

Transkriptionelle Regulation geprägter Gene
durch inter- und
intra-chromosomale Interaktionen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie der Johannes
Gutenberg-Universität in Mainz

Florian Bohne

geboren am 07.03.1984

Mainz, Mai 2018

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Zielsetzung.....	31
2.	Material und Methode.....	33
2.1	Verwendete Materialien.....	33
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	33
2.1.2	Antikörper.....	35
2.1.3	Medien, Lösungen und Puffer.....	35
2.1.4	Enzyme, Nukleotide, Molekulargewichtsstandards, Reaktionsagentien und Kits.....	38
2.1.5	Oligonukleotidsequenzen.....	40
2.1.6	Verwendete Zellen.....	44
2.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	45
2.1.8	Geräte.....	45
2.2	Zellbiologische Methoden.....	47
2.2.1	Zellkultur.....	47
2.2.2	Chemische Stabilisierung von P53.....	48
2.2.3	Induktion von P53 durch Bestrahlung.....	48
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	49
2.2.5	Transfektion humaner Zellen für einen siRNA-basierten Gen-Knockdown.....	49
2.3	DNA/RNA Standardmethoden.....	51
2.3.1	DNA-Isolierung mittels QiaGen PCR-Purification Kit.....	51
2.3.2	Isolierung genomischer DNA mittels Roche DNA-Kit.....	51
2.3.3	Isolierung von DNA mittels MSB Spin PCRapace Kit.....	52
2.3.4	DNA-Fällung mittels Ethanol und Natriumacetat.....	52

2.3.5	DNA-Fällung mittels Isopropanol	52
2.3.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
2.3.7	Bisulfit DNA-Umwandlung und Aufreinigung	53
2.3.8	RNA-Isolierung.....	54
2.3.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	55
2.3.10	cDNA-Synthese	55
2.3.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
2.3.12	Quantitative-Echtzeit-PCR und Schmelzpunktbestimmung	58
2.3.13	Agarose Gelelektrophorese.....	62
2.3.14	DNA-Fragmentgrößenbestimmung mittels Bioanalyser	62
2.3.15	Sequenzierung nach Sanger	63
2.4	Protein-Standardmethoden	64
2.4.1	Fraktionierte Proteinextraktion	64
2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	65
2.4.3	Fällung von Proteinen	65
2.4.4	SDS-PAGE und Westernblot	65
2.5	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	68
2.5.1	Chromatin-Fixierung, Lyse und Fragmentierung der Zellen	68
2.5.2	Chromatin-Immunopräzipitation	69
2.6	Circular chromosome conformation capture (4C)	70
2.6.1	Fixierung der 4C-Proben.....	70
2.6.2	Enzymatischer Verdau und Lyse der 4C-Proben	71
2.6.3	Bestimmung der Verdaueffizienz der 4C-Proben	71
2.6.4	Reverse Crosslink, Ligation und Aufreinigung der 4C-Proben	72

2.6.5	PCR für die 4C.....	73
3.	Ergebnisse	76
3.1	Molekulare Charakterisierung der Deletion der BWS Δ H19/ICR1-Zellen	76
3.1.1	Eingrenzung der Deletion mittels qPCR	77
3.1.2	Bruchpunktbestimmung der Deletion	79
3.2	Methylierungsanalyse der SRS- und BWS-Fibroblasten	81
3.3	Expressionelle Charakterisierung von Zellen mit verschiedenen Imprintingdefekten	83
3.3.1	Expressionsanalyse und Auswahl der Haushaltsgene.....	84
3.3.2	Vergleichende Expressionsanalyse der SRS- und BWS-Fibroblasten.....	86
3.4	Analyse regulatoriver Effekte von Kaiso auf die ICR1	90
3.4.1	Methylierungsanalyse nach Kaiso-Knockdown.....	91
3.4.2	Methylierungsanalyse nach KBS-Editierung.....	92
3.4.3	Expressionsanalysen von IGF2/H19 nach der KBS-Editierung	93
3.5	Interaktionsanalysen	94
3.5.1	Interaktionsanalysen der ICR1 mittels 4C	94
3.5.2	Interaktionsanalysen auf Chromosom 11p15.5 mittels T2C.....	96
3.6	Analyse von P53-Effekten auf IGF2/H19 bzw. die ICR1 nach Nutlin-3a-Zugabe.....	101
3.6.1	Nachweis der Induktion von P53 durch Nutlin-3a auf Proteinebene	102
3.6.2	Transkriptionelle Analysen nach P53-Induktion mit Nutlin-3a	103
3.7	Transkriptionelle Analyse nach P53-Knockdown	105
3.8	Nachweis der P53-Bindung an Enhancer- bzw. Promoterelemente von IGF2 und H19	108
3.8.1	Verifikation der Fragmentierung des Chromatins	109
3.8.2	Verifikation der CHIP mittels Kontrollregionen.....	110
3.8.3	Analyse der P53-Bindung an regulatorische Elementen von H19 und IGF2.....	111

3.8.4	Analyse der P53-Bindungen mittels ChIP-Seq.....	113
3.9	Analyse von P53 Effekten auf IGF2/H19 bzw. die ICR1 nach Bestrahlung.....	117
3.9.1	Nachweis der Induktion von P53 durch Bestrahlung auf Proteinebene.....	118
3.10	Expressionsanalysen nach der Bestrahlung.....	118
4.	Diskussion.....	121
4.1	Analyse von SRS- und BWS-Zellen mit unterschiedlicher molekularen Defekten	121
4.1.1	Molekulare Charakterisierung der verwendeten Fibroblasten	121
4.1.2	Vergleichende Expressionsanalysen der verwendeten Fibroblasten	127
4.1.3	Regulative Effekte von Kaiso auf die ICR1.....	134
4.1.4	Interaktionsanalysen der ICR1	137
4.2	Analyse von P53 im Zusammenhang mit IGF2 und H19	142
4.2.1	Transkriptionelle Effekte von P53	142
4.2.2	Transkriptionelle Effekte von P53 nach Induktion durch Bestrahlung	150
4.3	Ausblick.....	153
5.	Zusammenfassung.....	155
6.	Abstract	156
7.	Literaturverzeichnis.....	157
8.	Anhang	180
9.	Lebenslauf	182
9.1	Publikationen.....	184
9.2	Aktive Teilnahme an Tagungen und Kongressen	184
	Eidesstattliche Erklärung.....	185

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Zusammenspiel von DNA und Histonen	5
Abb. 1-2 Erhalt der genetischen Prägung in der Keimbahn	7
Abb. 1-3 Imprinting Cluster der Chromosomalen Region 11p15.5.....	9
Abb. 1-4 Schematischer Aufbau und Regulation der ICR1.....	10
Abb. 1-5 Vereinfachtes Modell der CTCF-Cohesin-Interaktionen im Bereich der ICR1.....	13
Abb. 1-6 Visualisierung der IGF2-Transkripte und -Promotoren im UCSC Genome Browser ...	15
Abb. 1-7 Vereinfachte Darstellung des P53 Netzwerks	18
Abb. 2-1 Schematische Darstellung der Neubauer-Kammer	49
Abb. 2-2 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz.....	50
Abb. 2-3 Amplifikationskurve eines qPCR-Laufs	60
Abb. 2-4 Standardkurve einer qPCR.....	61
Abb. 2-5 Aufbau des Semi-Dry-Blots.....	67
Abb. 3-1 Gelbild der Deletions-PCR mit Long Amp und IMAX-II-Polymerase	80
Abb. 3-2 Darstellung des von der Deletion betroffenen Bereichs auf Chromosom 11	81
Abb. 3-3 Differentiell methylierte CpG-Motive in der ICR1	82
Abb. 3-4 Methylierungsanalyse von SRS UPD11, BWS UPD11 und BWS Δ H19/ICR1	83
Abb. 3-5 Genexpression der Gene H19 und IGF2	87
Abb. 3-6 Expression der Gene des IC2, CDKN1C und KCNQ1OT1.....	88
Abb. 3-7 Expression der IGN-Gene.....	90
Abb. 3-8 Kaiso-Bindestellen in der ICR1	91
Abb. 3-9 Methylierung der ICR1 nach lentiviralem Kaiso-Knockdown	91
Abb. 3-10 Methylierung der ICR1 nach Editierung der KBS	93
Abb. 3-11 Expression von H19 und IGF2 nach Editierung der KBS	93
Abb. 3-12 Potentielle Interaktionsregionen der ICR1	95
Abb. 3-13 Schematische Darstellung der T2C-Methode.....	98
Abb. 3-14 Grafische Darstellung der T2C-Sequenzierung von Chromosom 11p15.5.....	99
Abb. 3-15 P53-Bindestellen-Cluster bei CS7	101

Abb. 3-16 Nachweis der P53-Protein Stabilisierung in SRS UPD11.....	103
Abb. 3-17 Expressionsanalysen von SRS UPD11 und SRS UPD7 nach N3a-Behandlung	105
Abb. 3-18 P53- und P21-Expression nach P53-Knockdown	106
Abb. 3-19 H19-, IGF2- und CDKN1C-Expression nach P53-Knockdown.....	107
Abb. 3-20 Fragmentgrößenbestimmung der DNA.....	109
Abb. 3-21 PolIII-Pulldown im GAPDH-Promoterbereich	110
Abb. 3-22 P53-Pulldown im P21-Promoterbereich.....	111
Abb. 3-23 P53-Pulldown in der Region bei CS7 und für den H19 Promoter.....	112
Abb. 3-24 ChIP-Seq Daten für die genomische Region um CDKN1A	115
Abb. 3-25 P53-Bindestellen im Bereich des CDKN1A-Promoters bzw. des ersten Introns	115
Abb. 3-26 ChIP-Seq Daten für die Regionen um CS7 bzw. der ICR1	116
Abb. 3-27 Visualisierung der ChIP-Seq Daten im UCSC-Genome-Browser für das IGF2-Gen..	117
Abb. 3-28 Westernblot zum Nachweis der P53-Akkumulation nach Bestrahlung	118
Abb. 3-29 P21- und MDM2-Expression nach Bestrahlung.....	119
Abb. 3-30 H19-, IGF2- und CDKN1C-Expression nach Bestrahlung.....	120
Abb. 4-1 Deletionen und Enhancerregionen auf Chromosom 11p15.5	126
Abb. 4-2 ChIP-Seq-Daten für P21 (CDKN1C) und CS7 von Verfaillie et al.....	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Klinischer und molekularer Vergleich von BWS und SRS.....	24
Tab. 2-1 Verwendete Antikörper für Westernblot	35
Tab. 2-2 Verwendete Antikörper für die CHIP.....	35
Tab. 2-3 Expressionsprimer	40
Tab. 2-4 Primer für CHIP und genomische DNA	42
Tab. 2-5 qPCR Primer für 4C-Verdautest.....	43
Tab. 2-6 Primer für die 4C-PCR.....	44
Tab. 2-7 siRNAs.....	44
Tab. 2-8 Verwendete Zellen	44
Tab. 2-9 Zellkulturgefäße	48
Tab. 2-10 Zusätze für die Bisulfit-Reaktion	53
Tab. 2-11 Bedingungen der Bisulfit-Konversion.....	54
Tab. 2-12 cDNA-Mastermix für Invitrogen RT	56
Tab. 2-13 cDNA Mastermix für NEB RT	56
Tab. 2-14 cDNA-Synthese-Protokoll für den Thermocycler	57
Tab. 2-15 Mastermix für die verschiedenen Polymerasen	57
Tab. 2-16 PCR Bedingungen für die Nested PCR bei der 4C.....	58
Tab. 2-17 Thermocycler-Protokoll für Long Amp Taq-Polymerase und IMAX-II-Polymerase..	58
Tab. 2-18 Zusammensetzung Sequenzierreaktion	63
Tab. 2-19 Thermocyclerprogramm für die Sequenzierreaktion	64
Tab. 2-20 Trenngel für SDS-PAGE.....	66
Tab. 2-21 Sammelgel für SDS-PAGE	66
Tab. 2-22 Komponenten der outer- und inner-PCR für die 4C	74
Tab. 2-23 PCR-Bedingung für outer- und inner-PCR der 4C.....	75
Tab. 3-1 Eingrenzung der Deletion mittels qPCR	79
Tab. 3-2 Verhältnisse der relativen Expression der Haushaltsgene.....	85
Tab. 8-1 Expressionsverhältnisse der Haushaltsgene	180
Tab. 8-2 DMRs von geprägten Region.....	181

Abkürzungsverzeichnis

'	Minuten
''	Sekunden
3C	chromosome conformation capture
4C	circular chromosome conformation capture
A	Adenin
AK	Antikörper
abs.	absolut
APS	Amoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
C	Celsius, Cytosin
ca.	zirka
cGy	centi Grey
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
cDNA	komplementäre DNA
CNV	copy number variation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Crossing Point
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CTS	CTCF-target site
DMR	differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelstränig, Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EtOH	Ethanol
EMSA	electromobility shift assay
Fish	Fluorescence in situ hybridization
G	Guanin
g	Gramm, Beschleunigungsmaß bei der Zentrifugation
Gy	Grey (radioaktive Maßeinheit)
h bzw. Std.	Stunde
IC	Imprinting Center
ICR	Imprinting Control Region
IGN	Imprinted Gene Network
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k.A.	keine Angabe
Kb	Kilobase(n)
KD	Knockdown

kDa	Kilodalton
l	Liter
lncRNA	long non coding RNA
LOI	loss of imprinting
M	Molmasse, molar bzw. mol/l
mA	Milliampere
mat	maternal
Min.	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mol	molar
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Probenanzahl
nc	non coding (nicht kodierend)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N3a	Nutlin-3a
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pat	paternal
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RE	Response Element
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunde(n)
shRNA	short-hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
s.l.	scrambled locus
SRS	Silver-Russell Syndrom
Std.	Stunde(n)
T	Thymin; Temperatur
TBP	Tata-Box-Bindeprotein
U	Unit(s)
UPD	uniparentale Disomie
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Wt	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

1. Einleitung

Epigenetik

Der Begriff „Genetik“ beschreibt im Allgemeinen die Vererbungslehre in der Biologie. Sie beschäftigt sich hauptsächlich mit der Vererbung der DNA, sowie ihrer Sequenz und den daraus resultierenden Phänotypen. Schon im 19. Jahrhundert gab es mit Persönlichkeiten wie z.B. Mendel, Miescher und Altmann die ersten Forscher auf diesem Gebiet - auch wenn die tatsächliche Sequenz der DNA zu dieser Zeit aufgrund der technischen Möglichkeiten noch keine Rolle spielte. Mitte des 20. Jahrhunderts wurde erstmals von Conrad Waddington der Begriff der Epigenetik definiert. Noch bis heute werden viele seiner Werke und Abbildungen, wie z.B. die epigenetische Landkarte, häufig zitiert Wilkins (1997). In seinem Buch „Principles of embryology“ definierte er die Epigenetik als die Eigenschaft der Gene, mit ihrer Umwelt zu interagieren und so den Phänotyp zu beeinflussen (Waddington, 1956). Er war somit einer der ersten Wissenschaftler der versuchte, einen Zusammenhang zwischen (Embryonal-) Entwicklung (Epigenese), Genetik und Evolutionsbiologie zu schaffen (Morange, 2009). Die neuere und heute noch aktuelle Definition entwickelte sich ab etwa 1982, als die Epigenetik in einem biologischen Wörterbuch als „die Interaktion von genetischen Faktoren und Entwicklungsprozessen, welche den Genotyp zum Phänotyp werden lassen“ beschrieben wurde (Lincoln, 1982). 1992 schrieb B.K. Hall in seinem Buch „Evolutionary Developmental Biology“, dass die Epigenetik bzw. ihre Kontrolle die Summe aller genetischen und nicht genetischen Faktoren ist. Diese nehmen selektiv Einfluss auf die Kontrolle der Genexpression und können so eine höhere Komplexität des Phänotyps nicht nur während der Entwicklung gewährleisten (Hall, 1992). Die heute wohl geläufigste Definition der Epigenetik wurde von Russo und Kollegen im Jahr 1996 in dem Buch „Epigenetics Mechanisms of generegulation“ als „mitotisch und/oder meiotisch vererbare Veränderungen der Genfunktion, die nicht über eine Änderung in der DNA-Sequenz erklärt werden können“ beschrieben (Russo *et al.*, 1996). Die Epigenetik kann zwar nicht nur auf der Basis der Genetik erklärt werden, dennoch haben die epigenetischen Prozesse einen großen und wichtigen Einfluss auf die Entwicklung der Lebewesen und spielen unter anderem eine Rolle in der Gameto- und Embryogenese, bei der Zelldifferenzierung und dem Erhalt der Zelllinien, bis hin zum programmierten Zelltod (Delcuve *et al.*, 2009). Das Leben eines Individuums ist somit nicht nur über sein Genom, sondern auch über viele Epigenome (z.B. für verschieden differenzierte Zellen) definiert (Szyf

Einleitung

et al., 2008). Der Epigenotyp bestimmt also den Status der Zellen bzw. deren Genexpressionsmuster, weshalb auch für die epigenetischen Informationen eine stabile Vererbung auf die nächste Zellgeneration unerlässlich ist (Holliday, 1994). Dennoch verändert sich das Epigenom während der Entwicklung, wird durch äußere Einflüsse geprägt und ist über die gesamte Lebensspanne zumindest in Teilen variabel (Szyf, 2007).

Für den Informationsspeicher, die Regulation und Veränderung des Epigenoms, gibt es viele verschiedene Faktoren. Die wichtigsten Bestandteile sind die Methylierung der DNA sowie die Struktur des Chromatins, welche z.B. durch Histonmodifikationen beeinflusst wird. Da die epigenetischen Prozesse aber hauptsächlich für die Steuerung der Expression der Gene zuständig sind, können auch andere Faktoren, wie beispielsweise Proteine oder regulative RNAs, Einfluss auf die Epigenetik nehmen (Szyf *et al.*, 2008).

Eine der am besten untersuchten epigenetischen Modifikation ist die Methylierung der DNA. Entdeckt wurde die DNA-Methylierung zuerst in Bakterien. Hier findet häufig eine Methylierung des Adenins an Position 6 statt. Die DNA-Methylierung bei Prokaryoten dient wahrscheinlich hauptsächlich dem Schutz vor Restriktionsendonukleasen aus fremden Organismen wie beispielsweise Viren, da diese an den methylierten Erkennungssequenzen die DNA nicht schneiden können (Wilson und Murray, 1991). Durch die Methylierung kann aber auch zwischen Eigen- und Fremd-DNA unterschieden werden (Jeltsch, 2002). Auch in vielen Eukaryoten, wie beispielsweise allen Vertebraten, vielen Invertebraten, aber auch in einigen Pflanzen, konnte die Methylierung der DNA anhand von methylierten Cytosinen nachgewiesen werden (Reik *et al.*, 2003). Dabei handelt es sich um die einzige bekannte kovalente Modifikation der DNA in höheren Eukaryoten (Jeltsch, 2002). Die Methylierung kann viele Funktionen erfüllen, beispielsweise die Stilllegung von Genen durch Promotermethylierung, X-Chromosom-Inaktivierung, die Steuerung des Imprintings (siehe Abschnitt genomisches Imprinting), aber auch die Regulation von Tumorsuppressorgenen. Eine Fehlregulation der Methylierung ist häufig mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert. Die ursprüngliche Entwicklung diente jedoch wahrscheinlich einem ähnlichen Zweck wie bei den Prokaryoten, da die Methylierung bestimmter Sequenzen dem Schutz vor intragenomischen Parasiten wie Virus- oder Retroelementen gedient haben könnte (Reik *et al.*, 2003). Im humanen Genom wurden bisher nur methylierte Cytosine, auf welche ein Guanin folgt (CpG-Motiv), beschrieben (Jeltsch, 2002). Bei einfachen einzelligen Eukaryoten,

Einleitung

wie beispielsweise der Algenart *Chlamydomonas reinhardtii*, wurde hingegen bereits im Jahr 1978 das Vorhandensein von methylierten Adeninen publiziert (Hattman *et al.*, 1978), wobei diese Modifikation allerdings nur einen sehr geringen Anteil von 0,4 -0,8 % aller Adenine des Genoms ausmacht (G.Z. Luo *et al.*, 2015). Neuere Studien zeigen, dass auch in anderen Eukaryoten, wie beispielsweise bei *Drosophila melanogaster*, eine Methylierung von Adeninen möglich ist und diese epigenetische Modifikation Einfluss auf die Expression von diversen Genen haben kann. Nicht ganz klar ist, ob auch für Adenin eine sequenzabhängige Methylierung wie bei den CpG-Motiven existiert (G.Z. Luo *et al.*, 2015).

Häufig liegen mehrere CpG-Motive als Cluster vor und bilden sogenannte CpG-Inseln, welche beispielsweise im Bereich von bestimmten Promotoren vorkommen. Insgesamt bestehen ca. 1-2 % des humanen Genoms aus CpG-Inseln (Delcuve *et al.*, 2009). Die palindromische Sequenz, welche durch die CpG-Motive vorgegeben wird, ist wichtig für die Replikation der Zellen, da nur auf diese Weise die korrekte Methylierung auf die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Während der Replikation trennen sich die beiden DNA-Stränge, sodass nach der Neusynthese nur einer der beiden Stränge methyliert vorliegt. Zu diesem Zeitpunkt ist die DNA somit hemimethyliert (Jeltsch, 2002). Durch die Methyltransferase DNMT1, welche den methylierten Strang erkennt, kann der Gegenstrang remethyliert werden. Sie dient daher dem Erhalt der Methylierung, sowohl bei der Replikation als auch einer stabilen Weitergabe während der Meiose. Durch das Fehlen von DNMT1 würde somit eine passive Demethylierung stattfinden. Allerdings existieren auch *denovo*-Methyltransferasen, wie beispielsweise die Enzyme DNMT3a und DNMT3b, welche unmethylierte CpG-Motive methylieren können (Reik *et al.*, 2003). Wie essentiell diese Enzyme sind, zeigten Knockout-Versuche mit Mäusen, bei denen jeweils die Methyltransferasen deletiert wurden. Der Knockout von *Dnmt1* und *Dnmt3b* wirkte sich schon im Embryo letal aus - bei fehlender *Dnmt3b* kamen die Mäuse zwar lebend zur Welt, verstarben jedoch kurz nach der Geburt (Jeltsch, 2002).

Eine weitere epigenetische Informationseinheit ist die Modifikation von Histonen. Histone dienen dazu, die Verpackung und die Zugänglichkeit der DNA im Zellkern zu organisieren. Hierfür wird eine Einheit der DNA von je 146 Basen um einen Histonkomplex gewickelt, welcher aus 8 Histonuntereinheiten besteht. Diese setzen sich zusammen aus den Histonen H2a, H2b, H3 und H4, welche jeweils als Dimer vorliegen und zusammen ein Oktamer bilden, welches der Interaktion mit der DNA dient. Die Einheit aus einem Histonoktamer und der DNA

Einleitung

wird als Nukleosom bezeichnet. Das Chromatin ist aus unzähligen solcher Okatamere aufgebaut, welche durch das Linkerprotein H1 verbunden werden (Luger *et al.*, 1997). Aus der Aneinanderreihung der Nukleosomen entwickelt sich unter anderem die Struktur der Chromosomen, welche dabei hilft, die gesamte Länge des DNA-Strangs im Zellkern unterbringen zu können (siehe Abb. 1-1). Des Weiteren spielt die Organisation der DNA in den Chromosomen eine essentielle Rolle für die Mitose und Meiose der Zellen (Kamakaka und Biggins, 2005), Neben der Funktion als Strukturgeber dienen die Histone auch als eine weitere Informationseinheit. Dabei wird der Erhalt und das Erkennen bzw. die Funktion der Information über Modifikationen an den Seitenketten der Histone gewährleistet. Vor über 40 Jahren wurde mit der Methylierung von Lysinen an den Histonseitenketten die erste Modifikation identifiziert. Kurz danach folgte die Entdeckung von Acetylierung und Phosphorylierung, gefolgt von der Ubiquitinylierung, ADP-Ribosylierung und erst vor wenigen Jahren die Sumoylierung (Mersfelder und Parthun, 2006). Die verschiedenen Modifikationen erlauben es, dass das Chromatin nicht, wie lange angenommen, starr und unflexibel ist, sondern sich je nach Bedarf der Zelle dynamisch verändern kann. So nimmt die Struktur des Chromatins Einfluss auf viele wichtige zelluläre Prozesse wie beispielsweise Replikation, Steuerung der Transkription, DNA-Reparatur, aber auch die Rekombination von chromosomalen Bereichen. Die große Variabilität wird durch viele Enzymkomplexe gewährleistet, welche die Histonmodifikationen einerseits spezifisch erkennen, andererseits aber auch durch Neusetzen oder Entfernen von Modifikationen gezielt verändern können (siehe Abb. 1-1) (Kamakaka und Biggins, 2005).

Aus den vielen Modifikationsmöglichkeiten ergibt sich eine fast unendliche Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten - so hat alleine das Histon H2 mind. 13 modifizierbare Aminosäuren und neben den einfachen Modifikationen wie Acetylierung können Lysine, welche methyliert werden, sowohl mono-, di- als auch tri-Methylierungen aufweisen (Kouzarides, 2007). Viele Modifikationen können inzwischen spezifischen Prozessen zugeordnet werden, so handelt es sich z.B. bei der Modifikation H3K9me3 um einen Marker für spät replizierendes, perizentrisches Heterochromatin (Bartova *et al.*, 2008).

Ferner scheinen sich Histonmodifikationen und die DNA-Methylierung gegenseitig beeinflussen zu können. So bieten methylierte DNA-Bereiche die Möglichkeit zur Rekrutierung von Proteinkomplexen, welche für die Modifikation von Histonen verantwortlich sind. Es gibt

Einleitung

aber auch Studien die zeigen, dass die Histonmodifikationen die DNA-Methylierung beeinflussen. Daher scheint die Hierarchie zwischen den beiden Modifikationskomplexen nicht klar festgelegt zu sein (Y. Kondo, 2009).

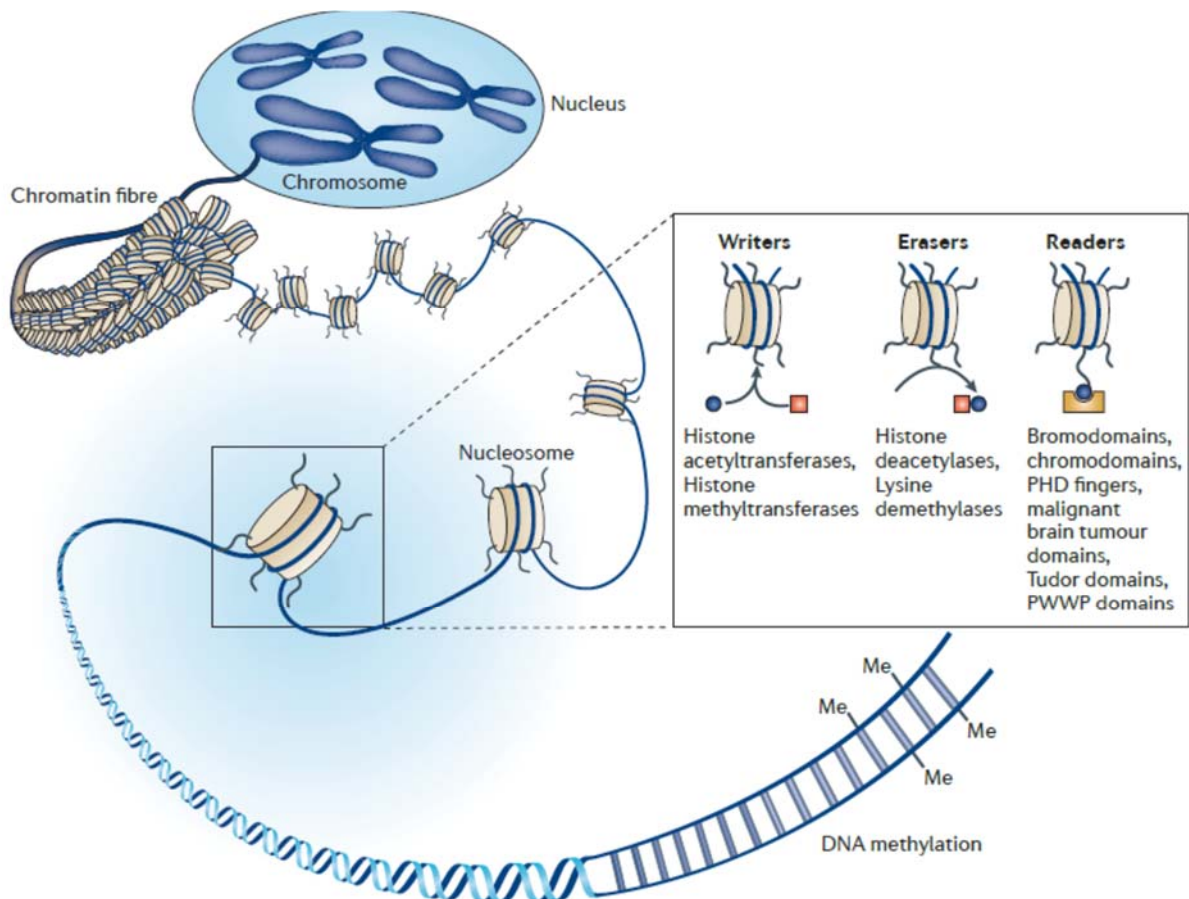


Abb. 1-1 Zusammenspiel von DNA und Histonen

Die kleinste Informationseinheit ist die DNA, welche zusätzlich zu ihrer Basensequenz methyliert vorliegen kann. Als nächste Einheit stehen die Histone zur Verfügung, aus welchen zusammen mit der DNA die Nucleosomen gebildet werden. Durch das Linkerprotein H1 werden die einzelnen Nucleosomen miteinander verbunden und bilden schließlich die Chromatinschleifen und -fasern, aus welchen die Chromosomen aufgebaut sind. Da die Histonmodifikationen für bestimmte Funktionen codieren, gibt es Proteine, welche spezifische Histonmodifikationen erkennen können (Readers). Die Histonmodifikationen sind variabel und es können sowohl neue Modifikationen von Enzymen gebildet werden (Writers), als auch nicht benötigte Modifikationen entfernt werden (Erasers) (Arrowsmith *et al.*, 2012).

Auch die Rolle von regulativen RNAs als epigenetischer Kontrollmechanismus nimmt immer konkretere Formen an. Die X-Chromosominaktivierung ist ein klassisches Beispiel für die Rolle einer ncRNA in einem epigenetischen Prozess. Im Laufe der Zeit wurden weitere RNAs gefunden, welche eine Funktion im Bereich der Epigenetik aufweisen können (J. Zhao *et al.*, 2010). Über verschiedene RNAs ist die gezielte Beeinflussung posttranskriptioneller Regulation möglich - so kann beispielsweise über eine endogene siRNA und die zugehörige siRNA-

Einleitung

Maschinerie die Expression der mRNA eines bestimmten Transkripts reduziert werden (Watanabe *et al.*, 2008). Andere Studien zeigten, dass lange ncRNAs Enzymkomplexe zu spezifischen Loci des Genoms dirigieren können, um gezielt in diesem Bereich beispielsweise die Histonmodifikationen zu verändern. Dabei handelt es sich vor allem um die Interaktion von lncRNAs mit PolyComb-Proteinen, welche wiederum häufig mit histonmodifizierenden Enzymen assoziiert sind (J.T. Lee, 2010).

Der Bereich der Epigenetik umfasst somit viele verschiedene Bestandteile, die alle zusammen Einfluss auf die Struktur des Chromatins und auf die Regulation der Expression von Genen nehmen können. Sie alle zusammen können flexibel auf den jeweiligen Bedarf der Zelle (z.B. während der Entwicklung) oder bestimmte durch die Umwelt ausgelöste Reize (wie beispielsweise Stress oder Toxine) reagieren und durch viele verschiedene Mechanismen die epigenetischen Prozesse steuern (Maleszka *et al.*, 2014).

Genomisches Imprinting

Ein Prozess, der ebenfalls stark von den epigenetischen Prozessen abhängt, ist das genomische Imprinting, welches die elterliche Prägung der betroffenen Gene beschreibt. Dabei handelt es sich um Gene, die in Abhängigkeit des elterlichen Allels monoallelisch exprimiert werden. Das genomische Imprinting weicht daher von den klassischen Vererbungsregeln ab und unterliegt keimbahn-spezifischen epigenetischen Modifikationen, welche abhängig von der Herkunft des elterlichen Allels vererbt werden (Ferguson-Smith, 2011; Murphy und Jirtle, 2003). Zurzeit sind ca. 150 geprägte Gene bekannt und in der „Imprinted Gene Datenbank“ zusammengefasst (<http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species> (J. Jirtle, 2017)). Das Imprinting entwickelte sich vor etwa 150 Mio. Jahren in den Vorfahren der Säugetiere und ist heute in Eutheria (Plazentatiere) und Metatheria (Beuteltiere) sowie den angiospermen Pflanzen zu finden (Murphy und Jirtle, 2003). Aber auch in einigen Insektenarten wurden genomische Prägungen beschrieben. In der Mückenart *Sciara* wurde erstmals beschrieben, dass bestimmte Verhaltensmuster in Abhängigkeit der elterlichen Chromosomen, welche eine Art Prägung aufweisen, entstehen können (Crouse, 1960).

Die Verteilung zwischen maternal und paternal reprimierten Genen scheint etwa gleich zu sein. Eine Eigenschaft, welche fast alle geprägten Gene auszeichnet, ist das Vorhandensein differentiell methylierter Regionen (DMR) (Reik und Walter, 2001). Mehrere geprägte Gene

Einleitung

liegen häufig in bestimmten Loci als Cluster vor, welche einer koordinierten epigenetischen Kontrolle unterliegen. Diese wird meistens über die zugehörigen DMRs gewährleistet, welche als „Imprinting Kontroll Regionen“ (Imprinting Control Regions (ICRs)) bezeichnet werden (Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015).

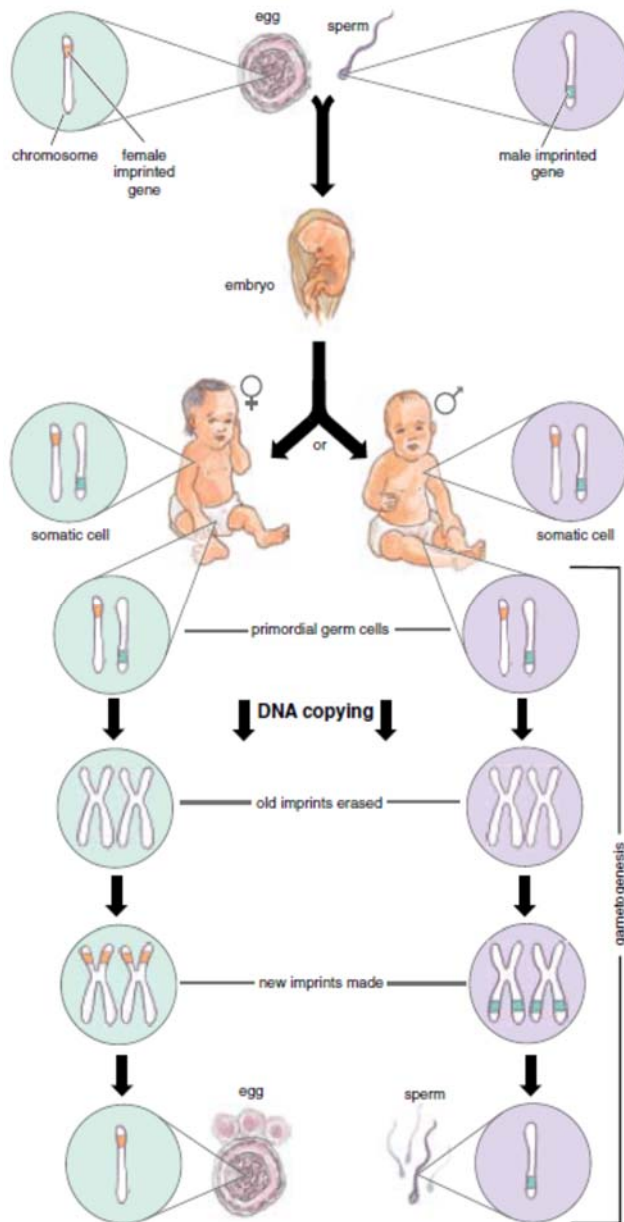


Abb. 1-2 Erhalt der genetischen Prägung in der Keimbahn
In der Abb. wird die Löschung und das Neusetzen der genetischen Prägung beschrieben (R. Jirtle und Weidman, 2007)

Die selektive Stilllegung von Genen während der genomischen Prägung wird während der Entwicklung der Gameten jedes Mal neu festgelegt. In den primordialen Keimzellen werden daher die ursprünglichen Prägungen gelöscht und durch die jeweils geschlechtsspezifischen ersetzt. Für eine normale Entwicklung ist es essentiell, dass die entstehende Zygote sowohl die maternalen als auch die paternalen Prägungen aufweist. Daher bleiben diese Markierungen auch während der in der Entwicklung des Embryos stattfindenden Demethylierungsphasen (siehe Abb. 1-2) erhalten (Murphy und Jirtle, 2003). Funktionell gesehen führt dieser Prozess also dazu, dass ein geprägtes Gen eine Art haploiden Status aufweist, da es nur von einem der beiden Allele exprimiert wird. Dies macht einen betroffenen Organismus allerdings auch anfälliger für negative Effekte wie beispielsweise Mutationen, da diese zumindest bei rezessiver Vererbung durch das gesunde Allel ausgeglichen werden könnten.

Darüber hinaus sind sie zusätzlich möglichen Veränderungen des Epigenoms ausgesetzt. Aufgrund dieser Nachteile sind Veränderungen in der Expression geprägter Gene häufig mit

Einleitung

der Entstehung von verschiedenen Tumoren, Asthma, Diabetes, Fettleibigkeit oder verschiedener anderer Entwicklungsstörungen assoziiert (R. Jirtle und Weidman, 2007).

Der Mechanismus des Imprintings muss also einen evolutionären Vorteil bieten, da die genomische Prägung bei allen untersuchten Säugetieren bestätigt werden konnte. Zum Imprinting existieren verschiedene Hypothesen, wobei sich die Wissenschaftler jedoch nicht einig sind, weshalb und zu welchem Zweck sich das Imprinting entwickelt hat (R. Jirtle und Weidman, 2007). Eine der bekanntesten Theorien ist die Konflikthypothese von Moore und Haig aus dem Jahr 1991. Diese beschreibt das Imprinting als eine Art Tauziehen von Mutter und Vater um die dem Fötus durch die Mutter zur Verfügung gestellten Ressourcen. Die mütterliche Seite will alle Ressourcen gut verteilt wissen, um möglichst vielen Nachkommen das Überleben zu sichern. Im Gegensatz dazu ist die väterliche Seite darauf ausgelegt, dass der durchsetzungsfähigste Embryo die begrenzten Ressourcen der Mutter effektiv nutzt um das Überleben des Stärksten und Durchsetzungsfähigsten in besonderem Maße zu fördern und dessen Genpool auf die nächsten Generationen übertragen zu können (Moore und Haig, 1991). Jirtle und Weidmann haben diesen Prozess in ihrem Artikel folgendermaßen beschrieben: „Wenn der Embryo ein Auto auf der Autobahn des Wachstums und der Entwicklung wäre, würde die väterliche Prägung versuchen das Auto zu beschleunigen, während die maternale es wieder bremsen würde“ (R. Jirtle und Weidman, 2007).

Imprinting Cluster in der chromosomalen Region 11p15.5

In der chromosomalen Region 11p15.5 sind zwei Imprinting Cluster zu finden: zum einen das Cluster um die Gene *IGF2* und *H19*, zum anderen das Cluster um die Gene *CDKN1C* und *KCNQ1*. Beide werden von ICRs reguliert, welche jedoch auf unterschiedliche Weise funktionieren (siehe Abb. 1-3). Die regulative Region der ICR2, auch als KvDMR1 bezeichnet, liegt direkt im Promoter des Gens *KCNQ1OT1*. Bei *KCNQ1OT1* handelt es sich um ein nicht codierendes Antisense-Transkript, welches im Intron 10 des *KCNQ1*-Gens lokalisiert ist (Du *et al.*, 2004). Die maternale Methylierung des Promoters ist maßgeblich für die Regulation des Imprinting Clusters verantwortlich (Horike *et al.*, 2000). So konnte bereits in der Maus gezeigt werden, dass die paternal exprimierte RNA *Kcnq1ot1* eine repressive Wirkung auf weitere Gene des Clusters, wie z.B. *Cdkn1c* und *Kcnq1*, aufweist (Kanduri, 2011). Aber auch der humanen *KCNQ1OT1*-RNA wird eine Rolle als regulativer Faktor für diese Region zugeschrieben (Chiesa *et al.*, 2012).

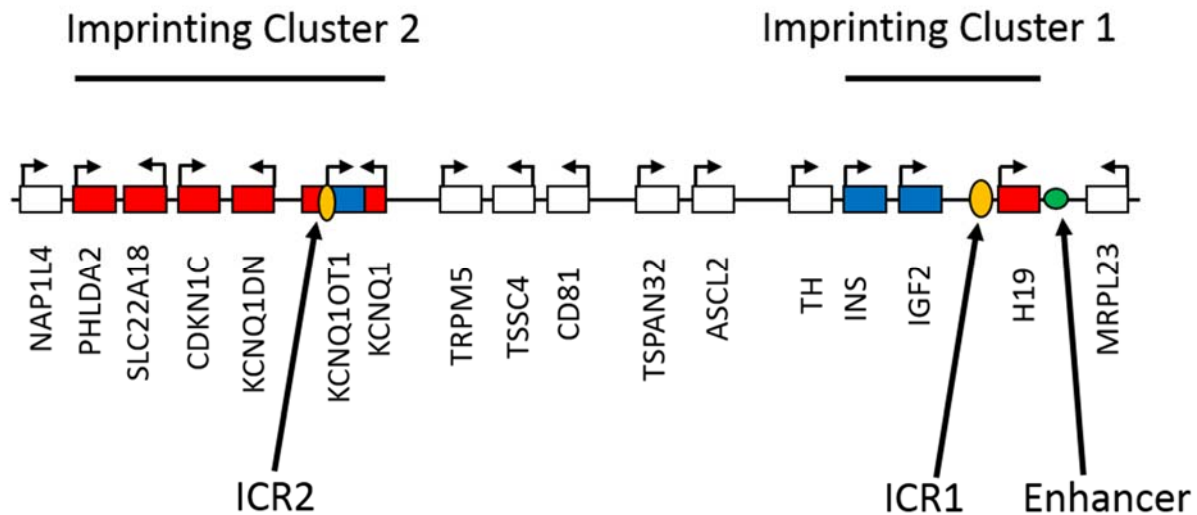


Abb. 1-3 Imprinting Cluster der Chromosomalen Region 11p15.5

Die Abb. zeigt eine schematische Darstellung der telomernahen Region 11p15.5, in welcher die beiden Imprintingcluster IC1 und IC2 lokalisiert sind. Die blau hinterlegten Gene *Ins*, *IGF2* und *KCNQ1OT1* weisen, abhängig von der Methylierung der ICR, eine paternale (teilweise gewebespezifisch) und die rot hinterlegten Gene wie beispielsweise *H19*, *KCNQ1* und *CDKN1C* eine maternale Expression auf. Die übrigen Gene (weiß) unterliegen nicht der allelspezifischen Prägung und werden von beiden Allelen exprimiert. Beim IC2 liegt die ICR (gelb) direkt im Promoter des Genes *KCNQ1OT1*, während sie beim IC1 zwischen den Genen *IGF2* und *H19* lokalisiert ist.

Bei der ICR1 handelt es sich um eine intergene ICR, welche zwischen den beiden Genen *IGF2* und *H19* liegt. Eine Gemeinsamkeit zur ICR2 und anderen ICRs ist, dass auch hier die Funktionsweise von der differentiellen Methylierung abhängt, der generelle Mechanismus ist jedoch ein anderer (Azzi *et al.*, 2014). Der Aufbau der ICR1 besteht aus sieben B- und zwei A-Repeats und ist in zwei Hälften aufgeteilt. Mit Ausnahme des verkürzten B4-Repeats weisen alle B-Repeats eine CTCF-Bindestelle auf, welche mit differentiell methylierten CpGs assoziiert sind. Die Bindung von CTCF kann jedoch nur an unmethylierte Sequenzen stattfinden (siehe Abb. 1-4). CTCF ist ein DNA-bindendes Zinkfingerprotein, welches eine Rolle in der Genregulation und als Chromatininsulator spielt (Abi Habib *et al.*, 2014). Des Weiteren sorgt CTCF dafür, dass der unmethylierte Status des maternalen Allels aufrechterhalten wird (Demars *et al.*, 2010). Eine korrekte differentielle Methylierung ist also essentiell für die Funktion und Regulation der ICR1, sowie die Expression von *IGF2* und *H19*. (siehe Abb. 1-4).

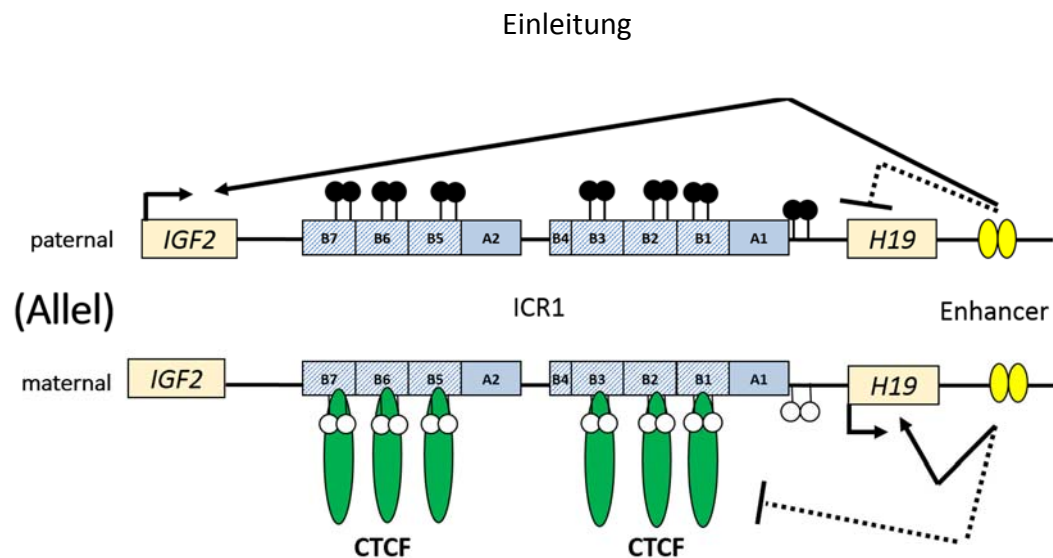


Abb. 1-4 Schematischer Aufbau und Regulation der ICR1

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau der ICR1 und wie durch die allelspezifische Bindung von CTCF die reziproke Expression der Gene *IGF2* und *H19* reguliert wird. Die Bindung von CTCF an das unmethylierte (weiße Kreise) maternale Allel blockiert den Enhancer-Zugang zum *IGF2*-Promoter und demzufolge auch die Expression von *IGF2*, erlaubt aber gleichzeitig die Expression von *H19*. Dagegen wird auf dem methylierten (schwarze Kreise) paternalen Allel die *H19*-Expression durch Promotermethylierung reprimiert und die Enhancer erhalten durch das Fehlen von CTCF Zugang zum Promoter von *IGF2* und können das Gen so aktivieren.

Ein Komplex aus ZFP57 und KAP1 bindet an alle bekannten ICRs und hält in vielen Fällen die differentielle Methylierung der ICRs aufrecht (Quenneville *et al.*, 2011). Doch obwohl auch die ICR1 Bindestellen für ZFP57 aufweist, scheint der Methylierungserhalt in dieser Region unabhängig von ZFP57 zu funktionieren (X. Li *et al.*, 2008). CTCF schützt das maternale Allel vor der Methylierung. Bisher konnte jedoch noch kein Protein identifiziert werden, welches für die Aufrechterhaltung der paternalen Methylierung verantwortlich ist.

Für die Regulation mittels CTCF gibt es zwei erklärende Modelle. Dies ist zum einen das Enhancer blocking-Modell (Bell und Felsenfeld, 2000), welches schematisch in Abb. 1-4 dargestellt ist und zum anderen das sogenannte Loopmodell, welches dreidimensionale Strukturen des Chromatins berücksichtigt und erstmals in der Maus beschrieben wurde (Murrell *et al.*, 2004).

Das Enhancer blocking-Modell von Bell und Felsenfeld beschreibt die Expression von *Igf2* und *H19* abhängig von CTCF in der Maus. Aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologien kann es aber auch auf den Menschen übertragen werden. Wie in Abb. 1-4 zu sehen ist, teilen sich *Igf2* und *H19* mehrere telomerwärts gelegene Enhancer, welche für beide Gene aktivierend auf deren Expression wirken können. Durch die differentielle Methylierung und CTCF-Bindung liegt jedoch eine reziproke Expression der Gene von beiden parentalen Allelen vor. Auf dem unmethylierten maternalen Allel kann CTCF binden und durch seine Insulatorfunktion die Interaktion der Enhancer mit dem *IGF2*-Promoter unterbinden und somit die Expression

Einleitung

verhindern, während gleichzeitig *H19* exprimiert wird. Auf dem paternalen Allel hingegen kann CTCF aufgrund der Methylierung nicht an die ICR1 binden - dies ermöglicht die Interaktion der Enhancer mit der *Igf2*-Domäne, wodurch *Igf2* aktiviert werden kann. Die Methylierung betrifft zusätzlich den *H19*-Promoter, so dass *H19* auf dem paternalen Allel inaktiv vorliegt (Bell und Felsenfeld, 2000).

Es ist bekannt, dass CTCF auch an der Bildung von Loopstrukturen chromosomaler Bereiche involviert ist und so aktive von inaktiven Bereichen separieren kann (Yusufzai *et al.*, 2004). Die Möglichkeit der dreidimensionalen Struktur, welche durch CTCF gebildet werden kann, ergänzt somit sehr anschaulich das Enhancer blocking-Modell. Für die Region um die ICR1 wurde dies erstmals im murinen System beschrieben. Murrell und Kollegen entdeckten, dass durch die differentielle Methylierung und CTCF-Bindung der beiden Allele unterschiedliche Chromatinfaltungen entstehen können (Murrell *et al.*, 2004). Der murine *Igf2*-Lokus weist mit der DMR0, DMR1 und DMR2 in der Maus drei differentiell methylierte Bereiche auf (Monk *et al.*, 2006). Mithilfe von 3C-Experimenten (Chromatin Conformation Capture) konnten Murrell und Kollegen zeigen, dass auf dem maternalen Allel die ICR1 mit der DMR1 interagiert, auf dem paternalen Allel hingegen mit der DMR2. Aus dieser Erkenntnis entwickelten sie ein Loopmodell für diese Region, in welchem *H19* auf dem maternalen Allel in einer aktiven Domäne liegt, während *Igf2* in einer inaktiven Domäne weit entfernt von den Enhancern lokalisiert ist. Auf dem paternalen Allel hingegen liegt eine andere Faltung vor, wodurch *Igf2* in die Nähe der Enhancer gebracht wird und somit aktiv transkribiert werden kann. *H19* befindet sich zwar auch in der aktiven Domäne, wird aber aufgrund seiner Promoter-Methylierung reprimiert (Murrell *et al.*, 2004). Erweiterte 3C-Analysen dieser Region konnten später tatsächlich zeigen, dass die distalen Enhancer nur auf dem paternalen Allel in räumlicher Nähe zum *Igf2*-Gen und den Promoterbereichen lagen. Durch den Vergleich von Mäusen mit beiden parentalen Allelen und Mäusen mit Mutationen der ICR1, welche die Bindung von CTCF verhinderten, konnte die chromosomale Schleifenbildung eindeutig dem paternalen Zustand der ICR1 zugeordnet werden. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die räumliche Lage der einzelnen Elemente der Region abhängig von der Bindung von CTCF an die ICR1 ist (Kurukuti *et al.*, 2006).

Ein Klärungsansatz, wie CTCF in die Chromatinschleifenbildung involviert sein könnte, zeichnet sich seit 2008 ab, als mehrere Arbeitsgruppen eine physische Interaktion von CTCF und

Einleitung

Cohesin nachweisen konnten (Parelho *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2008; Wendt *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang wurde die Interaktion von CTCF und Cohesin genauer untersucht. So wurden etwa in der Maus ca. 1800 Loci, an welchen sowohl CTCF- als auch Cohesinbindestellen vorliegen, identifiziert. Die sensitive CTCF-Bindung an die DNA erlaubt die Cohesinrekrutierung, abhängig vom epigenetischen Status des Locus (Parelho *et al.*, 2008). CTCF und Cohesin bilden dabei einen sogenannten „Loop-Erhaltungskomplex“, welcher für die vorgesehene Chromatinstruktur bzw. -interaktion von verschiedenen DNA-Bereichen verantwortlich ist (Hansen *et al.*, 2017). Bisher wurde angenommen, dass dieser Prozess relativ starr und invariabel ist (Ghirlando und Felsenfeld, 2016). Die Studie von Hansen und Kollegen zeigte jedoch, dass es sich hierbei um einen transienten und dynamischen Prozess handelt. Dabei rekrutiert CTCF das Cohesin an die entsprechenden Positionen der DNA, welche über das Cohesin physisch miteinander verbunden werden (Hansen *et al.*, 2017). Im humanen Genom sind über 9000 Bindestellen für Cohesin bekannt und in 89 % der Fälle konnten in unmittelbarer Nähe ebenfalls CTCF-Bindestellen nachgewiesen werden. Für einige dieser Regionen konnte bereits eine gemeinsame regulative Funktion beschrieben werden. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel ist die Region um die ICR1, sowie die Gene *IGF2* und *H19* (Wendt und Peters, 2009). Somit zeigte sich, dass eine Übertragung des Loopmodells auf den Menschen nicht nur möglich, sondern auch sinnvoll ist.

Die Chromatinschleifenbildung im Bereich der ICR1, initiiert durch CTCF und Cohesin, wurde erstmals von Nativio und Kollegen beschrieben. In der Region um die ICR1 befinden sich neben der ICR1 selbst weitere CTCF-Bindestellen, welche vor *IGF2* (CTCF AD (Adjacent to DMR0)), zwischen *IGF2* und der ICR1 (CCD (Centrally Conserved DNase I hypersensitive domain)), sowie telomerwärts hinter den Enhancern (CTCF DS (Downstream of the enhancers)) liegen (siehe Abb. 1-5). Ähnlich wie im murinen Loopmodell wird vermutet, dass die differentielle Methylierung und die somit veränderte CTCF-Bindung an der ICR1 verantwortlich für die parental unterschiedliche Schleifenbildung ist. Auch hier interagieren die distal gelegenen Enhancer nur auf dem paternalen Allel mit *IGF2*, so dass *IGF2* auf dem maternalen Allel aufgrund einer anderen Chromatinkonformation inaktiv vorliegt (Nativio *et al.*, 2009). Die chromosomale Faltung in Abhängigkeit der Methylierung der ICR1 scheint also analog wie in der Maus zu funktionieren.

Einleitung

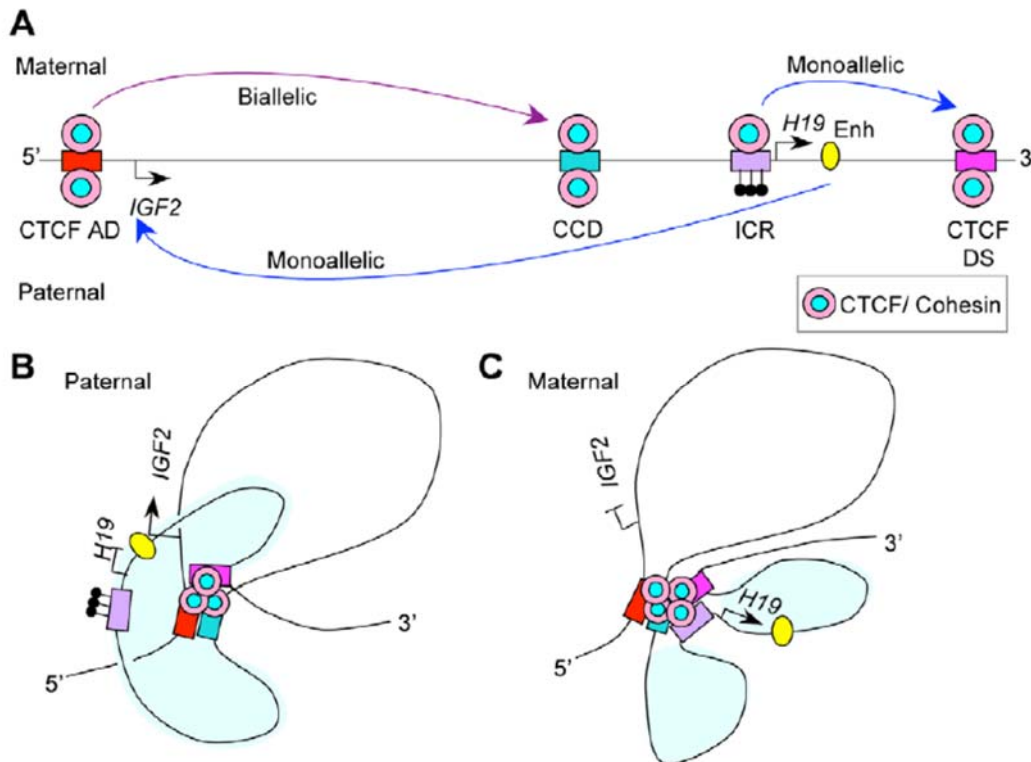


Abb. 1-5 Vereinfachtes Modell der CTCF-Cohesin-Interaktionen im Bereich der ICR1

In der Abb. ist schematisch die Interaktion der verschiedenen CTCF-Bindestellen im Bereich der ICR1 dargestellt. **A** Wie sich aus der linearen Darstellung ergibt, befinden sich neben der ICR1 drei weitere CTCF-Bindestellen in dieser Region, welche über die Bindung von CTCF über Cohesin miteinander interagieren können. Während auf dem maternalen unmethylierten Allel eine Verbindung zwischen der ICR und CTCF DS möglich ist, interagiert auf dem paternalen methylierten (schwarze Kreise) Allel stattdessen CTCF DS mit CTCF AD. Daraus ergeben sich zwei unterschiedliche Konformationen. **B** Auf dem paternalen Allel liegt *IGF2* in der aktiven Domäne (blau schattiert) nahe der Enhancer. **C** Auf dem maternalen Allel hingegen ist *IGF2* in einem inaktiven Bereich zu finden (Nativio *et al.*, 2009).

Bei den beschriebenen Enhancerelementen handelt es sich um 10 konservierte Segmente (CS1 - CS10), welche sowohl in der Maus, als auch im Mensch zu finden sind. Es besteht eine Sequenzhomologie von 68 – 85 %. Diese Elemente scheinen zumindest teilweise gewebe- bzw. keimblattspezifisch genutzt zu werden. So fungieren beispielsweise die Elemente CS3 und CS4 in der Maus nur in endodermalen Geweben als Enhancer (Ishihara *et al.*, 2000). Zusätzlich zu den abwärts von *H19* gelegenen Elementen existieren mindestens zwei weitere Elemente, welche zwischen der ICR1 und *IGF2* lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich um die Elemente HUC1 und HUC2 (*H19* upstream conserved regions), welche ebenfalls zwischen Maus und Mensch stark konserviert sind. Auch diese beiden Elemente scheinen einen transkriptionellen Effekt auf *IGF2* und *H19* ausüben zu können. Allerdings beschränken sich die beschriebenen Effekte gegenwärtig ausschließlich auf mesodermale Gewebe (Drewell *et al.*, 2002).

