transformationen wurden wiederum durch Kolonie-PCR überprüft.

**Abb. 22: Kolonie-PCR mit pETBlue-*Creb1*-Plasmiden aus Tuner(DE3)pLacI-Zellen**

Es wurden jeweils 12,5 µl Produkt der Kolonie PCRs im 1 % Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. 1 - 5 = *Creb1*-Klone; M = 1 kb DNA Marker; - = PCR ohne DNA; + = PCR mit pETBlue-*Creb1*-Plasmid

Die Transformationen waren bei den *Creb*-Klonen (Abb. 22) und den anderen untersuchten Klonen (*c-Jun*, *c-Fos*, *Atf2* und *Mef2*) erfolgreich. Die amplifizierten DNA-Fragmente besaßen die berechneten Größen. Somit konnten alle Klone für die Proteinexpression eingesetzt werden.

1.2.1.3 Proteinexpression

Um eine hohe Ausbeute an rekombinantem Protein zu erlangen, mussten verschiedene Parameter der Proteinexpression mit den Tuner-Zellen optimiert werden. So wurde zum einen der Beginn der Expression, bei unterschiedlichen Zelldichten induziert und zum anderen wurden verschieden lange Expressionszeiten ausgetestet. Die Zellen wurden im Anschluss durch Lyse aufgebrochen. Die Bakterienlysate wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinfractionen mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

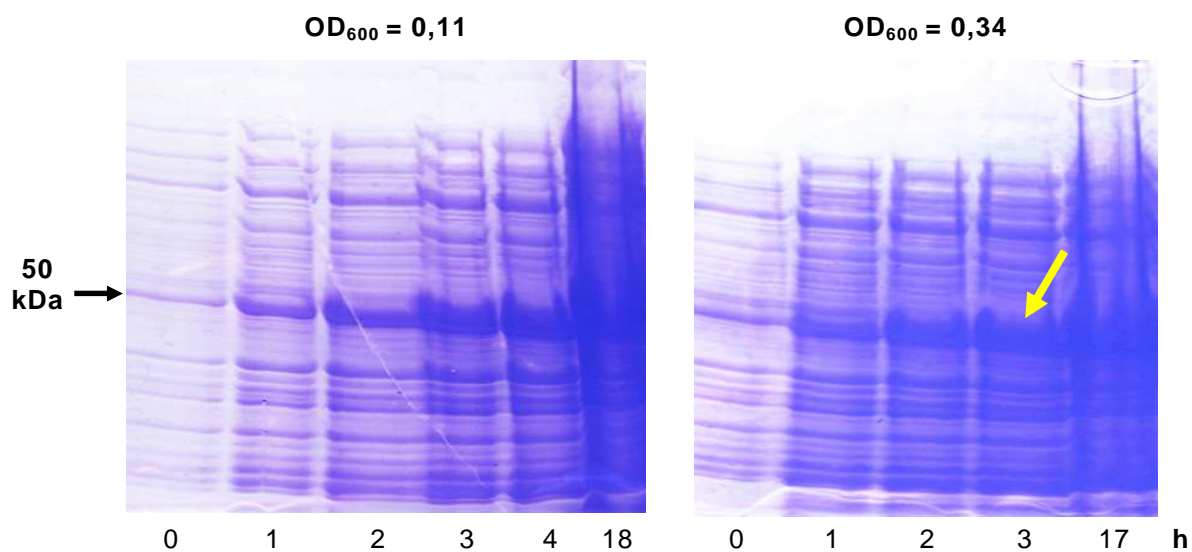
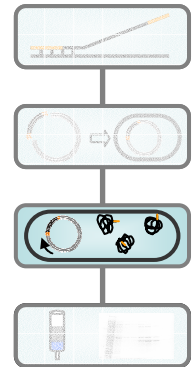


Abb. 23: c-Jun-Expression

Die Expression des rekombinanten Proteins c-Jun wurde bei unterschiedlicher Zelldichte (OD_{600}) induziert. Die Kulturen wurden nach den angegebenen Expressionszeiten (h) geerntet. Die Proteine der Bakterienlysate wurden in Polyacrylamidgelen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Der schwarze Pfeil markiert die Größe des rekombinanten c-Jun. Der gelbe Pfeil markiert die Probe, bei der die Parameter der Induktion und der Expressionszeit optimal waren.

Die größten Anteile des rekombinanten c-Jun, gemessen an den Mengen der Gesamt-Proteine der Bakterienlysate, wurden mit folgenden Parametern erreicht: bei einer Induktion der Proteinexpression mit einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,11$ und der Bakterienernte nach drei und vier Stunden, sowie bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,34$ und der Ernte nach zwei und drei Stunden (Abb. 23). Bei Induktionen mit höheren Zelldichten ($OD_{600} = 0,48$ und $OD_{600} = 0,66$) waren nur geringere Expressionsmengen nach verschiedenen Inkubationszeiten zu erkennen (Abb. nicht gezeigt).

Die Expressionszeiten sollten möglichst kurz gehalten werden um Zeit einzusparen. Deshalb sollte im Folgenden die Expression bei $OD_{600} = 0,34$ induziert und die Kulturen drei Stunden später geerntet werden (siehe gelber Pfeil).

Beim rekombinanten Creb-1 wurde die beste Proteinausbeute unter den gleichen Bedingungen erreicht. Bei Tuner-Bakterien mit den Plasmidkonstrukten *c-Fos*, *Atf-2* und *Mef-2* konnte keine Expression der rekombinanten Proteine beobachtet werden (Abb. nicht gezeigt).

Als letzter Parameter zur Optimierung der Proteinexpression wurde die IPTG-Konzentration ausgetestet. IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert die Expression der rekombinanten Proteine. Konzentrationen von 1 mM oder 0,3 mM IPTG bewirkten keinen Unterschied in der Expression der rekombinanten Proteine (Abb. nicht gezeigt). Somit sollten Proteinexpressionen für die rekombinanten c-Jun und Creb-1 bei einer Bakteriendichte von $OD_{600} = 0,34$ mit 0,3 mM IPTG induziert werden und die Bakterien nach drei Stunden Inkubationszeit geerntet werden.

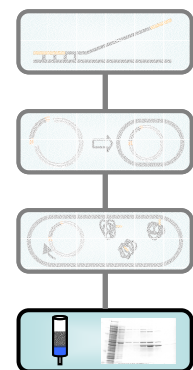
1.2.1.4 Proteinaufreinigung

Die Bakterienzellen wurden direkt nach dreistündiger Expressionszeit lysiert und durch Gefrier-/Auftauzyklen mit anschließender Sonifikation aufgebrochen. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine bestand aus einer Fraktionierung und anschließender Affinitätsaufreinigung.

1.2.1.4.1 Fraktionierung der Proteine

Die rekombinanten Proteine müssen für die Affinitätsaufreinigung gelöst vorliegen. In den Bakterienzellen können die Proteine gelöst oder aggregiert als unlösliche Einschlusskörperchen vorliegen. Da eventuelle Proteinaggregate zunächst aufgelöst werden mussten, wurden die Bakterienlysate durch Zentrifugation in Zellüberstand mit gelösten Proteinen und Zellpellets mit ungelösten Proteinen fraktioniert. Mögliche Aggregate in den Pellets wurden durch Urea-Behandlung gelöst und wiederum durch Zentrifugation fraktioniert. Ein Schema der Fraktionierung ist in Abb. 24b dargestellt. Proteinproben der einzelnen Fraktionen wurden im Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

Im Gel sind die einzelnen Fraktionen der c-Jun-Expression zu sehen (Abb. 24a). Sowohl im Überstand, als auch im Pellet war rekombinantes Protein vorhanden, wobei der Anteil an c-Jun im Pellet größer war. Da im Pellet zusätzlich weniger Bakterienproteine als im Überstand vorlagen, wurde die Pellet-Fraktion zur weiteren Proteinaufreinigung ausgewählt. Das rekombinante Creb-1 wurde nach der Fraktionierung ausschließlich im Überstand detektiert (Abb. nicht gezeigt), welcher dann für die weitere Proteinaufreinigung verwendet wurde.



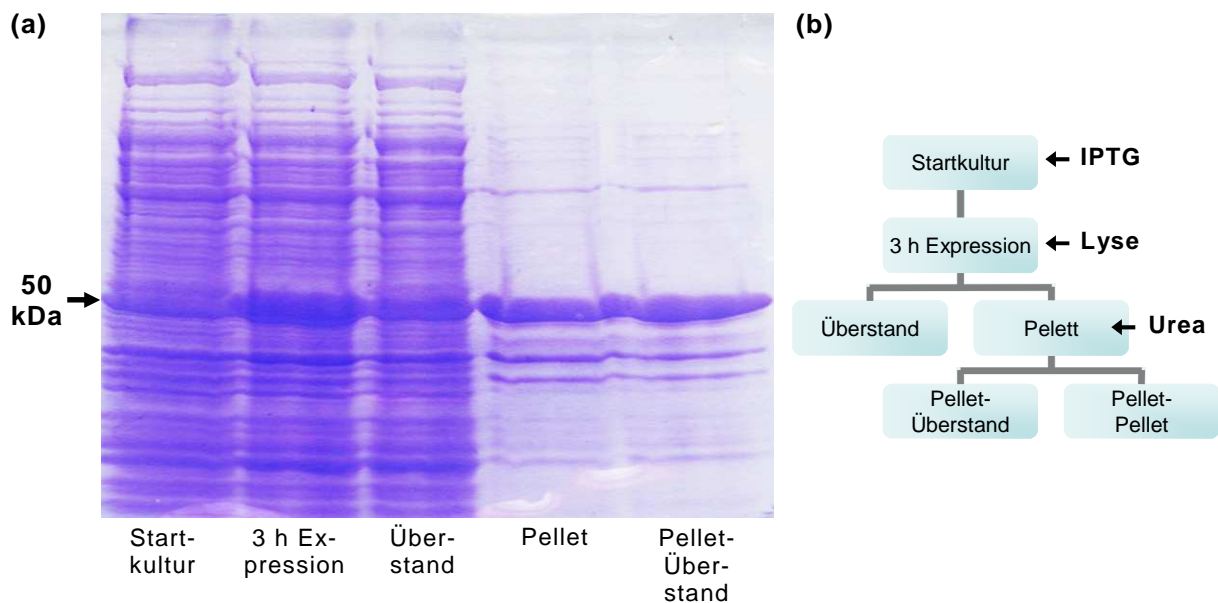


Abb. 24: Proteinfractionen der c-Jun-Expressionsbakterien

Von den Expressionsbakterien mit dem pETBlue2-*c-Jun*-Plasmid wurden Proben entnommen, direkt nach IPTG Zugabe (Startkultur) und 3 h danach (3 h Expression). Mittels Lyse der Zellen und Zentrifugation wurde die 3 h Probe in Überstand und Pellet aufgetrennt. Das Pellet wurde anschließend mit 8 M Urea behandelt und durch Zentrifugation in die Fraktionen Pellet-Überstand und Pellet-Pellet aufgeteilt. **(a)** Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Der schwarze Pfeil zeigt die Bandenhöhe des rekombinanten c-Jun. **(b)** Schema der Fraktionierung.

1.2.1.4.2 Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung

Fraktionen mit rekombinantem Protein wurden mit Ni-NTA-His-Bind-Resin (Novagen) weiter aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine werden dabei über die starke Affinität ihrer Histidin-Reste (6xHis-Tags) an eine Ni-NTA-Matrix gebunden. Ungebundene Proteine werden ausgewaschen. Die gebundenen Proteine werden dann mit ansteigenden Imidazol-Konzentrationen eluiert. Imidazol ist Bestandteil der Aminosäure Histidin und kompetiert mit dem 6xHis-Tag um die Bindung am Ni-NTA.

Im Polyacrylamidgel ist zu erkennen, dass in den Fraktionen 50 – 500 mM Imidazol das rekombinante c-Jun aufgereinigt vorliegt und die anderen Bakterienproteine fast gänzlich gewegewaschen wurden (Abb. 25). Das rekombinante Creb-1 konnte ebenfalls erfolgreich aufgereinigt werden (Abb. nicht gezeigt).

Fraktionen mit gereinigten rekombinanten Proteinen wurden in PBS dialysiert und konnten dann für die Immunisierung von Ratten und Mäusen eingesetzt werden.

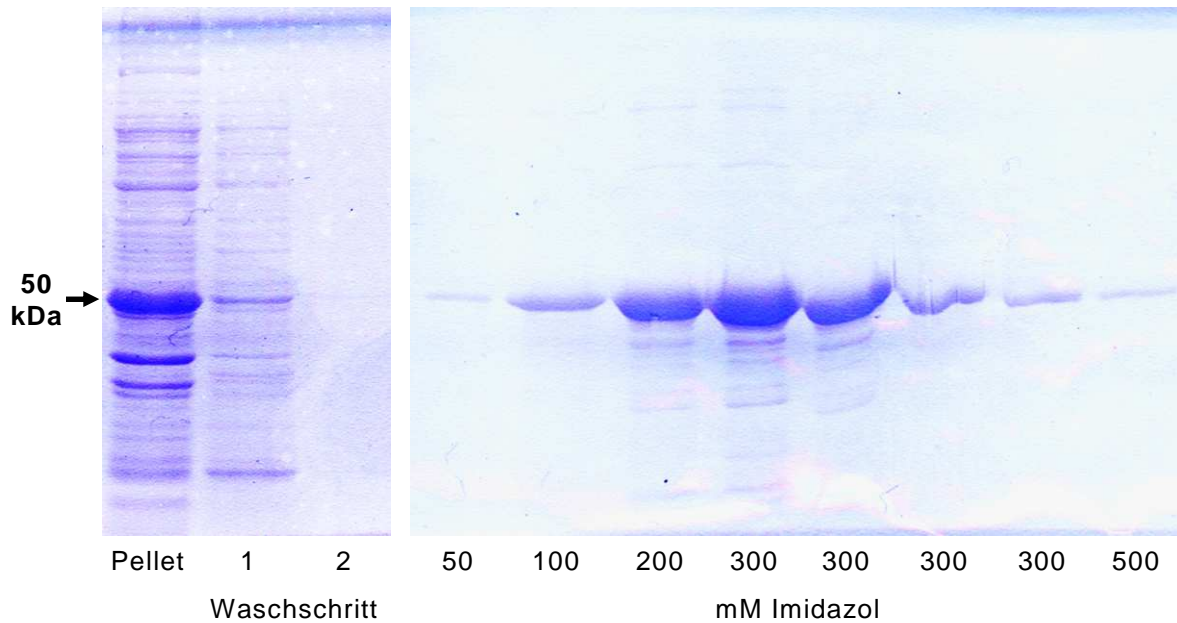


Abb. 25: Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung des rekombinanten c-Jun

Proben der Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung des rekombinanten c-Jun wurden im Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In Einzelnen sind der Überstand des Bakterienpellets, die zwei Waschschriffe, sowie die Elutionen mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen (mM) zu sehen. Der schwarze Pfeil markiert die Größe des rekombinanten c-Jun.

1.2.2 Herstellung und Aufreinigung von c-Jun- und Creb-Antikörpern

Die Herstellung von Seren und Zellüberständen mit poly- bzw. monoklonalen Antikörpern gegen c-Jun und Creb der Honigbiene wurde von Iris Fuchs (AG Müller) durchgeführt.

1.2.2.1 Polyklonale c-Jun- und Creb-Antikörper

Durch Immunisierung von Ratten mit rekombinatem c-Jun oder Creb-1 wurden polyklonale Antikörper gegen die entsprechenden Proteine aus *Apis mellifera* hergestellt. Die Blutseren mit gebildeten Antikörpern aus immunisierten Ratten wurden im Western-Blot auf Bienenhomogenat getestet. Dabei sollten im Idealfall nur Banden mit den Proteingrößen von c-Jun bzw. Creb detektiert werden. Da aber alle Antikörper mehrere Banden markierten (Abb. 26, Serum), sollten die Antikörper über ihre Immunoaffinitäten zu den rekombinanten Proteinen aufgereinigt werden. Hierfür wurde das Affi-Gel-15 (Bio-Rad) verwendet, bei dem es sich um eine Matrix aus N-hydroxysuccinimid-Ester handelt, an welche die rekombinanten Proteine c-Jun und Creb-1 jeweils immobilisiert wurden. An die rekombinanten Proteine konnten dann die spezifischen Antikörper binden. Unspezifische Antikörper wurden ausgewaschen. Anschließend wurden gebundene Antikörper mit stark sauren und stark basischen Puffern eluiert. Die Antikörper in den Eluatzen wurden zunächst im Western-Blot auf rekombinatem c-Jun bzw. Creb-1 getestet (Abb. nicht gezeigt). Fraktionen

die eine Bande aufwiesen wurden anschließend im Western-Blot auf Homogenat aus Bienenhirn getestet.

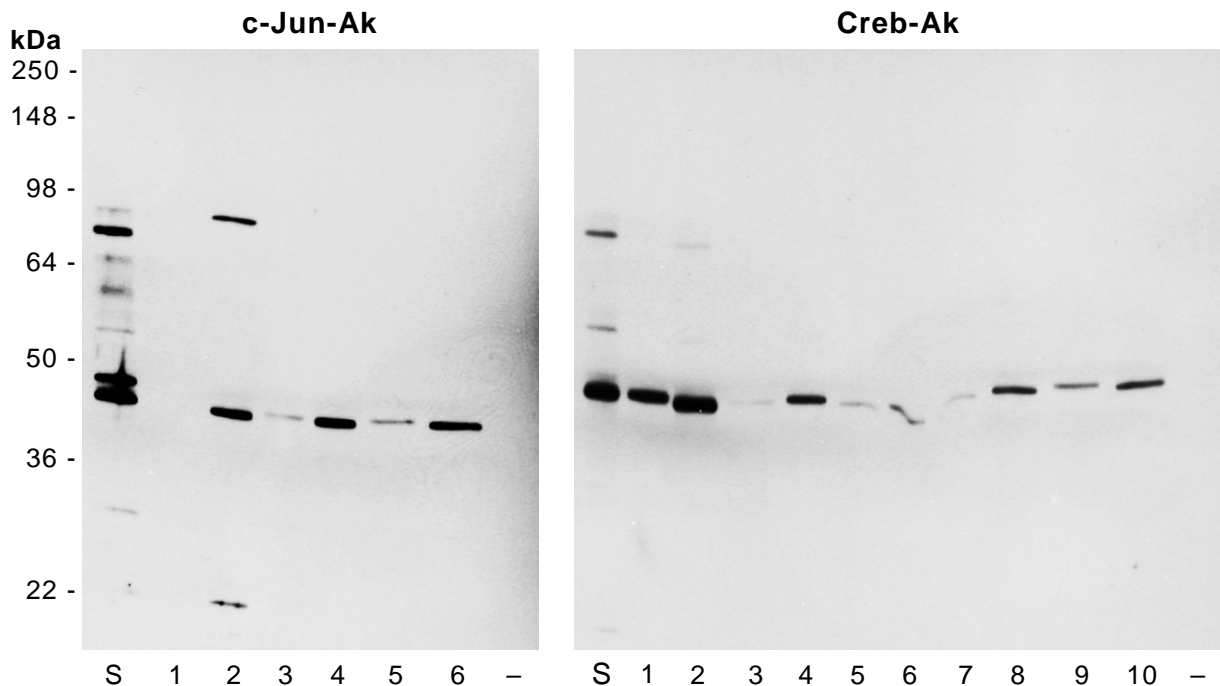


Abb. 26: Immunoaffinitätsaufreinigung von c-Jun- und Creb-Antikörpern

Polyklonale Antikörper (Ak) gegen c-Jun und Creb-1 wurden auf Homogenat aus Bienenhirn im Westernblot getestet. Die Antikörper wurden zuvor immunoaffinitätsaufgereinigt, mit mehrmaliger Elution (1-10). Das Serum (S) beinhaltet die gesamten Antikörper vor der Aufreinigung. – = ohne primären Antikörper. Die Antikörper wurden folgendermaßen verdünnt: **c-Jun**: S, 2, 3 = 1:1000; 1, 4, 5 = 1:200; 6 = 1:100; **Creb**: S = 1:1000; 1, 2, 3 = 1:2000; 4, 5, 10 = 1:400; 6 = 1:200; 8, 9 = 1:5

Die Seren mit c-Jun- und Creb-Antikörpern weisen im Western-Blot mehrere Banden auf (Abb. 26). Bei c-Jun sind bei den Elutionen 3 – 6 nur die Hauptbanden um 40 kDa zu erkennen. Daher sind diese Antikörper am besten für Versuche geeignet. Die Elution 1 zeigt keine Bande und die Elution 2 zeigt neben der Hauptbande zwei schwächere Nebenbanden. Daher sind diese Antikörper weniger geeignet.

Bei Creb sind in den Elutionen 1 und 3 – 10 nur die Hauptbanden um 45 kDa vorhanden. Bei der Elution 2 sind neben der Hauptbande zwei Nebenbanden zu erkennen, die aber im Verhältnis zur Hauptbande relativ schwach sind, so dass diese für Versuche zu vernachlässigen sind. Somit sind alle Antikörper der Creb-Elutionen (1 – 10) für Versuche verwendbar.

Die Hauptbanden markieren Proteine mit einem Molekulargewicht von 40 kDa für c-Jun und 45 kDa für Creb. Da die berechneten Molekulargewichte von 30 kDa für c-Jun und 26 kDa für Creb davon abweichen, sollten die Antikörper genauer auf ihre Spezifität überprüft werden. Hierzu wurde ein Protein-Kompetitions-Assay durchgeführt. Ein Antikörper wird dabei mit dem entsprechenden Antigen (rekombinantes c-

Jun oder Creb-1) inkubiert und anschließend im Western-Blot auf rekombinantem c-Jun-, bzw. Creb-Protein getestet. Dabei sollte die Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers wegen der Bindung an das rekombinante Protein maskiert sein, worauf der Antikörper im Western-Blot nicht mehr an das Epitop des Antigens binden sollte.

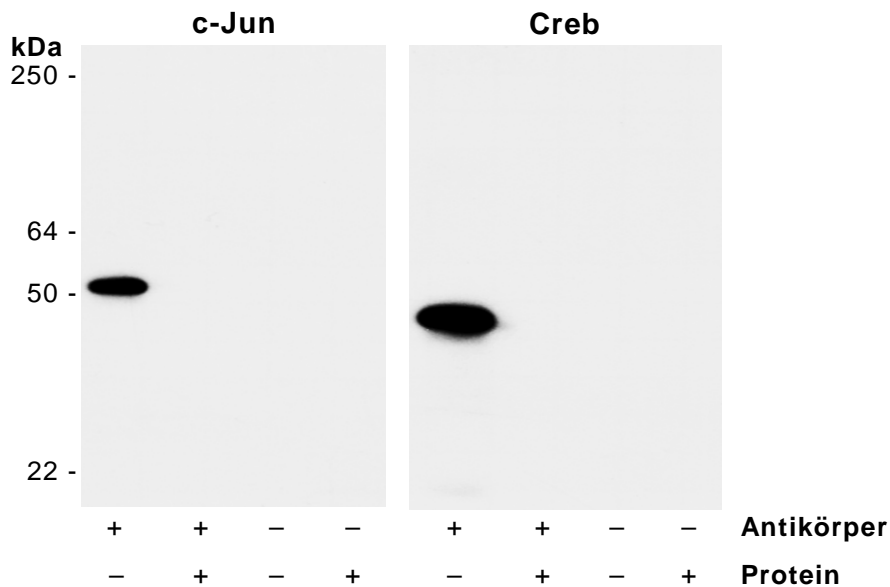


Abb. 27: Protein-Kompetitionsversuch mit c-Jun- und Creb-Antikörpern

Im Westernblot wurden polyklonale Antikörper gegen c-Jun und Creb-1 auf rekombinantem c-Jun-, bzw. auf Creb-1-Protein getestet. Antikörper (+), sowie Kontrollen ohne primären Antikörper (-), wurden zuvor mit rekombinantem c-Jun-, bzw. Creb-1-Protein (+) inkubiert oder ohne entsprechendes Antigen (-). Der Creb-Antikörper (Elution 1) wurde 1:5000 eingesetzt und der c-Jun-Antikörper (Elution 4) 1:100.

Sowohl der c-Jun-, als auch der Creb-Antikörper, zeigte im Western-Blot nur eine Bande, nämlich mit den primären Antikörpern, die vorher nicht mit rekombinantem Protein inkubiert wurden (Abb. 27). Kompetierte Antikörper detektierten keine Proteine im Blot. Hiermit wurde ihre Spezifität demonstriert. Zusätzlich wurden der c-Jun-Antikörper auf rekombinantem Creb-1 und der Creb-Antikörper auf rekombinantem c-Jun im Western-Blot getestet. Beide Antikörper konnten die anderen Antigene jeweils nicht detektieren (Abb. nicht gezeigt).

Die polyklonalen c-Jun-Antikörper sind nach Lagerung in 50 % Glycerin-Lösung bei -20°C unbrauchbar gewesen und wurden nicht mehr weiter verwendet.

1.2.2.2 Monoklonale Creb-Antikörper

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden Mäuse mit rekombinantem Creb-1 immunisiert. Nach angemessener Zeit wurden aus den B-Lymphozyten der Milzen Hybridoma-Zellen hergestellt und einzeln kultiviert. Die Zellen sezernierten monoklonale Antikörper, die dann in den Medienüberständen enthalten waren.

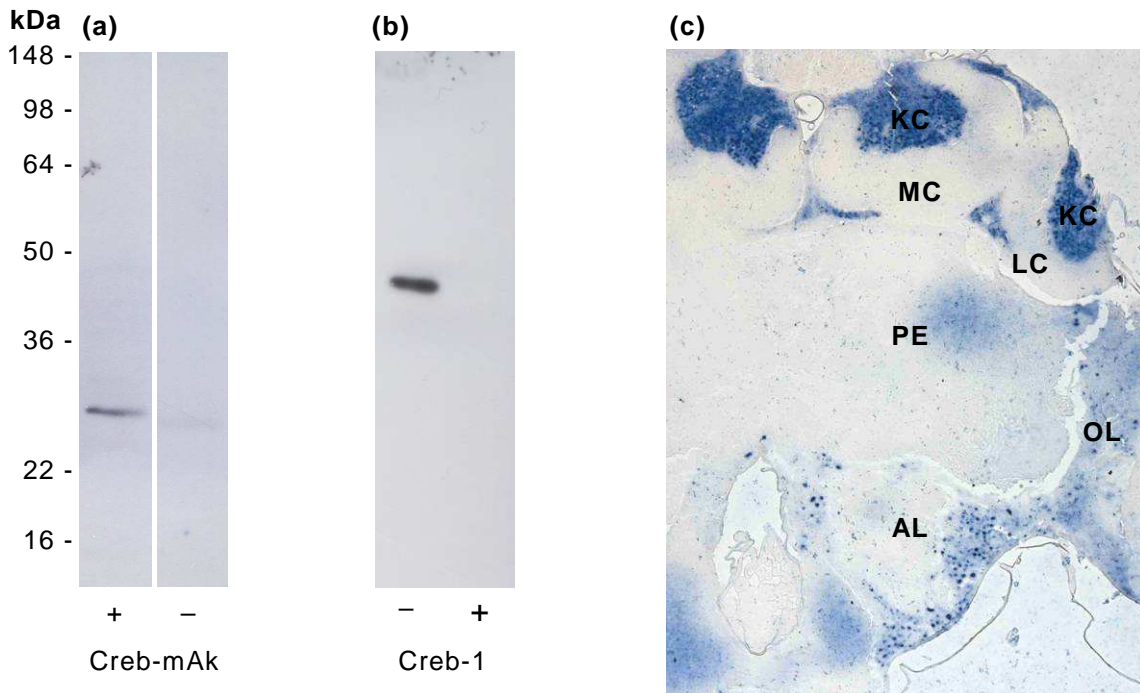


Abb. 28: Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers Creb-mAk

Der monoklonale Maus Antikörper Creb-mAk wurde auf seine Antigen-Spezifität getestet. **(a)** Creb-mAk (1:250 verdünnt) wurde im Westernblot auf Homogenat aus Bienenhirn getestet, das zuvor über SDS-PAGE aufgetrennt wurde. + = mit Creb-mAk; – = ohne Creb-mAk **(b)** Kompetierter (+) oder nicht kompetierter Creb-mAk (–) wurde im Westernblot auf rekombinatem Creb-1-Protein getestet, das zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurde. **(c)** Vom Gehirn der Biene wurde ein Frontalschnitt angefertigt, der mittels Creb-mAk immunohistologisch auf die Lokalisation von endogenem Creb untersucht wurde. MC = medianer Kelch des Pilzkörpers; LC = lateraler Kelch des Pilzkörpers; PE = Pedunkel des Pilzkörpers; AL = Antennallobus; OL = Optischer Lobus; KC = Kenyon-Zellen

Der monoklonale Maus-Antikörper Creb-mAk wurde im Western-Blot auf Homogenat aus Bienenhirn getestet (Abb. 28a), wo er eine Hauptbande um die 30 kDa detektierte (+). Diese entspricht ungefähr dem Molekulargewicht des nativen Creb-Proteins von 26 kDa. Um die Spezifität des Creb-mAk zu demonstrieren, wurde ein Kompetitions-Assay durchgeführt (siehe oben). Dabei wurde der Antikörper mit rekombinatem Creb-1- oder ohne Protein inkubiert. Im Western-Blot markierte der nicht kompetierte Creb-mAk (–) das rekombinante Creb-1 (Abb. 28b). Dagegen konnte der kompetierte Creb-mAk (+) das rekombinante Protein nicht detektieren. Auch im Western-Blot mit rekombinatem c-Jun zeigte der Creb-mAk keine Bande (Abb. nicht gezeigt). Zuletzt wurde der Creb-mAk noch von Angelika Gardezi (AG Müller) immunohistologisch auf Frontalschnitten von Bienenhirnen getestet. Die detektierten Creb-mAk-Antigene wurden dabei durch eine enzymatische Färbereaktion lokalisiert. Dafür wurden NBT und BCIP als Färbesubstanzen verwendet, welche zu bläulichen Färbungen der von den Antikörpern markierten Bereiche führten. Im Präparat sind primär die Kenyon-Zellen angefärbt (Abb. 28c). Auch im Bereich der An-

tennalloben und der optischen Loben sind gefärbte Zellen zu erkennen. In diesen Regionen häufen sich die Soma von Neuronen, in denen die Zellkerne liegen. Die nicht gefärbten Bereiche der Pilzkörper bestehen aus Neuropil ohne Zellkerne. Die hellblauen Färbungen sind Artefakte. Da Creb im Kern lokalisiert ist,^[206,207] also in den detektierten Regionen, bekräftigt die immunohistologische Untersuchung die Spezifität des Creb-mAk gegen das native Creb der Biene.

Gegen rekombinantes c-Jun konnte kein Antikörper hergestellt werden, da die Hybridomazellen abstarben.

Abschließend standen folgende Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren zur Verfügung:

- monoklonaler Maus anti Creb-Antikörper (**Creb-mAk**)
- polyklonaler Ratte anti Creb-Antikörper (**Creb**)
- polyklonaler Kaninchen anti c-Jun-Antikörper (**c-Jun**)
- polyklonaler Kaninchen anti ATF-2-Antikörper (**ATF2**)

2 Etablierung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) für *in vivo* Experimente mit der Biene

Wie bereits erwähnt, galt das Interesse dieser Arbeit der Genregulation durch Transkriptionsfaktoren (TFs). Mit der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) sollten von TFs gebundene DNA-Sequenzen untersucht werden. Mit dieser Methode werden 200 bis 1000 Basenpaare große DNA-Fragmente, an denen ein TF gebunden hat, durch Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen den TF angereichert (Abb. 29). Diese DNA-Sequenzen können anschließend quantitativ und qualitativ untersucht werden.

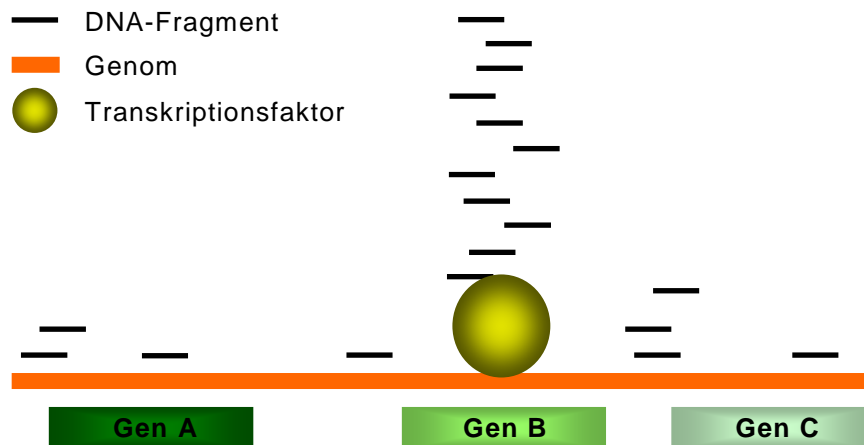
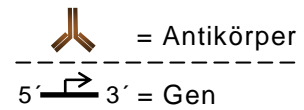


Abb. 29: DNA-Anreicherung durch ChIP

Mit einer ChIP werden kurze DNA-Fragmente angereichert, an die ein TF gebunden hat. Hierbei werden aus zerstückelter genomischer DNA mit spezifische Antikörpern gegen TFs, Antikörper-TF-DNA-Komplexe präzipitiert. Die DNA kann dann aufgereinigt und analysiert werden.

Da ChIP-Experimente zur Untersuchung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBSs) fast ausnahmslos mit Zellkulturen durchgeführt wurden,^[181] musste für die Biene eine *in vivo* ChIP-Methode erst etabliert werden. Der Großteil an ChIP-Experimenten galt bisher der Untersuchung von Histon-DNA-Bindungen. Da diese Bindungen in Nukleosomen sehr stabil sind, ist keine Fixierung notwendig. Die TF-DNA-Bindungen hingegen sind weniger stabil, weshalb TFs die an die DNA gebunden haben, im ersten Schritt der ChIP-Methode, mit Formaldehyd daran fixiert werden. Anschließend wird die DNA mit Ultraschall in kleine Fragmente zertrümmert (Sonifikation). Die entstandenen TF-DNA-Komplexe werden dann mit spezifischen Antikörpern präzipitiert (Immunopräzipitation). Zuletzt wird die Fixierung gelöst und die DNA-Fragmente werden aufgereinigt.

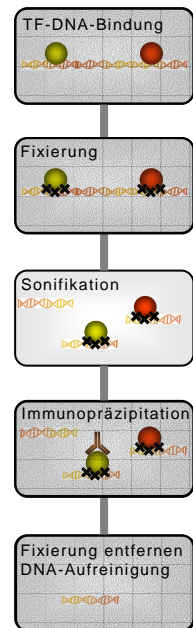
Im Folgenden werden der besseren Übersicht wegen die Arbeitsschritte der ChIP-Methode als Abbildung angezeigt, die im Methodenteil ausführlich beschrieben ist. Zusätzlich



werden auch die verwendeten Antikörper und das zu untersuchende Gen angegeben (siehe Abb. rechts).