Die gewebespezifische Expression wird allerdings auch von den verschiedenen *IGF2*-Promotoren gewährleistet. Das *IGF2*-Gen besteht aus neun Exons und fünf verschiedenen

Einleitung

Promotoren (siehe Abb. 1-6). Durch alternatives Splicen und die variable Nutzung der Promotoren (P) können so verschiedene Transkripte von *IGF2* entstehen (Monk *et al.*, 2006). Die Analysen der *IGF2*-mRNAs ergaben eine Transkription der P2-, P3- und P4-Transkripte in vielen verschiedenen fetalen Geweben und adulten nicht hepatischen Geweben. In der adulten Leber hingegen werden P2, P3 und P4 deaktiviert, während P1 biallelisch aktiviert wird (Ekstrom *et al.*, 1995; Holthuizen *et al.*, 1993). Die Promotorbereiche P0, P2, P3 und P4 sind zwischen dem murinen und dem humanen Genom syntän konserviert (Monk *et al.*, 2006), während P1 ausschließlich beim Menschen vorkommt (Ekstrom *et al.*, 1995). Allerdings scheint die Funktion der Promotorbereiche in den verschiedenen Spezies nicht immer einheitlich zu sein. Während P0 in der Maus ausschließlich in der Plazenta aktiv ist, wird das humane P0-Transkript besonders stark im fetalen Muskelgewebe gebildet. Darüber hinaus konnte eine schwache ubiquitäre Expression in adulten Geweben und zeitweise in der Plazenta festgestellt werden (Monk *et al.*, 2006). Für den murinen P3-Promoter gelang es zudem, in Muskelzellen eine gewebespezifische Interaktion mit CS9 und eine daraus resultierende Expression von *IGF2* nachzuweisen. Aufgrund der Konservierung wird auch für das humane Genom eine CS9-abhängige Aktivierung von *IGF2* in Muskelzellen angenommen (Alzhanov *et al.*, 2010). Die Expression der *IGF2*-Transkripte P3 und P4 in humanen Fibroblasten (Prawitt *et al.*, 2005) scheinen die mesodermale Aktivität von P3 und P4 zu bestätigen.

Drei weitere Elemente in diesem Locus sind neben den bereits beschriebenen Faktoren die DMR0, DMR1 und die DMR2 (siehe Abb. 1-6), wobei die DMR1 nur im murinen Genom differentiell methyliert ist. Die genaue Funktion der DMR0 ist bisher allerdings unklar (Murrell *et al.*, 2008). Allerdings wurden verschiedene Tumorarten, wie unter anderem Prostata-, Oesophagus- und Kolorektalkarzinome mit einer Hypomethylierung der DMR0 assoziiert. Interessanterweise gehen diese Publikationen von einer paternalen Methylierung der DMR0 aus (Bhusari *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2008; Murata *et al.*, 2014; Murrell *et al.*, 2008; Schagdarsurengin *et al.*, 2017), während andere Veröffentlichungen eine maternale Methylierung der DMR0 beschreiben (Monk *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 1999). Die DMR2 dient als Interaktionspunkt für die endodermalen Enhancer. Court und Kollegen haben in murinen Leberzellen gezeigt, dass die untersuchten Enhancerbereiche nicht mit den *Igf2*-

Einleitung

Promoterregionen, sondern mit der DMR2 interagieren, aber dennoch die Expression von *Igf2* steigern können (Court *et al.*, 2011).

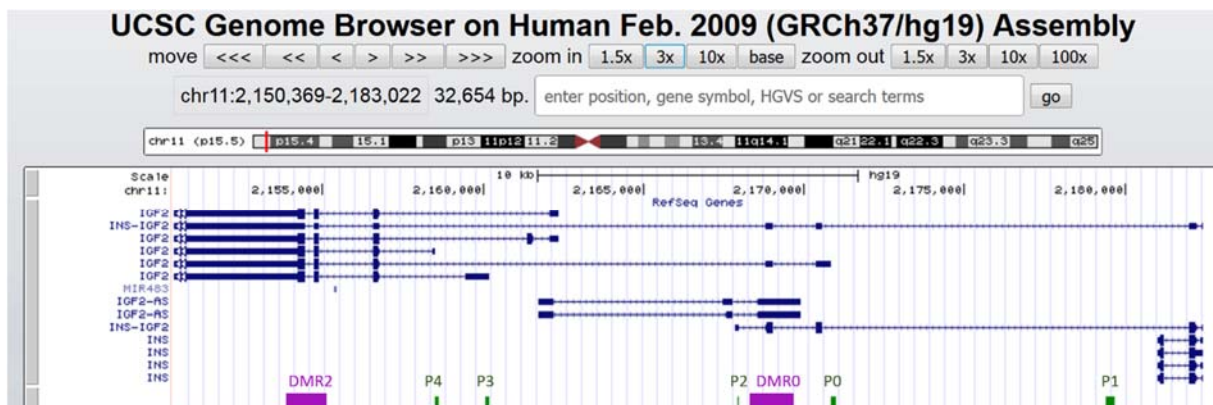


Abb. 1-6 Visualisierung der *IGF2*-Transkripte und -Promotoren im UCSC Genome Browser

In dem genomischen Bereich auf Chromosom 11p15.5 sind verschiedene *IGF2*-Transkripte sowie die fünf Promoterbereiche (grün) und die beiden humanen DMRs (violett) dargestellt.

Neben den beschriebenen cis-Interaktionen in der Region um die ICR1 sind auch trans-Interaktionen zwischen der ICR1 und anderen Chromosomen möglich. Mit mehreren 4C-Experimenten (circular chromosome conformation capture) konnten Zhao und Kollegen zeigen, dass in der Maus die ICR1 auf Chromosom 7 in direktem physischen Kontakt mit verschiedenen Regionen anderer Chromosomen steht. Bei der 4C wird ein Ausgangspunkt, wie beispielsweise die ICR1, über eine Formaldehydfixierung mit seinen Interaktionspartnern verbunden. Die interagierenden Elemente können mithilfe einer Ligation verbunden und im Anschluss per Sequenzierung identifiziert werden. Die Analyse der erstellten 4C-Bibliotheken ergab eine Überrepräsentation verschiedener geprägter Regionen und könnte auf ein epigenetisch reguliertes chromosomales Netzwerk hinweisen (Z. Zhao *et al.*, 2006). Auch andere Gruppen fanden ebenfalls trans-Interaktionen zwischen der ICR1 und anderen geprägten Regionen. So wurde beispielweise bei Versuchen mit fetalen Schweineleberzellen eine trans-Interaktion der ICR1 mit dem geprägten *MEG3-DLK1*-Locus beschrieben. Dies konnte auch in anderen Geweben bestätigt werden (Lahbib-Mansais *et al.*, 2016). Bei Analysen einer Interaktion zwischen der ICR1 und dem *Wsb1/Nf1*-Locus auf Chromosom 11 in der Maus wurde festgestellt, dass diese Interaktion CTCF-basiert ist. Dies legt eine Funktion von CTCF auch für trans-Interaktionen nahe. Weitere Analysen ergaben zusätzlich einen CTCF-vermittelten Einfluss auf die beiden interagierenden Gene, da ein Verlust von CTCF zu einer Auflösung der Interaktion, und damit einhergehend, zu einer veränderten Expression von *Wsb1* und *Nf1* führte (Ling *et al.*, 2006). Eine Funktion der CTCF-basierten Interaktionen

Einleitung

konnte auch im Zusammenhang mit der epigenetischen Reprogrammierung in murinen undifferenzierten männlichen Keimzellen (Spermatogonien) verifiziert werden. In den Spermatogonien, welche als Stammzellpopulation für die Entwicklung der Samenzellen dienen, wurde eine Interaktion der ICR1 mit den geprägten Regionen *Cpg2*, *Htr2a*, *Dlk1* und *Ins1* gefunden. Diese waren allerdings in den fertig gereiften Spermatozyten nicht mehr nachzuweisen, was wahrscheinlich daran liegt, dass die Interaktion allelspezifisch auf dem maternalen Allel zustande kommt. In den Spermatozyten ist jedoch nur noch ein Allel vorzufinden, welches eine paternale Prägung aufweist (Sandhu *et al.*, 2009).

Die ICR1 ist zusätzlich mit verschiedenen Histonmodifikationen assoziiert. Auf dem paternalen Allel sind die Modifikationen H3K9me3 und H4K20me3 zu finden, bei denen es sich um repressive Markierungen handelt (Nativio *et al.*, 2011). Diese sind allerdings nicht nur in der ICR1 zu finden, sondern konnten zusammen mit H3K4me3 in allen untersuchten ICRs nachgewiesen werden (McEwen und Ferguson-Smith, 2010). Die H3K9 tri-Methylierung kann durch die Bindung des Proteins MDB1 an die DNA, welches die Histonmethyltransferase SETDB1 rekrutiert, initiiert werden (Ichimura *et al.*, 2005). Es sind aber auch sieben weitere Methyltransferasen bekannt, welche H3K9me3 bilden können. Die Methylierung von H4K20 wird durch mehrere bekannte Methyltransferasen (Pr-SET 7/8, SUV4 20H1, SUV420H2 und SpSet 9) katalysiert (Kouzarides, 2007). Bei der maternalen ICR1 hingegen wurden die aktivierenden Modifikationen H3K4me2/3 und H3K9ac, sowie interessanterweise die inaktivierende Markierung H3K27me3 gefunden. H3K27me3 wurde in vielen verschiedenen Zellen analysiert, scheint aber nicht mit der Expression von *H19* zu korrelieren (Nativio *et al.*, 2011). Die tri-Methylierung von H3k27 wird von der Methyltransferase EZH2 und dem Polycomb-Repressive Complex 2 gewährleistet, welche jedoch häufig mit transkriptionell inaktiven chromosomalen Regionen assoziiert sind (Kaneko *et al.*, 2010). Die Methylierung von H3K4 kann von neun verschiedenen Methyltransferasen (MLL 1-5, SET1 A u. B, ASH1b und Sc/Sp SET1) gewährleistet werden, während die Acetylierung von nur einem Enzym übernommen wird (PCAF/GCN5) (Kouzarides, 2007).

Versuche in der Maus haben eine sehr ähnliche Verteilung der Histonmodifikationen im Bereich der ICR1 und den CTCF-Bindestellen ergeben. Die Versuche zeigten somit, dass sowohl die CTCF-Bindung, als auch die daraus resultierenden Interaktionen in diesen Bereichen abhängig von der DNA-Methylierung und den daran gekoppelten allelspezifischen Histonmodifikationen sind (Nativio *et al.*, 2011).

Einleitung

Eine korrekte Methylierung und Verteilung der Histonmodifikationen ist somit essentiell für die Regulation und Funktion dieser Region. Eine Fehlregulation in dieser Region ist häufig mit den Imprintingkrankungen Beckwith-Wiedemann- oder Silver-Russel-Syndrom assoziiert (siehe Abschnitt BWS und SRS).

Ein Faktor, der in der ICR1 binden und die Expression von *IGF2* und *H19* beeinflussen kann, ist das Zinkfingerprotein Kaiso. Die Bindung an die DNA wird durch zwei oder drei c-terminale Zinkfingerdomänen gewährleistet (Buck-Koehntop *et al.*, 2012). Das Protein weist eine dualspezifische Bindeeigenschaft auf, es kann sowohl an methylierte CGCG-Sequenzen, als auch an die unmethylierte Bindesequenz TNGCAGGA (KBS) binden (Daniel *et al.*, 2002; H.G. Yoon *et al.*, 2003). Die Bindung an CGCG-Motive wurde im Allgemeinen mit einer reprimierenden Wirkung auf die analysierten Gene beschrieben (Prokhortchouk *et al.*, 2001). Es konnte jedoch auch eine transkriptionelle Aktivierung in der Maus und im Huhn gezeigt werden (Rodova *et al.*, 2004). Auch in der humanen ICR1 liegen auf dem paternalen Allel mehrere methylierte CGCG-Motive, sowie auf beiden Allelen eine unmethylierte KBS im B4-Repeat vor. An beide Motive konnte mittels ChIP und EMSA eine Bindung von Kaiso nachgewiesen werden. Dies deutete auf eine Regulation im Bereich der ICR1 hin (Langer, 2012). In meiner Diplomarbeit konnte erstmals durch einen lentiviral basierten Knockdown von Kaiso ein transkriptionell aktivierender Effekt von Kaiso auf die Gene *IGF2* und *H19* gezeigt werden (Bohne, 2013).

Ein weiterer Faktor, welcher zumindest teilweise Einfluss auf die Regulation der Expression von *H19* und *IGF2* zu nehmen scheint, ist P53. Bei P53 handelt es sich um eines der vielleicht wichtigsten und vielseitigsten Proteine, welches je beschrieben wurde. Dies äußert sich unter anderem in der enormen Anzahl an publizierten Artikeln zu diesem Thema (89641, gelistet in NCBI, Stand 09.03.18). Es zeigt sich aber auch an der Vielzahl beschriebener Funktionen, auf die es Einfluss nimmt, wie beispielsweise Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Transkriptionsregulation, Apoptose und noch viele weitere. 1978 wurde P53 erstmals von zwei unabhängig voneinander arbeitenden Gruppen beschrieben (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen und weil P53 maßgeblich für die Integrität und die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verantwortlich ist, beschreibt D. Lane die Funktion von P53 als eine Art „molekularen Polizisten“ bzw. als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass P53-

Einleitung

Mutationen in vielen Tumorarten eine Rolle spielen und die Entstehung verschiedenster Tumore begünstigen. In einigen Tumorarten wurden P53-Mutationsraten von bis zu 50 % entdeckt (Hollstein *et al.*, 1994). Auch bei der Untersuchung von Wilms-Tumoren, welche häufig auch im Zusammenhang mit der Imprintingkrankung BWS auftreten (siehe Abschnitt BWS und SRS), wurden P53-Mutationen und eine Beteiligung von P53 entdeckt (Sredni *et al.*, 2001).

P53 kann über viele verschiedene Faktoren oder Prozesse aktiviert werden und auf viele verschiedene Vorgänge in der Zelle Einfluss nehmen. Ein Teil dieses riesigen Interaktionsnetzwerks ist in Abb. 1-7 dargestellt.

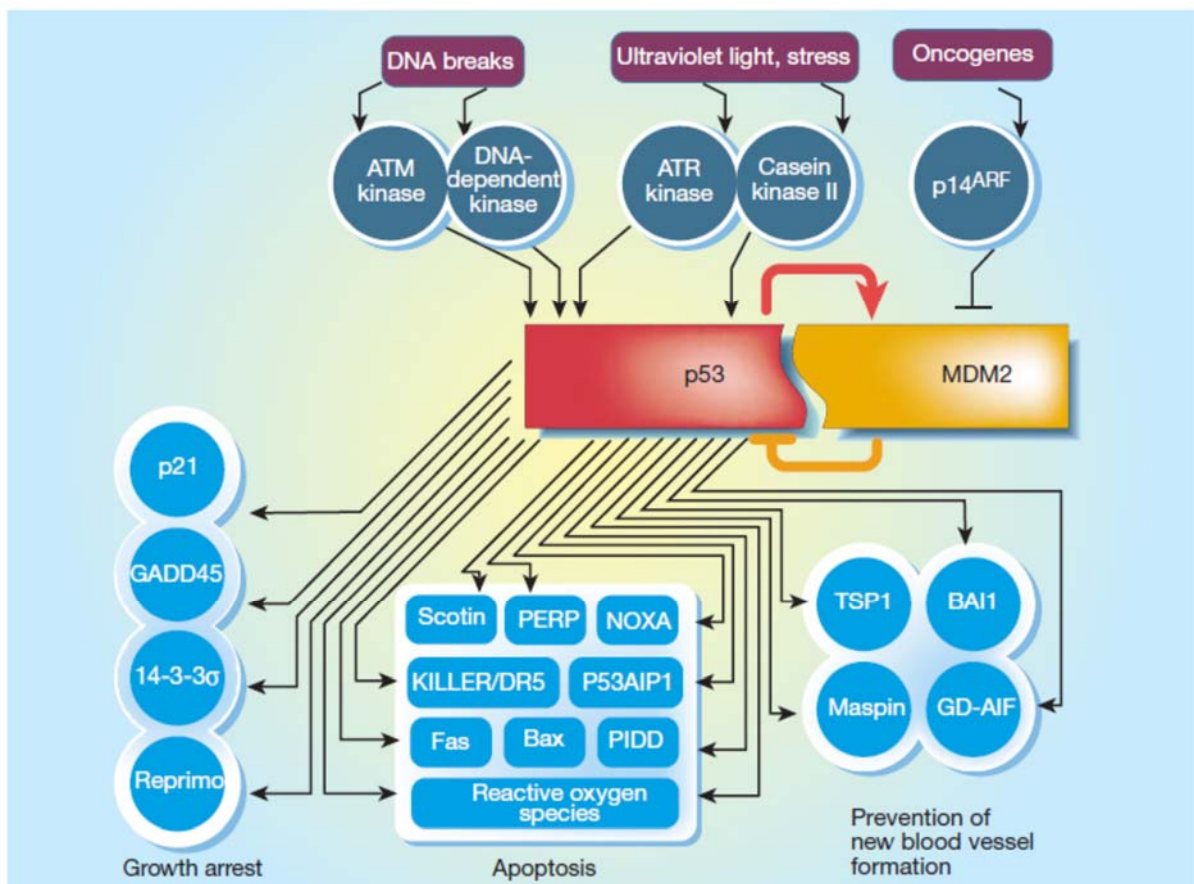


Abb. 1-7 Vereinfachte Darstellung des P53 Netzwerks

Die Abbildung zeigt schematisch, wie bzw. durch welche Faktoren P53 aktiviert werden kann, sowie eine Auswahl durch P53 beeinflusster Gene oder Elemente, welche z.B. auf die Prozesse Zellzyklusarrest, Apoptose oder die Bildung von Blutgefäßen Einfluss nehmen. Ein Kernelement hierbei ist die Interaktion mit MDM2, welches die P53-Protein-Konzentration in der Zelle niedrig hält. Durch die P53-Aktivierung wird diese Bindung gelöst und P53 kann auf verschiedenen Wegen aktiv werden (Vogelstein *et al.*, 2000).

Einleitung

Einer der wichtigsten Punkte dieses Netzwerks ist die Interaktion von P53 und MDM2 bzw. dem MDM2-Proteinkomplex, welcher für die Regulation von P53 in der Zelle verantwortlich ist. Durch die Bindung zu MDM2 wird die P53-Proteinkonzentration in der Zelle auf einem niedrigen Level gehalten. Bei MDM2 handelt es sich um eine Ubiquitinligase, welche durch die Ubiquitylierung von P53 dafür sorgt, dass das Protein proteolytisch abgebaut wird (Vogelstein *et al.*, 2000). Der Abbau kann sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma erfolgen. Die Ubiquitylierung durch MDM2 sorgt nicht nur für den Abbau, sondern auch für den Export aus dem Kern in das Zytoplasma. Dies wird über eine unterschiedliche Menge an Ubiquitinen gesteuert. Während eine Polyubiquitylierung dazu führt, dass P53 direkt im Kern abgebaut wird, bedingt eine Monoubiquitylierung den Export aus dem Kern und den Abbau im Zytoplasma (M. Li *et al.*, 2003). Findet nun ein Ereignis statt, welches P53 aktivieren soll, wird dieses Gleichgewicht aufgehoben. So reagiert die Zelle beispielsweise auf DNA-Schäden, die durch UV- oder radioaktive Strahlung entstehen können. Dies geschieht unter anderem durch die Phospho-Kinase ATM, welche P53 am Serin 15 phosphoryliert und so für die Dissoziation von P53 und MDM2 sorgt, oder durch die Kinasen CHK1 und CHK2. Diese können neben P53 allerdings auch MDM2 phosphorylieren und damit zusätzlich zur Destabilisierung der Interaktion von P53 und MDM2 beitragen (Fei und El-Deiry, 2003; Lavin und Gueven, 2006). Gleichzeitig ist die Modifikation am Serin 15 eine Prädisponierung für weitere Modifikationen, welche unter anderem für die Interaktion von P53 mit weiteren Faktoren wie beispielsweise dem Coaktivierungsfaktor P300 sorgen, welcher die transkriptionelle Funktion von P53 unterstützt. (Abraham, 2001; Lavin und Gueven, 2006; Shiloh, 2003; Vogelstein *et al.*, 2000). Inzwischen sind viele Faktoren, aber auch über 50 individuelle Modifikationsmöglichkeiten des P53-Proteins bekannt, welche den Regulationspfad des stabilisierten P53-Proteins steuern und in eine bestimmte Richtung lenken können. Viele seiner Funktionen erfüllt P53 als Transkriptionsfaktor, indem das stabilisierte Protein in den Zellkern transloziert wird und dort auf diverse Zielgene transkriptionellen Einfluss nehmen kann. Dabei bestimmen verschiedene spezifische Modifikation unter anderem die Bindeaffinität zu einem entsprechenden Promoter (Meek und Anderson, 2009; Toledo und Wahl, 2006). Die Akkumulierung von P53 kann auch durch chemische Substanzen wie Nutlin-3a (N3a) erfolgen, dabei kann jedoch der Stabilisierungsmechanismus abweichen. Bei Nutlin-3a handelt es sich um eine Substanz, welche durch eine Interaktion mit MDM2 die Binderregion für P53 blockiert und somit die Ubiquitylierung unterbindet. Dies führt zu einer Akkumulation von P53, allerdings ohne

Einleitung

spezifische Modifikationen. Die Bindung von P53 an die DNA scheint hierdurch jedoch nicht beeinträchtigt zu sein (Lavin und Gueven, 2006; Nikulenkov *et al.*, 2012). Es stellte sich allerdings heraus, dass die Bindung von P53 an die DNA per se nicht ausreichend für eine Regulierung der Genexpression ist und dies wahrscheinlich auf fehlende Modifikationen, welche sich auf die Interaktion mit weiteren Faktoren auswirken, zurückzuführen ist (Nikulenkov *et al.*, 2012).

Für seine Funktion als Transkriptionsfaktor bindet P53 an spezifische DNA-Sequenzen. Die Bindemotive sind aus zwei Halbseiten mit je zehn Basen aufgebaut, welche durch einen Spacer von 0-21 Basen getrennt sein können (Riley *et al.*, 2008; Vyas *et al.*, 2017). Die einzelnen Bindemotive bestehen optimalerweise aus den Basen RRRCWWGYYY, wobei an den einzelnen Positionen auch andere Basen möglich sind. (Menendez *et al.*, 2009). Die funktionelle Einheit besteht aus zwei P53-Dimeren, welche sich zu einem Tetramer zusammensetzen (McLure und Lee, 1998). In der Zelle liegen P53-Dimere und Tetramere im Gleichgewicht vor. Durch die Bindung von zwei Dimeren an die spezifische DNA-Sequenz findet eine Tetramerisierung statt, welche das Gleichgewicht in Richtung der Tetramere verschiebt (Weinberg *et al.*, 2004).

Neben dem regulären Bindemodus gibt es aber auch noch die Möglichkeit der hemispezifischen Bindung, bei welcher nur eins der beiden P53-Dimere an ein einzelnes Bindemotiv und das zweite Dimer an die benachbarte unspezifische DNA-Sequenz bindet (Vyas *et al.*, 2017). Durch die Bindung kann P53 weitere Faktoren, wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor IIH, rekrutieren und aktiviert so gemeinsam mit der Polymerase II den Promoter des entsprechenden Gens (Levine, 1997; Vogelstein *et al.*, 2000). Inzwischen sind sehr viele von P53 beeinflusste Gene bekannt, die tatsächliche Zahl ist jedoch unklar, da ständig weitere Gene entdeckt werden, auf welche P53 einen transkriptionellen Einfluss hat. Die Schwierigkeit besteht unter anderem darin, dass P53 je nach Aktivierungsart, Zelltyp oder zum Teil auch zellzyklusabhängig andere Effekt auslöst, so dass durch viele verschiedene Experimente jeweils andere Zielgene entdeckt wurden oder erst noch entdeckt werden. Des Weiteren konnten sowohl induzierende als auch repressive Effekte von P53 gezeigt werden (Yu *et al.*, 1999; R. Zhao *et al.*, 2000).

Neben vielen Genen, wie beispielsweise *c-fos*, *c-jun* und *c-myc*, hat P53 auch eine reprimierende Wirkung auf *IGF2* (Zhang *et al.*, 1996). So konnte unter anderem für den P4-Promoter des *IGF2*-Gens, zumindest in vitro, mittels Electromobility shift assay (EMSA) eine

Einleitung

direkte Bindung von P53 und ein damit einhergehender repressiver Effekt festgestellt werden (Zhang *et al.*, 1998). Auch auf den P3-Promoter scheint P53 einen transkriptionellen Einfluss zu haben, hier konnte allerdings keine direkte Bindung gezeigt werden. Allerdings wurde eine Proteininteraktion von P53 und dem Tata-Box-Bindeprotein (TBP) beschrieben. Die repressiven transkriptionellen Effekte auf *IGF2* werden höchstwahrscheinlich durch die Bindung dieses Komplexes über TBP an den P3-Promoter von *IGF2* ausgelöst (Zhang *et al.*, 1996). Weiterhin konnte zumindest im murinen System gezeigt werden, dass P53 auch einen Effekt auf die DNA-Methylierung haben kann. P53 nimmt in der Maus transkriptionellen Einfluss auf die Methyltransferasen Dnmt1 und Dnmt3b. Die Expression des *Dnmt1b*-Gens wird beispielweise durch die Bindung von P53 an das erste Exon reprimiert. Untersuchte P53-Knockout-Mäuse wiesen somit einen genomweiten Methylierungsverlust der DNA auf. Damit einhergehend zeigte sich auch eine Hypomethylierung der ICR1, welche mit einer Reprimierung der *Igf2*- und einer reziproken Erhöhung der *H19*-Expression einherging (Park *et al.*, 2005). Auch in anderen Zusammenhängen wurde P53 als reprimierender Faktor für *IGF2* beschrieben. Ein P53-Verlust ist beispielsweise ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung eines Nebennierenrinden-karzinoms. Versuche an Zelllinien des Tumors haben gezeigt, dass der Verlust von P53 mit einer Erhöhung der *IGF2*-Expression einhergeht, welche durch Überexpression von *P53* und anschließende Aktivierung mittels Bestrahlung wieder reduziert werden konnte (Sampaoli *et al.*, 2012).

Auch auf den *H19*-Promoter haben Experimente in Hela-Zellen eine inhibierende Wirkung von P53 gezeigt (Dugimont *et al.*, 1998). Untersuchungen in verschiedenen Tumorzelllinien ergaben, dass der reprimierende Effekt von P53 auf *H19* teilweise mit der Interaktion von P53 und dem Faktor Hif1- α zusammenhängen könnte. Hif1- α wird unter hypoxischen Bedingungen aktiviert und zeigte in diesem Zusammenhang eine Aktivierung von *H19*, jedoch nur bei fehlendem oder mutiertem P53. Tumore mit wtP53 zeigten im Vergleich eine signifikante Reduktion von *H19* (Matouk *et al.*, 2010). Allerdings scheint auch *H19* selbst einen Einfluss auf P53 zu haben. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass die *H19*-RNA mit dem P53-Protein interagiert und diese Interaktion eine repressive Wirkung auf P53-Ziele, wie beispielweise Bax, haben kann. Außerdem hat die microRNA 675, welche im ersten Exon von *H19* codiert ist, ebenfalls einen reprimierenden Effekt auf die Aktivierung von P53. (L)ncRNAs scheinen also auch ein wichtiger Teil des P53-Netzwerks sowohl up- als auch downstream von P53 zu sein (Chaudhary und Lal, 2017).

Einleitung

Eine (epi)genetische Veränderung der chromosomalen Region 11p15.5 kann mit der Entstehung eines Beckwith-Wiedemann oder Silver-Russell-Syndroms assoziiert sein.

Beckwith-Wiedemann und Silver-Russell Syndrom

Bei Beckwith-Wiedemann- (BWS) und Silver Russell-Syndrom (SRS) handelt es sich um seltene Erkrankungen, welche häufig auf einen Imprintingdefekt zurückgehen. Charakteristischerweise zeigen sich bei BWS-Patienten ein intrauteriner und postnataler Überwuchs und demgegenüber eine Wachstumsretardierung bei SRS-Patienten (Bell und Felsenfeld, 2000). Die wichtigsten klinischen und molekularen Merkmale der beiden Syndrome sind in Tab. 1-1 zusammengefasst.

SRS-Patienten weisen eine starke pre- und postnatale Wachstumsverzögerung, sowie häufig eine stark ausgeprägte Körperasymmetrie, auf. Hierbei handelt es sich jedoch um Symptome, welche auch bei anderen Erkrankungen, beispielsweise bei der idiopathischen intrauterinen Wachstumsretardierung, auftreten können. Von diesen Erkrankungen kann SRS durch seine weiteren phänotypischen Merkmale recht gut abgegrenzt werden. Hierzu zählt unter anderem die relative Makrozephalie, die dadurch zustande kommt, dass der Kopfumfang relativ normal, das Wachstum der Körperlänge oder das Gewicht jedoch stark verzögert sind. Weitere Auffälligkeiten sind Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme, eine charakteristische trianguläre Gesichtsform, welche durch eine auffällig hohe Stirn begünstigt wird, sowie einige Nebenmerkmale wie beispielsweise eine Klinodaktylie des 5. Fingers (Binder *et al.*, 2011; K. Eggermann *et al.*, 2016; Wakeling *et al.*, 2017). Für die klinische Diagnose wurde das Netchine-Harbinson Punktesystem entwickelt, nach welchem ein Patient als SRS-Fall diagnostiziert werden kann, wenn mindestens vier der sechs Hauptmerkmale erfüllt sind (Azzi *et al.*, 2015).

Die Hauptmerkmale (EMG) beim BWS sind Exomphalos, Makroglossie und Gigantismus, welcher sich als pre- und postnataler Überwuchs äußert, und auch hier häufig asymmetrisch auftritt. Nebenmerkmale, welche mit einer geringeren Häufigkeit auftreten, sind z.B. Organomegalie, in der Regel von der Niere, aber auch weiterer Organe, Ohr-Anomalien, neonatale Hyperglykämie und besonders auffällige Flammenmale im Gesicht (Naveus Flameus) (Choufani *et al.*, 2010; Neri und Moscarda, 2009; Weksberg *et al.*, 2001). Des Weiteren weisen die betroffenen Patienten ein erhöhtes Tumorrisiko auf. Das durchschnittliche Risiko liegt bei etwa 7,5 %, schwankt jedoch je nach Publikation zwischen

Einleitung

4% und 21 %, was an der hohen Heterogenität der Patienten liegen könnte (Choufani *et al.*, 2010). Die am häufigsten vorkommende Tumorart ist der Wilms Tumor, es wurden aber auch andere Tumore, wie beispielsweise Hepatoblastome, Rhabdomyosarkome oder auch Neuroblastome, bei BWS-Patienten beschrieben (Weksberg *et al.*, 2001). Die Diagnostik der Patienten erfolgt anhand der häufigsten phänotypischen Merkmale, welche nach Haupt- und Nebenmerkmalen eingeteilt werden und nach einem bestimmten Punktesystem gewertet werden. Während Makroglossie, Makrosomie und die abdominalen Wanddefekte immer zu den Hauptmerkmalen gezählt werden, sind sich die Autoren der publizierten Paper bei einigen der anderen charakteristischen Merkmale, wie beispielsweise den Ohrkerben, nicht immer einig, ob sie zu den Haupt- oder Nebenmerkmalen gezählt werden sollten. Außerdem sind manche der Nebenmerkmale nicht in alle Kataloge aufgenommen, sodass es je nach Protokoll zu Abweichungen kommen kann. Problematisch ist darüber hinaus, dass manche Patienten nur einen inkompletten Phänotyp aufweisen und dadurch teilweise durch das Raster fallen könnten, was allerdings auch für SRS-Patienten gilt (Ibrahim *et al.*, 2014). Aufgrund dieser Tatsachen wurde 2017 auf europäischer Ebene ein BWS-Konsensus-Treffen mit den führenden Experten auf diesem Gebiet organisiert, bei welchem ein einheitliches Merkmal- und Punktesystem etabliert wurde. Nach dem neuen System werden die dort festgelegten Kardinalsmerkmale mit je zwei Punkten bewertet und die Nebenmerkmale mit je einem Punkt. Bei Patienten mit mindestens vier Punkten kann eindeutig das BWS diagnostiziert werden - allerdings wird auch empfohlen, ab zwei Punkten eine molekulare Diagnostik durchzuführen, um auch Patienten, welche nur einen inkompletten Phänotyp aufweisen, als Patient im BWS-Spektrum erkennen zu können (Brioude *et al.*, 2018).

Die BWS-Patienten, sowie ein Großteil der SRS-Patienten, bei denen die molekulare Ursache eindeutig diagnostiziert wurde, weisen kausal (epi)genetische Defekte auf Chromosom 11p15.5 auf, welche mit den Imprinting-Clustern um *KCNQ1* bzw. *IGF2/H19* assoziiert sind und sich zumindest teilweise reziprok verhalten (Bell und Felsenfeld, 2000).

Die meisten BWS- und SRS-Fälle treten sporadisch auf, es wurden jedoch für beide Syndrome familiäre Fälle beschrieben, welche für BWS bei 10-15 % (Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015) und für SRS bei ca. 19 % liegen (Eggermann *et al.*, 2008). Während bei SRS-Patienten neben den häufig auftretenden Defekten auf Chromosom 11 auch Defekte auf anderen Chromosomen, wie beispielsweise auf Chromosom 7, und in seltenen Fällen auch auf den

Einleitung

Chromosomen 14 und 20, entdeckt wurden, beschränken sich die BWS-assoziierten Defekte bis jetzt auf Chromosom 11 (Wakeling *et al.*, 2017).

Bei SRS handelt es sich auf Chromosom 11 meistens um Epimutationen, die mit einer Methylierungsveränderung der ICR1 einhergehen. Die Hypomethylierung dieser Region macht mit mehr als 38 % den größten Teil der SRS-Patienten aus. In seltenen Fällen wurde auch eine maternale uniparentale Disomie (UPD11mat) der Region entdeckt, welche ebenfalls mit einer Hypomethylierung der ICR1 einhergeht. Viele BWS-Patienten weisen mit einer Hypermethylierung der ICR1 (5-10 %) oder einer paternalen UPD11 (ca. 20 %) einen gegensätzlichen Methylierungsdefekt auf. Ein Unterschied ist jedoch, dass bei BWS deutlich mehr Fälle mit Defekten im Bereich der ICR2 assoziiert sind als bei SRS. Die Hypomethylierung der ICR2 macht etwa 40-50 % der BWS-Fälle aus, hinzu kommen die paternalen UPDs, welche sowohl eine Hypermethylierung der ICR1, als auch eine Hypomethylierung der ICR2 beinhalten. Außerdem ist BWS mit *CDKN1C*-Mutationen (5 %) assoziiert, welche die Funktion von *CDKN1C* negativ beeinträchtigen, diese treten meist sporadisch auf, machen jedoch etwa die Hälfte der familiären BWS-Fälle aus (K. Eggermann *et al.*, 2016; Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015; Eggermann, Netchine, *et al.*, 2015; Wakeling *et al.*, 2017). Auch für SRS ist inzwischen eine *CDKN1C*-Mutation bekannt, die jedoch mit einer erhöhten Aktivität assoziiert ist (K. Eggermann *et al.*, 2016).

Tab. 1-1 Klinischer und molekularer Vergleich von BWS und SRS

Die Tabelle fasst die wichtigsten phänotypischen Merkmale und molekulare Ursachen der beiden Syndrome zusammen (verändert nach Eggermann *et al.*, 2015b).

Imprinting Erkrankung	Klinische Präsentation	Frequenz	Chromosomen/ Imprinting-region	Typ der Mutation/ Epimutation	Detektionsrate
Beckwith-Wiedemann Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • pre- und postnataler Überwuchs • Makroglossie • abdominale Wanddefekte • Hemihyperplasie • Organvergrößerungen • erhöhtes Risiko für kindliche Tumore 	1/15.000	11p15	upd(11p15)pat	ca. 20%
			<i>IGF2/H19</i> <i>KCNQ1</i> <i>CDKN1C</i>	chrom. Aberrationen Hypermethyl. Hypomethyl. Punktmutation	2-4% 5-10% 40-50% 5% (sporadisch) 40-50% (familiär)
Silver-Russell Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • schwere intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung • charakteristisches kleines trianguläres Gesicht • Hemihypoplasie • Ernährungsschwierigkeiten 	1/75.000- 1/100.000	7 11p15	upd(7)mat upd(11p15)mat Maternale Duplikation Hypomethyl. Punktmutation	ca. 10% wenige bekannt ≤1% ≥40-60% ein Fall bekannt

Einleitung

In einigen BWS-Fällen wurden auch chromosomale Aberrationen in Form von Translokationen oder Inversionen (1 %), bzw. paternal vermittelten Duplikationen (1 %), beschrieben, welche meist den Bereich des Gens *KCNQ1* betreffen (Weksberg *et al.*, 2010). Auch andere Mutationen, welche meistens die Expression von *IGF2* und *H19* beeinflussen, sind bekannt. Bei den familiären Fällen treten besonders häufig maternale Mikrodeletionen der ICR1 von etwa 1,4 - 1,8 Kb auf, welche mit einem Verlust von CTCF-Bindungen und somit auch mit einer Hypomethylierung und einer erhöhten *IGF2*-Expression einhergehen. Eine maternale Vererbung der Mikrodeletion ist direkt mit dem BWS-Phänotyp assoziiert, während bei einer paternalen Deletion des Chromosomenabschnitts ein gesunder Phänotyp zu erwarten ist (Prawitt *et al.*, 2005; Sparago *et al.*, 2004; Sparago *et al.*, 2007). Bei Untersuchungen von BWS-Patienten mit Punktmutationen in der OCT4/SOX2 Bindestelle bzw. Deletion stellte sich heraus, dass diese ebenso in einer erhöhten Methylierung der ICR1-Region resultieren. Im murinen System wurde gezeigt, dass OCT4/SOX2 zusammen mit CTCF eine protektive Funktion für den unmethylierten Status der ICR1 hat (Abi Habib *et al.*, 2014). Eine alternative Hypothese geht zusätzlich von einem Einfluss des richtigen Abstands der CTCF-Bindestellen aus, da bei einer größeren Deletion (2,2 kb), bei welcher die drei CTCF-Bindestellen der Repeats B5-B7 erhalten geblieben sind, die differentielle Methylierung erhalten geblieben ist (De Crescenzo *et al.*, 2011). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Postulation von Baskin *et al.*, dass etwa 40 % der erhöhten Methylierung in der ICR1 bei BWS auf Mutationen oder kleinere Deletionen, also auf eine Veränderung der Kopienanzahl des Locus (CNV), zurückzuführen sind. Aber auch größere Deletionen im Bereich der ICR1 mit bis zu 137 Kb, oder solche der ICR2 mit bis zu 330 Kb, sind beschrieben worden, welche jeweils einen Einfluss auf die Methylierung der ICR haben (Baskin *et al.*, 2014). Die sehr heterogenen Defekte bei den BWS-Patienten haben auch einen Einfluss auf den Phänotyp, so ist beispielsweise die Hemihypertrophie hauptsächlich mit einer paternalen UPD11 und ein erhöhtes Wilms-Tumor-Risiko mit einer Hypermethylierung der ICR1 assoziiert. Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit einer *CDKN1C*-Mutation oder einer ICR2-Hypomethylierung häufiger einen Exomphalos auf. Für die BWS-Patienten ist daher eine genaue molekulare Bestimmung des Subtyps für die Prognose und eine individuelle Therapie unabdingbar (Eggermann, Netchine, *et al.*, 2015).

Während für BWS die Defekte bislang nur auf Chromosom 11 zurückzuführen sind, weist ein nicht unerheblicher Teil der SRS-Patienten Defekte auf anderen Chromosomen auf. In bis zu 30% der Fälle konnte die molekulare Ursache nicht identifiziert werden. Ca. 10 % der SRS-Fälle

Einleitung

weisen eine maternale UPD des Chromosoms 7 auf. Auch hier befinden sich einige Cluster geprägter Gene, die evtl. mit der Entstehung von SRS in Verbindung gebracht werden können. Auf Chromosom 7q werden die Gene *MEST*, *CPA4* und *COPG2* (Eggermann *et al.*, 2012) und auf 7p das Gen *GRB10* (growth factor receptor-bound protein) im Zusammenhang mit SRS diskutiert (Blagitko *et al.*, 2000). Mit Ausnahme zweier Patienten, welche eine paternale Deletion des *MEST*-Lokus bzw. eine Mikrodeletion im codierenden Bereich des *MEST*-Gens aufweisen, wurden bisher jedoch keine pathogenen Mutationen oder veränderte Methylierungen der einzelnen Regionen selbst im Zusammenhang mit SRS beschrieben. (Carrera *et al.*, 2016; Eggermann *et al.*, 2012). Auch im Mausversuch wurde durch den paternalen Verlust von *Mest* (*Peg1*) eine Wachstumsretardierung gezeigt, welche aufgrund von Sequenzhomologien auch auf den Menschen übertragbar scheint (Lefebvre *et al.*, 1997).

In seltenen Fällen wurden auch Veränderungen auf anderen Chromosomen, wie Translokationen im Bereich 17q24-q25 (Eggermann *et al.*, 2008) oder auf den Chromosomen 14, 16 und 20, beschrieben. Die bei SRS-Patienten entdeckten Defekte auf Chromosom 14 konnten aber auch mit dem Temple-Syndrom in Verbindung gebracht werden, so dass hier evtl. eine Überschneidung zwischen den beiden Syndromen vorliegen könnte. Des Weiteren wurden bei wenigen SRS-Patienten Veränderungen in Form von paternalen UPDs auf Chromosom 16 und maternalen UPDs auf Chromosom 20 entdeckt. Bei acht Patienten mit einer maternalen UPD20 wies keiner eine Makrozephalie oder eine Körperasymmetrie auf, weshalb sie in der klinischen Diagnose etwas vom klassischen Phänotyp des SRS abweichen. Auch ist bis jetzt noch nicht klar, welche Gene oder Gengruppen auf den anderen Chromosomen für die Verbindung zum SRS verantwortlich sind (Wakeling *et al.*, 2017).

Imprinting Defekte auf anderen Chromosomen können ebenfalls zu Imprintingkrankungen führen, welche häufig auch durch reziproke Defekte ausgelöst werden. Auf Chromosom 14 sind gegensätzliche epigenetische Störungen mit dem Temple Syndrom bzw. dem Kagami-Ogata Syndrom assoziiert (Kagami *et al.*, 2015; Temple *et al.*, 1991). Während bei etwa 78 % der Temple Syndrom-Patienten eine maternale UPD des Chromosoms 14 vorliegt, wurde bei 65 % der Kagami-Ogata Syndrom-Patienten eine paternale UPD festgestellt (Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015). Die Expression der betroffenen Gene *RTL1*, *DLK1* und *MEG3* wird von zwei verschiedenen DRMs reguliert, welche auf dem paternalen Allel methyliert und auf dem maternalen Allel unmethyliert vorliegen. Daher können neben den UPDs auch parentale

Einleitung

Deletionen oder Methylierungsstörungen für den entsprechenden Phänotyp verantwortlich sein (Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015; Kagami *et al.*, 2008). Störungen im Cluster der Gene *UBE3A*, *NDN*, *NPAP1* und *SNRPN* auf Chromosom 15 verursachen häufig die Imprintingkrankungen Angelman (AS) bzw. Prader-Willi Syndrom (PWS). Die zugehörige DMR, welche für die Regulation der Gene verantwortlich ist liegt auf dem maternalen Allel methyliert und auf dem paternalen Allel unmethyliert vor. Epigenetische Defekte, die zu einer Hypermethylierung führen, sind mit dem PWS assoziiert, während eine Hypomethylierung zum AS führt. Die beiden Syndrome werden auch zu den Mikrodeletionssyndromen gezählt, da bei etwa 70 % der PWS-Patienten eine Deletion des paternalen Allels und bei 70 % der AS-Patienten eine Deletion des maternalen Allels vorliegt - aber auch maternale bzw. paternale UPDs sind als Ursache möglich (zusammenfassend Eggermann *et al.* 2015a).

Eine Fehlregulation des paternal exprimierten Faktors *PLAGL1* auf Chromosom 6 führt zu einem transienten neonatalen Diabetes Melitus (TNDM). Die Expression von *PLAGL1* wird ebenfalls durch eine DMR reguliert, welche auf dem paternalen Allel unmethyliert vorliegt. TNDM ist mit einer Überexpression von *PLAGL1* assoziiert, welche durch eine patUPD6 oder einer paternale Duplikation ausgelöst werden kann (Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015; Gardner *et al.*, 2000). In seltenen Fällen ist auch eine maternale UPD6 möglich, welche mit SRS-ähnlichen Merkmalen assoziiert wurde (Sachwitz *et al.*, 2016). Dieses und weitere Beispiele zeigen, dass auch eine Überlappung der phänotypischen Merkmale zwischen einzelnen Syndromen und den betroffenen Chromosomen möglich ist. Eine zunehmende Anzahl an Patienten mit einer Imprintingkrankung wie beispielsweise BWS wiesen nicht nur in der für BWS spezifischen Region eine Methylierungsveränderung auf, sondern auch in anderen geprägten Regionen. In diesen Fällen handelt es sich um multi-Lokus Imprintingdefekte oder auch multi-Lokus Methylierungsdefekte, welche sich unter Umständen im klinischen Bild etwas von den Patienten, bei denen nur ein Locus betroffen ist, unterscheiden können (Eggermann *et al.*, 2014; Eggermann, Netchine, *et al.*, 2015). Eine weitere Hypothese, welche die klinischen und molekularen Überschneidungen zwischen den verschiedenen Imprintingkrankungen erklären könnte, ist eine Regulation durch ein Netzwerk geprägter Gene (IGN) (Al Adhami *et al.*, 2015; Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015; Varrault *et al.*, 2006).

Imprinted Gene Network (IGN)

Frühere Studien mit Mäusen, welche z.B. chromosomale Aberrationen oder UPDs geprägter Regionen aufwiesen, lieferten erste Hinweise auf die phänotypische Verknüpfung verschiedener geprägter Regionen. Später entwickelte sich das Model des IGN, in welchem alle geprägten, sowie weitere nicht geprägte Gene, welche in einem regulativen Zusammenhang zu diesen stehen, zusammengefasst sind.

Erste Hinweise auf das IGN im Menschen zeigten sich bei Untersuchungen im Zusammenhang mit BWS. Hierbei wurden unter anderem Funktionen des geprägten Gens *PLAGL1* analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass der Transkriptionsfaktor *PLAGL1* im Bereich des geprägten Promoters von *KCNQ1OT1* bindet und so die Expression der regulativen RNA aktivieren kann, welche dann wiederum die Expression des Gens *CDKN1C* reprimiert (Arima *et al.*, 2005).

Erstmals detaillierter beschrieben wurde das IGN 2006 von Varrault und Kollegen in der Maus. Die Gruppe stellte fest, dass *Plagl1* Einfluss auf die Expression diverser geprägter Gene hat. Grundlage dieser Studie waren Meta-Analysen von Micro Array-Daten, durch welche der Einfluss von *Plagl1* auf weitere geprägte Gene, wie beispielsweise *H19*, *Igf2*, *Cdkn1c* und *Dlk1*, gezeigt werden konnte. Diese Effekte konnten auch durch weitere funktionelle Analysen, wie beispielsweise der Überexpression von *Plagl1*, welche einen transkriptionellen Effekt auf verschiedene IGN-Gene zeigten, bestätigt werden. Dabei wurde vermutet, dass das IGN hauptsächlich der Entwicklungs- und Wachstumskontrolle sowie deren Regulation dient (Varrault *et al.*, 2006).

In einer Arbeit von Liu und Kollegen wurde analysiert, welche Effekte während der Entwicklung dazu führen, dass mit zunehmendem Alter das Wachstum und die Zellproliferation abnehmen. Dieser Prozess findet in allen Säugetieren statt und kann nicht auf hormonelle Mechanismen zurückgeführt werden. Daher führte die Gruppe Microarray-Analysen durch, um dysregulierte Gene zwischen der frühen Entwicklungsphase und dem späteren Stadium identifizieren zu können. Dabei konnte - wohl eher zufällig - die Existenz und Funktionalität des IGNs weiter untermauert werden, da bei den Vergleichen vor allem geprägte Gene in ihrer Expression stark verändert waren. Die Ergebnisse zeigten mit zunehmendem Alter eine starke Reduktion der Expression von mindestens elf geprägten Genen in der Maus in allen drei untersuchten Organen (Niere, Herz und Lunge). Zu diesen Genen zählten unter anderem *Igf2*, *H19*, *Plagl1*, *Mest*, sowie weitere geprägte Gene. Darüber

Einleitung

hinaus wiesen alle Gene dieser Gruppe einen Bezug zum somatischen Zellwachstum auf. Zumindest bei den untersuchten Genen *Mest*, *Peg3* und *Plagl1* konnte diese Reduktion jedoch nicht auf eine veränderte Methylierung und somit auf eine veränderte Prägung zurückgeführt werden, was eine gemeinsame Regulation im Kontext des IGN nahelegt (Lui *et al.*, 2008). Untersuchungen im humanen Prostatakarzinom zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier scheint PLAGL1 einen wichtigen transkriptionellen Einfluss unter anderem auf die Gene *IGF2*, *H19* und *CDKN1C* zu haben, welcher unabhängig von einer Veränderung der DNA-Methylierung auftritt (Ribarska *et al.*, 2014). Auch im humanen Plazentagewebe konnten transkriptionelle Effekte von PLAGL1 auf weitere geprägte Gene, wie beispielsweise *H19*, *IGF2*, *CDKN1C*, *SLC2A4* oder *PPAR γ 1*, gezeigt werden. Für die Region von *IGF2/H19* konnte unter anderem auch eine Bindung von PLAGL1 zwischen den Enhancerbereichen von CS3 und CS4 gezeigt werden, welche in die Regulation der Expression von *IGF2* und *H19* involviert zu sein scheint (Iglesias-Platas *et al.*, 2014). Auch diese Studie stützt somit die These eines humanen IGN.

Die Funktion des IGN wurde in weiteren Studien näher untersucht (Gabory *et al.*, 2010; Gabory *et al.*, 2009; Martinet *et al.*, 2016; Monnier *et al.*, 2013), wobei neben *Plagl1* auch *H19* als wichtiger Transregulator des IGN in der Maus beschrieben wurde. In der Studie von Gabory und Kollegen zeigte sich, dass *H19* während der Embryonalentwicklung auf mindestens 20 Gene des IGN transkriptionellen Einfluss nehmen kann. Die Daten untermauern nicht nur die funktionelle Existenz eines IGN in der Maus, sondern zeigten auch erstmals *in vivo* die funktionelle Relevanz der regulativen *H19*-RNA (Gabory *et al.*, 2009). *H19* scheint hauptsächlich in der murinen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen, da es nach der Geburt in vielen Geweben reprimiert wird - mit Ausnahme der Skelettmuskeln und des Herzens, was eine wichtige Aufgabe von *H19* in diesen Geweben nahelegt. Durch Untersuchungen von Martinet und Kollegen zeigte sich, dass *H19* tatsächlich eine Funktion in der Muskelregeneration hat. Gleichzeitig zeigte sich während dieses Prozesses eine Reaktivierung der embryonalen Funktion von *H19* und damit einhergehend eindeutige Effekte auf weitere Gene des IGN (Martinet *et al.*, 2016). Die Effekte der lncRNA *H19* werden zum Teil über eine Interaktion mit dem Protein MBD1 gesteuert. Durch diese Interaktion können gezielt repressive Histonmodifikationen im Bereich der DMRs der betroffenen Gene gesetzt werden. Dabei handelt es sich um die Histonmodifikation H3K9me3, welche einen repressiven Einfluss auf die Expression nehmen kann. Es wurden allerdings auch Gene beschrieben, die

Einleitung

unabhängig von MBD1 durch *H19* reguliert sein können (Monnier *et al.*, 2013). Ein weiterer Interaktionspartner von *H19*, der eine histonmodifizierende Wirkung hat, ist die Methyltransferase EZH2. Diese wird von *H19* zu bestimmten Zielgenen rekrutiert um dort die repressive Modifikation H3K27me3 zu katalysieren, welche die expressionelle Regulation beeinflussen kann (M. Luo *et al.*, 2013). Diese Daten zeigen, wie *H19* als Kofaktor für die Rekrutierung von transkriptionell regulierenden Histonmodifikationen beispielsweise zu den DMRs geprägter Gene seine Funktion als trans-Faktor des IGN wahrnehmen kann.

Bisher wurde angenommen, dass sich die Funktion des Großteils der geprägten Gene auf die embryonale Entwicklung beschränkt. Allerdings zeigen sich auch bei Erwachsenen mit verschiedenen Imprintingdefekten pathogene Auffälligkeiten wie beispielsweise Übergewicht, Diabetes, Muskelhypertrophie, geistige Behinderungen oder verschiedene Tumore. Bis auf wenige Ausnahmen scheinen die geprägten Gene auf den ersten Blick jedoch unabhängig voneinander zu sein und nicht alle in den gleichen Signalkaskaden oder Funktionen involviert zu sein. Allerdings konnten keine weiteren Anhaltspunkte gefunden werden, welche Existenz und Funktionalität des IGN auch im Menschen bestätigen. Auf der Grundlage von Coexpressions-Datenbank-Analysen, sowie Microarray- und RNA-Sequenzierungsdaten erstellten Al Adhami und Kollegen 2015 eine aktuelle Version des IGN in der Maus. Dabei konnte gezeigt werden, dass 84 der geprägten Gene coexprimiert werden, was ihre Abhängigkeit voneinander noch mehr verdeutlicht. Zusätzlich scheinen aber auch biallelisch exprimierte und nicht geprägte Gene dem IGN anzugehören. Bisher schienen die Gene des IGN, mit Ausnahme der Gene *Ins2*, *Igf2* und *Igf2r*, welche alle dem Insulin-Signalweg angehören, keinen funktionellen Zusammenhang aufzuweisen. Die aktuellen Daten belegen jedoch, dass viele Gene des IGN eine gemeinsame zelluläre Funktion haben können. Ein Teil dieser Gene ist beispielsweise in die Kontrolle der Extrazellulärmatrix-Komposition, der Zelladhäsion oder von Zell-Zell-Kontakten involviert (Al Adhami *et al.*, 2015).

1.1 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie die allelspezifische Expression der Gene *IGF2* und *H19* reguliert werden kann. Neben der allelspezifischen Methylierung der ICR1 spielen auch andere Elemente wie die distalen Enhancer eine wichtige Rolle für die Regulation von *IGF2* und *H19*. Vereinfacht wurde die Regulation bereits über das Enhancer blocking-Modell beschrieben. Inzwischen ist weitgehend akzeptiert, dass die Regulation der Region zumindest teilweise von verschiedenen Chromatinfaltungen abhängt. Nicht vollständig geklärt ist, welche Rolle dabei die unterschiedlichen Enhancerelemente im Zusammenhang mit der Transkription der beiden Gene spielen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob neben den Enhancern, CTCF und Cohesin noch weitere Faktoren in die Regulation der Region involviert sind.

Eng verbunden mit der Analyse der funktionellen Mechanismen in diesem Imprinting Center ist die Identifikation und Aufklärung epigenetischer und struktureller Störungen dieser Region, die zu den Imprintingerkrankungen SRS und BWS führen können. Interessanterweise zeigen Befunde bei SRS-Patienten, dass auch Epimutationen auf Chromosom 7 zu einem nahezu identischen klinischen Bild führen wie Epimutationen auf Chromosom 11. Durch transkriptionelle Vergleiche von Zellen mit maternaler UPD7 und UPD11 sollte geklärt werden, welche Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlichen Defekten zu erkennen sind.

Welche Abschnitte auf Chromosom 11 in diesem Zusammenhang relevant sind, sollte unter anderem auch mithilfe von Zellen eines BWS-Patienten, die eine maternale Deletion der ICR1 und des *H19*-Bereichs aufweisen, festgestellt werden. Die Klärung, welche regulativen Elemente von der Deletion betroffen sind, sollte weitere Hinweise über ihre Funktion und ihre Rolle in dieser Region liefern.

Mit Fibroblasten von SRS- bzw. BWS-Patienten sollten vergleichende (Expressions-)Analysen durchgeführt werden. Hierfür konnten unter anderem die bereits beschriebenen Defekte modellhaft verwendet werden. Durch den transkriptionellen Vergleich von Patienten mit gegensätzlichen Defekten auf Chromosom 11, wie beispielsweise einer maternalen bzw. paternalen UPD, sollten vor allem die parental unterschiedlichen Effekte der ICR1 herausgearbeitet werden. Die Vergleiche zwischen den verschiedenen Zellen sollten auch

Einleitung

Aufschluss darüber geben, ob die Gene *IGF2* und *H19*, oder auch die ICR1 selbst, Teil eines größeren regulativen Netzwerks wie dem IGN sind.

In diesem Zusammenhang sollten Interaktionsanalysen dabei helfen zu untersuchen, ob zwischen der ICR1 und weiteren chromosomalen Regionen physische Interaktionen vorliegen. Fibroblasten eines SRS-Patienten mit einer maternalen UPD11 sollten dabei helfen festzustellen, ob diese Interaktionen allelspezifisch unterschiedlich sind. Die Analyse der Interaktionen sollte mittels 4C und einer anschließenden Sequenzierung durchgeführt werden. Nach eingehender Bewertung der Ergebnisse sollten diese dafür genutzt werden, in möglichen Interaktionsregionen nach Bindemotiven für potentielle regulative Faktoren zu suchen. Eine Bindung in dieser Region hätte somit gegebenenfalls Einfluss auf die Expression von *IGF2* und *H19*. Um die Relevanz und die Bindung eines Faktors in diesem Bereich dokumentieren zu können, sollte eine CHIP durchgeführt werden. Eine Frage war, ob bzw. inwiefern potentielle Interaktionen und damit einhergehende Faktoren Einfluss auf die geprägten Regionen auf Chromosom 11 oder auch das IGN nehmen können. Dies sollte mittels einer Reduzierung des Faktors durch einen mRNA-Knockdown oder eine gezielte Anreicherung des Proteins in der Zelle untersucht werden. Im Anschluss an die Veränderungen sollte der Einfluss auf die Expression ausgewählter IGN-Gene mittels qRT-PCR untersucht werden, um die transkriptionellen Effekte zu dokumentieren.