2.1 Sonifikation der DNA

Das Ergebnis eines ChIP-Experiments hängt u. a. von der Fragmentgröße der DNA ab, die in der Immunopräzipitation eingesetzt wird. Sind die Fragmente zu groß, könnte es zu sterischen Schwächungen oder Hemmungen bei Bindungen zwischen Antikörpern und TF-DNA-Komplexen kommen. Dadurch könnte sich die Menge an angereicherten DNA-Fragmenten verringern. Wichtiger noch ist die DNA-Größe für PCR-Analysen. Hierbei ist zu bedenken, dass die TFs mittig als auch distal an die Fragmente gebunden sein können, die Primer aber immer die gleiche Sequenz umspannen. Sind die DNA-Fragmente zu kurz, kann eventuell nur ein Primer oder gar keiner gebunden werden und eine Amplifikation ist nicht möglich. Wird das Fragment hingegen größer, wird die Analyse unspezifischer, da auch Sequenzabschnitte amplifiziert werden können, die weiter weg von der eigentlichen



TFBS liegen. Deshalb sollten die DNA-Fragmente eine Größe von 200 bis 1000 Basenpaare haben, mit einem Maximum um die 500 Basenpaare. Dementsprechend wurden verschieden lange Sonifikationszeiten getestet, die aus Zyklen mit Beschallung und Pausen bestehen sollten. Die Unterbrechungen sind wichtig, da die Proben sich beim Beschallen aufheizen, wobei sich die Fixierungen lösen könnten.

Die Proben wurden hergestellt, indem die Gehirne von Bienen präpariert und in einprozentigem Formaldehyd fixiert wurden. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit Glycin gestoppt. Die Hirne wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer homogenisiert. Darauf folgten Sonifikationszyklen auf Eis, mit 30 Sekunden Ultraschall und 30 Sekunden Pause. Um die Fixierung zu lösen wurden die Gewebereste abzentrifugiert und die Überstände bei 50°C über Nacht bei 200 rpm geschüttelt. Schließlich wurde die DNA mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) aufgereinigt. Die DNA-Proben wurden dann elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

Wurden die Gehirne lediglich lysiert und homogenisiert (0 min), ist keine DNA im Gel zu sehen (Abb. 30). Erst durch die Sonifikation des Hirnhomogenats wurden die Zellen ausreichend aufgeschlossen, um im Gel sichtbare DNA-Mengen zu erhalten (5 und 15 min). Nach 15 Minuten Sonifikation wurde die DNA in Fragmente von 100 bis

500 Basenpaare zertrümmert, mit einem Maximum an DNA bei 250 Basenpaaren. Nach fünf Minuten Beschallung mit Ultraschall entstanden DNA-Fragmente von 200 bis 1500 Basenpaaren, mit einer maximalen DNA-Menge bei 500 Basenpaaren. Diese Fragmentgrößen sind gut geeignet für PCR-Analysen von ChIP-Proben. Somit sollte die Sonifikationszeit von fünf Minuten beibehalten werden.

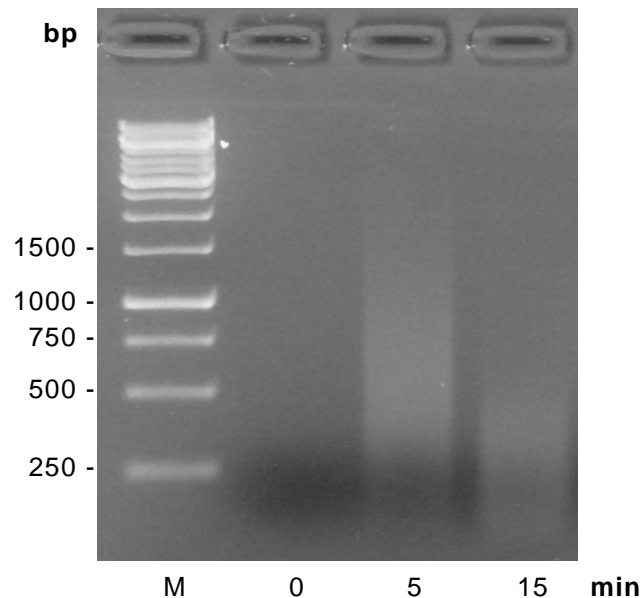


Abb. 30: Sonifikation von DNA

DNA aus Bienengehirnen wurde fixiert, sonifiziert und aufgereinigt. Pro Spur wurde DNA aus 3,4 Gehirnen aufgetragen und im 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Angegeben sind die gesamten Sonifikationszeiten (min). M = 1 kb DNA-Leiter

Außer den Sonifikationszeiten wurden auch verschiedene Mengenverhältnisse von Proben (Hirnhomogenat der Biene) zu Homogenisierungspuffer (RIPA) für die Sonifikation ausgetestet, da sich dieses ebenfalls auf die Fragmentgröße der DNA auswirken kann. Als optimale Mengen erwiesen sich dabei fünf Bienenhirne in 500 Mikrolitern RIPA-Puffer (Abb. nicht gezeigt).

2.2 Ermittlung von TF-DNA-Bindungsstellen (TFBSs)

Die weiteren Einstellungen von Parametern der ChIP-Methode wurden durch Analyse der ChIP-Proben mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dafür mussten die TFBSs bekannt sein, um entsprechende Primer zu designen. Die zu testenden DNA-Elemente sollten möglichst Bindungsstellen für die TFs Creb, Atf-2 und c-Jun enthalten, da gegen diese Antikörper vorhanden waren. Solche TFBSs waren für die Biene nicht bekannt. Daher wurde zunächst nach Genen gesucht, die das Cyclic-AMP-Response-Element (CRE) besitzen, einem DNA-Motiv, an das alle drei TFs binden können.^[133] In dem Review von Mayr und Montminy (2001) sind Ge-

ne des Menschen mit CRE-Motiven in den Promotorregionen aufgelistet.^[110] Hieraus wurde *Creb* ausgewählt, da die Expression des Gens bei Stress aktiviert wird.^[198,208,209] Als nächstes mussten die CRE-Motive im *Creb*-Promotor der Biene identifiziert werden. Da Motive und Konsensus-Sequenzen von CRE in der Biene ebenfalls unbekannt sind, wurde die Sequenz des Gens (2000 bp 5' vor dem Startcodon bis zum Stopcodon) *in silico* mit den Programmen Cister und TESS auf *cis*-Elemente durchsucht. Beide Programme benutzen eine gewichtete Matrix. Hierbei handelt es sich um eine Konsensussequenz aus bekannten TF-Bindungsstellen, bei der jede Nukleotidposition nach der Häufigkeit ihres Vorkommens in den bekannten TF-Bindungssequenzen gewichtet wird. Ein Algorithmus sucht mit Hilfe der Matrix nach möglichen *cis*-Elementen in der Gensequenz und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der es sich um solch ein DNA-Element handelt. Neben dem CRE-Motiv (TRANSFAC 5.0 accession # M00178) wurde auch nach dem AP-1-Motiv (activating protein-1) (TRANSFAC 5.0 accession # M00174) gesucht, welches eine Bindungssequenz von c-Jun ist.^[210]

Nach der Sequenzanalyse auf *cis*-Elemente, wurde für die PCR-Analyse eine Region von 1200 bis 1000 Basenpaare vor dem Startcodon ausgewählt, die ein Cluster von theoretischen CREs beinhaltet (Creb-Positiv-Primer, Abb. 31). Als Negativkontrolle wurde eine Region bei 4500 Basenpaaren nach dem Startcodon ausgewählt, die in einem Exon liegt und keine *in silico cis*-Elemente beinhaltet (Creb-Negativ-Primer). Die Primerpaare, die für diese Regionen designt wurden, umfassen ca. 250 Basenpaare. Mit Bienen-DNA wurden die Primer mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese getestet. Beide Primerpaare zeigten ausschließlich ihre spezifischen Bandengrößen und konnten für Versuche verwendet werden (Abb. nicht gezeigt).

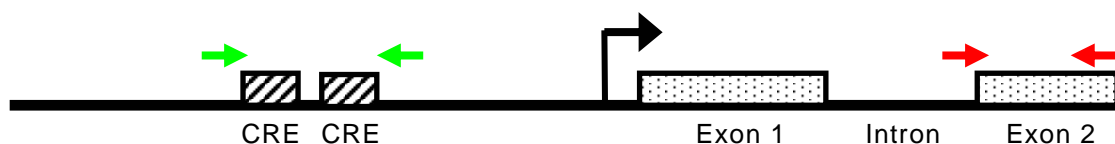


Abb. 31: CRE-Motive im *Creb*-Gen

Einzelne DNA-Elemente des *Creb*-Gens sind schematisch dargestellt. Die Primerpaare umspannen DNA-Regionen mit (Creb-Positiv-Primer, grüne Pfeile) und ohne CRE-Motiven (Creb-Negativ-Primer, rote Pfeile).

2.3 Fixierung der TF-DNA-Komplexe

Damit sich die relativ schwachen Bindungen zwischen TFs und DNA bei der Durchführung der ChIP-Methode nicht lösen, müssen die TF-DNA-Komplexe fixiert werden. Hierbei ist die Stärke der Fixierung für das Ergebnis eines ChIP-Experiments von großer Wichtigkeit. Ist die Fixierung zu schwach, könnte der TF von der DNA dissoziieren und mit der Immunopräzipitation würde keine DNA angereichert werden. Ist die Fixierung hingegen zu stark, könnte das Epitop des Transkriptionsfaktors für einen Antikörper maskiert sein und dieser könnte nicht binden. Auch hierbei würde keine DNA angereichert werden. Zur Fixierung wurde einprozentiges Formaldehyd verwendet. Variiert wurde die Dauer der Fixierung, die mit Glycin abgestoppt wird. Als Anhaltspunkt dienten ChIP-Protokolle für Zellen, mit Fixierungszeiten um die zehn Minuten.^[211-213] Da das Formaldehyd beim Gehirn erst in das Gewebe eindringen muss, wurden längere Fixierungszeiten von 15, 30 und 60 Minuten gewählt. Für die ChIP wurde ein Mix aus den Antikörpern ATF2, c-Jun und Creb (je 0,3 µg) verwendet. Analysiert wurden die ChIP-Proben mittels PCR-Amplifikation und Agarose-Gelelektrophorese. Die PCR-Reaktionen wurden mit Creb-Positiv-Primern durchgeführt.

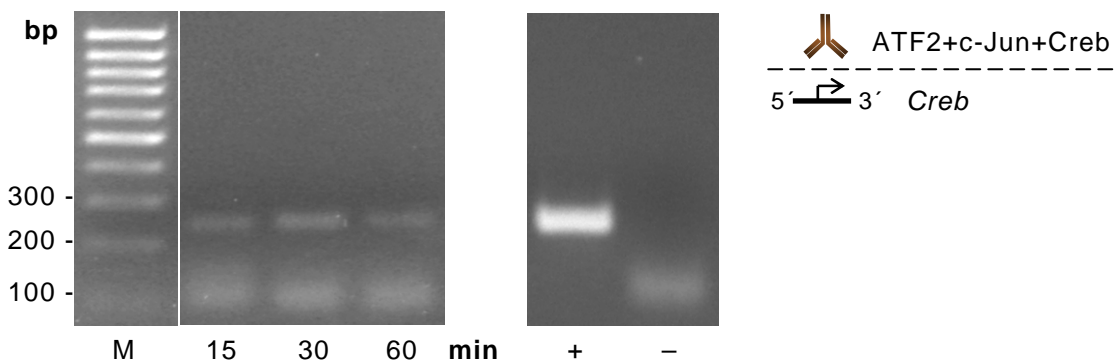
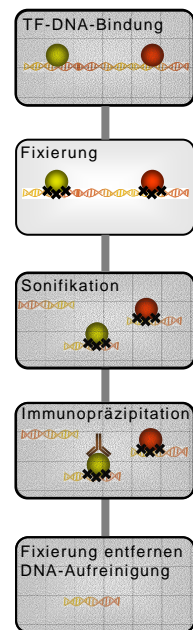


Abb. 32: Fixierung der TF-DNA-Komplexe

Aus Bienegehirn wurde mittels ChIP mit verschiedenen Fixierungszeiten (15, 30, 60 min) DNA angereichert. Diese wurde mit Creb-Positiv-Primern amplifiziert und die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. + = Kontroll-DNA; – = ohne DNA; M = DNA ladder Low Range

Bei allen Fixierungszeiten sind PCR-Produkte von ca. 250 Basenpaaren vorhanden (Abb. 32). Die unteren unscharfen Banden zeigen Primerdimere, die entstehen können, wenn relativ kleine DNA-Mengen in der PCR eingesetzt werden (s. a. Kontroll-DNA). Die Probe mit 30minütiger Fixierungszeit zeigt die stärkste Intensität. Hier

wurden anscheinend die meisten DNA-Fragmente mit der ChIP angereichert. Im Vergleich zu DNA-Mengen von 30 bis 200 Mikrogramm für herkömmlicher ChIP-Methoden mit Zellkulturen,^[211,213] stand hier wegen der aufwändigen Präparation der Bienegehirne nur ein Mikrogramm DNA zur Verfügung. Um ChIP-Ergebnisse noch analysieren zu können, musste eine höchstmögliche Anreicherung der DNA erreicht werden. Deshalb wurde eine Fixierungszeit von 30 Minuten beibehalten.

2.4 Elution der TF-DNA-Komplexe

Um mit der ChIP möglichst große DNA-Mengen zu erhalten, sollte auch die Elution der Immunopräzipitation (IP) optimiert werden. Hierzu wurden zwei unterschiedlichen IP-Elutionspuffer getestet, ein saurer Glycin-Elutionspuffer (100 mM Glycin, pH 2,5) und ein SDS-Elutionspuffer (1 % SDS, 100 mM NaHCO₃). Als Antikörper wurden 0,25 Mikrogramm anti-H3 eingesetzt und für die Amplifikation der ChIP-Proben die Creb-Positiv-Primer. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im 1,5 % Agarosegel aufgetrennt (Abb. 33).

Bei beiden ChIP-Proben (Gly und SDS) wurde die gewünschte DNA-Region von 220 Basenpaaren amplifiziert. Die Probe, die mit SDS-Elutionspuffer (SDS) eluiert wurde, lieferte deutlich mehr PCR-Produkt als die Probe mit der Elution durch Glycin-Elutionspuffer (Gly). Somit soll der SDS-Puffer als IP-Elutionspuffer in der ChIP-Methode verwendet werden.

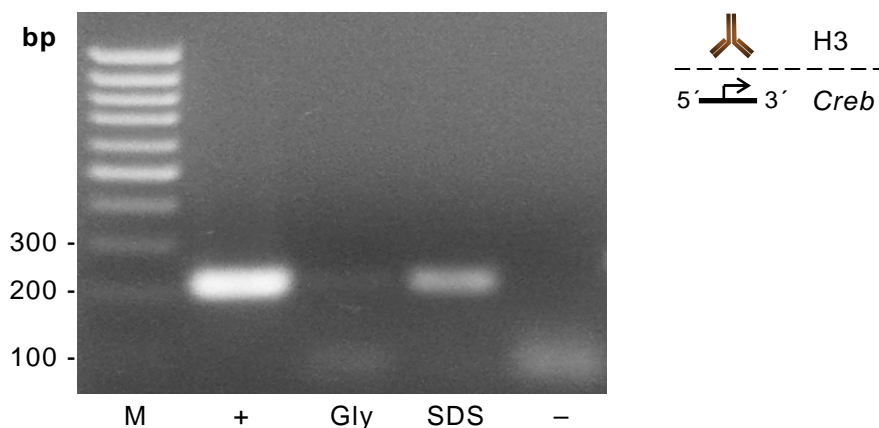
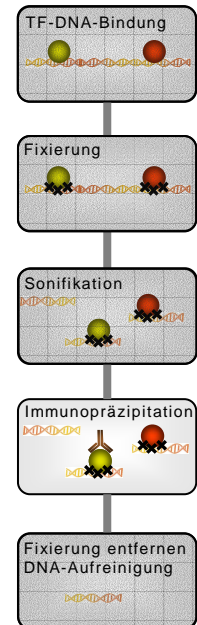


Abb. 33: Elution der Immunopräzipitation

Aus Bienegehirn wurde mittels ChIP unter Verwendung des H3-Antikörpers DNA angereichert. Die Elution der Immunopräzipitation (IP) wurde mit saurem Glycin-Puffer (Gly) oder SDS-Puffer (SDS) durchgeführt. Die Proben wurden mit ChIP-Creb-Positiv-Primern in der PCR amplifiziert und im 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. + = nicht präzipitierte DNA aus der IP; - = ohne DNA; M = DNA ladder Low Range

2.5 Überprüfung der ChIP-Methode

Abschließend wurde überprüft, ob die ChIP-Methode mit den optimierten Parametern funktioniert. Da die Bindungen der ChIP-Antikörper an TFs eines der kritischsten Momente der ChIP ist, sollte ein Mix aus den Antikörpern c-Jun, ATF2 und Creb eingesetzt werden. Durch den Einsatz mehrere Antikörper sollte die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Immunopräzipitation (IP) erhöht werden. Weil nicht sicher war, ob die Creb-Positiv-Primer eine Region eingrenzen, an die *in vivo* ein TF bindet, wurde als Positivkontrolle der Histon-H3(tri-methyl-K4)-Antikörper (H3-4.3) eingesetzt. Denn die Histone sollten in etwa gleichmäßig auf der DNA verteilt sein und somit auch in der Region der Creb-Positiv-Primer. Da die DNA-Fragmente in der IP auch unspezifisch binden und dann amplifiziert werden könnten, wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt. Zum einen wurde eine ChIP mit PKA-Antikörper fertig gestellt. Dieser sollte an keine TFs binden und somit keine DNA anreichern. Zum anderen wurden auch PCRs mit den Creb-Negativ-Primern durchgeführt. Diese grenzen eine DNA-Region ein, in der keine *in silico cis*-Elemente vorkommen (siehe oben). Die ChIP-Proben wurden in der PCR amplifiziert und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

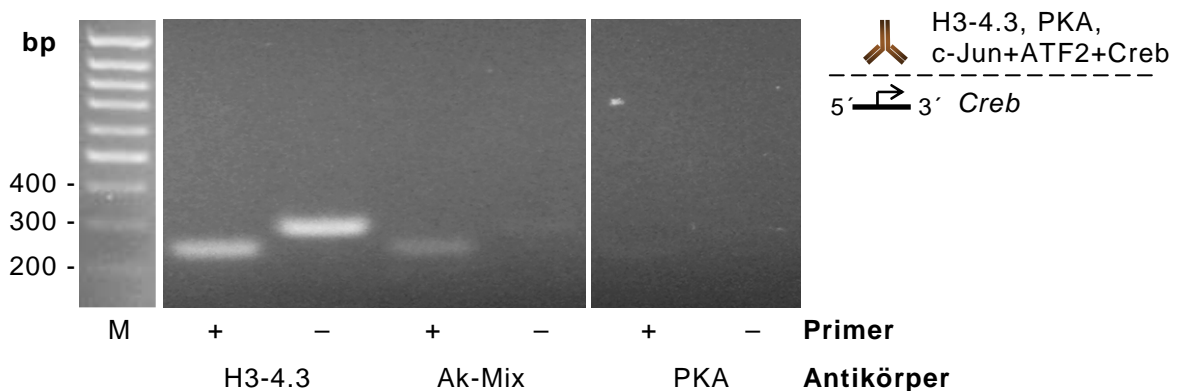


Abb. 34: Test des ChIP-Protokolls

Aus Bienegehirn wurde mittels ChIP unter Verwendung der Antikörper H3-4.3, PKA oder einem Mix aus c-Jun, ATF2 und Creb (Ak-Mix) DNA angereichert. Die Proben wurden mit Creb-Positiv-Primern (+) oder Creb-Negativ-Primern (-) mittels PCR amplifiziert und im 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. M = DNA ladder Low Range

Da die Histone im Chromatin gleichmäßig verteilt sind, wurde erwartet, dass in den DNA-Regionen mit und ohne *cis*-Elemente gleich viele Histon-DNA-Komplexe mit dem H3-4.3-Antikörper mittels ChIP angereichert werden. Im Agarosegel sind dementsprechend gleich starke Banden zu sehen (Abb. 34). Nach der ChIP mit dem Antikörper-Mix (Ak-Mix) wurde deutlich mehr DNA mit Creb-Positiv-Primern (+) amplifiziert, als mit den Creb-Negativ-Primern (-). Es scheint, dass die TFs tatsächlich unterschiedlich häufig an die beiden DNA-Regionen banden und daher die DNA-

Fragmente der Positiv-Region mehr angereichert und dann stärker amplifiziert wurden. Die Negativkontrolle mit Antikörpern gegen die Protein-Kinase-A (PKA), welche keine DNA Bindungsdomäne aufweist,^[214] zeigt nur in der Region mit *cis*-Elementen (+) eine sehr schwache Bande. Diese könnte auf unspezifisch gebundene DNA-Fragmente beruhen oder die PKA bindet indirekt an die DNA, eventuell über die Bindung an Creb.^[112,214,215]

Somit konnte gezeigt werden, dass die ChIP-Methode funktioniert. Da bei der PKA unklar ist, ob sie an die DNA binden kann, wurde für nachfolgende Versuche als Negativkontrolle ein unspezifischer IgG-Antikörper verwendet, der an kein Protein binden soll und bereits in anderen ChIP-Experimenten zur Anwendung kam.^[216]

Jetzt mussten die Antikörper aus dem Antikörper-Mix noch einzeln in der ChIP getestet werden, um zu sehen, welche dieser Antikörper an die TF-DNA-Komplexe binden. Bei der Immunopräzipitation ist das Verhältnis der Menge von Antikörpern zu DNA wichtig, da dieses die Bindungseigenschaften beeinflussen kann. Sind wenige Antikörper vorhanden, werden geringere Mengen der TF-DNA-Komplexe gebunden. Sind die Antikörper hingegen im Überschuss vorhanden, können mehr Antikörper ohne gebundenen TF-DNA-Komplex an die Protein-G gekoppelten Magnetkügelchen binden und machen diese somit unzugänglich für Antikörper-TF-DNA-Komplexe (siehe auch Methodenteil ChIP). Letztlich resultiert daraus eine geringere DNA-Ausbeute. Da jede DNA-Region unterschiedlich häufig von TFs gebunden wird, ist das Verhältnis von Antikörper zu DNA spezifisch für jede Region. Um möglichst effiziente ChIP-Experimente durchzuführen, sollte die Antikörperkonzentration für jede zu untersuchende DNA-Region und jeden verwendeten Antikörper ermittelt werden. Da dies sehr aufwändig ist, wurden nur für sechs verschiedenen Regionen die Antikörper c-Jun, ATF2 und Creb jeweils zu 4, 40 und 400 Nanogramm pro 100 Mikroliter Homogenat im ChIP eingesetzt. Die Proben wurden mit PCR amplifiziert und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Das beste Signal wurde für alle drei Antikörper jeweils mit 40 ng Antikörpern erreicht (Abb. nicht gezeigt). Dabei wurde auch der IgG Antikörper als Negativkontrolle für unspezifisch gebundene DNA eingesetzt.

2.6 Normalisierung der ChIP-Proben

Um ChIP-Proben quantitativ zu vergleichen, muss die Menge der angereicherten DNA in der exponentiellen Phase einer PCR-Reaktion gemessen werden. Bei einer Standard-PCR müsste diese Phase für jeden Parameter, der die Anzahl der Amplikons eines DNA-Fragments beeinflusst, ausgetestet werden. Die Amplifikation hängt u. a. von den Primer-Sequenzen und der eingesetzten DNA-Menge ab, die wiederum durch ChIP-Antikörper und Versuchsanordnung beeinflusst wird. Da diese Art der Quantifikation sehr aufwändig und weniger genau ist, sollten die angereicherten

DNA-Mengen der ChIP-Proben per quantitativer Real-Time-PCR (Real-Time-qPCR) analysiert werden. Die Real-Time-qPCR hat den Vorteil, dass eine Probe nach jedem PCR-Zyklus quantifiziert wird und die Zyklen der exponentiellen Phase somit nicht ausgetestet werden müssen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Proben verschiedener Experimente durch die Verwendung von standardisierten DNA-Mengen (Standards) miteinander verglichen werden können.

Beim Vergleich von ChIP-Proben muss berücksichtigt werden, dass die DNA-Mengen, die in Immunopräzipitationen eingesetzt werden (Input), Schwankungen unterliegen können. Solche Unterschiede in den DNA-Mengen können bei der Präparation der Gehirne oder deren Aufbereitung entstehen. Da die Input-Menge Einfluss auf die Ausbeute der Immunopräzipitation haben könnte, sollten die Mengen der angereicherten DNA (ChIP-Proben) auf ihre Abhängigkeit von den Input-Mengen untersucht werden. Dazu wurde mit Bienengehirnen eine ChIP durchgeführt. Die Proben wurden mit ATF2-Antikörpern präzipitiert und Input-, sowie ChIP-Proben wurden mit ChIP-c-Jun-Primern mittels Real-Time-qPCR quantifiziert. Von den DNA-Mengen der Input- und ChIP-Proben wurde eine mögliche Korrelation berechnet.

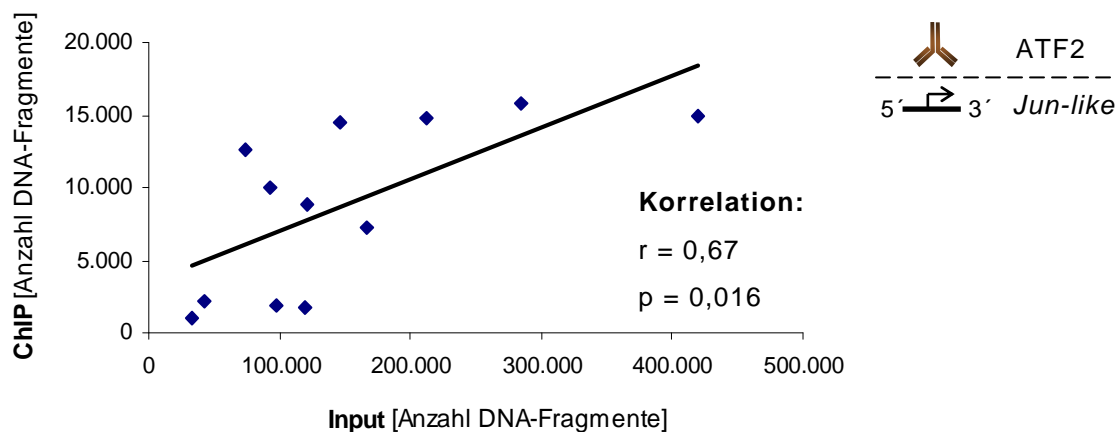


Abb. 35: Korrelation der DNA-Mengen von Input- zu ChIP-Proben

Aus denselben Bienengehirnen wurden unter Verwendung von ATF2-Antikörpern Input- und ChIP-Proben hergestellt ($n = 12$). Die Anzahl der DNA-Fragmente wurde mit c-Jun-Primern in der Real-Time-qPCR quantifiziert. Zu den Einzelwerten im Diagramm wurde eine Trendlinie hinzugefügt. r = Maßkorrelationskoeffizient; p = Wahrscheinlichkeit, dass keine Korrelation vorliegt

In Abb. 35 ist das Verhältnis der DNA-Mengen von Input- zu ChIP-Proben dargestellt. Die einzelnen Werte sind breiter um die Trendlinie herum gestreut, was sich in dem Maßkorrelationskoeffizienten r (Pearson-Korrelation) von 0,67 ausdrückt. Der Koeffizient kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen, wobei die lineare Korrelation umso besser ist, desto größer der Betrag wird. Die Güte einer Pearson-Korrelation ist Abhängig von der Untersuchung. Wird z. B. bei Milcherträgen die Abhängigkeit

von der Anzahl der Kühe untersucht, sollte die Pearson-Korrelation nahe dem Betrag 1 liegen. Bei der Durchführung der ChIP-Methode hingegen gibt es viele Einzelschritte, die sich auf die Probenmenge und somit auf die Pearson-Korrelation auswirken können. Um nun eine Abhängigkeit der DNA-Menge von ChIP- zu Input-Probe zu beweisen, muss der Maßkorrelationskoeffizient (r) auf die Wahrscheinlichkeit einer Korrelation überprüft werden. Für die Probenwerte ($n = 12$) ergibt sich eine schwach signifikante lineare Korrelation mit $p = 0,016$. Somit soll für ChIP-Experimente die DNA-Mengen der Inputs zur Normalisierung der ChIP-Proben verwendet werden.

3 Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Genregulation

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Genregulation nach Stress zu untersuchen. Ultraviolette Strahlung (UV) ist ein exogener Stress-Stimulus, der Änderungen in der Genexpression bewirken kann.^[217-220] Abhängig von der Wellenlänge, können durch UV-Strahlung DNA-Schäden entstehen, ROS (reactiv oxygen species) gebildet werden und/oder eine Signal-Transduktion aktiviert werden, welche die Stress- und Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen-Kaskaden (SAPK/ MAPK) involviert. In der Biene bewirkt UV-Strahlung die Aktivierung der JNK (Jun-N-terminale-Kinase), sowie Änderungen im Lernverhalten und Gedächtnisbildung.^[2] Da die Versuchsbedingungen für UVA-Strahlung, der länger welligen Strahlung (320 – 380 nm), die den Hauptbestandteil des UV-Lichts auf der Erde ausmacht, bei der Biene bereits erprobt worden war, sollten die ChIP-Experimente unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt werden.

3.1 Bindung von Transkriptionsfaktoren nach UV-Strahlung

Nachdem Bienen einer UV-Strahlung ausgesetzt wurden, sollten DNA-Bereiche bestimmter Gene auf Bindungen von TFs untersucht werden. Hierfür wurden die Kandidaten *JUN* und *EGR1* ausgewählt, deren mRNA-Expression nach UVA-Behandlung stark zunimmt.^[218,221-224] Als weiteres Gen sollte *NOS* untersucht werden, von dem es bei der Biene nur eine Variante gibt (BLAST-Ergebnis nicht gezeigt). Bei Säugern ist die neuronale nNOS ein Regulator der Stressantwort.^[225-227] Die entsprechenden Bienenhomologen *Jun-like*, *Egr1* und *Nos* (Sequenzvergleich nicht gezeigt) wurden mit dem Programm Cister auf mögliche *cis*-Elemente hin analysiert. Für die geeigneten DNA-Regionen wurden ChIP-Primer entworfen und durch PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf Funktionalität und Spezifität überprüft (Abb. nicht gezeigt).

Damit die Bienen vor Versuchsbeginn möglichst wenig Stress hatten, wurden sie bereits am Tag zuvor gefangen, in Röhrchen eingespannt und bis zur Sättigung gefüttert. Über Nacht standen die Bienen in einer abgedunkelten, feuchten Box. Am Versuchstag wurden die Bienen zum Akklimatisieren eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn aus ihrer Box genommen. Die Bienen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, die dann in lichtundurchlässigen Kisten 30 Minuten lang UV-Strahlung (365 nm) oder Weißlicht ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Bienen aus den Kisten genommen und nach einer Stunde wurden ihnen die Gehirne heraus präpariert. Für jede Probe wurden fünf Gehirne vereint und nach dem ChIP-Protokoll behandelt. Die Proben wurden mittels Real-Time-qPCR analysiert.

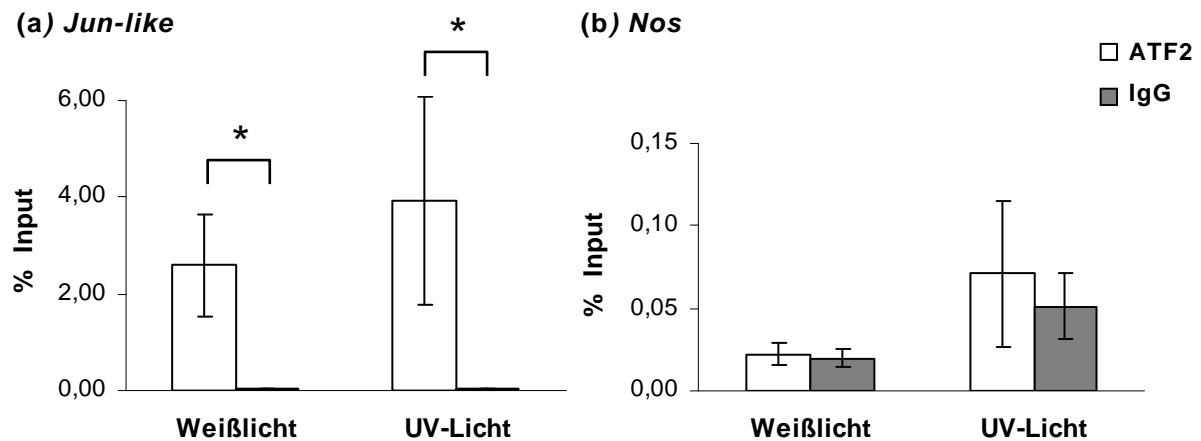


Abb. 36: Bindung von Atf-2 an *Jun-like* und *NOS* nach UV-Strahlung

Bienen wurden 30 min lang UV-Strahlung ($n = 4$) oder Weißlicht ($n = 4$) ausgesetzt. 60 min danach wurden die Gehirne mittels ChIP und Real-Time-qPCR auf Bindungen von Atf-2 an die Gene *Jun-like* (a) und *NOS* (b) untersucht. Für den ChIP wurden ATF2-Antikörper eingesetzt und als Kontrolle IgG-Antikörper. Die Real-Time-qPCR wurde mit den Primern ChIP-c-Jun und ChIP-Nos durchgeführt. Die DNA-Mengen der ChIP-Proben sind in Prozent der Input-Proben dargestellt.

Im Vergleich der DNA-Mengen, die durch die Antikörper ATF2 oder IgG angereichert wurden, sind am Gen *Jun-like*, sowohl nach Weißlicht ($p = 0,017$), als auch nach UV-Licht ($p = 0,036$), signifikante Unterschiede zu erkennen (Abb. 36a). Beim Gen *Nos* sind keine Unterschiede bei den DNA-Mengen vorhanden (Abb. 36b). Das bedeutet, dass der TF Atf-2 an *Jun-like*, nicht aber an *Nos* gebunden hat. Bei der Intensität der TF-DNA-Bindung wurde bei *Jun-like* kein Unterschied zwischen Weiß- und UV-Licht festgestellt.