2. Material und Methode

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Butanol	Merck
Aceton	Appli-Chem
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose	Star Lab
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Aqua	B. Braun
Bacto Agar	Bio Rad
Benzonase (0,25U/ μ l)	Roche
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	Roth
Bradford-Reagenz	Bio Rad
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Dimethyl Sulfoxid	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Formaldehyd (Methanol frei, 16 %)	Thermo Scientific
Formamid (Hi-Di)	Applera
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Glycogen Blue	Ambion
HEPES	Invitrogen
IPTG	Applchem
Isopropanol	Roth
Magermilchpulver	Roth

Material und Methode

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Natrium-Acetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
OrangeG	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco
PhosphoStop Easy Pack	Roche
PMSF	Roth
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Roth
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Roth
Tergitol-type NP-40	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio Rad
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Tris-Hydrochlorid	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck
Western Lightning® Plus-ECL	Perking Elmer
X- Gal	Appllichem

Material und Methode

2.1.2 Antikörper

Tab. 2-1 Verwendete Antikörper für Westernblot

Primärer Antikörper	Wirtstier	Verdünnung	Pufferlösung	Blocking	Firma
P53	Mouse	1:500	PBST	Milchpulver	Santa Cruz
Lamin A/C	Goat	1:500	PBST	BSA	Santa Cruz
H2A.Z	Rabbit	1:1000	TBST	BSA	Cell Signaling
Sekundärer Antikörper					
Anti-Rabbit	Goat	1:5000	entsprechend der primären Antikörper		Santa Cruz
Anti-Goat	Rabbit	1:5000			Santa Cruz
Anti-Mouse	Rabbit	1:5000			Santa Cruz

Tab. 2-2 Verwendete Antikörper für die ChIP

Antikörper	Eingesetzte Menge pro IP [μ l]	Firma
P53	1	Millipore
IgG	1	Millipore
Pol II	10	Santa Cruz

2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

Agarosegel (x %)	x g Agarose/100 ml (1x) TBP-Puffer
Blockingpuffer	1x PBST + 5 % BSA
	1x PBST + 5 % Magermilchpulver
	1x TBST + 5 % BSA
	1x TBST + 5 % Magermilchpulver
DMEM (1x)	Gibco
DPBS (1x)	Gibco
Ethidiumbromidlösung	5 μ g/ml, Roth
Fetales Rinderserum (FCS)	Gibco

Material und Methode

IP-Lysepuffer	10 mM Tris (pH 7,5) 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % TritonX-100 (Zugabe nach dem Autoklavieren)
IP-Puffer (nach Nelson)	150 mM NaCl 50 mM TRIS HCl pH 7,5 5 mM EDTA 0,5 % NP40 (v/v) 1 % Triton X 100 Ad H ₂ O
<i>Spezial-</i> IP- Puffer	6,6 ml 5M NaCl + 10,1 ml 1M TRIS- HCl (pH 7,5) + 2,02 ml 0,5M EDTA + 0,1 % SDS + 2,2 ml Triton™ X-100 + 79,08 ml aqua bidest
Ladepuffer (6x)	35 0mM Tris-HCL (pH 6,8) 34,4 % Glycerol 10 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,06 % Bromphenolblau ad Aqua bidest
Laufpuffer (10x)	24,8 mM Tris 192 mM Glycerin 1 % SDS
Ligationspuffer 4C	4095 µl Wasser 300 µl Triton X-100 (20 %) 60 µl Tris-HCl (pH 7,8) 60 µl BSA (10 mg/ml) 90 µl Complete (50x)
Orange Dye	30 % Succrose 0,35 % Orange G, Sigma

Material und Methode

PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/7\text{xH}_2\text{O}$ 2 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua bidest
PBS-Tween (PBST, 1x)	0,05 % Tween 20 1000 ml PBS (1x)
Penicillin-Streptomycin	10000 U/ml Penicillin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, Sigma-Aldrich
Proteinlysepuffer-I	750 μl 666 mM Hepes (pH 7,9) 75 μl 1M MgCl_2 500 μl 1M KCL ad 50 ml Aqua bidest alle weiteren Bestandteile werden frisch zugegeben 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 0,1 M DTT 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 25x Complete Roche 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 0,25 U/ μl Benzonase (1:1000 in PBS) 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 25 % NP40 (wird dem Puffer separat zugegeben)
Proteinlysepuffer-II	1,5 ml 666 mM Hepes (pH7,9) 75 μl 1 M MgCl_2 10,5 ml 2 M NaCl 20 μl 0,5 M EDTA 12,5 ml Glycerin ad 50 ml Aqua bidest alle weiteren Bestandteile werden frisch zugegeben 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 0,1 M DTT 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 25x Complete Roche 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 0,25 U/ μl Benzonase 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ PhoshoStop (10x)
RPMI 1640	Gibco
Sodium Pyruvate	Sigma-Aldrich

Material und Methode

TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA ad 1000 ml Aqua bidest
TBS (10x)	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest pH 7,6
TBS-Tween (TBST, 1x)	0,1 % Tween 20 (1000 ml TBS (1x))
Transferpuffer (10x)	24,8 mM Tris 192 mM Glycerin ad 1000 ml Aqua bidest
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich

2.1.4 Enzyme, Nukleotide, Molekulargewichtsstandards, Reaktionsagentien und Kits

100 bp DNA Ladder	Invitrogen
1 kb DNA Standard	Invitrogen
2 log DNA Standard	Invitrogen
Big Dye Premix	Applied Biosystems
Big Dye Sequenzierpuffer (5x)	Applied Biosystems
CsP6I	Fermentas
DNase Digestion Kit	Peqlab
dATP 10 mM	Invitrogen
dNTP 10 mM	Invitrogen
Epitect Bisulfit Kit	Qiagen
Exonuklease I	Invitrogen
Exonuklease III	Invitrogen
High Sensitivity DNA Kit	Agilent
IMAX-II-Polymerase	iNtRON Biotechnology
KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	KAPA Biosystems
Lipofectamine 2000 und 3000 Reagent	Invitrogen
Long Amp Taq	New England Biolabs
Magic Mark™ XP	Invitrogen

Material und Methode

M-MuLV Reverse Transkriptase	New England BioLabs
M-MuLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
Nutlin-3a	Sigma Aldrich
Oligo dT	Metabion International AG
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab
Phusion Polymerase	New England BioLabs
PLUS-Reagent	Invitrogen
Proteinase K	Roche
Q5 Polymerase	New England Biolabs
QIAquick Gelextraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
Ribo Lock Rnase Inhibitor	Thermo Scientific
Rnase A	Cell Signaling
SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit	Cell Signaling
T4 Ligase Kit	New England BioLabs
Taq Polymerase	Labor-Taq, AG-Prawitt
trueChIP™ Chromatin Shearing Reagent Kit	Covaris
PCR Purification Kit MSB Spin PCRapace	Invitex

2.1.5 Oligonukleotidsequenzen

Alle in der Arbeit verwendeten Primer sind bei Metabion International AG bestellt worden. Für die Expressionsanalysen wurden nach Möglichkeit intronüberspannende Primer designt um Probleme mit Kontaminationen genomischer DNA zu minimieren.

Tab. 2-3 Expressionsprimer

In Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Expressionsprimer sowie deren Einstellung für die qPCR aufgeführt. Die Produktgröße ergibt sich aus dem amplifizierten cDNA-Produkt. Die Zeiten für Denaturierung, Anealing und Elongation waren für alle Expressionsprimer gleich (5 Sek. 5 Sek. 1 Sek.)

Primername	Sequenz (5'→3')	Anealing T [°C]	Produktgröße [Bp]
<i>ACTB</i>	Fw: GGCATCCTCACCTGAAGTA	60	200
	Rv: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA		
<i>ATP5J</i>	Fw: CTCGGGACTGAGTGCAAGAAT	62	94
	Rv: CCTCCGCAAATGGACTGAGA		
<i>B2M</i>	Fw: ATGAGTCCTGCCGTGTGA	60	98
	Rv: GGCATCTTCAAACCTCCATG		
<i>CDKN1C</i>	Fw: TGCTACATGAACGGTCCCAG	64	240/245
	Rv: TGTCGGGCCTCTGATCTC		
<i>GRB10</i>	Fw: GACCACGGGCTCTGCATA	61	163
	Rv: TCTGCTGAGGGATTCGGTAA		
<i>H19</i>	Fw: GGCCTTCTGAACACCTTAG	61	142
	Rv: TGAGCTGGGTAGCACCATTT		
<i>HPRT</i>	Fw: ATTGACACTGGCAAACAATGC	61	110
	Rv. TCCAACACTTCGTGGGGTCC		
<i>IGF2</i>	Fw: CCGTGCTTCCGGACAAC	62	69
	Rv: CTGCTTCCAGGTGTCATATTGG		
<i>IGF2R</i>	Fw: CTCATCTCCCTGGACAAGCA	62	150
	Rv: AGCCTCATAACCACCAAGTGC		
<i>KCNQ10T1</i>	Fw: TGGAAGTGTGGCGGTAAAGA	59	153
	Rv: TTCAGCTTGCTTGGCTTTGC		
<i>MEST</i>	FW: CCCACCCCAACAGGAATTC	61	87
	RV: AAGGCATGTGCCATAACGT		

Material und Methode

Primername	Sequenz (5'→3')	Anealing T [°C]	Produktgröße [Bp]
<i>MDM2</i>	Fw: GACTCCAAGCGCGAAAAC	58	142
	Rv: AGCAATGGCTTTGGTCTAAC		
<i>P21/CDKN1A</i>	Fw: GCTGCGTTCACAGGTGTTT	58	188
	Rv: TCGAAGTTCCATCGCTCAC		
<i>P53</i>	Fw: TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC	67	121
	Rv: AGGACAGGCACAAACACGCACC		
<i>PDH</i>	Fw: GACCAATGGACATGGAAACC	61	483
	Rv: TGGCAACCGTAACAGACAAA		
<i>PIDD</i>	Fw: AATCTGCTGGACACGCTACC	62	139
	Rv: TGCTGTGCAGGACAAGGAG		
<i>PPIA</i>	Fw: ACGTGGTATAAAAAGGGGCGG	60	163
	Rv: TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG		
<i>TBP</i>	Fw: GGATAAGAGAGCCACGAACCAC	66	139
	Rv: TTAGCTGCTGGAAAACCCAATTCTG		
<i>PLAGL1</i>	Fw: GATTGCTGTCACGTCTAATGT	60	125
	Rv: GTCCATTAGGTTTCTGTCTG		

Material und Methode

Tab. 2-4 Primer für ChIP und genomische DNA

Die Tabelle gibt die Primer und q PCR-Einstellungen für die ChIP-Primer an. Die Produktgröße ergibt sich aus der Amplifikation des genomischen Bereiches. Für die Primer IGF2-P3 und -P4 wurde die initiale Denaturierung auf 6 Min. verlängert.

Primernamen	Sequenz (5'→3')	Annealing T [°C]	Zeit [Sek.]	Größe [Bp]
CCD	Fw: AGGGGGTGGACCTTTCCAGA	65	10'5'1'	194
	Rv: TCCTTTGGAGCCCAGATGGC			
CS3	Fw: TTGTTTTAGATGGGTGTGC	61	10'5'1'	182
	Rv: AGCCTTAAGGGAGAGCAAGG			
CS6	Fw: AGCACTTTATTGCCGTTGTG	61	10'5'1'	89
	Rv: TGCACAGCTTACTGCTACC			
CS7 + 4,8 Kb	Fw: TGAGCTTGCTGTGTTTGGAG	60	10'5'1'	149
	Rv: GATGCCCTGGAAATGGGAG			
CTCF DS – 2,8 Kb	Fw: CTGTAGAGGTCGTCGGCAGT	63	10'5'1'	106
	Rv: GCCTTTGTTCTCCCCCTTAG			
CTCF DS	Fw: GTCATCACCACGGCAACACC	62	10'5'1'	103
	Rv: GGTTTCTCCCAACCGTCT			
GAPDH-Promoter	Fw: TACTAGCGGTTTTACGGGCG	62	10'5'1'	166
	Rv: TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA			
H19-Promoter	Fw: CACCCCTACTCTCCAGGAAC	59	10'5'1'	116
	Rv: CATACTTTGCACATGGCTGG			
HUC1	Fw: TGAAGGGAACCAACCATC	60	10'5'1'	210
	Rv: TGTGTTTCTGGACCTCACTC			
HUC2	Fw: GTCCACTTGCTCATCTACTG	60	10'5'1'	116
	Rv: AAAGGGCTATCTGACCAGG			
ICR1	Fw: AGGTGATCATGACTGGGACC	61	10'5'1'	128
	Rv: AGACTCCAGGAACACTGTGC			
ICR1 – 6 KB	Fw: CAAGATGGCAAGTCACCAAC	61	10'5'1'	82
	Rv: GGCCTGGAGTTTTAATGGG			

Material und Methode

Primername	Sequenz (5'→3')	Anealing T [°C]	Zeit [Sek.]	Größe [Bp]
ICR1 – 4,5 Kb	Fw: CAGTGGCCCTACATCTGTCTC	62	10'5'1'	171
	Rv: ACAGAAGACCCCACTCACAG			
ICR1 – 3,2 Kb	Fw: GGAGAGAGACATGAGAGGGT	62	10'5'1'	85
	Rv: CCAGAGCAGTGAGATGGAAG			
ICR1 – 2,2 Kb	Fw: ACGCTGTGCCATGTCCCT	62	10'5'1'	208
	Rv: TCACCTGGAGGCAGATGT			
IGF2-P3	Fw: GTCGGCCCAAACCGAGCTG	64	20'5'1'	111
	Rv: CAGAGAAGCGGAGGGAAGGG			
IGF2-P4	Fw: GTGCAGGAGAGAAGAGACTG	61	20'5'1'	134
	Rv: CAGCTTTTATGTGTGAGCCG			
KCNQ10T1	FW: TGGAACTGTGGCGGTAAAGA	59	10'5'1'	153
	RV: TTCAGCTTGCTTGGCTTTGC			
P21-Promoter	Fw: GTGGCTCTGATTGGCTTTCTG	68	10'5'1'	105
	Rv: CTGAAAACAGGCAGCCCAAG			
P53-CS7	Fw: GTGGGGAGGACATAGACCC	59	10'5'1'	300
	Rv: AGCAAATCCTTCCTATGCCG			

Tab. 2-5 qPCR Primer für 4C-Verdautesst

Primername	Sequenz (5'→3')	Anealing T [°C]	Produktgröße [Bp]
F1	Fw: CTGTGGGCAAATTCACCTCT	60	197
	Rv: CTGGTCCAGGATCCTTGT		
F2	Fw: CTCATCTCCCAACCTCAA	60	341
	Rv: ATGCTCCAGAGGGAATCGTT		
F3	Fw: GCCACCTGTGTTCCATACC	60	143
	Rv: ATGCTCCAGAGGGAATCGTT		

Material und Methode

Tab. 2-6 Primer für die 4C-PCR

Primername	Sequenz (5'→3')	Anealing T [°C]
Outer Primer ICR1 B5	Fw: TCGATAAAGGATGGGGATCA	62
	Rv: GAGACCTGGGACGTTTCTGT	
Inner Primer ICR1 B5	Fw: ATTGCCTGCCTTGTGCTGT	63
	Rv: GGCCACTTCTGATTCCAC	

Tab. 2-7 siRNAs

Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma Qiagen bezogen, verwendete Konzentration: 5 nmol.

Name bzw. Ziel	Zielsequenz (5'→3')	Sequenz Sense-Strang (5'→3')	Sequenz Antisense-Strang (5'→3')
P53	AAGGAAATTTGCGTGTGGAGT	GGAAAUUUGCGUGUGGAGUTT	ACUCCACACGCAAUUUCCTT
s.l.	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	UUCUCCGAAGCUGUCACGU	ACGUGACACGUUCGGAGAA

2.1.6 Verwendete Zellen

Tab. 2-8 Verwendete Zellen

Bezeichnung	Phänotyp	Medium
SRS UPD11	SRS	DMEM
SRS UPD7	SRS	DMEM
BWS ΔH19/ICR1	BWS	DMEM
BWS UPD11	BWS	RPMI
Kontrolle	Kontrolle	DMEM

Material und Methode

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Afa-Tubes	Covaris
Einmal-Injektions-Kanülen (20g)	Braun
Einmalspritzen (20 ml)	Braun
Extra Thick Blotpaper	BioRad
Falcons (15 und 50 ml)	Greiner bio-one
Filter Whatman™ (0,2 µm)	GE Healthcare
Hybond ECL-Plus Nitrocellulose-Membranen	Amersham Pharmacia
Kryo-Röhrchen (1,0 ml)	Nalgene
Küvetten Uvette® (220-1600 nm)	Eppendorf
LightCycler 480 96-Well-Platten	4Titude
Pasteurpipetten	VWR
Pipetten Cellstar®, serologisch (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen (10 – 5000 µl, gestopft und unterstopft)	Starlab
Reaktionsgefäße (0,2-5 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Zellkulturflaschen NUNC™ (T75/75 cm ² und T175/175 cm ²)	Thermo Scientific
Zellkulturschaber Costar® 3008	Corning Incorporated
Zellkulturschalen (Ø 6, 10 und 15 cm)	TPP, Sarstedt

2.1.8 Geräte

Absaugpumpe Mini-Vac Power	Peqlab
Autoklav Systec-V-100	Systec
Bestrahlungsgerät D3000	Gulmay Medical
Bioanalyzer 2100	Agilent
Brutschränke: Hera Cell' und Function Line'	Heraeus
ChemiDoc™ MP Imaging System	BioRad
Chromatin-Ultrasonicator M220	Covaris
ChIP Priming Station	Agilent
Drehmischer Stuart SB3 (End-over-end-Gerät)	Bibby Scientific Limited
Elektrophorese-Spannungsgerät	Pharmacia
Geldetektionssystem	Peqlab
Gelkammern	Peqlab
Gießvorrichtung (Polyacrylamid-Gel)	BioRad
LightCycler® 480 II RT-PCR Gerät	Roche

Material und Methode

Mikroskop Diavert	Zeiss
Nanodrop® Spectrometer	Peqlab
Neubauer-Zellzählkammer	LaborOptik
PCR-Gerät	Biometra
Photometer	Eppendorf
Pipetten	
manuell: Finnpipette® F2	Thermo Scientific
elektronisch: Matrix	Thermo Scientific
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Rollenmischer Stuart SRT6D	Bibby Scientific Limited
Sicherheitswerkbank/Sterilbank	
LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus
Klasse 2 Sicherheitswerkbank	Microflow
Spannungsgeräte für Gelelektrophorese EPS 300	Pharmacia Biotech
Spektrometer Biophotometer Plus	Eppendorf
Thermo Cycler PCR Gerät	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Microzentrifuge	Starlab
Trans-Blot® SD SemiDry Transfer Cell	BioRad
IKA Vortex Mixer	Agilent
VF2	Jahnke und Kunkel
Vortex Mixer	Starlab
Reax 2000	Heidolph
Waagen (Analyse- und Laborwaage)	Sartorius AG
Wasserbad Certomat® WR	Braun
Western Blot Apparatur Mini-PROTEAN®Tetra Cell	BioRad
Wippschüttler Stuart SSL4	Bibby Scientific Limited
Zell-Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen	
EBA12R	Hettich
RT 6000 D	Sorvall
Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zellkultur-Inkubator	Haereus

2.2 Zellbiologische Methoden

Für die im Manuskript aufgeführten Versuche wurden humane Zellen (soweit nicht anders beschrieben Fibroblasten) von freiwilligen Spendern verwendet. Die Fibroblasten wurden aus Gewebespenden isoliert und kultiviert. Für die dauerhafte Lagerung wurden sie in flüssigem Stickstoff konserviert. Es wurden verschiedene Zellen, sowohl von SRS- als auch von BWS-Patienten verwendet (siehe Tab. 2-8).

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank mit sterilen Geräten und Kulturgefäßen durchgeführt. Für die Kultivierung der humanen Zellen wurde DMEM- oder RPMI-Medium verwendet, welchem fetales Kälberserum (FCS, 5 %), Penicillin und Streptomycin (1 %), sowie Natrium-Pyruvat (1 %, nur bei DMEM) zugesetzt wurde. Aufbewahrung und Wachstum der Zellen fanden in sterilen Kulturgefäßen in einem Zellinkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Konzentration statt.

2.2.1 Zellkultur

Zu Beginn der Zellkultur mussten zuerst kryokonservierte Zellen aufgetaut werden. Hierfür wurden 25 ml Medium in eine T-175 Zellkulturflasche, sowie 10 ml Medium in ein Reagenzgefäß vorgelegt und bis zum Gebrauch im Zellinkubator gelagert. Die aus dem flüssigen Stickstoff entnommenen Cryogefäße wurden schnellstmöglich in der Hand aufgetaut, der Inhalt von etwa 1 ml wurde anschließend in das Reagenzgefäß überführt und die Zellen in einem anschließenden Zentrifugationsschritt pelletiert (900 rpm, 10 Min. bei RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Medium aus der vorbereiteten Zellkulturflasche gelöst und in diese zurückgeben. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Zellinkubator und wurde täglich unter dem Mikroskop optisch anhand der Zelldichte (Konfluenz) überprüft. Wenn die Zellen eine bestimmte Konfluenz erreicht hatten oder die Gefäße voll bewachsen waren, mussten die Zellen für die entsprechenden Versuche verwendet oder auf weitere Gefäße aufgeteilt (gesplittet) werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mithilfe von Trypsin/EDTA von ihrem Gefäß abgelöst. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Trypsin/EDTA (siehe Tab. 2-9) wurden die Zellen für 6-8 Min. in den Inkubator gestellt und anschließend überprüft, ob sie sich gelöst hatten. War dies der Fall, wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen konnten nun entweder auf die entsprechenden Kulturgefäße aufgeteilt oder

beispielsweise für die entsprechenden Versuche in einem Reagenzgefäß pelletiert werden. Zellkulturplatten oder -flaschen, die in Benutzung blieben, wurden mit der entsprechenden Menge Medium befüllt (siehe Tab. 2-9). Wurden die Zellen nicht innerhalb von ca. 4 Tagen umgesetzt oder verwendet, musste ein Mediumwechsel durchgeführt werden, um einer Ansammlung von negativen Stoffwechselprodukten und dem Verbrauch von Nährstoffen vorzubeugen.

Falls die Zellen nicht für weitere Versuche benötigt wurden, konnten sie zur Aufbewahrung kryokonserviert werden. Hierfür wurden sie, wie oben beschrieben, mit Trypsin/EDTA abgelöst, in ein Reagenzgefäß überführt und bei 900 rpm für 10 Min. und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Zellkulturmedium (+10 % DMSO) gelöst und zu je 1 ml auf die Menge der verwendeten Einfriergefäße überführt. Diese wurden in speziellen Einfrierbehältern bei -80°C eingefroren. Nach etwa 3 Tagen konnten die Zellen in den Stickstoffbehälter (-196°C) für ihre dauerhafte Lagerung überführt werden.

Tab. 2-9 Zellkulturgefäße

Die Tabelle gibt die verwendeten Kulturgefäße und ihre entsprechenden Größen, sowie die verwendeten Mengen an Zellkulturmedium und Trypsin/EDTA (T/E) zum Ablösen an.

Zellkulturgefäß	Platte Ø 60mm	Platte Ø 150 mm	Flasche T-75	Flasche T-175
Kulturfläche [cm ²]	22,1	148	75	175
Mediummenge [ml]	4	25	15	25
T/E Menge [ml]	0,6	2	1	2

2.2.2 Chemische Stabilisierung von P53

Die chemische Stabilisierung des P53-Proteins in den Zellen fand mit der Substanz Nutlin-3a statt, da diese verhindert, dass das Protein - wie normalerweise in der Zelle üblich - dem Abbau durch das Proteasom zugeführt wird. Die Inkubation mit Nutlin-3a erfolgte meist auf Zellkulturplatten, die Substanz wurde dem Medium (20 µM) für eine Dauer von 6 Stunden direkt zugeben. Im Anschluss fand eine RNA- (siehe 2.3.8) oder Proteinisolation (siehe 2.4.1) aus den Zellen statt.

2.2.3 Stabilisierung von P53 durch Bestrahlung

Eine radioaktive Bestrahlung von Zellen induziert DNA-Schäden, welche Reparationsprozesse initiieren, diese wiederum führen zu einer Stabilisierung des P53-Proteins in der Zelle. Für die

entsprechenden Versuche wurden die Zellen auf 10 cm Schalen kultiviert, welchen bei Erreichen der gewünschten Konfluenz bestrahlt wurden. Die Bestrahlung fand mit einer Energiedosis von 0,05 cGy bzw. 2 Gy statt. Eine bzw. zwei Std. nach der Bestrahlung wurde aus den entsprechenden Zellen RNA (siehe 2.3.8) bzw. Proteine (siehe 2.4.1) isoliert.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Auf diese wurden 10 µl einer Zellsuspension der zu zählenden Zellen aufgetragen, welche gegebenenfalls noch verdünnt werden musste. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop. Hierfür wurden jeweils die vier großen, mit „L“ markierten, Quadrate ausgezählt (siehe Abb. 2-1) - die kleineren Quadrate dienten der besseren Orientierung und der Vermeidung von Doppelzählungen. Für die Berechnung wird nur der Wert eines großen Quadrates benötigt, daher wurde entsprechend der Mittelwert ermittelt. Jedes große Eckquadrat weist eine Fläche von 1 mm² und eine definierte Höhe von 0,1 mm bis zum Deckglas auf. Das Volumen von 0,1 µl bzw. 0,1 mm³ musste daher mit dem Faktor 10000 multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml Medium zu ermitteln. Mit diesem Wert konnte dann die gewünschte Zellzahl entsprechend der Versuche berechnet werden.

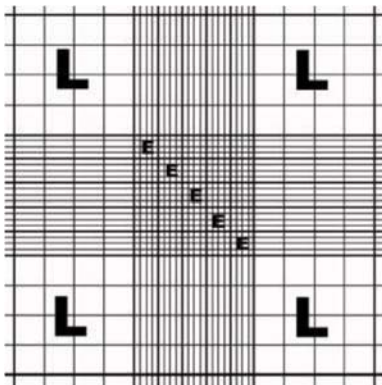


Abb. 2-1 Schematische Darstellung der Neubauer-Kammer

Die Abb. zeigt die Darstellung der Neubauer Quadrate, wie sie unter dem Mikroskop zu erkennen sind. Die großen, für das Zählen relevanten Quadrate, sind mit einem L markiert.

2.2.5 Transfektion humaner Zellen für einen siRNA-basierten Gen-Knockdown

Ein Gen-Knockdown wird angewendet, um ein Transkript bereits auf RNA-Ebene herunterzuregulieren. Hierfür wird eine künstliche siRNA mittels Transfektion in die Zelle eingebracht, welche dort mit dem entsprechenden Transkript interagiert und so seine Translation unterdrückt (siehe Abb. 2-2).

Material und Methode

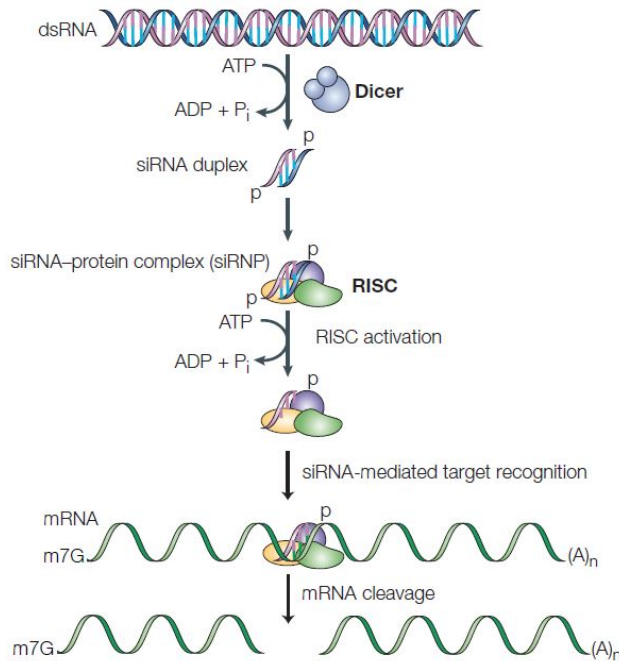


Abb. 2-2 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz

Die doppelsträngige siRNA wird in den RNA-induced-silencing-Komplex inkorporiert und in eine Einzelstrang-RNA umgewandelt. Zusammen mit dem Proteinkomplex kann sie mit der Ziel-RNA interagieren und dessen Translation unterbinden (Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Vor der Transfektion mit der entsprechenden siRNA wurden die Zellen einen Tag zuvor auf 6 cm Kulturschalen ausplattiert. Pro Schale wurden $2-3 \cdot 10^5$ Zellen vorbereitet, welche in Medium ohne Penicillin/Streptomycin kultiviert wurden, da dies die Effizienz der Transfektion negativ beeinflussen kann. Pro siRNA-Ansatz wurden 250 μ l des Opti-MEM-Mediums mit 15 μ l siRNA (20 μ M) versetzt. Als Kontrolle diente eine negative siRNA (Scrambled Locus; s.l.), welche kein humanes Transkript als Zielsequenz aufweist. Zu dem Gemisch wurden 8 μ l Plus-Reagenz gegeben und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. In einem 15 ml Reaktionsgefäß wurden je Ansatz 2000 μ l Opti-MEM-Medium mit 12 μ l Lipofectamin gemischt. Zu dieser Lösung wurde nach der Inkubation der siRNA-Mix gegeben und erneut für 20 Min. inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der Zellen abgesaugt, die Zellen drei Mal mit Opti-MEM-Medium gespült und mit 720 μ l Medium bedeckt. Nach der Inkubation wurde die Transfektionslösung langsam tropfenweise auf die Zellen pipettiert, was in drei Schritten à 760 μ l erfolgte. Im Anschluss folgte vierstündige Inkubation der Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium durch Opti-MEM-Medium, welches mit 10 % FCS versetzt wurde, ersetzt. Nach 24, 48 und 72 Std. konnte aus den Zellen RNA isoliert werden (siehe 2.3.8). Die Effizienz des Knockdowns und die Auswirkung auf andere Gene konnte mittels qRT-PCR (siehe 2.3.12) überprüft werden.

2.3 DNA/RNA Standardmethoden

2.3.1 DNA-Isolierung mittels QiaGen PCR-Purification Kit

Die DNA, beispielweise aus den CHIP-Experimenten, wurde mithilfe des QiaGen PCR-Purification Kits aufgereinigt. Hierfür wurde der Probe das fünffache Volumen an DNA-Bindepuffer zugegeben und gut durchmischt. Das Gemisch wurde auf eine DNA-Bindesaule, welche in einem Sammelröhrchen platziert war, übertragen und durch eine anschließende Zentrifugation (17000 g, 1 Min. bei RT) an diese gebunden. Darauf folgten zwei 30-sekündige Waschschrte mit Waschpuffer PE, sowie ein zweiminütiges Trocknen der Säule (Zentrifugation jeweils 17000 g bei RT). Der Säulendurchfluss wurde jeweils verworfen. Die Elution erfolgte mithilfe des Elutionspuffers aus dem verwendeten Kit. Die aufgereinigte DNA konnte sofort, beispielsweise für eine quantitative PCR, eingesetzt und bei 4°C gelagert werden.

2.3.2 Isolierung genomischer DNA mittels Roche DNA-Kit

Das High Pure PCR Template Präparationskit wurde zur Aufreinigung genomischer DNA, welche anschließend in eine qPCR eingesetzt werden sollte, verwendet. Eine Probe bestand aus 10^4 - 10^6 Zellen. Die zu verwendenden Zellen wurden entweder mittels Trypsin abgelöst (siehe 2.2.1) oder mithilfe eines Schabers von einer Zellkulturplatte gelöst, in ein 15 ml Gefäß überführt und für 10 Min. (1200 g, RT) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl PBS gelöst und zusammen mit 200 µl Bindepuffer, sowie 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 10 Min. bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl Isopropanol hinzugeben, die Lösung gut durchmischt und auf ein Filtertube gegeben. Durch die folgende Zentrifugation (1 Min., 8000 g, RT) wurde die DNA an die Säule gebunden. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Removal-Puffer gewaschen (Zentrifugation wie oben). Anschließend fanden zwei weitere Waschschrte mit 500 µl Waschpuffer (Zentrifugation wie oben), sowie ein Trocknungsschritt statt. Das Filtertube wurde in ein 1,5 ml Gefäß gesetzt und die DNA mit 200 µl vorgewärmten Elutionspuffer (70°C) durch Zentrifugieren (wie oben) gelöst. Die gelöste DNA konnte bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.3 Isolierung von DNA mittels MSB Spin PCRapace Kit

Dieses Kit dient zu Aufreinigung von DNA, beispielsweise aus enzymatischen Reaktion. Zur Probe wurde das fünffache Volumen an Bindepuffer gegeben und gut durchmischt. Der Mix wurde auf ein Filtertube gegeben, für 3 Min. (11000 g, RT) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Das Filtertube wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die DNA mit 10-20 µl Elutionspuffer nach einminütiger Inkubation durch Zentrifugieren (wie oben) gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.4 DNA-Fällung mittels Ethanol und Natriumacetat

DNA, beispielsweise solche aus PCR-Ansätzen, konnte mithilfe von Ethanol und Natriumacetat gefällt werden. Hierfür wurde die DNA-Probe mit dem gleichen Volumen H₂O, sowie einem Zehntel des Volumens Natriumacetat (3M) versetzt und das dreifache Volumen Ethanol (100 %) zugegeben. Das Pelletieren der DNA fand bei 13000 rpm und 10°C für 30 Min. statt. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen. Hierauf erfolgte erneut eine Zentrifugation (13000 rpm) für 15 Min. bei 15°C. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Dieses konnte anschließend, beispielsweise in Wasser oder Formamid, für eine anstehende Sequenzierung (siehe 2.3.15) gelöst werden.

2.3.5 DNA-Fällung mittels Isopropanol

Die Probe wurde mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und die gleiche Menge Ammoniumacetat sowie die doppelte Menge Isopropanol hinzugegeben. Nach anschließendem Vortexen wurde die Probe für 30 Min. bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10 Min., 14000rpm, 4°C). Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in Wasser oder Formamid gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um spezifische DNA-Produkte aus einem Agarosegel aufzureinigen, musste zunächst die entsprechende, durch UV-Licht sichtbar gemachte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Die Wiedergewinnung wurde mit dem QiaQuick Gelextraction Kit (QiaGen) durchgeführt. Hierfür wurde das Gelfragment mit

dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt und für 10 Min. bei 50°C inkubiert. Die Zeit musste gegebenenfalls verlängert werden, sofern das Gel nicht vollständig aufgelöst war. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und auf eine Aufreinigungssäule überführt. Das Binden der DNA erfolgt durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm (1 Min., RT). Die Säule wurde mit 700 µl PE-Puffer gewaschen (Zentrifugation wie oben). Zum Lösen der DNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die Probe in 50 µl EB-Puffer eluiert (Zentrifugation wie oben).

2.3.7 Bisulfit DNA-Umwandlung und Aufreinigung

Um die Methylierung von DNA untersuchen zu können, muss vorher eine Bisulfit-Konvertierung der nichtmethylierten Cytosine stattfinden. Dieser Prozess sorgt dafür, dass alle Cytosine der DNA, die nicht methyliert vorliegen, in Thymin umgewandelt werden, während methylierte Cytosine vor diesem Prozess geschützt sind. Durch eine anschließende Sequenzierung können methylierte und unmethylierte Cytosine detektiert werden und die Methylierung für die gewählten DNA-Regionen analysiert werden.

Für die Bisulfit-Umwandlung wurden 200-500 ng DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Der Bisulfit-Mix musste vorher vollständig gelöst werden. Die benötigten Zusätze sind in Tab. 2-10 aufgeführt.

Tab. 2-10 Zusätze für die Bisulfit-Reaktion

Komponenten	Volumen [µl]
DNA	Max. 20
Wasser	Ad 140
Bisulfit-Mix	85
DNA-Protect-Puffer	35

Die Reaktion wurden in 200 µl PCR Gefäßen angesetzt, anschließend wurde der Reaktionsmix gut durchmischt. Der Farbumschlag des DNA-Protect-Puffers von grün zu blau zeigte eine gute Durchmischung und einen korrekten pH-Wert an. Die DNA-Bisulfit-Konversion fand in einem PCR-Cycler bei den Bedingungen, welche in Tab. 2-11 angegeben sind, statt.

Tab. 2-11 Bedingungen der Bisulfit-Konversion

Schritt	Zeit [Min.]	Temperatur [°C]
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60
Pause	∞	10

Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch in ein 1,5 ml Gefäß überführt, mit 560 µl Puffer-BL gemischt und auf eine Aufreinigungssäule überführt. Diese wurde bei 20000 g für eine Min. zentrifugiert (RT) und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde die Proben mit 500 µl Puffer-BW gewaschen (Zentrifugation wie oben) und mit 500 µl Puffer-BD für 15 Min. inkubiert. Danach fand eine Zentrifugation (wie oben) statt, der

Durchfluss wurde verworfen und die Proben zweimal mit Puffer-BW gewaschen (wie oben). Im Anschluss wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt, durch eine weitere Zentrifugation getrocknet, in ein 1,5 ml Gefäß platziert und für 5 Min. bei 65°C inkubiert. Um die DNA zu lösen, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß gestellt, 20 µl EB-Puffer direkt auf die Membran gegeben und für eine Min. bei 15000 g zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA konnte für einen Tag bei 4°C und für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden. Die konvertierte DNA konnte nun für die anschließenden Methylierungsanalysen genutzt werden.

2.3.8 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das Peq Gold Total RNA Kit der Firma PeqLab verwendet. Als erster Schritt wurde entweder der Lysepuffer direkt auf die verwendeten Zellkulturplatten gegeben (bei 6 cm Ø 400 µl und bei 15 cm Ø 700 µl) und die Zellen mithilfe eines Zellspatels abgeschabt oder es wurde ein zuvor gewonnenes Zellpellet in 700 µl Lysepuffer suspendiert. Das Lysat wurde auf eine DNA-Removing Säule gegeben, welche in einem Auffanggefäß platziert war. Anschließend fand eine Zentrifugation (12.000 g, 1 Min. bei RT) statt und der Säulendurchfluss wurde mit dem identischen Volumen Ethanol (70 %) versetzt und gut durchmischt. Dieser konnte dann auf die RNA-Bindensäule überführt und diese bei 10000 g für eine Min. bei RT zentrifugiert werden. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 600 µl Waschpuffer I und einer Min. Zentrifugation (wie oben). Nach Entfernen des Säulendurchflusses wurde ein 15-minütiger DNase-Verdau auf den Säulen, mit 73,5 µl DNase Verdaupuffer und 1,5 µl DNase, durchgeführt. Zum Entfernen der

DNase-Komponenten wurden die Säulen für 5 Min. mit 400 µl Waschpuffer I inkubiert und im Anschluss für 5 Min. zentrifugiert (wie oben). Im Anschluss folgten zwei Waschschriffe mit Waschpuffer II (Zentrifugation: 10000 g, 15 Sek. bei RT), nach Verwerfen des Säulendurchflusses erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation zur Entfernung der Ethanolreste. Zur Elution der RNA wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Gefäß überführt, 50 µl RNase freies Wasser zugegeben und für eine Min. inkubiert. Die Elution erfolgte durch eine einminütige Zentrifugation bei 5000 g (RT). Die Konzentration der RNA konnte anschließend am Nano Drop gemessen werden.

2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurde mit dem Nano Drop Gerät (Photospektrometer) durchgeführt. Als Nullabgleich diente das entsprechende Lösungsmittel. Es wurden jeweils 1,5 µl der Probe zweimal gemessen. Aus den Werten konnte ein Mittelwert gebildet und die Konzentration in ng/µl bestimmt werden. Dies erfolgte mithilfe des spezifischen Absorptionsmaximums der Nukleinsäure bei 260 nm unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E_{\lambda} = \xi_{\lambda} * C * D$). E_{λ} gibt den Extinktionskoeffizienten der Wellenlänge λ an, bei ξ_{λ} handelt es sich um den molarischen dekadischen Extinktionskoeffizienten, C gibt die Konzentration und D die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers an. Die gemessenen Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm können zueinander in Verhältnis gesetzt werden und geben so die Reinheit der Nukleinsäuren an. Für RNA sollte der 260/280-Wert bei 1,8 und für DNA bei 2 liegen, ein 260/230 Verhältnis von 1,8-2,2 zeigt für beide Nukleinsäuren einen akzeptablen Reinheitsgrad an.

2.3.10 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese dient der Umwandlung einzelsträngiger RNA in cDNA, um diese beispielsweise in einer PCR amplifizieren und analysieren zu können. Während der Promotionsarbeit wurden zwei verschiedene Reverse Transkriptasen von den Firmen NEB und Invitrogen verwendet. Das Enzym wurde unabhängig voneinander von den Wissenschaftlern H. Temin und D. Baltimore entdeckt (Mizutani *et al.*, 1970; Rekosh *et al.*, 1970). Die Reverse Transkriptase dient dazu, die Translation von RNA in cDNA zu katalysieren. Je nach Hersteller wurden für die Synthese 1-3 µg RNA eingesetzt. Die Ansätze unterschieden sich jedoch teilweise in den eingesetzten Reagenzien (siehe Tab. 2-12 und Tab. 2-13 für den

Material und Methode

Synthesemastermix und den verwendeten Bedingungen im Thermocycler (siehe Tab. 2-14). Die Umwandlung erfolgt bei beiden Enzymen nach demselben Prinzip. Als Primer wird an das Poly-A-Ende der mRNA ein oligo-dT angelagert, welcher als Startpunkt für das Enzym dient, von welchem aus der Gegenstrang synthetisiert wird. Initial startet das Programm mit einer kurzen Denaturierungsphase, um eventuell vorhandene Tertiärstrukturen der RNA aufzulösen. Danach wurde der entsprechende Mastermix zugegeben und die Synthese fand bei der für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur statt. Um den Prozess zu beenden, wurde das Enzym im abschließenden Schritt durch Erhitzen inaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und die cDNA konnte bei -20°C gelagert werden.

Tab. 2-12 cDNA-Mastermix für Invitrogen RT

Die Tabelle gibt an, welche Reagenzien für den Mastermix zur cDNA-Synthese je 20 µl Probe verwendet wurden. Der Mastermix wurde nach der initialen Denaturierung zugegeben.

Zusatz	Menge [µl]	Konz.
Oligo dT	1	100 nM
dNTP	3,5	Je 2,5 mM
RNAse Inhibitor	2	
Firststrandpuffer	8	5x
Dithiothreitol	4	0,1 M
Reverse Transkriptase	1,5	200 U/µl

Tab. 2-13 cDNA Mastermix für NEB RT

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA Synthese je 11 µl Probe. Oligo dT und dNTPs wurden der Probe unmittelbar vor der initialen Denaturierung zugegeben, die restlichen Komponenten danach.

Zusatz	Menge [µl]	Konz.
DNA-Probe	x	
H ₂ O	ad 20	
Oligo dT	1	100 nM
dNTP	4	Je 2,5 mM
RNAse Inhibitor	1	
Firststrandpuffer	2	10 x
Reverse Transkriptase	1	200 U/µl

Material und Methode

Tab. 2-14 cDNA-Synthese-Protokoll für den Thermocycler

Die Tabelle gibt die spezifischen Synthesebedingungen der beiden verwendeten Enzyme an.

Schritt	Invitrogen RT	NEB RT
Initiale Denaturierung	70°C, 10 Min.	80°C ,5 Min.
Pause	4°C, ∞	4°C, ∞
Synthese	37°C, 90 Min.	42°C, 60 Min.
Hitzeinaktivierung	90°C, 10 Min.	90°C, 10 Min.
Pause/Ende	4°C, ∞	4°C, ∞

2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde genutzt, um mithilfe von Primern (siehe Tab. 2-3, Tab. 2-4 und Tab. 2-6) DNA-Produkte für verschiedene Anwendungen zu amplifizieren. Sie besteht aus den Schritten Denaturierung, Primer Annealing und der Elongationsphase. Je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und abhängig von der Anwendung wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Während für die Amplifikation der 4C-Produkte vor der Sequenzierung die Phusion Polymerase (NEB) zum Einsatz kam, wurden für besonders lange Produkte die Long Amp® Taq-Polymerase von NEB bzw. die IMAX-II-Polymerase von iNtRON Biotechnology verwendet.

Tab. 2-15 Mastermix für die verschiedenen Polymerasen

Bei der Phusion Polymerase (NEB) wurden zusätzlich 0,4 µl MgCl₂, 0,6 µl DMSO (aus dem Kit), sowie 1 µl *E. Coli* DNA (nur bei Outer PCR) zugegeben.

Zusatz	Long Amp TAQ		IMAX-II-Polymerase		Phusion (NEB)	
	Menge [µl]	Konz.	Menge [µl]	Konz.	Menge [µl]	Konz.
Puffer	5	5x	2	10x	4	5x
Polymerase	0,5	2,5 U/µl	0,5	5 U/µl	0,3	2U/µl
dNTPs	0,5	je 10 mM	2	je 2,5 mM	0,7	je 10 mM
Primer Fw + Rv	je 1	je 10 µM	je 1	je 10 µM	je 1,3	je 10 µM
DNA-Probe	1	1-500 ng	1	1-500 ng	2,5 bzw. 10 µl	unbek.
H ₂ O	ad 25		ad 20		ad 20	

Material und Methode

Tab. 2-16 PCR Bedingungen für die Nested PCR bei der 4C

Die PCRs wurden mit der Phusion Polymerase (NEB) durchgeführt. Bei der Outer-PCR wurden initial 3 Zyklen mit je 40 Min. Aneling und 5 Min. Elongation vorgeschaltet, gefolgt von 32 Zyklen, wie in der Tab. angegeben. Für die Inner-PCR wurden 31 Zyklen verwendet.

Schritt	Outer-PCR		Inner-PCR	
	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]
Initiale Denaturierung	98	45	98	45
Denaturierung	98	7	98	10
Primer Annealing	63	150	62	60
Elongation	72	300	72	240
Finale Elongation	72	420	72	420
Pause/Ende	4	∞	4	∞

Tab. 2-17 Thermocycler-Protokoll für Long Amp Taq-Polymerase und IMAX-II-Polymerase

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation werden in 30 Zyklen wiederholt. Die Elongation entspricht ca. 50 Kb in 50 Sek.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]
Initiale Denaturierung	94	60
Denaturierung	94	10
Primer Annealing	abhängig von den Primern	30
Elongation	72	Abhängig von der Länge
Finale Elongation	72	600
Pause/Ende	4	∞

2.3.12 Quantitative-Echtzeit-PCR und Schmelzpunktbestimmung

Die quantitative-PCR (qPCR) wird zur relativen Quantifizierung von DNA oder auch cDNA (siehe 2.3.10) genutzt. Vom Grundprinzip entsprechen die einzelnen Schritte Denaturierung, Primer Annealing und Elongation der klassischen PCR. Für die Quantifizierung während der PCR wird ein spezieller Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieser wird während des

Elongationsschrittes in DNA interkaliert. Hierdurch erfährt er eine Konformationsänderung und die Fluoreszenz, welche bei 530 nm gemessen wird, kann durch das Light Cycler-Gerät detektiert werden. Die Fluoreszenz steigt somit proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte. Die Amplifikation erfolgt in drei unterschiedlichen Phasen, beginnend mit der initialen Lag-Phase. In dieser Phase findet noch keine Verdopplung der PCR-Produkte statt, da für eine ausreichende Effizienz noch nicht genug Ausgangsmaterial vorliegt. Die erste Phase endet, wenn das Fluoreszenzsignal der Probe stärker als dasjenige des Hintergrundes wird. Während der Log-Phase findet eine exponentielle Bildung von PCR-Produkten statt und damit auch ein exponentielles Ansteigen des Fluoreszenzsignals. Bei optimaler Effizienz der PCR findet in dieser Phase eine Verdopplung der PCR-Produkte pro Zyklus statt. Diese Phase endet mit dem Eintritt in die Plateau-Phase. Dies findet statt, da Zusätze des verwendeten Mastermixes verbraucht werden, bzw. die Komponenten, wie beispielsweise die Polymerase, durch das häufige Erhitzen in der Denaturierungsphase geschädigt werden und nicht mehr ihre volle Effizienz entfalten können. Die Fluoreszenz nimmt mit jedem durchlaufenen Zyklus, abhängig von der eingesetzten DNA-Menge, zu. Die Messung der Fluoreszenz für die anstehende Quantifizierung findet während der Log-Phase statt, da in dieser das Signal erstmals über dem Hintergrund erscheint und in diesem Bereich optimale Reaktionsbedingungen vorliegen. Der jeweilige Messpunkt wird als Crossing Point (CP) bezeichnet. Der von der Software ermittelte Messpunkt ist der Punkt, ab dem die Fluoreszenz nicht mehr exponentiell zunimmt (siehe Abb. 2-3). Mathematisch kann dies als der Wendepunkt der Kurve bzw. das Maximum der 2. Ableitung ausgedrückt werden (Pfaffl, 2001). Dieses Berechnungsmodell bietet laut Literatur die höchste Genauigkeit bei der Quantifizierung (Tichopad *et al.*, 2003).

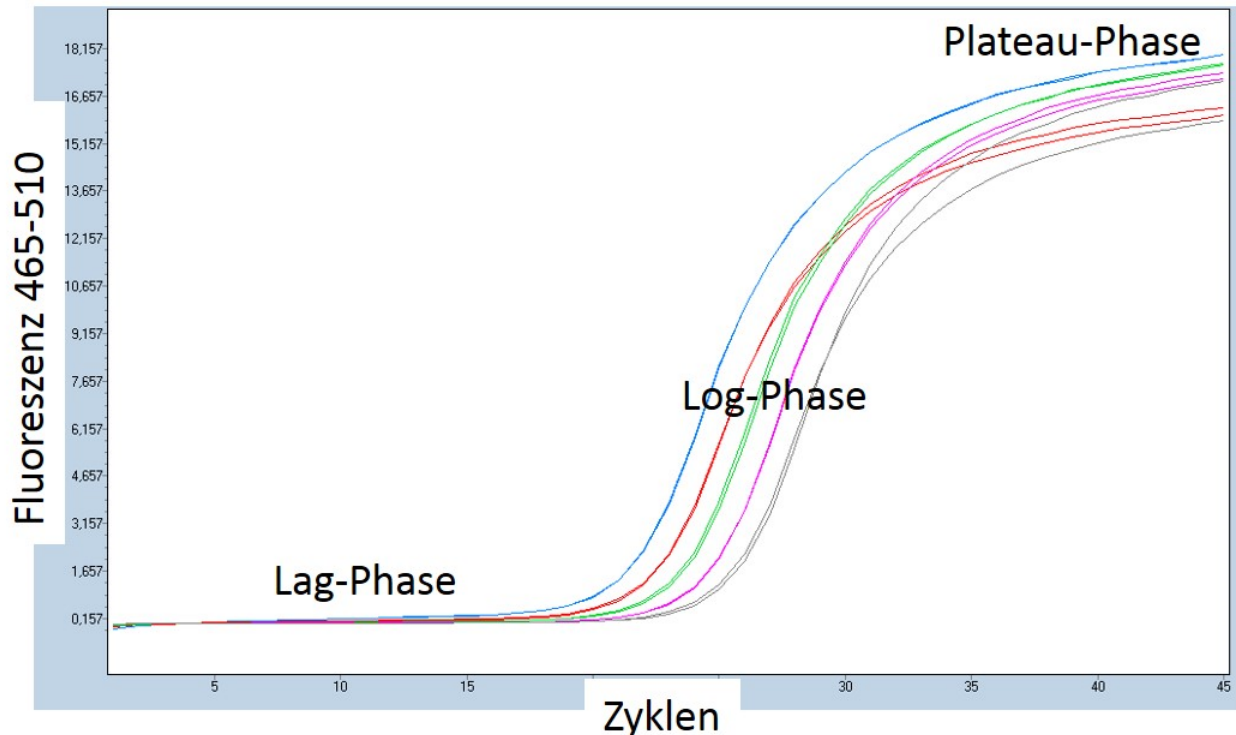


Abb. 2-3 Amplifikationskurve eines qPCR-Laufs

In der Abbildung ist der typische Fluoreszenzverlauf eines qPCR-Laufs zu erkennen. Während die Fluoreszenz in der Lag-Phase kaum zunimmt, geht sie in der Log-Phase in einen exponentiellen Verlauf über. In diesem Bereich findet auch die Messung für die Quantifizierung statt. Gegen Ende der PCR nach, ca. 30-35 Zyklen, befindet sich die Fluoreszenz in der Plateau-Phase, da kaum noch neue PCR-Produkte gebildet werden.

Mithilfe einer Verdünnungsreihe, welche als Standardreihe verwendet wird, kann eine lineare Regressionsgerade zur Berechnung der Konzentration unbekannter Proben erstellt werden. Dies kann mit der Formel $T_n = T_0 \cdot E^n$ beschrieben werden. T gibt die Menge der Ausgangsmoleküle und n die Anzahl der gemessenen Zyklen an, während E die Effizienz der Reaktion darstellt.

Die Effizienz selbst kann über die Steigung (Slope) der Regressionsgeraden berechnet werden (siehe Abb. 2-4). Hierfür wird die Formel $E = 10^{-1/\text{Slope}}$ verwendet. Die perfekte PCR-Effizienz liegt somit bei 2, was einer Verdopplung der PCR-Produkte pro Zyklus entspricht. Sie kann jedoch nach unten abweichen. Rechnerisch ergeben sich so theoretisch auch Werte größer 2, was allerdings praktisch nicht möglich ist. Die Light Cycler-Software errechnet ebenfalls einen Fehler-Wert (Error), mit dessen Hilfe die Genauigkeit der Standardreihe bestimmt werden kann. Laut Herstellerangaben sollte dieser Wert nicht größer als 0,02 sein.

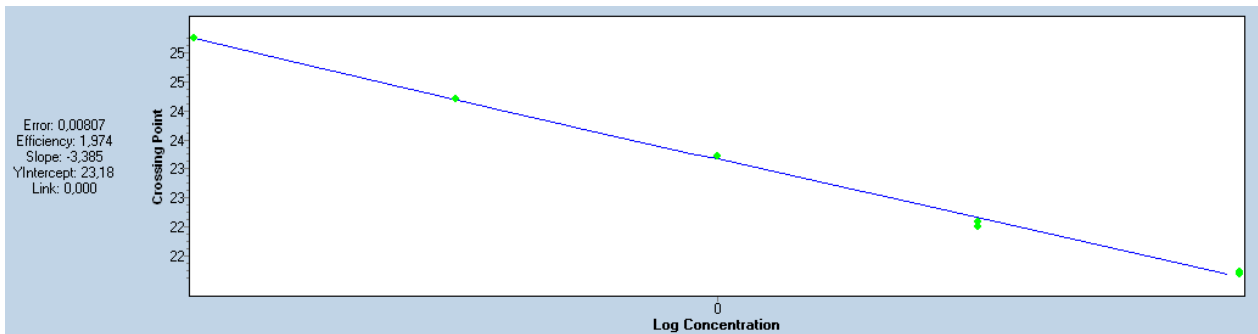


Abb. 2-4 Standardkurve einer qPCR

Die Standardkurve wird aus den einzelnen gemessenen Messpunkten (grün markiert) der Verdünnungsreihe zusammengesetzt. Der Slope gibt die Steigung der Geraden an, aus welcher sich die Effizienz der PCR errechnen lässt.

Für die qPCR Versuche wurden pro Probe 5 μl des qPCR Mix KAPA™ SYBR® Fast der Firma PeqLab verwendet, welcher neben der verwendeten Polymerase auch den Reaktionspuffer sowie die benötigten dNTPs enthält. Zusätzlich mussten je 0,5 μl (10 pmol) Fw und Rv Primer sowie 3 μl H₂O hinzugegeben werden. Es wurden 9 μl Mastermix in die verwendeten Wells einer 96-Wellplatte vorgelegt und jeweils 1 μl Probe hinzugegeben. Alle Proben wurden doppelt (Replikat) pipettiert. Zwei nur mit Mastermix befüllte Wells dienten als Negativkontrolle. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und abzentrifugiert, anschließend konnte die Analyse gestartet werden. Nach einer 3-minütigen initialen Denaturierung bei 95°C folgten die Schritte Denaturierung (95°C, 5 Sek.), Hybridisierung (x°C, 5 Sek.) und Elongation (72°, 1 Sek.), welche 45-Mal wieder wiederholt wurden. Die Hybridisierungstemperatur musste an die verwendeten Primer angepasst werden (siehe 2.1.5). Für die genomischen DNA-Proben wurde die Denaturierung auf 10 Sek. verlängert.

Die Überprüfung der Spezifität des PCR-Produkts fand anschließend an die qPCR durch Schmelzpunktanalyse statt, welche ebenfalls mit dem qPCR-Gerät durchgeführt werden konnte. Das Gerät erhöht dabei schrittweise die Temperatur (0,1°C pro Sek.), wobei durch das Aufschmelzen der DNA Stränge der interkalierte Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt wird und die gemessene Fluoreszenz abnimmt. An dem für das Produkt spezifischen Schmelzpunkt der DNA, welcher beispielsweise von der Länge oder der Basenverteilung abhängig ist, wird die höchste Farbstofffreisetzung erreicht. Anschließend wurden die Proben heruntergekühlt. Ergaben sich bei der Analyse zwei oder mehr verschiedene Schmelzpunkte, konnte dies ein Hinweis auf Primerdimere (T_m sehr niedrig), verschiedene RNA-Varianten des zu untersuchenden Gens, schlechte Primer (oft gekennzeichnet durch viele verschiedene

Schmelzpunkte) oder Verunreinigung der Proben sein. Allerdings muss ein einheitlicher Schmelzpunkt nicht zwangsweise auf das richtige Produkt zurückzuführen sein, daher wurden die Proben im Anschluss in regelmäßigen Abständen auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.3.13), um ihre Produktgröße zu überprüfen. Durch die Überprüfung konnte einem spezifischen Schmelzpunkt die entsprechende Produktgröße zugeordnet und die korrekte Größe des zu erwartenden Produkts gewährleistet werden.

2.3.13 Agarose Gelelektrophorese

Das Auftrennen von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese dient zur Bestimmung ihrer Fragmentgröße. Die Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer Orange-Dye versetzt und auf das Agarosegel (1-2 % aufgetragen. Als Größenreferenz dienten Molekulargewichtstandards (z.B. 100 Bp Marker), welche der zu erwartenden Banden oder Fragmentgröße entsprechen sollten. Die Auftrennung der Proben im Gel erfolgte in einer speziellen Gelelektrophoresekammer, welche mit TAE-Laufpuffer gefüllt war, an welchen eine Spannung von 90-130 V angelegt wurde. Die Zeitspanne der Auftrennung war abhängig von der Größe des Gels sowie dessen Prozentigkeit und der zu erwartenden Probengröße. Anhand des Verlaufs der sichtbaren Spur des Orange-Dyes konnte der Prozess je nach gewünschter Laufstrecke gestoppt werden. Im Anschluss wurden die Gele in einem Ethidumbromidbad (5 µg/ml) für eine Dauer von ca. 10-15 gefärbt und mit Wasser gewaschen. Mittels UV-Licht wurden Proben und Marker sichtbar gemacht und konnten mithilfe des Detektiergerätes fotografiert werden.

2.3.14 DNA-Fragmentgrößenbestimmung mittels Bioanalyser

Für eine genauere Fragmentgrößenbestimmung von DNA Proben, beispielsweise vor oder nach der CHIP (siehe 2.5.2), konnte neben der klassischen Gelelektrophorese auch auf eine Analyse mithilfe des Bioanalyzers zurückgegriffen werden. Bei diesem System wird ein DNA-Chip verwendet, mit welchem maximal 11 Proben analysiert werden können. Die Analyse erfolgt bei dieser Methode nach den klassischen Prinzipien der Gelelektrophorese. Innerhalb der einzelnen Felder des Chips befindet sich ein Gel, in welchem die Proben durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt und mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs detektiert werden können. Die gemessenen Daten werden anschließend in gelartige Bilder und Elektrogramme übersetzt. Für die Nutzung mussten die bei 4°C gelagerte Gelmatrix und der High sensitivity-

Material und Methode

Dye bei Raumtemperatur für eine Dauer von 30 Min. äquilibriert werden. Vor dem ersten Benutzen wurden 15 µl des DNA-Dyes in das vorgegebene Gefäß zur Gelmatrix gegeben, gevortext und auf ein Filtrertube übertragen, gefolgt von einer Zentrifugation bei 2200 g (10 Min. bei RT). Das fertige Gel konnte nun für den Versuch verwendet und der Rest für weitere Analysen bis zu 6 Wochen bei 4°C gelagert werden. 9 µl des äquilibrierten Gelgemischs wurden in das dafür vorgesehene Feld (mit G markiert) des Chips gegeben und mithilfe eines Kolbendrucks in einer Apparatur des Herstellers (Priming Station) für 60 Sek. gleichmäßig im Chip verteilt. Danach wurden drei weitere markierte Felder mit je 9 µl Gel beladen. 5 µl des internen Längenstandards wurden in jedes Proben-Well gegeben. In das Feld, welches für den Marker vorgesehen ist, wurde 1 µl des DNA-ladders pipettiert. In die restlichen 11 Felder wurde 1 µl (auf 3ng eingestellt) der entsprechenden DNA-Probe gegeben, dabei war zu beachten, dass alle Felder belegt sein müssen. Der Chip musste vor der Analyse im Bioanalyser-Gerät noch für 60 Sek. bei 2400 rpm in einem speziellen Vortexer (IKA) gemischt werden. Anschließend konnte der Chip im Bioanalyser-Gerät platziert und die Analyse gestartet werden. Die Auswertung erfolgte mittels der Agilent 2100 Expert-Software.

2.3.15 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger erfolgt durch eine Kettenabbruchreaktion - hierbei wird mithilfe einer Polymerase ein DNA-Strang synthetisiert. Die fluoreszenzmarkierten dNTPs bewirken jedoch aufgrund einer fehlenden OH-Gruppe einen Kettenabbruch. Die unterschiedlich langen Fragmente können anschließend analysiert und anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzen die Sequenz ermittelt werden. Die Sequenzierreaktion (siehe Tab. 2-18) wurde mit dem Big Dye Premix 3.1 im Thermocycler (siehe Tab. 2-19) durchgeführt.

Tab. 2-18 Zusammensetzung Sequenzierreaktion

Zusatz	Menge [µl]	Konzentration
Big Dye Premix 3.1	2	
Sequenzierpuffer	1	5x
Primer	0,5	10 µM
DNA	variabel	ca. 500 ng
H ₂ O	ad 10	

Tab. 2-19 Thermocyclerprogramm für die Sequenzierreaktion

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Sequenzierreaktion wurden in 25 Zyklen wiederholt.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]
Initiale Denaturierung	96	60
Denaturierung	96	10
Primerannealing	50	5
Sequenzierreaktion	60	240
Pause/Ende	4	∞

Im Anschluss wurde die Probe mit Ethanol gefällt (siehe 2.3.4) und nach dem Trocknen in 15 µl Formamid gelöst. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Sequenzierer „Genetic Analyzer 3130“. Die Auswertung der Proben erfolgte mit dem Programm „Sequencher“ (Gene Codes).

2.4 Protein-Standardmethoden

2.4.1 Fraktionierte Proteinextraktion

Für die anstehenden Versuche wurden Cytoplasma- und Zellkernproteine getrennt untersucht - daher wurde eine fraktionierte Zellextraktion durchgeführt, mit welcher die beiden Kompartimente voneinander getrennt werden konnten. Als Ausgangsmaterial dienten Zellen, welche auf einer 15 cm Schale kultiviert wurden. Sobald diese eine gewünschte Konfluenz erreicht hatten, konnten sie mithilfe eines Zellspatels von der Platte gelöst werden. Hierfür wurde das Medium der Platte abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen und in 10 ml PBS aufgenommen. Ab diesem Punkt fanden alle weiteren Schritte auf Eis oder in auf 4°C gekühlten Zentrifugen statt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reagenzgefäß gegeben und bei 4000 rpm für 10 Min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS suspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls bei 4000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 500 µl Lysepuffer I aufgenommen und 10 Min. auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde je Probe eine kleine Spritze (20G) vorbereitet und mit Lysepuffer I gespült. Anschließend wurden die Proben mit 5 µl NP40 supplementiert, das Lysat vier Mal in die vorbereiteten Spritzen aufgezogen und im Anschluss in eine neues 1,5 ml Gefäß überführt. Nach einer weiteren dreiminütigen

Material und Methode

Zentrifugation (4000 rpm) befand sich im Überstand die Cytoplasmafraktion, welche bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt werden konnte. Das Pellet wurde zwei Mal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation 4000 rpm, 2 Min.) und anschließend in 100 µl Lysepuffer II aufgenommen, welchem NP40 zugesetzt wurde (10µl/ml). Die Gefäße wurden für eine Dauer von 20 Min. bei 4°C auf einem Drehschüttler platziert und im Anschluss fand eine siebenminütige Zentrifugation (14.000 rpm) statt. Im Überstand befand sich das gewonnene Kernextrakt. Beide Fraktionen wurden bei -80°C gelagert.

2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der gewonnenen Proteine wurde mithilfe von Bradford-Reagenz und einem Photometer bestimmt. Hierfür wurden 1 µl der Probe mit 800 µl Wasser, sowie 200 µl Bradford-Reagenz in einer Küvette gut gemischt und für eine Dauer von 5 Min. inkubiert. Durch Komplexbildung erfolgt ein Farbumschlag von braun zu blau. Die Messung der Absorption erfolgte im Photometer bei 595 nm. Anhand der optischen Dichte konnte die Konzentration der Proteine bestimmt werden. Als Nullabgleich diente Wasser mit Bradford-Reagenz.

2.4.3 Fällung von Proteinen

Für den Einsatz im Westernblot mussten die Proteine gefällt und in Ladepuffer (2x) gelöst werden. Vom Kernprotein wurden 30 µg, vom Cytoplasmaprotein 100 µg eingesetzt. Die entsprechende Menge der jeweiligen Lösung wurde mit dem neunfachen Volumen an kaltem Aceton versetzt. Die Fällung fand bei -20°C über Nacht statt. Das Gemisch wurde für 30 Min. (14.000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet getrocknet, in 16 µl Ladepuffer (2x) gelöst und für mind. eine Stunde inkubiert. Die Proben konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.4.4 SDS-PAGE und Westernblot

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Polyacrylamidgelelektrophorese, mit welcher die Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Das SDS (Natriumdodecylsulfat) sorgt dabei für eine gleichmäßige anionische Ladung der Proteine, welche eine Auftrennung im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode ermöglicht (Laemmli, 1970). Zur Vorbereitung wurde das Gel, bestehend aus einem Sammelgel (Tab. 2-21) und dem Trenngel (Tab. 2-20), in einer Apparatur von Biorad gegossen. Zuerst musste

Material und Methode

das Trenngel gegossen werden, sobald es auspolymerisiert war, konnte das Sammelgel oberhalb des Trenngels zugefügt werden, in welchem der Kamm für die Probenkammern platziert wurde.

Tab. 2-20 Trenngel für SDS-PAGE

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung für das Trenngel entsprechend seiner Prozentigkeit an.

	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
H ₂ O	2,325 ml	1,925 ml	1,5 ml	1,125 ml
30 % Acrylamid (37,5:1)	1,3 ml	1,7 ml	2,125 ml	2,5 ml
1,5 M Tris pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
20 % SDS	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Temed	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Tab. 2-21 Sammelgel für SDS-PAGE

Zusammensetzung für das Sammelgel, die Acrylamid Konzentration bleibt hierbei konstant.

	1 Gel
H ₂ O	1,87 ml
30 % Acrylamid (37,5:1)	415 µl
2 M Tris pH 6.8	157,5 µl
20 % SDS	12,5 µl
10 % APS	25 µl
Temed	2,5 µl

Die fertigen Gele wurden in einem speziellen Geltank platziert, welcher mit Laufpuffer gefüllt war und an welchen später die elektrische Spannung angelegt werden konnte. Vor der Übertragung auf das Gel fand ein achtminütiges Aufkochen der Proben statt, um Tertiär- und Quartärstrukturen aufzulösen. Nach dem anschließendem Abzentrifugieren konnten sie auf das Gel geladen werden. Als Gewichtsstandard dienten Proteinladder, von welchen 5 µl aufgetragen wurden. Sobald der Deckel platziert war, konnte eine Spannung an das Gerät

Material und Methode

angelegt werden. Je nach gesuchter Proteingröße dauerte die Auftrennung 60-120 Min. Im Anschluss wurden die Trenngel, sowie die dafür zurechtgeschnittenen Hybond-ECL-Membranen, in auf 4° gekühlten 1xTransferpuffer (+15 % Methanol) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Blotgerät vorbereitet. Als Verfahren wurde das Semi-Dry Blot-Verfahren verwendet, durch welches die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die entsprechende Nitrocellulose-Membran übertragen wurden. Der Blot wurde wie in Abb. 2-5 aufgebaut, dabei wurde die Membran und das aufliegende Gel zwischen zwei Extra-Thick-Blotpapieren platziert, welche vorher ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet wurden.

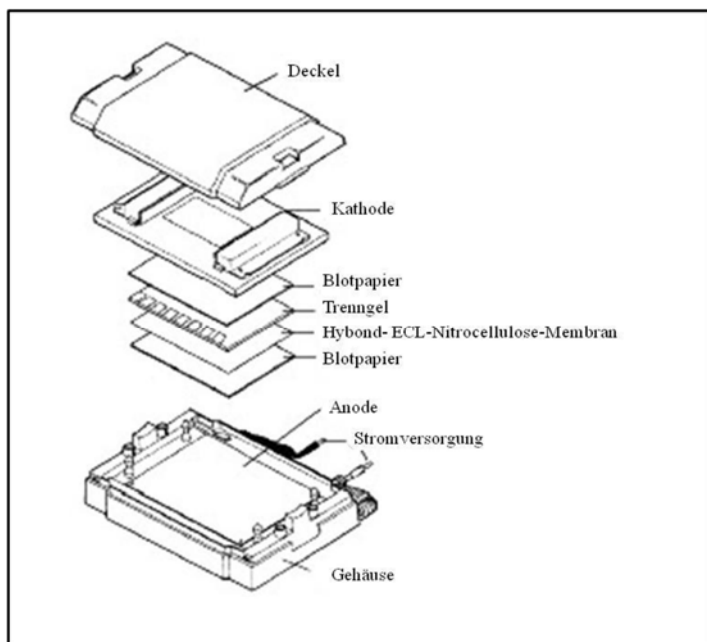


Abb. 2-5 Aufbau des Semi-Dry-Blots

Die Abb. stellt den schematischen Aufbau des Blots dar.

Das Blotten von 2 Gelen dauerte eine Stunde bei 12 V und bei 4 Gelen 90 Min. bei 15 V. Das Blotten wurde mittels Ponceau-S Färbung überprüft. Hierfür wurden die Membranen kurz in Wasser gewaschen und mit der Ponceau-S-Lösung angefärbt. Ein gleichmäßiges Bandenmuster zeigte einen guten Übertrag der Proteine an. Die Färbelösung wurde abgegossen und die Membran mit PBST oder TBST gewaschen. Anschließend erfolgte für eine Stunde das Blocken der Membran, welches die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran unterbinden soll. Je nach Antikörper fand das Blocken in PBST oder TBST, in welchem Magermilchpulver oder BSA gelöst war, statt (siehe Tab. 2-1). Die Blocklösung wurde verworfen und der Primärantikörper, welcher ebenfalls in der entsprechenden Lösung gelöst war, wurde hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte in 5 ml Antikörperlösung in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf einem Rollenmischer über Nacht bei 4°C. Auf die Inkubation folgten drei 15-minütige Waschschrte mit PBST bzw. TBST. An diese schloss sich eine einstündige

Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper an, welcher in der gleichen Blockinglösung wie der Primärantikörper gelöst war. Im Anschluss fanden erneut drei Waschschriffe mit PBST bzw. TBST sowie ein vierter mit PBS bzw. TBS statt. Durch ein an den Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym konnte durch die Zugabe des Lösungsgemischs (Western Lightning Plus ECL Lösung 1+2 (1:1)) eine Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst werden, welche die Proteinbanden sichtbar machte. Diese wurden mit dem Detektionssystem ChemiDoc™ aufgenommen und konnten anschließend mit der Software Image-Lab™ analysiert und quantifiziert werden.

2.5 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunopräzipitation wird genutzt, um die Bindung von Proteinen an die DNA bzw. das Chromatin nachzuweisen. Hierfür wird das Chromatin der entsprechenden Zellen mit Formaldehyd behandelt und so alle gebundenen Proteine fixiert. Über die Präzipitation mit Antikörpern, welche an magnetische Beads gekoppelt sind, können spezifisch Proteine und die daran gebundene DNA isoliert und anschließend, beispielsweise mittels qPCR, analysiert werden.

2.5.1 Chromatin-Fixierung, Lyse und Fragmentierung der Zellen

Die Chromatin-Proteinfixierung fand auf 15 cm Zellkulturschalen statt. Die Fixierung bei der P53-ChIP fand im Anschluss an die Stabilisierung von P53 mittels Nutlin-3a statt (siehe 2.2.2). Die Fixierung wurde mit 690 µl Formaldehyd (16 %) durchgeführt, welches direkt in das auf 10 ml reduzierte Medium gegeben wurde. Die Inkubation erfolgte für eine Dauer von 10 Min bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler. Die Fixierungsreaktion wurde durch Zugabe von 505 µl Glycin (2M) für 5 Min. abgestoppt. Nach Abgießen der Fixierungslösung wurden 5 ml PBS/Glycin (125 mM) auf die Zellkulturschalen gegeben und diese auf Eis platziert. Das Abschaben der Zellen erfolgte mithilfe eines Zellspatels. Anschließend wurden erneut 5 ml PBS/Glycin zugeben und ein zweites Mal abgeschabt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 Min. (1800 rpm, 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation wie oben) und in 300 µl Lysepuffer B (aus truChIP™ Chromatin Shearing Reagent Kit (Covaris)) gelöst. Die Proben wurden für eine Dauer von 10 Min. bei 4°C auf einem Drehschüttler platziert, gefolgt von einer 5-minütigen Zentrifugation (1700 g 4°C), nach welcher der Überstand entfernt wurde. Das Pellet wurde in 300 µl Waschpuffer-C

Material und Methode

suspendiert, erneut für 10 Min. auf dem Drehschüttler inkubiert und im Anschluss pelletiert (wie oben). Anschließend wurde es zwei Mal mit Shearing-Puffer D3 gespült ohne es dabei zu zerstören, zentrifugiert (wie oben) und der Überstand verworfen. Die Fragmentierung fand in AFA-Tube statt, in welche das in 130 µl Shearing-Puffer D3 gelöste Pellet überführt wurde. Die Tubes wurde im Covaris-Gerät (M220) platziert, in welchem die Fragmentierung bei 4°C durchgeführt wurde. Es fand eine dreiminütige Beschallung unter Standardbedingungen statt. Die zusammengehörigen Proben konnten zusammengeführt und bis zur Verwendung bei 4°C (max. eine Woche) gelagert werden.

Vor der anstehenden ChIP musste die Größe der Fragmente überprüft werden. Bei der Aufreinigung der DNA wurden zuerst mittels Reverse Cross Link die DNA-Proteinbindung aufgelöst. Für die Überprüfung wurden 25 µl der fragmentierten DNA mit 50 µl Wasser 3 µl NaCl (3M) und 1 µl RNase A (10mg/ml) für eine Std. bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl Proteinase K (10mg/ml) hinzugegeben und die Proben für eine Dauer von mind. 3,5 Std. bei 65°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe des QiaGen PCR-Purification Kits (siehe 2.3.1) und die Fragmentanalyse per Gelelektrophorese (siehe 2.3.13) bzw. Bioanalyser-Analyse (siehe 2.3.14). Hatte der Großteil der Fragmente etwa eine Größe von 200-800 Basen, konnte im Anschluss eine ChIP durchgeführt werden.

2.5.2 Chromatin-Immunopräzipitation

Eine IP bestand aus 70 µl Chromatin mit 57 µl Nelson IP-Spezialpuffer (bei Zellen mit geringerer Dichte 90 µl + 73 µl). Als Input dienten 10 % desselben Gemischs, welches bis zur Verwendung bei 4°C gelagert wurde. Die Proben wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern versetzt: 1 µl P53 (Abcam), 10 µl Pol II (Santa Cruz) und 1 µl IgG (Abcam). Die Inkubation erfolgte über Nacht auf dem Drehschüttler bei 4°C in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß. Das Gemisch wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Min. bei 12.000 g zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde in ein neues 0,2ml Gefäß überführt, mit 30 µl magnetischen Beads versetzt und für zwei Std. auf dem Drehschüttler inkubiert (4°C). Mit einem magnetischen Rack konnten die Beads gebunden und der Überstand entfernt werden. Die Beads wurden in 400 µl Nelson IP-Puffer aufgenommen, anschließend folgten mehrere Waschschrte mit 500 µl Nelson IP-Puffer (2x), low salt Chip-Puffer (NEB) (2x) und high salt Chip-Puffer (NEB-Puffer + 0,07ml NaCl(5M)/ml) (3x). Zum Waschen wurden die Proben jeweils 4 Min. auf dem Drehschüttler (4°C) platziert und anschließend der Überstand mithilfe des

Magneten entfernt. Sowohl die Proben als auch der Input wurden in 150 µl Elutionspuffer gelöst, wobei jedoch nur die Proben für 1 Std. bei 65°C (1200 rpm) inkubiert wurden, während der Input bei Raumtemperatur gelagert wurde. Im Anschluss wurde der Überstand mithilfe des magnetischen Racks von den magnetischen Beads getrennt und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben und dem Input wurden jeweils 6 µl NaCl (5M) und 2 µl Proteinase K (10mg/ml) pipettiert. Nach einer Inkubation von mind. 3,5 Std. bei 65°C erfolgte die DNA-Aufreinigung (siehe 2.3.1). Die anschließende Analyse erfolgte mittels qPCR (siehe 2.3.12) bzw. ChIP-Sequenzierung (ChIP-Seq), welche bei der Biontech AG in Mainz als Auftragsarbeit angefordert wurde. Die Librarypreparation, sowie die anschließende Sequenzierung, die Qualitätsüberprüfung und eine erste bioinformatische Basisauswertung wurden dort durchgeführt.

2.6 Circular chromosome conformation capture (4C)

Die 4C ist eine Technik, mit welcher chromosomale Interaktionen untersucht werden können. Als Ausgangspunkt (Viewpoint) wird eine entsprechende Region, wie beispielsweise die ICR1, gewählt. Über eine Fixierung des Chromatins werden alle interagierenden Regionen miteinander verbunden. Durch einen anschließenden Restriktionsverdau und Ligation der aneinanderhängenden Ligationspartner werden diese dauerhaft auf DNA-Ebene miteinander verknüpft. Da nun ein Sequenzübergang zwischen dem bekannten Ausgangsfragment (ICR1) und den unbekanntem möglichen Interaktionsregionen besteht, kann im Anschluss die fixierte Proteinbindung aufgelöst werden - somit bleiben nur auf DNA-Ebene verbundene zirkuläre Fragmente als eine Einheit bestehen. Aufschluss darüber, welche Interaktionspartner vorhanden sind, sollte eine anschließende Sequenzierung geben.

2.6.1 Fixierung der 4C-Proben

Pro 4C Ansatz wurden ca. 3×10^6 Zellen mit einer Konfluenz von etwa 80 % benötigt, was in etwa einer Anzahl von drei bis vier 15 cm-Platten entsprach. Für die Fixierung wurde frisches Formaldehyd (4 %) hergestellt. Hierfür wurden 0,8 g Paraformaldehyd in 20 ml PBS bei 65°C für 4 Std. gelöst und anschließend durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Die Lösung wurde mit 60 ml PBS verdünnt. Die Zellen wurden auf den Platten mit 10 ml PBS/Formaldehyd (1 %) für 10 Min. fixiert. Nach der Fixierung wurden die Platten auf Eis gestellt und mit 10 ml PBS/Glycin (125 mM) gewaschen. Danach wurden erneut 10 ml PBS/Glycin auf die Platten gegeben und

die Zellen darin abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Min. (2000 g, 4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl PBS/Glycin resuspendiert und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. An diesem Punkt konnte das Chromatin bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.6.2 Enzymatischer Verdau und Lyse der 4C-Proben

Die Zellen wurden auf drei Aliquots mit je 100 µl aufgeteilt. Diese wurden erneut 5 Min. (2000 g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in 200 µl Restriktionspuffer (Fermentas, Puffer B) gewaschen und zentrifugiert (wie oben). Im Anschluss wurde das Pellet in 194 µl Verdaupuffer (Puffer B + Complete) resuspendiert und nach Zugabe von 6 µl SDS (10 %) im Thermoschüttler bei 37°C und 1400 rpm über Nacht inkubiert. Das SDS diente der Öffnung des Chromatins für den enzymatischen Verdau.

Am nächsten Tag wurde unter Schütteln (800 rpm) 400 µl vorgewärmter Verdaupuffer in kleinen Portionen (4 x 25 µl, 2 x 50 µl, 2 x 100 µl) zugegeben, da sich sonst Zellaggregate bilden können. Falls doch Verklumpungen auftraten, wurden diese durch vorsichtiges Resuspendieren wieder gelöst. Nach dem Suspendieren wurde das SDS durch Zugabe von 67 µl Triton X-100 (20 %, auf 37°C vorgewärmt) unter Schütteln (1400 rpm) für 1,5 Std. bei 37°C weggefangen. Aus den drei Aliquots wurden jeweils vorsichtig 50 µl als Kontrolle (unverdaut) entnommen und bei 4°C gelagert. Für den Restriktionsverdau wurden 31 µl des Enzyms Csp6I und 10,8 µl Puffer B-Konzentrat(10x) zugegeben und die Probe für 4 Std. bei 37°C (900 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 31 µl Csp6I und 3,1 µl Puffer B (10x) zugegeben und die Proben über Nacht ohne Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden der Probe weitere 31 µl Enzym und 3,1 µl Puffer B (10x) zugegeben und nochmals für 4 Std. bei 900 rpm verdaut. Im Anschluss wurden 50 µl als Verdaukontrolle abgenommen und bei 4°C gelagert. Der Verdaustop und die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 145 µl SDS (10 %) und einer 20-minütigen Inkubation bei 65°C (600 rpm). Die Zellfragmente wurden für 3 Min. (16000 g, RT) abzentrifugiert. Das Volumen des Überstands wurde bestimmt, in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 4°C gelagert, bis die Verdaueffizienz der Proben bestimmt war.

2.6.3 Bestimmung der Verdaueffizienz der 4C-Proben

Zu den 50 µl der Kontrollproben (vor und nach dem Verdau) wurden jeweils 9,5 µl SDS (10 %) gegeben und diese für 20 Min. bei 65°C inkubiert. Die Zellfragmente wurden für drei Min.

Material und Methode

(12000 g, 12°C) pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Das Pellet wurde anschließend in 127 µl TE resuspendiert und erneut abzentrifugiert (siehe oben). Der Überstand wurde zum ersten hinzugegeben und die Proben nach Zugabe von 5 µl RNase A (10mg/ml) für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Für das Auflösen der Formaldehydfixierung (Reverse Crosslink) wurde den Proben 10 µl Proteinase K (10mg/ml), sowie 8 µl NaCl (5M) zugegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert. Nach dem Reverse Crosslink konnte die DNA aus den Proben mithilfe des QiaGen PCR-Aufreinigung-Kits isoliert werden (siehe 2.3.1). Der Verdau der Proben wurde mit drei qPCRs überprüft. Die Proben für den weiteren Verlauf wurden anhand der Verdaueffizienz ausgewählt. Während die Probe mit dem besten Verdau als 4C-Probe verwendet wurde, wurden die anderen beiden als Kontrollen genutzt. Mit der ersten Kontrollprobe wurde nur das Reverse Crosslink, aber keine Ligation durchgeführt, mit der anderen Kontrollprobe wurde die Ligation im Anschluss an das Reverse Crosslink durchgeführt. Die 4C-Probe wurde bis zur Ligation bei 4°C gelagert.

2.6.4 Reverse Crosslink, Ligation und Aufreinigung der 4C-Proben

Beide Kontrollproben wurden mit Wasser auf das Volumen von 800 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von jeweils 2014 µl Wasser 6 µl EDTA (0,5M), 6 µl NaCl (5M) und 120 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden sie bei 65°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA mithilfe des QiaGen Kits (siehe 2.3.1) aufgereinigt. Da das Volumen allerdings 3 ml betrug, musste die entsprechende Menge Bindepuffer (PB, 5-fache des Volumens) verwendet werden. Daher wurde zum Binden der DNA je Probe zwei Aufreinigungssäulen verwendet und jeweils die Hälfte der DNA in mehreren Zentrifugationsschritten an die Säule gebunden. Beim Eluieren wurde zuerst die DNA der einen Säule mit 50 µl Elutionspuffer nach fünf-minütiger Inkubation gelöst und dann auf die zweite Säule übertragen. Im Anschluss wurde die Konzentration der Proben bestimmt (siehe 2.3.9). Für die anstehende Ligation sollte die Konzentration 80 – 96 ng/µl nicht überschreiten. Eine Probe wurde nicht ligiert und bis zur PCR bei -20°C gelagert. Die Kontrollprobe (Reverse Crosslink + Ligation), sowie die 4C-Probe wurden jeweils mit Wasser auf 750 µl aufgefüllt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 4635 µl Ligationspuffer (siehe 2.1.3) gemischt und für 1,5 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 600 µl T4-Ligasepuffer und 15 µl T4-Ligase zugegeben. Während der 12 Tage andauernden Ligation wurden alle drei Tage 60 µl ATP (100 mM) frisch zugegeben, sowie am zehnten Tag nochmals 7 µl Ligase und 60 µl ATP (100 mM). Am zwölften Tag wurde das

Material und Methode

Reverse Crosslink der beiden Proben gestartet. Nach einer Std. bei Raumtemperatur wurden je 240 µl NaCl (5M), 12 µl EDTA (0,5M) und 120 µl Proteinase K (10mg/ml) zugegeben und die Proben bei 65°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ligationsmix in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 60 µl Glycogen Blau, 600 µl Natrium-Acetat (3M, pH 5), sowie 12 ml Ethanol (100%) versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung wurde die Probe für 45 Min. (2200 g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen, erneut für 15 Min. zentrifugiert (2200g, 4°C), getrocknet, in 100 µl TE (0,5x) gelöst und die DNA aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden zwei verschiedene Kits benutzt, um den hohen Salzgehalt während der Ligation wieder ausgleichen zu können. Zuerst wurde die DNA mit dem Westburg Kit (Invitex) isoliert und in 50 µl Elutionspuffer gelöst. Im Anschluss folgte eine zweite Aufreinigung mit dem QiaGen Aufreinigungs Kit, bei welcher DNA ebenfalls in 50 µl Elutionspuffer gelöst wurde. Nach Bestimmung der Konzentration (siehe 2.3.9) wurde diese mit TE (0,5x) auf 20 ng/µl eingestellt. Anschließend fand ein 45-minütiger Exonukleaseverdau bei 37°C statt. Hierfür wurden 50 µl der entsprechenden Probe, sowie 20 µl HF-Puffer, 23 µl Wasser, 7 µl Exonuklease-I und 1,5 µl Exonuklease-III eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 80°C für 25 Min. inaktiviert. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem Westburg Kit. Hierfür wurden sie mit 500 µl Bindepuffer und 62 µl TE (0,3x und 10 ng *E.coli* DNA(300bp)) über Nacht auf der Säule inkubiert und erst am nächsten Tag eluiert. Die lange Inkubationszeit war nötig um die Ausbeute der zirkulären DNA zu erhöhen; die *E.coli*-DNA sollte verhindern, dass die DNA-Proben mit der Gefäßwand interagierten.

2.6.5 PCR für die 4C

Zur Amplifikation der 4C-Proben wurde eine sogenannte nested PCR mit inner- und outer-PCR durchgeführt. Hierbei handelt es sich um zwei aufeinanderfolgende PCRs, die sich besonders gut für die Amplifizierung selbst geringer Mengen an DNA eignen. Der Primer für die erste PCR ist meist spezifischer und generiert eine Matrize für den zweiten Primer, der somit auch etwas unspezifischer sein kann, dadurch aber in seiner Lage näher an der Restriktionsschnittstelle platziert werden konnte.

Material und Methode

Von jeder Probe wurden drei outer-PCRs durchgeführt (siehe Tab. 2-22 u. Tab. 2-23). Anschließend wurden die Proben der outer-PCR 1:100 verdünnt. Von den Verdünnungen der outer-PCRs wurden jeweils 2,5 µl für die inner-PCRs eingesetzt. Aus jeder der drei outer PCRs der Probe und der ligiert-Kontrolle wurden jeweils drei inner-PCRs angesetzt, sowie eine PCR mit einer Mischung aus allen drei outer PCRs. Für die nicht-ligiert-Kontrolle wurden die outer PCRs gemischt und insgesamt nur drei inner PCRs angesetzt (siehe Tab. 2-22 u. Tab. 2-23). Im Anschluss wurden die 10 bzw. 3 PCRs gepoolt und jeweils einmal eine Menge von 20 µl auf einem Agarosegel überprüft (siehe 2.3.13). Die restlichen 180 µl wurden mithilfe des QiaGen Kits aufgereinigt (siehe 2.3.1) und in 50 µl Elutionspuffer gelöst. Nach sorgfältiger Überprüfung wurden die geeigneten Proben für die Sequenzierung zur Firma Tron übergeben, welche sowohl die Librarypreparation, als auch die anstehende Sequenzierung als Auftragsarbeit durchgeführt hat.

Tab. 2-22 Komponenten der outer- und inner-PCR für die 4C

Es wurden jeweils 20 µl Ansätze verwendet. Für die inner-PCR wurden die Proben der outer-PCR 1:100 verdünnt eingesetzt.

Komponente	Menge pro Reaktion [µl]		Konzentration
	outer-PCR	inner-PCR	
Wasser	0,4	8,9	
HF-Puffer	4	4	5x
Primer Fw	1,3	1,3	10 µM
Primer Rv	1,3	1,3	10 µM
DNTPs	0,7	0,7	je 10mM
MgCl ₂	0,4	0,4	10 mM
<i>E.coli</i> -DNA (300bp)	1	-	10 ng/µl
4C-DNA-Probe	10*	2,5	*ca. 200 ng
DMSO	0,6	0,6	100%
Phusion-Polymerase	0,3	0,3	2 U/µl

Material und Methode

Tab. 2-23 PCR-Bedingung für outer- und inner-PCR der 4C

Für die outer-PCR wurden initial drei Zyklen mit 40 Min. Primer Annealing durchgeführt, danach folgten 32 Zyklen wie in der Tabelle beschrieben. Für die inner-PCR wurden 31 Zyklen durchgeführt.

Schritt	outer PCR		inner-PCR	
	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]
Initiale Denaturierung	98	45	98	45
Denaturierung	98	7	98	10
Primer Annealing	63	21	62	60
Elongation	72	300	72	240
Finale Elongation	72	420	72	420
Pause/Ende	4	∞	4	∞

3. Ergebnisse

Als zelluläres Ausgangsmaterial für die Experimente während der Promotionsarbeit wurden hauptsächlich humane Fibroblasten mit Imprinting- bzw. epigenetischen Defekten, welche zu SRS oder BWS führen, genutzt. Dabei standen mit BWS Δ H19/ICR1 und BWS UPD11 zwei BWS-Zellkulturen und mit SRS UPD11 und SRS UPD7 zwei SRS-Zellkulturen zur Verfügung, welche jeweils spezielle molekulare Eigenschaften aufweisen. Bei BWS Δ H19/ICR1 handelt es sich um Zellen mit einer maternalen Deletion auf Chromosom 11p15.5, welche unter anderem die ICR1 betrifft, die in der Arbeit näher charakterisiert wurden (siehe 3.1), während für BWS UPD11 durch molekulare Untersuchungen von Blutzellen eine paternale UPD von Chromosom 11p15.5 diagnostiziert wurde. Die Patienten der Spenderzellen SRS UPD11 und SRS UPD7 weisen beide einen SRS-Phänotyp auf, jedoch mit unterschiedlichen kausalen molekularen Defekten. Für SRS UPD11 wurde eine maternale UPD der Region 11p15.5 beschrieben und für SRS UPD7 eine maternale UPD des Chromosoms 7.

Zentrale Ausgangspunkte für die Analysen waren die ICR1 sowie die zugehörigen Gene *IGF2* und *H19*. Die Expression der beiden Gene ist, abhängig von der Methylierung der ICR1 und der daraus resultierenden CTCF-Bindung, parental unterschiedlich. Darüber hinaus teilen sich die beiden Gene mehrere Enhancer, welche zwischen *IGF2* und *H19* bzw. von *H19* aus telomerwärts liegen. Durch DNA-Schleifenbildung können diese Bereiche mit den *IGF2*-Promoterbereichen oder dem *H19*-Promoter interagieren (Nativio *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern dies von bestimmten Faktoren oder epigenetischen Defekten beeinflusst wird.

3.1 Molekulare Charakterisierung der Deletion der BWS Δ H19/ICR1-Zellen

Im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Bioscientia sollte ein Teil der Analysen für die molekulare Diagnostik einer BWS-Patientin in unserem Labor durchgeführt werden. Die Überwachung der Schwangerschaft war bis zum Ende des zweiten Trimesters unauffällig. Ultraschalluntersuchungen in Schwangerschaftswoche 30 zeigten jedoch eine auffällig vergrößerte Zunge, sowie eine Vergrößerung der Nieren. Diese Auffälligkeiten können Anzeichen für einen BWS-Phänotyp sein. Das Kind wurde in der 31 (+2) Woche per Kaiserschnitt geboren und wies ein Geburtsgewicht von 2155 g (+1,9 SD), eine Körperlänge

Ergebnisse

von 48 cm (+4,7 SD) und einen Kopfumfang von 31 cm (+ 1,8 SD) auf. Der Verdacht auf BWS konnte durch die nach der Geburt durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden. Neben der vergrößerten Zunge wurden weitere phänotypische Auffälligkeiten, wie beispielsweise eine leichte Verformung der Ohren, entdeckt. Die engmaschigen Ultraschalluntersuchungen ergaben, dass sich in den vergrößerten Nieren weiterhin persistierende embryonale Gewebereste befanden, welche die Entwicklung eines perilobaren Nephroblastoms andeuteten. Im weiteren Verlauf wurde die Patientin mit einer Chemotherapie behandelt. Bis zum Alter von 12 Monaten hatte sich die Größe der Nieren normalisiert. Eine genaue molekulare Diagnostik war insbesondere für eine zukünftige genetische Beratung unerlässlich.

Die molekulare Diagnose wurde von der Firma Bioscientia erstellt. Eine durchgeführte methylierungssensitive MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) wies auf eine Deletion des *H19*-Gens sowie der ICR1 hin. Für *IGF2* bzw. das IC2 wurden keine genomische Veränderungen festgestellt. Gleichzeitig zeigte sich eine erhöhte Methylierung für die ICR1, während die ICR2 unauffällig war. Die erhöhte Methylierung im Bereich der ICR1 sprach dafür, dass es sich bei der Deletion um den Verlust des maternalen Allels handelt. Für eine genauere Analyse wurde zusätzlich eine Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array CGH) für diesen Bereich durchgeführt. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Sonden benutzt, welche an die DNA binden und so einen Nachweis für genomische Imbalancen ermöglichen. Durch diese Technik konnte die Deletion vorerst für den Bereich von 1.996.741 – 2.020.975 (hg19) nachgewiesen werden. Aufgrund der limitierten Anzahl an Sonden konnte der exakte Bruchpunkt der Deletion jedoch nicht genauer bestimmt werden. Diese Analyse zeigte jedoch klar, dass sowohl *H19* als auch ein Teil der distalen Enhancer von der Deletion betroffen waren. Die exakte Beschreibung der Deletion sowie weitere funktionelle Analysen sollten in unserem Labor durchgeführt werden. Hierfür wurden Fibroblasten (BWS Δ H19/ICR1) der Patientin zu Verfügung gestellt.

3.1.1 Eingrenzung der Deletion mittels qPCR

Da die genaue Lokalisierung der Bruchpunkte der Deletion unklar war und sie für eine PCR mit anschließender Sequenzierung potentiell zu weit auseinanderlagen, sollte die grobe Eingrenzung der Deletion mittels qPCR (siehe 2.3.11) durchgeführt werden. Hierfür wurde genomische DNA (siehe 2.3.2) aus den Patientenzellen isoliert. Für die anschließende qPCR wurden 15 ng DNA eingesetzt. Dabei wurden zuerst die Loci, welche ohne Zweifel innerhalb

Ergebnisse

bzw. außerhalb der Deletion liegen, miteinander verglichen. Als nichtbetroffener Locus wurde *KCNQ1OT1* genutzt und die relative Konzentration der qPCR als 2 definiert. Alle weiteren untersuchten Loci wurden auf diese Kontrolle normalisiert. Demzufolge sollten Regionen innerhalb der Deletion eine normalisierte Konzentration von 1, Regionen außerhalb der Deletion eine Konzentration von 2 aufweisen.

Insgesamt wurden 15 verschiedene Loci untersucht, welche sich, abgesehen von *KCNQ1OT1*, von der CTCF-Bindestelle CCD über den Bereich der ICR1 und der distalen Enhancer bis hin zum Gen *MRPL23* verteilten. Zur Absicherung der Methode wurden Kontrollfibroblasten als verwendet und die Ergebnisse beider Proben miteinander verglichen (siehe Tab. 3-1). Eine Konzentration von 2 entsprach also der Menge an DNA zweier Allele. Mit ICR1 – 2,2 Kb, ICR1, CS3 und CS6 gab es bei BWS Δ H19/ICR1 insgesamt vier Regionen, die eine Konzentration von etwa 1 aufwiesen. Dies deutete darauf hin, dass für diese Bereiche nur ein Allel vorhanden war. Der Abgleich auf die Kontrolle konnte diese Ergebnisse bestätigen. *KCNQ1OT1* sowie die übrigen Regionen wiesen einen Wert von 2 oder höher auf. Somit war davon auszugehen, dass die vier Regionen, in welchen nur etwa die Hälfte der Konzentration gemessen wurde, innerhalb der Deletion liegen müssen. Der Bruchpunkt der Deletion konnte centromerwärts somit auf den Bereich von etwa 2,2 bis 3,2 Kb vor der ICR1 eingegrenzt werden. Auf der telomerwärts gelegenen Seite der Deletion lag der Bereich des Enhancers CS6 innerhalb der Deletion. Der nächste Marker, welcher mit den gewählten Primern außerhalb zu finden war, lag etwa 4,8 Kb hinter CS7.

Ergebnisse

Tab. 3-1 Eingrenzung der Deletion mittels qPCR

Die Tabelle gibt die normalisierten Werte von BWS Δ H19/ICR1 und der Kontrolle aus der qPCR wieder. Dabei wurde jeweils die Region *KCNQ1OT1* als 2 gesetzt und die anderen Proben auf diesen Wert normalisiert.

	BWS Δ H19/ICR1	Kontrolle	(BWS Δ H19/ICR1/Kontrolle)*2
<i>KCNQ1OT1</i>	2,0	2,0	2,0
CCD	2,8	2,0	2,8
HUC1	2,3	2,0	2,3
HUC2	2,6	2,0	2,6
ICR1 – 6 Kb	2,6	1,8	3,0
ICR1 – 4,5 Kb	2,2	1,9	2,4
ICR1 – 3,2 Kb	2,8	1,7	3,3
ICR1 – 2,2 Kb	1,2	1,9	1,3
ICR1	0,7	1,4	1,0
CS3	1,1	2,0	1,1
CS6	1,0	2,1	1,0
CS7 + 4,8 Kb	2,6	1,6	3,1
CTCF DS – 2,8 Kb	2,6	2,0	2,7
CTCF DS	2,2	1,8	2,5
<i>MRPL23</i>	2,5	1,7	2,9

3.1.2 Bruchpunktbestimmung der Deletion

Die exakte Größe der Deletion sowie die genauen Bruchpunkte sollten durch eine PCR mit anschließender Sequenzierung genau bestimmt werden. Die beiden flankierenden Punkte (ICR1 – 3,2 Kb und CS7 + 4,8 Kb), welche durch die qPCR bestimmt worden waren, dienten in diesem Fall als Ausgangspunkt für die anstehende PCR. Auf dem deletierten Allel konnte das zu amplifizierende Produkt rechnerisch bis zu 7,4 Kb groß sein (für das intakte Allel: 31,6 Kb). Für die Amplifizierung wurde der Fw-Primer von ICR1 – 3,2 Kb und der Rv-Primer von CS7 + 4,8 Kb sowie die Polymerasen Long Amp Taq und IMAX-II verwendet (siehe 2.3.11). Die Größe des amplifizierten Produkts wurde anschließend mithilfe eines Agarosegels bestimmt (siehe Abb. 3-1). Die PCR-Produkte beider Polymerasen zeigten eine Bande bei etwa 3400 Basen, wobei bei der Bande der Long Amp-Polymerase eine deutlich höhere Intensität zu erkennen war. Beide Gelspuren zeigten zusätzlich weitere schwache Banden bzw. einen verschmierten Hintergrund bei der IMAX-II-Polymerase. Aufgrund der wahrscheinlich unspezifischen Nebenprodukte wurden die Banden bei 3400 Basen aus dem Gel ausgeschnitten (siehe 2.3.6)

Ergebnisse

und die DNA aufgereinigt, welche anschließend mittels DNA-Fällung aufkonzentriert und in einem Volumen von 10 μl H_2O aufgenommen wurde (siehe 2.3.4).

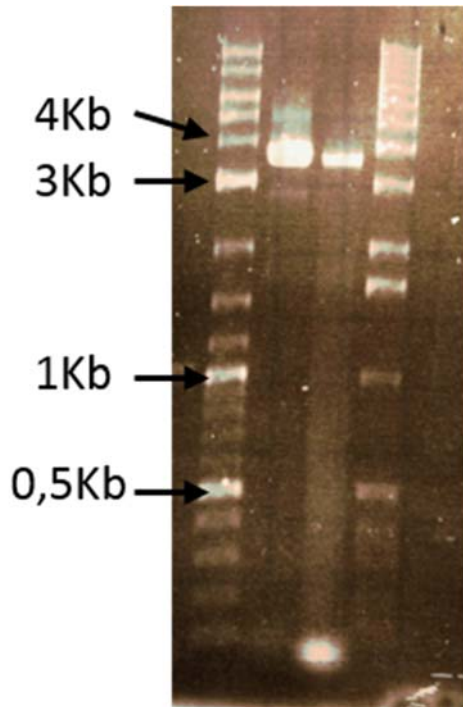


Abb. 3-1 Gelbild der Deletions-PCR mit Long Amp und IMAX-II-Polymerase

Die äußeren Spuren zeigen den Längenstandard des Agarosegels (2-Log, NEB). Die linke Probenspur zeigt das Produkt der NEB-Polymerase, die rechte Spur das der IMAX-II-Polymerase. Die oberen beiden deutlichen Banden zeigen das jeweilige PCR-Produkt auf Höhe von etwa 3400 Basen.

Für das Produkt der Long Amp-Polymerase konnte nach DNA-Fällung eine Konzentration von 11 $\text{ng}/\mu\text{l}$ und für das der IMAX-II-Polymerase eine Konzentration von 3,8 $\text{ng}/\mu\text{l}$ gemessen werden. Anschließend folgte eine Sanger-Sequenzierung (siehe 2.3.15) zur genauen Bestimmung der Deletionsbruchpunkte. Für die Sequenzierungs-PCR wurden 5 μl des aufgereinigten PCR-Produkts sowie der ICR-3,2 Kb Primer verwendet. Nach Auswertung der Sequenzierungsergebnisse konnte die Deletion eindeutig bestimmt werden. Der Abgleich für die Position wurde mithilfe des UCSC Genome Browsers durchgeführt. Somit konnte die Deletion für den Bereich 1.996.581 – 2.027.213 (hg 19) ermittelt werden. Dies entspricht einer Größe von 30.632 Basen. Die Deletion betraf neben der ICR1 und *H19* auch die Enhancerelemente CS3, CS4, CS6 und CS7 (siehe Abb. 3-2).

Ergebnisse

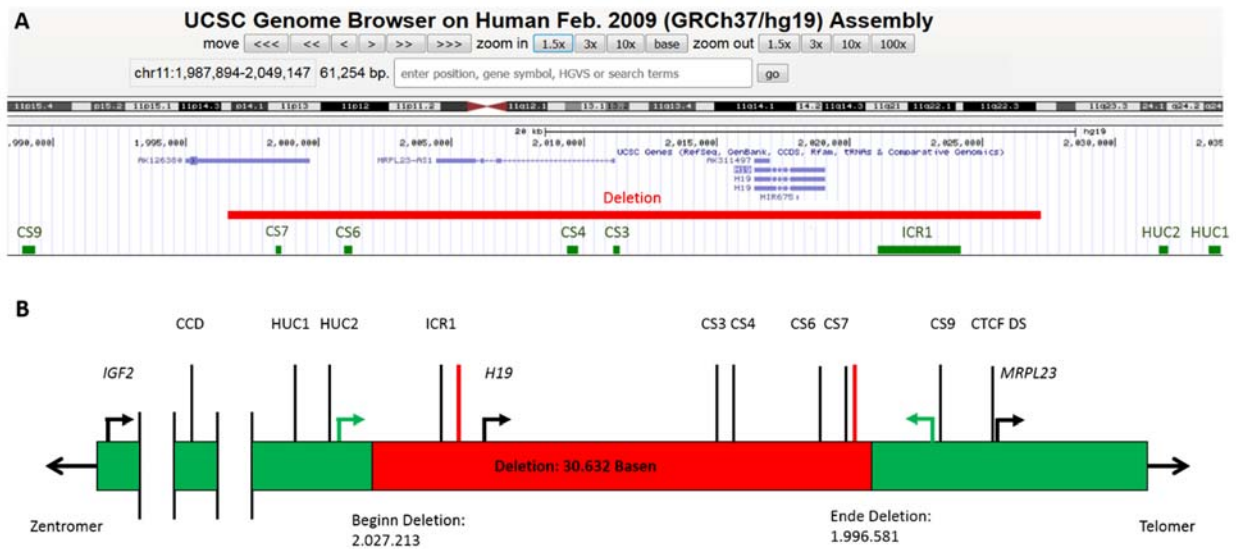


Abb. 3-2 Darstellung des von der Deletion betroffenen Bereichs auf Chromosom 11

A Der genomische Ausschnitt des UCSC Genome Browsers zeigt den Bereich auf Chromosom 11, über welchen sich die 30.632 Basen große Deletion (rot) erstreckt. Sie umfasst neben der *ICR1* und dem *H19*-Gen auch die Enhancerelemente *CS3* – *CS7* (grün). **B** In der schematischen Darstellung ist zu erkennen, welche Elemente innerhalb bzw. außerhalb der Deletion liegen. Die beiden grünen Pfeile geben den Startpunkt für die PCR der Deletion an, während die roten Linien die äußeren Sonden der Array CGH markieren.

3.2 Methylierungsanalyse der SRS- und BWS-Fibroblasten

Die molekulare Diagnostik der Patienten mittels Satellitenanalyse ergab, dass bei SRS UPD11 eine matUPD11 und bei BWS UPD11 eine patUPD11 jeweils für den Bereich 11p15.5 vorlag, welcher sowohl die Gene *IGF2* und *H19*, als auch die Gene des zweiten geprägten Clusters beinhaltet. Da die initialen molekularen Untersuchungen mit Blutproben durchgeführt wurden, erfolgte zur genaueren Analyse, wie sich diese Defekte in den Fibroblasten äußern, eine Methylierungsanalyse der beiden Zellkulturen für die relevanten Regionen. Auch die BWS Δ H19/*ICR1*-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Methylierung auf Chromosom 11 untersucht. Hierfür wurde DNA aus den Zellen isoliert und mithilfe einer Bisulfitkonversion (siehe 2.3.7) für die Untersuchung vorbereitet. Die Analyse der Methylierung erfolgte in Kooperation mit dem humangenetischen Institut der Universitätsmedizin. Hier wurde eine Pyrosequenzierung der jeweiligen Regionen vorgenommen, mit deren Hilfe die Methylierung bestimmt werden konnte. Für die Sequenzierung wird hierbei die als Einzelstrang vorliegende DNA mithilfe eines regionsspezifischen Primers amplifiziert. Die dNTPs werden einzeln nacheinander zugegeben. Sobald das komplementär passende Nukleotid an die DNA-Matrize bindet, wird Pyrophosphat enzymatisch abgespalten und durch eine ATP-Sulfurylase direkt in ATP umgewandelt. Dieses

Ergebnisse

aktiviert dann wiederum eine Luciferase, welche den Einbau durch einen detektierbaren Lichtblitz sichtbar macht (Ronaghi, 2001).

Um die Methylierungsrate festzustellen, wurden für die ICR1 drei CpG-Motive im B1-Repeat (siehe Abb. 3-3) verwendet, welche auch für die SRS- bzw. BWS-Diagnostik genutzt werden. Aus den generierten Methylierungswerten wurde der Mittelwert berechnet.

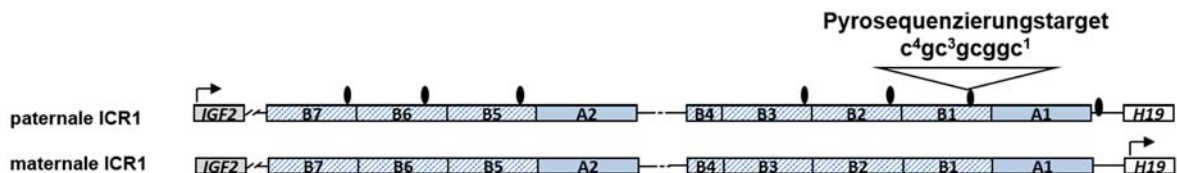


Abb. 3-3 Differentiell methylierte CpG-Motive in der ICR1

In der schematischen Darstellung der ICR1 sind die einzelnen Repeats, sowie die differentiell methylierten CpG-Motive (schwarze Ovale) dargestellt. Für die Methylierungsanalyse wurden die CpGs im B1-Repeat sequenziert.

Für die ICR2 sind zwei relevante CpGs im Bereich des *KCNQ1OT1*-Promoters untersucht worden. Dabei zeigte sich bei Betrachtung der ICR1, dass die Methylierung für BWS UPD11 im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert und für SRS UPD11 hoch signifikant auf etwa 30 % reduziert war (siehe Abb. 3-4 A). Im Bereich der ICR2 konnte, im Vergleich zur Kontrolle, eine signifikante Reduktion der Methylierung für BWS UPD11 auf 46 % und für SRS UPD11 eine sehr signifikante Erhöhung auf etwa 60 % festgestellt werden (siehe Abb. 3-4 B). Dieses Ergebnis zeigte, dass die UPD für BWS UPD11 in den Fibroblasten zumindest auf Methylierungsebene kaum nachweisbar und auch für SRS UPD11 nicht vollständig ausgeprägt war. Dies ließ auf eine mosaikale Verteilung des epigenetischen Defekts in den verschiedenen Geweben schließen. In den BWS Δ H19/ICR1-Zellen konnte in der ICR1 eine hoch signifikante Erhöhung der Methylierung auf 86 % gemessen werden, während diese in der ICR2 im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert war.

Ergebnisse

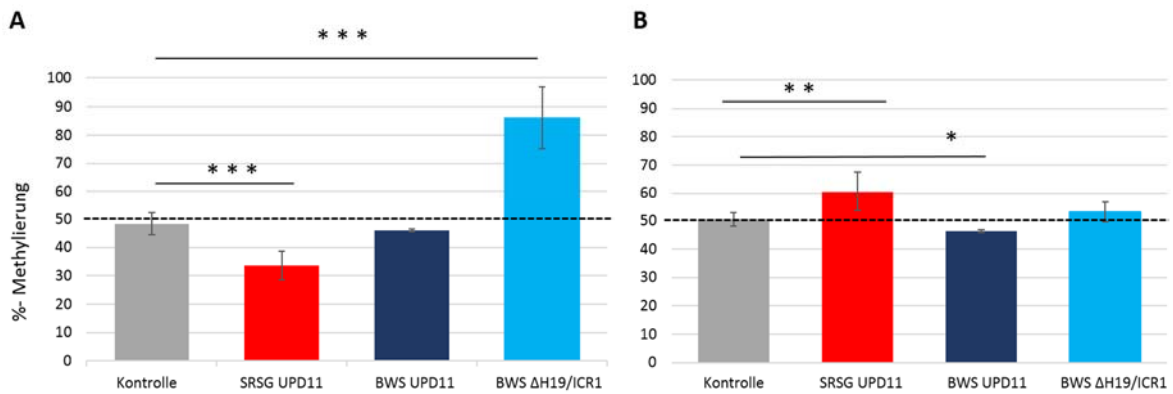


Abb. 3-4 Methylierungsanalyse von SRS UPD11, BWS UPD11 und BWS ΔH19/ICR1

Die Balken stellen die mittlere ermittelte Methylierung für SRS UPD11, BWS UPD11 und BWS ΔH19/ICR1 in der ICR1 (A) bzw. der ICR2 (B) dar. Die zu erwartende Methylierung der Kontrolle lag bei etwa 50 % (gestrichelte Linie). Die Sterne geben die Signifikanz der reduzierten bzw. erhöhten Methylierung der SRS UPD11-Zellen im Vergleich zur Kontrolle an, während für BWS UPD11 nur eine geringe und für BWS ΔH19/ICR1 keine Veränderung in der ICR2 vorlag. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test berechnet (* = P-Wert ≤ 0,05, ** = P-Wert ≤ 0,01, *** = P-Wert ≤ 0,001, n=2 bzw. für SRS UPD11 n=4).

Die Methylierungsanalyse zeigte somit für SRS UPD11 mit einer Reduktion der Methylierung in der ICR1 und einer Erhöhung in der ICR2 die erwarteten Tendenzen, während sie in BWS UPD11 kaum verändert vorlag. In den BWS ΔH19/ICR1-Zellen konnte, wie erwartet, aufgrund der maternalen Deletion eine hohe Methylierung in der ICR1 und keine Veränderung in der ICR2 festgestellt werden.

3.3 Expressionelle Charakterisierung von Zellen mit verschiedenen Imprintingdefekten

Mithilfe vergleichender Expressionsanalysen mittels qRT-PCR und ausgewählter Transkripte wurden Zellen mit verschiedenen Imprintingdefekten miteinander verglichen. Unter anderem wurden dabei die zwei verschiedenen SRS-Fibroblasten SRS UPD11 und SRS UPD7 verwendet. Des Weiteren wurden die Zellen mit der Deletion (BWS ΔH19/ICR1) und Zellen eines weiteren BWS-Patienten (BWS UPD11) untersucht. Der Vergleich der verschiedenen Zellen sollte zeigen, welche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster zu finden sind.

Wie sich durch die Bestimmung der Deletion in den BWS ΔH19/ICR1-Zellen gezeigt hat, fehlten auf dem maternalen Allel einige Enhancerelemente. Daher sollte eine Expressionsanalyse der Gene *IGF2* und *H19* zeigen, ob diese von dem Verlust der Elemente beeinflusst sind. Hierbei war davon auszugehen, dass aufgrund des fehlenden maternalen Allels keine *H19*-Expression vorliegen sollte.

Ergebnisse

Für die Expressionsanalysen wurde RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgewandelt (siehe 2.3.10), welche anschließend per qRT-PCR quantifiziert werden konnte (siehe 2.3.12). Da ein Vorhandensein genomischer DNA nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, wurden - soweit möglich - Primer benutzt, welche in verschiedenen Exons des entsprechenden Gens binden und somit eine Amplifizierung genomischer DNA vernachlässigbar war, bzw. ein deutlich größeres Produkt ergeben würde. Die amplifizierten Produkte wurden mittels Schmelzpunktanalyse und Gelelektrophorese auf ihre korrekte Größe überprüft (siehe 2.3.12 und 2.3.13). Die Effizienz der qRT-PCRs wurde mithilfe von Standardreihen für die jeweiligen Primer überprüft und lag zwischen 1,9 und 2. Die Standardabweichung der einzelnen Proben sollte einen Fehlerwert von 0,2 nicht übersteigen. Bei Bedarf wurden einzelne Proben wiederholt. Für den Vergleich der einzelnen Proben wurde die Geneexpression aller untersuchten Gene mithilfe von Haushaltsgenen normalisiert.

3.3.1 Expressionsanalyse und Auswahl der Haushaltsgene

Bei Haushaltsgenen handelt es sich um Gene, welche von den Zellen konstitutiv gebildet werden und welche somit in jedem Zelltyp vorhanden sein sollten. Außerdem zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie möglichst unabhängig von äußeren Faktoren oder beispielsweise Zellteilungsstadien sind. Sie werden benötigt um schwankende Expressionsniveaus verschiedener Zellen in der qPCR berücksichtigen zu können. Vor Beginn der Expressionsanalysen wurden daher verschiedene, bereits bekannte, Haushaltsgene auf ihre Eignung in den verwendeten Zellen getestet und festgelegt, welche für die entsprechenden Versuche verwendet werden sollten. Hierfür wurde das Verhältnis der Haushaltsgene zueinander ermittelt, welches zwischen den verschiedenen Proben möglichst konstant bleiben sollte.

Um den Einfluss durch Abweichungen bei einzelnen Haushaltsgenen möglichst gering zu halten, sollten mindestens drei verschiedene Haushaltsgene verwendet werden. Bei den initialen Expressionsanalysen wurden die Gene *PDH*, *TBP*, *ACTB* und *HPRT* getestet. Für die Auswahl wurden vorerst fünf verschiedene BWS Δ H19/ICR1-Proben mit jeweils vier SRS UPD11- bzw. BWS UPD11-Proben verglichen. Beim Vergleich der Verhältnisse der Gene zueinander (siehe Tab. 3-2) zeigte der mittlere Quotient von *PDH* und den anderen drei Genen die größten Standardabweichungen und die meisten Werte die mehr als 50% vom Median abwichen. Beim Verhältnis *PDH/ACTB* lag eine besonders hohe Standardabweichung vor. Auch

Ergebnisse

die Expressionsverhältnisse der anderen Gene zueinander wiesen Schwankungen auf, jedoch fiel die Streuung der einzelnen Werte zueinander (STD) bei den Proben ohne PDH deutlich geringer aus. Aufgrund der hohen Expressionsschwankungen bei *PDH* wurde dieses nicht zur Normierung verwendet. Mit *ATP5J* wurde ein weiteres Haushaltsgen getestet, hierfür wurden auch vorher noch nicht berücksichtigten Proben mit einbezogen. Insgesamt wurden jetzt neun Proben für BWS Δ H19/ICR1, zwölf für SRS UPD11, acht für BWS und zehn für SRS UPD7 verwendet.

Beim Vergleich der vier Gene zeigte sich trotz einiger Abweichungen dennoch ein relativ ähnliches Expressionsverhältnis der Gene zueinander (siehe Tab. 8-1), sodass die Gene *ACTB*, *HPRT*, *TBP* und *ATP5J* für die Normierung verwendet wurden.

Tab. 3-2 Verhältnisse der relativen Expression der Haushaltsgene

In der Tabelle sind die Verhältnisse der getesteten Haushaltsgene zueinander angegeben. Rot markierte Werte wichen um mehr als 50% vom Median ab, die größten Abweichungen traten bei *PDH* auf. Auch die Standardabweichung zum Mittelwert der Verhältnisse war bei *PDH* am größten und überstieg den Mittelwert bei *PDH/ACTB* sogar um ein Vielfaches.

	<i>PDH/TBP</i>	<i>PDH/ACT</i>	<i>PDH/HPRT</i>	<i>TBP/HPRT</i>	<i>ACTB/HPR</i>	<i>TBP/ACTB</i>
BWS Δ H19/ICR1 1	1,26	0,70	1,98	1,57	1,39	1,13
BWS Δ H19/ICR1 2	2,83	0,43	4,94	1,75	2,11	0,83
BWS Δ H19/ICR1 3	3,24	0,50	4,86	1,50	2,42	0,62
BWS Δ H19/ICR1 4	2,78	0,57	3,55	1,28	2,02	0,63
BWS Δ H19/ICR1 5	2,83	0,84	3,69	1,30	3,09	0,42
SRS UPD11 1	1,70	0,95	3,23	1,90	3,08	0,62
SRS UPD11 2	0,07	12,10	0,40	5,43	4,83	1,12
SRS UPD11 3	3,51	0,59	5,00	1,42	2,94	0,48
SRS UPD11 4	2,91	0,69	5,27	1,81	3,66	0,49
BWS UPD11 1	1,27	1,49	2,07	1,86	3,08	0,61
BWS UPD11 2	3,48	0,63	5,98	1,72	3,78	0,46
BWS UPD11 3	1,79	0,76	3,11	1,74	2,36	0,73
BWS UPD11 4	2,12	0,56	4,17	1,97	2,32	0,85
Mw	2,29	1,60	3,71	1,94	2,85	0,69
STD	1,03	3,17	1,57	1,07	0,90	0,23
% von Mw	44,8	197,8	42,3	55,2	31,5	33,8
Med. - 50%	1,39	0,35	1,84	0,87	1,47	0,31
Median	2,78	0,69	3,69	1,75	2,36	0,62
Med. + 50%	4,17	1,04	5,53	2,62	4,41	0,93

3.3.2 Vergleichende Expressionsanalyse der SRS- und BWS-Fibroblasten

Wie bereits in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, liegt in den Fibroblasten BWS Δ H19/ICR1 eine maternale Deletion auf Chromosom 11 vor, welche unter anderem die ICR1, *H19*, sowie einen Teil der Enhancer betrifft. Da es sich bei *H19* und *IGF2* um geprägte Gene handelt, sollte aufgrund der allelspezifischen Deletion *H19* in seiner Expression stark reduziert vorliegen. Der Verlust der maternalen ICR1 sowie der beschriebenen Enhancerelemente könnte zusätzlich auch einen Einfluss auf die Transkription des Gens *IGF2* haben. Aus diesem Grund wurden Expressionsanalysen der betroffenen Gene *H19* und *IGF2* durchgeführt. Des Weiteren wurden auch die Gene des IC2, *KCNQ10T* und *CDKN1C*, sowie weitere Gene des IGN untersucht, um festzustellen, ob Elemente der deletierten Bereiche auch auf diese Gene einen regulativen Einfluss haben können. Als Vergleich dienten Fibroblasten von BWS UPD11, SRS UPD11 und SRS UPD7. Durch die maternale UPD11p15.5 der SRS UPD11-Zellen sollte eine erhöhte *H19*-Expression und eine reduzierte *IGF2*-Expression vorliegen. Da die UPD auch die Gene *CDKN1C* und *KCNQ10T1* betrifft (siehe 3.2), sollte auch hier eine veränderte Genexpression stattfinden. Die für die Analyse benötigten mRNAs wurden zu verschiedenen Passagen aus den Zellen isoliert (siehe 2.3.8) und für die Untersuchung in cDNA umgeschrieben (siehe 2.3.10). Die in der qPCR (siehe 2.3.12) ermittelten relativen Konzentrationen der Proben wurden durch das geometrische Mittel der Haushaltsgene *ACTB*, *TBP*, *HPRT* und *ARTP5J* geteilt, um diese anschließend miteinander vergleichen zu können. Für BWS Δ H19/ICR1 wurden neun, für BWS UPD11 acht, für SRS UPD11 zwölf und für SRS UPD7 zehn verschiedene Proben untersucht. Bei BWS Δ H19/ICR1 konnte in keiner der neun Proben eine *H19*-Expression gemessen werden, während für SRS UPD11, SRS UPD7 und BWS UPD11 eine sehr schwankende Expressionsstärke von *H19* detektiert wurde. Die höchsten gemessenen Werte waren bei BWS UPD11 und SRS UPD11 zu finden, konnten jedoch im Boxplot als Ausreißer definiert werden. Im Mittel unterschieden sich die drei Zellkulturen hinsichtlich ihrer *H19*-Expressionsstärke (siehe Abb. 3-5 A) allerdings kaum. Das Transkript von *IGF2* lag in den BWS Δ H19/ICR1-Zellen - im Vergleich zu den anderen drei Zellkulturen - signifikant erhöht vor und zeigte gegenüber SRS UPD11, welche mit 0,0015 den geringsten Medianwert für *IGF2* aufwies, eine 1145-fache Erhöhung. Auch im Vergleich zu BWS UPD11 und SRS UPD7, welche im Mittel (0,008 bzw. 0,0073) deutlich über SRS UPD11 lagen, konnte eine 220- bzw. 240-fach erhöhte Transkriptmenge von *IGF2* festgestellt werden (siehe Abb. 3-5 B).