Weitere Untersuchungen von TF-DNA-Bindungen wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen für die TFs Atf-2, c-Jun und Creb und die Gene *Jun-like*, *Nos* und *Egr1* durchgeführt. Bei verschiedenen Kombinationen von TFs und Genen konnten keine weiteren Interaktionen nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Bindungen von Transkriptionsfaktoren an bestimmte Genregionen

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse verschiedener ChIP-Experimente mit Weißlicht (W, $n = 4$) und UV-Licht (UV, $n = 4$). Es sind die verwendeten Antikörper und die getesteten Gene aufgeführt. + = Unterschied zur IgG-Kontrolle, - = kein Unterschied, x = nicht getestet

Antikörper \ Gen	<i>Jun-like</i>	<i>Nos</i>	<i>Egr1</i>
	W / UV	W / UV	W / UV
ATF2	+ / +	- / -	- / -
c-Jun	x	- / -	- / -
Creb	- / -	- / -	x

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, konnte DNA nur mit dem ATF2-Antikörper in der Promotorregion von *c-Jun* angereichert werden. Entweder haben die anderen Antikörper nicht funktioniert oder die TFs binden nach Weiß- und UV-Licht nicht. Möglich ist aber auch, dass die *in silico* (am Computer) gefundenen *cis*-Elemente, keine *in vivo* TFBS sind. Deshalb sollten *cis*-Elemente im Bienengenom experimentell *in vivo* identifiziert werden.

3.2 ChIP-Sequenzierung – Untersuchung von Atf-2-DNA-Bindungen im gesamten Bienengenom nach UV-Strahlung

Im gesamten Genom der Biene sollten durch ChIP-Sequenzierung (ChIP-seq) TFBSs des TF Atf-2 identifiziert werden. Hierbei werden wie beim herkömmlichen ChIP-Experiment bestimmte DNA-Fragmente über spezifische Antikörper angereichert. Mit einem Hochdurchsatz-Sequenzierer werden die DNA-Fragmente dann sequenziert (Next-Generation-Sequencing) und die DNA-Sequenzen, Reads genannt, werden mit der genomischen DNA abgeglichen. An Bereichen des Genoms, an denen der zu untersuchende TF gebunden hat, sollte aufgrund der lokalen DNA-Anreicherung die Anzahl der Reads höher sein, als an DNA-Bereichen, an denen kein TF gebunden hat.

Wie gehabt wurden Bienen 30 Minuten lang mit UV- oder Weißlicht bestrahlt und 60 Minuten später die Gehirne präpariert (Abschnitt 3.1). Die DNA wurde mit der ChIP-Methode unter Verwendung der ATF2-Antikörper angereichert. Da in der Aufbereitung der DNA-Proben für die Sequenzierung relativ große DNA-Mengen (1 µg laut Hersteller) benötigt werden, wurden im Versuch jeweils 50 Bienenhirne pro Gruppe vereint. Dies hatte zudem den Vorteil, dass die Proben durch die Vielzahl der Tiere homogener waren. Dennoch wurden mit der ChIP lediglich DNA-Ausbeuten von ca. ein bis zwei Nanogramm erreicht. Deshalb wurde die ChIP-DNA zusätzlich mit dem „Genomeplex complete WGA Kit“ (Sigma) amplifiziert. Diese Whole-Genome-Amplification (WGA) vervielfacht das gesamte Genom, bzw. die Proben-DNA sehr gleichmäßig, so dass dieser Schritt das Ergebnis der Sequenzierung nicht verzerren dürfte.^[185] Nach der WGA standen von der UV-Licht-Probe 740 Nanogramm DNA und von der Weißlicht-Probe 614 Nanogramm DNA für die Probenaufbereitung der Sequenzierung zur Verfügung.

3.2.1 Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die Aufbereitung und Hochdurchsatz-Sequenzierung der WGA-Proben wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Walter (Genetik/ Epigenetik, Universität des Saarlandes) von Dr. Sascha Tierling und Jasmin Gries durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde das „Genome Sequencer FLX System“ (Roche) verwendet, auch als 454-Sequencing bekannt.

Für die UV- und Weißlicht-Proben sollten insgesamt 100.000 DNA-Fragmente sequenziert werden, woraus sich in etwa 50.000 Reads pro Probe ergeben sollten. Von der UV-Licht-Probe waren 39.795 Reads auswertbar und von der Weißlicht-Probe 9.354 Reads. Die Gesamtzahl der auswertbaren Reads war wesentlich niedriger, verglichen mit anderen Proben desselben Sequenzierungslaufs (Abb. 37).

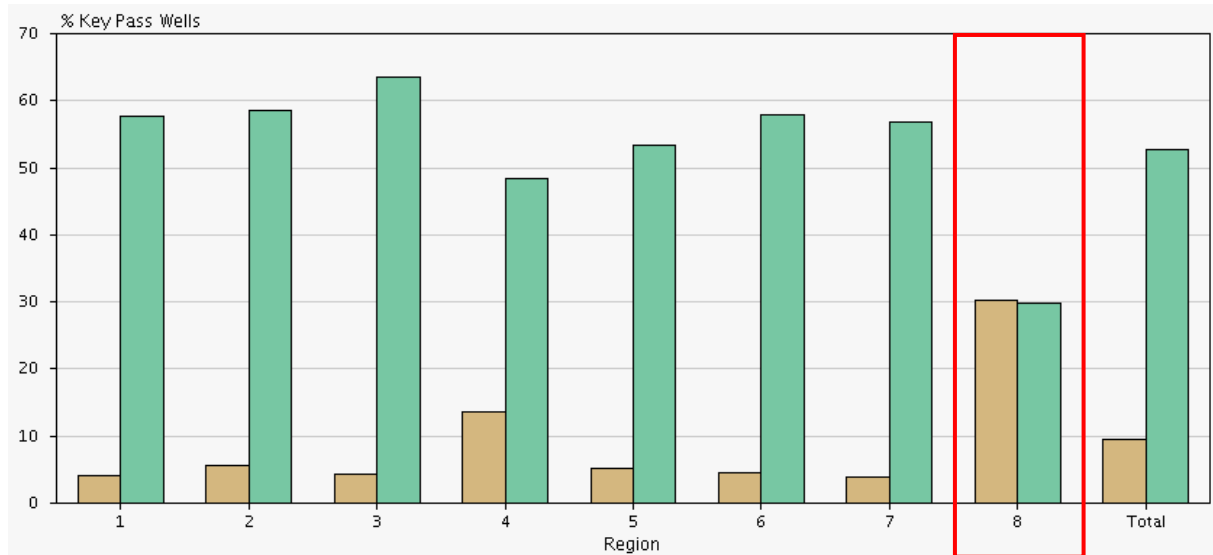


Abb. 37: Verwendbare Reads der Hochdurchsatz-Sequenzierung

Das Diagramm zeigt, wie viel Prozent der Reads einer Spur auswertbar sind. Für den Sequenzierungslauf wurde eine Picotiterplatte mit einer Million Löchern in acht Spuren mit unterschiedlichen Proben aufgeteilt (1 – 8). Total bildet den Mittelwert der gesamten Platte. Rot eingerahmt in Spur 8 ist ein Mix aus den UV- und Weißlichtproben. Die grünen Balken geben die Löcher mit verwertbaren Reads wieder, die braunen Balken stehen für die Löcher der Platte, in denen mehr als ein DNA-Fragment sequenziert wurde und deren Reads deshalb nicht auswertbar sind.

Im Durchschnitt sind 50 bis 60 Prozent der Reads aus unterschiedlichen Versuchen auswertbar (Spur 1 – 8 und Total, grüne Balken). Hierbei sind im Mittel 38 Prozent der gesamten Reads ausgeschlossen, weil die Sequenzen kleiner als 70 Basenpaare sind (Abb. nicht gezeigt). Aus Spur acht dagegen, mit dem Mix aus UV- und Weißlicht-Proben, sind nur 30 Prozent der Reads auswertbar (grüner Balken). Das liegt zum Teil daran, dass bereits 30 Prozent der gesamten Reads nicht verwendet werden konnten, weil in den entsprechenden Löchern der Picotiterplatte mehr als ein DNA-Fragment sequenziert wurde (Spur 8, hellbrauner Balken). Bei den anderen Sequenzierungen (Spur 1 – 7, braune Balken) fallen aus diesem Grund weniger als zehn Prozent der Reads weg. Dieser hohe Anteil an mehrfachen DNA-Fragmenten in Löchern aus Spur acht lässt sich dadurch erklären, dass das Verhältnis der Anzahl von DNA-Molekülen zu den Kügelchen, an denen die DNA gebunden, amplifiziert und sequenziert wird, nicht optimal war. Im Idealfall soll ein DNA-Molekül pro Kügelchen binden.

Mit der „Genome Sequencer Data Analysis Software“ (Version 2.0.01.14, Roche) wurden von Sascha Tierling die Reads der Sequenzierung an das Referenzgenom der Biene (Amel_3.0) angeglichen. Reads, die den gleichen genomischen Sequenzen zugeordnet waren, wurden in einer gemeinsamen Sequenz als so genanntes Contig zusammengefasst. Einen Überblick über die Anzahl der Sequenzierungen ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Anzahl der ausgewerteten Reads und Contigs aus der ChIP-seq

Es sind die Reads angegeben, die im Sequenzabgleich mit der genomischen Sequenz der Biene (RefSeq) eingesetzt wurden. Reads, die demselben Bereich der genomischen Sequenz zuzuordnen waren (in RefSeq), wurden in Contigs zusammengefasst.

Reads	Weißlicht		UV-Licht	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Gesamt	9.354	100	39.795	100
In RefSeq	7.223	77	29.875	75
Nicht in RefSeq	1.774	19	8.361	21
Zu kurz	357	4	1.559	4
Mehrfach in RefSeq	514	5	2.329	6
Contigs	4.247		16.029	

3.2.2 Atf-2-Bindungen im Bienengenom nach UV-Strahlung

Die Daten der Weißlicht- und UV-Licht-ChIP-seq sollten vergleichend analysiert werden auf:

- Verteilung der Atf-2-DNA-Bindungen auf unterschiedliche DNA-Elemente
- Zielgene und DNA-Bindungsstellen von Atf-2
- Ontologie der Zielgene von Atf-2
- Bindungshäufigkeiten von Atf-2 an spezifische DNA-Bereiche

3.2.2.1 Bindung von Atf-2 an DNA-Elemente

Weil es sich bisher als schwierig erwies, distale DNA-Elemente wie Enhancer zu identifizieren, konzentrierten sich Forschungen zu TFBSs hauptsächlich auf die Promotorbereiche von Genen. Da diese Experimente noch dazu *in vitro* oder in Zellkulturen durchgeführt wurden und daher oft nicht die Genregulation in einem lebenden Organismus darstellten, sollte durch *in vivo* Experimente gezeigt werden, an

welche DNA-Elemente des Bienengenoms Atf-2 bindet. Hierfür wurden von der UV- und der Weißlichtprobe die Contig-Sequenzen der möglichen Atf-2-Bindungsstellen aus der CHIP-seq und die Referenz-Sequenzen des Genoms abgeglichen und den Exons, Introns, Promotoren (- 2000 bis + 1 bp vom Translationsstartpunkt) und den Bereichen zwischen den Genen (inter Gen) zugeordnet. Zum weiteren Vergleich wurde auch die normale Verteilung der DNA-Elemente im Genom der Biene miteinbezogen.^[9,16] Der Sequenzabgleich wurde von Andreas Wagenmann (Lehrstuhl für Computational Biology, Universität des Saarlandes) unter Verwendung der RefSeq Amel_2.0 und dem BLAST-Algorithmus (NCBI) durchgeführt. Für die Zuordnung der Contigs zu den DNA-Elementen wurde von ihm ein Programm entwickelt.

Da in den Proben auch unspezifisch gebundene DNA-Fragmente (Reads) vorkommen könnten, sollte ein unterer Grenzwert für die Anzahl der Reads pro Contig festgelegt werden. Hierbei sollte die Wahrscheinlichkeit $p \leq 0,001$ sein, dass unspezifisch gebundene DNA-Fragmente aus dem gleichen genomischen DNA-Bereich stammen. Daraus ergab sich, dass für Weißlicht nur Contigs mit mindestens drei Reads ($p = 0,0001$) und für UV-Licht mit mindestens vier Reads ($p = 0,00009$) analysiert wurden. Wegen der ungleichmäßigen Gesamtzahl der Reads beider Proben (siehe oben) wurden die Anteile der DNA-Elemente für jede Probe einzeln in Prozent berechnet.

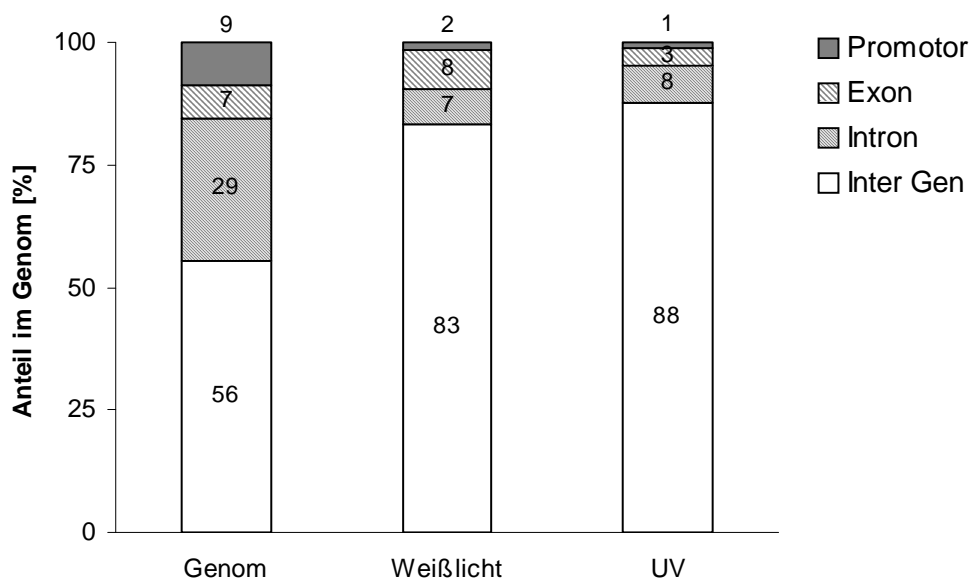


Abb. 38: Verteilung der Atf-2-Bindungsstellen auf DNA-Elemente

Die Weiß- und UV-Licht-Proben wurden auf die Anzahl der Bindungen von Atf-2 an Promotoren, Exons, Introns und den übrigen DNA-Bereichen (Inter Gen) hin untersucht. Insgesamt wurden 582 Contigs der Weißlichtprobe und 1396 Contigs der UV-Probe analysiert. Die Verteilung auf die DNA-Elemente wurde für beide Proben und das Genom prozentual berechnet. Die Anteile der Proben beziehen sich auf die jeweilige Gesamtzahl der Bindungen (Contigs). Die Verteilung im Genom wurde nach Angaben von Solignac (2007)^[9] und Elsik (2007)^[16] berechnet.

Der Abb. 38 ist zu entnehmen, dass Atf-2 nach UV- und Weißlicht-Behandlung relativ häufig in intergenetischen Regionen (Inter Gen) gebunden hat und wenig in Promotoren und Introns. In den Exons entspricht die Verteilung der Bindungsstellen etwa der des Genoms. Im Vergleich zur Weißlicht-Probe, nimmt nach UV-Behandlung die Anzahl der möglichen TF-DNA-Bindungsstellen in den Exons um die Hälfte ab.

3.2.2.2 Bindung von Atf-2 an Gene und DNA-Sequenzen

Als nächstes wurde untersucht, an welche Gene Atf-2 im Vergleich von Weißlicht- zu UV-Licht-Behandlung gebunden hat. Die Gene wurden wie schon zuvor von Andreas Wagenmann durch Sequenzabgleich der genomischen Sequenzen und der Atf-2-Bindungsstellen (Contigs) ermittelt. Um die Anzahl der gebundenen Gene zu berechnen, wurden die Grenzwerte für die Contigs wie bei der Ermittlung der DNA-Elemente festgelegt, mit Weißlicht ≥ 3 Reads/Contig und UV-Licht ≥ 4 Reads/Contig. Da Gene mehrere TFBSs haben könnten, sollten zusätzlich die einzelnen Bindungsstellen der Weißlicht- und der UV-Licht-Probe verglichen werden. Da diese Daten manuell ausgewertet wurden, konnten wegen der großen Datenmengen nur Contigs mit Weißlicht ≥ 5 Reads/Contig und UV-Licht ≥ 10 Reads/Contig analysiert werden. Um die Mengen von gebundenen Genen und TF-DNA-Bindungsstellen miteinander vergleichen zu können, wurde die Anzahl der Zielgene zusätzlich mit den Grenzwerten Weißlicht ≥ 5 Reads/Contig und UV-Licht ≥ 10 Reads/Contig berechnet.

Beim Vergleich der Anzahlen von Zielgenen fällt auf, dass nach der UV-Behandlung wesentlich mehr Gene gebunden waren, als nach Weißlicht-Behandlung, unabhängig von den Grenzwerten der Contigs (Abb. 39a). Ein Großteil der Weißlicht-Gene wird auch nach UV-Strahlung durch Atf-2 gebunden. Bei der Betrachtung der einzelnen DNA-Bindungsstellen sieht die Verteilung anders aus (Abb. 39b). Hier sind mehr DNA-Bereiche nach Weißlicht-, als nach UV-Licht-Behandlung gebunden. Gemeinsame Bindungsstellen gibt es kaum. Der Vergleich der Anzahlen von Zielgenen und einzelnen TFBSs lässt folgende Schlüsse zu: Viele TFBSs bzw. Contigs wurden mehreren Genen zugeordnet, denn die Anzahl der Gene ist jeweils größer als die Anzahl der Contigs. Dass in beiden Proben viele gemeinsame Zielgene gebunden wurden, lässt sich wohl durch die großen Genbereiche erklären. Bei der Zuordnung zu den Genen wurden teilweise Contigs mit einbezogen, die über einhundert Kilobasenpaare vom Translationsstartpunkt entfernt liegen. Dadurch ergaben sich für viele Gene mehrere TFBSs. Die einzelnen Contigs dagegen sind im Durchschnitt etwa fünfhundert Basenpaar groß. Somit ist eine Überschneidung der einzelnen Contigs unwahrscheinlicher, als die Bindung mehrerer Contigs an ein Gen. Beim Vergleich von Genanzahl und TFBSs ist weiterhin auffällig, dass nach Weißlicht-Behandlung 85 Bindungsstellen 301 Genen zugeordnet wurden. Nach UV-Behandlung aber waren es 60 Bindungsstellen und 751 Gene. Das könnte darauf hindeuten, dass Atf-2

an spezifische DNA-Motive bindet, die sich im Genom wiederholen. Nach UV-Stimulus könnte der TF dann, im Vergleich zur Weißlichtprobe, vermehrt an diese Sequenz-Motive binden.

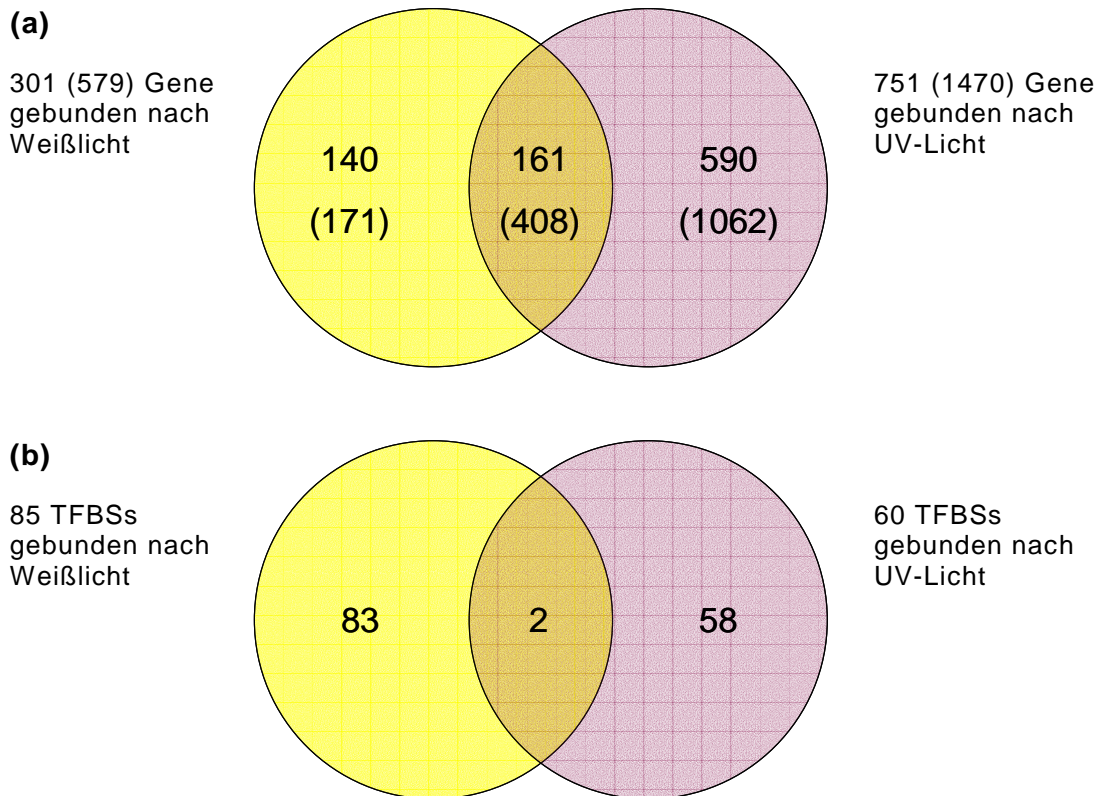


Abb. 39: Bindung von Atf-2 an Gene und TFBSs

(a) Im oberen Venn-Diagramm sind die Anzahlen der durch Atf-2 gebundenen Gene nach UV- und Weißlicht-Behandlung dargestellt. Für die Auswertung wurden Contigs mit Weißlicht ≥ 5 Reads (oder ≥ 3 Reads) und mit UV-Licht ≥ 10 Reads (oder ≥ 4 Reads) herangezogen. **(b)** Im unteren Diagramm ist die Anzahl der TFBSs angegeben, die nach UV- und Weißlicht-Behandlung durch Atf-2 gebunden wurden. Für die Auswertung wurden Contigs mit Weißlicht ≥ 5 Reads und UV-Licht ≥ 10 Reads herangezogen. Contigs, die mehreren DNA-Bereichen zugeordnet werden konnten, wurden ausgeschlossen.

3.2.2.3 Ontologie der Gene

Um einen Überblick über die gesamten Zielgene beider Proben zu bekommen, wurden die Funktionsweisen der Genprodukte untersucht und nach biologischen Prozessen geordnet. Hierfür wurden von Andreas Wagenmann mit den „Gene Ontology Tools“ (Lewis-Sigler Institut, Princeton University, USA) die Gene aus dem Sequenzabgleich (siehe oben) den Gen-Ontology(GO)-Begriffen aus der Datenbank des „Gene Ontology“-Projektes zugeordnet. Da für die Bienengene keine GO-Daten verfügbar waren, wurden homologe Gene der Maus (*Mus musculus*) aus der „Mouse Genome Database“ (MGD) verwendet. Die GO-Begriffe bezeichnen u. a. die biologi-

schen Prozesse, an denen die Genprodukte beteiligt sind, so dass die Gene in funktionelle Gruppen aufgeteilt werden können. Von den gesamten GO-Ergebnissen wurden vorwiegend Gruppen ausgewertet, die an der Stressantwort oder der Genregulation beteiligt sind. Die jeweilige Ontologie der Gene von Weiß- und UV-Lichtprobe wurde prozentual dargestellt. Der Grenzwert für die untersuchten Contigs wurde wie gehabt auf Weißlicht ≥ 3 Reads und UV-Licht ≥ 4 Reads festgesetzt (siehe oben). Eine Liste mit allen funktionellen Gruppen ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 8).

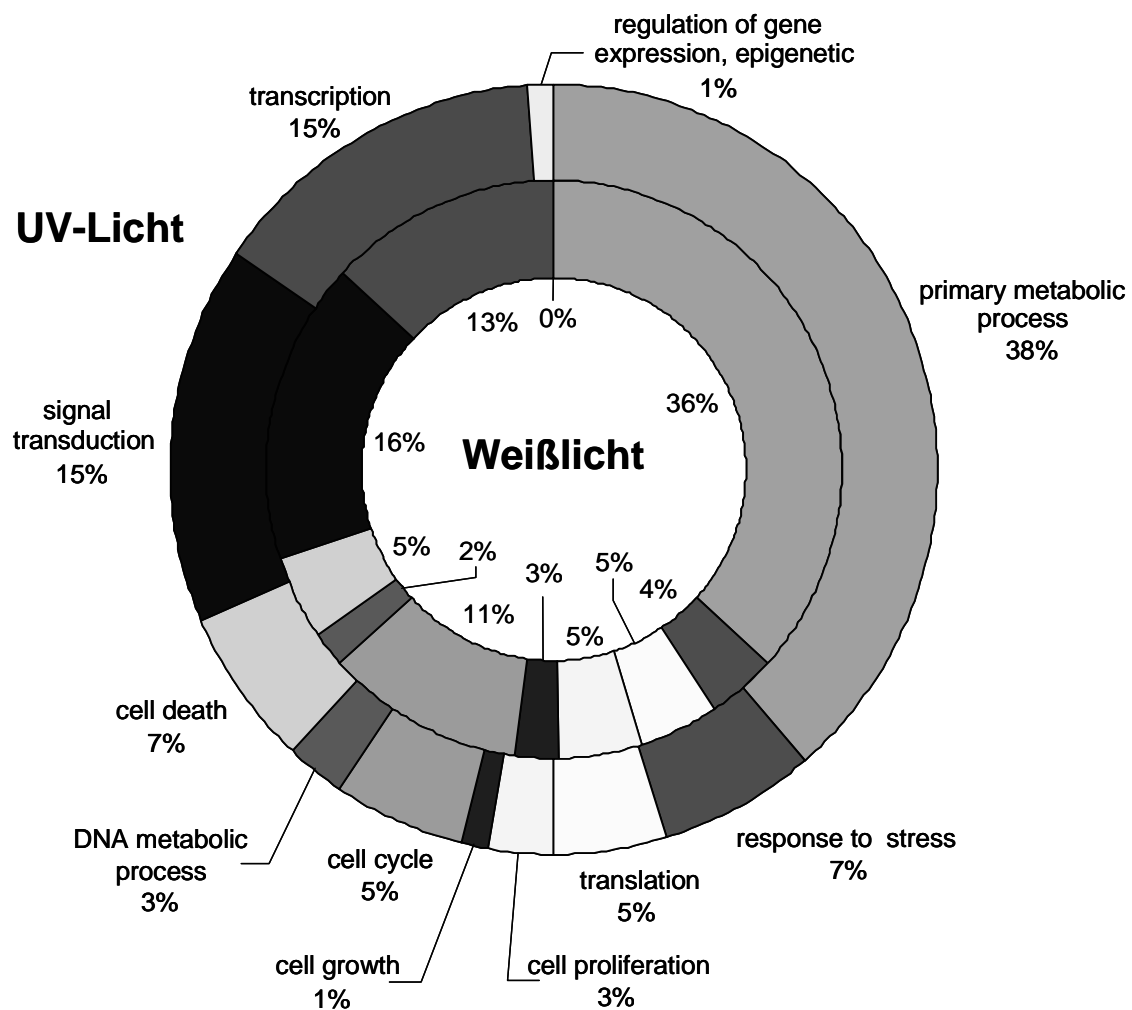


Abb. 40: Ontologie der Zielgene von Atf-2

Die Zielgene von Atf-2 wurden jeweils für die Weißlicht- und die UV-Lichtprobe in funktionelle Gruppen eingeteilt. Die Kategorisierung der Gene erfolgte nach „biologischen Prozessen“ der „Gen Ontology“-Datenbank. Einzelne Gene können auch mehreren Prozessen zugeordnet sein. Insgesamt wurden für Weißlicht 153 und für UV-Licht 300 Gene prozentual auf die Gruppen verteilt.

Im Vergleich zur Weißlichtprobe (4 %) ist nach UV-Stimulus besonders der Anteil der Gene größer, die an der Stressantwort (7 %) beteiligt sind (Abb. 40). Auch der Anteil der Gene, die am Zelltod mitwirken, ist bei der UV-Probe (7 %) größer, als bei

der Weißlicht-Probe (5 %). Dagegen nehmen die Anteile der Gengruppen aus Zellproliferation, Zellwachstum und Zellzyklus zusammen von 19 Prozent bei der Weißlichtprobe auf 9 Prozent bei der UV-Probe ab. Bei der Genregulation (Transkription und Epigenetik) ist der Anteil an Genen nach UV-Strahlung (16 %) nur gering höher als nach Weißlicht (13 %).

3.2.2.4 Bindungshäufigkeit von Atf-2 an TFBSs

Beim Vergleich der UV- und der Weißlichtprobe auf lokusspezifische Bindungshäufigkeit von Atf-2, wurden mögliche TFBSs in Promotorregionen oder Introns von Genen untersucht. Diese DNA-Regionen konnten besser einem bestimmten Gen zugeordnet werden, als distale Bindungsstellen, die weit entfernt von einem Gen liegen. Mögliche Atf-2-Bindungsstellen (Contigs) wurden für folgende Gene ausgewählt: *Mitogen-activated protein kinase ERK-A (Erka)*, *Ras-GEF domain-containing family member 1B-like (RasGef1b)*, *Octopamine receptor (Oa1)*, *Guanylate cyclase, soluble, beta 1 (Gucy1b3)*, *D2-like dopamine receptor (Dop3)*, *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (Camkii)* und *Jun-related antigen (Jun-like)*.

Um die Bindungen von Atf-2 an eine bestimmte DNA-Sequenz nach UV- oder Weißlichtbehandlung miteinander zu vergleichen, sollte die Intensität der Atf-2-DNA-Bindung quantifiziert werden. Dabei wurden die Read-Anzahlen der Contigs beider Proben gegenübergestellt. Hat also ein TF häufiger an eine bestimmte DNA-Region gebunden, sollten auch mehr DNA-Fragmente angereichert werden, wodurch sich die Anzahl der Reads erhöht. Berücksichtigt wurde bei der Auswertung auch der Unterschied in der Gesamtzahl der Reads beider Proben (siehe oben). Deshalb wurden die Weißlicht-Reads zusätzlich angepasst, indem die Read-Anzahl der Weißlicht-Contigs mit der Ratio aus der Gesamtzahl von UV- (39795) zu Weißlicht-Reads (9354) multipliziert wurde. Die gestrichelten Balken zeigen die korrigierten Reads an (Abb. 41).

Bezogen auf die Weißlicht-Kontrollen, nehmen nach UV-Strahlung die Bindungshäufigkeiten von Atf-2 an den Genen *Erka*, *RasGef1b*, *Gucy1b3*, *Dop3* und *Camkii* zu (Abb. 41). An *Oa1* hat Atf-2 nach UV-Behandlung weniger gebunden. Zwar ist am *Jun-like* nach UV-Strahlung ebenfalls eine Zunahme der Atf-2-Bindung zu beobachten, jedoch ist mit der korrigierten Weißlicht-Probe kaum ein Unterschied zwischen den Proben zu erkennen (8,5 Weißlicht-Reads zu 10 UV-Reads).

Weitere TFBSs mit den stärksten Bindungshäufigkeiten (Contigs mit höchster Read-Anzahl) sind im Vergleich von Weißlicht- und UV-Lichtprobe in Tabelle 9 im Anhang dargestellt.

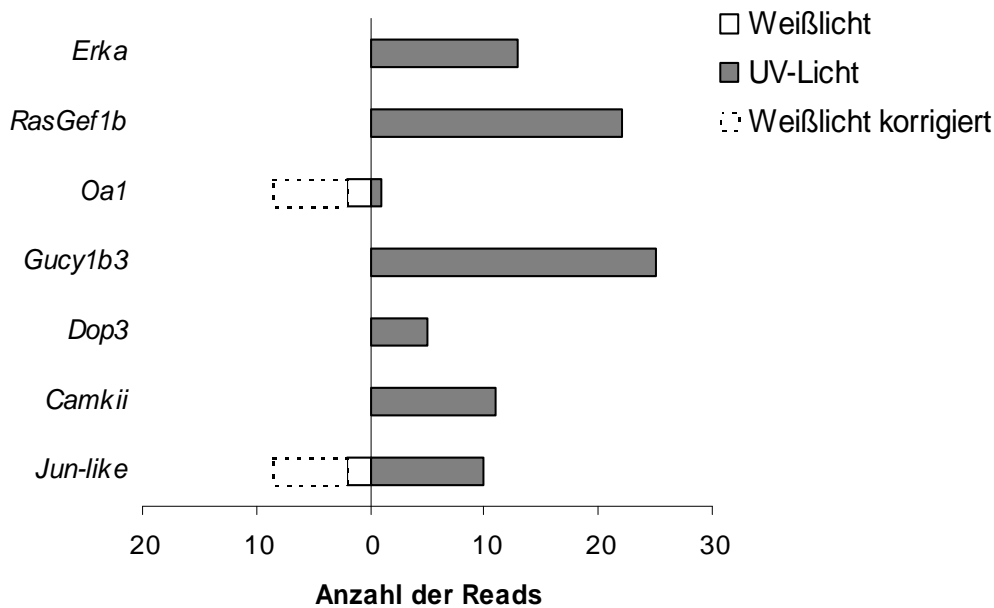


Abb. 41: Bindungshäufigkeit von Atf-2 an bestimmte Genloci nach UV-Strahlung

Bienen wurden 30 min mit UV- oder Weißlicht behandelt. 1 h später wurden die Gehirne präpariert und mittels CHIP-seq mit ATF-2-Antikörpern untersucht. Aufgeführt sind die Anzahlen der Reads (Bindungshäufigkeiten von Atf-2) verschiedener TFBSs von Genen. Die gestrichelten Balken geben korrigierte Reads wieder. Dabei wurde die Gesamtzahl der Weißlicht-Reads an die Gesamtzahl der UV-Licht-Reads angepasst.

3.3 Validierung von Atf-2-Bindungsstellen aus der CHIP-seq mittels CHIP mit Real-Time-qPCR (CHIP-qPCR)

Die ausgesuchten Atf-2-Bindungsstellen der CHIP-seq (siehe oben, 3.2.2.4) sollten mittels CHIP mit Real-Time-qPCR (CHIP-qPCR) auf ihre Bindungsintensitäten überprüft werden. Dazu wurden die Bienen wie bei der CHIP-seq behandelt. Eine Stunde nach 30minütiger UV- oder Weißlicht-Bestrahlung wurden die Gehirne der Bienen präpariert und die DNA durch CHIP aufbereitet. Parallel zur IP mit ATF2-Antikörper wurden dieselben Hirnhomogenate mit den Antikörpern Creb und Creb-mAk präzipitiert. Für die zu untersuchenden TFBSs wurden CHIP-Primer entworfen, die mit Real-Time-qPCR, sowie mit PCR und Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Spezifität und Funktionalität positiv getestet wurden (Abb. nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der CHIP-qPCR sind in Abb. 42 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengefasst und mit den Ergebnissen der CHIP-seq verglichen.

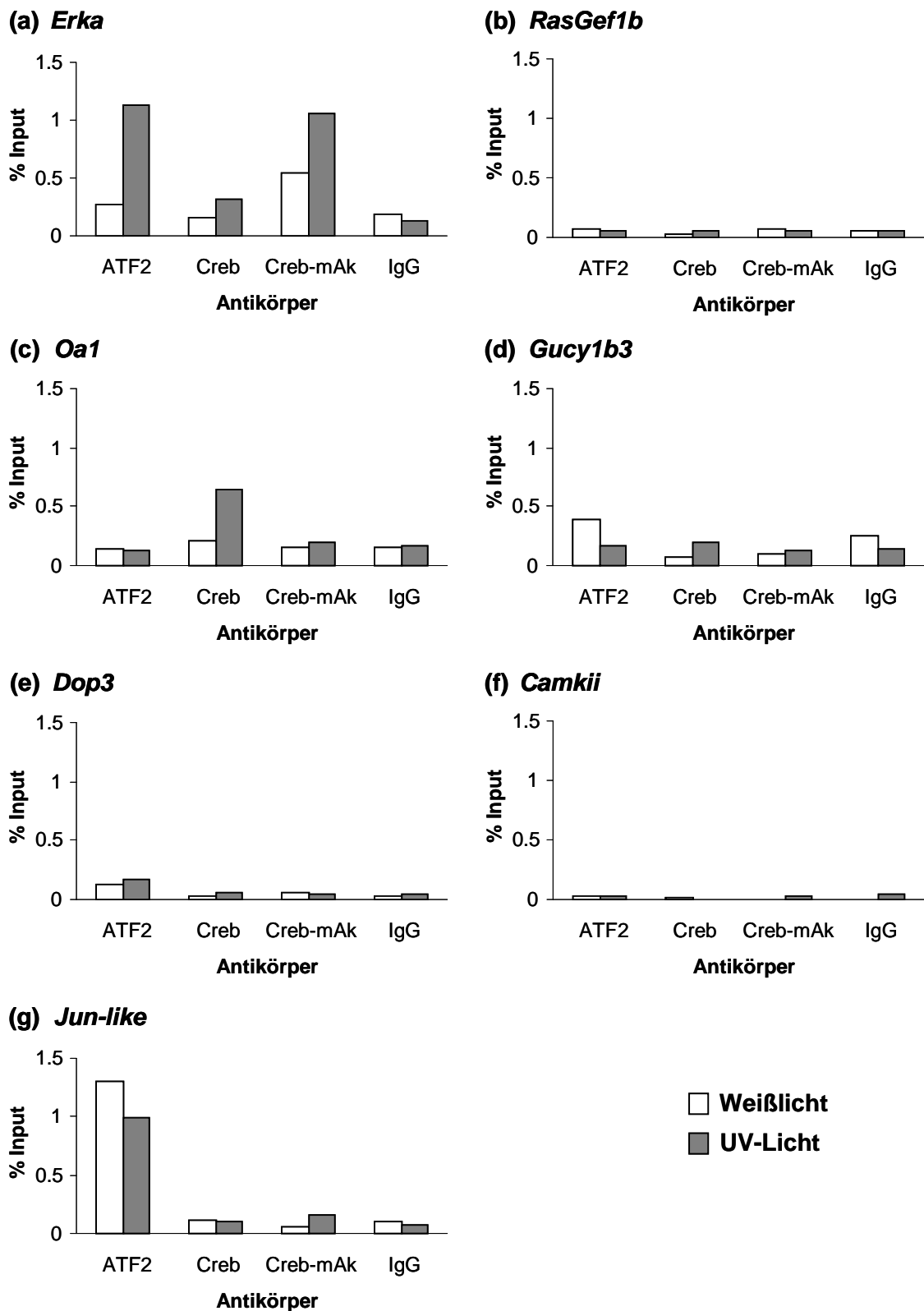


Abb. 42: DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren nach UV-Strahlung

Im Versuch wurden Bienen 30 min mit UV- oder Weißlicht bestrahlt. 1 h später wurden die Gehirne präpariert. Die durch ChIP präzipitierte DNA wurde mittels Real-Time-qPCR quantifiziert. Dieselben Proben wurden parallel mit ATF2-, Creb- und Creb-mAk-Antikörpern präzipitiert. Der IgG-Antikörper dient als Negativkontrolle. Die ChIP behandelten DNA-Proben wurden durch die jeweilige DNA-Menge vor der IP (Input) normalisiert. In den Teilabbildungen (a) – (g) sind die Intensitäten von TF-DNA-Bindungen verschiedener Genloci dargestellt.

Tabelle 6: DNA-Bindung von Creb und Atf-2 nach UV-Strahlung: Vergleich von ChIP-seq und ChIP-qPCR

Bienen wurden 30 min mit UV- oder Weißlicht bestrahlt. 1 h später wurden die Gehirne präpariert. Die TF-DNA-Bindungen wurden mit ChIP-qPCR (n = 2) (Abb. 42) oder ChIP-seq (n = 1) (Abb. 41) untersucht. In der Tabelle ist jeweils die Ratio der TF-DNA-Bindungen aus UV-Licht zu Weißlicht-Probe dargestellt. Die Bindungsintensität, bzw. –Häufigkeit, wurde bei der ChIP-qPCR aus dem Inputanteil und bei der ChIP-seq aus der Read-Anzahl berechnet. Es sind nur ChIP-qPCR-Ergebnisse aufgeführt, bei denen die DNA-Menge einer ChIP-Probe $\geq 1\%$ des Inputs ist und die Ratio ChIP-Probe/IgG-Kontrolle ≥ 2 . Bei den Ergebnissen der ChIP-seq wurden 0 Reads gleich 1 gesetzt. In Klammern ist die Ratio aus UV-/Weißlicht-Probe mit korrigierten Anzahlen der Weißlicht-Reads angegeben. – = keine TF-DNA-Bindung

Gen	Antikörper		ChIP-qPCR			ChIP-seq	
	Creb	Creb-mAk	ATF2		ATF2		
<i>Erka</i>	2,0	1,9	4,1		13	(3,1)	
<i>RasGef1b</i>	–	–	–		22	(5,2)	
<i>Oa1</i>	3,0	–	–		2	(0,5)	
<i>Gucy1b3</i>	–	–	–		25	(5,9)	
<i>Dop3</i>	–	–	1,3		5	(1,2)	
<i>Camkii</i>	–	–	–		11	(2,6)	
<i>Jun-like</i>	–	–	0,8		5	(1,2)	

Vor der Betrachtung der Ergebnisse aus Tabelle 6 muss zunächst erwähnt werden, dass für UV- und Weißlicht-Proben jeweils nur ein n = 2 für die ChIP-qPCR und ein n = 1 für die ChIP-seq untersucht wurde. Bei der Analyse mit der Real-Time-qPCR wurden nur für ChIP-Proben mit ATF2-Antikörper PCR-Replikate angefertigt. U. a. resultieren auch daraus teilweise große Standardabweichungen bei den Ergebnissen (nicht in Abb. 42 gezeigt). Auffällig ist, dass von den TF-DNA-Bindungen der ChIP-seq kaum welche mit der ChIP-qPCR bestätigt wurden (Tabelle 6). Beim Gen *Jun-like* konnte die DNA-Bindung von Atf-2 wiederholt gezeigt werden (Abb. 36). Eine Änderung der Bindungshäufigkeit von Weißlicht zu UV-Licht ist hier ebenfalls nicht zu erkennen. Verglichen mit der ChIP-seq sind die Verhältnisse von UV- zu Weißlicht bei *Jun-like*, sowie bei *Erka* und *Dop3* in etwa gleich, allerdings nur mit den korrigierten Weißlicht-Reads (Werte in Klammern). Überraschend ist, dass an den Genen, bzw. TFBSs, mit den höchsten Read-Anzahlen in der ChIP-seq (*RasGef1b*, *Gucy1b3* und *Camkii*), mit der ChIP-qPCR keine Bindungsereignisse von Atf-2 festgestellt wurden. Bei den Genen *Nos* und *Egr1* konnten weder mit ChIP-qPCR (Abb. 36), noch mit ChIP-seq (Ergebnisse nicht gezeigt) TF-DNA-Bindungen nachgewiesen werden.

3.4 mRNA-Expression nach UV-Strahlung

Um zu untersuchen, wie TF-Bindungsereignisse die Transkription beeinflussen, sollte die mRNA-Expression von Genen überprüft werden, an die ein TF gebunden hat (Tabelle 6). Dazu wurden Bienen wiederum 30 Minuten mit Weißlicht ($n = 3$) oder UV-Licht ($n = 3$) bestrahlt. Nach 15 Minuten, einer, fünf oder 24 Stunden wurde aus drei Hirnen pro Probe die RNA extrahiert und mittels Real-Time-qPCR analysiert. Für die zu untersuchenden mRNA-Transkripte der Gene *Erka*, *Dop3* und *Jun-like* wurden Primer hergestellt. Diese wurden mittels Real-Time-qPCR, sowie durch PCR und Agarose-Gelelektrophorese positiv auf ihre Spezifität und Funktionalität getestet (Abb. nicht gezeigt). Nach der Real-Time-qPCR wurden die mRNA-Mengen mittels cDNA-Standards bekannter Konzentration quantifiziert und durch die Haushaltsgene *RpS18*, *Ppi* und *EF1-alpha* normalisiert.

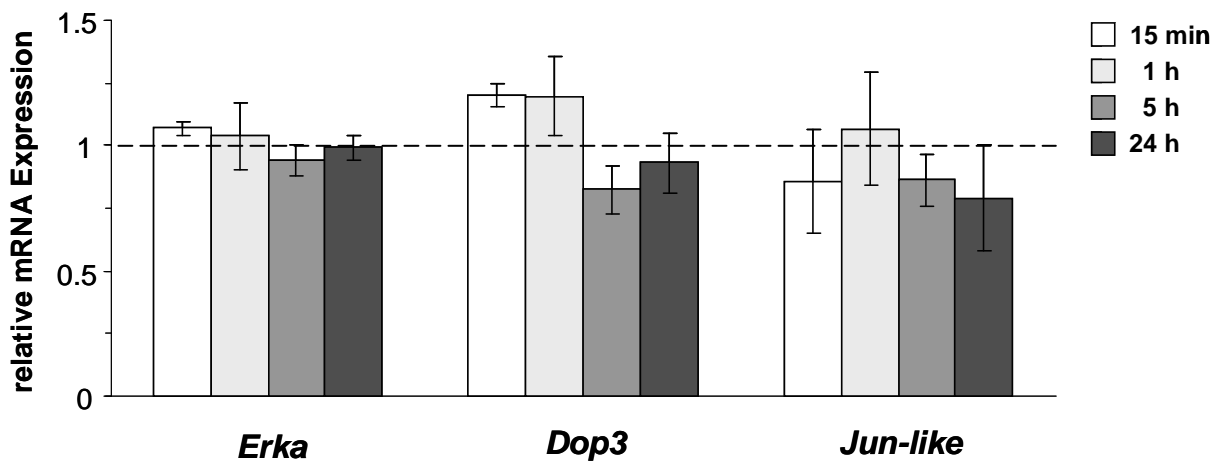


Abb. 43: mRNA-Expression nach UV-Strahlung

Bienen wurden 30 min mit UV- oder Weißlicht bestrahlt ($n = 3$ pro Gruppe). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus den Gehirnen extrahiert und mittels Real-Time qPCR analysiert. Gezeigt sind die relativen Genexpressionen der UV-Proben verschiedener Gene. Die UV-Proben wurden jeweils durch die Mittelwerte der entsprechenden Weißlichtproben normalisiert und die Weißlichtproben (nicht im Diagramm gezeigt) wurden gleich eins gesetzt (gestrichelte Linie).

Es wurde mit dem studentischen t-test zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von Weißlicht- und UV-Licht-Proben festgestellt (Abb. 43). Da die Abhängigkeit der mRNA-Expression von TF-Bindungsereignissen untersucht werden sollte, wird hier nicht auf mögliche Unterschiede der mRNA-Expression, zu verschiedenen Zeitpunkten nach UV-Strahlung, eingegangen.

Ebenso wie die mRNA-Expression, blieb eine Stunde nach UV-Strahlung auch die Stärke der Atf-2-Bindung an die Gene *Dop3* und *Jun-like* fast unverändert (Tabelle 6). Bei *Erka* hat Atf-2 nur nach UV-Strahlung an die DNA gebunden. Auf die mRNA-Expression hatte der Stimulus dagegen keine Auswirkungen.

D Diskussion

Um die Genregulation durch Bindungen von Transkriptionsfaktoren (TFs) an *cis*-regulatorische DNA-Elemente zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) für Hirngewebe der Honigbiene etabliert werden. Bisherige Studien hierzu haben sich hauptsächlich auf die Promotorbereiche von Genen konzentriert.^[228-230] Seit kürzerer Zeit gibt es aber immer mehr Hinweise darauf, dass viele TFs auch an distale DNA-Elemente, wie den Enhancern binden. Diese könnten eine wichtigere Rolle in der Genregulation einnehmen als bisher angenommen.^[231] In humanen Zellen z. B. wurden über 10.000 Bindungsstellen für den TF STAT1 gefunden. Hiervon lagen nur 18 Prozent innerhalb von ein Kilobasenpaaren des 5'-Endes der Gene.^[232] Wie die Genexpression durch TF-Bindungsstellen (TFBSs) reguliert wird, insbesondere durch distale TFBSs, lässt noch viele Fragen offen. Hiermit beschäftigt sich u. a. das ENCODE-Projekt-Consortium,^[180] das ein Prozent des menschlichen Genoms untersucht. Alle Experimente diese DNA-Region betreffend, werden zusammengetragen und analysiert. Auf der Suche nach bestimmten Mustern von TF-DNA-Bindungen, Protein-Protein-Interaktionen oder RNA-Expression, wird versucht, Regeln für die Transkriptionskontrolle aufzustellen. Allerdings wurden Experimente hierzu meistens *in vitro* oder in Zellkulturen durchgeführt (siehe Einleitung), deren Expressionsmuster sich von denen aus Zellen nativer Lebewesen unterscheiden. Um die Genregulation *in vivo* zu untersuchen sind deshalb neue Techniken notwendig, wie die ChIP für Gewebe.

1 Vergleich der ChIP-Methode mit anderen Techniken zur Untersuchung der Genregulation

1.1 *In vitro* Protein-DNA-Bindungsassays und *in silico* Analysen

Ein Großteil der Erkenntnisse über die Genregulation durch TFs wurde in den letzten 20 Jahren durch Electrophoretic-Mobility-Shift-Analysis (EMSA) erworben. Mit dieser Methode lassen sich physikalische Interaktionen zwischen Proteinen und DNA untersuchen.^[233,234] Hierbei werden DNA-Fragmente und Proteine *in vitro* inkubiert und anschließend in nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. DNA-Protein-Komplexe können aufgrund ihrer differenzierten Laufeigenschaften im Gel detektiert werden. Mit weiter entwickelten *in vitro* Bindungs-Assays wie CASTing (*engl.* cyclic amplification and selection of targets), können große Mengen von kurzen zufälligen Oligonukleotiden auf Bindungen bestimmter Proteine untersucht werden.^[235] Die Informationen aus solchen Experimenten werden u. a. in der JASPAR-Datenbank zusammengetragen, um gewichtete Positionsmatrizen (PMW, *engl.* posi-

tion weight matrix) zu erstellen.^[176] In speziell entwickelten Algorithmen können diese PMWs genutzt werden, um das Genom mit Computerprogrammen auf TFBSs zu untersuchen, *in silico* Analyse genannt.^[236,237] Manche Algorithmen suchen nicht einzelne DNA-Motive, sondern ganze Cluster von TFBSs.^[237,238] Der Hintergrund hierzu beruht auf der Annahme, dass mehrere TFs an eine kurze DNA-Sequenz binden, um kooperativ die Expressionsstärke von Genen zu regulieren. So wurde in embryonalen Stammzellen der Maus durch ChIP-seq eine hohe Co-Lokalisation von TFs an bestimmten Stellen des Genoms festgestellt.^[239] Darüber hinaus hat der Co-Faktor p300 fast nur an Cluster von drei bis sechs TFs gebunden und kaum an einzelne TFs.

Um die ChIP-Technik für die Honigbiene zunächst mit der PCR zu testen, mussten DNA-Bereiche amplifiziert werden, die mindestens eine TFBS enthielten. Da für die Biene bisher keine TFBSs bekannt waren, wurden in dieser Arbeit Promotorsequenzen (-4000 bis +200 bp vom TSS) von Genen mit den Programmen TESS und Cister auf Bindungsstellen für die TFs Atf-2, c-Jun und Creb untersucht (C2.2). Bei den ausgewählten Genen waren DNA-Bindungen durch einzelne TFs in humanen Zellen und durch *in vitro* Versuche bekannt.^[110,145,240] Experimentell wurden mit der ChIP und der Analyse durch quantitative Real-Time-PCR (ChIP-qPCR) oder Standard-PCR, im Gehirn der Biene mögliche TFBSs von fünf Genen mit drei verschiedenen Antikörpern gegen die genannten TFs untersucht. Dabei wurden DNA-Bereiche ausgewählt, die *in silico* mit mindestens 90prozentiger Wahrscheinlichkeit TFBSs beinhalten sollten. Von neun möglichen Kombinationen aus TFs und *in silico* TFBSs, konnten nur in zwei DNA-Bereichen Bindungen von TFs nachgewiesen werden, nämlich am *Creb*-Promotor mit Creb-Antikörpern (Abb. mit Creb-Ak nicht gezeigt, ChIP mit Antikörper-Mix Abb. 34) und am *Jun-like*-Promotor mit ATF2-Antikörpern (Abb. 36 und Tabelle 4). Auch andere Studien zeigten zum Teil geringe Übereinstimmungen von *in silico* und *in vivo* TFBSs.^[236,241,242] *In silico* Vorhersagen scheinen vor allem mit zunehmender Komplexität der Genregulation schwieriger zu werden. Während z. B. bei einem relativ einfach reguliertem Organismus wie *E. coli* das *in vitro* LexA-Motiv fast immer auch *in vivo* gebunden wird,^[243] sieht es bei höheren Organismen anders aus. In einer menschlichen Zelllinie wurde durch ChIP-Experimente die Bindung des TF p63 untersucht.^[244] Nur ein bis drei Prozent der *in silico* TFBSs wurden auch *in vivo* gebunden, obwohl die *in vivo* Bindung des TF signifikant mit dem p63-Motiv korreliert. Diese *in vivo* Experimente widersprechen früheren Annahmen, dass TFs nur an bestimmte Sequenz-Motive binden. Nur *in vivo* Studien ermöglichen es, die Komplexität der Transkriptionskontrolle in höheren Organismen zu erfassen. Bei *in vitro*, *in silico* oder Zellkulturstudien werden einzelne Genregulationsmechanismen nicht berücksichtigt, wie z. B. die in der Einleitung erwähnte Chromatinstrukturierung oder Interaktionen von TFs mit anderen Protei-

nen. Solche regulatorischen Mechanismen sind schwer in Algorithmen auszudrücken. Deshalb benötigen Bioinformatiker viel mehr Daten aus *in vivo* Experimenten, um *in silico* Analysen zu optimieren.

Eine weitere *in silico* Methode zur Identifikation von TFBSs ist das phylogenetische Footprinting. Mit dieser Methode werden konservierte DNA-Motive in orthologen Genen verschiedener Spezies gesucht.^[245] Hierbei zeigen sich in verschiedenen ChIP-Experimenten sehr unterschiedliche Konservierungsstärken der TFBSs zwischen den Spezies (zusammengefasst in Dowell (2010)^[246]). So wurden z. B. in sechs verschiedenen Studien Mensch und Maus verglichen, bei denen abhängig vom TF, zwei bis 48 Prozent Übereinstimmungen an konservierten Bindungsereignissen gefunden wurden.^[182,247-251] Geringe Konservierungen von TFBSs zwischen Säugern und Biene könnten erklären, warum in den ChIP-Experimenten dieser Arbeit relativ wenige der *in silico* TFBSs nachgewiesen werden konnten. Diese wurden nämlich aus PMWs der TRANSFAC-Datenbank berechnet und beruhen hauptsächlich auf Experimenten mit Säugerzellen oder *in vitro* Bindungsassays mit humanen TFs.

Für die TFs wurden ebenfalls nur geringe Konservierungen im Tierreich festgestellt. In einer Studie wurde die phylogenetische Verwandtschaft von 1391 Gensequenzen humaner TFs mit den Orthologen aus 24 eukaryotischen Spezies verglichen (Abb. 44).^[6] Dabei zeigte sich besonders bei Invertebraten wie *D. melanogaster* nur noch geringe Übereinstimmungen zu den orthologen humanen Genen. Das liegt zum Teil daran, dass das Repertoire an TFs bei Menschen wesentlich größer ist als bei Invertebraten. Von den humanen TFs kommen alleine 13 % ausschließlich in Primaten vor. Bei eigenen BLAST-Suchen nach homologen TFs wurden ebenfalls nur wenige Mitglieder der humanen Jun- und CREB/ATF-Familien in der Biene gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Konservierung von TF-DNA-Bindungsereignissen ist also von evolutiven Veränderungen der TFs (*trans*) und der TFBSs (*cis*) abhängig. In zwei Studien wurden in nahe verwandten Hefen die Auswirkungen von *cis*- und *trans*-Effekten auf die Expression verglichen.^[252,253] Beide kamen zu dem Schluss, dass Unterschiede von Bindungsereignissen eher auf Variationen von *cis*-Elementen zurückzuführen sind. So besteht die kodierende DNA-Sequenz für die Bindung eines TF (*trans*) an ein DNA-Motiv aus durchschnittlich sechs mal mehr Basenpaaren, als die DNA-Sequenz des Bindungsmotivs (*cis*). Aufgrund dessen und wegen des degenerierten Codes, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass Punktmutationen bei *cis*-Elementen eher zu Veränderungen von TF-DNA-Interaktionen führen, als Mutationen in den kodierenden Bereichen der DNA-Bindungsdomänen von TFs.

Unterschiede in den Bindungsereignissen könnten auch durch epigenetische Veränderungen entstehen, die sich z. B. auf den Kondensationsgrad des Chromatins auswirken. Dieses wurde bei einer Maus untersucht, die eine Kopie des humanen Chromosoms 21 getragen hat.^[254] In diesem System wurden die TFs, Nukleosomen

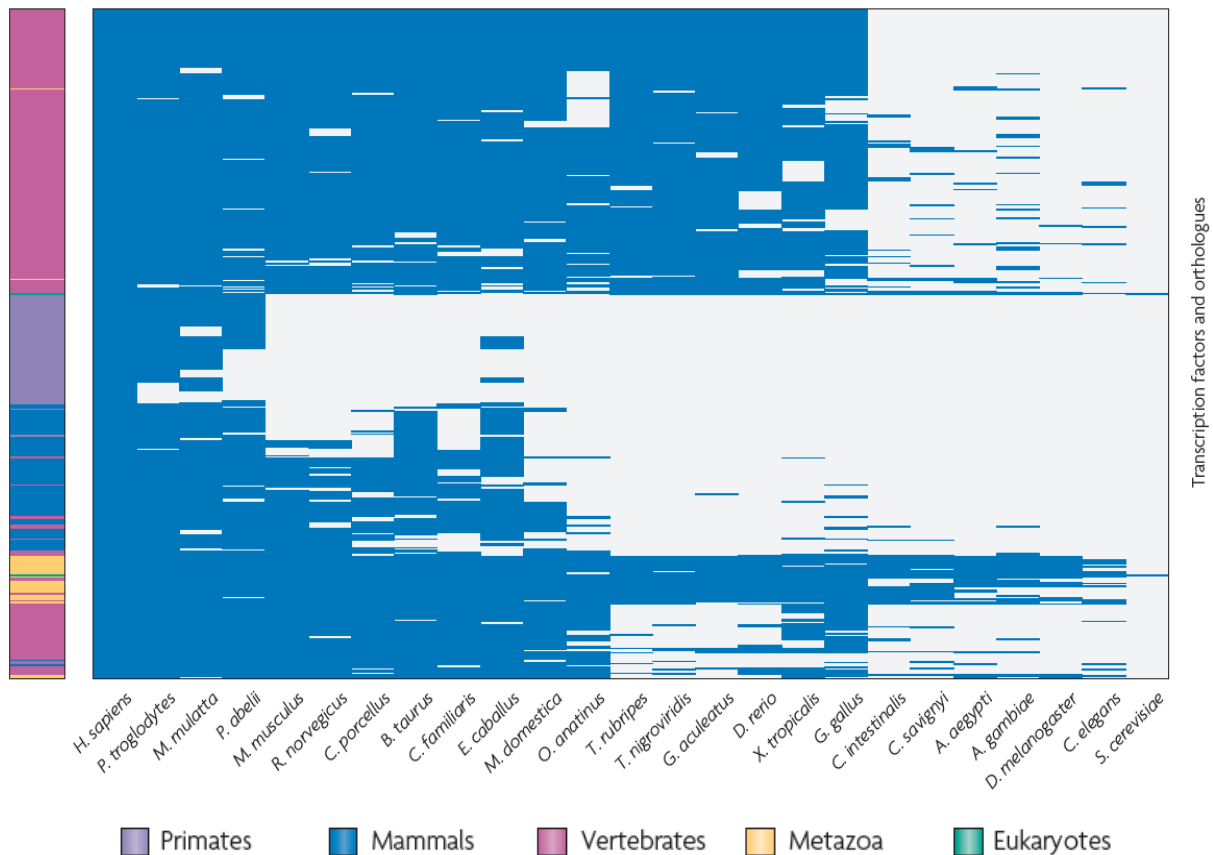


Abb. 44: Konservierung von humanen TFs in 24 eukaryotischen Genomen

In der Heatmap sind TFs (horizontal) und Spezies (vertikal) hierarchisch zusammengefasst, nach der Präsenz (blaue Zellen) oder Abwesenheit (weiß) von orthologen Genen. Die linke Kolumne gibt an, ob TFs spezifisch für eine bestimmte Gruppe von Spezies sind. Abb. verändert nach Vaquerizas et al. (2009)^[6]

und andere regulatorische Proteine von dem Maus-Genom exprimiert. Die Bindungsereignisse am humanen Chromosom stimmten eher mit denen im menschlichen Gewebe überein, als mit den Bindungsereignissen am orthologen Maus-Chromosom. Dies zeigt, dass Bindungsereignisse eher von der DNA-Sequenz, als vom epigenetischen Status abhängen. Andere Studien mit Allelvergleichen von Eltern und Kindern haben diese Beobachtungen bestätigt.^[255]

1.2 Reporter-Assays und Genkonstrukte

Eine weit verbreitete Technik zur Erforschung der Genregulation sind Reporter-Assays. Durch transiente oder stabile Transfektion werden synthetische Genkonstrukte in Zelllinien oder Organismen eingebracht. Die Reporterkonstrukte enthalten ein *cis*-Element, eine Promotorsequenz und ein „Reporter-gen“, das z. B. Luciferase oder GFP (*engl.* Green Fluorescent Protein) exprimiert. Hierdurch lässt sich die Transkriptionsstärke in Abhängigkeit vom *cis*-Element messen.^[256-258] Allerdings geben solche Experimente nicht unbedingt die *in vivo* Situation wieder, da diese künstliche Genregulation mit einzelnen *cis*-Elementen häufig aus einem Kontext ge-

rissen ist. So werden oft nicht die Interaktionen von proximalen und distalen *cis*-Elementen berücksichtigt. Des Weiteren wird bei Reporter-Assays mit einzelnen DNA-Bindungsmotiven nicht beachtet, dass TFBSs in Clustern auftreten können, um die Transkription kooperativ zu regulieren.^[259] Häufig werden Zelllinien zusätzlich zu den Reporter genen mit Genkonstrukten transfiziert, die einen bestimmten TF überexprimieren. Auch hierbei sollten die Ergebnisse kritisch betrachtet werden. So haben Experimente mit humanen Zellkulturen gezeigt, dass überexprimierte TFs teilweise an andere DNA-Loci binden, als die endogenen TFs.^[260,261]

Mit Genkonstrukten können auch nichtfunktionelle TFs exprimiert werden. Diese sollen durch ihr zahlenmäßiges Übergewicht die Funktion von endogenen TFs inhibieren. Dem gleichen Zweck dienend, kann die Proteinexpression eines bestimmten TF auch direkt durch RNA-Interferenz reprimiert werden, wobei der TF nicht vollständig inhibiert werden kann.^[262] Allerdings könnte bei einer starken Affinität zwischen einem endogenen TF und einem *cis*-Element immer noch eine Bindung entstehen. Abhilfe könnten Knock-out Experimente schaffen. Doch selbst hierbei könnte es zu einer Kompensation des ausgeknockten TF durch andere verwandte TFs kommen. So wurden z. B. durch Microarrays zu Proteinbindungen festgestellt, dass die Hälfte von 104 DNA-Bindungsproteinen der Maus an mehrere unterschiedliche Sequenz-Motive binden.^[263] Zusammenfassend haben verschiedene Studien gezeigt, dass Veränderungen der Anzahlen von TFs die Expressionsstärken potenzieller Zielgene nur um ein bis zehn Prozent verändern.^[244,264-266]

In vitro Methoden oder Reporter-Assays scheinen bei der Erklärung der Genregulation durch TFs, zumindest bei höheren Eukaryoten, an ihre Grenzen zu stoßen. An der Transkriptionsmaschinerie sind viele *trans*- und *cis*-regulierende Elemente beteiligt, die bei den herkömmlichen Methoden unberücksichtigt bleiben und zu anderen Ergebnissen führen können. Deshalb scheint es sinnvoll zu sein, die Genregulation *in vivo* zu untersuchen.

1.3 *In vivo* Methoden zur Identifikation von regulatorischen *cis*-Elementen

Zur Untersuchung von einzelnen oder genomweiten *cis*-Elementen gibt es verschiedene Techniken (Abb. 45). Einige Methoden zur Identifikation von *cis*-Elementen beruhen auf der Annahme, dass regulatorische DNA-Regionen aus dekondensiertem Chromatin bestehen, um Proteinen der Genregulation die Bindung an die DNA zu ermöglichen. Mit dem DNase-I- oder dem Mnase- (*engl.* micrococcal nuclease) Hypersensitivitäts-Assay wird die DNA durch die entsprechenden Restriktionsenzyme nur an offenen DNA-Regionen verdaut, den DNase-I hypersensitiven Stellen (DHS). Die Enden der DNA-Fragmente können dann, u. a. durch Hochdurchsatzverfahren, sequenziert, identifiziert und mit Kontroll-DNA verglichen werden.^[267,268] Bei einer

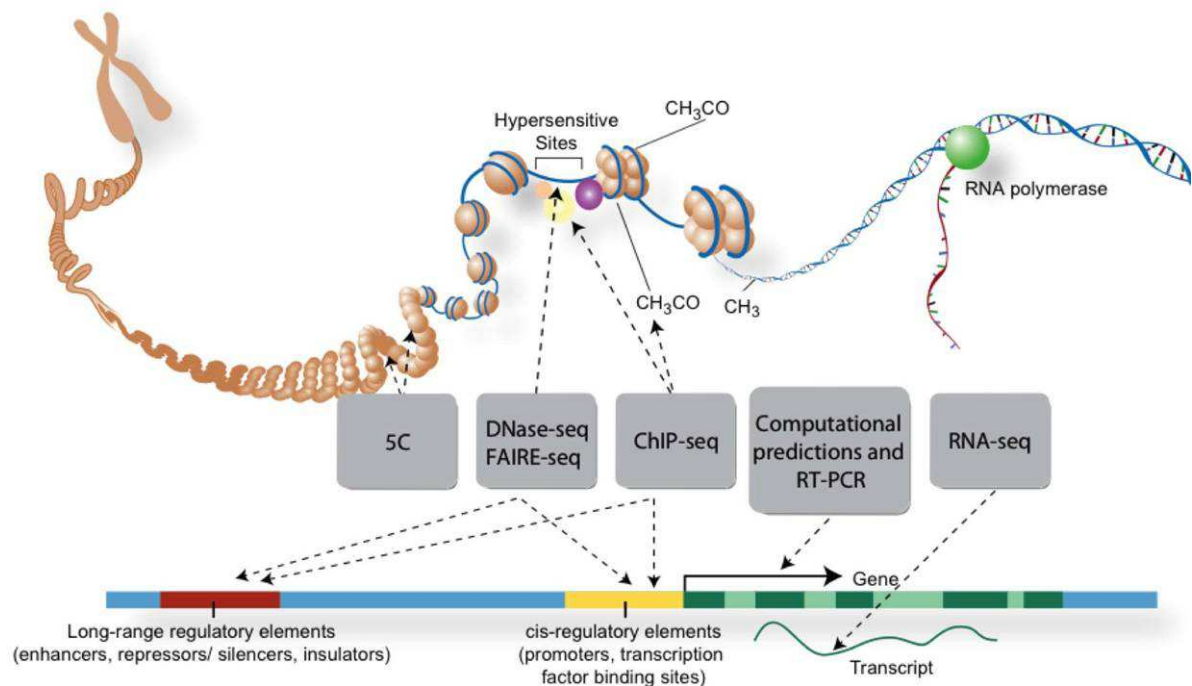


Abb. 45: Methoden zur Untersuchung der Genregulation

Für die Erforschung von *cis*-Elementen und deren regulatorischer Funktion auf die Transkription, werden verschiedene Hochdurchsatzverfahren angewendet. Damit lassen sich genomweite Untersuchungen durchführen, zu TF-DNA-Bindungen (ChIP-seq), DNA-DNA-Interaktionen (5C), zur Identifikation regulatorischer DNA-Elemente (DNase-seq, FAIRE-seq und Bioinformatik) und Genexpression (RNA-seq). Abb. verändert nach ENCODE Project Consortium (2004)^[13]; Darryl Leja (NHGRI), Ian Dunham (EBI) (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/index.html>)

ähnlichen Methode ohne Restriktionsenzyme, werden DNA und Proteine durch Formaldehyd vernetzt. Die DNA wird danach an Bereichen ohne gebundene Proteine geschert und durch Phenol-Chloroform wird die nackte DNA isoliert (FAIRE, engl. formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements).^[269] Die Anreicherung der erhaltenen DNA-Sequenzen wird mit Kontroll-DNA oder anderen Proben verglichen. Die Annahme, dass eine offene Chromatinstruktur die Transkription fördert, muss aber nicht zwangsläufig richtig sein.^[270,271] So wurden in humanen Erythrozyten an DHS zu gleichen Teilen aktive, sowie inaktive Gene identifiziert.^[272] Zusätzlich konnte in Studien mit humanen Zellen kaum eine Korrelation zwischen dem Grad der Hypersensitivität und der Expressionsstärke beobachtet werden.^[273,274] Der Nachteil dieser Technik gegenüber der ChIP-Methode liegt darin, dass lediglich offene Chromatinstrukturen nachgewiesen werden, nicht aber Interaktionen zwischen DNA und Proteinen. Ein Vorteil der Identifikation von DHS ist wiederum, dass im Genom nach allen *cis*-Elementen gesucht werden kann. Mit der ChIP-Methode lassen sich ausschließlich *cis*-Elemente identifizieren, an die der zu untersuchende TF gebunden hat.