Ergebnisse

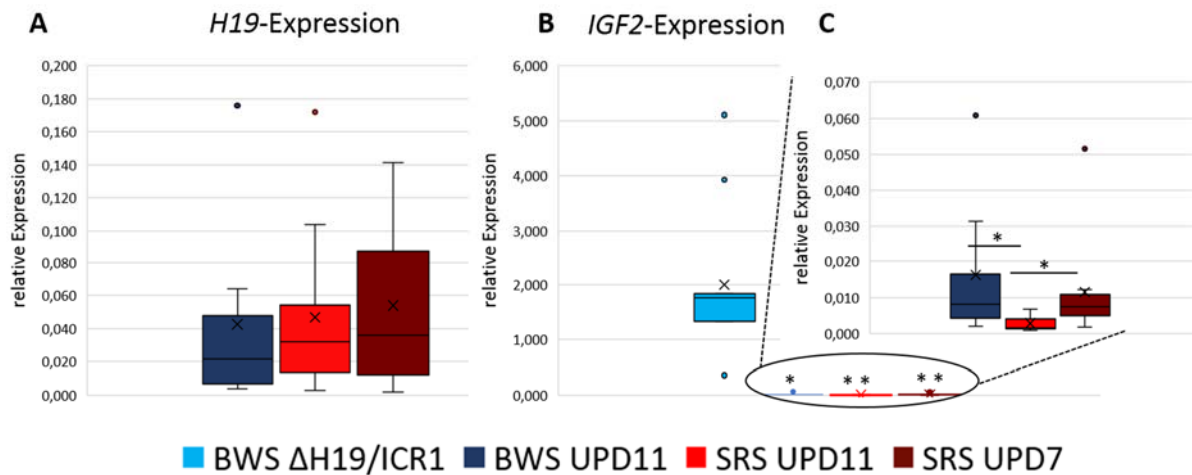


Abb. 3-5 Genexpression der Gene *H19* und *IGF2*

In der Abbildung ist die relative Expressionsstärke der Gene *H19* und *IGF2* in den vier untersuchten Zellkulturen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die mittlere Linie der Box gibt den Median an, während das x den Mittelwert markiert. **A** Für BWS ΔH19/ICR1 konnte keine Expression von *H19* festgestellt werden, bei den anderen drei Proben stellte sie sich auf niedrigem Niveau sehr schwankend dar. **B** *IGF2* lag in den BWS ΔH19/ICR1-Zellen im Vergleich zu BWS UPD11 signifikant und zu SRS UPD11 bzw. SRS UPD7 sehr signifikant erhöht vor. **C** Für eine bessere Übersichtlichkeit ist die Expression von *IGF2* in BWS UPD11, SRS UPD11 und SRS UPD7 vergrößert dargestellt. Dabei zeigt sich in den SRS UPD11-Zellen die geringste Menge an *IGF2*. Gegenüber SRS UPD7 und BWS UPD11 wies SRS UPD11 eine signifikant reduzierte *IGF2*-Expression auf. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, BWS ΔH19/ICR1 $n=9$, BWS UPD11 $n=8$, SRS UPD11 $n=12$, SRS UPD7 $n=10$).

Im IC2 liegen unter anderem die Gene *CDKN1C*, *KCNQ1* und *KCNQ1OT1*, welche ebenfalls der elterlichen Prägung unterliegen. Während *KCNQ1* und *CDKN1C* maternal exprimiert werden, wird *KCNQ1OT1*, welches sich im zehnten Intron von *KCNQ1* befindet, als Antisensetranskript vom paternalen Allel exprimiert. Dies sollte zumindest in den SRS UPD11-Zellen, welche von der maternalen UPD betroffen sind, zu einer reduzierten *KCNQ1OT1* und zu einer erhöhten Expression der maternalen Gene führen. Das Transkript von *KCNQ1* wurde jedoch in keiner der untersuchten Zellen in einer für die Analyse ausreichenden Menge gebildet. Dies liegt daran, dass es sich bei *KCNQ1* um einen Ionentransporter handelt, welcher nur in bestimmten Geweben, wie beispielsweise Herz, Schilddrüse, Magen oder den Epithelialzellen des Innenohrs aktiv ist (Neverisky und Abbott, 2015). In den BWS UPD11- und SRS UPD7-Zellen war die *CDKN1C*-Expression am niedrigsten, während sie in den SRS UPD11-Zellen etwas höher war. Im Vergleich zu den anderen Zellen wies BWS ΔH19/ICR1 die höchste *CDKN1C*-Expression auf (siehe Abb. 3-6 A). Für *KCNQ1OT1* zeigten die Zellen von BWS ΔH19/ICR1 und BWS UPD11 bzw. SRS UPD11 und SRS UPD7 sehr ähnliche Expressionsniveaus. Während SRS UPD11 und SRS UPD7 eine relativ niedrige Expression aufwiesen, lag diese in BWS ΔH19/ICR1 und BWS UPD11 - im Vergleich zu den SRS-Zellen - etwa doppelt so hoch vor. Dabei war jedoch

Ergebnisse

aufgrund der breiten Streuung der Werte bei BWS Δ H19/ICR1 und SRS UPD7 nur der Unterschied zwischen BWS UPD11 und SRS UPD11 signifikant (siehe Abb. 3-6 B).

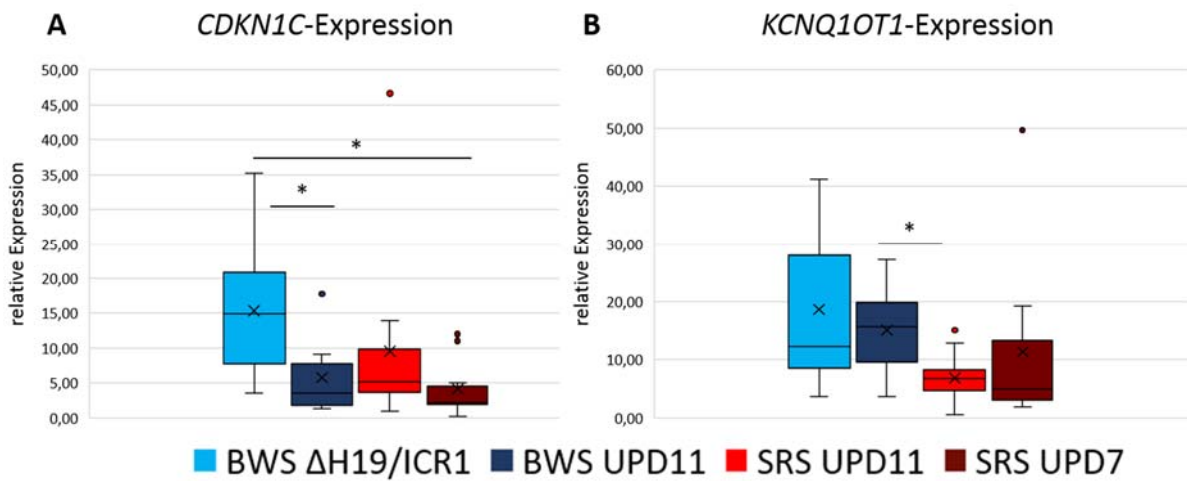


Abb. 3-6 Expression der Gene des IC2, *CDKN1C* und *KCNQ1OT1*

In der Abbildung ist die relative Expression der Gene *CDKN1C* und *KCNQ1OT1* in den vier untersuchten Zellkulturen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die mittlere Linie der Box gibt den Median an, während das x den Mittelwert markiert. **A** *CDKN1C* war in den BWS Δ H19/ICR1-Zellen am stärksten exprimiert und zeigte gegenüber der Expression in BWS UPD11 und SRS UPD7 eine signifikante Erhöhung. SRS UPD11 wies im Vergleich zu BWS UPD11 und SRS UPD7 eine etwas höhere Expression auf, die Werte lagen jedoch auch breiter verteilt vor. **B** Die niedrigsten Werte für *KCNQ1OT1* wurden bei SRS UPD11 und SRS UPD7 ermittelt. Ein signifikanter Unterschied konnte nur zwischen BWS UPD11 und SRS UPD11 festgestellt werden. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet (* = $p \leq 0,05$, BWS Δ H19/ICR1 n = 9, BWS UPD11 n = 8, SRS UPD11 n = 12, SRS UPD7 n = 10).

Zusätzlich zu den bereits genannten Genen wurden weitere Gene des IGN untersucht. Das Vorhandensein des IGN gilt in der Maus inzwischen als gesichert, aber auch für das humane System häufen sich die Hinweise auf ein funktionelles IGN. Im murinen IGN ist *H19* als ein wichtiger trans-Faktor beschrieben worden, welcher die Expression von *IGF2* mitbeeinflussen kann, aber auch transkriptionelle Effekte auf andere Gene, wie beispielsweise *Cdkn1c*, *Gnas*, *Dlk1*, *Rtl1* und *Igf2r*, auf verschiedenen Chromosomen ausübt (Gabory *et al.*, 2009). Denkbar ist aber auch, dass die ICR1 selbst, beispielsweise über die dort bindenden Proteine, wie beispielsweise CTCF, einen Einfluss auf die Expression weiterer IGN-Gene haben könnte. Daher wurde untersucht, ob der unterschiedliche Zustand der ICR1 in den verschiedenen Zellen einen Einfluss auf die Expression der analysierten Gene hat. Um mögliche regulative Effekte zwischen der ICR1 und weiteren geprägten Regionen zu analysieren, wurde die Expression der Gene *MEST* (Chr. 7), *GRB10* (Chr. 7), *PLAGL1* (Chr. 6) und *IGF2R* (Chr. 6) in den vier verschiedenen Zellkulturen untersucht. Für SRS UPD7 war dabei zu beachten, dass hier

Ergebnisse

eine maternale UPD des Chromosoms 7 vorlag und somit geprägte Gene auf diesem Chromosom direkt davon betroffen sein sollten.

Die Expression von *MEST* lag in den Zellen von BWS Δ H19/ICR1 im Vergleich zu SRS UPD11 und SRS UPD7 sehr signifikant erhöht vor, während sie in BWS UPD11 im Mittel zwar etwas höher lag, jedoch aufgrund der breiten Streuung nur eine signifikante Erhöhung aufwies (siehe Abb. 3-7 A u. B). SRS UPD11 und SRS UPD7 wiesen beide eine sehr geringe Expression von *MEST* auf, dennoch war sie in SRS UPD11 im Vergleich zu SRS UPD7 um das 25-fache erhöht (siehe Abb. 3-7 B). Die Transkriptmenge des Gens *GRB10*, welches ebenfalls auf Chromosom 7 zu finden ist, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Zellkulturen (Abb. 3-7 C).

Die *PLAGL1*-Expression lag in den SRS UPD11- und BWS UPD11-Zellen im Vergleich zu BWS Δ H19/ICR1 und SRS UPD7 am niedrigsten vor. Im Vergleich zu SRS UPD7 handelte es sich bei SRS UPD11 um eine sehr signifikante, im Vergleich zu den anderen beiden Zellkulturen um eine signifikante Reduktion (siehe Abb. 3-7 D). Die Zellen von BWS Δ H19/ICR1 und BWS UPD11 zeigten fast identische Expressionsniveaus von *IGF2R*, während dieses bei SRS UPD11 leicht erhöht war. Die geringste Expression von *IGF2R* wurde bei den Zellen SRS UPD7 festgestellt, welche im Vergleich zu BWS Δ H19/ICR1 und SRS UPD11 signifikant reduziert war (siehe Abb. 3-7 E).

Während die BWS-Zellen, abgesehen von *CDKN1C*, relativ ähnliche Expressionsniveaus für die untersuchten Gene aufwiesen, konnte dies in den SRS-Zellen nur teilweise gezeigt werden. Die Gene *MEST* und *KCNQ1OT1* wiesen bei beiden SRS-Zellen im Vergleich zu den BWS-Zellen niedrigere Konzentrationen auf, wohingegen die Gene *GRB10*, *PLAGL1* und *IGF2R* in SRS UPD11 und SRS UPD7 unterschiedliche Expressionsniveaus im Vergleich zu den BWS-Zellen aufwiesen.

Ergebnisse

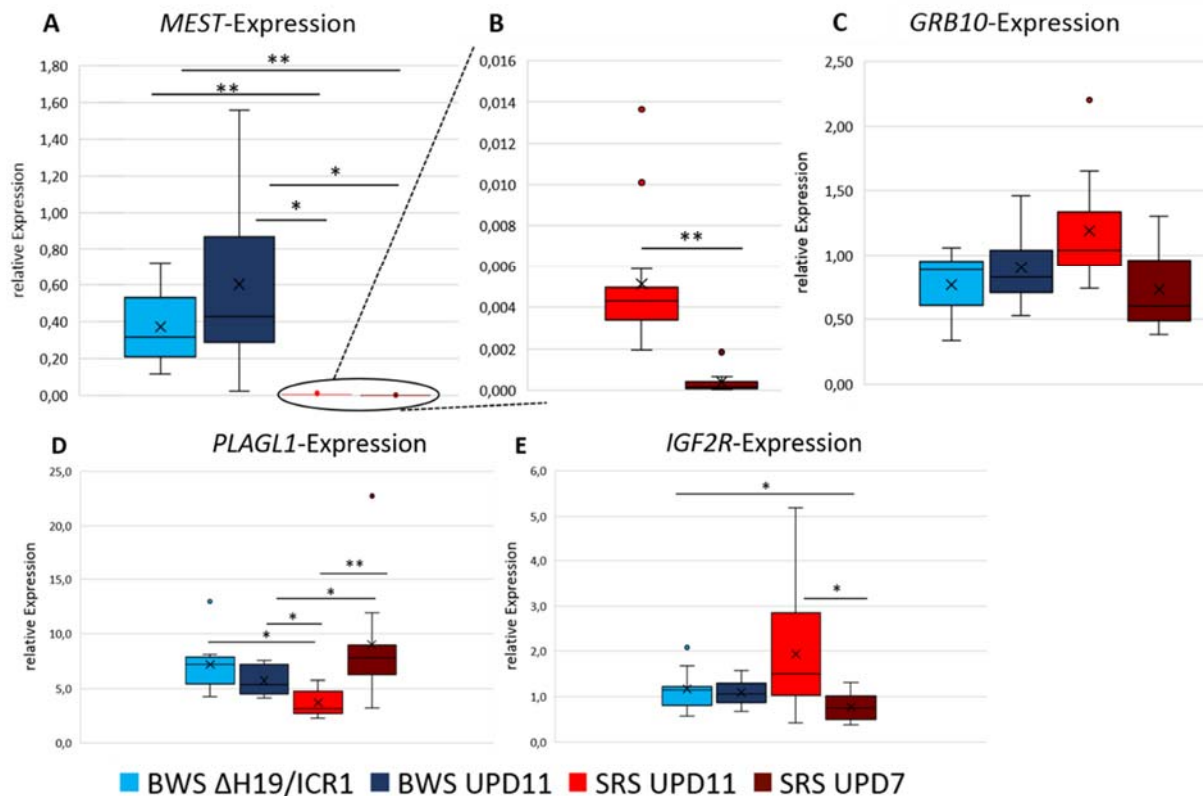


Abb. 3-7 Expression der IGN-Gene

In der Abbildung ist die relative Expression der IGN-Gene in den vier untersuchten Zellkulturen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die mittlere Linie der Box gibt den Median an, während das x den Mittelwert markiert. **A** In BWS ΔH19/ICR1 und BWS UPD11 wurde eine deutlich höhere *MEST*-Expression als in SRS UPD11 und SRS UPD7 gemessen. **B** Für eine bessere Übersicht sind die Expressionswerte von SRS UPD11 und SRS UPD7 vergrößert dargestellt. SRS UPD7 zeigte von allen untersuchten Zellkulturen die geringste *MEST*-Expression, welche auch im Vergleich zu SRS UPD11 sehr signifikant reduziert war. **C** Die relative Expression von *GRB10* zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den vier untersuchten Zellkulturen, auch wenn *GRB10* in den SRS UPD11-Zellen im Vergleich zu den anderen Zellen etwas erhöht vorlag. **D** Im Vergleich zu den anderen drei Zellkulturen war die Expression von *PLAGL1* in den SRS UPD11-Zellen am niedrigsten und in SRS UPD7 am höchsten. **E** *IGF2R* zeigte für BWS ΔH19/ICR1 und BWS KLF eine recht ähnliche Expression, während für SRS UPD11 eine leichte Erhöhung mit deutlichen Schwankungen der Expression festgestellt wurde. SRS UPD7 wies den niedrigsten Wert auf und die Expression von *IGF2R* lag im Vergleich zu BWS ΔH19/ICR1 und SRS UPD11 signifikant reduziert vor. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, BWS ΔH19/ICR1 $n = 9$, BWS UPD11 $n = 8$, SRS UPD11 $n = 12$, SRS UPD7 $n = 10$).

3.4 Analyse regulatoriver Effekte von Kaiso auf die ICR1

Ein möglicher Faktor, welcher in der ICR1 bindet und Einfluss auf die Methylierung der ICR1 - und somit auch auf die Expression von *IGF2* und *H19* - nehmen könnte, ist Kaiso. In der ICR1 existieren sowohl mehrere methylierte als auch eine unmethylierte Bindestelle für Kaiso im B4-Repeat (KBS) mit der Sequenz TGGCAGGA (siehe Abb. 3-8), an welche eine Bindung von Kaiso nachgewiesen werden konnte (Langer, 2012). Daher wurde getestet, ob die Bindung von Kaiso an die ICR1 einen Effekt auf die Methylierung in diesem Bereich hat. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde für die Analyse von Kaiso-Effekten ein shRNA-Konstrukt lentiviral stabil in

Ergebnisse

BWS UPD11-Zellen transfiziert. Die shRNA wird durch die Integration des Konstrukts in das Genom von den Zellen selbst gebildet. Sie wird durch den Dicer-Komplex zu einer Einzelstrang-RNA umgewandelt, welche komplementär zur *Kaiso*-mRNA ist und einen Knockdown induzieren kann (vergleiche Abb. 2-2). Als Negativkontrolle diente ein s.l.-Konstrukt, welches keine endogene Zielsequenz aufwies. Die *Kaiso*-mRNA war in den BWS UPD11-Zellen auf 32 % im Vergleich zum s.l. reduziert (Bohne, 2013).

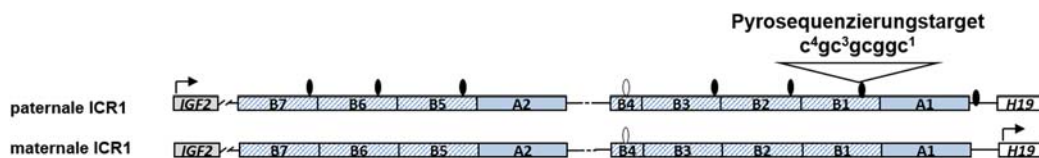


Abb. 3-8 Kaiso-Bindestellen in der ICR1

In der ICR1 liegen mehrere differentiell methylierte Kaiso-Bindestellen (schwarze Ovale) vor, welche in methyliertem Zustand von Kaiso gebunden werden können. Im B4-Repeat existiert eine weitere Kaiso-Bindestelle (KBS) (weiße Ovale), welche nicht differentiell methyliert ist und somit methylierungsunabhängig von Kaiso gebunden werden kann.

3.4.1 Methylierungsanalyse nach *Kaiso*-Knockdown

Die transfizierten Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt um einen Einfluss auf die Methylierung der ICR1 zu untersuchen. Die Analyse der Methylierung erfolgte, wie zuvor beschrieben (siehe 3.2 und 2.3.7), anhand der drei CpG-Motive im B1-Repeat der ICR1 (siehe Abb. 3-8). Die Negativkontrolle (s.l.) zeigte in den BWS UPD11-Zellen, wie erwartet, eine Methylierung von knapp unter 50 %, während die Reduktion von Kaiso mit einer Abnahme der Methylierung auf 23 % einherging (siehe Abb. 3-9).

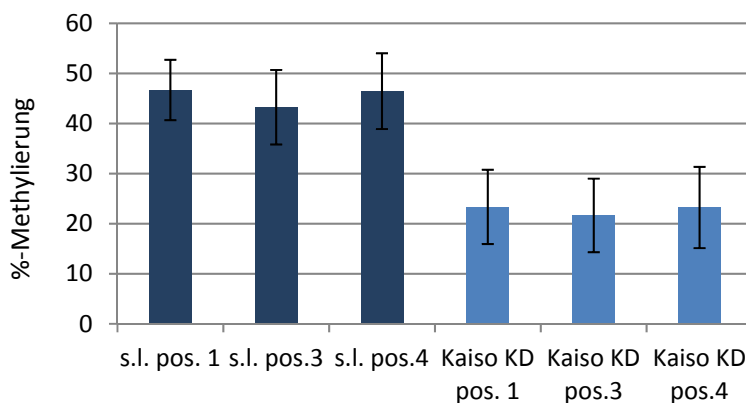


Abb. 3-9 Methylierung der ICR1 nach lentiviralem *Kaiso*-Knockdown

Das Diagramm gibt die Methylierung der ICR1 an den drei untersuchten CpGs im s.l. und nach dem *Kaiso*-Knockdown an. Durch den Knockdown war eine Reduktion der Methylierung auf etwa die Hälfte zu verzeichnen (n=2).

Ergebnisse

Die Analyse der ICR2 ergab hingegen keine Veränderung der Methylierung. Die Wegnahme von Kaiso hat somit (scheinbar) einen spezifischen Effekt auf die Methylierung der ICR1.

3.4.2 Methylierungsanalyse nach KBS-Editierung

Da die in 3.4.1 beschriebene Abnahme der Methylierung nach dem *Kaiso*-Knockdown auch auf genomweite indirekte *Kaiso*-Effekte zurückgehen kann, wurde gezielt die Rolle von *Kaiso* in der ICR1 untersucht. Die KBS wurde in Vorarbeiten mittels einer CRISPR/CAS9- (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) Editierung in den BWS UPD11-Zellen deletiert. Hierfür wurde mittels lentiviraler Transfektion ein Plasmid mit dem CRISPR/CAS9-Konstrukt, einer entsprechenden synthetischen guide RNA (sgRNA) und einem GFP-Reporter in das Genom der Zelle integriert. Bei CAS9 handelt es sich um eine Endonuklease, welche im Komplex mit CRISPR einen DNA-Doppelstrangbruch erzeugen kann. Für die korrekte Lokalisierung dieses Doppelstrangbruchs wurden zusätzlich zwei verschiedene sgRNAs (sense und antisense) verwendet, welche die Bindung des Komplexes direkt an die KBS im B4-Repeat initiieren. In den betroffenen Zellen setzt dieser Prozess die zellinternen DNA-Reparaturmechanismen in Gang. Die Reparatur erfolgt durch non-homologous end joining (NHEJ). Durch das NHEJ können gezielt Deletionen an der betroffenen Stelle generiert werden. Mithilfe des GFP-Reporters konnten die betroffenen Zellen per Durchflusszytometrie von den untransfizierten Zellen getrennt und analysiert werden. Eine im Anschluss stattfindende Sequenzierung ergab bei den editierten Zellen Deletionen von 3-29 Basen, welche alle die Sequenz des KBS-Motivs betrafen und somit eine Bindung von *Kaiso* beeinträchtigten. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt mit einer sgRNA für den murinen *Rosa26*-Locus verwendet. Die anschließende Methylierungsanalyse der CpGs im B1-Repeat (siehe Abb. 3-8) ergab eine Reduktion der Methylierung nach der Editierung auf etwa 45 % bei der sense sgRNA bzw. 77 % bei der antisense sgRNA im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wies die Kontrolle selbst schon eine reduzierte Methylierung auf (siehe Abb. 3-10).

Die ICR2 wies, sowohl für die Kontrollen als auch für die editierten Zellen, keine Veränderung der Methylierung auf. Die Deletion der KBS im B4-Repeat geht also mit einer spezifischen Reduktion der Methylierung der ICR1 einher.

Ergebnisse

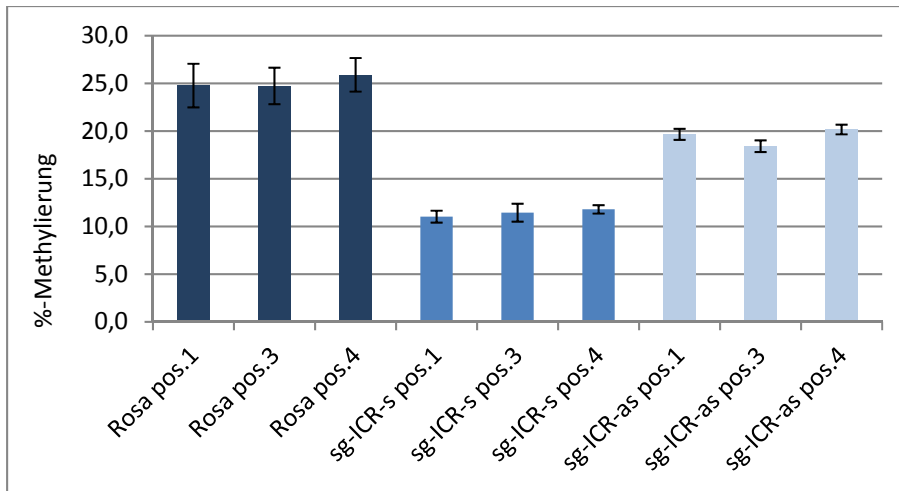


Abb. 3-10 Methylierung der ICR1 nach Editierung der KBS

Das Diagramm gibt die Methylierung der ICR1 an den drei untersuchten CpGs in den Rosa26- bzw. den beiden editierten Zellkulturen an. Die Reduktion der Methylierung im Vergleich zur Kontrolle war in den Zellen mit der sense sgRNA etwas stärker ausgeprägt als bei der antisense sgRNA (n=2).

3.4.3 Expressionsanalysen von *IGF2/H19* nach der KBS-Editierung

Die spezifische Deletion zeigte einen eindeutigen Effekt auf die Methylierung, daher war auch von einem Einfluss auf die Expression der Gene *H19* und *IGF2* auszugehen. Durch den Kaiso-Knockdown konnte bereits eine Reduzierung der Transkriptmengen für *H19* und *IGF2* gezeigt werden (Bohne, 2013). Für die durchgeführten Expressionsanalysen wurde die Transkriptmenge der untersuchten Gene auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene *PDH* und *B2M* normalisiert. Aus der Analyse ergab sich, sowohl für *H19* als auch für *IGF2*, mit beiden verwendeten sgRNAs eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zur Kontrolle.

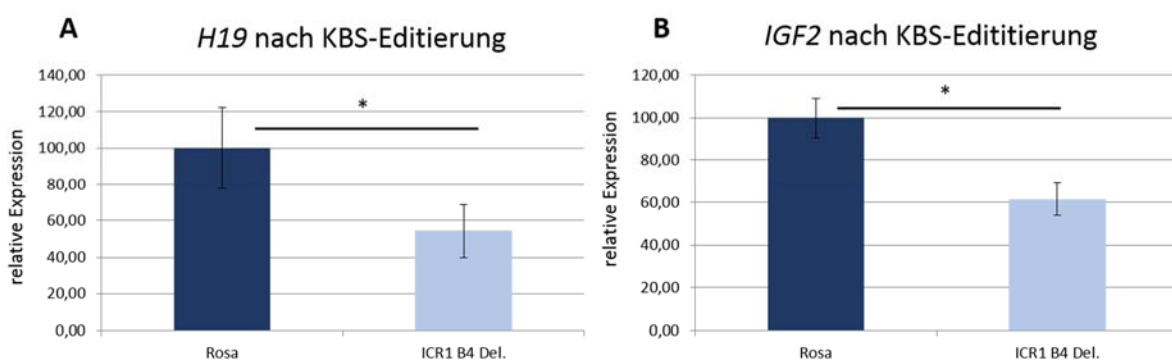


Abb. 3-11 Expression von *H19* und *IGF2* nach Editierung der KBS

Die Gene *H19* (A) und *IGF2* (B) wiesen beide eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle auf (n =2, * = p ≤ 0,05).

Die Deletion der KBS im B4-Repeat hat damit neben den Effekten auf die Methylierung auch einen Einfluss auf die Expression der Gene *H19* und *IGF2*.

3.5 Interaktionsanalysen

Die Regulation der Gene *IGF2* und *H19* funktioniert über die parental unterschiedliche Methylierung der ICR1. Dabei spielt CTCF, welches an die unmethylierte ICR1 bindet, für die Chromatinfaltung und cis-Interaktion relevanter Enhancer mit *IGF2* und *H19* auf Chromosom 11 eine entscheidende Rolle (Wendt und Peters, 2009). In der Literatur wird zusätzlich auch über mögliche trans-Interaktionen der ICR1 mit anderen Chromosomen berichtet. Zhao und Kollegen beschreiben in der Maus die Interaktion der ICR1 mit insgesamt 114 verschiedenen genetischen Loci, welche einen hohen Anteil an geprägten Regionen aufweisen. Des Weiteren postulieren sie ein ICR1-abhängiges chromosomales Netzwerk (Z. Zhao *et al.*, 2006). Eine weitere Studie beschreibt CTCF-basierte chromosomale Interaktionen der ICR1 in der Maus. Dabei wurden jedoch nur zwei potentielle geprägte Interaktionsregionen gefunden und weitergehend analysiert (Ling *et al.*, 2006). Auch in weiteren Organismen, wie beispielsweise dem Schwein, konnten trans-Interaktionen zwischen der ICR1 und anderen Chromosomen festgestellt werden (Lahbib-Mansais *et al.*, 2016). Aufgrund der konservierten Funktion von CTCF sowie der ICR1 sind somit potentielle trans-Interaktionen auch beim Menschen denkbar, welche in die Regulation des IGN involviert sein könnten. Die in dieser Arbeit durchgeführten 4C-Experimente sollten dabei helfen, mögliche trans-Interaktionen mit weiteren geprägten Genen bzw. Regionen zu finden und zu analysieren.

3.5.1 Interaktionsanalysen der ICR1 mittels 4C

Die durchgeführten 4C-Experimente dienten der Analyse möglicher Interaktionen der ICR1 zu anderen chromosomalen Regionen und wurden, wie in 2.6 beschrieben, nach dem Protokoll von Göndör *et al.* (2008) mit SRS UPD11- und SRS HM-Zellen durchgeführt. Die SRS HM-Zellen wurden als direkter Vergleich für die SRS UPD11-Zellen verwendet, da diese eine isolierte Hypomethylierung der ICR1 aufweisen und somit das gleiche Interaktionsmuster wie SRS UPD11 aufweisen sollten. Für die 4C-Analysen wurde das Chromatin der Zellen fixiert, mittels CSP6I verdaut, ligiert und im Anschluss die fixierte Proteinverbindung mittels Reverse-Crosslink wieder aufgehoben. ICR1 spezifische Primer definierten den sogenannten Viewpoint und dienten nach der Aufreinigung dazu, die mit der ICR1 ligierten Fragmente zu amplifizieren. Die auf diese Weise amplifizierten PCR-Produkte wurden als Auftragsarbeit bei der Firma Tron mittels NGS sequenziert und es wurde eine basisbioinformatische Auswertung durchgeführt.

Ergebnisse

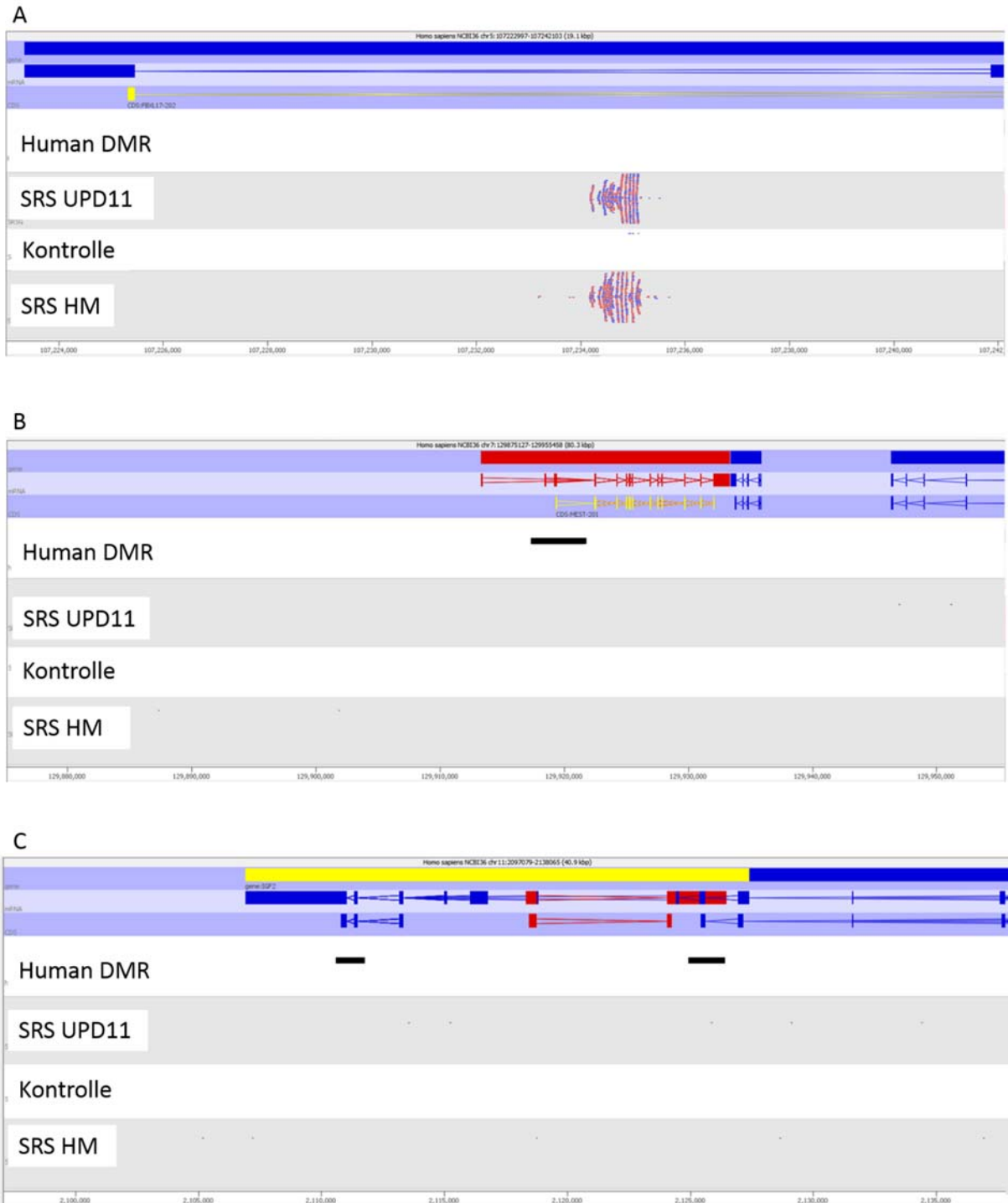


Abb. 3-12 Potentielle Interaktionsregionen der ICR1

A Im Interaktionsbereich der ICR1 und *FBXL17* (Intron 1) konnte in allen untersuchten Proben eine große Anzahl an Reads detektiert werden, welche in der Kontrolle nicht zu finden waren. **B** Für die nicht vorhandenen trans-Interaktionen mit den DMRs ist beispielhaft die Region um die DMR des Gens *MEST* dargestellt. Hier ist klar zu erkennen, dass weder im Bereich der DMR, noch in der Nähe eine Häufung von Reads vorlag. **C** Auf Chromosom 11 ist der Bereich des *IGF2*-Gens bzw. der DMR0 und DMR2 dargestellt, auch hier lag keine erhöhte Menge an Reads vor.

Mithilfe des Programms SeqMonk konnten die potentiellen Interaktionsregionen analysiert und identifiziert werden. Hierfür wurden die Proben nach der Qualitätsbewertung auf das

Ergebnisse

humane Genom kartiert (hg18) und die vorhandenen Reads quantifiziert. Die Auswertung ergab, dass in verschiedenen transchromosomalen Regionen eine räumliche Nähe zur ICR1 nachgewiesen werden konnte. So wurde beispielweise eine räumliche Nähe mit dem auf Chromosom 4 liegenden Gen *FBXL17* festgestellt (siehe Abb. 3-12 A). Die räumliche Nähe konnte zwischen der ICR1 und dem ersten Intron des Gens festgestellt werden. Dass in dieser und weiteren Regionen tatsächlich eine Verbindung auf DNA-Ebene vorlag, konnte in einer Diplomarbeit, welche in meiner Arbeitsgruppe angefertigt wurde, gezeigt werden. Für den Nachweis wurden die entstandenen Ligase zwischen der ICR1 und dem entsprechenden Fragment mittels spezifischer Primer amplifiziert. Ein Primer wurde dabei in der ICR1 platziert, während der zweite innerhalb der zu untersuchenden Region lokalisiert war. Somit konnte nur dann ein PCR-Produkt entstehen, welches im Anschluss sequenziert wurde, wenn diese beiden Fragmente auf DNA-Ebene verbunden waren. Die Sequenzierung konnte zweifelsfrei eine Verbindung der ICR1 mit den analysierten Regionen bestätigen und es konnte eine genaue Beschreibung der jeweiligen Interaktion vorgenommen werden (Brandt, 2013).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch zwischen der ICR1 und weiteren geprägten Regionen eine räumliche Nähe besteht, da dies möglicherweise einen Einfluss auf die Regulation des IGN haben könnte. In diesem Zusammenhang wurden die potentiellen Interaktionen zu allen geprägten Genen bzw. der zugehörigen DMR (nach (Court *et al.*, 2014) untersucht (siehe Tab. 8-2). Die Auswertung ergab, dass in keiner mit einer DMR assoziierten Region eine erhöhte Anzahl an Reads gefunden werden konnte (siehe Abb. 3-12 B). Auch auf Chromosom 11 konnte keine räumliche Nähe zwischen den DMRs bei *IGF2* oder *KCNQ1OT1* festgestellt werden (siehe Abb. 3-12 C). Somit konnte mit den 4C-Analysen in den SRS UPD11- und SRS HM-Zellen keine räumliche Nähe zwischen der ICR1 und den untersuchten geprägten Genen detektiert werden.

3.5.2 Interaktionsanalysen auf Chromosom 11p15.5 mittels T2C

Mit den 4C-Daten konnten die cis-Interaktionen auf Chromosom 11 nur relativ schwach abgebildet werden, obwohl einige CTCF-basierte Interaktionen auf Chromosom 11 bereits belegt werden konnten (Nativio *et al.*, 2011). Als Alternative zur Untersuchung von cis-Interaktionen einer bestimmten genetischen Region bietet sich die sogenannte Targeted Chromatin Capture-Methode (T2C) an, bei der es sich um eine Weiterentwicklung der 3C-Methode handelt. Im Gegensatz zu anderen Methoden, bei denen die Interaktion von einem

Ergebnisse

Viewpoint zu einer anderen Region (3C) oder mehreren anderen Regionen (4C) untersucht werden, können bei der T2C über die selektive Anreicherung von 3C-Ligationsprodukten einer ausgewählten Region die möglichen Interaktionen innerhalb einer Domäne (2-6 Kb groß) parallel analysiert werden. Die parallele Analyse mehrerer Viewpoints wäre auch bei der 4C denkbar, würde jedoch sowohl die Sequenzierungskosten als auch den Arbeitsaufwand linear steigern.

Wie bei allen Chromatin Capture-Methoden wird auch bei der T2C mit einer Fixierung der Chromatininteraktionen mittels Formaldehyd und einem Restriktionsverdau der interagierenden Elemente begonnen. Im Anschluss folgt eine Ligation und das Reverse Crosslink, sowie ein zweiter Verdau der miteinander ligierten Fragmente, welche nach Anligierung der Sequenzieradapter als Ausgangsmaterial für die Sequenzierlibrary dienen. Der entscheidende Schritt dieser Methode ist, dass über eine gezielte Anreicherung alle Fragmente einer gewünschten Region selektioniert werden. Hierfür werden spezifische Oligonukleotidproben verwendet, welche die gewählten Bereiche repräsentieren. Diese sind entweder an einen Microarraychip oder an Beads gebunden und können so die entsprechenden Fragmente über homologe Sequenzen selektiv binden. Diese können im Anschluss wieder eluiert und sequenziert werden (siehe Abb. 3-13) (Kolovos *et al.*, 2014).

Für die Validierung der Methode wurden bekannte Interaktionen auf Chromosom 11 im Bereich der ICR1 sowie der Gene *IGF2* und *H19*, welche bereits durch verschiedene 3C-Experimente identifiziert wurden, verwendet. Durch das Design der T2C zeigte sich, dass eine höhere Abdeckung bzw. Auflösung einer bestimmten Region im Vergleich zu anderen Methoden erreicht werden kann (Kolovos *et al.*, 2014).

Dank einer Kooperation mit Frau Dr. Wendt, welche ebenfalls an der Entwicklung der T2C-Methode beteiligt war, wurden unserer Arbeitsgruppe T2C-Daten, welche mittels HB2-Zellen unter anderem für den Bereich der ICR1 generiert wurden, zur Verfügung gestellt und durften nach Absprache in dieser Arbeit verwendet werden.

Für das Experiment wurden Oligonukleotidproben verwendet, welche einen etwa 2 Mb großen Bereich auf Chromosom 11p15.5 abdecken. Die Fragmentierung fand mit dem Restriktionsenzym BglII statt. Nach der anschließenden Sequenzierung und Kartierung konnten die Interaktionen der gesamten untersuchten Region bioinformatisch ausgewertet und grafisch dargestellt werden. Hierfür wurde ein sogenanntes Interaktionsdiagramm erstellt (siehe Abb. 3-14 A), in welchem alle möglichen Interaktionen zwischen den einzelnen

Ergebnisse

Fragmenten zu erkennen sind und die jeweilige Intensität per Farbcodierung ausgewertet werden konnte. Der zu untersuchende Bereich auf Chromosom 11 (etwa 1.100.000 – 3.200.000, Hg 18) beinhaltete unter anderem ICR1 und ICR2 (siehe Abb. 3-14 B).

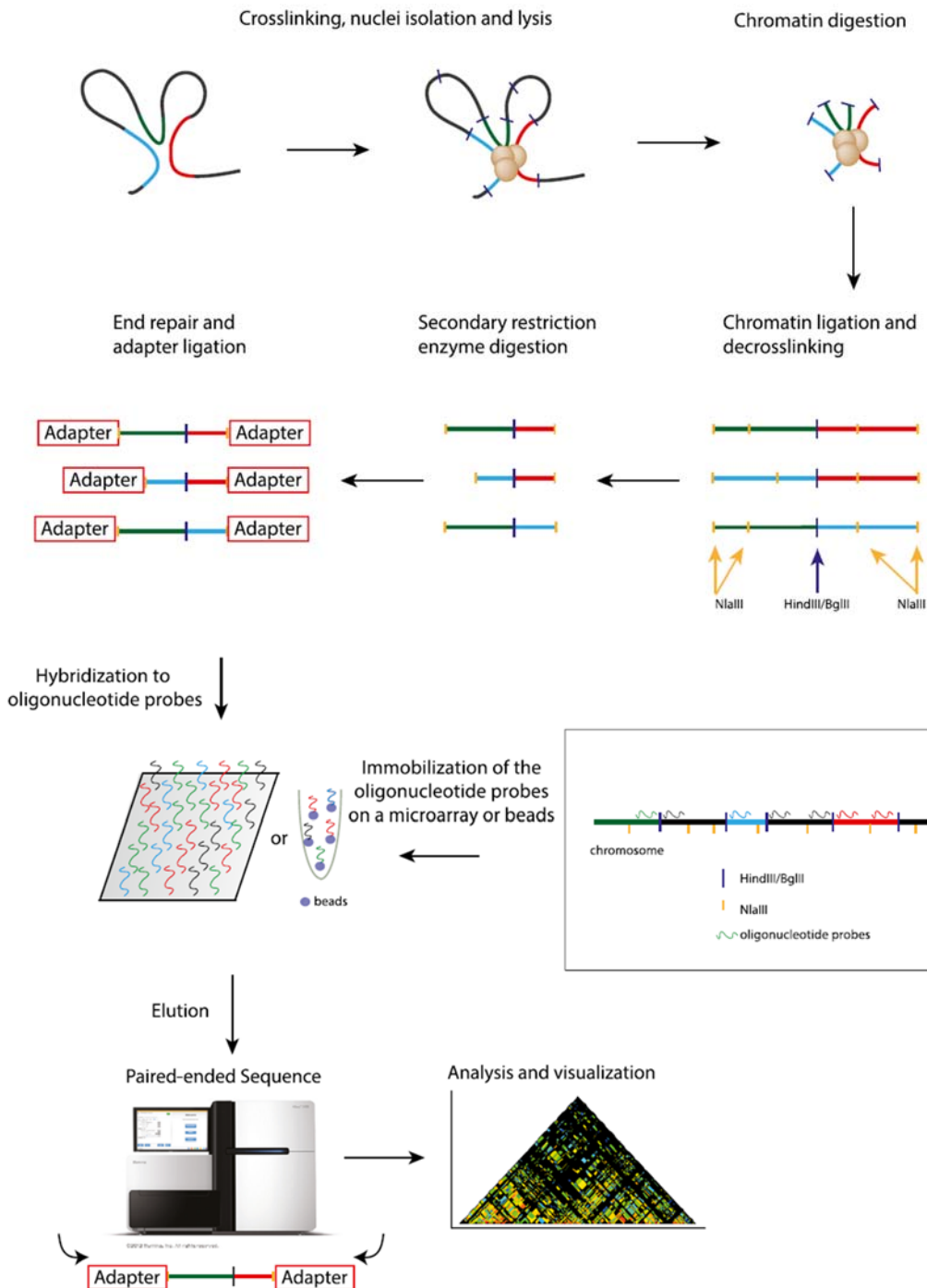


Abb. 3-13 Schematische Darstellung der T2C-Methode

Nach der Fixierung des Chromatins findet der erste Verdau mit BglII statt. Die entstandenen Fragmente werden miteinander ligiert, nach dem Reverse Crosslink ein zweites Mal mit NlaIII verdaut und im Anschluss mit den Sequenzieradaptern verbunden. Die Library wird dann an spezifische Oligonukleotide hybridisiert. Die hybridisierte DNA-Bibliothek enthält nun alle Interaktionen der gewählten Region und kann nach der Elution sequenziert und bioinformatisch ausgewertet werden (Kolovos *et al.*, 2014).

Ergebnisse

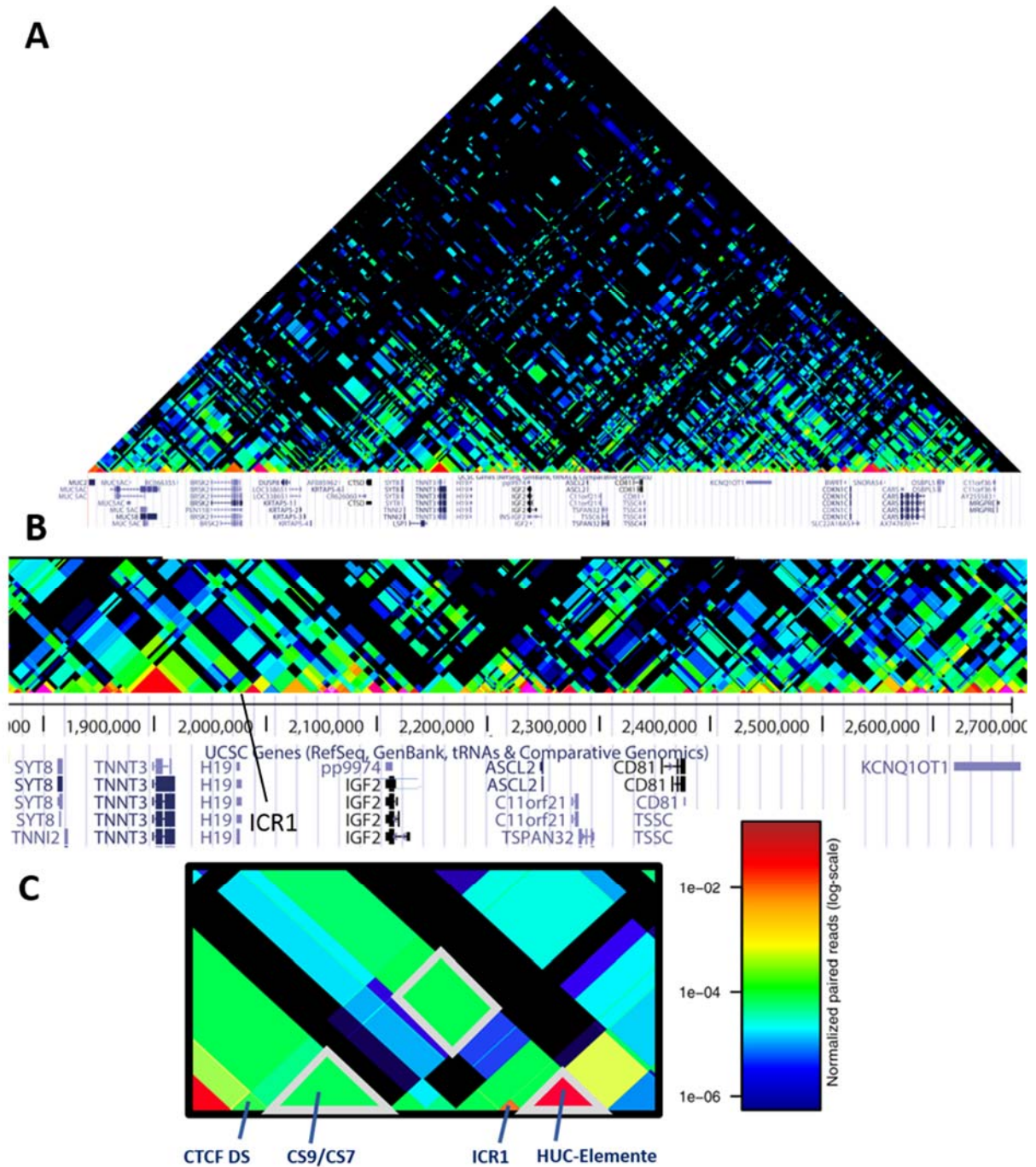


Abb. 3-14 Grafische Darstellung der T2C-Sequenzierung von Chromosom 11p15.5

Für eine bessere Übersicht wurde die vorher quadratische Darstellung in eine dreieckige Form konvertiert. Dies ist möglich, da beide Hälften des Quadrats exakt identisch sind. Die Farbskala dient der Darstellung der Häufigkeit, in welcher die benachbarten Fragmente vorlagen. Schwache Interaktionen sind dunkelblau dargestellt, während nach oben zu Rot hin die Häufigkeit der Interaktionen zunimmt. **A** In der grafischen Darstellung der T2C-Sequenzierung sind alle potentiellen Interaktionen der gewählten Region dargestellt. Die untere, durchgehende Linie gibt schematisch den DNA-Strang an. Zwischen zwei Punkten auf der DNA kann ein rechtwinkliges Dreieck gebildet werden, der Punkt an dem sich die beiden Katheten schneiden, definiert den möglichen Interaktionsbereich. Die Hypotenuse der Dreiecke gibt die Größe der einzelnen Fragmente an. **B** Vergrößerte Darstellung der Region um den Bereich der ICR1 und ICR2. **C** Stark vergrößerte Darstellung des Bereichs um die ICR1. Dabei ist zu erkennen, dass sich das direkt zur ICR1 benachbarte Restriktionsfragment mit dem Fragment, in welchem die Enhancer CS7 und CS9 liegen, in räumlicher Nähe befand.

Ergebnisse

Bei der genaueren Analyse der ICR1 und weiterer, sich in der Nähe befindlicher Fragmente, zeigte sich, dass die ICR1 und das benachbarte Fragment, in welchem unter anderem die HUC-Enhancer liegen, mit der Region, in welcher sich die Enhancer CS7 und CS9 befinden, häufig in räumlicher Nähe zueinander lagen. Sowohl das Fragment der ICR1 als auch das der HUC-Elemente zeigten eine mögliche Verbindung zum benachbarten Fragment von CS7, in welchem die CTCF DS-Bindestelle lokalisiert ist. Bei beiden Fragmenten war jedoch die räumliche Nähe zur ICR1 (blau) relativ schwach im Vergleich zum benachbarten Fragment (hellgrün). Eine hellblau dargestellte Verbindung konnte auch zwischen dem CTCF DS-Fragment und *H19* festgestellt werden (siehe Abb. 3-14 C). Die ICR1 zeigte auch eine Verbindung zu dem direkt vor *IGF2* (*IGF2* P3 und P4 sowie Exon 5-9) gelegenem Fragment (hellblau), während das *IGF2*-Fragment (Exon 5-9) unter anderem auch mit dem Fragment der HUC-Elemente zu interagieren schien (siehe Abb. 3-14 B). Vereinzelt wurde auch eine mögliche Verbindung zum IC2 sichtbar. So wies unter anderem das HUC-Fragment eine Übereinstimmung (hellblau) mit dem Fragment auf, in welchem *CDKN1C* lokalisiert ist. Auch die ICR1 zeigt eine mittelblaue Verbindung zum *KCNQ1OT1*-Gen. Das Gen *KCNQ1OT1* setzte sich aufgrund der Lage der Schnittstellen des Restriktionsenzym aus mehreren Einzelfragmenten zusammen. Der Interaktionspunkt mit der ICR1 konnte auf den Anfang des Gens (Promoter) und somit in unmittelbarer Nähe zur ICR2 lokalisiert werden.

Da das Element, in welchem CS7 und CS9 lokalisiert sind, eine auffällig starke räumliche Nähe zum Fragment neben der ICR1, sowie eine etwas schwächere zu *H19* aufwies, wurde dessen Sequenz eingehender untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich in einer Entfernung von 532 Basen zu CS7 ein Cluster mit 27 potentiellen P53-Bindestellen befindet. Davon wiesen, mit Ausnahme der Kernregion (mittlere 4 Basen), 18 Sequenzen exakt dieselbe Basenabfolge von GGAC..GCTC auf. In der Kernregion waren entweder die Basen TT oder AT zu finden. Lediglich eine der potentiellen Bindestellen wies eine Abweichung in der 8. Base auf, hier wurde statt eines Cs ein A detektiert. Die übrigen neun Sequenzen hatten eine Basenabweichung an der vierten Position, an welcher statt eines Cs ein T zu finden war. Die ersten fünf Sequenzen wiesen einen Spacer von 14 Basen zueinander auf, gefolgt von einem 34 Basenabstand zum nächsten Bindemotiv. Im Sequenzverlauf folgten 22 weitere Motive, die ebenfalls alle einen Abstand von 14 Basen zueinander aufwiesen (siehe Abb. 3-15 B).

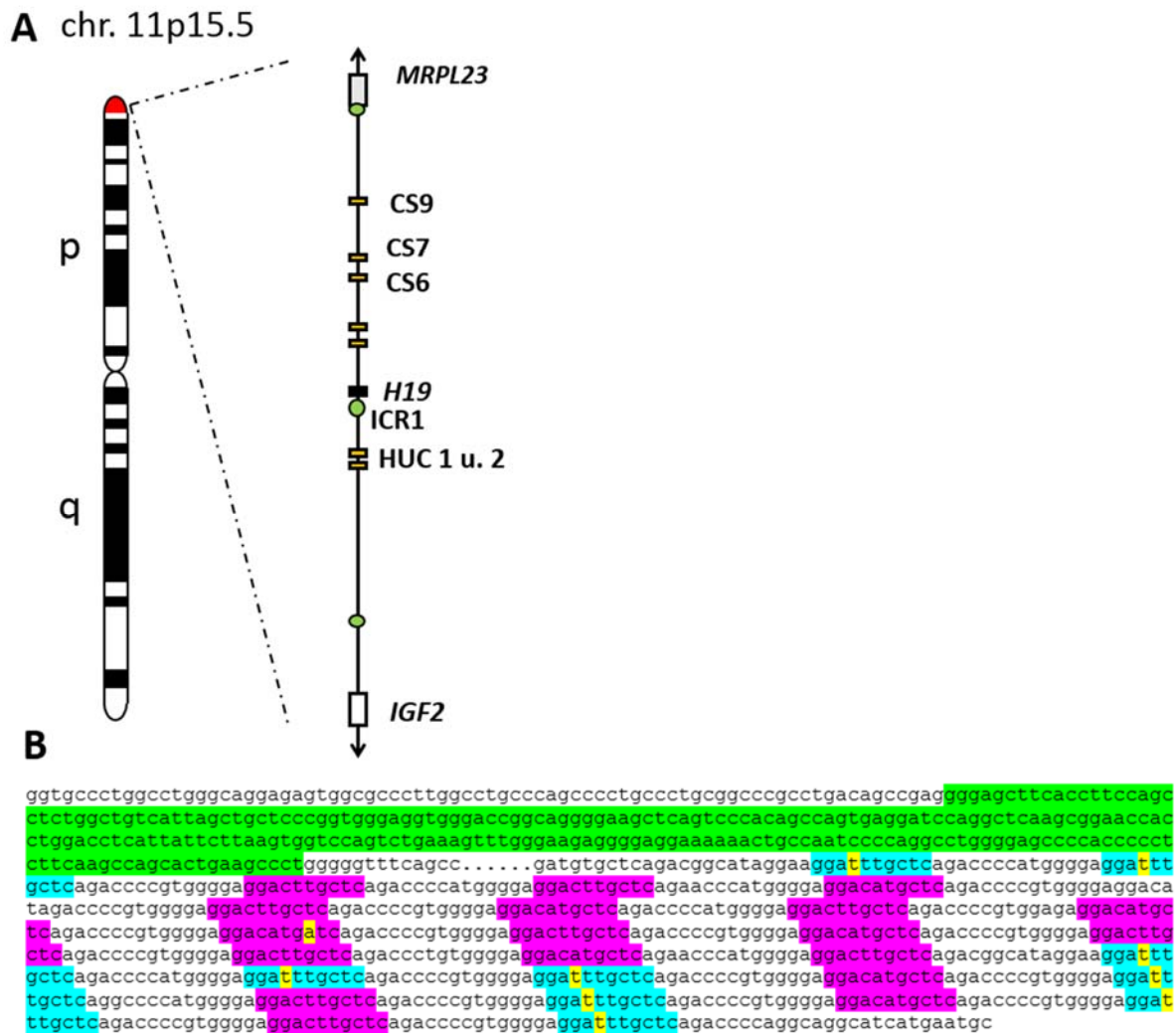


Abb. 3-15 P53-Bindestellen-Cluster bei CS7

A Schematische Darstellung der untersuchten Region auf Chromosom 11p15.5 **B** Der Sequenzauszug beinhaltet das CS7-Element (grün), sowie die 27 entdeckten P53-Bindemotive. Der Abstand zwischen den Motiven beträgt bis auf eine Ausnahme - 14 Basen. Die optimale Sequenz ist violett dargestellt und Motive, welche eine Abweichung im Kernelement aufweisen, türkis. Basen, die von der optimalen Sequenz abweichen, sind gelb markiert.