Bei einer weiteren Methode zur Auffindung regulatorischer *cis*-Elemente werden posttranslationale Histonmodifikationen untersucht. Hierbei wird vermutet, dass bestimmte Modifikationen der N-terminalen Histonschwänze die Transkription regulieren.^[270,275] Viele dieser Histonmodifikationen können zur Umstrukturierung des Chromatins führen und beteiligen sich an der Regulation der Genexpression. Bereiche mit modifizierten Histonen können mit der nativen ChIP-Methode (N-ChIP) untersucht werden. Da die Nukleosomen relativ stabil an die DNA gebunden sind, ist eine Fixierung bei der N-ChIP nicht notwendig. Gegenüber einer ChIP mit Formaldehyd-Fixierung (X-ChIP) hat dies den Vorteil, dass Antikörper leichter an die Antigene binden können und dadurch erhöhte DNA-Mengen angereichert werden. Daher können bei dieser Methode geringere Mengen an Proben-DNA eingesetzt werden, als bei der X-ChIP.^[276] Allerdings funktioniert der N-ChIP nicht für schwächer gebundene TFs. Verschiedene Histonmodifikationen werden mit gezielten Veränderungen der Expressionsstärke in Verbindung gebracht, woraufhin ein Histoncode für die Regulation der Transkription vorgeschlagen wurde.^[277] Etablierte Marker bei der Aktivierung von Genen sind die Methylierung von Lysin-4 im Histon-3 (H3K4) in Promotoren und Enhancern, sowie Variationen von Histon-Acetylierungen und die Methylierung von Lysin-27 (H3K27).^[278-280] Aber bis jetzt konnte kein kompletter Mechanismus für die Korrelation von Histonmodifikationen und Transkription gezeigt werden. So gibt es in manchen Genen an der TSS gleichzeitig aktivierende (H3K4me3) und reprimierende (H3K27me3) Marker.^[281-283] Der Histoncode gibt also nicht unbedingt zuverlässige Aussagen über *cis*-Elemente wieder. Außerdem decken Untersuchungen von Histonen eher allgemeine Regulationsmechanismen auf, ähnlich wie bei der Transkriptionsinitiation, da die Nukleosomen sich im Grunde gleichen und von relativ wenigen Enzymen reguliert werden können. Dagegen werden die regulatorischen Netzwerke, die spezifische Expressionsmuster generieren, aus einem großen Pool von TFs gebildet, der sich stark in verschiedenen Spezies, Zelltypen und Entwicklungsstadien unterscheiden kann.

Der Vergleich der ChIP-Methode mit anderen Techniken zur Untersuchung der Genregulation hat zum einen gezeigt, dass *in vivo* Experimente (keine Zellkultur) unabdingbar sind, um die wirklichen Kontrollmechanismen der Transkription in Organismen in ihrer Gesamtheit aufzudecken. Zum anderen wurde dargelegt, dass die ChIP-Methode am besten geeignet ist, um zuverlässig genomweite *cis*-Elemente zu identifizieren. Ein Manko dieser Methode liegt hierbei in der Eingeschränktheit auf bestimmte *cis*-Elemente, abhängig vom TF bzw. vom Antikörper. Der Vorteil gegenüber den anderen Methoden besteht darin, dass konkrete Aussagen über Protein-DNA-Interaktionen gemacht werden können.

2 Betrachtung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Erste ChIP-Experimente wurden Mitte der 1980er Jahre durchgeführt.^[284,285] Dabei wurden einzelne DNA-Regionen durch Southern-Blot oder PCR auf Bindungen von Proteinen untersucht.^[213,286] Im neuen Millennium wurde ChIP-DNA erstmals im großen Maßstab durch DNA-Microarrays analysiert, dem ChIP-chip.^[287,288] Dieses Hochdurchsatzverfahren ermöglicht es, eine Vielzahl von DNA-Regionen gleichzeitig auf Proteinbindungen zu untersuchen.^[289] Allerdings können mit einem ChIP-chip letztendlich nur DNA-Regionen untersucht werden, die vom Chip vorgegeben werden. Deshalb wurde diese Technik hauptsächlich zur Erforschung von Promotor-Sequenzen eingesetzt.^[289-293] Erst die Hochdurchsatzsequenzierung von ChIP-DNA (ChIP-seq) ermöglichte es, das gesamte Genom auf Protein-DNA-Interaktionen zu durchsuchen.^[294] Dies war ein großer Schritt für die Erforschung distaler regulatorischer DNA-Elemente, die vorher schwierig zu identifizieren waren.

2.1 ChIP-Antikörper

Die ChIP-Methode ist die einzige Technik, um Interaktionen von *cis*- (TFBS) und *trans*-Elementen (TFs) *in vivo* zu erforschen. Allerdings ist die Anwendung dieser Technik auf funktionierende Antikörper limitiert. Beim Menschen gibt es, beruhend auf Analysen der genomischen Sequenz, ca. 1400 sequenzspezifische TFs.^[6] Aber über die Hälfte der Studien zu TFs in den PubMed- und GO-Datenbanken befassen sich lediglich mit drei TFs. Es gibt also wenige TFs, die ausführlich untersucht sind, wohingegen die Masse unzureichend oder gar nicht charakterisiert ist. Von 1052 TF-Genen, vorhergesagt durch InterPro-DNA-Bindungsdomänen,^[295] wurden lediglich für 62 TFs experimentell eine DNA-Bindung und eine regulatorische Funktion gezeigt.^[6] Die große Anzahl nicht charakterisierter TFs beruht u. a. auf die zu kleine Auswahl an Antikörpern, wodurch auch ChIP-Experimente eingeschränkt werden. Hinzu kommt, dass kommerzielle Antikörper hauptsächlich gegen Antigene in Säugern produziert werden. Hierdurch wird es noch schwieriger für evolutiv entfernte Spezies funktionierende ChIP-Antikörper zu finden. So konnte in dieser Arbeit nur bei zwei von neun kommerziellen Antikörpern eine Spezifität gegen ihre orthologen Antigene der Biene im Western-Blot nachgewiesen werden (C1.1). Von diesen beiden konnte nur beim ATF-2-Antikörper die Funktionalität in der ChIP gezeigt werden (C3.1). Dagegen scheinen die selbst hergestellten mono- und polyklonalen Creb-Antikörper im ChIP zu funktionieren (C3.3). Deren Spezifität wurde in Western-Blots und Kompetitions-Assays nachgewiesen, sowie histologisch für den Creb-mAk (C1.2.2). Warum der kommerzielle c-Jun-Antikörper in der ChIP nicht funktioniert hat, könnte verschiedene Gründe haben. Möglicherweise detektiert der Antikörper ein Epitop nur im denaturierten c-Jun-Protein, so wie es im Western-Blot vorliegt oder das Epitop könnte durch andere Proteine oder Konformationsänderungen mas-

kiert sein. Möglich wäre auch, dass der TF c-Jun gar nicht an die untersuchten DNA-Regionen gebunden hat.

2.2 Normalisierung der ChIP-Proben

Bei der Anwendung der ChIP-Methode könnte es wegen der relativ vielen Arbeitsschritte (B1.3) zu technisch bedingten Unterschieden zwischen den Proben kommen. Deshalb ist es sinnvoll die Proben zu normalisieren. Hierbei gibt es verschiedene Ansätze.^[296] So kann von einer ChIP-Probe das Hintergrundsignal subtrahiert werden.^[297] Das Hintergrundsignal wird von einer Probe gemessen, die aus der gleichen DNA-Probe wie die ChIP-Probe hergestellt wird. Jedoch wird bei der Immunopräzipitation kein Antikörper verwendet oder es wird ein Kontrollantikörper eingesetzt, der keine DNA bindenden Proteine detektiert, wie z. B. der IgG-Antikörper. Da die Mengen der Hintergrund-DNA relativ gering sind, kann es hierbei zu großen Schwankungen zwischen den Proben kommen. So sind in den IgG-Kontrollen (Hintergrund) der ChIP-Experimente mit ATF-2-Antikörpern am *Jun-like*-Promotor zwischen 43 und 265 DNA-Fragmente vorhanden (grafische Auswertung C3.1). Da in den ChIP-Proben ungefähr die hundertfache DNA-Menge enthalten war, würde eine Normalisierung durch Hintergrundsubtraktion kaum einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Dagegen könnte diese Art der Normalisierung das Ergebnis drastisch verändern, wenn die Mengen der angereicherten ChIP-DNA nur geringfügig größer sind als die Mengen der Hintergrund-DNA (Abb. 42). Daher scheint diese Methode der Probennormalisierung ungeeignet zu sein.

Eine andere Möglichkeit, die Proben zu normalisieren, besteht in der Berechnung der Ratio aus angereicherter ChIP-Probe zur Hintergrundkontrolle.^[298] Hierbei kann es zu den gleichen Fehlinterpretationen der Ergebnisse kommen, wie bei der Normalisierung durch die Subtraktion des Hintergrunds. Somit sollte die Hintergrundkontrolle nicht in den direkten Probenvergleich einberechnet werden. Sie sollte vielmehr mit der entsprechenden Probe verglichen werden, um die Signifikanz einer DNA-Anreicherung zu berechnen, so wie in dieser Arbeit.

Auch über konstante TF-Bindungen ließen sich ChIP-Proben normalisieren.^[299] Der zu untersuchende TF müsste bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen immer gleich stark an eine bestimmte TFBS binden. Die Bindungsintensitäten verschiedener ChIP-Proben an dieser Bindestelle würden gleichgesetzt werden und die Bindungsintensitäten an den zu untersuchenden TFBSs würden daran ausgerichtet werden. Diese Methode entspricht in etwa der Normalisierung, wie sie bei der Real-Time-qPCR angewendet wird. Hierbei wird die mRNA-Expression von Genen anhand der Expressionsstärke von Haushaltgenen normalisiert (B1.6). Der Vorteil bei der Normalisierung durch Kontroll-TFBSs wäre, dass technisch bedingte Unterschiede bei der Aufarbeitung von Proben und Kontrollen auszuschließen sind. Aber

die Schwierigkeit hierbei ist, solche Kontroll-TFBSs zu finden. An *in silico* TFBSs der Bienenhomologen der Haushaltsgene *EF1- α* (Gene ID: 544670, *similar to stripe*) und *GAPDH* (Gene ID: 410122, *similar to Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1 CG12055-PA, isoform A*), konnten mit den Antikörpern c-Jun, ATF-2 und Creb mit der ChIP-Methode keine DNA-Anreicherungen gemessen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine weitere Methode ist die Normalisierung einer ChIP-Probe auf die entsprechende Input-Probe, der DNA-Menge vor der Immunopräzipitation. Ein Nachteil hierbei wäre, dass Input- und ChIP-Proben getrennt aufgereinigt werden und es hierdurch zu Schwankungen in den DNA-Mengen kommen könnte. Da aber, bei der Bienen-ChIP, die DNA-Mengen der ChIP-Proben mit denen der Input-Proben korrelieren (C2.6), scheint diese Normalisierungsmethode zum jetzigen Zeitpunkt die am besten geeignete und zuverlässigste zu sein.

2.3 ChIP in Zellkulturen (*in vitro/ ex vivo*) und Organismen (*in vivo*)

ChIP-Experimente zur Untersuchung von TFBSs wurden bisher fast ausschließlich mit immortalisierten (*in vitro*) oder primären Zellkulturen (*ex vivo*) durchgeführt (siehe Einleitung, sowie Sakabe und Nobrega (2010)^[181] für Zusammenfassung). Zellkulturen können allerdings nur bedingt die regulatorischen Mechanismen wiedergeben, wie sie in nativen Organismen vorherrschen (*in vivo*). In einem Vergleich von *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen des Transkriptom von humanen lymphatischen Endothelzellen, hat der Großteil der Gene unterschiedliche Expressionsstärken aufgewiesen.^[300] In einer anderen Studie, mit Endothelzellen der Rattenlunge, konnten 41 Prozent von 450 untersuchten Proteinen aus dem Gewebe nicht in der Zellkultur nachgewiesen werden.^[301] Viele Unterschiede bei *in vivo* und *in vitro* Experimenten sind auf die Zellumgebung zurückzuführen. Bei *in vitro*, wie auch bei *ex vivo* Kulturen fehlen extrinsische Zellsignale, die in nativen Organismen durch andere Zellen oder Organe induziert werden. Bei einem Organ wie dem Gehirn spielt die zelluläre Umgebung eine besondere Rolle, da die Neuronen über Synapsen miteinander vernetzt sind. Durch afferente Signale kann die Genexpression einzelner Zellen oder ganzer Hirnregionen verändert werden.^[20] Sicherlich können viele grundlegende Mechanismen in Zellkulturen und Organismen übereinstimmen, aber besonders für die Aufklärung der regulatorischen Netzwerke von TFs scheint es unabdingbar zu sein, DNA-Bindungsereignisse von TFs im lebenden Organismus zu beobachten. Der Grund, warum die ChIP-Methode bisher kaum an Geweben angewendet wurde, liegt an den relativ großen DNA-Mengen, die für ein ChIP-Experiment benötigt werden.^[178,302] In den meisten ChIP-Protokollen werden 2×10^7 - 10^8 Zellen oder über 200 mg Gewebe benötigt.^[251,276,303-305] In der von mir entwickelten ChIP-Methode reichen bereits fünf Bienenhirne aus (B1.3, B1.5). Das entspricht ca. $2,1 \times 10^6$

Zellen^[306] oder 5,16 mg Gewebe (Ergebnis nicht gezeigt). Das ist 10 bis 50mal weniger Probenmaterial als bei den herkömmlichen ChIP-Methoden. Auch die Effizienz der Bienen-ChIP ist teilweise sehr hoch. In typischen X-ChIP-Experimenten werden im Verhältnis zur Kontroll-DNA (z. B. IgG-ChIP) zwei- bis zehnfache DNA-Anreicherungen erzielt.^[276,307,308] Zwar wurden in ChIP-Experimenten mit der Biene an einigen TFBSs ähnliche Anreicherungen gemessen (*Erka* und *Oa1*, Abb. 42), am *Jun-like* Promotor allerdings wurde die DNA mit ATF-2-Antikörpern ca. hundertfach angereichert (Abb. 36). Ein weiterer Vorteil der ChIP-Methode für die Biene ist, dass die Arbeitsschritte bereits nach eineinhalb Tagen abgeschlossen sind. In herkömmlichen ChIP-Protokollen werden drei bis vier Tage für die Versuchsdurchführung benötigt.^[178,309,310]

2.4 Untersuchung genomweiter TFBSs durch ChIP-seq

Die Identifikation von TFBSs im gesamten Genom ist erst seit wenigen Jahren durch die Analyse von ChIP-Proben mit DNA-Microarrays (ChIP-chip) oder Hochdurchsatzsequenzierungen (ChIP-seq) möglich. Wie zuverlässig die ChIP-seq ist, zeigen Vergleiche mit ChIP-qPCRs. Aus einer ChIP-seq mit HeLa-S3-Zellen^[232] wurden die TFBSs des TF STAT1 auf die Überlappung mit TFBSs aus ChIP-qPCRs zweier Studien mit den gleichen Zellen verglichen.^[279,311] Von 20 positiven Loci, getestet mit ChIP-qPCR, wurden 70 bis 85 Prozent Übereinstimmungen mit den ChIP-seq-Daten festgestellt, abhängig von der Definition der DNA-Bereiche. Von 42 negativen Loci der ChIP-qPCR waren 97 Prozent auch bei der ChIP-seq negativ. Aus der zweiten Studie deckten sich 97 Prozent von 13 positiven ChIP-qPCR-Loci mit den ChIP-seq-Daten. Dagegen sind die Übereinstimmungen der Atf-2-Bindungsstellen aus ChIP-seq und ChIP-qPCR des Bienengehirns geringer. So wurden von sieben TFBSs der ChIP-seq nur drei (43 %) durch ChIP-qPCR bestätigt (C3.3). Bei den positiven Loci der ChIP-qPCR stimmte allerdings die Ratio von UV- zu Weißlicht-Proben überein, verglichen mit den korrigierten Werten der ChIP-seq. Zwei Gene zeigten mit beiden Methoden keine Bindungsstellen (Tabelle 4). Warum aber gerade TFBSs der ChIP-seq mit relativ hohen Read-Anzahlen, wie bei *RasGef1b* (22 UV-Reads) und *Gucy1b3* (25 UV-Reads) (Tabelle 6), nicht durch ChIP-qPCR bestätigt wurden, könnte einfach auf die geringe Anzahl an Proben und Reads geschoben werden. So war die ChIP-seq auf maximal 50.000 Reads pro Probe ausgelegt, während in anderen ChIP-seq-Studien mehr als zwei bis 15 Millionen Reads ausgewertet wurden.^[232,294,312] Obwohl bei der Biene weniger Reads für eine Analyse von TFBSs benötigt würden, da die Größe des Bienengenoms etwa nur ein zehntel des menschlichen Genoms beträgt, müssten schätzungsweise immer noch eine Million Sequenzierungen durchgeführt werden, um gute (signifikante) Ergebnisse zu erzielen.

Zusammengefasst ist es mir gelungen eine ChIP-Methode für Hirngewebe der Biene zu etablieren und funktionierende Creb-Antikörper zur Anwendung der Methode herzustellen. Um technisch bedingte Probenabweichungen zu minimieren, habe ich eine Normalisierung über Input-Kontrollen eingeführt. Im Vergleich zu herkömmlichen ChIP-Methoden, ist das von mir entwickelte ChIP-Protokoll schneller in der Durchführung und effektiver in der DNA-Anreicherung. Der größte Vorteil meiner ChIP-Methode liegt darin, dass relativ kleine DNA-Mengen benötigt werden. Dadurch lässt sich die Genregulation durch TFs erstmals auch in kleineren Geweben *in vivo* studieren.

3 Genomweite Bindungsstellen von Atf-2 im Gehirn der Biene

Die ChIP-Experimente, insbesondere die ChIP-seq ($n = 1$), wurden mit kleinen Probenanzahlen (n) durchgeführt, weshalb die Ergebnisse teilweise statistisch nicht auswertbar sind. Daher dienen sie im Folgenden als Grundlage einer eher allgemeineren Diskussion.

3.1 Verteilung der Bindungsereignisse von Atf-2 im Genom

Untersuchungen zu DNA-Bindungen von TFs wurden bisher vorwiegend in Promotorregionen durchgeführt (siehe oben). In Einzellern könnte eine Regulation der Transkription über Promotoren ausreichend sein. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* z. B. sind regulatorische DNA-Elemente generell auf Upstream-Activation-Sequences (UAS) begrenzt, ein paar hundert Basenpaare upstream vom Promotor. Wird die UAS weiter distal relokalisiert, führt dieses zu einem Verlust der Genfunktion.^[313] Dagegen ist die Genregulation bei höheren Eukaryoten aufwändiger organisiert. So bestehen der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* aus ca. 1000 Zellen und der Mensch aus Billionen von Zellen. Beide Organismen besitzen aber in etwa die gleiche Anzahl Protein kodierender Gene, mit 20.000 bis 25.000. Damit ein so komplexer Organismus wie der Mensch entstehen kann, muss die Expression der Gene feiner abgestimmt werden, als es bei weniger komplexen Lebewesen notwendig ist. Eine Möglichkeit hierzu wird in höheren Organismen durch alternatives Splicing gegeben, bei dem aus einem Gen unterschiedlich funktionelle Proteine entstehen können.^[314] Eine weitere Möglichkeit wäre, die Expressionsmuster vielfältiger und feiner zu regulieren. Hierfür wird eine größere Anzahl von TFs benötigt, ebenso wie eine höhere Anzahl regulatorischer *cis*-Elemente, die sowohl im Promotor, als auch weit entfernt vom TSS liegen können. Zu Bindungsereignissen von TFs an distale *cis*-Elemente gab es bis vor kurzer Zeit nur wenige Studien, wie z. B. am Interferon- β -Enhanceosom, bei dem TF-DNA-Interaktionen *in vitro* und in Zellkulturen untersucht wurden.^[315,316] Erst durch Hochdurchsatzverfahren wie dem ChIP-chip, einem DNA-Microarray mit ChIP-DNA oder der ChIP-seq, wurden in den letzten Jahren vermehrt

TF-Bindungen im gesamten Genom untersucht. Im ENCODE-Projekt, bei dem über 200 experimentelle Datensätze zu einem bestimmten genomischen Bereich des Menschen analysiert werden (1 % des Genoms), wurde festgestellt, dass weniger als zehn Prozent der getesteten TFs mehr als 50 Prozent Bindungsseiten innerhalb von 2,5 Kilobasenpaaren vom TSS besitzen.^[180] Das bedeutet, dass bei höheren Eukaryoten eine primäre Bindung an Promotoren eher die Ausnahme als die Regel zu sein scheint. Bei der Biene gibt es zu TF-Bindungsereignissen keine umfassenden Studien, außer der *in silico* Identifikation von *cis*-Elementen in Promotorregionen.^[317]

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Verteilung von TF-Bindungsstellen (TFBSs) im Genom der Biene *in vivo* untersucht. Auffallend ist die überdurchschnittlich hohe Anzahl an Bindungen von Atf-2 in intergenetischen DNA-Regionen (83 - 88 %) und relativ wenig Bindungen in Promotorbereichen (1 - 2 %), im Vergleich zur normalen genomischen Verteilung der DNA-Regionen (9 % Promotor- und 56 % intergenetischer Anteil). Diese Unterschiede können zum Teil wegen der verwendeten Datensätze entstanden sein, denn während die natürliche genomische Verteilung von DNA-Elementen aus 10.157 Genen berechnet wurde, identifiziert durch den GLEAN-Algorithmus,^[16] wurde die genomische Verteilung der Atf-2-Bindungsseiten mit dem Amel_2.0 Datensatz (HGSC) ausgewertet, der 6626 unterstützte Genmodelle beinhaltet (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/bee/AmeGnomon.html>). Daher könnte es sein, dass die Anteile an Atf-2-Bindungsstellen in intragenetischen DNA-Bereichen (Exon und Intron) und Promotorbereichen in Wirklichkeit größer sind, da einige TFBSs in Genen lokalisiert sein könnten, die nicht in die Analyse einbezogen wurden. Hinzu kommt noch, dass nur Protein kodierende Gene analysiert wurden. Das ENCODE-Projekt hat viele neue nicht Protein kodierende Transkripte (z. B. nc-RNA, *engl.* non coding RNA) identifiziert, sowie eine Anzahl unbekannter TSS.^[180] Somit könnten sich zusätzlich „intergenetische Enhancer“ als proximale *cis*-Elemente in Promotoren entpuppen. Aber selbst wenn die Verteilung der Atf-2-Bindungsstellen im Bienengenom mit der doppelten Anzahl von Genen berechnet wird, dominiert der Anteil an intergenetischen Bindungsstellen immer noch. Dagegen haben andere CHIP-Studien mit Zellkulturen gezeigt, dass bestimmte TFs ausschließlich am proximalen Promotor binden. In einem Tiling-Array (genomweiter CHIP-chip) mit immortalisierten humanen Epithelzellen wurde nachgewiesen, dass innerhalb einer 30 Mb DNA-Region über 80 Prozent der TFBSs des TF E2F1 im Kernpromotor liegen.^[318] Aber wie beim ENCODE-Projekt haben auch andere Studien mit unterschiedlichen Säugerzellen gezeigt, dass viele TFs eher distal vom TSS binden als in der Promotorregion.^[13,180,289,318-320] Beim TF ER z. B. liegen nur vier Prozent von 3665 Bindungsstellen innerhalb von ein Kilobasenpaaren um die

TSS^[319] und FoxA1 zeigt nur drei Prozent Bindungsereignisse am proximalen Promotor.^[321]

Die Bindungshäufigkeiten in Introns liegen bei den TFs NRSF,^[294] p53,^[322] Nanog^[250] und FoxA1^[321] zwischen 31 und 36 Prozent, gemessen am gesamten Genom. Dieser Anteil ist bei der Biene mit sieben bis acht Prozent um einiges geringer (Abb. 38). Wie oben erwähnt könnte sich dieser Anteil erhöhen, wenn mehr Gene in die Analyse einbezogen werden. Des Weiteren könnte der deutlich höhere Anteil von Bindungen in Introns bei Säugern dadurch zustande kommen, dass der genomische Anteil der Introns beim Menschen mit 37,2 Prozent (berechnet nach Sakharkar (2004)^[323]) größer ist als bei der Biene (29 %).

Der Anteil der TFBSs in Promotoren und intergenetischen DNA-Bereichen ist schwieriger zu vergleichen, da die Promotorgrößen in vielen Studien unterschiedlich definiert wurden oder nur der Anteil weit entfernter TFBSs berechnet wurde.^[250,312,322,324,325] So kann es hierdurch zu größeren Unterschieden zwischen den Studien kommen, was den nicht intragenetischen Anteil der TFBSs betrifft. STAT1 z. B. hat 26 Prozent intergenetische Bindungsstellen^[232] und FoxA1 52 Prozent.^[321]

Letztendlich aber, ist ein Vergleich der Atf-2-Bindungsverteilung in der Biene mit anderen Studien schwierig. So gibt es zum Einen große Unterschiede im genomischen Anteil der Junk-DNA, die beim Menschen um die 50 Prozent liegt und bei *Drosophila* bei drei Prozent.^[326] Außerdem hat sich gezeigt, dass die genomischen Verteilungen von TFBSs sich zwischen den TFs stark unterscheiden können (siehe oben). Des Weiteren können unterschiedliche Bindungsereignisse auf evolutive Änderungen der *cis*- wie auch der *trans*-Elemente beruhen, denn viele Bindungsereignisse sind Spezies spezifisch (siehe oben).^[182,246,248,249,251,254] Zuletzt gibt es die bereits erwähnten Unterschiede zwischen Geweben und Zellkulturen, wobei hauptsächlich die letzteren für Untersuchungen von TFBSs verwendet wurden.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass Atf-2, wie zahlreiche andere TFs, weit gefächert im Genom bindet und nur zu einem geringen Anteil an Promotorregionen. Das könnte bedeuten, dass Zielgene durch Atf-2 vornehmlich über distale *cis*-Elemente reguliert werden.

Bei der Betrachtung von Stress induzierten Atf-2-Bindungen an die DNA ist zwischen Weißlicht- und UV-Proben kaum ein Unterschied bei der Verteilung der Atf-2-Bindungsstellen zu erkennen. Nur in Exons scheint Atf-2 nach UV-Strahlung weniger häufig zu binden, dafür etwas mehr im intergenetischen Bereich. In einer CHIP-seq mit HeLA-S3-Zellen wurde die Bindung von STAT1 untersucht.^[232] Im Vergleich von unstimulierten Zellen zu Interferon-Gamma stimulierten Zellen, nahm zwar die Anzahl der Bindungsstellen insgesamt um das Vierfache zu, aber die Verteilung der inter- und intragenetischen Bindungsstellen im Genom hat sich nicht verändert. Das könnte darauf hin deuten, dass aktivierte TFs wie Atf-2 oder STAT1 die Gene nicht

regulieren, indem sie abhängig vom Stimulus einmal an proximale und ein anderes Mal an distale DNA-Elemente binden, sondern einen grundlegenden Mechanismus zur Transkriptionskontrolle befolgen. Weiteren Aufschluss hierzu könnte die Betrachtung von Bindungsereignissen an Genen und bestimmten DNA-Sequenzen geben.

3.2 Bindung von Atf-2 an Gene und TFBSs nach UV-Strahlung

Die transkriptionelle Aktivität von ATF-2 wird insbesondere über Phosphorylierungen durch die Stress aktivierten Kinasen JNK (Jun N-terminale Kinase)^[146-148] und p38^[149] induziert. Stress-Stimuli, welche diese Kinasen aktivieren, wie pro-inflammatorische Cytokine, UV-Strahlung, DNA-Schädigung oder ROS (*engl.* reactive oxygene species), sind auch die klassischen Stimuli zur Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von ATF-2.^[145] DNA-Bindungen von ATF-2 wurden vor allem durch Reporter-Assays an einzelnen Genen untersucht.^[240,327] Eine groß angelegte Bindungsstudie wurde von Hayakawa et al. (2004) durchgeführt, mit einem ChIP-chip aus Promotor-Sequenzen von 3083 Genen.^[155] Nachdem humane BT474-Brustkarzinoma-Zellen durch Cisplatin mit genotoxischem Stress (DNA-Schädigung) induziert wurden, wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 180 Gene stärker von phosphoryliertem ATF-2 gebunden und acht Gene schwächer. Dagegen gab es nach Cisplatin-Behandlung für nicht phosphorylierten ATF-2 viele Bindungsereignisse, die dem Bindungsprofil bei unbehandelten Zellen (Mock) glichen. Da sowohl bei Mock-, wie auch bei Cisplatin-Proben die Bindungsprofile von nicht phosphoryliertem ATF-2 dem des phosphoryliertem ATF-2 ähnelten, liegt die Vermutung nahe, dass bereits nicht phosphoryliertes ATF-2 an die TFBSs bindet und nach Phosphorylierung transkriptionelle Aktivität erlangt. Weitere Belege hierfür, dass ATF2 immer am Chromatin gebunden ist, werden zwar von den Autoren angegeben,^[14,328,329] allerdings wurde in keiner dieser Studien die Bindung von ATF-2 an die DNA untersucht. So haben die zitierten Cavigelli et al. (1995)^[328] die Translokation von MAPKs vom Zytoplasma in den Kern untersucht und Kalodimos et al. (2004)^[329] haben allgemeine Konformationsänderungen von DNA bindenden Proteinen an spezifische und unspezifische Bindungsstellen verglichen. Somit scheinen diese Studien schwache Argumente für konstitutive DNA-Bindungen von ATF-2 zu sein. Dafür wurde in einem ChIP-Experiment gezeigt, dass in HeLa-Zellen nach Entzug der Aminosäure Leucin die mRNA-Expression des *CHOP*-Gens (*C/EBP homologes Protein*) ansteigt.^[330] Während ATF-2 mit und ohne Leucin konstitutiv an den *CHOP*-Promotor bindet, verstärkt sich die Bindung von Phospho-ATF-2 (Thr71) nach Leucin-Entzug, parallel mit einem Anstieg der mRNA-Expression. Dagegen scheint die Atf-2-Bindung bei der Biene nicht konstitutiv zu sein. So wurden in der ChIP-seq durch Atf-2 nur zwei von 143 Bindungsstellen sowohl nach Weißlicht, als auch nach UV-

Strahlung gebunden (Abb. 39b). Ebenso unterscheiden sich die Atf-2-Bindungsprofile an Genen, bei denen die meisten Gene nur nach Weißlicht- oder nur nach UV-Strahlung gebunden wurden (Abb. 39a). Darüber hinaus stieg der Anteil der Atf-2-Zielgene nach UV-Behandlung um das 6,2fache an. Das könnte darauf hinweisen, dass Atf-2 nicht konstitutiv an die DNA bindet und dort aktiviert wird, wie von Hayakawa postuliert, sondern dass der TF aktiviert wird um an die DNA binden zu können. Li und Green (1996) haben *in vitro*, sowie durch Reporter-Assays mit ATF-2-Mutanten gezeigt, dass die DNA bindende bZIP-Domäne (*engl.* basic leucine zipper) an die Aktivierungsdomäne bindet und ATF-2 hierdurch intramolekular inhibiert wird.^[142] Zusammen mit anderen Studien die *in vitro* gezeigt haben, dass die Aktivierungsdomäne die Bindung des TF an die DNA inhibieren kann,^[331] lässt sich vermuten, dass durch eine Phosphorylierung von ATF2 durch Stress aktivierte Proteinkinasen (MAPK)^[145,147,148] oder durch andere Proteininteraktionen^[332-335] die intramolekulare Bindung zwischen bZIP- und Aktivierungsdomäne aufbricht und ATF-2 aktiviert wird, so dass er an die DNA binden kann. Des Weiteren haben Liu et al. (2006) gezeigt, dass der Großteil an ATF-2 in unstimulierten murinen F9-Teratocarcinoma-Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist und durch den Stress-Stimulus UV-Strahlung in den Zellkern translokalisiert.^[153] Dabei konnte u. a. durch Deletion bestimmter Aminosäure-Sequenzen gezeigt werden, dass ATF-2 ein Nukleus-Export-Signal (NES) und zwei Nukleus-Lokalisations-Signale (NLS) besitzt. Hierdurch werden Homodimere von ATF-2 in unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert und Monomere wandern zwischen Kern und Zytoplasma. Bildet ATF-2 ein Heterodimer mit c-Jun, steigt der Anteil von nuklearem ATF-2 stark an, wie durch bimolekulare Fluoreszenz-Komplementierungs-Assays (*engl.* BiFC) demonstriert wurde. Zusammenfassend könnte die transkriptionelle Aktivität von Atf-2 auf verschiedene Weisen reguliert werden. Einerseits könnte DNA gebundenes Atf-2 über Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert werden, andererseits könnte auch die Bindung von Atf-2 an die DNA durch die Regulation des Kerntransports oder durch intramolekulare Inhibition gesteuert werden.

3.3 Ontologie nach UV-Strahlung

UV-Strahlung ist bei Säugern essentiell für die Produktion von Vitamin D, zuviel Strahlung kann aber zu Hautkrebs und Hautalterung führen.^[336-338] UV-Strahlung wird in Spektren unterschiedlicher Wellenlänge eingeteilt. UVC (240 – 290 nm) besitzt die höchste Energie und wird in vielen Experimenten angewendet. Physiologisch ist dieses Spektrum weniger bedeutend, da die kurzwellige Strahlung von der Ozonschicht absorbiert wird. Hauptsächlich erreicht die Erde UVB (290-320 nm) und UVA (320-400 nm). Während UVC stark von der DNA absorbiert wird und diese schädigt, nehmen die DNA-Absorption und damit die direkte Schädigung bei länger

welliger UVB-Strahlung ab. UVA wird nur noch schwach absorbiert.^[339] UVA schädigt die DNA indirekt, indem durch Photosensibilisierung reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *engl.* reactive oxygene species) und reaktive Nitrogenspezies (NOS) gebildet werden. Diese Radikale können zu Strangbrüchen und Mutationen in der DNA führen.^[340-348] Solche Schäden rufen in Zellen die so genannte UV-Antwort hervor, die Zellzyklus, DNA-Reparatur und Stressantwort betrifft, um über Apoptose, Zellüberleben oder Bildung von Malignomen (bösartiger Tumor) zu entscheiden (zusammengefasst in Ridley (2009)^[219] und Herrlich (2008)^[349]). Die Determination der Zelle zu Proliferation, DNA-Reparatur oder programmiertem Zelltod durch UVA-Strahlung ist dosis- und zeitabhängig und wird u. a. auch durch die Expression von Genen reguliert. So haben He et al. (2004)^[218] die mRNA-Expression in humanen Keratinozyten nach UVA-Strahlung untersucht. Vornehmlich wurden Gene differentiell exprimiert die an Apoptose, Zellzyklus und DNA-Reparatur beteiligt sind.

Da UV-Strahlung über DNA-Schädigung oder generierte ROS alle drei MAPK-Signalwege (JNK, p38 und ERK) aktivieren kann,^[350-354] wurde insbesondere UVC, durch das auch die MAPKs induziert werden können,^[146-149,355-357] zur Aktivierung von ATF-2 verwendet.^[153,201,240,357-359] Die bekannten Zielgene von ATF-2 überschneiden sich daher auch mit denen der UV-Antwort. Bhoumik et al. (2007)^[12] haben diese zusammengefasst. Hierzu gehören Gene der Stress- und DNA-Schädigungsantwort, Gene die an Wachstum und Tumorgenese beteiligt sind, sowie Gene zur Aufrechterhaltung der Homeostase. In dem ChIP-chip von Hayakawa et al. (2004)^[155] mit humanen BT474-Brustkrebszellen, bei denen genotoxischer Stress induziert wurde (siehe oben), sind als Zielgene von aktiviertem ATF-2 (phospho-Thr71) u. a. Regulatoren der Apoptose, sowie Gene der DNA-Reparatur identifiziert worden. Wie die ChIP-seq bei der Biene eine Stunde nach 30minütiger UVA-Strahlung (365 nm) zeigt, hat Atf-2 im Vergleich zur Weißlicht-Kontrolle vermehrt an Gene der Stressantwort (1,64fach) gebunden, ebenso wie an Gene, die am Zelltod involviert sind (1,40fach). Gene, die an Zellproliferation (0,56fach), Zellwachstum (0,49fach) und Zellzyklus (0,46fach) mitwirken, wurden weniger gebunden (C3.2.2.3 und Tabelle 8). In Versuchen mit verschiedenen Tumorzelllinien wurde für ATF-2 vor allem eine Beteiligung an Zellproliferation und Zellzyklus beobachtet und damit verbunden bei der Tumorentwicklung, sowie bei Apoptose.^[327,360-365] Hierbei kann ATF-2 als Oncogen^[362,364,366,367] oder als Tumor-Supressor wirken.^[368,369] Die Regulation von Zelltod, Überleben oder Proliferation ist letztendlich abhängig vom Stimulus, der Dosis und der Dauer, sowie dem Zelltyp.^[370-373] Auch in Nervenzellen wurde beobachtet, dass ATF-2 zum Überleben oder zur Apoptose beitragen kann.^[374-376]

Im Bienengehirn wurden nach UV-Stress die gleichen Gruppen von Zielgenen durch Atf-2 angesprochen, wie in Experimenten mit Zellkulturen. Aussagen darüber, wie Atf-2 die Gene reguliert, lassen sich dabei nicht machen. Hierfür müssen zusätzlich

zu den Bindungsereignissen die Expressionsstärken der Zielgene untersucht werden.

4 Regulation der mRNA-Expression durch DNA-Bindungen von Transkriptionsfaktoren nach UV-Strahlung

4.1 mRNA-Expression nach UV-Strahlung

Atf-2 hat nach UV-Strahlung an die Promotoren von *Jun-like* und *Erka*, sowie in einem Intron von *Dop3* gebunden, sowohl in der ChIP-seq, als auch in der ChIP-qPCR (Tabelle 6). Hierbei war allerdings nur die Bindung an *Jun-like* signifikant (Abb. 36a). Ebenso wie ATF-2 (siehe oben) beteiligen sich auch DOP3, c-Jun und ERK-1/2 an der Stressantwort, Zelltod und/oder -überleben. In Neuronen z. B. wird nach Stress die Signaltransduktion über die MAPKs ERK-1/2 (Extrazelluläres Signal regulierte Kinase) aktiviert, welche auf Apoptose, Proliferation und Zellzyklus wirken kann. (zusammengefasst in Rubinfeld und Seger (2005)^[377], Grewal et al. (1999)^[378]). C-Jun, der häufigste TF des Dimers Aktivator-Protein-1 (AP-1), wird ebenfalls nach Stress reguliert und beteiligt sich u. a. an der Regulation von Neuroprotektion oder -degeneration. (zusammengefasst in Herdegen und Waetzig (2001)^[379], Raivich und Behrens (2006)^[380]). Der Dopamin3-Rezeptor (DOP3) gehört zu den D2-ähnlichen Dopaminrezeptoren. Dessen Rolle in der Signaltransduktion nach Bindung des Neurotransmitters Dopamin ist mit lokomotorischer Aktivität, Entwicklung und möglicherweise mit Plastizität im Gehirn und im Verhalten verknüpft. Einige Studien zeigen aber auch eine Beteiligung an der Stressantwort und Neuroprotektion (zusammengefasst in Bogomolova et al. (2010)^[381], Beggs et al. (2005)^[382], Bozzi und Borrelli (2006)^[383]). Da die drei untersuchten Gene ebenso wie ATF-2 an der Stressantwort beteiligt sein können, wäre eine Regulation der Genexpression durch Atf-2 nachvollziehbar. Bezüglich ERK-1/2 und DOP3 sind mir keine Studien darüber bekannt, dass ATF-2 an diese Gene bindet. Gut untersucht dagegen ist die Bindung von ATF-2 an den humanen *Jun*-Promotor. Van Dam et al. (1993)^[384] haben durch *in vitro* Bindungsstudien gezeigt, dass das Heterodimer c-Jun/ATF-2 nach Stimulation mit dem Adenovirus E1A-Protein an den *Jun*-Promotor bindet. Ebenso bewirkt UVC-Strahlung *in vitro* die Bindung des Dimers an den *Jun*-Promotor.^[145,240] Durch Reporterkonstrukte wurde weiterhin demonstriert, dass *Jun* nach UV-Strahlung exprimiert wird. Hierbei haben Gelshift-Experimente gezeigt, dass die transkriptionelle Antwort durch zwei Promotor-Elemente *jun1* und *jun2* vermittelt wird, die bereits ohne UV-Induktion konstitutiv gebunden werden. Auch in dem ChIP-qPCR-Experiment mit der Biene hat Atf-2 gleichermaßen nach Weißlicht und UV-Strahlung an den *Jun-like*-Promotor gebunden (Abb. 36a). Da ATF-2 konstitutiv an die DNA bindet, die mRNA-Expression von *Jun* nach UVC aber verstärkt

wird, vermuten Van Dam et al. (1995)^[145] und Herr et al. (1994)^[240], dass an die DNA gebundenes ATF-2 posttranslational modifiziert und somit transkriptionell aktiviert wird. Eine andere Studie hat durch Microarrays, als auch durch Real-Time-qPCR gezeigt, dass die Expression von *Jun* in humanen Keratinozyten nach UVA-Induktion, schnell und lange anhaltend (0, 6 und 24 h), um das zwei- bis achtfache gesteigert wird.^[218] Bei der Biene dagegen konnte ich in einem ähnlichen Zeitraum keine gesteigerte Expression nach UVA-Strahlung feststellen. Eine weitere Studie hat ebenfalls die mRNA-Expression von *Jun* in Keratinozyten untersucht. Dabei wurde zwar nach UVB-Strahlung eine verstärkte *Jun*-Expression beobachtet, nicht aber nach UVA-Strahlung.^[385] Hierbei muss beachtet werden, dass hier A431-Zellen verwendet wurden und in der vorherigen Studie HaCaT-Zellen. Hierdurch könnten die Unterschiede in der Genexpression entstanden sein. Die Expressionsanalysen weiterer Gene haben gezeigt, dass die Stärke der Expression von Art der Strahlung, Dosis und Zeit abhängig ist. Diese Beispiele verdeutlichen die Komplexität der Genregulation und die Schwierigkeit allgemeine Regeln aufzustellen, da bereits kleine Veränderungen in der Versuchsanordnung zu differentiellen Expressionsprofilen führen können.

4.2 Regulation der Genexpression durch TF-Bindungen an die DNA

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression interessierten Zusammenhänge mit biologischen Funktionen zunächst nur nebensächlich. Vielmehr sollte die Wirkung von TF-Bindungen auf die Genexpression analysiert werden. Bei allen drei Genen, *Jun-like*, *Dop3* und *Erka*, wurden keine Unterschiede in der mRNA-Expression nach Weißlicht und UV-Strahlung festgestellt (Abb. 43). Die mRNA-Expression korreliert mit der Atf-2-Bindung bei den Genen *Dop3* und *Jun-like*, bei denen die Intensität der Bindungen nach UV-Strahlung fast unverändert bleibt (ChIP-qPCR und korrigierte ChIP-seq, Tabelle 1). Bei *Erka* dagegen bindet Atf-2 erst nach UV-Strahlung an die DNA (Abb. 41, Abb. 42), während die mRNA-Expression zu diesem und späteren Zeitpunkten unverändert bleibt. Andere Untersuchungen zur Korrelation von TF-Bindungen und Expressionsstärken zeigen unterschiedliche Ergebnisse. In *C. elegans* z. B. korreliert die Bindung des TF PHA-4 mit der Expression der Zielgene.^[386] Eine Folgestudie hat hierzu die DNA-Bindungen durch ChIP-seq und die mRNA-Expression durch RNA-seq im größeren Maßstab untersucht.^[387] Hierbei bewirkte die Bindung von PHA-4 bei 87 Prozent der Zielgene eine verstärkte Expression und eine Abnahme der TF-Bindungsereignisse reduzierte die Expression bei 60 Prozent der Zielgene. Ebenso korrelierte in Säugerzellen die DNA-Bindungen von NRSF mit relativ niedrigen Expressionsstärken der Zielgene.^[294] Weitere Studien zeigten in Säugerzellen eine direkte Korrelation von DNA-Bindungen der TFs PXR und CaRF mit der Genexpression.^[388,389] Dagegen haben andere Studien in *Drosophila* und

humanen Zellen viele Bindungsereignisse des TF Myc und weiteren Proteinen der dMAX-Familie im Genom festgestellt, die nicht unbedingt mit der Regulation der nahe gelegendsten Gene korrelierten.^[261,390] Auch bei einer ChIP-seq zu MyoD in skeletalen Muskelzellen zeigten die meisten Bindungsereignisse keine direkte Assoziation mit der Genregulation.

Warum bei der mRNA-Expression von *Erka* und den DNA-Bindungen von Atf-2 oder Creb keine Korrelation vorliegt, kann im speziellen Fall nicht genau geklärt werden. Mögliche Ursachen gibt es viele. So wird die Expressionsrate der mRNA durch verschiedene Mechanismen beeinflusst. Außer durch die Transkription, kann die Genexpression über alternatives Spleißen, Kernexport und den Abbau von RNA-Transkripten reguliert werden (Zusammengefasst in Moore (2005)^[391] und Keene (2007)^[10], Abb. 46).

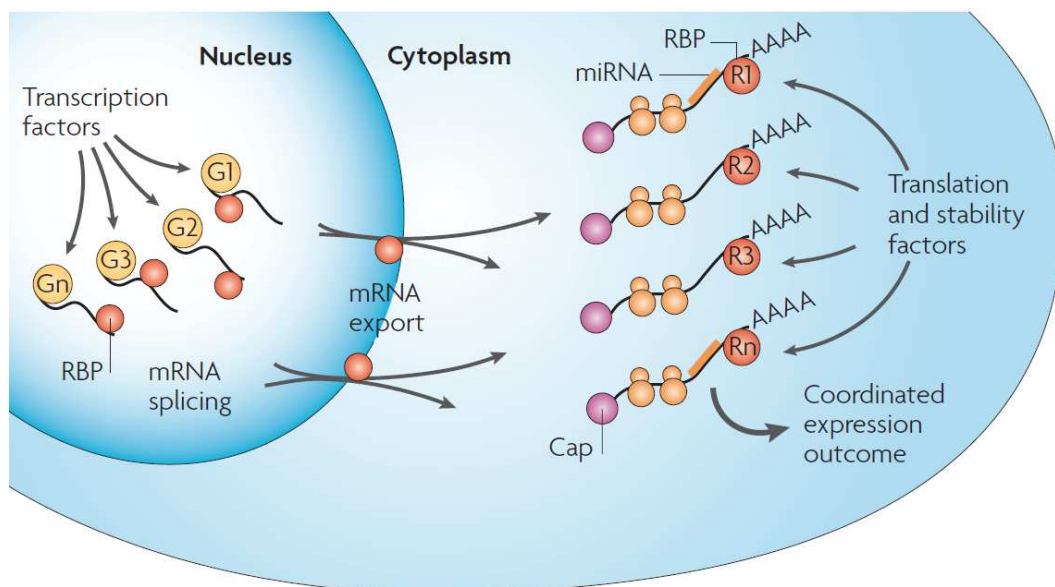


Abb. 46: Regulation der mRNA-Expression

TFs kontrollieren die Transkription von Genen (G1-Gn). Während diese noch transkribieren, werden die zu bildenden mRNAs durch RNA-bindende-Proteine (RBPs) gebunden, gespleißt und in das Zytoplasma exportiert. Dort wird die Stabilität u. a. durch miRNAs (microRNA) und die RBPs (R1-Rn) kontrolliert. Abb. aus Keene (2007)^[10]

Beim alternativen Spleißen, das bei allen Eukaryoten verbreitet ist, auch bei Invertebraten,^[392] können verschiedene Exons eines Gens zu unterschiedlichen mRNAs zusammengesetzt werden. (zusammengefasst in Keren et al. (2010)^[393] und Wahl et al. (2009)^[394]. Alternatives Spleißen könnte sich auf die Korrelation von TF-DNA-Interaktionen verstärken, indem z. B. ein Gen als Folge von TF-DNA-Interaktionen verstärkt transkribiert wird, aber ein alternatives mRNA-Transkript gespleißt wird, das von den spezifischen Primern nicht gebunden werden kann und daher mittels PCR nicht nachweisbar ist. Diese Möglichkeit der Genregula-

tion muss bei der Interpretation der mRNA-Expression berücksichtigt werden, mit Ausnahme beim *Jun-like*-Gen, das nur ein Exon besitzt. Eine Alternative würde die Detektion aller RNA-Transkripte anbieten, wie z. B. bei der Nuclear-run-on-Transcription-Methode.^[395] Hierbei werden markierte Nukleotide in die frisch transkribierte RNA eingebaut.

Der Kernexport von mRNA-Produkten könnte Einfluss auf die Expressionsanalyse nehmen, wenn nur zytoplasmatische Fraktionen untersucht würden. Da aber die gesamte RNA extrahiert wurde, spielt der Kerntransport bei der mRNA-Analyse keine Rolle.

Dagegen kann die Regulation des mRNA-Abbaus entscheidend in die Genexpression eingreifen (zusammengefasst in Parker und Song (2004)^[396]). So gibt es in vielen RNAs der Immediate-early-Genes (IEG), zu denen auch *JUN/Jun-like* gehört, Uridylat-reiche-Elemente (ARE). An diese können RNA-bindende-Proteine binden und zur Degradation der RNA führen.^[397] In verschiedenen Zellkulturen wurde demonstriert, dass IEG-mRNAs, u. a. auch *c-Jun*, eine hohe Instabilität besitzen und schnell abgebaut werden.^[397,398] So besitzt die mRNA von *c-Jun* eine normale Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten.^[399] Da die Transkription der IEG nach kurzer Aktivierung normal transient ist und die RNA extrem instabil ist,^[395,400,401] könnte es sein, dass eine verstärkte mRNA-Expression zu den gemessenen Zeitpunkten bereits abgeklungen ist. In Fibroblasten von Mäusen wurde gezeigt, dass nach UVC-Strahlung die mRNA-Expression von *c-Jun* nach 20 Minuten stark erhöht ist, aber nach einer Stunde und 40 Minuten wieder den Normalzustand erreicht hat.^[402] Des Weiteren hat diese Studie in NIH-3T3-Zellen demonstriert, dass UVC-Strahlung in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer, die Stabilität von *c-Jun*-mRNA-Transkripten erhöht. Möglicherweise könnte eine verstärkte mRNA-Expression nicht auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen sein, sondern auf eine erhöhte Stabilität der Transkripte.

Weitere Möglichkeiten zur Interpretation der Korrelation von mRNA-Mengen und TF-Bindungsereignissen sind bei der Regulation der Transkription zu suchen. Hierbei stellt sich u. a. die Frage, ob Gene nur durch einen TF reguliert werden oder durch die Kooperation mehrerer TFs. In embryonale Stammzellen von Mäusen wurden mit einer ChIP-seq die Bindungen der TFs OCT4, SOX2, und NANOG genomweit untersucht.^[239] Hierbei wurde der Co-Faktor p300, eine Histonacetyltransferase (HAT) die an der Aktivierung von Genen beteiligt ist,^[403-405] nur an wenigen DNA-Regionen detektiert, an die alle drei TFs gebunden hatten. Diese Studie unterstützt die Hypothese, dass ein einzelner TF (OCT4) keinen funktionellen Effekt hat. Gleichzeitige nahe gelegene Bindungen durch andere TFs (SOX2 und/oder NANOG) können aber die Rekrutierung des Co-Faktors p300 und damit die transkriptionelle Aktivierung des Zielgens bewirken. Eine solche Regulation wäre auch für Atf-2 denkbar. Es ist be-

kannt, dass ATF-2 mit verschiedenen TFs der ATF/CREB- und der FOS/Jun-Familien dimerisiert und dadurch eine unterschiedliche Genregulation bewirkt.^[133,151,154,406] So könnte Atf-2, induziert durch UV-Strahlung, mit einem anderen TF dimerisieren und an die DNA binden, reguliert durch den Kerntransport.^[153] Atf-2 könnte hierdurch an manchen Genen die Transkriptionsrate ändern und an anderen nicht, abhängig vom Dimerisierungspartner und/oder von anderen co-lokalisierten TFs. Des Weiteren könnte die Bindung von Atf-2 nur in bestimmten Zelltypen eine regulatorische Funktion ausüben. In nicht neuronalen Zellen z. B. könnte Atf-2 durch Kooperation mit einem anderen TF regulatorisch auf die Genexpression wirken, während in neuronalen Zellen der andere TF nicht exprimiert oder aktiviert wird und die Bindung von Atf-2 somit wirkungslos bleibt. Hinweise für solch eine Zelltyp spezifische Genregulation kommen aus einer Expressionsstudie von TFs in 32 menschlichen Organen und Geweben.^[6] Dabei wurden TFs in zwei Gruppen eingeteilt. 161 TFs wurden in allen oder den meisten Geweben ähnlich stark exprimiert (ubiquitäre TFs) und 349 TFs wurden selektiv in wenigen oder nur in einzelnen Geweben exprimiert (spezifische TFs). Atf-2 gehört zu den ubiquitär exprimierten TFs.^[137] Diese Klasse von TFs könnte generelle zelluläre Prozesse regulieren, die spezifischen TFs dagegen Zelltyp spezifische. So wäre es denkbar, dass die Bindung von Atf-2 nach UV-Strahlung an *Erka* in den meisten Geweben dessen Expression aktiviert, im Gehirn aber würde hierfür ein zusätzlicher spezifischer TF benötigt.^[407] Solch eine Regulation wurde bereits beim Serum-Response-Factor (SRF) beobachtet. Dieser wird ubiquitär exprimiert, und ist in verschiedene Prozesse wie Proliferation und Differenzierung involviert.^[408-411] Eine CHIP-chip-Studie hat gezeigt, dass SRF an eine Große Anzahl von DNA-Loci bindet, und dass Zielgene aktiviert werden, wenn SRF mit anderen spezifisch exprimierten TFs kombiniert wird.^[412,413] So ist z. B. die Determination von glatten Muskelzellen abhängig von der SRF-Kombination mit den TFs NFAT und HERP1,^[414,415] während bei der Prostata-Differenzierung und -Funktion die Interaktion mit NKX3-1 notwendig ist.^[416]

Ein weiteres Beispiel für kooperative Genregulation wurde für ATF-2 am Interferon- β (IFN- β)-Enhanceosom demonstriert.^[316] Neben dem Dimer ATF-2/c-Jun binden hierbei kooperativ sechs weitere TFs in einer IFN- β -Promotorregion von 55 Basenpaaren, um die Transkription zu aktivieren.^[315] Der Enhancer operiert dabei als Koinzidenz-Detektor. Signale, welche nur einzelne dieser TFs induzieren, reichen nicht aus, um die Transkription des Gens zu aktivieren. So wurde *in vitro* durch biochemische Analysen und EMSA gezeigt, dass ATF-2/c-Jun kooperativ mit IRF-3 an den Enhancer bindet und diese Bindung vorrangig durch Protein-Protein-Interaktionen gesteuert werden.^[417,418]

Eine weitere Möglichkeit einer nicht regulierenden DNA-Bindung von Atf-2 ergibt sich aus anderen Studien. Basierend auf der Bindung des *lac*-Repressors an bakte-

rielle DNA^[419] wird vermutet, dass genomweite Bindungen an nicht regulatorische Elemente die Mengen von TFs im Zellkern optimal regulieren sollen. Dies könnte der Feinabstimmung der Genregulation dienen, indem Konzentrationen von ungebundenen TFs limitiert werden, damit diese nicht an Sequenzen binden, die durch kooperative Bindung besetzt werden müssen. Dieses Reservoir an TFs könnte eine Art Puffersystem bilden, analog zu anderen biologischen Puffersystemen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Bindungsstudien bei *Drosophila*.^[420,421] Dabei haben TFs stärker an TFBSs von regulierten Genen gebunden, als an TFBSs von unregulierten Genen.

Eine nicht funktionelle Bindung eines TF kann neben physiologischen Gründen auch methodische Ursachen haben. Üblicherweise wird die Genregulation durch TFs nur indirekt analysiert, über die Korrelation der TF-Bindung zur mRNA-Expression. Dabei wird einer TFBS in den meisten Fällen das am nächsten gelegene Gen zugeordnet. Ein TF, der nahe oder in einem Gen bindet, könnte aber ganz andere Gene regulieren.^[422] Dies ist z. B. in der Maus am *limb-bud*-Enhancer demonstriert worden, der in einem Intron dieses Gens liegt und die Expression des ein Megabasenpaare entfernten *Sonic-hedgehog* (*Shh*)-Gens kontrolliert.^[167,423] Es wurde sogar gezeigt, dass der olfaktorische H-Enhancer in epithalen Geweben mit einer Vielzahl von olfaktorischen Rezeptorgenen interagiert, die sowohl auf dem selben, als auch auf anderen Chromosomen liegen, woraufhin die Zielgene exprimiert werden.^[424] Des Weiteren können Interaktionen zwischen einem gebundenen TF und dem Zielgen durch *cis*-regulatorische Insulators blockiert werden. (zusammengefasst in Bushey et al. (2008)^[425], Gaszner und Felsenfeld (2006)^[426]). Gut untersucht ist der *Drosophila* Gypsy-Insulator, der die Aktivität eines Enhancers durch die Bindung eines Proteinkomplexes blockieren kann (zusammengefasst in Valenzuela und Kamakaka (2006)^[427]). Hierbei kann ein TF an die DNA binden, aber wegen des Insulators nicht die Genaktivität regulieren.

Weiterhin könnten auch die Eigenheiten der Antigen-Antikörper-Interaktionen zu Fehlinterpretationen von CHIP-Ergebnissen führen. TFs binden nicht unbedingt einzeln an die DNA, sondern können auch mit anderen Proteinen interagieren. Dadurch könnte das Epitop für einen CHIP-Antikörper maskiert sein, wodurch die Bindung des TF an die DNA nicht detektiert werden kann. Zuletzt könnte beim DNA Looping, das durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt wird,^[166,428,429] nicht die direkte TFBS detektiert werden, sondern die Bindestelle des Interaktionspartners an einem anderen DNA-Locus.

Um eine TFBS direkt einem Gen zuzuordnen, gibt es eine neuere Methode, das Chromosom-Conformation-Capture (3C) (zusammengefasst in Dekker (2006)^[430], Simonis et al. (2007)^[431]). Hierbei wird eine CHIP durchgeführt und DNA-Abschnitte, bei denen z. B. Enhancer und Promotor interagieren, werden durch Formaldehyd

vernetzt. Statt der Fragmentierung der DNA durch Ultraschall, wird die DNA durch Restriktionsenzyme verdaut.^[432] Nach der ChIP werden die über Proteine miteinander verbunden Enden der DNA-Fragmente legiert. Anschließend können beide Abschnitte durch Sequenzierung oder PCR analysiert werden. Erweiterungen dieser Methode, dem 4C und 5C, ermöglichen Analysen mit Hochdurchsatzsequenzierungen oder Microarrays. Allerdings stellt sich die Frage, ob diese Methoden auch allgemein funktionieren, da für eine ChIP mit Formaldehydfixierung ein Restriktionsverdau ineffizient ist.^[296,433]

Zusammenfassend haben manche Studien eine Korrelation zwischen TF-Bindungsereignissen und mRNA-Expression festgestellt, andere Studien wiederum nicht. Dies hat gezeigt, dass die mRNA-Expression nicht ausschließlich von TF-Bindungsereignissen abhängig sein muss. Insgesamt gibt es bei der Signaltransduktion zahlreiche Möglichkeiten regulierend einzugreifen, wie bei der mRNA-Expression durch Transkription, Kerntransport oder mRNA-Abbau. Ob es allgemein eine Korrelation gibt oder nur in bestimmten Fällen, werden weitere Studien zeigen. Um die Abhängigkeit der Transkription von den TF-Bindungsereignissen zu untersuchen, sollten eher direkte TF-Gen-Interaktionen, sowie die lokale Transkription am Gen untersucht werden.

5 Ausblick

Die Genexpression bei höheren Eukaryoten wird durch ein kompliziertes Netzwerk von TFs und Co-Faktoren reguliert. Um das Zusammenspiel der beteiligten *cis*- und *trans*-Elemente zu entschlüsseln, wird die Forschung vermehrt auf genomweite Untersuchungen mit Hochdurchsatzverfahren setzen müssen. Da die Regulation der Transkription von vielen Faktoren abhängt und sich von Gen zu Gen unterscheiden kann, können die großen Datenmengen aus genomweiten Untersuchungen eher dazu beitragen, allgemeine regulatorische Mechanismen zu erkennen. Hierzu können verschiedenste Methoden herangezogen werden, wie die ChIP-seq, die RNA-seq und epigenetischen Untersuchungsmethoden, die im Idealfall alle kombiniert werden. Bei Studien zur Genregulation sind meiner Meinung nach *in vivo* Experimente gegenüber Zellkultur- oder *in vitro* Experimenten vorzuziehen. Für die letztgenannten Versuchsbedingungen gibt es genügend Beispiele, bei denen die Gene differenziell zu *in vivo* Bedingungen reguliert werden. Für *in silico* Methoden fehlen teilweise noch Versuchsdaten, um alle Eventualitäten mit einzuberechnen. In der Zukunft aber, könnten verbesserte Algorithmen Bindungsstellen in weniger gut untersuchten Organismen vorhersagen, um ChIP-Experimente für einzelne TFBSs zu planen. Bei allen Vorteilen gegenüber herkömmlichen Techniken, kann mit der ChIP-Methode kein direkter Zusammenhang zwischen der DNA-Bindung eines TF und der Ge-

nexpression gezeigt werden. Beim Reporter-Assay lässt sich dieses zwar nachweisen, doch stimmen die aus dem genomischen Kontext gerissenen Regulationsmechanismen nicht unbedingt mit denen *in vivo* überein. Eine Weiterentwicklung der ChIP in der Chromosom-Conformation-Capture-Technik könnte weiterhelfen, um TFBSs den regulierten Genen zuzuordnen.

E Zusammenfassung

Zur Analyse der Genregulation durch die Bindungen von Transkriptionsfaktoren an DNA, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) für Gewebe in der Biene etabliert. Hierbei konnte durch gezielte Optimierung, bei gleicher Effizienz der ChIP-Methode, die Menge des notwendigen Gewebes um den Faktor 10 bis 50 reduziert werden. An den *Creb*- und *Jun-like*-Promotoren wurden Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) identifiziert und die Funktionalität der Methode demonstriert. Für den weitergehenden Einsatz der ChIP-Methode wurden Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor Creb für die Biene hergestellt. Die Anwendung der ChIP-Methode in Verbindung mit der Hochdurchsatzsequenzierung (ChIP-seq) liefert erste Hinweise auf genomweite Bindungsstellen des Activating-Transcription-Factor-2 (Atf-2) in neuronalen Zellen des Bienenhirns. Die Untersuchungen von TFBS aus der ChIP-seq und der Korrelation mit der mRNA Expression zeigen, dass für aussagekräftige Erklärungen zur genomweiten Genregulation, Experimente in einem viel größerem Maßstab notwendig sind. Die Grundlagen für solche zukünftigen Untersuchungen an kleinen Gewebeproben sind jetzt durch diese Arbeit geschaffen.

F Summary

In this work a chromatin immunoprecipitation (ChIP) has been developed first time for brain tissue of the honey bee to examine the regulation of genes by the binding of transcription factors to DNA. The optimized ChIP protocol enables experiments with very low amounts of tissue. Using ChIP, transcription factor binding sites (TFBS) at the promoters of the *Creb* and *Jun-like* genes were identified and the functionality of this method demonstrated. To broaden the application of the ChIP technique, honeybee Creb antibodies were developed. Combining the ChIP technique with high throughput sequencing (ChIP-seq) indicates genome wide distribution of binding sites of the activating transcription factor 2 (Atf-2) in neuronal cells of the honeybee brain. The performed low number experiments of transcription factor binding and the correlation to mRNA expression demands for extensive ChIP-seq experiments on a broad scale to get significant results. The foundation for these further studies is presented in this dissertation.

G Anhang

Tabelle 7: Nomenklatur der Gene und Proteine

In der Tabelle sind die untersuchten Gene und Proteine aufgelistet. Für eine bessere Verständlichkeit der Arbeit wurden teilweise statt der offiziellen Symbole gebräuchlichere Abkürzungen verwendet. Von manchen Genen und Proteinen sind auch die Synonyme aufgeführt. Im oberen Teil der Tabelle sind die Gene beschrieben, im unteren Teil, die dazu gehörigen Proteine. Zu den Genen und Proteinen der Biene (*Apis mellifera*, *Am*) sind die Homologen des Menschen (*Homo sapiens*, *Hs*) aufgelistet.

	Abkürzung	Gen	Symbol	Gene ID (NCBI)
<i>Hs</i>	ATF2/ ATF-2	activating transcription factor 2	<i>ATF2, CREB2, CREBP1</i>	1386
<i>Am</i>	Atf2	cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2-like	<i>LOC100576527, Atf2</i>	100576527
<i>Hs</i>	JUN	jun proto-oncogene	<i>JUN</i>	3725
<i>Am</i>	Jun-like	Jun-related antigen	<i>Jra, Jun-like</i>	726289
<i>Hs</i>	NFKB3	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	<i>RELA, NFKB3</i>	5970
<i>Am</i>	Nfkb3	dorsal	<i>DI</i>	406086
<i>Hs</i>	CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	<i>CREB1</i>	1385
<i>Am</i>	Creb	cyclic-AMP response element binding protein B at 17A ortholog	<i>Creb</i>	409401
<i>Hs</i>	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>FOS, C-FOS</i>	2353
<i>Am</i>		ATF-3-like protein	<i>ATF-3-like</i>	408981
<i>Hs</i>	MYEF2	myelin expression factor 2	<i>MYEF2, MEF-2</i>	50804
<i>Am</i>	Myef2	rumpelstiltskin	<i>rump</i>	411969
<i>Hs</i>	NOS1	nitric oxide synthase 1 (neuronal)	<i>NOS1</i>	4842
<i>Am</i>	Nos	nitric oxide synthase	<i>NOS</i>	503861
<i>Hs</i>	EGR1	early growth response 1	<i>EGR1, KROX-24, ZIF-268</i>	1958
<i>Am</i>	Egr1	hypothetical protein LOC726302	<i>LOC726302</i>	726302
<i>Hs</i>	ERK1	mitogen-activated protein kinase 3	<i>MAPK3, ERK1</i>	5595
<i>Am</i>	Erka	mitogen-activated protein kinase ERK-A	<i>rl</i>	409523

	Abkürzung	Gen	Symbol	Gene ID (NCBI)
<i>Hs</i>	RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B oder GPI gamma-4	<i>RASGEF1B, GPIG4</i>	153020
<i>Am</i>	RasGef1b	ras-GEF domain-containing family member 1B-like	<i>LOC412801</i>	412801
<i>Hs</i>	5HT1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	<i>5HT1a</i>	3350
<i>Am</i>	Oa1	octopamine receptor	<i>Oa1, Oar</i>	406068
<i>Hs</i>	GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	<i>GUCY1B3</i>	2983
<i>Am</i>	Gucy1b3	guanylate cyclase, soluble, beta 1	<i>Gucy1b3, Gyc-beta1</i>	408880
<i>Hs</i>	DRD3	dopamine receptor D3	<i>DRD3</i>	1814
<i>Am</i>	Dop3	D2-like dopamine receptor	<i>Dop3</i>	408995
<i>Hs</i>	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	<i>CAMK2D</i>	817
<i>Am</i>	Camkii	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	<i>Camkii</i>	551691
<i>Hs</i>	RPS18	ribosomal protein S18	<i>RPS18</i>	6222
<i>Am</i>	RpS18	ribosomal protein S18	<i>RpS18</i>	552726
<i>Hs</i>	PPIF	peptidylprolyl isomerase F	<i>PPIF, CYP3, Cyp-D</i>	10105
<i>Am</i>	Ppi	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like	<i>LOC409890</i>	409890
<i>Hs</i>	EF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	<i>EEF1A1, EF1A1</i>	1915
<i>Am</i>	EF1-alpha	elongation factor 1-alpha	<i>EF1-alpha</i>	544670

	Abkürzung	Protein	Symbol	RefSeq (NCBI)
<i>Hs</i>	ATF2	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2	<i>ATF-2, CREB-2, CRE-BP1</i>	NP_001871.2
<i>Am</i>	Atf-2	cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2-like	<i>Atf-2</i>	XP_003249317.1
<i>Hs</i>	c-Jun	transcription factor AP-1	<i>AP1, c-Jun</i>	NP_002219
<i>Am</i>	c-Jun	transcription factor AP-1	<i>AP-1</i>	XP_003251036.1
<i>Hs</i>	NF-kappa-B p65	transcription factor p65; Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit		NP_068810.3
<i>Am</i>	NF-kappa-B p65	dorsal protein isoform A		NP_001011577

	Abkürzung	Protein	Symbol	RefSeq (NCBI)
<i>Hs</i>	CREB-1	cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 isoform B	CREB-1	NP_604391
<i>Am</i>	Creb-1	cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	Creb-1	XP_623116
<i>Hs</i>	c-Fos	proto-oncogene c-Fos		NP_005243.1
<i>Am</i>	c-Fos	hypothetical protein LOC408981		XP_392513
<i>Hs</i>	MEF-2	myelin expression factor 2	MEF-2	NP_057216.2
<i>Am</i>	Mef-2	myelin expression factor 2		XP_395436.3
<i>Hs</i>	nNOS	nitric oxide synthase, brain isoform 1	Neuronal NOS, nNOS	NP_000611.1
<i>Am</i>	Nos	nitric oxide synthase		NP_001012980.1
<i>Hs</i>	EGR-1	early growth response protein 1	EGR-1	NP_001955.1
<i>Am</i>	Egr-1	hypothetical protein LOC726302		XP_001122050.2
<i>Hs</i>	ERK-1	Mitogen-activated protein kinase 3 oder Extracellular signal-regulated kinase 1	MAPK 3, ERK-1, p44-ERK1	NP_002737.2
<i>Am</i>	Erk-a	mitogen-activated protein kinase 1		XP_393029.2
<i>Hs</i>	RAS-GEF-1B	ras-GEF domain-containing family member 1B		NP_689758.1
<i>Am</i>	Ras-Gef-1b	ras-GEF domain-containing family member 1B-like		XP_396254.4
<i>Hs</i>	5-HAT-1A	5-hydroxytryptamine receptor 1A	5-HT-1A, Serotonin receptor 1A	NP_000515.2
<i>Am</i>	Oa-1	octopamine receptor		NP_001011565.1
<i>Hs</i>	GCS-beta-1	guanylate cyclase soluble subunit beta-1 oder Guanylate cyclase soluble subunit beta-3	GCS-beta-1, GCS-beta-3	NP_000848.1
<i>Am</i>	Gcs-beta-1	Soluble guanylyl cyclase beta 1 subunit		NP_001011632.1
<i>Hs</i>	DRD-3A	D(3) dopamine receptor isoform a		NP_000787.2
<i>Am</i>	Drd-2	D2-like dopamine receptor		NP_001014983.1
<i>Hs</i>	CAMK-2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta isoform 2		NP_742126.1
<i>Am</i>	Camk-ii	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II		NP_001128422.1
<i>Hs</i>	RP-S18	40S ribosomal protein S18		NP_072045.1

	Abkürzung	Protein	Symbol	RefSeq (NCBI)
<i>Am</i>	Rp-S18	40S ribosomal protein S18		XP_625104.1
<i>Hs</i>	PPlase F	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, Cyclophilin F	PPlase F	NP_005720.1
<i>Am</i>	Ppi	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like		XP_393381.2
<i>Hs</i>	EF-1-alpha-1	elongation factor 1-alpha 1	EF-1-alpha-1	NP_001393.1
<i>Am</i>	EF1-alpha	elongation factor 1-alpha		NP_001014993.1

Tabelle 8: Ontologie der Zielgene von Atf-2 nach UV- und Weißlicht

Gene, an die Atf-2 nach UV- oder Weißlichtbehandlung gebunden hat, wurden nach der „Gene Ontology“ (GO) in biologische Prozesse kategorisiert. Insgesamt gab es für Weißlicht (Contigs ≥ 3 Reads) 727 Zielgene und für UV-Licht (Contigs ≥ 4 Reads) 1482 Zielgene. Einzelne Gene können mehreren Gruppen zugeordnet sein und einzelne Gruppen können anderen Gruppen untergeordnet sein. Der Anteil der Zielgene einer jeden Probe ist in Prozent der Gesamtzahl angegeben. In Klammern stehen die Anzahlen der Zielgene. Die Änderungen von UV- zu Weißlicht beziehen sich auf die prozentualen Anteile der Proben.