3.6 Analyse von P53-Effekten auf *IGF2/H19* bzw. die ICR1 nach Nutlin-3a-Zugabe

Da in der unmittelbaren Nähe des für *IGF2* und *H19* verantwortlichen Enhancers CS7 mehrere putative P53-Bindestellen gefunden wurden (siehe Abb. 3-15) und auch in der Literatur Effekte auf diese beiden Gene beschrieben bzw. diskutiert werden (Matouk *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998), sollte untersucht werden, ob P53 einen Einfluss auf die Expression von *IGF2* und *H19* hat.

Ergebnisse

Um mögliche Effekte von P53 untersuchen zu können, musste P53 zunächst in der Zelle induziert bzw. stabilisiert oder reduziert werden. Im Grundzustand der Zelle wird P53 konstitutiv exprimiert, um im Bedarfsfall schnell verfügbar zu sein. Gleichzeitig wird P53 jedoch auf Proteinebene durch den Abbau im Proteasom auf einem niedrigen Level gehalten. Bei einer benötigten Aktivierung von P53 wird dieser Abbau unterbunden und das P53-Protein kann entsprechend seiner benötigten Funktionen modifiziert und aktiviert werden (Abraham, 2001; Vogelstein *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch eine Induktion oder eine Reduktion von P53 transkriptionelle Veränderungen im Imprinting-Cluster von *IGF2* und *H19* auftreten.

Um den Abbau von P53 im Proteasom zu verhindern, wurde die Substanz Nutlin-3a (N3a) genutzt. Nutlin-3a konkurriert mit P53 um die Bindung an MDM2 und inhibiert somit die Interaktion. Daraus resultiert, dass P53 nicht mehr ubiquitinyliert wird und somit auch nicht im Proteasom abgebaut, sondern in der Zelle akkumuliert (Nikulenkov *et al.*, 2012). Für die anstehenden Versuche wurde P53 in den untersuchten Zellen mittels Nutlin-3a stabilisiert. Nutlin-3a wurde hierfür in DMSO gelöst, die Lösung direkt zu den Zellen in das Zellkulturmedium gegeben und für 6 Std. inkubiert. Zu Beginn der verschiedenen Experimente wurde die Zugabe von 5 μ M bzw. 10 μ M Nutlin-3a in SRS UPD11-Zellen getestet.

3.6.1 Nachweis der Induktion von P53 durch Nutlin-3a auf Proteinebene

Um die Akkumulierung in der Zelle bzw. im Zellkern nachzuweisen, wurde ein Westernblot zur Detektion von P53 durchgeführt. Hierfür wurde das Zelllysate von SRS UPD11-Zellen verwendet. Die Proteinfractionen des Zytoplasmas und des Kerns wurden voneinander getrennt und aufgereinigt (siehe 2.4). Als Kontrolle dienten Proteine aus Zellen, welche mit der gleichen Menge DMSO wie die Nutlin-3a-Proben behandelt wurden. Für die Normalisierung der Kernfraktion wurde Lamin A/C verwendet. Die Auftrennung der Proteinproben und der Proteinnachweis durch die entsprechenden Antikörper für SRS UPD11 sind in Abb. 3-16 dargestellt. Die Intensität der Banden von Lamin A und C verhielt sich jedoch nicht einheitlich. Während bei der DMSO- und der 5 μ M-Probe das Verhältnis von Lamin A zu C jeweils 0,41:1 betrug, lag es bei der 10 μ M-Probe bei 0,71:1. Daher ergab sich, je nach Abgleich, ein unterschiedliches Ergebnis. Bei der Normalisierung mit Lamin A wies die 5 μ M-Probe mit einer 5-fachen Zunahme im Vergleich zu DMSO die höchste P53 Konzentration im Kern auf, während beim Abgleich auf Lamin C die 10 μ M-Probe mit dem Faktor 7,4 eine

Ergebnisse

höhere Zunahme aufwies. Insgesamt konnte jedoch von einer klaren Akkumulation des P53-Proteins im Kern ausgegangen werden. Auch im Zytoplasma konnte nach der Induktion eine stärkere Bande von P53 im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden.

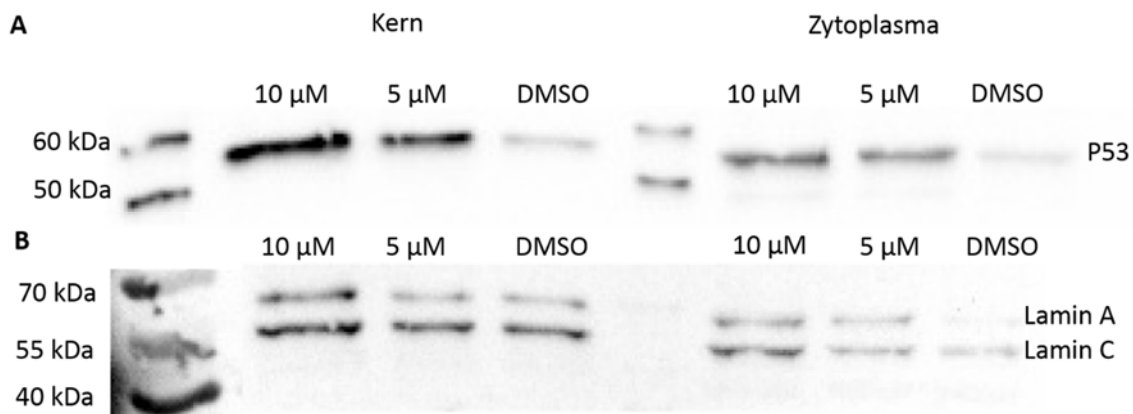


Abb. 3-16 Nachweis der P53-Protein Stabilisierung in SRS UPD11

A Die Westernblot-Abbildung zeigt die P53 (53 kDa)-Akkumulation im Kern 6 h nach der Zugabe von 10 μM bzw. 5 μM N3a, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Auch im Zytoplasma war eine Zunahme von P53 zu beobachten.

B Als Kontrolle für die Kernfraktion wurde ein Antikörper gegen Lamin A/C verwendet. Bei der oberen Bande handelt es sich um Lamin A (69 kDa), bei der unteren um Lamin C (62 kDa).

Mit den Analysen konnte die Akkumulation von P53 im Zellkern nach einer Nutlin-3a-Behandlung in den untersuchten SRS UPD11-Zellen nachgewiesen werden. Da im späteren Verlauf der Arbeit allerdings nur P53-Effekte im Kern untersucht werden sollten, wurde P53 im Zytoplasma nicht mithilfe eines Haushaltsgens näher bestimmt.

3.6.2 Transkriptionelle Analysen nach P53-Induktion mit Nutlin-3a

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Expression des Gens *P21* über P53, bzw. nach seiner Stabilisierung durch Nutlin-3a, gesteigert wird (Nikulenkov *et al.*, 2012). Daher wurde eine erhöhte Expression von *P21* nach einer Nutlin-3a-Behandlung als sicheres Zeichen für eine P53-Aktivierung, welche sich auf Transkriptionsebene auswirkt, bewertet. Die zu untersuchenden Zellen wurden für eine Dauer von 6 Stunden mit 10 μM Nutlin-3a inkubiert. Im Anschluss daran wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert (vergleiche 2.3.8, 2.3.10 und 2.3.12). Die Expression der untersuchten Gene wurde auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene *B2M*, *ATP5J* und *PPIA* abgeglichen. In SRS UPD11 und SRS UPD7 konnte nach der Behandlung mit Nutlin-3a im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine deutliche Erhöhung des *P21*-Transkripts auf das 4,5-Fache bei SRS UPD11 und

Ergebnisse

auf das 3,7-Fache bei SRS UPD7 festgestellt werden (siehe Abb. 3-17 A). Die Induktion mit 10 μ M Nutlin-3a reichte also aus, um transkriptionelle Effekte von P53 auszulösen.

In den untersuchten SRS UPD11- und SRS UPD7-Proben zeigte die Expression von *H19* im Zusammenhang mit der P53-Induktion keine einheitliche Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Wie allerdings in Abb. 3-17 B und C zu sehen ist, war in den SRS UPD11- und SRS UPD7-Zellen in einigen Proben eine deutliche Reduktion, in anderen Proben eine deutliche Steigerung der Expression festzustellen. SRS UPD7 zeigte die stärkste Reduktion auf etwa 30% der Kontrolle und wies einen Ausreißer (609%) auf, während *H19* in SRS UPD11 die höchste Steigerung auf das Doppelte der Kontrolle aufwies. Bei beiden Zellkulturen waren sowohl reduzierte, unveränderte, als auch erhöhte *H19*-Expressionen im Vergleich zur Kontrolle zu finden. Auch für die Expression von *IGF2* wurde sowohl bei SRS UPD11 als auch bei SRS UPD7 eine starke Schwankung der Werte detektiert. In SRS UPD11 lagen jedoch, mit Ausnahme des niedrigsten Werts (95%), alle Werte über der Kontrolle. Somit konnte für SRS UPD11 eine signifikante Steigerung (Median 133% und Mittelwert 160%) des *IGF2*-Transkripts festgestellt werden. Bei SRS UPD7 betrug der niedrigste Wert nur 5% der Kontrolle und der höchste Wert wies eine Steigerung auf 188% auf. Aufgrund der breiten Streuung konnte daher für SRS UPD7 keine eindeutige Steigerung oder Reduktion der Expression von *IGF2* nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-17 D).

Des Weiteren wurde die Expression von *CDKN1C* im Zusammenhang mit der P53-Induktion analysiert. Für SRS UPD11 zeigte sich hierbei eine leichte nicht signifikante Reduktion des *CDKN1C*-Transkripts (siehe Abb. 3-17 E). Insgesamt lagen dabei nur die Werte zweier Proben höher als die der Kontrolle, während die restlichen Proben im Mittel eine Verringerung auf etwa 80% im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Für SRS UPD7 konnte keine klare Tendenz festgestellt werden. Der Median der Werte lag mit 110% nur minimal höher als die Kontrollwerte, während der Mittelwert bei 89% lag. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass der niedrigste Wert (16,4%), welcher als Ausreißer definiert werden konnte, zur Bildung des niedrigeren Mittelwerts beitrug (siehe Abb. 3-17 E).

Ergebnisse

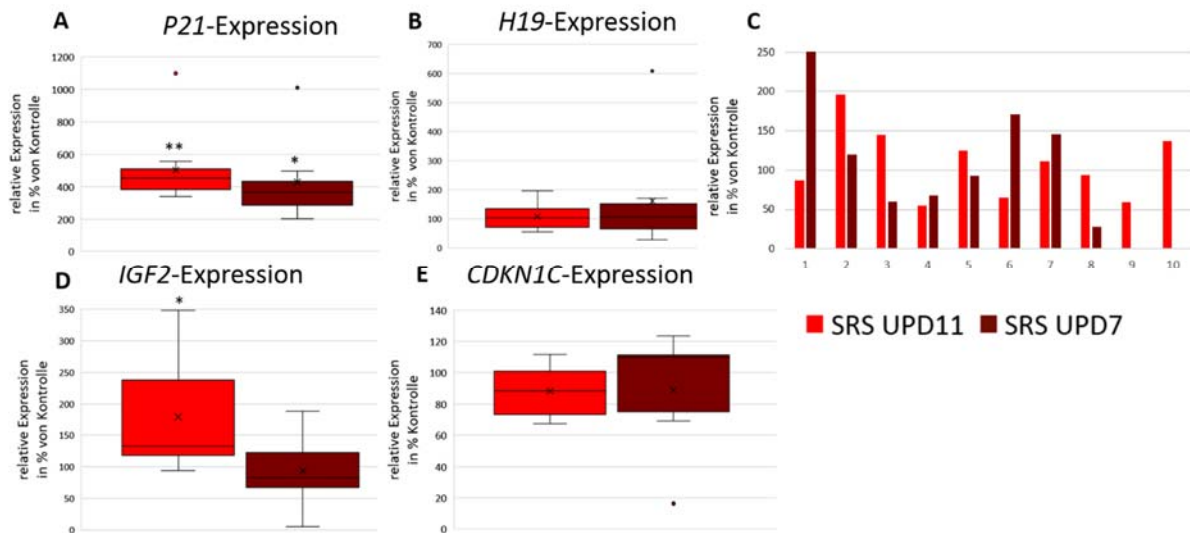


Abb. 3-17 Expressionsanalysen von SRS UPD11 und SRS UPD7 nach N3a-Behandlung

In den Diagrammen ist die Expression der analysierten Gene im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Die mittlere Linie der Box gibt den Median an, das x markiert den Mittelwert. **A** Bei beiden Zellkulturen war eine signifikante bzw. sehr signifikante Steigerung des *P21*-Transkripts zu beobachten. **B** Die mittlere *H19*-Expression zeigt keinen Unterschied im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. **C** In dem Diagramm sind die Veränderungen der *H19*-Expression in den einzelnen Proben dargestellt. Die Expression zeigte in beiden Zellkulturen eine breite Streuung, die erste Probe von SRS UPD7 wies mit 607% einen besonders hohen Ausreißerwert auf. Aufgrund der übersichtlicheren Darstellung ist die Y-Achse auf 300% begrenzt. **D** Die *IGF2*-Expression wies in beiden Zellkulturen eine große Streuung auf. Nur in SRS UPD11 konnte eine signifikante Erhöhung des *IGF2*-Transkripts festgestellt werden. **E** Die *CDKN1C*-Expression wies in beiden Zellkulturen eine große Streuung auf und es konnte keine signifikante Steigerung oder Reduktion nachgewiesen werden. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, SRS UPD11 $n = 10$, SRS UPD7 $n = 8$).

Die Analysen zeigten, dass P53 durch die Nutlin-3a-Behandlung stabilisiert wurde, dies konnte indirekt über die Expressionssteigerung von *P21* nachgewiesen werden. Die P53-Induktion hatte jedoch keine einheitliche Auswirkung auf die Expression der Gene *H19* und *CDKN1C* in den beiden untersuchten Zellkulturen. Für *IGF2* konnte lediglich in den SRS UPD11-Zellen eine Erhöhung der Expression nachgewiesen werden.

3.7 Transkriptionelle Analyse nach P53-Knockdown

Alternativ zur Stabilisierung wurden auch Experimente, welche auf einer Reduktion von P53 basierten, durchgeführt. Hierfür wurde der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) genutzt. RNAi ist ein Prozess, der auf posttranskriptionaler Ebene mit einer Destabilisierung von mRNA-Transkripten assoziiert ist (Caudy *et al.*, 2002). Durch die Nutzung künstlicher shRNA- (short hairpin) oder siRNA- (small interfering) Konstrukte kann experimentell eine RNAi ausgelöst werden. Die doppelsträngigen RNAs werden durch den sogenannten Dicer-Komplex in eine einzelsträngige RNA umgewandelt. Die RNA-Einzelstränge werden nun in den RNA-

Ergebnisse

inducing silencing complex (RISC) inkorporiert, welcher die Bindung mit der komplementären mRNA und dadurch ihren Abbau im Zellekern initiiert (siehe Abb. 2-2) (Dykxhoorn *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde der Prozess der RNAi als Knockdown, also einer Herunterregulation, für *P53* genutzt. Wie in 2.2.5 beschrieben ist, wurden die Zellen SRS UPD11 und SRS UPD7 mit der entsprechenden siRNA, welche eine homologe Sequenz zur *P53* mRNA besitzt, transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem siRNA-Konstrukt (s.l.) transfiziert, welches keine endogene Zielsequenz aufwies. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die zelluläre RNA isoliert und in cDNA umgewandelt (siehe 2.3.8 und 2.3.10). Die Effekte auf Transkriptionsebene wurden anschließend mittels qRT-PCR analysiert (siehe 2.3.12). Für die Normalisierung wurde das geometrische Mittel der Haushaltsgene *PDH*, *ATP5J* und *B2M* genutzt. Insgesamt wurden für beide Zellkulturen vier, bzw. für den 72 Stunden-Wert fünf, unabhängig voneinander durchgeführte Knockdown-Experimente miteinander verglichen.

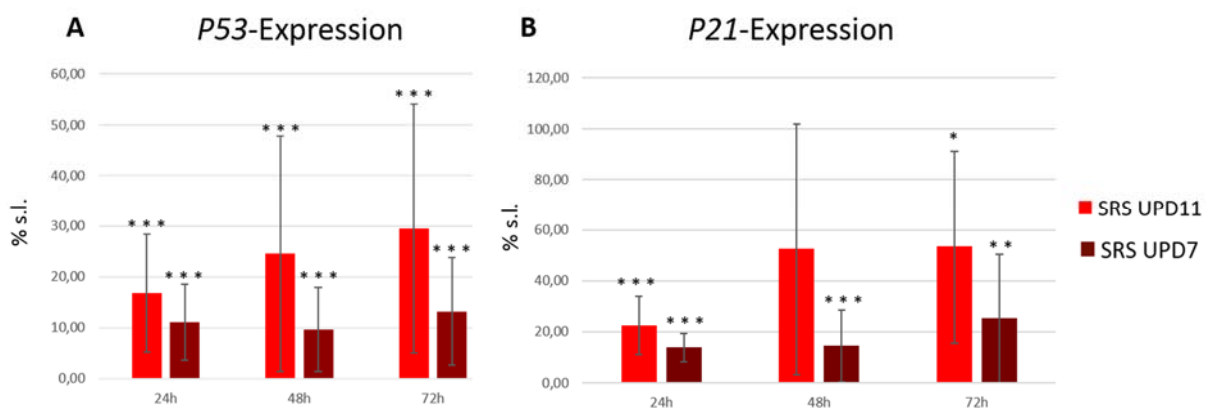


Abb. 3-18 *P53*- und *P21*-Expression nach *P53*-Knockdown

A Sowohl in SRS UPD11 als auch in SRS UPD7 lag die durchschnittliche *P53*-Expression im Vergleich zum s.l. hoch signifikant reduziert vor. Im Vergleich zu SRS UPD11 war das Expressionsniveau zumindest nach 48 h und 72 h bei SRS UPD7 deutlich niedriger. **B** SRS UPD7 wies auch für *P21* zu allen drei Zeitpunkten eine geringere Transkriptmenge auf als SRS UPD11. Nach 48 h zeigte sich in den SRS UPD11-Zellen eine starke Schwankung und somit nicht signifikante Reduktion. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet. ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, 24 h u. 48 h $n = 4$, 72 h $n = 5$)

Wie in Abb. 3-18 A zu sehen ist, hat der *P53*-Knockdown in beiden Zellkulturen zu allen drei Zeitpunkten zu einer hoch signifikanten Reduktion des *P53*-Transkripts im Vergleich zur s.l.-Kontrolle geführt. Für *P21* zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei für SRS UPD7 eine deutlichere und zumindest nach 48 h und 72 h auch signifikantere Reduktion der *P21*-Expression als bei SRS UPD11 verzeichnet werden konnte. Für SRS UPD11 war nach 48 h im Mittel die geringste *P21*-Reduktion zu verzeichnen (siehe Abb. 3-18 B). Die große Schwankung für diesen Zeitpunkt war auf den dritten der vier Versuche, in welchem die Expression von *P21* mit 123 % deutlich über den anderen drei Versuchen (Mittelwert: 29 %) lag, zurückzuführen. Derselbe Versuch

Ergebnisse

wies auch nach 72 h mit 82 % einen besonders hohen Wert auf, welcher zusammen mit der gemessenen Expression in Versuch 5 (91 %) maßgeblich zu der großen Schwankung beitrug.

Die Expression von *H19* wies in beiden Zellkulturen nach 24 h und 48 h keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zur s.l.-Kontrolle auf. Nach 72 h war in SRS UPD11 eine leichte nicht signifikante Reduktion zu erkennen, während in SRS UPD7 eine signifikante Erhöhung der Expression auf das 1,5-Fache des S.L. zu verzeichnen war (siehe Abb. 3-19 A). Im Gegensatz zu *H19* zeigte sich in beiden Zellkulturen nach allen drei Zeitpunkten im Mittel eine Reduktion des *IGF2*-Transkripts, welche in SRS UPD7 nach 24 h und 48 h hoch signifikant ausfiel (siehe Abb. 3-19 B). Bei den Versuchen von SRS UPD11 gab es für jeden Zeitpunkt eine Probe, die im Vergleich zu den übrigen drei bzw. vier Versuchen keine Reduktion, sondern eine Erhöhung der Expression von *IGF2* zeigte. Daraus ergab sich eine hohe statistische Standardabweichung der Werte. Auch für die Expression von *CDKN1C* konnte keine statistisch verifizierbare Veränderung im Zusammenhang mit dem *P53*-Knockdown ermittelt werden (siehe Abb. 3-19 C). Die Expression wies vor allem in SRS UPD11 für alle drei Zeitpunkte und in SRS UPD7 insbesondere nach 72 h eine sehr starke Schwankung auf. Während sich in SRS UPD7 im Mittel nach 24 h eine Reduktion von *CDKN1C* zeigte, welche nach 48 h wieder S.L.-Niveau erreichte und nach 72 h auf das 2,8-Fache vom S.L. anstieg, wies SRS UPD11 nach 24 h im Mittel eine Erhöhung des *CDKN1C*-Transkripts auf das 2,7-Fache des S.L. auf, welche jedoch nach 48 h und 72 h nicht mehr festzustellen war.

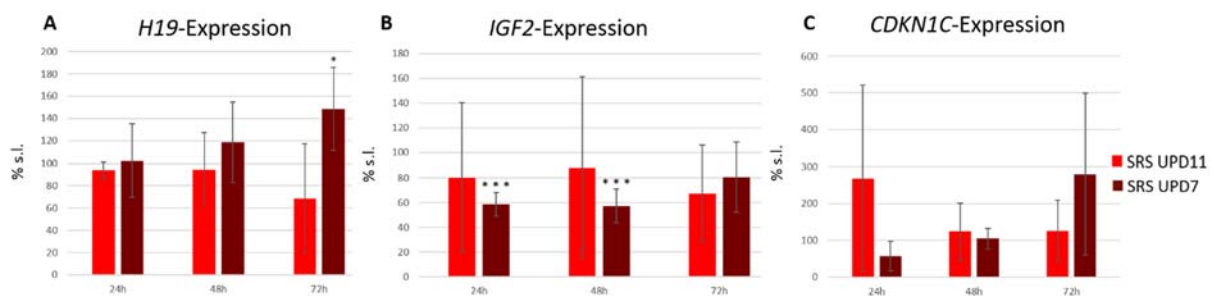


Abb. 3-19 *H19*-, *IGF2*- und *CDKN1C*-Expression nach *P53*-Knockdown

A Die Expression von *H19* wies nach 24 h und 48 h weder im Vergleich zur Kontrolle noch zwischen den beiden verschiedenen Zellkulturen einen Unterschied auf. Lediglich nach 72 h war eine leichte Reduktion in SRS UPD11 und eine signifikante Erhöhung in SRS UPD7 festzustellen. **B** *IGF2* lag in beiden Zellen nach allen drei Zeitpunkten im Vergleich zum S.L. im Mittel reduziert vor. **C** Die Expression von *CDKN1C* stellte sich vor allem nach 24 h in SRS UPD11 und nach 72 h in beiden Zellkulturen sehr schwankend dar. Es konnte für keinen Zeitpunkt eine statistisch signifikante Veränderung festgestellt werden. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet.

($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,001 = ***$, 24 h u. 48 h $n = 4$, 72 h $n = 5$)

Der Knockdown von P53 zeigte reziprok zur Induktion durch Nutlin-3a, welche mit einer Erhöhung der *P21*-Expression einherging, eine Reduktion des *P21*-Transkripts. Die Expression von *H19* war in den SRS UPD11-Zellen kaum verändert, während sie in den SRS UPD7-Zellen tendenziell erhöht vorlag. Für *IGF2* konnte in beiden Zellkulturen im Mittel eine reduzierte Expression festgestellt werden.

3.8 Nachweis der P53-Bindung an Enhancer- bzw. Promoterelemente von *IGF2* und *H19*

Es ist bekannt, dass P53 einen regulativen transkriptionellen Einfluss auf proteincodierende Gene, aber auch auf nicht codierende RNA-Gene hat (Younger *et al.*, 2015). Eine Funktion von P53 liegt in der Interaktion mit regulativen Elementen, welche in nicht codierenden Regionen des Genoms zu finden sind. Hierbei handelt es sich unter anderem um die Erkennung und Bindung an regulatorischen Enhancerelementen. Dabei konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die entsprechenden Enhancerregionen über Chromatinschleifenbildung mit einem oder mehreren Genen interagieren und auf diese Weise regulieren können. Zusätzlich scheinen die Enhancer häufig eine sogenannte Enhancer-RNA (eRNA) zu bilden, welche in den regulativen Prozess involviert sein könnte (Melo *et al.*, 2013). Die Stabilisierung und die Reduktion von P53 zeigten keine eindeutigen und einheitlichen Effekte für die in dieser Arbeit untersuchten Regionen auf Chromosom 11 (siehe 3.6). Aufgrund des Bindeclusters bei CS7 und bereits beschriebener Effekte von P53 auf die Expression von *H19* und *IGF2* scheint dennoch die Möglichkeit gegeben, dass P53 hier eine regulative Funktion aufweisen kann. Für *IGF2* wurde bisher eine repressive Wirkung von P53 beschrieben, allerdings konnte sowohl die direkte Bindung von P53 an *IGF2*-P4, als auch die indirekte Bindung an P3 bisher nur *in vitro* per EMSA gezeigt werden (Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998). Auch für *H19* scheint ein regulativer Effekt von P53 aufgrund von Erkenntnissen, die in Zusammenhang mit Analysen in Tumoren gemacht wurden denkbar. In der Publikation wurde dargestellt, dass P53 einen repressiven Einfluss auf die Transkription von *H19* hat (Matouk *et al.*, 2010). Dazu passen auch die in Kap. 3.5 gezeigten Ergebnisse nach welchen die Enhancerregion um CS7, welche auch das putative P53-Bindecluster enthält, mit der *H19*-Promoterregion zu interagieren scheint (siehe Abb. 3-15).

Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte daher mittels ChIP untersucht werden, ob nach der Induktion mit Nutlin-3a, welche die Menge an P53-Protein im Kern steigert (siehe 3.6.1), eine Bindung im Bereich des CS7-Enhancers oder in den Promoterbereichen von *IGF2* oder *H19* festzustellen ist. Hierfür wurde eine ChIP zur Detektion von P53 in SRS UPD11- und SRS UPD7-Zellen durchgeführt, um die Bindung von P53 zu verifizieren (siehe 2.5). Die Analyse der ChIP erfolgte für einzelne ausgewählte Regionen mit spezifischen Primern per qPCR (siehe 2.3.12) und wurde per ChIP-Seq, welche einen genomweiten Überblick über die P53-Bindestellen bieten sollte, ergänzt.

3.8.1 Verifikation der Fragmentierung des Chromatins

Für die ChIP war es wichtig, dass das Chromatin eine bestimmte Größe aufwies. Daher wurden die Proben, im Anschluss an die kovalente Fixierung der Proteine an das Chromatin, mithilfe des Ultraschallgeräts Chromatin-Ultrasonicator M220, wie in 2.5.1 beschrieben, 3 Min. lang fragmentiert. Die durchschnittliche Fragmentgröße sollte in einem Bereich von 200-800 Basen liegen. Die Fragmente sollten nicht zu groß sein, um den Bereich der Bindung relativ exakt abschätzen zu können. Zu kleine Fragmente hingegen könnten dazu führen, dass trotz einer vorhandenen Bindung die Fragmente möglicherweise nicht amplifiziert werden können, da Teile der DNA-Sequenz, an welche die Primer in der durchgeführten qPCR binden sollten, fehlen würden. Die Bestimmung der Fragmentgröße wurde mittels Bioanalyzer bzw. Gelelektrophorese ausgewertet. Die Auswertung der Ergebnisse ergaben, dass das Chromatin der Proben nach dreiminütiger Ultraschallbehandlung die gewünschten Parameter aufwies (siehe Abb. 3-20). Da von einer gleichbleibenden Qualität der Behandlung auszugehen war, wurden die weiteren ChIP-Proben nur anhand der Gelelektrophorese bewertet.

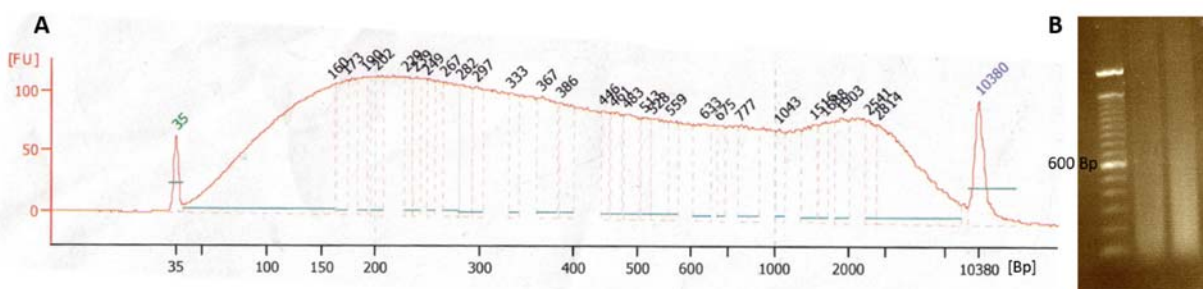


Abb. 3-20 Fragmentgrößenbestimmung der DNA

A Die Abb. zeigt das Elektropherogramm der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA im Bioanalyzer. Auf der x-Achse ist die Verteilung der Größe der Fragmente zu erkennen, die über die Fluoreszenz (y-Achse) und entsprechende interne Längenstandards quantifiziert werden konnten. Für die ausgewählte SRS UPD11-Probe ist zu erkennen, dass der Großteil der Fragmente im Bereich von 100-1000 Bp lag. **B** Über die Färbung des Agarosegels konnte eine ähnliche Verteilung der Chromatinfragmente gezeigt werden. Das Chromatin stellt sich als diffuser Schmier dar, der sich Großteils im Bereich von 100-800 Basen befindet. Als Längenstandard diente der 100 Bp-Marker.

3.8.2 Verifikation der ChIP mittels Kontrollregionen

Zur Überprüfung des ChIP-Experiments sollte mittels einer für Polymerase-II (PolII) positiven Kontrollregion festgestellt werden, ob mit einem PolII-Antikörper ein spezifischer Pulldown erzeugt werden kann. Als Kontrollregion wurde der Bereich des *GAPDH*-Promoters verwendet, da bekannt ist, dass dieser in jeder Zelle eine hohe Bindung von PolII aufweist. Die Proben für PolII wurden mittels qPCR analysiert und auf den unbehandelten Input normalisiert (siehe 2.3.12). Für die ersten zwei ChIP-Experimente mit SRS UPD11 zeigte der PolII Antikörper einen erhöhten Pulldown im Vergleich zur unspezifischen Negativkontrolle IgG (siehe Abb. 3-21).

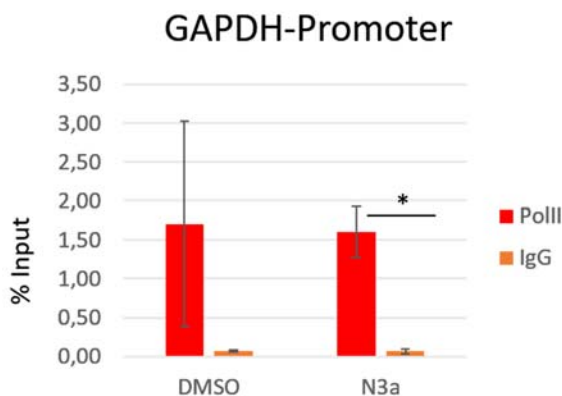


Abb. 3-21 PolII-Pulldown im *GAPDH*-Promoterbereich

In den untersuchten SRS UPD11-Zellen wiesen im Vergleich zu IgG sowohl die DMSO- als auch die N3a-Proben einen erhöhten Pulldown von PolII im *GAPDH*-Promoter auf. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet. ($p \leq 0,05 = *$, $n = 2$)

Da somit von einem erfolgreichen ChIP-Ansatz ausgegangen werden konnte, wurde für die weiteren ChIP-Experimente nur noch der Pulldown von P53, in einer Kontrollregion welche mit einer P53-Bindung assoziiert ist, überprüft. Für die Bestätigung der Induktion und der Bindung von P53 wurde der Bereich des *P21 (CDKN1A)*-Promoters verwendet.

Wie in Abb. 3-22 zu sehen ist, zeigten die Ergebnisse der qPCR für SRS UPD11 und SRS UPD7 sowohl für die mit DMSO- als auch mit Nutlin-3a behandelten Zellen einen signifikant erhöhten Pulldown von P53 im Vergleich zu IgG. Zudem wiesen beide Zellkulturen einen verstärkten Pulldown im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach der Induktion durch Nutlin-3a auf. Somit konnte die Spezifität des P53-Antikörpers bestätigt werden.

Ergebnisse

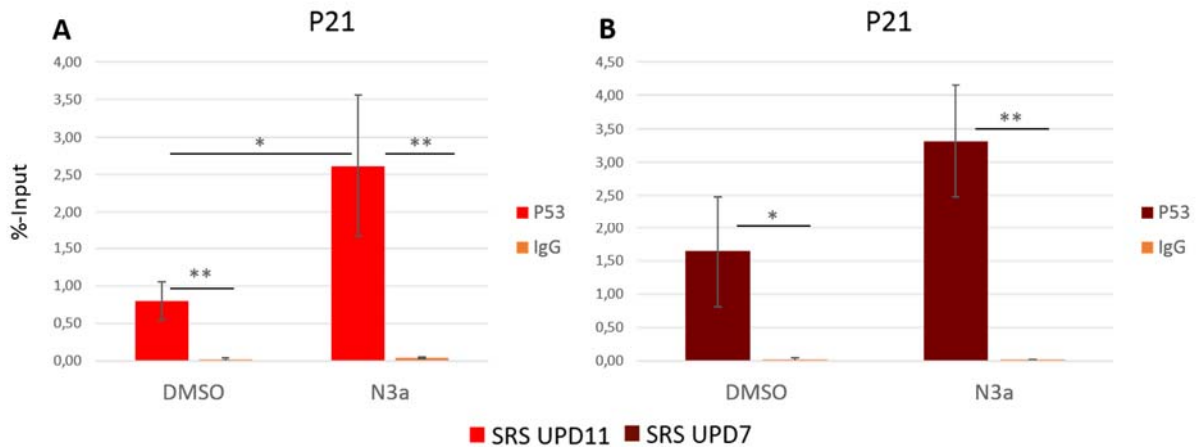


Abb. 3-22 P53-Pulldown im P21-Promoterbereich

A Für SRS UPD11 wiesen sowohl die DMSO-Kontrolle, als auch die N3a-Probe, eine sehr signifikante Erhöhung des P53-Pulldowns im Vergleich zu IgG auf. Außerdem konnte eine signifikante Steigerung des P53-Pulldowns nach der N3a-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. **B** Auch für SRS UPD7 war ein deutlicher Pulldown von P53 über dem IgG-Niveau und eine Steigerung nach der N3a-Zugabe zu verzeichnen. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet. ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $n = 4$)

3.8.3 Analyse der P53-Bindung an regulatorische Elementen von *H19* und *IGF2*

Um eine mögliche Relevanz von P53 in der Region auf Chromosom 11 festzustellen, wurde die Bindung von P53 in der Nähe von CS7, in welcher ein Cluster mit P53-Bindemotiven gefunden wurde (siehe Abb. 3-15) sowie im Bereich des *H19*-Promoters und der *IGF2*-Promoteren P3 und P4 untersucht.

Die Analyse des Bereichs bei CS7 ergab, dass mit dem P53-Antikörper in den untersuchten SRS UPD11-Proben in zwei CHIP-Experimenten ein sehr geringer Pulldown stattgefunden hat, welcher keinen signifikanten Unterschied zu IgG aufwies. Die Nutlin-3a-Proben wiesen zudem im Mittel einen geringeren Wert als die DMSO-Kontrolle auf. Insgesamt waren auf diesem niedrigen Niveau starke Schwankungen festzustellen (siehe Abb. 3-23 A). Auch für SRS UPD7 konnten nur die Werte von zwei CHIP-Experimenten zuverlässig ausgewertet werden (siehe Abb. 3-23 B). In den anderen Experimenten zeigten nahezu alle Proben von P53 und IgG in der Schmelzpunktanalyse nicht den erwarteten spezifischen Schmelzpunkt. Dies konnte allerdings nicht auf eine fehlerhafte qPCR zurückgeführt werden, da die Proben des Inputs bzw. der Standardreihe die korrekten Schmelzpunkte aufwiesen. Ein fehlerhafter bzw. abweichender Schmelzpunkt kann beispielsweise bei einer zu niedrigen DNA-Konzentration der Probe durch die Bildung von Primerdimeren auftreten. Die in der qPCR erzeugten CPs, welche mit einem differentiellen Schmelzpunkt assoziiert waren, wurden daher nicht zur Berechnung des

Ergebnisse

Pulldowns herangezogen, so dass von einem sehr geringen bzw. keinem Pulldown für die untersuchte Region bei CS7 in diesen Proben auszugehen war. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Promoterbereiche von *IGF2* (Daten nicht abgebildet) und *H19* (siehe Abb. 3-23 C u. D). Bei beiden Zellkulturen waren sowohl bei den DMSO- als auch bei den Nutlin-3a-Proben die in der qPCR gemessenen Konzentrationen für den P53-Pulldown so gering, dass sie nicht von IgG unterschieden werden konnten oder nicht den korrekten Schmelzpunkt aufwiesen. Somit konnte auch für die *IGF2*-Promoterbereiche (P3 und P4), sowie den *H19*-Promoter weder vor noch nach der Behandlung mit Nutlin-3a eine Bindung von P53 mithilfe der ChIP nachgewiesen werden.

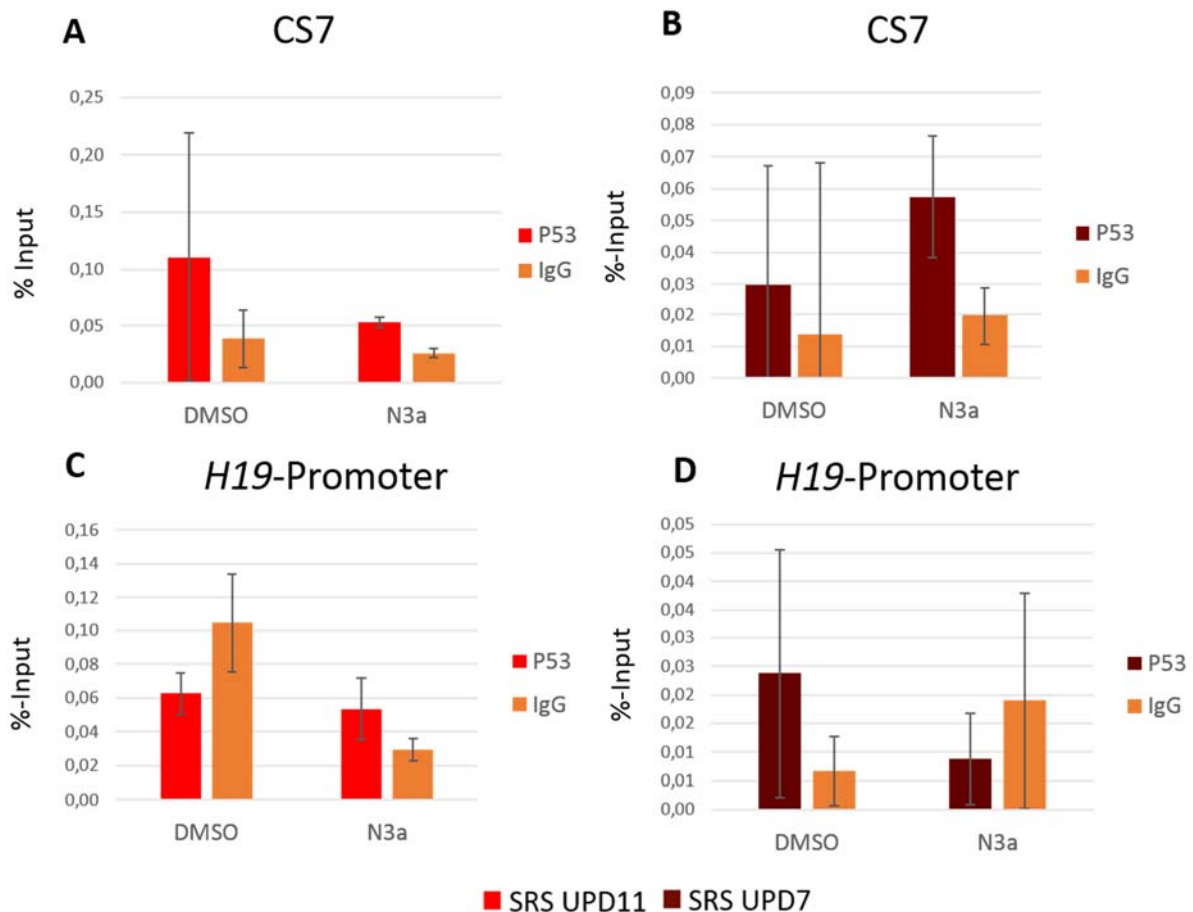


Abb. 3-23 P53-Pulldown in der Region bei CS7 und für den *H19* Promoter

A Für SRS UPD11 konnte kein signifikant erhöhter Pulldown in diesem Bereich festgestellt werden, es zeigte sich auch keine Erhöhung nach der N3a-Behandlung. **B** Auch bei den Proben von SRS UPD7 lag der Pulldown von P53 nahezu auf IgG-Niveau und wies starke Schwankungen auf. **C** Für SRS UPD11 konnte keine signifikant erhöhter Pulldown in diesem Bereich festgestellt werden, es zeigte sich auch keine Erhöhung nach der N3a-Behandlung. **D** Auch für die Proben von SRS UPD7 lag der Pulldown von P53 nahezu auf IgG Niveau und wies starke Schwankungen auf. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet. (n = 4)

Ergebnisse

Mit der ChIP konnte in P53 positiv assoziierten Regionen wie dem *P21*-Promoter eine Bindung von P53 nachgewiesen werden. In den untersuchten Regionen bei CS7, dem *H19*-Promoter oder den *IGF2*-Promoterbereichen (P3 und P4) konnte jedoch keine Bindung von P53 festgestellt werden, diese konnte auch nicht durch Nutlin-3a induziert werden.

3.8.4 Analyse der P53-Bindungen mittels ChIP-Seq

Für eine genomweite Analyse der P53-Bindungen wurde eine ChIP-Seq-Analyse durchgeführt. Hierfür wird die ChIP wie bereits beschrieben durchgeführt (siehe 2.5.2). Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Proben nicht per qPCR, sondern per NGS analysiert. Die Sequenzierung wurde bei der Firma Biontech durchgeführt. Hierfür wurden zwei mit Nutlin-3a behandelte SRS UPD11-Proben mit zwei DMSO-Kontrollen und eine SRS UPD7-Nutlin-3a-Probe mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. Aufgrund der starken Schwankungen in den Expressionsanalysen wurden für die Sequenzierung Proben ausgewählt, welche einen möglichst großen expressionellen Unterschied des *H19*-Transkripts zwischen der DMSO-Kontrolle und der Nutlin-3a-Probe aufwiesen. Während die beiden verwendeten SRS UPD11 Proben eine Reduktion auf etwa die Hälfte aufwiesen, wurde für SRS UPD7 eine Probe verwendet, bei welcher die Expression auf das 1,7-Fache gesteigert war.

Die komplette Librarypreparation der Proben, sowie die Sequenzierung wurde von der Firma Biontech durchgeführt. Dort fand ebenfalls eine generelle bioinformatische Qualitätsbewertung und Selektion der dort generierten fastq-Daten statt. Die Sequenziertiefe betrug ca. 35 Millionen Reads pro Probe. Mit diesen erzeugten Daten wurde eine Annotation auf das humane Referenzgenom (Hg 19) vorgenommen und eine Bam-Datei erstellt. Die Qualitätskontrolle ergab, dass für die Proben zwischen 80-90 % der erzeugten Reads einer Sequenz im humanen Genom zugeordnet werden konnten. Die Auswertung der ChIP-Seq-Daten konnte nun von mir anhand der für jede Probe generierten Bam-Datei mithilfe der Auswertetools auf der Galaxyserverplattform (<https://usegalaxy.org/>) durchgeführt werden. Die Darstellung der Reads erfolgte mithilfe des RPKM-Werts (reads per kb per million mapped reads). Dieser gibt die normalisierte Fragmentgrößen auf die Anzahl der Reads pro Kilobase pro Million kartierter Reads an. Mit Hilfe des „Bamcompare“-Programms für den Vergleich der mit Nutlin-3a behandelten Proben und der DMSO-Kontrolle wurde die Differenz aus den beiden Proben gebildet und eine „Bamcompare“-Datei erzeugt. Die generierten Daten konnten graphisch im UCSC-Genome-Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) dargestellt werden.

Ergebnisse

Alle positiven Werte zeigten somit potentiell eine Zunahme der P53-Bindung in den Regionen in denen die Bindung stattgefunden hat. Als Kontrollregion für die positive Bindung von P53 wurde auch für die CHIP-Seq-Auswertung der Promoter des *P21 (CDKN1A)*-Gens verwendet. Bei der Analyse der Region konnte gezeigt werden, dass im Bereich des Promoters sowie des ersten Exons von *P21* eine deutliche Zunahme des P53- Pulldowns im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sowie zu den ungebundenen Regionen zu verzeichnen war. Die Peaks in den Regionen ergeben sich aus der Differenz der RPKM-Werte der Nutlin-3a- und der DMSO-Probe. Die Peaks wiesen dabei eine Höhe von 50 bis 92 auf. Etwa 600 Basen entfernt im ersten Intron konnte ein weiterer, wenn auch nicht ganz so hoher Peak entdeckt werden (siehe Abb. 3-24), der für SRS UPD7 die Höhe 19,5 und für SRS UPD11 die Höhe 18,2 bzw. 33,6 aufwies. Etwa 1350 Basen vor dem zweiten bzw. dritten Exon (je nach Splicevariante) befand sich ein weiterer Peak, wobei dieser sich bei SRS UPD7 mit einer Höhe von 6,2 kaum vom Hintergrund abhob und nur bei SRS UPD11 (13 und 16,9) einen Unterschied zu diesem aufwies. Die genaue Analyse der Sequenz ergab, dass sich im Bereich des Promoters 22 Basen vor dem Beginn des ersten Exons ein doppelseitiges P53-Bindemotiv befindet, welches nicht durch einen Spacer getrennt wird. Zusätzlich konnte in unmittelbarer Nähe ein weiteres einzelnes Bindemotiv lokalisiert werden. Während das vordere Motiv der Doppelseite genau mit der in der Literatur (Menendez *et al.*, 2009) angegebenen Sequenz übereinstimmte, wies das zweite Motiv zwei Abweichungen auf, welche die erste und die letzte Base betrafen (siehe Abb. 3-25 A). Im Bereich des Peaks, welcher sich im Bereich des ersten Introns befindet, wurde eine einzelne passende Bindestelle lokalisiert (siehe Abb. 3-25 B). Die Analyse des dritten Peaks ergab, dass sich hier drei einzelne P53-Bindestellen befinden, von denen jedoch nur eine die vollständig korrekte Sequenz aufwies, während die anderen beiden eine Abweichung von jeweils 2 Basen im äußeren Bereich zeigten. Mit den Ergebnissen der CHIP-Seq konnte die Zunahme der P53-Bindung im *CDKN1A*-Promoter nach Nutlin-3a-Behandlung in beiden Zellkulturen gezeigt werden. Auch in weiteren bekannten Regionen wie beispielsweise bei *MDM2* und *PIDD* wurden erhöhte Peaks für P53 festgestellt. Diese Ergebnisse belegen, dass mit der durchgeführten CHIP-Methode spezifische P53-Bindungen im Genom nachgewiesen werden konnten. In der Analyse der Region um CS7 bzw. des Bereichs des in der Nähe identifizierten P53-Bindemotivclusters konnte im Vergleich zum Hintergrund kein P53-Pulldown detektiert werden. Trotz der erhöhten Bindemotivdichte scheint in dieser Region in keiner der beiden untersuchten Zellkulturen, weder in der Kontrolle, noch nach der Nutlin-3a-Behandlung, eine

Ergebnisse

Bindung von P53 stattgefunden zu haben (siehe Abb. 3-26 A). Ein ähnliches Bild ergab sich für den *H19*-Promoter, die ICR1 und die *IGF2*-Promoterbereiche (P3 und P4). Auch in diesen Regionen gab es keinen Hinweis für eine P53-Bindung (siehe Abb. 3-26 B und Abb. 3-27).

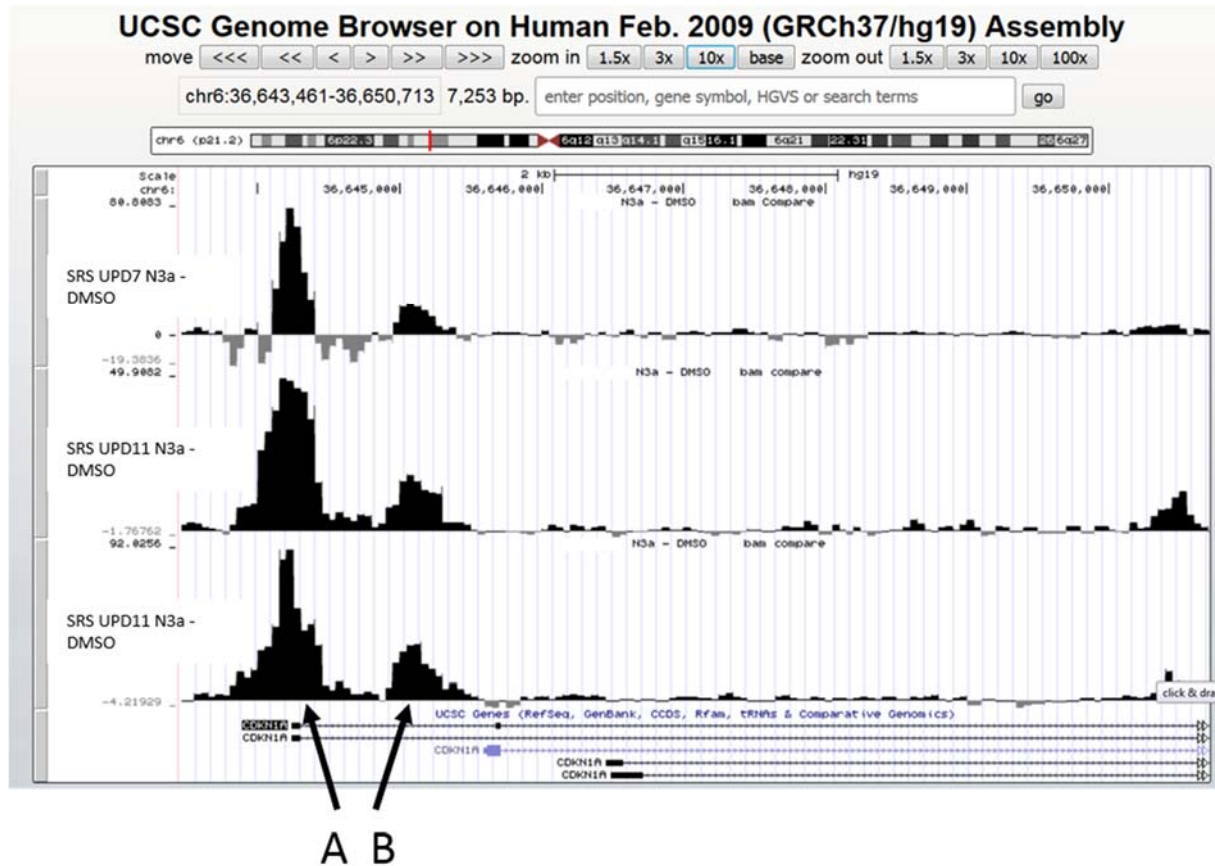


Abb. 3-24 ChIP-Seq Daten für die genomische Region um *CDKN1A*

Der im Bereich des Promoters dargestellte Peak (A) zeigte in allen drei Zellkulturen eine eindeutige Zunahme des P53-Pulldowns im Vergleich zum Hintergrund. Ein weiterer kleinerer Peak war im Bereich des ersten Introns (B) zu erkennen.

A CCTCCCTCCATCCCTATGCTGCCTGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGC
 AGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCCAACAT
 GTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCTTGGGCTGC
 CTGTTTTCAGGTGA

B GCGAGGCAGGCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGTCCTCCCACCCCTACCTGG
 GCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCGAGGTCA
 GCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTCCAGAC
 TCTGAGCAGCC

Abb. 3-25 P53-Bindestellen im Bereich des *CDKN1A*-Promoters bzw. des ersten Introns

Die in der DNA Sequenz violett markierten Bindestellen wiesen keine Sequenzabweichung zum beschriebenen Bindemotiv auf, während bei den grün markierten eine Abweichung von 2 Basen zu verzeichnen war. **A** Im Bereich des Promoters vor dem ersten Exon (gelb markiert) befindet sich eine einzelne Halbseite (violett) des P53-Bindemotivs und eine Doppelseite (violett und grün), welche nicht durch einen Spacer getrennt ist. **B** Im Bereich des zweiten Peaks, welcher sich im ersten Intron befindet, konnte ein einzelnes Bindemotiv (violett) detektiert werden.

Ergebnisse

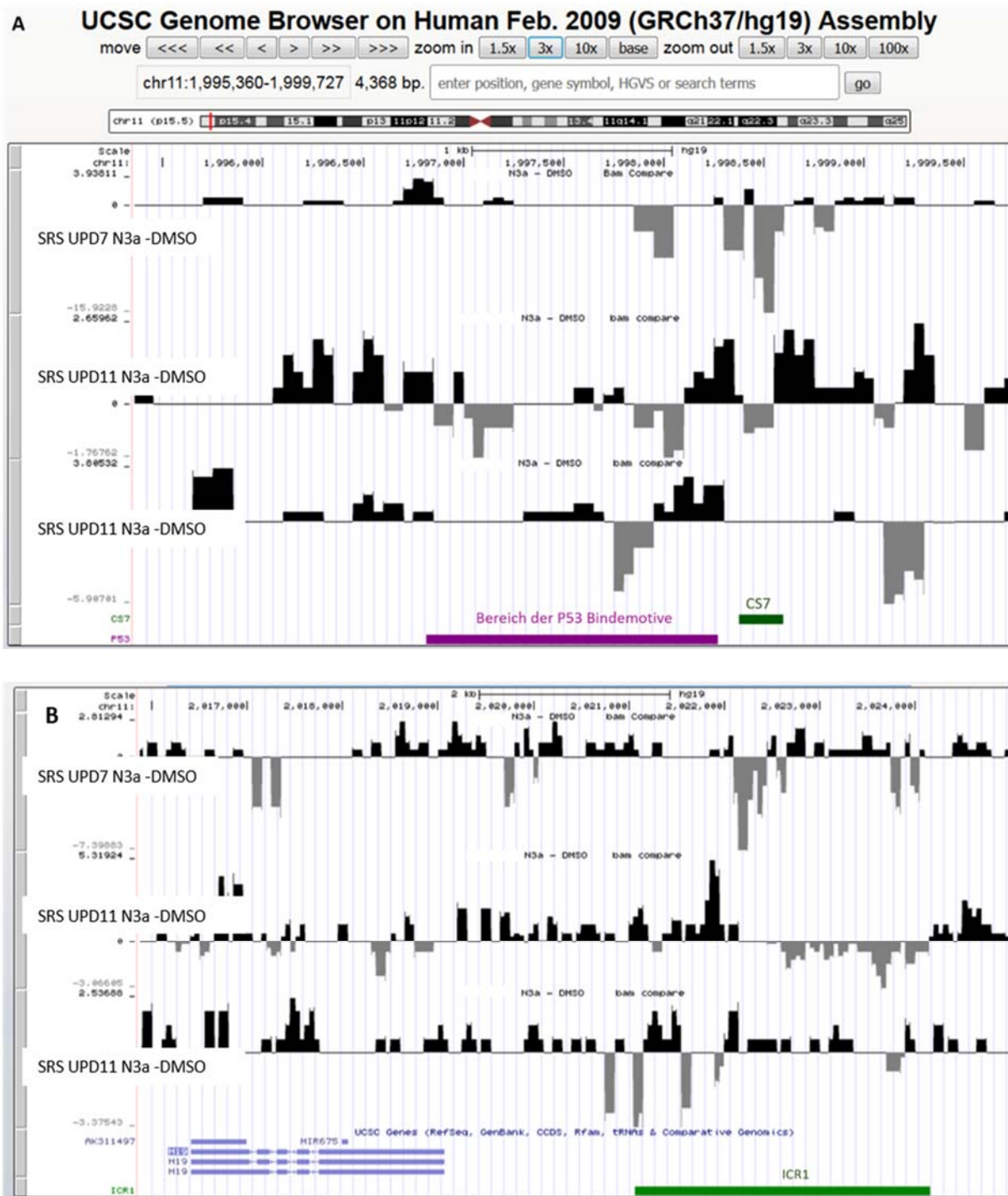


Abb. 3-26 ChIP-Seq Daten für die Regionen um CS7 bzw. der ICR1

A In dem genomischen Abschnitt sind der Bereich um CS7 (grün) und die Lage des in der Nähe gefundenen P53-Bindestellenclusters (violett) dargestellt. Es konnte kein erhöhter P53-Pulldown ähnlich den P53 positiven Regionen festgestellt werden. **B** Auch für den *H19*-Promoter bzw. den Bereich der ICR1 (grün) war kein P53-Pulldown feststellbar.

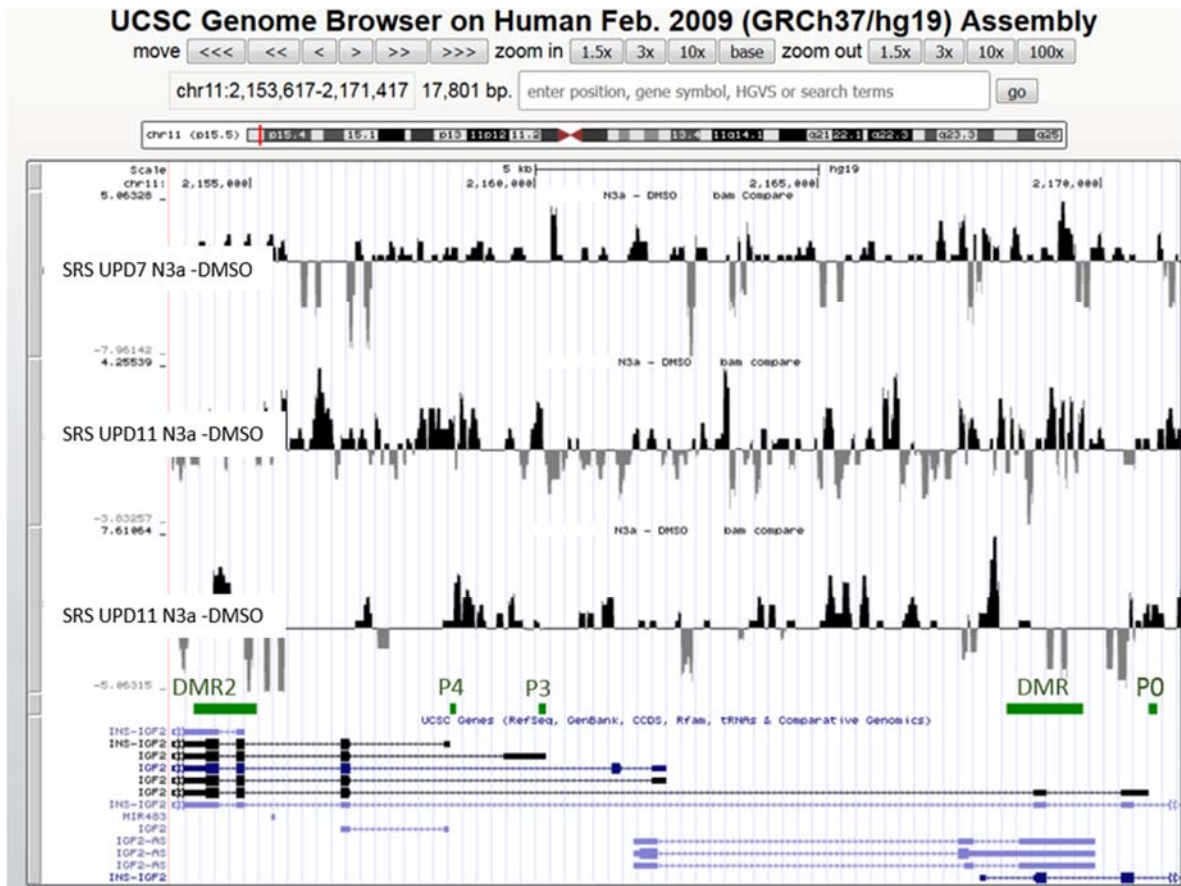


Abb. 3-27 Visualisierung der ChIP-Seq Daten im UCSC-Genome-Browser für das *IGF2*-Gen

Für die Promotoren von *IGF2* war ebenfalls kein P53-Pulldown, welcher sich von den umliegenden Regionen unterscheidet, zu detektieren.