GO Name	GO ID	Weißlicht	UV-Licht	vielfache Änderung
response to abiotic stimulus	9628	0,3 (2)	1,0 (15)	3,68
ion transport	6811	0,1 (1)	0,5 (7)	3,43
response to biotic stimulus	9607	0,1 (1)	0,3 (5)	2,45
catabolic process	9056	0,6 (4)	1,0 (15)	1,84
response to stress	6950	0,8 (6)	1,3 (20)	1,64
cell-cell signaling	7267	0,8 (6)	1,3 (19)	1,55
cell death	8219	1,0 (7)	1,3 (20)	1,40
death	16265	1,0 (7)	1,3 (20)	1,40
cell communication	7154	1,7 (12)	2,2 (32)	1,31
DNA metabolic process	6259	0,4 (3)	0,5 (8)	1,31
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	6139	3,6 (26)	4,5 (67)	1,26
embryo development	9790	1,7 (12)	2,0 (30)	1,23
biosynthetic process	9058	4,5 (33)	5,3 (78)	1,16
transport	6810	2,8 (20)	3,1 (46)	1,13
metabolic process	8152	8,0 (58)	8,9 (132)	1,12
anatomical structure morphogenesis	9653	4,7 (34)	5,1 (76)	1,10

GO Name	GO ID	Weißlicht	UV-Licht	vielfache Änderung
transcription	6351	2,8 (20)	3,0 (44)	1,08
protein metabolic process	19538	3,3 (24)	3,5 (52)	1,06
response to external stimulus	9605	1,7 (12)	1,8 (26)	1,06
primary metabolic process	44238	7,7 (56)	7,8 (116)	1,02
multicellular organismal development	7275	6,2 (45)	6,1 (91)	0,99
protein transport	15031	1,4 (10)	1,3 (20)	0,98
secondary metabolic process	19748	0,1 (1)	0,1 (2)	0,98
translation	6412	1,0 (7)	0,9 (14)	0,98
reproduction	3	2,9 (21)	2,8 (41)	0,96
protein modification process	6464	1,9 (14)	1,8 (27)	0,95
regulation of biological process	50789	7,7 (56)	7,2 (106)	0,93
growth	40007	1,8 (13)	1,6 (24)	0,91
signal transduction	7165	3,6 (26)	3,2 (47)	0,89
cell differentiation	30154	5,2 (38)	4,5 (66)	0,85
cellular component organization	16043	6,3 (46)	5,2 (77)	0,82
behavior	7610	2,1 (15)	1,6 (23)	0,75
organelle organization	6996	3,4 (25)	2,4 (36)	0,71
cytoskeleton organization	7010	2,1 (15)	1,4 (21)	0,69
carbohydrate metabolic process	5975	0,4 (3)	0,3 (4)	0,65
cell proliferation	8283	1,0 (7)	0,5 (8)	0,56
cell recognition	8037	1,0 (7)	0,5 (8)	0,56
cell growth	16049	0,6 (4)	0,3 (4)	0,49
lipid metabolic process	6629	0,8 (6)	0,4 (6)	0,49
cytoplasm organization	7028	0,4 (3)	0,2 (3)	0,49
cell cycle	7049	2,3 (17)	1,1 (16)	0,46
response to endogenous stimulus	9719	0,6 (4)	0,2 (3)	0,37
cellular homeostasis	19725	0,0 (0)	0,1 (1)	
generation of precursor metabolites and energy	6091	0,0 (0)	0,1 (1)	
mitochondrion organization	7005	0,0 (0)	0,1 (2)	
regulation of gene expression, epigenetic	40029	0,0 (0)	0,2 (3)	

Tabelle 9: Zielgene von Atf-2 nach UV- und Weißlicht

Aufgeführt sind TFBSs (Contigs) von Genen, an die Atf-2 nach Weißlicht- (≥ 5 Reads/Contig) oder UV-Licht Behandlung (≥ 10 Reads/Contig) gebunden hat. Da einzelne Gene mehrere Bindungsstellen besitzen können, kann ein Genname mehrmals aufgeführt sein. Bei der Berechnung der Ratio UV-/Weißlicht wurden Contigs mit 0 Reads gleich 1 gesetzt. Contigs deren Sequenzen nicht eindeutig einer genomischen Sequenz zuzuordnen sind oder mehr als einhundert kb von der kodierenden Sequenz entfernt liegen, sind nicht aufgeführt.

Gen	Gene ID	Weißlicht (Reads/Contig)	UV-Licht (Reads/Contig)	vielfache Änderung
protein TANC2-like	411569	0	91	91,00
glucuronosyltransferase	725997	0	38	38,00
cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	411053	0	35	35,00
testican-1-like	409774	0	25	25,00
guanylate cyclase, soluble, beta 1	408880	0	25	25,00
ras-GEF domain-containing family member 1B-like	412801	0	22	22,00
hypothetical protein LOC408316	408316	0	20	20,00
hypothetical protein LOC412878	412878	0	19	19,00
hypothetical protein LOC409778	409778	0	19	19,00
hypothetical protein LOC408443	408443	0	19	19,00
hypothetical protein LOC408318	408318	0	18	18,00
MOXD1 homolog 2-like	410362	0	18	18,00
lachesin-like	410439	0	18	18,00
scalloped	408616	0	17	17,00
krueppel	411166	1	16	16,00
venom carboxylesterase-6-like	408395	0	16	16,00
glutamyl aminopeptidase-like	552078	0	16	16,00
hypothetical protein LOC411158	411158	0	16	16,00
ATP-binding cassette sub-family G member 1-like	410552	0	15	15,00
heterotrimeric G protein alpha subunit-like protein	411704	0	15	15,00
hypothetical protein LOC724498	724498	0	14	14,00
feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 2-like	412892	0	14	14,00
hypothetical protein LOC410534	410534	0	14	14,00
tyrosine aminotransferase-like	725204	0	14	14,00
hypothetical protein LOC725079	725079	0	14	14,00

Gen	Gene ID	Weißlicht (Reads/Contig)	UV-Licht (Reads/Contig)	vielfache Änderung
multiple inositol polyphosphate phosphatase 1-like	725931	0	14	14,00
hypothetical protein LOC724683	724683	0	13	13,00
protein BTG2-like	726804	0	13	13,00
restin homolog	412634	0	13	13,00
polypyrimidine tract-binding protein 1-like	100577282	0	13	13,00
hypothetical LOC100576305	100576305	0	13	13,00
immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 4	551736	0	12	12,00
yellow-x2	727110	0	12	12,00
putative aminopeptidase W07G4.4-like	410627	0	12	12,00
nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like	551157	0	12	12,00
immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 6	412855	0	12	12,00
neurogenic protein mastermind	408877	0	12	12,00
NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	551667	1	11	11,00
serine protease inhibitor 5	413749	0	11	11,00
MOXD1 homolog 2-like	410362	0	11	11,00
O/E-associated zinc finger protein	413466	0	11	11,00
hypothetical protein LOC412813	412813	0	11	11,00
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	551691	0	11	11,00
elongation of very long chain fatty acids protein 4-like	725255	0	11	11,00
similar to fat2 CG7749-PA, isoform A	724657	0	11	11,00
discoidin domain-containing receptor 2-like	411213	0	11	11,00
hypothetical protein LOC100577012	100577012	0	10	10,00
2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain-containing protein 1-like	725925	0	10	10,00
facilitated trehalose transporter Tret1-like	551957	0	10	10,00
ultrabithorax	551594	0	10	10,00
cubilin-like	726886	0	10	10,00
hypothetical LOC100577851	100577851	0	10	10,00
protein NPC2 homolog	725038	0	10	10,00
slit	408960	0	10	10,00
Jun-related antigen	726289	0	10	10,00

Gen	Gene ID	Weißlicht (Reads/Contig)	UV-Licht (Reads/Contig)	vielfache Änderung
hypothetical protein LOC725282	725282	2	13	6,50
hypothetical protein LOC100577542	100577542	15	71	4,73
mitochondrial ribosomal protein L45	552656	15	70	4,67
regucalcin-like	725484	30	124	4,13
hypothetical protein LOC725282	725282	3	12	4,00
BAI1-associated protein 3-like	408914	3	12	4,00
trailer hitch	410015	5	0	0,20
similar to Organic anion transporting polypeptide 26F	552120	5	0	0,20
syntrophin-like 1	724333	5	0	0,20
hypothetical protein LOC726414	726414	5	0	0,20
bunched	411553	5	0	0,20
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C-like	409961	5	1	0,20
UNC93-like protein-like	410465	5	0	0,20
putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 9-like	410470	5	0	0,20
echinoderm microtubule-associated protein-like 1-like	410078	5	0	0,20
dipeptidase 1-like	412926	5	0	0,20
maternal protein exuperantia	551582	5	0	0,20
slit homolog 1 protein-like	410555	5	0	0,20
tankyrase protein	413032	5	0	0,20
similar to CG15589-PA	725585	5	1	0,20
worker-enriched antennal transcript	406065	5	0	0,20
ABC transporter G family member 20-like	409666	5	0	0,20
hypothetical protein LOC724468	724468	5	0	0,20
hypothetical protein LOC725776	725776	5	0	0,20
cell growth-regulating nucleolar protein-like	551406	5	0	0,20
ADP ribosylation factor 79F ortholog	409481	5	0	0,20
DNA polymerase interacting tpr containing protein of 47kD	551730	5	0	0,20
StAR-related lipid transfer protein 13	410706	5	0	0,20
leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1-like	409027	5	0	0,20
latrophilin Cirl-like	552142	5	0	0,20

Gen	Gene ID	Weißlicht (Reads/Contig)	UV-Licht (Reads/Contig)	vielfache Änderung
similar to CG3822-PA	410789	5	0	0,20
cysteine-rich with EGF-like domain protein 1-like	726865	5	0	0,20
probable G-protein coupled receptor Mth-like 1-like	724853	5	0	0,20
hypothetical protein LOC725398	725398	5	0	0,20
testican-1-like	409774	5	0	0,20
hypothetical protein LOC409658	409658	5	0	0,20
RPS6-protein kinase-II	411481	5	0	0,20
serrate	411086	5	0	0,20
MTA1-like protein	413318	5	0	0,20
transient receptor potential	724608	5	0	0,20
hypothetical protein LOC725130	725130	5	0	0,20
UPF0489 protein C5orf22 homolog	725329	5	0	0,20
hyperpolarization-activated ion channel	406072	5	0	0,20
slit	408960	5	1	0,20
Shal K[+] channel interacting protein	413382	5	1	0,20
radish	410006	6	0	0,17
chitin deacetylase-like 5	552276	6	0	0,17
protein phosphatase PP2A 55 kDa regulatory subunit	410604	6	0	0,17
LK6 protein kinase	412470	6	0	0,17
ultrabithorax	551594	6	1	0,17
maxillopedia	410648	6	1	0,17
hypothetical protein LOC724117	724117	6	0	0,17
acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like	551395	6	0	0,17
two pore potassium channel protein sup-9-like	411036	6	0	0,17
maternal gene required for meiosis	411028	6	0	0,17
similar to fat2 CG7749-PA, isoform A	724657	6	0	0,17
fat-like cadherin-related tumor suppressor homolog	411157	6	0	0,17
hypothetical protein LOC724406	724406	6	1	0,17
NMDA receptor 2	412818	6	0	0,17
TXBP181-like protein	724819	6	0	0,17

Gen	Gene ID	Weißlicht (Reads/Contig)	UV-Licht (Reads/Contig)	vielfache Änderung
hypothetical protein LOC725186	725186	6	0	0,17
similar to CG31163-PB, isoform B	726499	6	0	0,17
peripheral plasma membrane protein CASK-like	411347	6	0	0,17
hypothetical protein LOC100577878	100577878	7	0	0,14
chromatin-remodeling complex ATPase chain lswi	412742	7	0	0,14
P protein-like	551871	7	0	0,14
hypothetical protein LOC725791	725791	7	0	0,14
zinc finger SWIM domain-containing protein KIAA0913-like	413399	7	0	0,14
hypothetical protein LOC410987	410987	7	0	0,14
knirps	724640	8	0	0,13
troponin C type IIIa	408379	8	0	0,13
hypothetical LOC726524	726524	8	1	0,13
smooth	410674	8	0	0,13
beta-Tubulin at 60D ortholog	410994	8	0	0,13
otoferlin-like	724747	8	0	0,13
hypothetical protein LOC725027	725027	8	1	0,13
krueppel	411166	9	0	0,11
otoferlin-like	410318	10	0	0,10
hypothetical protein LOC551031	551031	11	0	0,09
pikachurin-like	409782	11	1	0,09
hypothetical protein LOC724749	724749	12	0	0,08
beta spectrin	411744	12	0	0,08
hypothetical protein LOC726179	726179	13	0	0,08
fructose-bisphosphate aldolase-like	550785	13	0	0,08
hypothetical protein LOC408282	408282	14	0	0,07
tRNA pseudouridine synthase A, mitochondrial- like	551700	15	0	0,07
semaphorin 2a	408896	17	0	0,06
neurotrimin-like	414025	18	0	0,06

H Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amel	Apis mellifera
AMP	Adenosin Monophosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäuren
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines serum albumine
BT474 Zellen	Human breast tumor cell line 474
bZIP	Basic leucine zipper
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Cam	Canabicyllin
CBP	CREB binding protein
cDNA	Complementary DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
ChIP-qPCR	ChIP quantitative Real-Time PCR
ChIP-seq	ChIP-Sequenzierung
CRE	Cyclic AMP-response element
Ct	Cycle of threshold
CTD	Carboxy-terminale Domäne
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DHS	DNase I hypersensitive Stellen
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	Doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
emPCR	Emulsions-PCR
ENCODE	ENCyclopedia Of DNA Elements
engl.	Englisch
ERK	Extracellular regulated MAP kinase
EtOH	Ethanol
FoxA1	Forkhead box A1
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GO	Gene ontology
GTF	General transcription factor
HaCaT Zellen	Human adult low calcium high temperature Zell-Linie (Keratinocyten)

HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HeLA S3 Zellen	Helen Lane (Human epithelial carcinoma) S3 cell line
HERP1	Hairy/enhancer-of-split-related repressor protein 1
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
JNK	JUN N-terminale Kinase (= MAPK 8; SAPK1)
kb	Kilobasenpaare
LB	Lysogeny broth
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Mb	Megabasenpaare
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mre11	Meiotic recombination 11
mRNA	Messenger RNA
MyoD	Myogenic differentiation
Na	Natrium
Nanog, NANOG	Nanog homeobox
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
N-ChIP	Native ChIP
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
Ni-NTA	Nickel-nitriloacetic acid
NKX3-1	NK3 homeobox 1
NOS	Nitric oxide synthase
NRSF	Neural-restrictive silencer factor (= REST)
NTC	No template control
OCT4	Octamer-binding protein 4 (=POU5F1)
OD	Optische Dichte
p38	p38 (MAPK14)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Preinitiation complex
PMW	Position weight matrix
PoI II	RNA-Polymerase II
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygene species

rpm	Runden pro Minute
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Serin
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SRF	Serum response factor
ssDNA	Einzelsträngige DNA (engl. single stranded DNA)
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
TBP	TATA box binding protein
Tet	Tetracyclin
TF	(Spezifischer) Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen
Thr	Threonin
Tm	Mittlere Schmelztemperatur
TSS	Transkriptions-Startseite
U	Unit
UV	Ultra Violett(e Strahlung)
WGA	Whole genome amplification
x g	x-fache mittlere Erdbeschleunigung
X-ChIP	Fixierungs-ChIP

I Literatur

1. **Laeger, T.** in Saarbrücken, Univ., Diss., 2008 (Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek 2007).
2. **Iqbal, J.** in Saarbrücken Univ. Diss. 2009 (Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek 2009).
3. **Kadonaga, J.T.** Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116, 247-57 (2004).
4. **Maston, G.A., Evans, S.K. & Green, M.R.** Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 29-59 (2006).
5. **Dulac, C.** Brain function and chromatin plasticity. *Nature* 465, 728-35 (2010).
6. **Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. & Luscombe, N.M.** A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* 10, 252-63 (2009).
7. **Plotsky, P.M., Cunningham, E.T., Jr. & Widmaier, E.P.** Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10, 437-58 (1989).
8. **Arck, P.C., Slominski, A., Theoharides, T.C., Peters, E.M. & Paus, R.** Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol* 126, 1697-704 (2006).
9. **Solignac, M. et al.** The genome of *Apis mellifera*: dialog between linkage mapping and sequence assembly. *Genome Biol* 8, 403 (2007).
10. **Keene, J.D.** RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8, 533-43 (2007).
11. **Cheung, E. & Kraus, W.L.** Genomic analyses of hormone signaling and gene regulation. *Annu Rev Physiol* 72, 191-218 (2010).
12. **Bhoumik, A., Lopez-Bergami, P. & Ronai, Z.** ATF2 on the double - activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Res* 20, 498-506 (2007).
13. **Consortium, E.P.** The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* 306, 636-40 (2004).
14. **Brivanlou, A.H. & Darnell, J.E., Jr.** Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-8 (2002).
15. **Rothberg, J.M. & Leamon, J.H.** The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1117-24 (2008).
16. **Elsik, C.G. et al.** Creating a honey bee consensus gene set. *Genome Biol* 8, R13 (2007).
17. **Herman, J.P., Cullinan, W.E., Ziegler, D.R. & Tasker, J.G.** Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci* 16, 381-5 (2002).

18. **De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S. & Joels, M.** Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19, 269-301 (1998).
19. **Lodish, H.F.** Molecular cell biology (W. H. Freeman, New York, 2004).
20. **Kandel, E.R.** The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-8 (2001).
21. **Herman, J.P. et al.** Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24, 151-80 (2003).
22. **Jacobson, L. & Sapolsky, R.** The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12, 118-34 (1991).
23. **Sandi, C.** Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci* 5, 917-30 (2004).
24. **Carroll, S.B.** Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS Biol* 3, e245 (2005).
25. **Hajkova, P.** Epigenetic reprogramming--taking a lesson from the embryo. *Curr Opin Cell Biol* 22, 342-50 (2010).
26. **Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D. & Sapolsky, R.M.** The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64, 33-9 (2009).
27. **Emerson, B.M.** Specificity of gene regulation. *Cell* 109, 267-70 (2002).
28. **Kramer, J.M. & van Bokhoven, H.** Genetic and epigenetic defects in mental retardation. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 96-107 (2009).
29. **Ramocki, M.B. & Zoghbi, H.Y.** Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature* 455, 912-8 (2008).
30. **McEwen, B.S.** Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583, 174-85 (2008).
31. **Cannon, W.B.** Stresses and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* 189, 1-14 (1935).
32. **Roosendaal, B.** 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25, 213-38 (2000).
33. **Sandi, C.** The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast* 6, 41-52 (1998).
34. **McEwen, B.S.** Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338, 171-9 (1998).
35. **EuroFound.** The fourth working conditions survey. *Office for official publications of the european communities* (2007).
36. **Ulrich-Lai, Y.M. & Herman, J.P.** Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10, 397-409 (2009).

37. **Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M.** Principles of neural science (McGraw-Hill, Health Professions Division, New York ; London, 2000).
38. **Droste, S.K. et al.** Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology* 149, 3244-53 (2008).
39. **De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G.** The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24, 488-522 (2003).
40. **Wurtman, R.J. & Axelrod, J.** Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* 241, 2301-5 (1966).
41. **Dhabhar, F.S. & McEwen, B.S.** Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11, 286-306 (1997).
42. **Madrigal, J.L. et al.** Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem* 76, 532-8 (2001).
43. **Karst, H. et al.** Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19204-7 (2005).
44. **Joels, M.** Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol Sci* 27, 244-50 (2006).
45. **Joels, M., Pu, Z., Wiegert, O., Oitzl, M.S. & Krugers, H.J.** Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* 10, 152-8 (2006).
46. **Kyriakis, J.M. & Avruch, J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-69 (2001).
47. **Giurfa, M.** Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr Opin Neurobiol* 13, 726-35 (2003).
48. **Menzel, R. & Muller, U.** Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19, 379-404 (1996).
49. **Sandoz, J.C., Galizia, C.G. & Menzel, R.** Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience* 120, 1137-48 (2003).
50. **Scheiner, R., Page, R.E., Jr. & Erber, J.** The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* 76, 138-50 (2001).
51. **Alaux, C. & Robinson, G.E.** Alarm pheromone induces immediate-early gene expression and slow behavioral response in honey bees. *J Chem Ecol* 33, 1346-50 (2007).
52. **Corona, M., Hughes, K.A., Weaver, D.B. & Robinson, G.E.** Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech Ageing Dev* 126, 1230-8 (2005).

53. **Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G.V.** Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 962-7 (2006).
54. **Seehuus, S.C., Krekling, T. & Amdam, G.V.** Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. *Exp Gerontol* 41, 1117-25 (2006).
55. **Sohal, R.S.** Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 33, 37-44 (2002).
56. **Corona, M. et al.** Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7128-33 (2007).
57. **Guidugli, K.R. et al.** Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett* 579, 4961-5 (2005).
58. **Kornberg, R.D.** Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* 9, M46-9 (1999).
59. **Cedar, H. & Bergman, Y.** Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10, 295-304 (2009).
60. **Berger, S.L.** Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-8 (2002).
61. **Jaenisch, R. & Bird, A.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl, 245-54 (2003).
62. **Bird, A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21 (2002).
63. **Paulsen, M. & Ferguson-Smith, A.C.** DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 195, 97-110 (2001).
64. **Goll, M.G. & Bestor, T.H.** Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514 (2005).
65. **Ramsahoye, B.H. et al.** Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5237-42 (2000).
66. **Feng, Q. & Zhang, Y.** The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15, 827-32 (2001).
67. **Ng, H.H., Jeppesen, P. & Bird, A.** Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20, 1394-406 (2000).
68. **Ng, H.H. et al.** MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23, 58-61 (1999).
69. **Wade, P.A. et al.** Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23, 62-6 (1999).
70. **Zhang, Y. et al.** Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-35 (1999).

71. **Clapier, C.R. & Cairns, B.R.** The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304 (2009).
72. **Becker, P.B. & Horz, W.** ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 247-73 (2002).
73. **Saha, A., Wittmeyer, J. & Cairns, B.R.** Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 437-47 (2006).
74. **Cai, Y. et al.** YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nat Struct Mol Biol* 14, 872-4 (2007).
75. **Cosma, M.P., Tanaka, T. & Nasmyth, K.** Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311 (1999).
76. **Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W. & Richmond, T.J.** Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 319, 1097-113 (2002).
77. **Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J.** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-60 (1997).
78. **Hacques, M.F., Muller, S., De Murcia, G., Van Regenmortel, M.H. & Marion, C.** Use of an immobilized enzyme and specific antibodies to analyse the accessibility and role of histone tails in chromatin structure. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 637-43 (1990).
79. **Brownell, J.E. et al.** Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-51 (1996).
80. **Grunstein, M.** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-52 (1997).
81. **Wolffe, A.P. & Pruss, D.** Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84, 817-9 (1996).
82. **Utley, R.T. et al.** Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498-502 (1998).
83. **Fuda, N.J., Ardehali, M.B. & Lis, J.T.** Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* 461, 186-92 (2009).
84. **Selth, L.A., Sigurdsson, S. & Svejstrup, J.Q.** Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annu Rev Biochem* 79, 271-93 (2010).
85. **Stargell, L.A. & Struhl, K.** Mechanisms of transcriptional activation in vivo: two steps forward. *Trends Genet* 12, 311-5 (1996).
86. **Esnault, C. et al.** Mediator-dependent recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol Cell* 31, 337-46 (2008).
87. **Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. & Kornberg, R.D.** A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608 (1994).

88. **Bjorklund, S. & Gustafsson, C.M.** The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci* 30, 240-4 (2005).
89. **Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T. & Conaway, J.W.** The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 30, 250-5 (2005).
90. **Sakurai, H. & Fukasawa, T.** Functional connections between mediator components and general transcription factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 37251-6 (2000).
91. **Liu, Y. et al.** Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol Cell Biol* 24, 1721-35 (2004).
92. **Spilianakis, C. et al.** CIITA regulates transcription onset via Ser5-phosphorylation of RNA Pol II. *Embo J* 22, 5125-36 (2003).
93. **Core, L.J. & Lis, J.T.** Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* 319, 1791-2 (2008).
94. **Core, L.J., Waterfall, J.J. & Lis, J.T.** Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845-8 (2008).
95. **Tsukiyama, T., Becker, P.B. & Wu, C.** ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367, 525-32 (1994).
96. **Wu, C.H. et al.** Molecular characterization of *Drosophila* NELF. *Nucleic Acids Res* 33, 1269-79 (2005).
97. **Wu, C.H. et al.** NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev* 17, 1402-14 (2003).
98. **Ni, Z. et al.** P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation in vivo. *Mol Cell Biol* 28, 1161-70 (2008).
99. **Mavrich, T.N. et al.** Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453, 358-62 (2008).
100. **Moore, M.J. & Proudfoot, N.J.** Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700 (2009).
101. **Yudkovsky, N., Ranish, J.A. & Hahn, S.** A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225-9 (2000).
102. **Latchman, D.S.** Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1305-12 (1997).
103. **Mitchell, P.J. & Tjian, R.** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-8 (1989).
104. **Lemon, B. & Tjian, R.** Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14, 2551-69 (2000).
105. **Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G.** Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* 11, 109-23 (2010).

106. **Remenyi, A., Scholer, H.R. & Wilmanns, M.** Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11, 812-5 (2004).
107. **Spiegelman, B.M. & Heinrich, R.** Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* 119, 157-67 (2004).
108. **Dikstein, R., Zhou, S. & Tjian, R.** Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell* 87, 137-46 (1996).
109. **Chrivia, J.C. et al.** Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-9 (1993).
110. **Mayr, B. & Montminy, M.** Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609 (2001).
111. **Lonze, B.E. & Ginty, D.D.** Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-23 (2002).
112. **Shaywitz, A.J. & Greenberg, M.E.** CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68, 821-61 (1999).
113. **Tang, C.J., Chuang, C.K., Hu, H.M. & Tang, T.K.** The zinc finger domain of Tzfp binds to the tbs motif located at the upstream flanking region of the Aie1 (aurora-C) kinase gene. *J Biol Chem* 276, 19631-9 (2001).
114. **Pashmforoush, M. et al.** Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell* 117, 373-86 (2004).
115. **Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D.L. & Hager, G.L.** Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4845-50 (1996).
116. **Mackem, S., Baumann, C.T. & Hager, G.L.** A glucocorticoid/retinoic acid receptor chimera that displays cytoplasmic/nuclear translocation in response to retinoic acid. A real time sensing assay for nuclear receptor ligands. *J Biol Chem* 276, 45501-4 (2001).
117. **Wrana, J.L.** Regulation of Smad activity. *Cell* 100, 189-92 (2000).
118. **Karin, M.** How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-74 (1999).
119. **Perkins, N.D.** The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 25, 434-40 (2000).
120. **Okamura, H. et al.** Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6, 539-50 (2000).
121. **Rao, A., Luo, C. & Hogan, P.G.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-47 (1997).
122. **Harrison, S.C.** A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353, 715-9 (1991).

123. **Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M. & Thornton, J.M.** An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol* 1, REVIEWS001 (2000).
124. **Pabo, C.O. & Sauer, R.T.** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61, 1053-95 (1992).
125. **Stegmaier, P., Kel, A.E. & Wingender, E.** Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Inform* 15, 276-86 (2004).
126. **Janin, J., Rodier, F., Chakrabarti, P. & Bahadur, R.P.** Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 1-8 (2007).
127. **Rohs, R. et al.** Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 79, 233-69 (2010).
128. **Hager, G.L., McNally, J.G. & Misteli, T.** Transcription dynamics. *Mol Cell* 35, 741-53 (2009).
129. **Phair, R.D. et al.** Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol Cell Biol* 24, 6393-402 (2004).
130. **Elf, J., Li, G.W. & Xie, X.S.** Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell. *Science* 316, 1191-4 (2007).
131. **Mueller, F., Wach, P. & McNally, J.G.** Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 94, 3323-39 (2008).
132. **Sprague, B.L., Pego, R.L., Stavreva, D.A. & McNally, J.G.** Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 86, 3473-95 (2004).
133. **Herdegen, T. & Leah, J.D.** Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28, 370-490 (1998).
134. **Beckett, D.** Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J Mol Biol* 314, 335-52 (2001).
135. **Bhoumik, A. & Ronai, Z.** ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* 7, 2341-5 (2008).
136. **Hai, T. & Hartman, M.G.** The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11 (2001).
137. **Takeda, J. et al.** Expression of the CRE-BP1 transcriptional regulator binding to the cyclic AMP response element in central nervous system, regenerating liver, and human tumors. *Oncogene* 6, 1009-14 (1991).
138. **Bailey, J. et al.** Characterization and functional analysis of cAMP response element modulator protein and activating transcription factor 2 (ATF2) isoforms in the human myometrium during pregnancy and labor: identification

- of a novel ATF2 species with potent transactivation properties. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1717-28 (2002).
139. **Bailey, J. & Europe-Finner, G.N.** Identification of human myometrial target genes of the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway: the role of activating transcription factor 2 (ATF2) and a novel spliced isoform ATF2-small. *J Mol Endocrinol* 34, 19-35 (2005).
 140. **Maekawa, T. et al.** Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *Embo J* 8, 2023-8 (1989).
 141. **Nomura, N. et al.** Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem* 268, 4259-66 (1993).
 142. **Li, X.Y. & Green, M.R.** Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev* 10, 517-27 (1996).
 143. **Flint, K.J. & Jones, N.C.** Differential regulation of three members of the ATF/CREB family of DNA-binding proteins. *Oncogene* 6, 2019-26 (1991).
 144. **Hagmeyer, B.M., Angel, P. & van Dam, H.** Modulation of AP-1/ATF transcription factor activity by the adenovirus-E1A oncogene products. *Bioessays* 17, 621-9 (1995).
 145. **van Dam, H. et al.** ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J* 14, 1798-811 (1995).
 146. **Buschmann, T., Yin, Z., Bhoumik, A. & Ronai, Z.** Amino-terminal-derived JNK fragment alters expression and activity of c-Jun, ATF2, and p53 and increases H₂O₂-induced cell death. *J Biol Chem* 275, 16590-6 (2000).
 147. **Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. & Davis, R.J.** Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-93 (1995).
 148. **Livingstone, C., Patel, G. & Jones, N.** ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *Embo J* 14, 1785-97 (1995).
 149. **Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B. & Davis, R.J.** MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16, 1247-55 (1996).
 150. **Kerppola, T.K. & Curran, T.** Selective DNA bending by a variety of bZIP proteins. *Mol Cell Biol* 13, 5479-89 (1993).
 151. **Vlahopoulos, S.A. et al.** The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays* 30, 314-27 (2008).
 152. **van Dam, H. & Castellazzi, M.** Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20, 2453-64 (2001).
 153. **Liu, H. et al.** Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *Embo J* 25, 1058-69 (2006).

154. **Hai, T.W., Liu, F., Coukos, W.J. & Green, M.R.** Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* 3, 2083-90 (1989).
155. **Hayakawa, J. et al.** Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell* 16, 521-35 (2004).
156. **Duyndam, M.C. et al.** The N-terminal transactivation domain of ATF2 is a target for the co-operative activation of the c-jun promoter by p300 and 12S E1A. *Oncogene* 18, 2311-21 (1999).
157. **Kawasaki, H. et al.** p300 and ATF-2 are components of the DRF complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells. *Genes Dev* 12, 233-45 (1998).
158. **Lee, J.S., See, R.H., Deng, T. & Shi, Y.** Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol Cell Biol* 16, 4312-26 (1996).
159. **Bhoumik, A. et al.** ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Mol Cell* 18, 577-87 (2005).
160. **Smale, S.T. & Kadonaga, J.T.** The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-79 (2003).
161. **McKnight, S.L. & Kingsbury, R.** Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217, 316-24 (1982).
162. **Atchison, M.L.** Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. *Annu Rev Cell Biol* 4, 127-53 (1988).
163. **Banerji, J., Rusconi, S. & Schaffner, W.** Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27, 299-308 (1981).
164. **Lee, T.I. & Young, R.A.** Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77-137 (2000).
165. **Thanos, D. & Maniatis, T.** Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83, 1091-100 (1995).
166. **Blackwood, E.M. & Kadonaga, J.T.** Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 60-3 (1998).
167. **Lettice, L.A. et al.** A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 12, 1725-35 (2003).
168. **Vilar, J.M. & Saiz, L.** DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise. *Curr Opin Genet Dev* 15, 136-44 (2005).
169. **Ogbourne, S. & Antalis, T.M.** Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 (Pt 1), 1-14 (1998).