3.9 Analyse von P53 Effekten auf *IGF2/H19* bzw. die ICR1 nach Bestrahlung

Die Induktion von P53 durch Nutlin-3a zeigte, vor allem bezogen auf die Expression der Gene *IGF2* und *H19*, keine einheitlichen signifikanten Effekte.

Da es sich bei der Nutlin-3a-Induktion von P53 um eine chemisch erzeugte Stabilisierung handelt, wurde alternativ auch eine Aktivierung durch Bestrahlung durchgeführt, um eine physiologischere Stabilisierung von P53 zu erzeugen. Durch die Bestrahlung wird ein Prozess initiiert der in einer Inhibierung der Interaktion von P53 und MDM2 resultiert.

Durch die Bestrahlung werden unter anderem Doppelstrangbrüche der DNA erzeugt, welche erkannt werden können und eine Signalkaskade auslösen die zur Folge hat, dass P53 in der Zelle akkumuliert wird (Fei und El-Deiry, 2003; Lavin und Gueven, 2006). Im Anschluss wurden die Effekte auf Expressionsebene untersucht.

Ergebnisse

3.9.1 Nachweis der Induktion von P53 durch Bestrahlung auf Proteinebene

Die Induktion von P53, durch die Bestrahlung von 0,05 Gy bzw. 2 Gy und die daraus resultierende erhöhte P53-Proteinmenge im Kern sollte mittels Westernblotanalyse nachgewiesen werden. Für den Nachweis wurden sowohl aus SRS UPD11 als auch aus SRS UPD7 2 h nach der Bestrahlung die Proteine isoliert und nach Zytoplasma und Kern getrennt aufgereinigt (siehe 2.4.1). Zur Normalisierung wurde der Mittelwert von Lamin A/C verwendet (siehe Abb. 3-28). Nach der Bestrahlung mit 2 Gy ergab sich für beide Zellkulturen eine Erhöhung der P53-Proteinmenge auf das 1,5-Fache im Kern im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für SRS UPD11 konnte bei der Bestrahlung mit 0,05 Gy keine Erhöhung festgestellt werden (siehe Abb. 3-28 A u. B), wohingegen die Menge an P53 in SRS UPD7 um das 1,3-Fache höher lag als in der Kontrolle (siehe Abb. 3-28 C u. D).

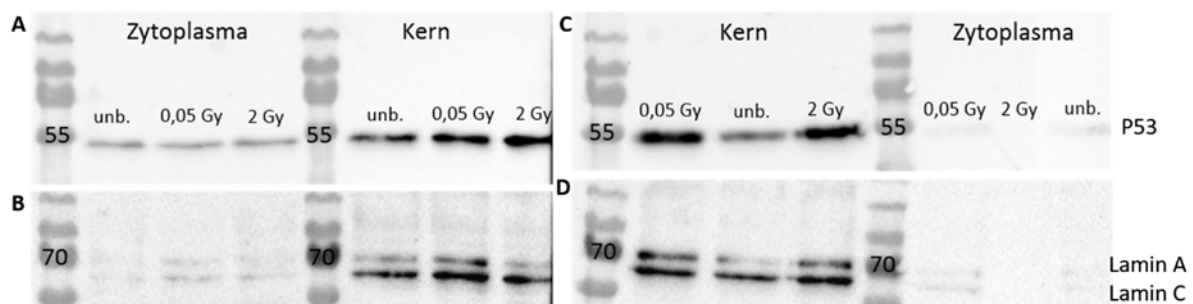


Abb. 3-28 Westernblot zum Nachweis der P53-Akkumulation nach Bestrahlung

Die Westernblot-Abbildung zeigt die P53 (53 kDa)-Akkumulation für SRS UPD11 (A) und SRS UPD7 (C) im Kern 2 h. nach der Bestrahlung mit 0,05 Gy bzw. 2 Gy, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Zytoplasma war keine Zunahme von P53 zu beobachten.

B u. D Als Kontrolle für die Kernfraktion wurde ein Antikörper gegen Lamin A/C verwendet. Bei der oberen Bande handelt es sich um Lamin A (69 kDa), bei der unteren um Lamin C (62 kDa).

3.10 Expressionsanalysen nach der Bestrahlung

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit 0,05 Gy bzw. 2 Gy bestrahlt. Eine bzw. zwei Stunden nach der Bestrahlung wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe 2.3.8) und die Expressionen mittels qRT-PCR ermittelt (siehe 2.3.12). Insgesamt wurden für jeden Zeitpunkt und jede Dosis drei, bzw. bei SRS UPD7 für die 2 h-Werte vier, verschiedene Proben analysiert und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Als Abgleich diente das geometrische Mittel der Haushaltsgene HPRT, PPIA und ATP5J. Anschließend wurde auf die Werte der unbehandelten Zellen normalisiert. Als Kontrolle für die hochdosierte Bestrahlung (2 Gy) sollte wie bei der

Ergebnisse

Nutlin-3a-Behandlung *P21* (*CDKN1A*) verwendet werden, da in verschiedenen Publikationen eine Steigerung der Expression von *CDKN1A* in Fibroblasten nach Bestrahlung beschrieben wurde (Ding *et al.*, 2005; Warters *et al.*, 2009).

Nach der niedrig dosierten Bestrahlung (0,05 Gy) konnte in keiner der beiden Zellkulturen eine Steigerung der *P21*-Expression festgestellt werden, im Mittel zeichnete sich für beide Zeitpunkte eine Reduktion der Transkriptmenge ab. Auch für 2 Gy konnte keine eindeutige Zunahme verzeichnet werden. Eine Stunde nach der Bestrahlung lagen die Werte für beide Zellkulturen im Mittel leicht reduziert vor. Nach zwei Stunden lag lediglich für SRS UPD11 im Mittel eine erhöhte Expression vor, wobei diese mit einer starken Schwankung einherging (siehe Abb. 3-29 A).

Als weitere Kontrolle für die Induktion von P53 wurde *MDM2* verwendet, welches bei der Akkumulierung von P53 über einen Feedbackloop aktiviert werden kann (Fischer, 2017). Bei *MDM2* wurde, ähnlich wie bei *P21*, eine starke Schwankung der Werte beobachtet. Im Mittel war jedoch bei den meisten Proben eine Erhöhung der Expression festzustellen (siehe Abb. 3-29 B)

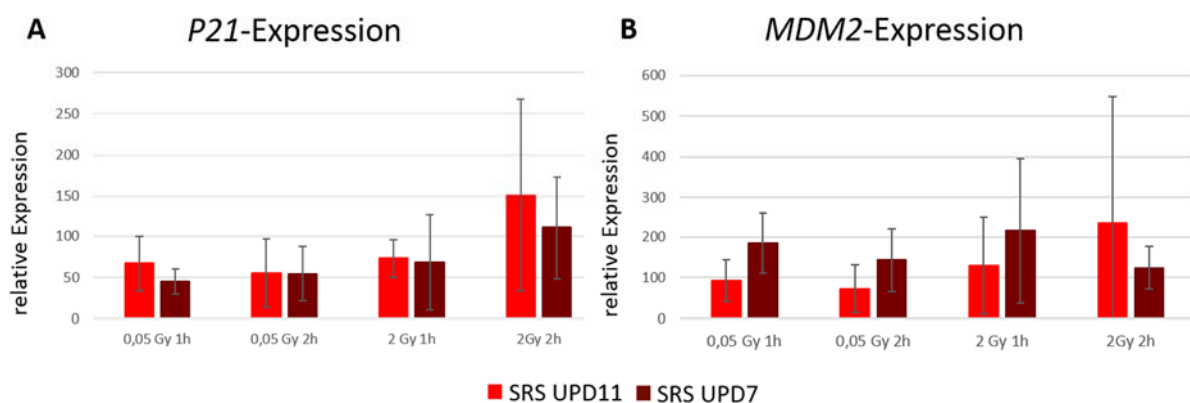


Abb. 3-29 P21- und MDM2-Expression nach Bestrahlung

A Nach der Bestrahlung mit 0,05 Gy konnte keine Steigerung der Expression von *P21* gezeigt werden. Nur für SRS UPD11 konnte zwei Stunden nach der Bestrahlung mit 2 Gy eine leichte Erhöhung festgestellt werden. **B** Nach der Bestrahlung mit 0,05 Gy (nicht bei SRS UPD11) bzw. 2 Gy konnte im Mittel eine Steigerung der Expression von *MDM2* gezeigt werden. Gleichzeitig war jedoch eine starke Schwankung zu verzeichnen. (n = 3)

H19 wies in allen Proben eine teilweise sehr signifikante Reduktion der Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle auf, welche in SRS UPD7 etwas deutlicher ausfiel (siehe Abb. 3-30 A). Für *IGF2* hingegen konnte keine signifikant veränderte Expression festgestellt werden. In SRS UPD11 zeigte sich jedoch eine Stunde nach der Bestrahlung mit 0,05 Gy und zwei Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy im Mittel eine leichte Erhöhung, während die Expression in SRS

Ergebnisse

UPD7 zu allen Zeitpunkten und Dosen kaum verändert war (siehe Abb. 3-30 B). Für die Expression von *CDKN1C* konnte kein einheitlicher Trend festgestellt werden. Während für SRS UPD7 die Proben 0,05 Gy 2 h. und 2 Gy 1 h. eine minimale Erhöhung aufwiesen, zeigten die SRS UPD11-Proben 0,05 Gy 2 h und 2 Gy 2 h eine leichte Reduktion (siehe Abb. 3-30 C). Somit konnte weder eine signifikante Veränderung, noch eine gleichbleibende Tendenz der *CDKN1C*-Expression festgestellt werden.

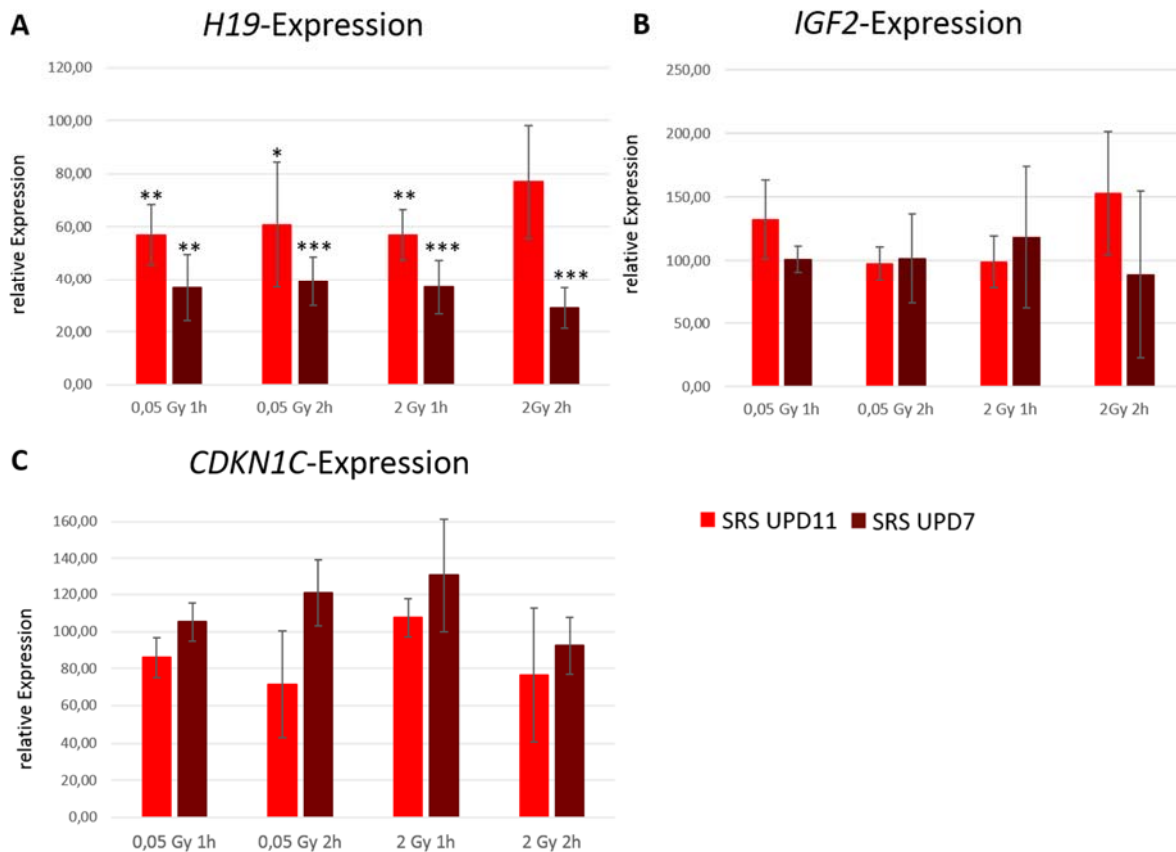


Abb. 3-30 H19-, IGF2- und CDKN1C-Expression nach Bestrahlung

A Nach der Bestrahlung konnte für beide Strahlendosen sowohl in SRS UPD11, als auch in SRS UPD7 eine zum Teil sehr signifikante Reduktion der Expression von *H19* gemessen werden. **B** Für *IGF2* konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle ermittelt werden. Teilweise war allerdings eine leichte Erhöhung der Expression zu erkennen. **C** Die Bestrahlung führte zu keiner eindeutigen bzw. signifikanten Veränderung der Expression von *CDKN1C*. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet. ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, $n = 3$)

Im Gegensatz zur Behandlung mit Nutlin-3a zeigte sich nach Bestrahlung keine deutliche Steigerung von *P21*. Für *MDM2* hingegen konnte nach der Bestrahlung mit 2 Gy eine erhöhte Expression festgestellt werden. Während für *IGF2* und *CDKN1C* keine expressionellen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auftraten, war die Expression von *H19* in allen untersuchten Proben deutlich reduziert.

4. Diskussion

4.1 Analyse von SRS- und BWS-Zellen mit unterschiedlicher molekularer Defekten

Die Imprintingkrankungen BWS und SRS sind teilweise mit gegensätzlichen (epi)genetischen Defekten auf Chromosom 11p15.5 assoziiert. Bei BWS weisen mindestens 70 -80 % der Patienten eine molekulare Ursache auf Chromosom 11 auf, wohingegen bei SRS nur in etwa 60 % der Fälle ein Defekt auf Chromosom 11 detektiert werden konnte. Zusätzlich ist bei ca. 10 % der SRS-Patienten eine maternale UPD des Chromosom 7 Ursache für die Ausprägung des Phänotyps. Für einen nicht unerheblichen Teil der Patienten, sowohl bei SRS (ca. 30%) als auch bei BWS (ca. 15 %), konnte allerdings bisher keine eindeutige molekulare Ursache identifiziert werden. Aufgrund der molekularen Komplexität ergibt sich eine große Herausforderung sowohl für die molekulare Diagnostik, als auch für die genetische Beratung von betroffenen Personen bzw. Familien (T. Eggermann *et al.*, 2016). Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen von SRS- bzw. BWS-Patienten sollten modellhaft dabei helfen die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Defekten zu verstehen und zu erkennen, ob zwischen Patienten eines Syndroms mit verschiedenen kausalen epigenetischen Defekten Gemeinsamkeiten oder Unterschieden beispielsweise auf Expressionsebene vorliegen. Für die Versuche standen vier verschiedene Zellkulturen mit unterschiedlichen epigenetischen Defekten zu Verfügung, deren molekulare Eigenschaften zu Beginn der Arbeit näher charakterisiert wurden.

4.1.1 Molekulare Charakterisierung der verwendeten Fibroblasten

Als Beispiel für SRS mit einem Defekt auf Chromosom 7 wurden Zellen mit einer maternalen UPD des Chromosoms 7 verwendet (SRS UPD7), für Defekte auf Chromosom 11 Zellen mit einer maternalen UPD des Chromosoms 11p15.5 (SRS UPD11). Eine maternale UPD des Chromosoms 11 kommt bei SRS-Patienten nur in einzelnen Fällen (<1%) und somit relativ selten vor, sie weist jedoch wie ein großer Teil der Fälle (≥ 38 %) eine Hypomethylierung der ICR1 und des *H19*-Promoters auf. Darüber hinaus sollte die UPD mit einer Hypermethylierung der ICR2 einhergehen. Demgegenüber liegt bei BWS-Patienten häufig eine Hypermethylierung

der ICR1 (ca. 10 %) oder eine Hypomethylierung der ICR2 (40-50 %) bzw. eine paternale UPD des Chromosoms 11 (ca. 20 %) vor, welche sowohl die ICR1 als auch die ICR2 betrifft (T. Eggermann *et al.*, 2016). Als Beispiel für BWS wurden daher Zellen (BWS UPD11) eines Patienten verwendet, bei dem eine paternale UPD für Chromosom 11p15.5 diagnostiziert worden war. Für initiale Untersuchungen der Patienten wurden Blutzellen analysiert. Da für die Arbeit Fibroblasten verwendet wurden, erfolgte für diese eine Überprüfung des Methylierungsstatus auf Chromosom 11p15.5 mittels Pyrosequenzierung. Bei der Überprüfung stellte sich heraus, dass die Methylierungsrate der BWS UPD11-Fibroblasten in der ICR1 bei etwa 50 % lag und diese sich somit kaum von denen der Kontrolle unterschieden. Daher konnte zumindest für die BWS UPD11-Fibroblasten die UPD auf Methylierungsebene nicht bestätigt werden (siehe 3.2). Dies könnte daran liegen, dass die UPD aufgrund eines mosaikalen Status nur in anderen Zellen und Geweben des Patienten ausgeprägt ist. Bei den SRS UPD11-Zellen zeigte sich zwar eine hoch signifikante Reduktion der Methylierung in der ICR1 und eine sehr signifikante Erhöhung der Methylierung in der ICR2 im Vergleich zur Kontrolle, mit 35 % bzw. 60 % war der Unterschied jedoch nicht besonders groß. Bei einer vollständigen UPD wären Werte nahe 0 % für die ICR1 bzw. 100 % für die ICR2 zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei um eine mosaikale Verteilung der epigenetischen Defekte handelt, und in verschiedenen Geweben unterschiedlich viele Zellen von der UPD betroffen sein können. Dabei ist es durchaus möglich, dass in bestimmten Geweben bzw. Zellen der Methylierungsstatus annähernd normal ist, während in anderen eine Hyper- oder Hypomethylierung einer entsprechenden Region vorliegt. Dies zeigten beispielsweise Alders und Kollegen bei einer Untersuchung von mehreren BWS-Patienten. In dieser Studie wiesen drei der untersuchten Patienten bei der Untersuchung von Blutzellen keine Auffälligkeiten der Methylierung auf, während im untersuchten Zungengewebe eine Hypomethylierung der ICR1 bzw. Hypermethylierung der ICR2 nachgewiesen wurde. Sowohl bei BWS als auch bei SRS kommen die UPD, aber auch andere epigenetischen Defekte häufig als Mosaik vor. Diese Resultate deuten auf eine postzygotische Entstehung des jeweiligen Defekts hin und können somit die differenzielle Verteilung in den verschiedenen Geweben erklären (Alders *et al.*, 2014). Die SRS UPD11-Fibroblasten setzen sich daher wahrscheinlich aus einem Gemisch von Zellen zusammen, welche zumindest teilweise keine UPD aufweisen.

Als weiteres Beispiel für BWS standen die Fibroblasten mit der maternalen Deletion auf Chromosom 11 (BWS $\Delta H19/ICR1$) zur Verfügung. Für BWS ist der molekulare Defekt in Form einer Deletion allerdings äußerst selten. Auf Methylierungsebene zeigte sich, wie erwartet, eine Hypermethylierung der ICR1 und keine Veränderung in der ICR2. Dieses Ergebnis zeigte, dass es sich bei dem noch vorhandenen Allel wahrscheinlich um das paternale handelt, da die Deletion das in der ICR1 unmethylierte maternale Allel betrifft. Da die ICR2 wie erwartet eine Methylierungsrate von 50 % aufweist ist hier nicht von einem Einfluss durch die Deletion auszugehen.

Bisher wurden in der Literatur nur sehr wenige Deletionen beschrieben, welche entweder die ICR1 oder die ICR2 betreffen und einen BWS-Phänotyp verursachen. Insgesamt sind nur 16 Deletionen (inkl. BWS $\Delta H19/ICR1$) bekannt, welche die ICR1 betreffen (Bachmann *et al.*, 2017; Baskin *et al.*, 2014; Beygo *et al.*, 2013; De Crescenzo *et al.*, 2011; Fryssira *et al.*, 2015) Zwei der publizierten Deletionen weisen einige Gemeinsamkeiten zu der in der vorliegenden Arbeit analysierten Deletion auf. Eine 137 Kb große Deletion wurde von Baskin und Kollegen (Baskin *et al.*, 2014) und eine 100 Kb große von Fryssira und Kollegen publiziert (Fryssira *et al.*, 2015). Die auffälligsten Gemeinsamkeiten liegen darin, dass bei beiden Deletionen neben der vollständigen ICR1 auch das *H19*-Gen betroffen ist. Im Unterschied zu der Deletion bei BWS $\Delta H19/ICR1$ sind jedoch sowohl die HUC-Enhancer, als auch alle distal gelegenen CS-Elemente von den Deletionen betroffen, während bei BWS $\Delta H19/ICR1$ die HUC-Enhancer gar nicht und die CS-Elemente nur teilweise betroffen (CS1 – CS7) sind (siehe Abb. 4-1). Interessanterweise hat der Patient, welcher in der Publikation von Fryssira beschrieben wurde, im Gegensatz zum BWS $\Delta H19/ICR1$ -Patienten bisher keine Tumore entwickelt (Erläuterung siehe Seite 125).

Weitere beschriebene Deletionen sind teilweise deutlich kleiner. Sie betreffen dadurch nur einen Teil der regulatorischen Elemente (Baskin *et al.*, 2014). Andere, noch kleinere, Deletionen betreffen meist nur Teile der ICR1 (zusammengefasst in De Crescenzo *et al.* 2011 und Beygo *et al.* 2013). Die Analyse der in dieser Arbeit untersuchten Deletion sollte dabei helfen, die regulatorischen Funktionen der Region besser verstehen und evtl. auch den Allelen zuordnen zu können. Außerdem bot sie in diesem Zusammenhang die Möglichkeit Zellen untersuchen zu können, welche keine *H19*-Expression aufweisen. Die durchgeführten qRT-PCR-Analysen zeigten wie erwartet keine Expression von *H19* in den BWS $\Delta H19/ICR1$ -Zellen, während die *IGF2*-Expression im Vergleich zu allen untersuchten Zellen sehr stark erhöht war.

Diskussion

Im Vergleich zu BWS UPD11 und SRS UPD7, welche in den Fibroblasten eine nahezu normale Methylierung der ICR1 aufwiesen, wurde eine Erhöhung um das 220- bzw. 240-Fache festgestellt. RNA Seq-Daten für BWS Δ H19/ICR1 aus unserer Arbeitsgruppe zeigten eine biallelische Expression von *IGF2* (Merz, 2015). Die starke Zunahme kommt somit wahrscheinlich unter anderem durch eine Reaktivierung des maternalen Allels und der damit einhergehenden biallelischen Expression des *IGF2*-Gens zustande. Es ist bekannt, dass die monallelische Expression neben der Methylierung der ICR1 auch abhängig von der paternalen Methylierung der DMR0 im *IGF2*-Promoter ist. Wie bei der ICR1 liegt im humanen Genom auch hier das paternale Allel methyliert vor. Daten von Murrell und Kollegen, welche mithilfe von SRS- und BWS-Patienten erhoben wurden, scheinen eine Korrelation der Methylierungsintensität zwischen der ICR1 und der DMR0 zu belegen. Sie konnten zeigen, dass in der DMR0 häufig die gleichen Methylierungsveränderungen wie in der ICR1 zu finden sind und postulierten daher eine Abhängigkeit der Methylierung der DMR0, welche mit dem Zustand der ICR1 korreliert (Murrell *et al.*, 2008).

Der von Fryssira und Kollegen beschriebene Deletionspatient wies neben dem methylierten paternalen Allel der ICR1 ebenfalls eine Zunahme der Methylierung in der DMR0 auf. Sie postulierten weiterhin eine transkriptionelle Aktivierung von *IGF2* auf dem maternalen Allel, welche allerdings experimentell (z.B. per qRT-PCR) nicht überprüft wurde (Fryssira *et al.*, 2015). Die erhöhte Expression bei BWS Δ H19/ICR1 könnte auch durch eine veränderte Interaktion des *IGF2*-Promoters mit den Enhancerelementen zustande kommen. Bereits im Jahr 2003 wurde in einer Publikation die Frage aufgeworfen, ob es neben den bis dahin publizierten weitere Enhancerelemente gibt, welche in der Region zwischen der ICR1 und *IGF2* lokalisiert sind und welchen Effekt sie auf *IGF2* ausüben (Arney, 2003). Da für das humane Genom nicht abschließend geklärt werden konnte, welche Enhancerelemente für die Expression von *IGF2* verantwortlich sind, haben Fryssira und Kollegen mittels *in silico*-Analysen bioinformatisch weitere putative Enhancerregionen identifiziert. Als Kandidaten wurden konservierte nicht codierende DNA-Regionen definiert. Diese sollten zwischen dem humanen und dem Genom von Nagern eine Übereinstimmung von mindestens 70 % aufweisen, eine Anreicherung der Histonmodifikationen H3K27ac und H3K4me1 zeigen und mit DNase I-hypersensitive Stellen, sowie Transkriptionsfaktorbindestellen assoziiert sein. Durch die Analysen konnten vier putative Kandidatenregionen ermittelt werden. Zwei dieser Regionen

(Region 2 und 3, ca. 26 und 10 Kb 3' von *H19* entfernt) sind von der Deletion des untersuchten Patienten betroffen (siehe Abb. 4-1). Die Region 2 umfasst unter anderem das Enhancerelement CS9, während innerhalb der Region 3 die Elemente CS3, CS4 und CS6 lokalisiert sind. Die Region 1 liegt etwa 85 Kb 3' entfernt von *H19*, während die Region 4 100 Kb von *H19* entfernt in Richtung *IGF2* zu finden ist (Fryssira *et al.*, 2015). Die Region 4 umfasst allerdings nicht die bereits bekannten HUC-Elemente (siehe Abb. 4-1). Die in dieser Arbeit untersuchte Deletion beinhaltet nur Region 3. Fryssira und Kollegen folgern aus ihren Ergebnissen, dass höchstwahrscheinlich die verbliebenen zwei Regionen (1 und 4) für die maternale Reaktivierung von *IGF2* verantwortlich sein müssen und stützen ihre These mit der in der Publikation von Baskin beschriebenen Deletion, welche allerdings zusätzlich auch die Region 1 umfasst (siehe Abb. 4-1). Die Aussage basiert jedoch nicht auf Expressionsanalysen, sondern hauptsächlich auf der Annahme, dass „die phänotypischen BWS-Merkmale auf eine Erhöhung des *IGF2*-Transkripts zurückzuführen sind“ (Fryssira *et al.*, 2015). Darüber hinaus wurden für den von Baskin beschriebenen Patient auch keine Methylierungsdaten veröffentlicht. Dennoch ist eine regulative Funktion für die Expression der Gene *IGF2* oder *H19* durch die verbliebenen putativen Enhancerelemente (Region 1 oder 4), welche aktivierend auf die Transkription wirkt nicht auszuschließen. In den BWS $\Delta H19/ICR1$ -Zellen konnte mittels der durchgeführten Expressionsanalysen eine sehr hohe *IGF2*-Expression festgestellt werden, ob dies bei den von Fryssira und Baskin untersuchten Patienten tatsächlich auch der Fall ist konnte aufgrund der fehlenden Expressionsdaten nicht abschließend geklärt werden. Es wäre auch möglich, dass bei den anderen beiden Patienten keine oder nur eine geringe Zunahme des *IGF2*-Transkripts zu verzeichnen ist. Möglicherweise sind auch die bei der BWS $\Delta H19/ICR1$ -Deletion verbliebenen Elemente (CS9, HUC1 und 2) auf dem maternalen Allel, welche bei dem von Fryssira beschriebenen Patienten fehlen (siehe Abb. 4-1), für die starke Aktivierung von *IGF2* verantwortlich und könnten durch eine veränderte chromosomale Struktur auf dem maternalen Allel Einfluss auf das Gen bzw. den Promoter nehmen. Eine erhöhte *IGF2*-Expression ist in verschiedenen Tumorarten wie beispielsweise in Kolorektal-, Lungen-, Blasen-, Ovarial-, Leber und Brustkarzinomen, sowie Wilms Tumoren vorzufinden (Baba *et al.*, 2010; Ogawa *et al.*, 1993; Rainier *et al.*, 1993). Insgesamt entwickeln 5-7 % der BWS-Patienten einen embryonalen Tumor (Eggermann, Netchine, *et al.*, 2015). Speziell die Entwicklung eines Wilms Tumors ist bei BWS-Patienten häufig zu beobachten. So wurden bei 24 % der Patienten

Diskussion

die eine erhöhte Methylierung im IC1 aufwiesen gleichzeitig ein Wilms Tumor diagnostiziert (Brioude *et al.*, 2018).

Dies könnte auch die (noch) nicht vorhandenen Tumore bei dem von Fryssira beschriebenen Patienten erklären, falls bei diesem tatsächlich keine besonders starke Steigerung von *IGF2* vorzufinden ist. Andererseits trifft dies nur auf einen Teil der Gewebe wie beispielweise Muskeln, Knochen oder Nieren zu, da es sich sowohl bei den HUC-Elementen als auch bei CS9 um mesodermale Enhancer handelt (Drewell *et al.*, 2002; Y.S. Yoon *et al.*, 2007). Außerdem entwickelte der BWS Δ H19/ICR1-Patient ein Hepatoblastom, welches endodermalen Ursprungs ist. Möglicherweise könnten hierbei die in der Publikation von Fryssira und Kollegen beschriebenen Regionen 1 und 4 eine Rolle spielen, falls bei diesen eine Funktion in endodermalen Geweben bestätigt werden kann. Letztendlich hängt es daher auch davon ab, welche Zellen bzw. welche Gewebe untersucht werden, da die Expression bzw. die Funktion der Enhancer gewebespezifisch sind. Aufschluss über die veränderten chromosomalen Strukturen auf Chromosom 11 in den BWS Δ H19/ICR1-Fibroblasten sowie darüber, welche Elemente für die starke Aktivierung von *IGF2* verantwortlich sind, könnten auch weitere Struktur- und Interaktionsanalysen wie 3C und T2C liefern, welche erste Hinweise für mögliche Interaktionen zwischen den Enhancerbereichen und den *IGF2*-Promotoren geben könnten.

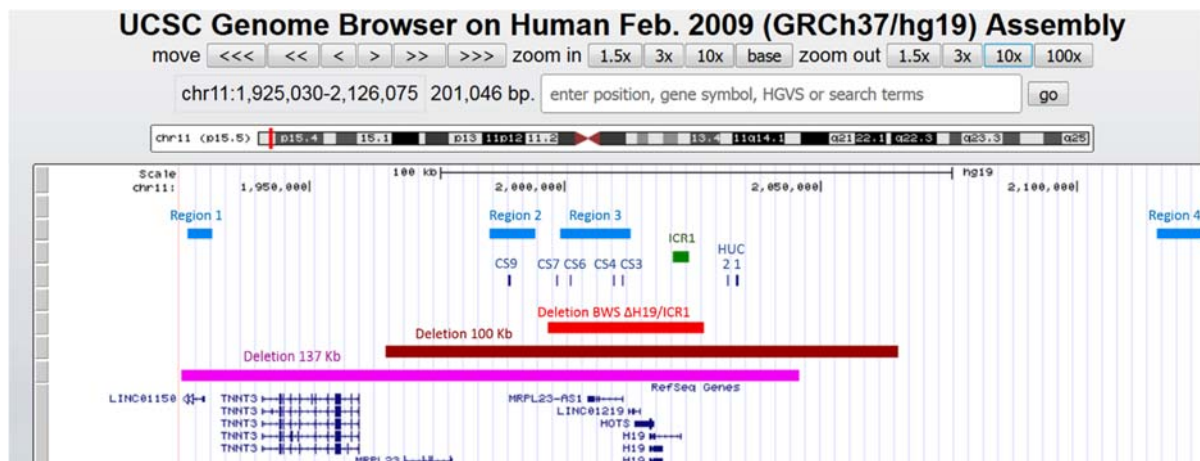


Abb. 4-1 Deletionen und Enhancerregionen auf Chromosom 11p15.5

Die Abb. zeigt die drei miteinander verglichenen maternalen Deletionen (BWS Δ H19/ICR1 = rot, Fryssira *et al.* 2015 = braun und Baskin *et al.* 2014 = pink), sowie die verschiedenen Enhancerelemente. Bei den Regionen 1 - 4 (hellblau) handelt es sich um die von Fryssira beschriebenen putativen Enhancerelemente (verändert nach Fryssira *et al.* 2015).

4.1.2 Vergleichende Expressionsanalysen der verwendeten Fibroblasten

Für die Expressionsanalysen wurde die mRNA der entsprechenden Zellen in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Für den Abgleich wurde, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, die Expression der Gene auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene *ACTB*, *ATP5J*, *HPRT* und *TBP* abgeglichen. Die weiteren untersuchten Gene wurden ausgewählt, da sie Bestandteil eines humanen IGN sein könnten, welches für die Maus bereits detailliert beschrieben wurde. In diesem Netzwerk findet eine gegenseitige Regulation der Gene untereinander auf verschiedenen Ebenen statt (Al Adhami *et al.*, 2015; Varrault *et al.*, 2006). Die in den Zellen unterschiedlichen genetischen und epigenetischen Defekte sollten dazu genutzt werden, um mögliche kausale Zusammenhänge der vorliegenden Genexpressionen und dem IGN herzustellen. Dabei sollte die Expression der Gene *IGF2* und *H19* bzw. *MEST* (für SRS UPD7) als Referenz für den jeweiligen epigenetischen Defekt dienen. Wie zu erwarten war, konnte bei BWS $\Delta H19/ICR1$ aufgrund des maternal deletierten *H19*-Gens keine Expression von *H19* gemessen werden. Für die anderen drei Zellkulturen stellte sich die *H19*-Expression auf niedrigem Niveau sehr schwankend dar. Insgesamt wurde im Mittel für BWS UPD11 die niedrigste Konzentration gemessen, während sie im Vergleich in SRS UPD11 und SRS UPD7 fast gleichhoch war und im Vergleich zu BWS UPD11 ca. 1,5-fach erhöht vorlag. Aufgrund der maternalen UPD11p15.5 wäre zumindest für SRS UPD11 eine deutlich höhere Expression als in den anderen Zellen vorstellbar gewesen. Da die Methylierung allerdings nur auf 30 % reduziert war, ist es möglich, dass dies nicht ausreicht um die *H19*-Expression vom paternalen Allel besonders stark zu reaktivieren oder die Reaktivierung aufgrund des mosaikalen Status nur in einem Teil der Zellen stattfindet. Die Expression von *IGF2* war, wie bereits in 4.1.1 beschrieben, in BWS $\Delta H19/ICR1$ im Vergleich zu den anderen drei Zellkulturen deutlich erhöht. Für die untersuchten Zellen von BWS UPD11, SRS UPD7 und SRS UPD11, welche für *H19* ein relativ ähnliches Expressionsniveau aufwiesen, konnten für *IGF2* signifikante Unterschiede festgestellt werden. Während sich die Expression von *IGF2* in BWS UPD11 und SRS UPD7 kaum unterschied, lag in SRS UPD11 im Vergleich dazu eine Reduktion auf etwa 20 % vor. Der Effekt der reduzierten Methylierung in der ICR1 in den SRS UPD11-Zellen scheint also auf *IGF2* einen größeren Einfluss zu haben als auf *H19*. Da mit den Methylierungsanalysen nur die Methylierung der ICR1 selbst untersucht wurde ist allerdings nicht sicher, dass die auch die Methylierung des *H19*-Promoters im gleichen Maße verändert

war. Eine weniger starke Reduzierung der Methylierung im *H19*-Promoter, als in der ICR1, könnte die schwächere Veränderung für *H19* erklären. Ein weiterer Faktor der im Kontext des IGN Einfluss auf die Expression von *IGF2* und *H19* nehmen könnte ist *PLAGL1*. Bei *PLAGL1* handelt es sich um einen Zinkfingertranskriptionsfaktor. In der Maus wurde eine Bindung von *Plagl1* an den *H19*-Promoter sowie zwei mesodermale Enhancerelemente von *H19* beschrieben. Die Enhancer zeigten durch die Bindung von *Plagl1* eine transaktivierende Wirkung auf *Igf2* und *H19* (Varrault *et al.*, 2006). Bei Untersuchungen mit humanem Plazentagewebe wurde ebenfalls eine Bindung an die humanen Enhancer von *H19* gezeigt. In diesen Zellen bestand ebenfalls eine starke Korrelation zwischen der Expression von *PLAGL1* sowie von *H19* und *IGF2* (Iglesias-Platas *et al.*, 2014). Dies könnte möglicherweise die leicht erhöhte *H19*-Expression in den SRS UPD7-Zellen erklären, da diese die höchste *PLAGL1*-Expression aufwiesen. Allerdings hatten sie gleichzeitig eine sehr niedrige *IGF2*-Expression. Für BWS Δ H19/ICR1 und BWS UPD11 hingegen würde die erhöhte *PLAGL1*-Expression zu der hohen *IGF2*-Expression passen. Die Daten lassen jedoch keinen Schluss über eine direkte Regulation von *PLAGL1* auf die Expression von *H19* und *IGF2* zu. *PLAGL1* könnte jedoch durch die Bindung an den *H19*-Promoter oder die Enhancerbereiche in einer untergeordneten Rolle einen feinregulierenden Einfluss auf die Gene *IGF2* und *H19* haben. Bei der regulativen Funktion von *PLAGL1* für *IGF2* und *H19* könnte es sich auch um einen gewebespezifischen Effekt handeln, da bisher die Bindung von *PLAGL1* nur an die endodermalen Enhancerbereiche CS3 und CS4 gezeigt wurde (Iglesias-Platas *et al.*, 2014). Somit hat eine Bindung an die Enhancerbereiche in den mesodermalen Fibroblasten evtl. keinen Effekt auf die Expression von *IGF2* und *H19*.

Für das IC2 wurden die Gene *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* und *CDKN1C* untersucht. In den verwendeten Fibroblasten konnte für *KCNQ1* keine Expression festgestellt werden. Dies war allerdings zu erwarten, da *KCNQ1* nur in bestimmten Geweben wie beispielsweise Herz, Schilddrüse, Magen oder den Epithelialzellen des Innenohrs aktiv ist und exprimiert wird (Neverisky und Abbott, 2015). *CDKN1C* wies trotz hoher Schwankungen bei den Proben von BWS Δ H19/ICR1 für BWS Δ H19/ICR1 die höchsten Werte auf (siehe Abb. 3-6). Beim Vergleich der übrigen drei Zellkulturen wies SRS UPD11 eine 1,5- bzw. 2,4-fach höhere *CDKN1C*-Expression als BWS UPD11 bzw. SRS UPD7 auf. Die leicht gesteigerte Transkriptmenge könnte mit der erhöhten Methylierung in der ICR2 korrelieren, da für die Expression von *CDKN1C* eine indirekte

Abhängigkeit von der Methylierung der ICR2 beschrieben wurde. Sowohl murine als auch humane Studien konnten belegen, dass eine Veränderung der Methylierung der ICR2 mit einer Beeinflussung der *CDKN1C*-Expression einhergeht. Verschiedenen Studien beschrieben nach einem maternalen Verlust der Methylierung, sowohl in der Maus als auch im Menschen, eine Reduktion der *CDKN1C*-Transkriptmenge (Fitzpatrick *et al.*, 2002; Horike *et al.*, 2000; Schwienbacher *et al.*, 2000). Dies ist wahrscheinlich auf einen repressiven Effekt durch die *KCNQ1OT1*-RNA zurückzuführen, welche bei einer Demethylierung aktiv transkribiert wird (Kanduri, 2011; Murakami *et al.*, 2007). Umgekehrt könnte somit die erhöhte Methylierung der ICR2 die gesteigerte *CDKN1C*-Expression in den SRS UPD11-Zellen erklären. Die im Vergleich zu BWS Δ H19/ICR1 und BWS UPD11 deutlich reduzierte *KCNQ1OT1*-Expression in SRS UPD11 scheint dies zu bestätigen. Auch die Expressionswerte von BWS UPD11 können die passende Tendenz belegen. Während *KCNQ1OT1* in den BWS-Zellen im Vergleich zu SRS UPD11 signifikant erhöht ist, weisen sie reziprok eine niedrigere *CDKN1C*-Expression im Vergleich zu SRS UPD11 auf. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise darauf, dass bei einigen BWS-Patienten eine reduzierte Methylierung der ICR2 mit einer verringerten *CDKN1C*-Expression assoziiert ist (Diaz-Meyer *et al.*, 2003). Wie in verschiedenen Studien dargestellt wurde, weisen BWS -Patienten zwar häufig eine reduzierte Methylierung in der ICR2 auf, diese geht jedoch relativ selten mit einer Tumorentwicklung einher (Bliok *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde jedoch bei verschiedenen Tumorarten wie dem Oesophagus- oder Kolorektalkarzinom ebenfalls ein Verlust der Methylierung in der ICR2 beschrieben (Nakano *et al.*, 2006; Soejima *et al.*, 2004). Während die reduzierte Methylierung bei den untersuchten Oesophagustumoren mit einer reduzierten *CDKN1C*-Expression assoziiert wurde (Soejima *et al.*, 2004), konnte bei der Analyse von Kolorektaltumoren keine Korrelation zwischen der Methylierung der ICR2 und der Expression von *CDKN1C* gezeigt werden (Nakano *et al.*, 2006). Allerdings ist unklar, weshalb bei BWS Δ H19/ICR1 eine 2,9-fach höhere *CDKN1C*-Expression als bei SRS UPD11 auftrat, obwohl bei BWS Δ H19/ICR1 im IC2 keine Methylierungsdefekte vorliegen, insbesondere da auch die Expression von *KCNQ1OT1* in Y.S 1,8-fach höher als in SRS UPD11 war und somit *CDKN1C* im direkten Vergleich eher reprimiert vorliegen sollte. Ebenso ist unklar, wie die differenziellen Expressionsniveaus der Zellen von BWS Δ H19/ICR1 und SRS UPD7, welche nicht von einem Methylierungsdefekt im IC2 betroffen sind, zustande kommen. So wies beispielsweise BWS Δ H19/ICR1 für beide Gene eine deutlich höhere Expressionsrate (2,5- bzw. 7-fach höher) als SRS UPD7 auf. Es ist durchaus möglich, dass die differenziellen

Diskussion

CDKN1C-Expressionen durch den Einfluss verschiedener Faktoren teilweise unabhängig von der Regulierung der ICR2 zustande kommen können. Die Aktivität des *CDKN1C*-Gens hängt unter anderem auch direkt von der Methylierung und den Histonmarkierungen des eigenen Promoters ab. So wurde beispielsweise für verschiedene humane Tumore eine Hypermethylierung des *CDKN1C*-Promoters beschrieben, welche mit einer Histondeacetylierung in diesem Bereich assoziiert ist und zu einer Stilllegung des Gens unabhängig von der ICR2 führt (Kikuchi *et al.*, 2002). Neben der Methylierung des Promoters scheinen aber auch die Histonmodifikationen und die daraus resultierenden Chromatinstrukturen einen entscheidenden Einfluss auf die Expression von *CDKN1C* haben zu können. In diesem Zusammenhang untersuchten Diaz und Kollegen mehrere BWS-Patienten, die zwar eine geringe *CDKN1C*-Transkription, aber eine normale ICR2-Methylierung aufwiesen. Laut den Ergebnissen war dies auf eine Erhöhung der Histonmodifikationen H3K9me2 und HP1 γ , sowie eine Reduktion von H3k4me2 im Bereich des *CDKN1C*-Promoters zurückzuführen (Diaz-Meyer *et al.*, 2005). Des Weiteren könnte die Regulation von *KCNQ1OT1/CDKN1C* teilweise durch das IGN beeinflusst sein, beispielsweise durch den Faktor PLAGL1. Arima und Kollegen konnten zeigen, dass *PLAGL1* und *CDKN1C* in der Maus in einigen Geweben ein korrelierendes Expressionsmuster aufwiesen. Darüber hinaus wurden bei Analysen des humanen Genoms sowohl im *CDKN1C*-Gen (2) als auch in der ICR2 (8) mehrere Bindestellen für PLAGL1 identifiziert. Mittels EMSA (electro mobility shift assay) konnte, zumindest *in vitro*, eine Bindung zwischen dem PLAGL1-Protein und der DNA-Sequenz der ICR2 nachgewiesen werden. Die Daten zeigten auch einen möglichen Zusammenhang zwischen einer *PLAGL1*-Überexpression und einer *CDKN1C*-Reduktion, ausgelöst durch eine *KCNQ1OT1*-Hyperaktivierung (Arima *et al.*, 2005). Die Bindung von PLAGL1 konnte zwar nur *in vitro* und darüber hinaus auch nur für die ICR2 gezeigt werden, jedoch schließen diese Daten seinen Einfluss von PLAGL1 auf die Expression von *CDKN1C* nicht aus. Zum einen scheint die indirekte Regulation von *CDKN1C* durch die Bindung von PLAGL1 an die ICR2 plausibel, zum anderen könnte es sich hierbei um gewebe- oder entwicklungspezifische Prozesse handeln. Damit einhergehend könnte daher auch ein direkter Effekt durch die Bindung an den *CDKN1C*-Promoter in bestimmten Geweben möglich sein. In diesem Kontext lieferten allerdings die Expressionsdaten von *PLAGL1*, wie schon zuvor die Daten von *KCNQ1OT1/CDKN1C*, nur für BWS UPD11 und SRS UPD11 die passenden Tendenzen. Ähnlich wie bei *KCNQ1OT1* lag in den BWS UPD11-Zellen die Expression von *PLAGL1* im Vergleich zu SRS UPD11 signifikant erhöht

vor. In den BWS Δ H19/ICR1-Zellen lag eine etwas höhere Expression als in BWS UPD11 vor. Die höchste Expression von *PLAGL1* wiesen jedoch die SRS UPD7-Zellen auf, welche zuvor sowohl für *KCNQ1OT1*, als auch für *CDKN1C* die niedrigsten Werte gezeigt hatten. Während in den BWS Δ H19/ICR1- und BWS UPD11-Zellen eine hohe *PLAGL1*-Expression mit einer hohen *KCNQ1OT1*-Expression einherging, scheint ein aktivierender Effekt von *PLAGL1* auf *KCNQ1OT1* zumindest in den SRS UPD7-Zellen nicht sehr wahrscheinlich.

Beispielhaft für die geprägten Gene auf Chromosom 7 wurden die Gene *MEST* und *GRB10* untersucht. Das Gen *MEST* (Mesoderm Specific Transcript) wird auch als *PEG1* (paternally expressed gene) bezeichnet, da es vom paternalen Allel exprimiert wird (Lefebvre *et al.*, 1997). Für die Expression von *MEST* waren große Unterschiede zwischen den beiden BWS- und den SRS-Zellkulturen zu erkennen. In SRS UPD7 lag die Transkriptmenge an der unteren Nachweisgrenze und auch in SRS UPD11 war sie äußerst gering. Dagegen lag sie in BWS Δ H19/ICR1 bzw. in BWS UPD11 im Vergleich zu SRS UPD7 1831-fach bzw. 2485-fach erhöht vor. Die in SRS UPD7 kaum vorhandene Expression lässt sich gut mit der in diesen Zellen vorliegenden maternalen UPD des Chromosoms 7 in Einklang bringen, da es sich bei *MEST* um ein paternal exprimiertes Gen handelt. Die parentale Expression ist auch bei *MEST* abhängig von einer differentiellen Methylierung. Die entsprechende DMR befindet sich direkt im *MEST*-Promoter. Während diese auf dem maternalen Allel methyliert vorliegt, ist das paternale Allel unmethyliert und das Gen kann monoallelisch transkribiert werden (Riesewijk *et al.*, 1997). Unerwarteterweise war auch in den SRS UPD11-Zellen die *MEST*-Expression sehr gering, obwohl hier kein Defekt auf Chromosom 7 vorliegt. Eine Möglichkeit wäre die Regulation über die RNA von *H19*, wobei in den BWS UPD11 Zellen die *H19*-Expression nur etwas geringer war als in den SRS UPD11-Zellen und somit auch dort *MEST* beeinflusst sein müsste. Eine weitere Option wäre ein Einfluss durch trans-Interaktionen der ICR1 mit dem *MEST*-Locus, welche jedoch in den SRS UPD11-Zellen nicht nachgewiesen werden konnten (Ausführliche Diskussion siehe 4.1.4). Durch Versuche an Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von *MEST* einen repressiven Effekt auf das Wachstum der Tiere hat (Ferguson-Smith *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurde schon länger eine Beteiligung des *MEST*-Gens an der Entstehung des SRS-Phänotyps diskutiert. Allerdings gibt es bisher kaum schlüssige Beweise, welche einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Regulation der geprägten Gene auf Chromosom 7 und der Entstehung von SRS zulassen (Hannula-Jouppi *et al.*, 2014), obwohl mindestens 10 %

der SRS-Fälle auf eine maternale UPD des Chromosom 7 zurückzuführen sind (Eggermann, De Nanclares, *et al.*, 2015). Eggermann und Kollegen untersuchten 2012 einen Patienten mit einer paternalen Deletion der *MEST*-Region auf Chromosom 7, welcher einige SRS-relevante Merkmale, ähnlich zu den matUPD7-Fällen, aufwies (Eggermann *et al.*, 2012). 2016 wurde ein zweiter Patient beschrieben, welcher ebenfalls eine paternale Deletion des *MEST*-Locus aufwies und ähnliche phänotypische Merkmale zeigte (Carrera *et al.*, 2016). Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung von *MEST* an der Entstehung des pathogenen Phänotyps sein. Die Autoren weisen allerdings auch darauf hin, dass bei den Patienten, welche von einer matUPD7 betroffen sind, deutlich schwächere Auswirkungen in der Wachstumsretardierung und in der Ausprägung der Körperasymmetrie zu finden sind als bei Patienten mit Defekten auf Chromosom 11 (Eggermann *et al.*, 2012). Analog dazu würde die hohe Expression von *MEST* in den BWS $\Delta H19/ICR1$ - und BWS UPD11-Zellen passen, allerdings scheint sich eine patUPD7 nicht auf die Entwicklung und das Wachstum auszuwirken (Hannula-Jouppi *et al.*, 2014) und darüber hinaus wurde bisher kein Zusammenhang zwischen *MEST* und BWS beschrieben. Die beiden BWS-Zellkulturen wiesen zudem eine erhöhte *MEST*-Expression im Vergleich zu SRS UPD11, obwohl sie keinen Defekt auf Chromosom 7 haben, während reziprok dazu die SRS UPD11-Zellen eine reduzierte Expression relativ ähnlich zu SRS UPD7 zeigten. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre eine Regulation durch Faktoren des IGN. Ein mögliches Regulationselement für *MEST*, welches bereits als trans-Faktor des IGN beschrieben wurde, könnte beispielsweise *H19* sein (Gabory *et al.*, 2009). In murinen embryonalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass *H19* durch die Interaktion mit dem Protein MBD1 Einfluss auf die Regulation einiger Gene des IGN nimmt. Der Komplex aus MBD1 und *H19* rekrutiert dabei die H3K9-Histonmethyltransferase zu den DMRs der entsprechenden Gene. Durch die tri-Methylierung von H3K9 wird Expression der betroffenen Gene repressiv moduliert. Insgesamt konnten mit *Igf2*, *Slc38a4*, *Dcn*, *Dlk1*, *Peg1* (*Mest*), und *Gtl2* fünf Gene identifiziert werden, die abhängig von *H19* und MBD1 reprimiert werden können (Monnier *et al.*, 2013). *H19* interagiert allerdings nicht nur mit MBD1, sondern auch mit anderen Histonmodifizierenden Proteinen wie beispielsweise EZH2. EZH2 ist ebenfalls eine Histonmethyltransferase, die im Komplex mit *H19* und weiteren Proteinen die tri-Methylierung von H3k27 katalysieren kann, welche wie H3K9me3 auch mit einem repressiven Chromatinstatus assoziiert ist (M. Luo *et al.*, 2013). Diese Mechanismen sind auch in den untersuchten Fibroblasten denkbar. Die nicht vorhandenen Expression von *H19* in den BWS $\Delta H19/ICR1$ -Zellen, bei gleichzeitig erhöhter

MEST-Expression und die reduzierte Expression von *MEST* in den SRS UPD11-Zellen sprechen für diese These (siehe Abb. 3-5 A und Abb. 3-7 A u. B). Die Expressionsdaten für die BWS UPD11-Zellen können dies allerdings nicht bestätigen, da diese nur eine geringfügig niedrigere *H19*-Expression wie die SRS UPD11-Zellen aufweisen, aber dennoch eine erhöhte *MEST*-Expression zeigten. Eine weitere Möglichkeit der Regulation, auch im Zusammenhang mit dem IGN, könnte die ICR1 selbst bieten, welche abhängig von ihrer Methylierung verschiedene transchromosomale Strukturen bilden und somit die Aktivität von anderen geprägten Genen, wie beispielweise *MEST*, beeinflussen könnte. In den SRS UPD11-Fibroblasten konnte jedoch keine Interaktion zwischen der ICR1 und geprägten Regionen auf Chromosom 7 festgestellt werden (siehe 3.5.1). Auf dieses Thema wird in Kapitel 4.1.4 noch näher eingegangen. Daher bleibt offen, welche Faktoren auf Chromosom 11 für die veränderte *MEST*-Expression verantwortlich sind. Da aber beide SRS-Zellkulturen eine Reduktion von *MEST* aufwiesen, ist eine Beteiligung von *MEST* an der Entwicklung des SRS-Phänotyps durchaus denkbar.

Ein weiteres geprägtes Gen auf Chromosom 7, welches mit der Ätiologie von SRS in Zusammenhang gebracht wurde, ist *GRB10*. *GRB10* befindet sich, im Gegensatz zu *MEST* und vielen weiteren geprägten Genen, auf dem p-Arm des Chromosoms 7. In den Focus gerückt ist es, da unabhängig voneinander in zwei Studien SRS-Patienten untersucht wurden, welche eine maternale Duplikation der Region 7p11.2-p13 ohne weitere Defekte auf Chromosom 7 aufwiesen. In diesem Bereich konnte *GRB10* als einziges geprägtes Gen identifiziert werden (Joyce *et al.*, 1999; Monk *et al.*, 2000). Aufgrund seiner Funktion als Wachstumsinhibitor passte dies gut ins Bild (Hitchins *et al.*, 2002). Auch die in der Maus festgestellte maternale Expression des *GRB10*-Gens schien diese Theorie zu stützen (Miyoshi *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, dass die monoallelische Expression im Menschen stark gewebe- und isoformabhängig ist. Während im fetalem Gehirn sowohl eine biallelische, als auch eine paternal exprimierte Isoform detektiert werden konnten, zeigte sich in den Skelettmuskeln eine maternale Expression. Sowohl die biallelische Expression in den meisten fetalen Geweben, als auch die sehr geringe Anzahl gefundener Mutationen im *GRB10*-Gen in den untersuchten SRS-Kohorten sprechen gegen eine wichtige Rolle für die Ätiologie von SRS (Blagitko *et al.*, 2000; Hitchins *et al.*, 2002). Auch die Expressionsdaten von *GRB10* konnten keine Korrelation zu BWS oder SRS liefern. Während die Expression in BWS Δ H19/ICR1 und BWS UPD11 relativ ähnlich war, wies sie in SRS UPD11 die höchsten und in SRS UPD7 die

niedrigsten Werte auf, des Weiteren lag auch eine starke Streuung der einzelnen Werte vor und die Unterschiede zwischen den Zellkulturen waren nicht signifikant (siehe Abb. 3-7 C).

Neben *PLAGL1* wurde mit *IGF2R* ein weiteres geprägtes Gen von Chromosom 6 untersucht. Für *IGF2R* ergaben sich fast identische Transkriptmengen in den BWS Δ H19/ICR1- und BWS UPD11-Zellen. SRS UPD11 wies dem gegenüber eine leichte Erhöhung (1,4-fach) und SRS UPD7 eine Reduktion ca. um das 0,7-Fache auf (siehe Abb. 3-7 E). *IGF2R* ist für die Degradierung von IGF2 verantwortlich und spielt eine Schlüsselrolle im Entwicklungsprozess der Säugetiere (O'Dell und Day, 1998). Im IGF-System gibt es neben *IGF2R* mit *IGF1R* einen weiteren Rezeptor. Während *IGF1R* hauptsächlich für Signaltransduktionsprozesse verantwortlich ist, handelt es sich bei *IGF2R* um einen kationenunabhängigen Manose-6-Phosphat-Rezeptor, welcher für die Kontrolle der extrazellulären Konzentration von IGF2 verantwortlich ist. Er sorgt für die Endocytose von IGF2 und initiiert den Abbau in den Lysosomen (Gicquel und Le Bouc, 2006). *IGF2R* weist zwei DMRs auf, welche für die elterliche Prägung verantwortlich sind. Während die DMR2 nur in einer gewissen Anzahl an Spezies und auch nicht im humanen Genom mit der elterlichen Prägung korreliert wurde, scheint die DMR1 relativ gut konserviert und mit einem geprägten Zustand assoziiert zu sein (Vu *et al.*, 2006). In der Maus liegt in den meisten fetalen Geweben und Entwicklungsstadien eine elterliche Prägung vor. Im humanen Genom findet allerdings nur in der frühen Entwicklungsphase eine maternale Expression des Gens statt. RNA-Seq-Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in den SRS UPD11-, SRS UPD7- und BWS Δ H19/ICR1-Fibroblasten eine biallelische Expression von *IGF2R* vorliegt (unveröffentlichte Daten). Dies ist wahrscheinlich auch für die nicht untersuchten BWS UPD11-Zellen der Fall. *IGF2R* ist zwar als Gen des IGN beschrieben worden (Varrault *et al.*, 2006), allerdings scheinen die unterschiedlichen epigenetischen Defekt der untersuchten SRS- und BWS-Zellen keinen Einfluss auf die Expression von *IGF2R* zu haben.