170. **Defossez, P.A. et al.** The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. *J Biol Chem* 280, 43017-23 (2005).
171. **Felsenfeld, G. et al.** Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 245-50 (2004).
172. **Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X. & Stamatoyannopoulos, G.** Locus control regions. *Blood* 100, 3077-86 (2002).
173. **Chakalova, L. et al.** Developmental regulation of the beta-globin gene locus. *Prog Mol Subcell Biol* 38, 183-206 (2005).
174. **Bulyk, M.L., Gentalen, E., Lockhart, D.J. & Church, G.M.** Quantifying DNA-protein interactions by double-stranded DNA arrays. *Nat Biotechnol* 17, 573-7 (1999).
175. **Liu, X., Noll, D.M., Lieb, J.D. & Clarke, N.D.** DIP-chip: rapid and accurate determination of DNA-binding specificity. *Genome Res* 15, 421-7 (2005).
176. **Sandelin, A., Alkema, W., Engstrom, P., Wasserman, W.W. & Lenhard, B.** JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 32, D91-4 (2004).
177. **Liu, Y., Michalopoulos, G.K. & Zarnegar, R.** Structural and functional characterization of the mouse hepatocyte growth factor gene promoter. *J Biol Chem* 269, 4152-60 (1994).
178. **Collas, P.** The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol Biotechnol* 45, 87-100 (2010).
179. **Park, P.J.** ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 10, 669-80 (2009).
180. **Birney, E. et al.** Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816 (2007).
181. **Sakabe, N.J. & Nobrega, M.A.** Genome-wide maps of transcription regulatory elements. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 422-37 (2010).
182. **Schmidt, D. et al.** Five-vertebrate ChIP-seq reveals the evolutionary dynamics of transcription factor binding. *Science* 328, 1036-40 (2010).
183. **Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R. & Osburne, M.S.** Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* 209, 95-103 (1998).
184. **Crowe, J. et al.** 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31, 371-87 (1994).
185. **O'Geen, H., Nicolet, C.M., Blahnik, K., Green, R. & Farnham, P.J.** Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *Biotechniques* 41, 577-80 (2006).
186. **Consortium.** Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931-49 (2006).

187. **Klatte, M. & Bauer, P.** Accurate Real-time Reverse Transcription Quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 479, 61-77 (2009).
188. **Vandesompele, J. et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034 (2002).
189. **Singer, V.L., Jones, L.J., Yue, S.T. & Haugland, R.P.** Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem* 249, 228-38 (1997).
190. **Shine, J. & Dalgarno, L.** Occurrence of heat-dissociable ribosomal RNA in insects: the presence of three polynucleotide chains in 26 S RNA from cultured *Aedes aegypti* cells. *J Mol Biol* 75, 57-72 (1973).
191. **Untergasser, A. et al.** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35, W71-4 (2007).
192. **Kibbe, W.A.** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35, W43-6 (2007).
193. **Larkin, M.A. et al.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-8 (2007).
194. **Lassmann, T. & Sonnhammer, E.L.** Kalign--an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics* 6, 298 (2005).
195. **Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M. & Barton, G.J.** Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-91 (2009).
196. **Frith, M.C., Hansen, U. & Weng, Z.** Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* 17, 878-89 (2001).
197. **Schug, J.** Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2, Unit 2 6 (2008).
198. **Briand, L.A. & Blendy, J.A.** Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Res* 1314, 219-34 (2010).
199. **Buttner, F. et al.** Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion. *Brain Res* 1252, 1-14 (2009).
200. **Green, T.A. et al.** Induction of activating transcription factors (ATFs) ATF2, ATF3, and ATF4 in the nucleus accumbens and their regulation of emotional behavior. *J Neurosci* 28, 2025-32 (2008).
201. **Sano, Y. et al.** Drosophila activating transcription factor-2 is involved in stress response via activation by p38, but not c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Biol Cell* 16, 2934-46 (2005).
202. **Al-Khalili, L. et al.** MEF2 activation in differentiated primary human skeletal muscle cultures requires coordinated involvement of parallel pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1410-6 (2004).
203. **Bish, L.T., Morine, K.J., Sleeper, M.M. & Sweeney, H.L.** Myostatin is upregulated following stress in an Erk-dependent manner and negatively regulates cardiomyocyte growth in culture and in a mouse model. *PLoS One* 5, e10230 (2010).

204. **Helmreich, D.L., Cullinan, W.E. & Watson, S.J.** The effect of adrenalectomy on stress-induced c-fos mRNA expression in the rat brain. *Brain Res* 706, 137-44 (1996).
205. **Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M. & Demura, H.** Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Res* 616, 114-25 (1993).
206. **Karin, M. & Smeal, T.** Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci* 17, 418-22 (1992).
207. **Montminy, M.R. & Bilezikjian, L.M.** Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328, 175-8 (1987).
208. **Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S. & Nestler, E.J.** The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28, 436-45 (2005).
209. **Nair, A. et al.** Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 32, 1504-19 (2007).
210. **Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E.** AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-6 (1997).
211. **Botquin, V. et al.** New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* 12, 2073-90 (1998).
212. **Martianov, I. et al.** Cell-specific occupancy of an extended repertoire of CREM and CREB binding loci in male germ cells. *BMC Genomics* 11, 530 (2010).
213. **Orlando, V. & Paro, R.** Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75, 1187-98 (1993).
214. **Eisenhardt, D., Kuhn, C. & Lebouille, G.** The PKA-CREB system encoded by the honeybee genome. *Insect Mol Biol* 15, 551-61 (2006).
215. **Hu, S. et al.** Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell* 139, 610-22 (2009).
216. **Kong, D.K. et al.** Deficiency of the transcriptional regulator p8 results in increased autophagy and apoptosis, and causes impaired heart function. *Mol Biol Cell* 21, 1335-49 (2010).
217. **Fornace, A.J., Jr.** Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Annu Rev Genet* 26, 507-26 (1992).
218. **He, Y.Y. et al.** Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *J Invest Dermatol* 122, 533-43 (2004).
219. **Ridley, A.J., Whiteside, J.R., McMillan, T.J. & Allinson, S.L.** Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* 85, 177-95 (2009).

220. **Tyrrell, R.M.** Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight--from models to reality. *Bioessays* 18, 139-48 (1996).
221. **Huang, R.P., Fan, Y. & Boynton, A.L.** UV irradiation upregulates Egr-1 expression at transcription level. *J Cell Biochem* 73, 227-36 (1999).
222. **Jean, S. et al.** The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365-nm UVA: study by cDNA arrays and real-time quantitative RT-PCR. *Biochim Biophys Acta* 1522, 89-96 (2001).
223. **Silvers, A.L. & Bowden, G.T.** UVA irradiation-induced activation of activator protein-1 is correlated with induced expression of AP-1 family members in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Photochem Photobiol* 75, 302-10 (2002).
224. **Soriani, M., Hejmadi, V. & Tyrrell, R.M.** Modulation of c-jun and c-fos transcription by UVB and UVA radiations in human dermal fibroblasts and KB cells. *Photochem Photobiol* 71, 551-8 (2000).
225. **Cioni, C., Bordieri, L., Miele, R. & Bonaccorsi di Patti, M.C.** Effect of hyperosmotic stress on the gene expression and activity of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the preoptic-hypothalamic neurosecretory system of the euryhaline fish *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci* 26, 163-70 (2009).
226. **Guix, F.X., Urbesalgo, I., Coma, M. & Munoz, F.J.** The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76, 126-52 (2005).
227. **Keser, A., Balkan, B., Gozen, O., Kanit, L. & Pogun, S.** Hippocampal neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is regulated by nicotine and stress in female but not in male rats. *Brain Res* 1368, 134-42 (2011).
228. **Lee, T.I. et al.** Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298, 799-804 (2002).
229. **Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D. & Brown, P.O.** Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet* 28, 327-34 (2001).
230. **Zeitlinger, J. et al.** Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* 113, 395-404 (2003).
231. **Cheng, Y. et al.** Erythroid GATA1 function revealed by genome-wide analysis of transcription factor occupancy, histone modifications, and mRNA expression. *Genome Res* 19, 2172-84 (2009).
232. **Robertson, G. et al.** Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods* 4, 651-7 (2007).
233. **Fried, M. & Crothers, D.M.** Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9, 6505-25 (1981).
234. **Garner, M.M. & Revzin, A.** A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9, 3047-60 (1981).

235. **Wright, W.E., Binder, M. & Funk, W.** Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol Cell Biol* 11, 4104-10 (1991).
236. **Das, M.K. & Dai, H.K.** A survey of DNA motif finding algorithms. *BMC Bioinformatics* 8 Suppl 7, S21 (2007).
237. **Wasserman, W.W. & Sandelin, A.** Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet* 5, 276-87 (2004).
238. **GuhaThakurta, D.** Computational identification of transcriptional regulatory elements in DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 34, 3585-98 (2006).
239. **Chen, X. et al.** Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106-17 (2008).
240. **Herr, I., van Dam, H. & Angel, P.** Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis* 15, 1105-13 (1994).
241. **Jolly, E.R., Chin, C.S., Herskowitz, I. & Li, H.** Genome-wide identification of the regulatory targets of a transcription factor using biochemical characterization and computational genomic analysis. *BMC Bioinformatics* 6, 275 (2005).
242. **Tompa, M. et al.** Assessing computational tools for the discovery of transcription factor binding sites. *Nat Biotechnol* 23, 137-44 (2005).
243. **Wade, J.T., Reppas, N.B., Church, G.M. & Struhl, K.** Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the Escherichia coli genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev* 19, 2619-30 (2005).
244. **Yang, A. et al.** Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell* 24, 593-602 (2006).
245. **Frith, M.C. et al.** Detection of functional DNA motifs via statistical over-representation. *Nucleic Acids Res* 32, 1372-81 (2004).
246. **Dowell, R.D.** Transcription factor binding variation in the evolution of gene regulation. *Trends Genet* 26, 468-75 (2010).
247. **Boyer, L.A. et al.** Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-56 (2005).
248. **Conboy, C.M. et al.** Cell cycle genes are the evolutionarily conserved targets of the E2F4 transcription factor. *PLoS One* 2, e1061 (2007).
249. **Kunarso, G. et al.** Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. *Nat Genet* 42, 631-4 (2010).
250. **Loh, Y.H. et al.** The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-40 (2006).
251. **Odom, D.T. et al.** Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nat Genet* 39, 730-2 (2007).

252. **Tirosh, I., Reikhav, S., Levy, A.A. & Barkai, N.** A yeast hybrid provides insight into the evolution of gene expression regulation. *Science* 324, 659-62 (2009).
253. **Zheng, W., Zhao, H., Mancera, E., Steinmetz, L.M. & Snyder, M.** Genetic analysis of variation in transcription factor binding in yeast. *Nature* 464, 1187-91 (2010).
254. **Wilson, M.D. et al.** Species-specific transcription in mice carrying human chromosome 21. *Science* 322, 434-8 (2008).
255. **McDaniell, R. et al.** Heritable individual-specific and allele-specific chromatin signatures in humans. *Science* 328, 235-9 (2010).
256. **de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. & Subramani, S.** Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7, 725-37 (1987).
257. **Kothary, R. et al.** Inducible expression of an hsp68-lacZ hybrid gene in transgenic mice. *Development* 105, 707-14 (1989).
258. **Tsien, R.Y.** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-44 (1998).
259. **Mann, R.S. & Carroll, S.B.** Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12, 592-600 (2002).
260. **Bruce, A.W. et al.** Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10458-63 (2004).
261. **Fernandez, P.C. et al.** Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-29 (2003).
262. **Boutros, M. & Ahringer, J.** The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet* 9, 554-66 (2008).
263. **Badis, G. et al.** Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science* 324, 1720-3 (2009).
264. **Krig, S.R. et al.** Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem* 282, 9703-12 (2007).
265. **Martone, R. et al.** Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12247-52 (2003).
266. **Scacheri, P.C. et al.** Genome-wide analysis of menin binding provides insights into MEN1 tumorigenesis. *PLoS Genet* 2, e51 (2006).
267. **Gross, D.S. & Garrard, W.T.** Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 57, 159-97 (1988).
268. **Higgs, D.R., Vernimmen, D., Hughes, J. & Gibbons, R.** Using genomics to study how chromatin influences gene expression. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 299-325 (2007).

269. **Giresi, P.G., Kim, J., McDaniel, R.M., Iyer, V.R. & Lieb, J.D.** FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res* 17, 877-85 (2007).
270. **Felsenfeld, G. & Groudine, M.** Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-53 (2003).
271. **Vermaak, D., Ahmad, K. & Henikoff, S.** Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol* 15, 266-74 (2003).
272. **Sabo, P.J. et al.** Genome-wide identification of DNaseI hypersensitive sites using active chromatin sequence libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4537-42 (2004).
273. **Boyle, A.P. et al.** High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell* 132, 311-22 (2008).
274. **Crawford, G.E. et al.** DNase-chip: a high-resolution method to identify DNase I hypersensitive sites using tiled microarrays. *Nat Methods* 3, 503-9 (2006).
275. **Barrera, L.O. & Ren, B.** The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells--insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Curr Opin Cell Biol* 18, 291-8 (2006).
276. **Buckley, N.J.** Analysis of transcription, chromatin dynamics and epigenetic changes in neural genes. *Prog Neurobiol* 83, 195-210 (2007).
277. **Jenuwein, T. & Allis, C.D.** Translating the histone code. *Science* 293, 1074-80 (2001).
278. **Barski, A. et al.** High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-37 (2007).
279. **Heintzman, N.D. et al.** Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39, 311-8 (2007).
280. **Robertson, A.G. et al.** Genome-wide relationship between histone H3 lysine 4 mono- and tri-methylation and transcription factor binding. *Genome Res* 18, 1906-17 (2008).
281. **Azuara, V. et al.** Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8, 532-8 (2006).
282. **Bernstein, B.E. et al.** A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-26 (2006).
283. **Sharov, A.A. & Ko, M.S.** Human ES cell profiling broadens the reach of bivalent domains. *Cell Stem Cell* 1, 237-8 (2007).
284. **Gilmour, D.S. & Lis, J.T.** Detecting protein-DNA interactions in vivo: distribution of RNA polymerase on specific bacterial genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4275-9 (1984).
285. **Solomon, M.J. & Varshavsky, A.** Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6470-4 (1985).

286. **Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. & Grunstein, M.** Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92-6 (1996).
287. **Iyer, V.R. et al.** Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* 409, 533-8 (2001).
288. **Ren, B. et al.** Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290, 2306-9 (2000).
289. **Kim, T.H. et al.** A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876-80 (2005).
290. **Li, Z. et al.** A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8164-9 (2003).
291. **Mao, D.Y. et al.** Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 13, 882-6 (2003).
292. **Odom, D.T. et al.** Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303, 1378-81 (2004).
293. **Weinmann, A.S. & Farnham, P.J.** Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* 26, 37-47 (2002).
294. **Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M. & Wold, B.** Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 316, 1497-502 (2007).
295. **Hunter, S. et al.** InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* 37, D211-5 (2009).
296. **Haring, M. et al.** Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3, 11 (2007).
297. **Mutskov, V. & Felsenfeld, G.** Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *Embo J* 23, 138-49 (2004).
298. **Tariq, M. et al.** Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8823-7 (2003).
299. **Mathieu, O., Probst, A.V. & Paszkowski, J.** Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *Embo J* 24, 2783-91 (2005).
300. **Wick, N. et al.** Transcriptomal comparison of human dermal lymphatic endothelial cells ex vivo and in vitro. *Physiol Genomics* 28, 179-92 (2007).
301. **Durr, E. et al.** Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. *Nat Biotechnol* 22, 985-92 (2004).
302. **Elnitski, L., Jin, V.X., Farnham, P.J. & Jones, S.J.** Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res* 16, 1455-64 (2006).
303. **Denissov, S. et al.** Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires. *Embo J* 26, 944-54 (2007).

304. **Schmidt, D. et al.** ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions. *Methods* 48, 240-8 (2009).
305. **Yoshioka, Y., Suyari, O. & Yamaguchi, M.** Transcription factor NF-Y is involved in regulation of the JNK pathway during *Drosophila thorax* development. *Genes Cells* 13, 117-30 (2008).
306. **Witthöft, W.** Absolute anzahl und verteilung der zellen im him der honigbiene. *Zoomorphology* 61, 160-184 (1967).
307. **Bottomly, D., Kyler, S.L., McWeeney, S.K. & Yochum, G.S.** Identification of {beta}-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res* 38, 5735-45 (2010).
308. **Euskirchen, G. et al.** CREB binds to multiple loci on human chromosome 22. *Mol Cell Biol* 24, 3804-14 (2004).
309. **O'Neill, L.P. & Turner, B.M.** Immunoprecipitation of chromatin. *Methods Enzymol* 274, 189-97 (1996).
310. **Spencer, V.A., Sun, J.M., Li, L. & Davie, J.R.** Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31, 67-75 (2003).
311. **Euskirchen, G.M. et al.** Mapping of transcription factor binding regions in mammalian cells by ChIP: comparison of array- and sequencing-based technologies. *Genome Res* 17, 898-909 (2007).
312. **Wederell, E.D. et al.** Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res* 36, 4549-64 (2008).
313. **Dobi, K.C. & Winston, F.** Analysis of transcriptional activation at a distance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 5575-86 (2007).
314. **Kim, E., Magen, A. & Ast, G.** Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 35, 125-31 (2007).
315. **Maniatis, T. et al.** Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 609-20 (1998).
316. **Panne, D.** The enhanceosome. *Curr Opin Struct Biol* 18, 236-42 (2008).
317. **Sinha, S., Ling, X., Whitfield, C.W., Zhai, C. & Robinson, G.E.** Genome scan for cis-regulatory DNA motifs associated with social behavior in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16352-7 (2006).
318. **Bieda, M., Xu, X., Singer, M.A., Green, R. & Farnham, P.J.** Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res* 16, 595-605 (2006).
319. **Carroll, J.S. et al.** Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122, 33-43 (2005).
320. **Cawley, S. et al.** Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116, 499-509 (2004).

321. **Lupien, M. et al.** FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* 132, 958-70 (2008).
322. **Wei, C.L. et al.** A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124, 207-19 (2006).
323. **Sakharkar, M.K., Chow, V.T. & Kanguane, P.** Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* 4, 387-93 (2004).
324. **Lin, C.Y. et al.** Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet* 3, e87 (2007).
325. **Zeller, K.I. et al.** Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17834-9 (2006).
326. **Strachan, T., Read, A.P. & Matthes, D.J.** Human molecular genetics 2 (BIOS Scientific, Oxford, 1999).
327. **Ma, Q. et al.** Activating transcription factor 2 controls Bcl-2 promoter activity in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 101, 477-87 (2007).
328. **Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.X. & Karin, M.** Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *Embo J* 14, 5957-64 (1995).
329. **Kalodimos, C.G. et al.** Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes. *Science* 305, 386-9 (2004).
330. **Bruhat, A. et al.** ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res* 35, 1312-21 (2007).
331. **Abdel-Hafiz, H.A. et al.** Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol Endocrinol* 6, 2079-89 (1992).
332. **Du, W., Thanos, D. & Maniatis, T.** Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74, 887-98 (1993).
333. **Franklin, A.A. et al.** Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB). *J Biol Chem* 268, 21225-31 (1993).
334. **Liu, F. & Green, M.R.** Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature* 368, 520-5 (1994).
335. **Wagner, S. & Green, M.R.** HTLV-I Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science* 262, 395-9 (1993).
336. **Bruls, W.A., Slaper, H., van der Leun, J.C. & Berrens, L.** Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40, 485-94 (1984).
337. **He, Y.Y. et al.** Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance. *Oncogene* 25, 3680-8 (2006).

338. **Rigel, D.S.** Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 58, S129-32 (2008).
339. **Sutherland, J.C. & Griffin, K.P.** Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm. *Radiat Res* 86, 399-409 (1981).
340. **Blair, I.A.** DNA adducts with lipid peroxidation products. *J Biol Chem* 283, 15545-9 (2008).
341. **Girotti, A.W.** Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 63, 103-13 (2001).
342. **Kawanishi, S., Hiraku, Y. & Oikawa, S.** Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 488, 65-76 (2001).
343. **Kvam, E. & Tyrrell, R.M.** Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 18, 2379-84 (1997).
344. **Paunel, A.N. et al.** Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radic Biol Med* 38, 606-15 (2005).
345. **Podhaisky, H.P., Klapperstuck, T., Riemschneider, S. & Wohlrab, W.** Evidence for a role of nitric oxide in the mediation of antiproliferative UVA effects in keratinocytes. *Pharmacol Res* 45, 229-33 (2002).
346. **Villiotou, V. & Deliconstantinos, G.** Nitric oxide, peroxynitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet A (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Res* 15, 931-42 (1995).
347. **Wondrak, G.T., Jacobson, M.K. & Jacobson, E.L.** Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci* 5, 215-37 (2006).
348. **Zhang, X. et al.** Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem Photobiol* 65, 119-24 (1997).
349. **Herrlich, P., Karin, M. & Weiss, C.** Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol Cell* 29, 279-90 (2008).
350. **Klotz, L.O. et al.** Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur J Biochem* 260, 917-22 (1999).
351. **Maziere, C. et al.** UVA radiation stimulates ceramide production: relationship to oxidative stress and potential role in ERK, JNK, and p38 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 289-94 (2001).
352. **Silvers, A.L., Bachelor, M.A. & Bowden, G.T.** The role of JNK and p38 MAPK activities in UVA-induced signaling pathways leading to AP-1 activation and c-Fos expression. *Neoplasia* 5, 319-29 (2003).

353. **Zhang, Y. et al.** Signal transduction pathways involved in phosphorylation and activation of p70S6K following exposure to UVA irradiation. *J Biol Chem* 276, 20913-23 (2001).
354. **Zhang, Y. et al.** UVA induces Ser381 phosphorylation of p90RSK/MAPKAP-K1 via ERK and JNK pathways. *J Biol Chem* 276, 14572-80 (2001).
355. **Morton, S., Davis, R.J. & Cohen, P.** Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett* 572, 177-83 (2004).
356. **Ouwens, D.M. et al.** Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *Embo J* 21, 3782-93 (2002).
357. **Zhu, F., Zhang, Y., Bode, A.M. & Dong, Z.** Involvement of ERKs and mitogen- and stress-activated protein kinase in UVC-induced phosphorylation of ATF2 in JB6 cells. *Carcinogenesis* 25, 1847-52 (2004).
358. **Herdegen, T. et al.** Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation. *Neuroscience* 81, 199-212 (1997).
359. **Kawasaki, H., Taira, K. & Yokoyama, K.** Histone acetyltransferase (HAT) activity of ATF-2 is necessary for the CRE-dependent transcription. *Nucleic Acids Symp Ser*, 259-60 (2000).
360. **Liang, G., Wolfgang, C.D., Chen, B.P., Chen, T.H. & Hai, T.** ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* 271, 1695-701 (1996).
361. **Maekawa, T. et al.** Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol* 27, 1730-44 (2007).
362. **Papassava, P. et al.** Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res* 64, 8573-84 (2004).
363. **Ricote, M. et al.** The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J Pathol* 208, 401-7 (2006).
364. **Ronai, Z. et al.** ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* 16, 523-31 (1998).
365. **Wang, Q., Salman, H., Danilenko, M. & Studzinski, G.P.** Cooperation between antioxidants and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. *J Cell Physiol* 204, 964-74 (2005).
366. **Abbas, S. et al.** Preclinical studies of celastrol and acetyl isogambogic acid in melanoma. *Clin Cancer Res* 13, 6769-78 (2007).
367. **Bhoumik, A., Jones, N. & Ronai, Z.** Transcriptional switch by activating transcription factor 2-derived peptide sensitizes melanoma cells to apoptosis and inhibits their tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4222-7 (2004).

368. **Bhoumik, A. et al.** Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1674-9 (2008).
369. **Maekawa, T. et al.** ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene* 27, 1045-54 (2008).
370. **Chen, S.Y. et al.** Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous squamous cell carcinoma, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 51, 210-5 (2008).
371. **Knippen, S. et al.** Expression and prognostic value of activating transcription factor 2 (ATF2) and its phosphorylated form in mammary carcinomas. *Anticancer Res* 29, 183-9 (2009).
372. **Lewis, J.S. et al.** Activation of cyclin D1 by estradiol and spermine in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism involving the p38 MAP kinase and phosphorylation of ATF-2. *Oncol Res* 15, 113-28 (2005).
373. **Zoumpourlis, V. et al.** High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* 19, 4011-21 (2000).
374. **Kreutz, M.R. et al.** Co-expression of c-Jun and ATF-2 characterizes the surviving retinal ganglion cells which maintain axonal connections after partial optic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 69, 232-41 (1999).
375. **Leppa, S., Eriksson, M., Saffrich, R., Ansorge, W. & Bohmann, D.** Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 21, 4369-78 (2001).
376. **Yuan, Z. et al.** Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis. *Mol Cell Biol* 29, 2431-42 (2009).
377. **Rubinfeld, H. & Seger, R.** The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 31, 151-74 (2005).
378. **Grewal, S.S., York, R.D. & Stork, P.J.** Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9, 544-53 (1999).
379. **Herdegen, T. & Waetzig, V.** AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* 20, 2424-37 (2001).
380. **Raivich, G. & Behrens, A.** Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol* 78, 347-63 (2006).
381. **Bogomolova, E.V. et al.** Dopamine down-regulates activity of alkaline phosphatase in Drosophila: the role of D2-like receptors. *J Insect Physiol* 56, 1155-9 (2010).
382. **Beggs, K.T., Hamilton, I.S., Kurshan, P.T., Mustard, J.A. & Mercer, A.R.** Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 873-82 (2005).
383. **Bozzi, Y. & Borrelli, E.** Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it? *Trends Neurosci* 29, 167-74 (2006).

384. **van Dam, H. et al.** Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *Embo J* 12, 479-87 (1993).
385. **Ariizumi, K., Bergstresser, P.R. & Takashima, A.** Wavelength-specific induction of immediate early genes by ultraviolet radiation. *J Dermatol Sci* 12, 147-55 (1996).
386. **Gaudet, J. & Mango, S.E.** Regulation of organogenesis by the *Caenorhabditis elegans* FoxA protein PHA-4. *Science* 295, 821-5 (2002).
387. **Zhong, M. et al.** Genome-wide identification of binding sites defines distinct functions for *Caenorhabditis elegans* PHA-4/FOXA in development and environmental response. *PLoS Genet* 6, e1000848 (2010).
388. **Cui, J.Y., Gunewardena, S.S., Rockwell, C.E. & Klaassen, C.D.** ChIPing the cistrome of PXR in mouse liver. *Nucleic Acids Res* 38, 7943-63 (2010).
389. **Pfenning, A.R. et al.** Genome-wide identification of calcium-response factor (CaRF) binding sites predicts a role in regulation of neuronal signaling pathways. *PLoS One* 5, e10870 (2010).
390. **Orian, A. et al.** Genomic binding by the *Drosophila* Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* 17, 1101-14 (2003).
391. **Moore, M.J.** From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-8 (2005).
392. **Artamonova, I. & Gelfand, M.S.** Comparative genomics and evolution of alternative splicing: the pessimists' science. *Chem Rev* 107, 3407-30 (2007).
393. **Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G.** Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* 11, 345-55 (2010).
394. **Wahl, M.C., Will, C.L. & Luhrmann, R.** The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-18 (2009).
395. **Greenberg, M.E. & Ziff, E.B.** Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 433-8 (1984).
396. **Parker, R. & Song, H.** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11, 121-7 (2004).
397. **Chen, C.Y. & Shyu, A.B.** Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol* 14, 8471-82 (1994).
398. **Edwards, D.R. & Mahadevan, L.C.** Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *Embo J* 11, 2415-24 (1992).
399. **Yang-Yen, H.F., Chiu, R. & Karin, M.** Elevation of AP1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New Biol* 2, 351-61 (1990).
400. **Greenberg, M.E., Hermanowski, A.L. & Ziff, E.B.** Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol Cell Biol* 6, 1050-7 (1986).

401. **Rahmsdorf, H.J. et al.** Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res* 15, 1643-59 (1987).
402. **Blattner, C. et al.** UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol* 20, 3616-25 (2000).
403. **Bannister, A.J. & Kouzarides, T.** The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-3 (1996).
404. **Hermanson, O., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G.** Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab* 13, 55-60 (2002).
405. **Kamei, Y. et al.** A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-14 (1996).
406. **Dorsey, M.J. et al.** B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* 11, 2255-65 (1995).
407. **Levine, M. & Tjian, R.** Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-51 (2003).
408. **Alberti, S. et al.** Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6148-53 (2005).
409. **Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U. & Nordheim, A.** Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J* 17, 6289-99 (1998).
410. **Gauthier-Rouviere, C., Cavadore, J.C., Blanchard, J.M., Lamb, N.J. & Fernandez, A.** p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period. *Cell Regul* 2, 575-88 (1991).
411. **Miano, J.M. et al.** Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17132-7 (2004).
412. **Cooper, S.J., Trinklein, N.D., Nguyen, L. & Myers, R.M.** Serum response factor binding sites differ in three human cell types. *Genome Res* 17, 136-44 (2007).
413. **Gineitis, D. & Treisman, R.** Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. *J Biol Chem* 276, 24531-9 (2001).
414. **Doi, H. et al.** HERP1 inhibits myocardin-induced vascular smooth muscle cell differentiation by interfering with SRF binding to CArG box. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2328-34 (2005).
415. **Gonzalez Bosc, L.V., Layne, J.J., Nelson, M.T. & Hill-Eubanks, D.C.** Nuclear factor of activated T cells and serum response factor cooperatively regulate the activity of an alpha-actin intronic enhancer. *J Biol Chem* 280, 26113-20 (2005).
416. **Zhang, Y., Fillmore, R.A. & Zimmer, W.E.** Structural and functional analysis of domains mediating interaction between the bagpipe homologue, Nkx3.1 and serum response factor. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 297-309 (2008).

417. **Falvo, J.V., Parekh, B.S., Lin, C.H., Fraenkel, E. & Maniatis, T.** Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Mol Cell Biol* 20, 4814-25 (2000).
418. **Panne, D., Maniatis, T. & Harrison, S.C.** Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer. *Embo J* 23, 4384-93 (2004).
419. **Tanay, A.** Extensive low-affinity transcriptional interactions in the yeast genome. *Genome Res* 16, 962-72 (2006).
420. **Li, X.Y. et al.** Transcription factors bind thousands of active and inactive regions in the Drosophila blastoderm. *PLoS Biol* 6, e27 (2008).
421. **MacArthur, S. et al.** Developmental roles of 21 Drosophila transcription factors are determined by quantitative differences in binding to an overlapping set of thousands of genomic regions. *Genome Biol* 10, R80 (2009).
422. **Bulger, M. & Groudine, M.** Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144, 327-39 (2011).
423. **Sagai, T., Hosoya, M., Mizushina, Y., Tamura, M. & Shiroishi, T.** Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* 132, 797-803 (2005).
424. **Lomvardas, S. et al.** Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126, 403-13 (2006).
425. **Bushey, A.M., Dorman, E.R. & Corces, V.G.** Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell* 32, 1-9 (2008).
426. **Gaszner, M. & Felsenfeld, G.** Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7, 703-13 (2006).
427. **Valenzuela, L. & Kamakaka, R.T.** Chromatin insulators. *Annu Rev Genet* 40, 107-38 (2006).
428. **Bulger, M. & Groudine, M.** Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13, 2465-77 (1999).
429. **de Laat, W. et al.** Three-dimensional organization of gene expression in erythroid cells. *Curr Top Dev Biol* 82, 117-39 (2008).
430. **Dekker, J.** The three 'C' s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls. *Nat Methods* 3, 17-21 (2006).
431. **Simonis, M., Kooren, J. & de Laat, W.** An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat Methods* 4, 895-901 (2007).
432. **Miele, A., Gheldof, N., Tabuchi, T.M., Dostie, J. & Dekker, J.** Mapping chromatin interactions by chromosome conformation capture. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21, Unit 21 11 (2006).
433. **O'Neill, L.P. & Turner, B.M.** Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods* 31, 76-82 (2003).

J Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Uli Müller für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Freiheit, selbständig arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Botanik und Genetik, die mir ihre Geräte zur Verfügung gestellt haben und mit Rat und Tat beiseite standen. Insbesondere möchte ich mich bei Jasmin Gries und Sascha Tierling für die Durchführung der FLX-Sequenzierung bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Müller möchte ich mich für die gute und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken, Angelika für die histologische Arbeit, die Versorgung der Bienen und den Taxiservice, Bärbel für die Hilfe bei wissenschaftlichen Problemen, Katja für die Frischluftpausen, Iris für die Herstellung von Antikörpern, Helmut für die Hilfe bei Problemen mit der Statistik, Alfred und Michael für die Unterstützung bei technischen Problemen. Vielen Dank auch an alle anderen für die Zusammenarbeit, Gespräche und gemeinsame Reisen.

Meinen Eltern Rosel und Joachim danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben.

Meinen Schwiegereltern Trudel und Schorsch danke ich dafür, dass sie immer für meine Familie da sind.

Meinen Kindern Janne und Bent danke ich für die vielen heiteren Momente. Meiner Frau Martina danke ich für das mühselige Korrekturlesen, aber besonders für ihren Rückhalt und die allerbesten Kinder von der Welt.

K Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Name: Fabian Büttner

Geburtstag: 05.07.1974

Geburtsort: Kaltenkirchen

Schulbildung:

1981 – 1985 Grundschule Flottkamp in Kaltenkirchen

1985 – 1995 Gymnasium Kaltenkirchen
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: Janusz-Korczak-Schule in Kaltenkirchen
(Schule für Geistigbehinderte)

Hochschulausbildung:

1996 – 1998 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Universität Hamburg

1998 – 2006 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Abschluss als Diplom-Biologe; Thema der Diplomarbeit „Veränderung der Genexpression bei der Wanderratte nach zerebraler Ischämie“, Betreuer: Prof. Dr. Thorsten Burmester

Wissenschaftlicher Werdegang:

2006 – 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Saarland bei Prof. Dr. Gerald Thiel

2007 - 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biowissenschaften der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uli Müller

2007 Beginn der Promotion am Institut für Biowissenschaften der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uli Müller

Veröffentlichungen und Poster:

Büttner F. et al., Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion. *Brain Res.*, 2009. 1252:1-14

Büttner F. und Müller U., Transcriptional regulation of memory formation in the honeybee. 20th Neuro-DoWO Würzburg 2009 (Poster)

Büttner F. und Müller U., Stress regulated transcription processes in honeybee. 7th FENS Amsterdam 2010 (Poster)