4.1.3 Regulative Effekte von Kaiso auf die ICR1

Die Funktion der ICR1 hängt maßgeblich von der Methylierung und der damit einhergehenden parental differentiellen Bindung von CTCF ab. Deshalb ist es essentiell den differentiell methylierten Status zu erhalten. Bei vielen ICRs wie beispielweise der ICR2 wird die Methylierung durch den Komplex aus ZFP57 und KAP1 aufrechterhalten (Quenneville *et al.*, 2011). Auch in der ICR1 konnte die Bindung von ZFP57 nachgewiesen werden (X. Li *et al.*,

2008). Insgesamt gibt es zwölf Bindestellen für ZFP57 in der ICR1. Sparago und Kollegen verglichen SRS-Patienten, welche eine paternale Deletion von Bereichen der ICR1 aufwiesen. Aus ihren Erkenntnissen stellten sie die Hypothese auf, dass paternale Deletionen, welche einen Teil der ZFP57-Bindestellen betreffen, zu einer Hypomethylierung und einem SRS-Phänotyp führen können. In der Untersuchung wurde allerdings auch eine paternale Deletion vorgestellt, welche zwei ZFP57-Bindestellen betraf und nicht mit einer Hypomethylierung oder einem SRS-Phänotyp assoziiert war (Sparago *et al.*, 2018). Die Annahme, dass ZFP57 in die Methylierung und die Ausprägung des SRS-Phänotyps involviert ist basiert daher bisher nur auf Indizien. Einige andere Daten widersprechen diesen. So konnte in der Maus bisher kein Effekt von ZFP57 auf die Methylierung der ICR1 gezeigt werden (X. Li *et al.*, 2008) und auch für das humane Genom gibt es hierfür bisher keine Hinweise. Bekannterweise führen ZFP57-Mutationen in anderen ICRs zu einer Hypomethylierung. Aus diesem Grund untersuchten Spengler und Kollegen 30 SRS-Patienten, welche eine Hypomethylierung in der ICR1 aufwiesen, auf ZFP57-Mutationen. Diese Studie lieferte jedoch keinen Hinweis auf eine Funktion von ZFP57 für die Methylierung der ICR1 (Spengler *et al.*, 2009). Insgesamt gibt es somit bisher keinen eindeutigen Beleg für eine Funktion von ZFP57 für die Methylierungserhaltung in der ICR1. Ein weiteres Protein, welches in der ICR1 binden kann, ist das Zinkfingerprotein Kaiso. Kaiso kann sowohl an eine methylierte Bindesequenz (CGCG), als auch an ein unmethyliertes Bindemotiv (KBS, TNGCAGGA) binden. In der ICR1 liegen mehrere methylierte Bindestellen auf dem paternalen Allel vor und jeweils eine unmethylierte KBS im B4-Repeat auf beiden parental Allelen (siehe Abb. 3-8). Die Bindung an diese Motive konnte mittels CHIP und EMSA bestätigt werden (Langer, 2012). Ein lentiviral basierter shRNA-Knockdown von Kaiso resultierte in einer reduzierten *H19*- und *IGF2*-Expression und gab somit erste Hinweise auf eine funktionelle Relevanz von Kaiso für die transkriptionelle Regulation der beiden Gene (Bohne, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob Kaiso einen Einfluss auf die Methylierung der ICR1 hat und so die Expressionsveränderungen auslösen kann. Die Analysen zeigten, dass die Reduktion von Kaiso mit einer reduzierten Methylierung in der ICR1 einherging (siehe 3.4.1). Der Methylierungsverlust könnte jedoch auch auf einen indirekten Effekt von Kaiso zurückzuführen sein. Daher wurde gezielt die Funktion von Kaiso auf die Methylierung durch seine Bindung an die KBS im B4-Repeat untersucht. Mit Hilfe eines CRISPR/CAS9-Konstrukts wurde die KBS im B4-Repeat deletiert, um so die Bindung des Kaiso-Proteins zu unterbinden. Die Deletion der Bindestelle führte wie die

Diskussion

Reduktion von Kaiso durch den Knockdown ebenfalls zu einem Verlust der Methylierung in der ICR1 (siehe 3.4.2). Darüber hinaus führte sie auch zu einer verringerten Expression der Gene *H19* und *IGF2* (siehe 3.4.3). Die Versuche zeigten somit, dass Kaiso für den Methylierungserhalt der ICR1 eine wichtige Rolle spielt und auch die Expression der Gene *H19* und *IGF2* direkt durch eine Bindung an das B4-Repeat beeinflusst. Allerdings konnte kein vollständiger Methylierungsverlust nach der Deletion verzeichnet werden. Dies liegt wahrscheinlich an einer unvollständigen Editierung durch das CRISPR/CAS9-Konstrukt, da nur ein Teil der nach der Sortierung untersuchten Zellen tatsächlich eine Deletion der KBS aufwies. Des Weiteren kann die Editierung auf beiden Allelen stattfinden und eine Deletion auf dem bereits unmethyliert vorliegendem maternalen Allel hat möglicherweise keinen Effekt auf die Methylierung des paternalen Allels. Insgesamt kann aber von einer spezifischen Funktion für die ICR1 ausgegangen werden, da weder nach dem Knockdown noch nach der Editierung eine Veränderung der Methylierung in der nahe gelegenen ICR2 beobachtet wurde. In der Literatur gibt es allerdings auch Hinweise für weitere Loci, bei denen ein Einfluss durch Kaiso auf die Methylierung beobachtet werden konnte. Beispielsweise konnte im humanen Rb-Locus gezeigt werden, dass eine Methylierung der im Promoter vorliegenden CTCF-Bindestelle statt einer CTCF-Bindung zu einer Kaiso-Bindung an die methylierten CGCG-Motive führt. Die Kaiso-Bindung in diesem Bereich geht mit der Initiierung eines epigenetischen repressiven Status für den Rb-Promoter einher, welcher beispielsweise durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen ausgelöst wird (De La Rosa-Velazquez *et al.*, 2007). Allerdings hat sowohl der Kaiso-Knockdown als auch die Bindestellendeletion der KBS im B4-Repeat zu einer reduzierten *H19*- und *IGF2*-Expression geführt. Die Expressionsdaten von *H19* und *IGF2* sprechen bei beiden Genen für eine aktivierende Funktion von Kaiso. Möglicherweise werden durch die Bindung an methylierte CGCG-Motive oder die KBS unterschiedliche Effekte ausgelöst. Wobei die Reduktion des *IGF2*-Transkripts auch auf die reduzierte Methylierung der ICR1 zurückzuführen sein kann. Da durch die Demethylierung CTCF an die ICR1 binden kann und den Zugang der Enhancer zu *IGF2* negativ beeinflusst. Die Veränderung von *H19* kann jedoch nicht mit der veränderten Methylierung erklärt werden, hier wäre aufgrund des Methylierungsverlusts eher eine erhöhte Expression zu erwarten gewesen. Allerdings gibt es auch eine Publikation, in welcher Kaiso mit einer verstärkten Histonacetylierung und aktiv transkribierten Promotoren assoziiert wurde (Blattler *et al.*, 2013). Dies könnte für *H19* auf dem maternalen Allel der Fall sein, während der Effekt auf dem paternalen Allel durch die

Methylierung des *H19*-Promoters blockiert wird. Dazu passt auch, dass CTCF in vielen genomischen Regionen in die Rekrutierung von Kaiso involviert ist (Blattler *et al.*, 2013). Somit könnte CTCF auf dem maternalen Allel die aktivierende Wirkung von Kaiso auf *H19*, durch die Bindung an die KBS im B4-Repeat, unterstützen. Kaiso könnte also auf den beiden parental Allelen zwei unterschiedliche Funktionen erfüllen. Während es auf dem maternalen Allel die Expression von *H19* aktiviert, ist es auf dem paternalen Allel für den Erhalt der ICR1-Methylierung und der damit einhergehenden Inhibierung der CTCF-Bindung und der daraus resultierenden Aktivierung der *IGF2*-Expression verantwortlich. In diesen Kontext passt auch, dass bei der Entwicklung von verschiedenen Tumoren *H19* und Kaiso eine wichtige Rolle spielen. So korreliert die Hochregulation der *H19*-Expression in verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise bei Kolorektalkarzinomen, mit deren Wachstum und Metastasierungspotential (Matouk *et al.*, 2007; Matouk *et al.*, 2014). Für Kaiso konnte eine Erhöhung der Expression in Kolorektalkarzinomen festgestellt werden (Prokhortchouk *et al.*, 2006). Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang zwischen Kaiso und *H19*. Bei Versuchen mit APC^{Min/+}-Mäusen, welche besonders anfällig für die Entwicklung eines intestinalen Tumors sind, wurde festgestellt, dass eine Deletion von Kaiso zu einer deutlich verzögerten Tumorentwicklung führt (Prokhortchouk *et al.*, 2006). Dies könnte womöglich über eine mit der Kaiso-Deletion einhergehende Reduktion der *H19*-Expression zusammenhängen. Darüber hinaus ist eine erhöhte *IGF2*-Expression prädisponierend für die Entstehung von Tumoren wie Nakagawa und Kollegen in Kolon-Zellen zeigen konnten (Nakagawa *et al.*, 2001). Somit könnte auch die durch die Kaiso-Reduktion verringerte Methylierung und die dadurch verringerte *IGF2*-Expression ebenfalls zur Verzögerung der Tumorentwicklung beitragen. Wenn dem so wäre müssten die untersuchten APC^{Min/+}-Mäusen gleichfalls eine reduzierte Methylierung der ICR1, sowie eine verminderte *Igf2*- und *H19*-Expression aufweisen. In diesem Fall würde Kaiso ein vielversprechendes Ziel für eine Behandlung bei genetischen Defekten bzw. Erkrankungen mit einer erhöhten Expression von *IGF2* oder *H19* bieten.

4.1.4 Interaktionsanalysen der ICR1

Für die regulativen Interaktionen der geprägten Gene untereinander können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Zum einen gibt es den Einfluss der trans-Faktoren wie *H19* und *PLAGL1* oder möglicherweise auch *KCNQ1OT1*, zum anderen sind direkte chromosomale Interaktionen zwischen gemeinsam regulierten Regionen möglich. Im Menschen sind

abhängig von der Methylierung der ICR1 parental unterschiedliche Chromatinfaltungen in cis bekannt und relativ gut untersucht, welche beispielsweise für die Interaktion der Enhancer mit den Genen *IGF2* und *H19* sorgen. Die chromosomalen Faltungen werden hauptsächlich durch die Bindung von CTCF und Cohesinen initiiert (Nativio *et al.*, 2009). Viele Studien konnten belegen, dass die Bindung von CTCF sowohl mit dem Vorhandensein von inter- als auch transchromosomalen Interaktionen korreliert (Botta *et al.*, 2010). In einem Review über die verschiedenen Funktionen von CTCF, wurde das Protein als eine Art „Meister Weber des Genoms“, welcher für viele inter- und intrachromosomale Schleifenbildungen verantwortlich ist beschrieben (Phillips und Corces, 2009). Die über CTCF vermittelten intrachromosomalen Interaktionen sind in einigen genetischen Regionen wie beispielsweise der ICR1 (siehe Kap. 1) bereits gut dokumentiert. Viele gerade auch neuere Daten deuten darauf hin, dass CTCF auch bei der Bildung von Interaktionen über eine größere Reichweite eine wichtige Rolle spielt (Phillips und Corces, 2009). Dabei gibt es zwei Möglichkeiten wie die Interaktionen gebildet werden. Entweder es besteht eine direkte Verbindung über CTCF-Dimere oder sie werden über einen Komplex aus CTCF und Cohesin aufgebaut. Die Relevanz des Zusammenspiels von CTCF und Cohesin zeigt sich auch durch die häufige Überlappung der beiden Bindemotive im gesamten Genom in einer Vielzahl von Zelltypen, so sind 65-90 % der Cohesinbindestellen mit CTCF-Bindestellen und 55-80 % der CTCF-Bindestellen mit Cohesin-Bindestellen assoziiert (Parelho *et al.*, 2008; Wendt *et al.*, 2008). Wie einige Gruppen herausfanden wird die Bindung von Cohesin an die DNA häufig durch CTCF initiiert. Darüber hinaus konnte in vielen Fällen auch eine Relevanz für die Regulation verschiedener Gene durch die Interaktionen belegt werden (Phillips und Corces, 2009).

In einigen Organismen wie Maus und Schwein sind Interaktionen zwischen der ICR1 und verschiedenen Chromosomen in trans und dabei unter anderem auch mit anderen geprägten Regionen beschrieben worden (Ausführliche Diskussion siehe Seite 139) (Lahbib-Mansais *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2006; Z. Zhao *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe von Zhao und Kollegen geht sogar von einem ICR1-abhängigen chromosomalen Netzwerk in der Maus aus (Z. Zhao *et al.*, 2006). Aufgrund der großen Homologien zwischen dem humanen und dem murinen Genom gerade im Bereich der ICR1 und der Funktion von CTCF sind funktionelle trans-Interaktionen der ICR1 im humanen Genom durchaus denkbar.

Die potentiellen Interaktionen in den Fibroblasten sollten mittels der durchgeführten 4C-Analysen untersucht werden, welche wie in Kap. 2.6 beschrieben durchgeführt wurden. Im Zuge der Auswertungen konnten diverse Regionen auf verschiedenen Chromosomen, welche sich in räumlicher Nähe zur ICR1 befunden haben, identifiziert werden.

Die in durch die NGS-Auswertung am häufigsten gefundenen DNA-Sequenzen konnten dem Gen *FBXL17* zugeordnet werden. Dieses Gen liegt auf Chromosom 4 und scheint sich somit in den Fibroblasten im räumlicher Nähe zur ICR1 befunden zu haben. Die Interaktion konnte auf einen Bereich im 1. Intron des Gens begrenzt werden. Da diese Sequenzen in mehreren Proben und in zwei verschiedenen Zellkulturen gefunden wurden (siehe 3.5.1) scheint es sich nicht um ein zufälliges Phänomen zu handeln. Ein Nachweis über die tatsächliche Verbindung konnte mit verschiedenen Versuchen erbracht werden. Mit Primerpaaren, welche in der Sequenz des Viewpoints bzw. der interagierenden Region lokalisiert waren wurde eine PCR durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert und konnten die Verbindung auf DNA-Ebene zwischen den beiden unterschiedlichen genomischen Regionen bestätigen. In der Arbeit von Brandt wurden weitere räumlich benachbarte Regionen auf unterschiedlichen Chromosomen bestätigt (Brandt, 2013). Diese Ergebnisse zeigten somit eindeutig, dass mögliche chromosomale Interaktionen mithilfe der durchgeführten 4C-Analysen identifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin untersucht, ob auch zwischen der ICR1 und geprägten Genen bzw. geprägten Regionen Interaktionen bestehen können. Als Basis für potentielle Ziele wurden die DMRs, welche von Court und Kollegen publiziert wurden, untersucht (Court *et al.*, 2014), da die ICRs häufig mit einer CTCF-Bindung einhergehen, über welche eine Interaktion aufgebaut werden könnte. Über die Sequenzanalysen der 4C-Ergebnisse konnten allerdings zu keiner der 36 untersuchten DMRs bzw. den zugehörigen geprägten Genen in unmittelbarer Nähe eine erhöhte Anzahl an Reads, welche ein Indiz für eine räumliche Nähe der Regionen zur ICR1 wären, nachgewiesen werden. Selbst auf Chromosom 11 konnte keine Verbindung zu den DMRs von *IGF2* nachgewiesen werden, obwohl bekannt ist, dass dort cis-Interaktionen mit der ICR1 vorkommen können, wie Kurukuti und Kollegen in der Maus gezeigt haben (Kurukuti *et al.*, 2006). Die Unterschiede zu den aus der Maus veröffentlichten trans-Interaktions-Daten können viele Gründe haben und auch in den beiden beschriebenen Maus-Studien wurden unterschiedliche Interaktionen identifiziert. Ling und Kollegen haben für die

Diskussion

Identifikation der Interaktionsregionen in murinen Fibroblasten des Knochenmarks eine 3C-Analyse durchgeführt und über diese eine Interaktion der ICR1 mit der geprägten Region *Wsb1/Nf1* zeigen können, welche mittels Fish verifiziert wurde (Ling *et al.*, 2006). In der Arbeit von Zhao und Kollegen hingegen wurden mittels 4C-Analysen 114 Interaktionen mit der ICR1 in murinen neonatalen Leberzellen identifiziert, welche über 3C- und Fish-Experimenten bestätigt werden konnten. Insgesamt wurden dabei auch neun trans-Interaktionen mit geprägten Region gezeigt. Die von Ling publizierten Interaktionen konnten hierbei jedoch nicht bestätigt werden (Z. Zhao *et al.*, 2006). Die Unterschiede können zum einen experimenteller Natur sein, wie beispielsweise die Verwendung von verschiedenen Restriktionsenzymen bei der 3C/4C oder differenziellen PCR-Bedingungen. Zum anderen sind die Interaktionen möglicherweise gewebespezifisch und es gibt daher generelle Unterschiede aufgrund der verwendeten Zellen. In der Arbeit von Ling wurden murine Fibroblasten des Knochenmarks verwendet, während bei Zhao murine neonatale Leberzellen verwendet wurden. Aufgrund der Funktion und der damit zum Teil erhöhten Expression von vielen geprägten Genen während der Embryonalentwicklung, wäre es auch möglich, dass in den neonatalen Zellen mehr Interaktionen zwischen geprägten Genen stattfinden als in adulten Geweben. Allerdings bleibt festzuhalten, dass in den humanen Fibroblasten keine räumliche Nähe zu geprägten Genen mittels der 4C-Analyse gefunden wurden.

Auch auf Chromosom 11 konnten keine Interaktionen zu anderen geprägten Regionen oder DMRs, wie beispielsweise zu den Regionen von *IGF2* oder *KCNQ1*, gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde zur zusätzlichen Analyse der Region auf Chromosom 11 auf T2C-Daten von HB2-Zellen zurückgegriffen die von einer Kooperationsarbeitsgruppe generiert wurden (Kolovos *et al.*, 2014) (siehe 3.5.2). Diese Methode dient der Untersuchung von möglichen cis-Interaktionen einer bestimmten Region und soll dabei alle räumlich benachbarten Regionen des gewünschten Bereichs sichtbar machen. Sie funktioniert zwar vom Ansatz ähnlich wie eine 3C bietet jedoch den Vorteil, dass alle Interaktionen parallel dargestellt werden können und nicht nur die eines vorher definierten Viewpoints analysiert werden können. Zusätzlich kann über diese Methode auch eine höhere Auflösung der gewählten Region erreicht werden. Durch weniger Zyklen bei der PCR sollten Effekte die auf unterschiedliche PCR-Effizienzen zurückzuführen sind deutlich reduziert werden. Durch das verwendete Restriktionsenzym BGLII wurde die untersuchte Region auf Chromosom 11p15.5 in eine Vielzahl an Fragmenten

gegliedert deren potentielle Interaktionen zueinander mittels NGS-Sequenzierung ermittelt wurden. Über dieses Verfahren konnten in den verwendeten HB2-Zellen einige potentielle Interaktionen auf Chromosom 11 innerhalb der gewählten Region gefunden werden (siehe Abb. 3-14). Dabei wurde unter anderem eine häufige räumliche Nähe zwischen dem Fragment in dem die CTCF DS-Bindestelle liegt, sowie dem Fragment mit CS7 und CS9 mit dem Fragment der HUC-Enhancer festgestellt. Beide weisen auch eine etwas schwächere Verbindung zur ICR1 auf. Die weniger häufige Verbindung von CTCF DS zur ICR1 könnte auch darauf beruhen, dass diese wie bereits beschrieben abhängig von der Methylierung der ICR1 nur auf dem maternalen Allel stattfindet (Nativio *et al.*, 2011).

Wie die T2C Daten zeigten, lag die Region der HUC-Enhancer ebenfalls benachbart zu den *IGF2*-Promoterbereichen P3 und P4. Diese Ergebnisse könnten somit die Modelle unterstützen, welche eine aktivierende Rolle der HUC-Elemente für *H19* und für *IGF2* postulierten (Drewell *et al.*, 2002). Die HUC-Enhancer scheinen auch in räumlicher Nähe zu *CDKN1C* zu liegen. In der Literatur finden sich jedoch bisher keine Anhaltspunkte für eine Funktion der HUC-Elemente im Bezug zur Regulation von *CDKN1C*. Eine weitere Verbindung zum IC2 konnte zwischen der ICR1 und *KCNQ1OT1* in der Nähe zur ICR2 festgestellt werden. Dies könnte zu publizierten Daten aus der Maus passen, die eine Interaktion zwischen *KCNQ1* und der maternalen ICR1 beschreiben (Z. Zhao *et al.*, 2006).

Zwischen den beiden Fragmenten auf welchen CTCF DS bzw. die Enhancerelemente CS7 und CS9 liegen zum Fragment mit den HUC-Elementen, welches direkt zur ICR1 benachbart ist, wurde eine besonderes hohe Intensität der räumlichen Nähe verzeichnet. Daher wurde die DNA-Sequenz in diesen Bereichen eingehender untersucht. Dabei wurde in 532 Basen Entfernung zu CS7 ein repetitiver Bereich entdeckt, in welchem sich 27 potentielle P53-Bindestellen befinden. Diese entsprechen zum Großteil den in der Literatur beschriebenen Sequenzen. Das Bindemotiv besteht in der vorderen Seitenregion aus drei Basen, welche ein A oder G sein sollten. Gefolgt von der Kernregion, die sich aus C, zwei Basen A/T und G zusammensetzt. Die zweite Seitenregion wird durch drei Basen C/T definiert (Menendez *et al.*, 2009). Bis auf zehn Ausnahmen wiesen alle 27 Motive die richtige Basenabfolge auf, von den übrigen zehn Sequenzen hatten neun eine Veränderung in der Kernregion, in Form eines C zu T Austauschs (siehe Abb. 3-15). Aufgrund der Vielzahl an gefundenen P53-Bindemotiven in dieser Region wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Experimente zur Funktion von P53 in diesem Bereich bzw. im Zusammenhang mit der Regulation von *IGF2* und *H19* durchgeführt.

4.2 Analyse von P53 im Zusammenhang mit *IGF2* und *H19*

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob zwischen den bei CS7 gefundenen Bindemotiven für P53 und den bereits in der Literatur beschriebenen Effekten von P53 im Bezug zu *IGF2* und *H19* ein Zusammenhang bestehen könnte. P53 hat eine Vielzahl an Funktionen und ist dabei unter anderem in die Regulation von Zellwachstum, Zellteilung, Überleben und/oder den programmierten Zelltod involviert. In vielen Fällen fungiert P53 dabei als Transkriptionsfaktor, welcher sowohl transaktivierend als auch repressiv wirken kann. P53 wird in den Zellen zwar ubiquitär exprimiert solange allerdings kein Stimulus, welcher P53 aktiviert, vorliegt wird die Menge an P53-Protein auf einem niedrigem Level konstant gehalten (Meek, 2015). In diesem Zusammenhang polyubiquityniert MDM2 P53 über eine Ubiquitinligase, wodurch P53 markiert und im Proteasom abgebaut wird. Ein niedriges Level von MDM2 führt hingegen zu einer Monoubiquitynylierung, welche initiiert, dass P53 aus dem Zellkern ausgeschleust wird (M. Li *et al.*, 2003). Um die möglichen transkriptionellen Effekte von P53 zu untersuchen, wurde die in der Zelle natürlich vorliegende P53-Proteinmenge verändert. Dies geschah zum einen durch eine Stabilisierung von P53 durch Nutlin-3a, zum anderen durch eine Reduktion von P53, welche durch einen mRNA-Knockdown ausgelöst wurde. Für die Versuche wurden SRS UPD11- bzw. SRS UPD7-Zellen verwendet. Die Zellen wurden ausgewählt, da sie eine erhöhte *H19*-Expression aufwiesen und Effekte durch die P53 Veränderungen möglicherweise eine Auswirkung auf diese haben könnte. Bei BWS $\Delta H19/ICR1$ wären diese aufgrund des deletierten maternalen Allels evtl. nicht zu detektieren. Der zweite Aspekt war, dass die beiden Zellkulturen unterschiedliche epigenetische Defekte auf verschiedenen Chromosomen aufwiesen. Dies sollte ermöglichen festzustellen, ob die UPD auf Chromosom 11p15.5 einen Einfluss auf die Funktion von P53 in diesem Bereich haben kann.

4.2.1 Transkriptionelle Effekte von P53

Für die Stabilisierung des P53-Proteins im Zellkern wurde eine Behandlung mit Nutlin-3a in den Zellen von SRS UPD11 und SRS UPD7 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine chemische Substanz, die eine Bindung von P53 zum N-Terminus von MDM2 imitiert und somit die Bindung zwischen P53 und MDM2 inhibiert. Die Zugabe von Nutlin-3a sollte in einem hohen Level an P53-Protein resultieren und ein robustes Signal der nachgeschalteten Prozesse

Diskussion

und Genexpressionen auslösen (Hu *et al.*, 2012). Hierfür wurden die Zellen sechs Stunden mit Nutlin-3a inkubiert. Durch die Überprüfung mittels Westernblot konnte eine Akkumulierung des P53-Proteins im Zellkern nachgewiesen werden (siehe 3.6.1). Als Positivkontrolle für die Effekte auf Transkriptionsebene wurde die Aktivierung der Expression bekannter Zielgene von P53 wie *P21 (CDKN1A)* mittels qRT-PCR analysiert. Die Funktion von P21 ist unter anderem die Inhibierung des Zellzyklus bei einem DNA-Schaden, um der Zelle Zeit für eine DNA-Reparatur Zeit zu verschaffen. So konnten in einigen Studien eine Aktivierung von P21 durch P53 gezeigt werden (Meek, 2015; Nikulenkov *et al.*, 2012; C.C. Wang *et al.*, 2006). Die Expressionsinduktion von *P21* erwies sich in den durchgeführten Experimenten als belastbare Positivkontrolle, da sowohl bei den untersuchten SRS UPD11- als auch den SRS UPD7-Zellen eine deutliche Steigerung nach der Behandlung mit Nutlin-3a im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt wurde (siehe Abb. 3-17 A). Als reziprokes Experiment wurde eine Reduktion von P53 mithilfe eines siRNA-basierten mRNA-Knockdowns untersucht. Als Kontrolle dienten hierbei Proben die mit einer s.l.-siRNA, welche kein endogenes Ziel aufwies, behandelt wurden. Die Untersuchungen fanden wie bei den Induktionsexperimenten mit den Zellen von SRS UPD11 und SRS UPD7 statt. Um die Effizienz und die Auswirkungen des Knockdowns zu verifizieren wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten neben der Expression von *P53* auch hier *P21* als Kontrolle verwendet. Die Analyse ergab eine deutliche Reduktion von *P53* in beiden Zellkulturen und zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zur Steigerung von *P21* nach der Induktion von P53 konnte nach dessen Reduktion eine Herunterregulation von *P21* festgestellt werden (siehe Abb. 3-18). Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Induktion bzw. Reduktion von P53 transkriptionelle Effekte ausgelöst werden konnten und unter anderem die Expression von *P21* reziprok verändert war. Die erhöhte P53-Proteinmenge nach der Nutlin-3a-Behandlung sollte auch eine verstärkte Bindung von P53 an die DNA initiieren. Daher wurde mittels ChIP die Bindung von P53 an die DNA untersucht. Bereits 1998 gab es in der Maus die ersten Hinweise darauf, dass eine Bindung von P53 an die DNA für eine DNA-Schleifenbildung verantwortlich sein kann. In der Publikation wurde beschrieben, wie die zwei P53-Bindeelemente im *Mck*-Promoter, welche etwa 3 KB auseinander liegen, in cis miteinander interagieren und so die Transkription des Gens beeinflussen (Jackson *et al.*, 1998). Später wurde gezeigt, dass eine Transaktivierung von Genen über eine lange Distanz, durch die Bindung von P53 an die entsprechenden Enhancerelemente, erfolgen kann (Link *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2013; Younger *et al.*, 2015).

Diskussion

In der Literatur werden viele verschiedene Bindemotive beschrieben. Der Großteil von ihnen weist jedoch einige übereinstimmende Merkmale in der Sequenz auf. Das P53-Responseelement (RE) besteht aus zwei Halbseiten mit der Sequenz RRR**CWWG**YYY, welche durch einen Spacer getrennt sein können. Die Basen CWWG bilden dabei das wichtige Kernelement. Sowohl in den Seitenbereichen, als auch im Kernelement sind Basenabweichungen möglich, welche die Bindungsaffinität und die Transaktivierung beeinflussen können (Fischer, 2017; Menendez *et al.*, 2009; Riley *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015; B. Wang *et al.*, 2009).

Von den 27 potentiellen P53-Bindestellen in der Nähe des CS7-Enhancerelements stimmten 18 Elemente mit der oben genannten Sequenz überein (siehe Abb. 3-15). Da die Interaktionsdaten der T2C-Analyse erste Hinweise darauf lieferten, dass eine Interaktion mit den ICR1 nahen Bereichen stattfinden könnte (siehe 3.5.2), wurde die Bindung von P53 in diesem Bereich mittels CHIP untersucht, welche anschließend per qPCR bzw. NGS ausgewertet wurde. Bei der CHIP wurden SRS UPD11- und SRS UPD7-Zellen mit und ohne Nutlin-3a-Behandlung miteinander verglichen um zu sehen, ob durch eine P53-Induktion eine Zunahme der P53-Bindung ausgelöst wurde. Als Positivkontrolle diente in diesem Fall erneut das *P21*-Gen bzw. dessen Promoterbereich, in welchem eine einzelne Bindesequenz und eine doppelte (ohne Spacer) zu finden sind (siehe Abb. 3-25 A). Eine weitere Bindestelle die mit den Primern der qPCR nicht abgedeckt wurde befindet sich im ersten Intron des Gens. Die qPCR-Ergebnisse zeigten für den *P21*-Promoter in beiden Zellkulturen eine signifikante Zunahme des P53-Pulldowns nach der Nutlin-3a-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (siehe 3.8.3), dies konnte auch durch die NGS-Sequenzierung bestätigt werden. Zusätzlich konnte durch die Sequenzierung für die Bindestelle im ersten Intron ebenfalls erhöhte Peaks festgestellt werden, welche jedoch nicht das Niveau der Peaks im Promoterbereich erreichten (siehe 3.8.4). Die Daten belegten somit eindeutig, dass mit der P53-ChIP und der CHIP-Seq bzw. generell die Bindung von P53 an die DNA in den Fibroblasten nachgewiesen werden konnte und dies mit der Transkriptionserhöhung von *P21* korreliert.

Die Analyse der Region mit den 27 potentiellen P53-Bindestellen bei CS7 (siehe Abb. 3-15) konnte jedoch weder mittels qPCR noch nach der Sequenzierung einen Hinweis auf eine Bindung von P53 in den Fibroblasten liefern. Sowohl bei den qPCR-Analysen als auch bei der NGS-Auswertung lagen die Werte für den P53-Pulldown im Bereich des Hintergrunds und es konnte keine Erhöhung durch die Nutlin-3a-Induktion festgestellt werden (siehe 3.8). Von

Diskussion

Verfaillie und Kollegen veröffentlichten ChIP-Seq-Daten, welche mit Nutlin-3a-induzierten MCF7-Zellen generiert wurden, weisen ähnliche Ergebnisse auf. Die Daten zeigten bei der Visualisierung im UCSC Genome Browser ebenfalls erhöhte Peaks in P53 positiven Regionen wie beispielweise dem *P21*-Promoter, während auch hier in dem Bereich bei *CS7* keine Anzeichen für eine P53-Bindung vorlagen (siehe Abb. 4-2)(Verfaillie *et al.*, 2016).

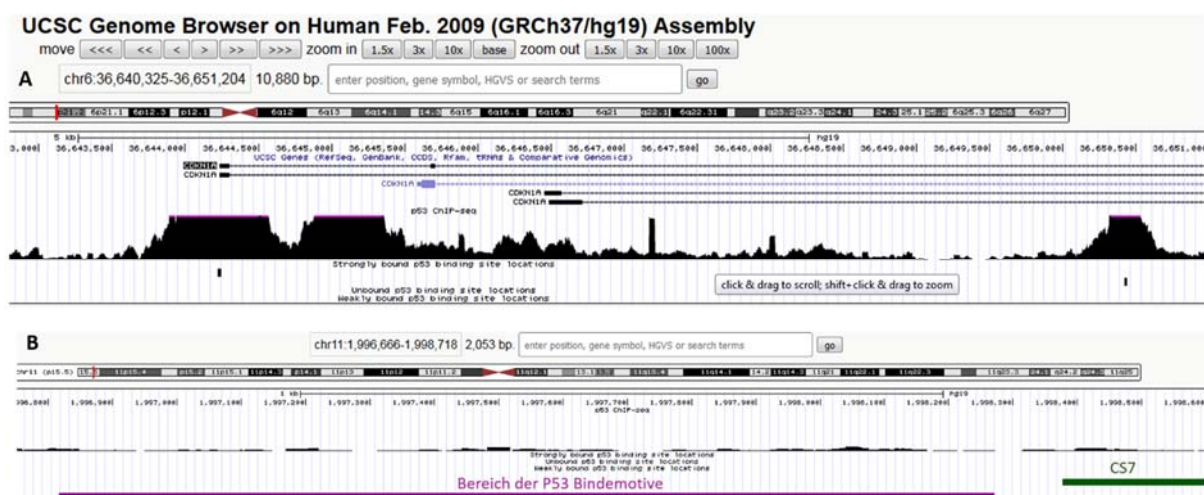


Abb. 4-2 ChIP-Seq-Daten für *P21* (*CDKN1C*) und *CS7* von Verfaillie *et al.*

Die öffentlich zugänglichen ChIP-Seq-Daten zeigen die P53-Bindungen in MCF7-Zellen. **A** Für den Bereich des *P21*-Promoters und des ersten Introns konnte ein starkes Bindsignal detektiert werden. **B** Im Bereich des P53-Bindeclusters und des *CS7*-Enhancers lag kein Signal vor, welches sich deutlich vom Hintergrund abhob. (Verfaillie *et al.*, 2016)

Weshalb in diesem Bereich keine P53-Bindung stattfindet, obwohl hier 27 P53-REs vorliegen, von denen 18 eine Sequenz aufweisen, welcher eine hohe Bindeaffinität zugeordnet wurde (Veprintsev und Fersht, 2008), ist allerdings unklar. Nicht unwahrscheinlich ist, dass dies mit der Länge der Spacer (14 Basen) zwischen den einzelnen REs zusammenhängen könnte. In der Literatur gibt es zwar Hinweise auf Spacerlängen von 0-21 Basen (Riley *et al.*, 2008; Vyas *et al.*, 2017), allerdings weist der Großteil der im Genom vorkommenden REs Spacer von 0-2 Basen auf, während nur etwa 10 % eine Spacerlänge von 10 oder mehr Basen haben. (Menendez *et al.*, 2009; Riley *et al.*, 2008). Ein längerer Spacer scheint tatsächlich die Bindung negativ zu beeinflussen. Viele Autoren gehen davon aus, dass mit zunehmender Spacerlänge sowohl die Bindekapazität als auch die Funktionalität von P53 in der Zielregion stark vermindert wird (Jordan *et al.*, 2008; Menendez *et al.*, 2009; Riley *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015). Demgegenüber gibt es auch eine Studie die bei längeren Spacern eine ähnlich starke Affinität feststellen konnte. Dabei handelt es sich allerdings nur um bestimmte Konstellationen. Beispielsweise beschreiben Yvas und Kollegen bei einer Spacerlänge von 10 oder 20 Basen

Diskussion

eine ähnliche starke Bindeaffinität wie bei einer Spacerlänge von 0-2. Dies führen sie auf die genaue Positionierung der beiden P53-Dimere zueinander anhand der DNA-Windung zurück, welche bei 0, bzw. 10 und 20 Basen am energetisch günstigsten erscheint. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studie dennoch auf eine starke Reduktion der Bindeaffinität mit zunehmender Spacerlänge hin. Besonders stark ist die Abnahme zwischen 12 und 18 Basen. Allerdings gibt es auch die Möglichkeit der hemispezifischen Bindung von P53-Tetrameren an P53-REs. Dabei bindet das eine Dimer direkt an das Bindemotiv und das zweite Dimer an die anliegende unspezifische DNA. Dies kommt nicht nur für einzeln vorliegende Bindemotive vor, sondern auch wenn zwei Bindemotive nebeneinanderliegen und durch einen Spacer von mindestens zehn Basen getrennt sind (Vyas *et al.*, 2017). Beim Vorliegen mehrere Bindemotive scheint die Bindeaffinität der hemispezifischen Bindung jedoch niedriger als bei einzeln vorkommenden Elementen zu sein (Vyas *et al.*, 2017). Viel spricht daher dafür, dass in dem Bereich bei CS7 keine optimalen Bedingungen für eine P53-Bindung vorliegen. Eine Funktion dieser Sequenzen ist dennoch nicht ausgeschlossen. Im Genom gibt es einige solcher „schwachen“ Bindemotive, welche im Vergleich zu den hoch affinen Bindemotiven mittels CHIP nur schwer nachweisbar sind, da sie häufig erst bei höheren P53-Konzentrationen gebunden werden. Daher wird für einige von ihnen eher eine feinregulierende Rolle angenommen. Insgesamt wurde auch gezeigt, dass mit zunehmender P53-Konzentration das Repertoire an Zielgenen ansteigt (Espinosa, 2008; Menendez *et al.*, 2009), dies könnte somit auch auf die P53-REs bei CS7 zutreffen. Alternativ wären indirekte Effekte von P53 für die transkriptionelle Regulation der Gene *IGF2* und *H19* denkbar.

Die Stabilisierung von P53 durch Nutlin-3a führte jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der *H19*-Expression. Im Mittel lagen sowohl die Werte von SRS UPD11 als auch von SRS UPD7 im Vergleich zur Kontrolle unverändert vor. Einzelne Proben allerdings zeigten eine starke Erhöhung oder Reduktion. Bei SRS UPD11 schwankten die Werte von 54 – 196 % und bei SRS UPD7 von 28 – 171 % (ein Ausreißer mit 609 %) im Bezug zur Kontrolle (siehe 3.6.2). Auch die Ergebnisse der Knockdown-Experimente zeigten nur geringe und nicht einheitliche Veränderungen. Während die Expression von *H19* in den SRS UPD11-Zellen bei den Zeitpunkten 24 h und 48 h nicht verändert und nach 72 h leicht reduziert (69 %) vorlag, war sie bei SRS UPD7 nach 24 h nicht verändert und stieg dann nach 48 h (119%) und nach 72 h (149 %) leicht an. Wobei der 72 h Wert von SRS UPD7 der einzige war, welchem eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle zugeordnet werden konnte (siehe Abb. 3-19

A). Der 72 h-Wert von SRS UPD7 würde somit für eine repressive Wirkung von P53 auf *H19* sprechen. In der Literatur gibt es relativ wenig Hinweise für einen direkten Effekt von P53 auf die Expression von *H19*. Allerdings wurde ein Zusammenhang zwischen P53 und *H19* in der Tumorentwicklung publiziert. Einige Studien beschreiben eine Rolle von *H19* in verschiedenen Tumoren, weshalb die Autoren *H19* als Onkogen eingestuft haben (M. Kondo *et al.*, 1995; Matouk *et al.*, 2007; Matouk *et al.*, 2010). Matouk und Kollegen fanden heraus, dass die *H19*-Expression in einigen der untersuchten Tumorzellarten unter Hypoxie zunahm. Diesen Effekt konnten sie mit Mutationen von P53 korrelieren, während in den Zellen mit erhöhtem *H19* häufig eine P53-Mutation zu Grunde lag, wiesen die Zellen mit normalem bzw. niedrigem *H19* Status das Wildtyp Protein von P53 auf. Die Autoren konnten die erhöhte Transkriptmenge von *H19* auf eine Interaktion mit dem Faktor Hif1- α zurückführen, welcher unter Hypoxie aktiviert wird. Die Ergebnisse ihrer Studien konnten zeigen, dass diese Interaktion durch P53 inhibiert wird (Matouk *et al.*, 2010). Dies belegt zwar einen repressiven Effekt von P53 auf *H19*, dieser entsteht jedoch wahrscheinlich indirekt über die Inhibierung von Hif1- α und nicht über die Funktion von P53 als Transkriptionsfaktor für *H19* oder eine Bindung an die REs bei CS7. In einer Veröffentlichung von Dugimont und Kollegen wurden ebenfalls repressive Effekte von P53 auf den *H19*-Promoter beschrieben. In der Studie wurde mittels eines Luciferaseassay in Hela-Zellen eine Reduktion der *H19*-Expression durch P53 gezeigt. Die genaue Bindestelle konnte jedoch nicht identifiziert werden (Dugimont *et al.*, 1998). Für den *IGF2-P3* wurde eine indirekte Bindung von P53 über das Protein TBP an die TATA-Box beschrieben (Zhang *et al.*, 1996). Der *H19*-Promoter weist allerdings auch keine TBP-Bindestelle auf. Daher scheint auch ein indirekter Effekt über die Interaktion von P53 und TBP ausgeschlossen. Die Studie von Dugimont und Kollegen konnte auch nicht einwandfrei klären, ob es sich um eine direkte Bindung an den Promoter handelt, oder um eine indirekte Interaktion zu einem anderen Protein wie beispielsweise den Faktor E2F, für den es zwei Bindestellen im *H19*-Promoter gibt. Die Bindung von E2F in Kombination mit P53 könnte für die Herunterregulation von *H19* verantwortlich sein (Dugimont *et al.*, 1998). Eine weitere Studie konnte ebenfalls einen repressiven Einfluss von P53 auf *H19* bei der Untersuchung von Li-Fraumeni Syndrom-Patienten (LFS) zeigen. Interessanterweise wurde bei den Analysen nur in den gesunden mesenchymalen Stammzellen durch die Stabilisierung von P53 mit Nutlin-3a eine *H19*-Reduktion gezeigt, während durch einen *P53*-Knockdown eine Steigerung der *H19*-Expression sowohl in den gesunden, als auch in den LFS-Zellen ausgelöst wurde. Die Effekte

scheinen auch hier durch die Interaktion mit einem weiteren Faktor zustande gekommen der nicht näher beschrieben werden konnte (D.F. Lee *et al.*, 2015). Die Diskrepanzen zu den vorliegenden Ergebnissen könnten möglicherweise auf die unterschiedlichen verwendeten Zellen oder generelle experimentelle Unterschiede zurückzuführen sein.

Darüber hinaus gibt es Studien die belegen, dass bei etwa 41 % der von P53 gebundenen Gene durch eine Stabilisierung mittels Nutlin-3a kein Effekt zu verzeichnen ist. Die Bindung von P53 per se ist also möglicherweise nicht ausreichend für eine transkriptionelle Regulation. Diese scheint zusätzlich von bestimmter Modifizierung von P53 abhängig zu sein, welche so für die Rekrutierung weiterer relevanter Faktoren sorgen kann (Nikulenkov *et al.*, 2012).

Für die gemessene Expression von *IGF2* lag in den beiden Zellkulturen eine breite Streuung nach der Nutlin-3a-Behandlung vor. Während in den SRS UPD7-Zellen sowohl reduzierte als auch erhöhte Werte für *IGF2* vorlagen, wiesen die SRS UPD11-Zellen überwiegend erhöhte Werte und damit einhergehend eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrolle auf (siehe Abb. 3-17 D). Auch die Ergebnisse der Knockdown-Versuche wiesen eine breite Verteilung der Werte auf. Allerdings zeigten sich hier im Mittel bei beiden Zellkulturen eine Reduktion der *IGF2*-Transkription (siehe Abb. 3-19 B). Die Ergebnisse die auf eine aktivierende Wirkung von P53 für *IGF2* in den Fibroblasten hindeuten, decken sich daher nicht mit der Literatur, in welcher repressive Effekte von P53 auf *IGF2* postuliert werden. Diese wurden allerdings bisher ausschließlich in Tumorzelllinien nachgewiesen (Sampaoli *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998).

Für die Expression von *CDKN1C* konnte kein eindeutiger Effekt von P53 gezeigt werden. Während die Behandlung mit Nutlin-3a so gut wie keine Veränderung hervorrief, lag besonders in den SRS UPD11-Zellen nach dem Knockdown von *P53* eine sehr starke Schwankung vor. Im Mittel war bei SRS UPD11 nach 24 h eine Erhöhung (2,8-fach) zu erkennen, die jedoch nach 48 h und 72 h nicht mehr feststellbar war. In den SRS UPD7-Zellen hingegen lag nach 24 h eine Reduktion vor, die Werte pendelten sich nach 48 h bei etwa 100 % im Vergleich zur Kontrolle ein und zeigten nach 72 h eine Erhöhung (2,7-fach), wobei dieser Wert auch eine besonders große Standardabweichung aufwies (siehe Abb. 3-19 C). In der Literatur ließen sich keine Anhaltspunkte für eine direkte Interaktion von P53 mit dem *CDKN1C*-Gen finde.

Diskussion

Insgesamt zeigten sich außer für *IGF2* also keine oder keine einheitlichen Effekte durch die Änderung des P53-Status für die Gene auf Chromosom 11p15.5. Für *IGF2* konnten zwar tendenziell aktivierende Effekte durch P53 festgestellt werden, dies deckt sich jedoch nicht mit der aktuellen Literatur. Dies könnte unter anderem auch darauf zurückzuführen sein, dass die P53-Effekte gewebs- bzw. entwicklungsspezifisch sind oder bestimmte Modifikationen des P53-Proteins vorliegen müssen, welche durch den Knockdown oder die Induktion mittels Nutlin-3a nicht gegeben waren. Eine der Modifikationen, welche nach einem DNA-Schaden gebildet wird ist die Phosphorylierung am Ser15. Durch die DNA-Schäden werden unter anderem die Kinasen ATM oder ATR aktiviert. Gleichzeitig können die Kinasen auch CHK1 und CHK2, sowie MDM2 Phosphorylieren. Die Phosphatgruppe am MDM2 destabilisiert zusätzlich die Bindung zu P53. Die Phosphorylierung am Ser15 wird durch ATM initiiert und ist prädisponierend für weitere Modifikationen von P53 ist. Beispielsweise wird die Phosphorylierung des Ser15 von der Kinase CHK1 erkannt, welche das Thr18 phosphoryliert. Die Modifikationen fördern weitere Modifizierungen des P53-Proteins sowie die Interaktion mit den Enzymen P300 und CBP, welche zusammen mit P53 für die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Gene verantwortlich sind. Di- oder poly-Phosphorylierungen können die Verbindungen mit den Interaktionspartnern noch verstärken, welche die Funktion bzw. die Effekte von P53 beeinflussen können. Gemeinsam führen alle diese Modifikationen zu einer Inhibierung der Interaktion von P53 und MDM2, wodurch P53 in der Zelle in einem aktiven Zustand akkumuliert wird. Eine Behandlung mit Nutlin-3a führt jedoch nicht zu einer Phosphorylierung des Ser15. Daher können sich die Effekte und Prozesse, welche durch P53 reguliert werden, voneinander unterscheiden (Fei und El-Deiry, 2003; Lavin und Gueven, 2006; Loughery *et al.*, 2014; Meek, 2015).

Diese Ergebnisse deuteten nur teilweise auf eine Funktion von P53 für das Cluster *IGF2* und *H19* hin, da auch keine Bindung an den Bereich des CS7-Enhancers festgestellt werden konnte. Da eine Funktion aber nicht gänzlich ausgeschlossen war, wurde auch die Bindung von P53 an die Promoterlemente von *H19* und *IGF2* untersucht. Für die untersuchten Regionen (*H19*-Promoter, ICR1 und *IGF2*-Promoter) lieferten allerdings sowohl die ChIP als auch die ChIP-Seq keine Hinweise auf eine direkte Bindung von P53. Außer in einer Publikation, welche eine Bindung für P53 an *IGF2*-P4 beschreibt (Zhang *et al.*, 1998), gibt es auch in der Literatur keine Anhaltspunkte für eine direkte Bindung von P53 bei den Genen *IGF2* oder *H19*. Die in den

Fibroblasten mittels ChIP nicht gefundene Bindung in *IGF2*-P4 ist nicht unbedingt überraschend. Zum einen wurden für die Analyse von Zhang und Kollegen ein anderer Zelltyp (Rhabdomyosarkomzellen) verwendet und zum anderen eine andere Nachweismethode (EMSA). Beim EMSA (electro mobility shift assay) wird *in vitro* die Bindung eines Proteins an eine synthetische DNA-Sequenz nachgewiesen. Die in dem Paper angegebene Sequenz, welche -16 bis -46 Basen vor dem Transkriptionsstart des P4-Promoters liegt, beinhaltet nur ein einzelnes P53-Bindemotiv (Zhang *et al.*, 1998). Darüber hinaus weicht die Sequenz (AAACTGAGGC) mit drei Basen, von denen eine das G (G\A) der Kernregion betrifft, sehr stark von der optimalen Konsensussequenz ab. Somit lässt sich eine nicht gefundene Bindung von P53 im Bereich des P4-Promoters mittels ChIP recht gut nachvollziehen. Für beide Gene scheint daher ein Einfluss von P53 über eine indirekte Bindung wahrscheinlicher. Hierfür war die ChIP jedoch nicht die richtige Nachweismethode. Für *IGF2* ist eine solche Bindung über das Protein TBP im P3-Promoter wie bereits beschrieben (siehe S. 147) bekannt (Zhang *et al.*, 1996). Insgesamt lassen die Ergebnisse der ChIP auch im Zusammenhang mit den Expressionsdaten nach der Stabilisierung von P53 durch Nutlin-3a noch viel Raum für Spekulationen. Möglicherweise spiegelt die Behandlung mit Nutlin-3a und die dadurch ausgelösten Effekte nicht den physiologischen Zustand der Zelle wieder. Bei der Behandlung mit Nutlin-3a wird zwar die Bindung zwischen P53 und MDM2 unterbunden und P53 in der Zelle akkumuliert, P53 wird über diesen Mechanismus jedoch nicht posttranslational modifiziert. Viele der nachgeschalteten Effekte von P53 werden aber gerade über die unterschiedlichen Modifikationen gesteuert. Aus diesem Grund wurde eine alternative Aktivierung von P53 untersucht. Hierfür wurde eine Bestrahlung der Zellen durchgeführt.

4.2.2 Transkriptionelle Effekte von P53 nach Induktion durch Bestrahlung

Die Bestrahlung induziert in den Zellen unter anderem DNA-Schäden in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen. Die DNA-Schäden können von diversen Faktoren erkannt werden und lösen so verschiedene Signalkaskaden aus. Dabei werden unter anderem die Kinasen ATM oder ATR aktiviert welche P53 durch posttranslationale Modifikationen regulieren können (Erklärung siehe S. 149). In der Literatur werden unterschiedliche Effekte von niedrigen und höheren Strahlendosen diskutiert (Ding *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden die Zellen sowohl mit einer niedrigen (0,05 Gy), als auch einer hohen (2 Gy) Dosis bestrahlt und die Effekt auf transkriptioneller Ebene eine bzw. zwei Stunden nach der Bestrahlung untersucht. Die

Diskussion

Westernblot Untersuchungen zeigten eine schwache Akkumulation von P53 im Kern nach der Bestrahlung, welche deutlich geringer als nach der Nutlin-3a-Behandlung ausfiel. Als Kontrolle für die Effekte auf die Transkription wurden *P21* und *MDM2* verwendet, da für *P21* und *MDM2* eine Zunahme der Expression nach Bestrahlung beschrieben wurde (Ding *et al.*, 2005; Wartens *et al.*, 2009). Die Aktivierung von *MDM2* durch P53 findet statt, um nach einer erfolgten P53-Akkumulierung in der Zelle diese schnellst möglich wieder zu reduzieren (Meek, 2015). Allerdings zeigte sich nur in den SRS UPD11-Zellen bei 2 Gy nach 2 h eine Erhöhung des *P21*-Transkripts. Zumindest die Befunde in den SRS UPD11-Zellen passen somit zu den Ergebnissen von Ding und Kollegen, welche frühestens 2 h nach einer höheren Strahlungs dosis eine Zunahme von *P21* verzeichnen konnten. Für SRS UPD7 zeigte sich im Mittel für alle Proben eine Erhöhung der *MDM2*-Expression, während dies für SRS UPD11 nur bei 2 Gy zu verzeichnen war. Somit konnte zumindest nach einer Bestrahlung mit 2 Gy und einem Zeitabstand von zwei Stunden sicher von einer Aktivierung von P53 ausgegangen werden.

Die Analysen der Expression von *IGF2* ergaben für SRS UPD7 keine auffälligen Veränderungen, während bei SRS UPD11 die Expression 2 h nach 2 Gy leicht erhöht vorlag. Die Expressionen 1 h nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy lassen sich schwer mit einer Funktion von P53 korrelieren, da im Westernblot keine Zunahme des Proteins in den SRS UPD11-Zellen bestätigt wurde und auch die Kontrollgene nicht auf eine aktive Rolle von P53 hinwiesen. Bei den 2 Gy Proben ließ sich 2 h nach Bestrahlung eine Aktivierung der Gene *MDM2* und *P21* zeigen. Ein Zusammenhang mit der Expression von *IGF2* ist dennoch fraglich, da die Expression nur auf das etwa 1,5-Fache im Vergleich zur Kontrolle stieg und auch die Abweichung der Proben relativ hoch war. Darüber hinaus decken sich die Daten auch nicht mit der Literatur, welche von einem reprimierenden Effekt von P53 für *IGF2* ausgeht (Park *et al.*, 2005; Sampaoli *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998). Für *H19* hingegen konnte in allen Proben von SRS UPD11 und SRS UPD7 eine Reduktion der Expression festgestellt werden. Interessanterweise betraf dies auch alle Proben, welche keine Veränderung oder sogar eine Reduktion für *P21* oder *MDM2* zeigten. Möglicherweise reicht also bereits eine schwache Aktivierung von P53 mittels Bestrahlung aus um einen repressiven Effekt auf *H19* zu erzeugen. Ein solcher Effekt wurde unter anderem im Zusammenhang mit einer Hypoxie in Tumorgewebe beschrieben (Matouk *et al.*, 2010) (wie bereits auf S 147 erläutert). Für eine genauere Charakterisierung der Funktion von P53 müssten daher im Anschluss an die Bestrahlung weitere Experimente

durchgeführt werden. Eine ChIP scheint jedoch nicht vielversprechend, da sowohl eine direkte Bindung an die P53-Elemente bei CS7 als auch an den *H19*-Promoter, sofern sie denn auftreten, eher schwächerer Natur sein dürften. Einen ersten Hinweis könnte ein EMSA der entsprechenden Regionen bieten, welcher *in vitro* eine Bindung von P53 bestätigen könnte. Allerdings besteht auch die Möglichkeit einer indirekten Bindung an den *H19*-Promoter, ähnlich wie es für den *IGF2*-Promoter (P3) beschrieben wurde (Zhang *et al.*, 1996). Erste Hinweise auf eine mögliche Regulation über eine indirekte Bindung von P53 an den *H19*-Promoter gibt die Publikation von Dugimont und Kollegen. In dieser wird ein repressiver Effekt von P53 auf den *H19*-Promoter beschrieben. Dieser kommt jedoch nicht wie für *IGF2* beschrieben über TBP zustande, da der *H19*-Promoter keine TBP-Bindestelle aufweist (siehe auch 4.2.1).

Eine indirekte Bindung von P53 könnte über eine Coimmunopräzipitation des P53-Proteins und sein potentiell Interaktionsprotein nachgewiesen werden. Ein Kandidat wäre ein Protein aus der E2F-Familie, da der *H19*-Promoter zwei E2F-Bindestellen aufweist. Dugimont und Kollegen konnten jedoch bei Analysen in Hela-Zellen keinen Einfluss von P53 zusammen mit E2F auf den *H19*-Promoter feststellen (Dugimont *et al.*, 1998). Inzwischen wurde allerdings eine stabile Komplexbildung von P53 und E2F-1 sowie weiteren E2F-Proteinen beschrieben, durch welche apoptotische Prozesse aktiviert werden können (Hsieh *et al.*, 2002; Yoshihara *et al.*, 2012). Die Komplexbildung in den Versuchen von Yoshihara und Kollegen wurde durch eine Adriamycin-Behandlung ausgelöst, welche zu DNA-Schäden führt (Adriamycin mediated damage response; ADR). Andere Gruppen konnten jedoch auch eine Induktion von E2F-1 ausgelöst durch Röntgen- oder UV-Strahlung zeigen (Blattner *et al.*, 1999). Einige der P53-Zielgene können im Anschluss an einen DNA-Schaden durch den Komplex aus E2F-1 und P53 reprimiert werden. E2F-1 inhibiert in diesem Fall die Bindung von P53 zu P300, welches unter anderem für die Aktivierung von P53 Zielgenen verantwortlich ist (Yoshihara *et al.*, 2012). Dieser Prozess könnte auch am *H19*-Promoter stattgefunden haben, da nach der Bestrahlung eine Reduktion der *H19*-Expression festgestellt wurde. Eine Bindung von P53 und E2F-1 oder gegebenenfalls einem anderen E2F-Protein an den *H19*-Promoter könnten somit die durch die Bestrahlung ausgelösten Veränderungen der *H19*-Expression erklären.

4.3 Ausblick

Die Expressionsdaten der untersuchten BWS- und SRS-Zellen konnten erste Hinweise auf verschiedene geprägte Gene liefern, welche in den entsprechenden Zellen (SRS bzw. BWS) gemeinsame oder ähnliche Expressionsmuster aufwiesen. So wiesen beispielsweise die SRS-Zellen unabhängig ihrer kausalen epigenetischen Defekte eine reduzierte *IGF2*- und ebenfalls eine reduzierte *MEST*-Expression auf, während die BWS Zellen für beide Gene eine Steigerung der Expression zeigten (siehe Abb. 3-5 B,C und Abb. 3-7 A,B). Für die Analyse weiterer potentiell gemeinsam regulierter Gene würde sich eine RNA-Seq des gesamten Transkriptoms der entsprechenden Zellen anbieten. Die daraus generierten Daten können helfen (geprägte) Gene zu identifizieren, welche in den entsprechenden Zellen ähnliche Expressionsmuster aufweisen. Die Gene können dann möglicherweise einer gemeinsamen Signalkaskade oder einer Korrelation für den syndromassoziierten Phänotyp zugeordnet werden. Darüber hinaus bietet es sich an Zellen weiterer Patienten mit verschiedenen Imprintingdefekten zu untersuchen, um ein möglichst klares Bild gemeinsam fehlregulierte Gene zu erhalten.

Die 4C-Analysen haben einen regulativen Einfluss der ICR1, zumindest über eine direkte physische Interaktion zu anderen geprägten Genen, ausgeschlossen. Dennoch scheint es Faktoren auf Chromosom 11p15.5 zu geben, welche regulativ auf andere geprägte Gene wirken können. Einer dieser Faktoren ist *H19*, für den auch bereits eine Rolle als trans-Regulator des IGN beschrieben wurde. Um weitere Funktionen von *H19* zu untersuchen, könnten beispielsweise eine Überexpression in Zellen, welche eine eher geringe *H19*-Expression aufweisen, durchgeführt werden. Hierfür wird ein Expressionsplasmid in die entsprechenden Zellen transfiziert. Im Anschluss kann untersucht werden, ob dies einen Einfluss auf verschiedene geprägte Gene hat und ob sich das Expressionsniveau im Vergleich zu Zellen mit einer erhöhten *H19*-Expression angleichen wird.

Ein weiterer trans-Faktor des IGN, welcher sich allerdings nicht auf Chromosom 11 befindet ist *PLAGL1*. Um zu verstehen auf welche geprägten Gene *PLAGL1* einen Einfluss haben kann bietet sich eine CHIP-Seq an, diese gibt Aufschluss darüber, an welche geprägten Gene *PLAGL1* binden kann. Ein direkter Einfluss auf die identifizierten Gene kann im Anschluss beispielsweise über einen *PLAGL1*-Knockdown verifiziert werden.

Die T2C-Methode hat erste Hinweise auf mögliche cis-chromosomale Interaktionen auf Chromosom 11p15.5 geliefert. Diese Daten sollten mithilfe weiterer Untersuchungen von

Diskussion

Zellen mit einem klar definierten epigenetischen Status ergänzt werden. Hierfür würden sich Zellen die BWS $\Delta H19/ICR1$ -Zellen anbieten oder Zellen die beispielsweise eine Hyper- oder Hypomethylierung der ICR1 oder der ICR2 aufweisen, um mögliche Interaktionen klar dem entsprechenden Allel bzw. seiner Methylierung zuordnen zu können. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse mithilfe einer weiteren Methode wie einer 3C verifiziert werden. Aufgrund der Größe der Fragmente aus der T2C konnten manche Interaktionen nicht genau einem genetischen Element wie beispielsweise einem einzelnen Enhancer zugeordnet werden. Daher sollte in diesem Zusammenhang darüber nachgedacht werden ein Restriktionsenzym zu wählen, welches kleinere Fragmente in dieser Region bedingt, um so eine spezifischere Aussage über die Interaktionen machen zu können. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf der möglichen Interaktion von CS7 mit den ICR1 nahen Bereichen liegen. Das in der Nähe liegenden Cluster der P53-Bindestellencluster sollte ebenfalls näher analysiert werden. Als Restriktionsenzyme würden sich beispielweise BceAI (ACGGC) oder ECP15I (CAGCAG) anbieten. Das mit BceAI geschnittene Fragment würde allerdings nur einen Teil der P53-REs enthalten, da 11 REs, welche in Richtung des Centromers liegen, außerhalb des Restriktionsfragments lokalisiert wären. Zwischen den zwei ECP15I-Schnittstellen würden neben den P53-Res auch das CS7 Element liegen.

Die ChIP-Ergebnisse deuteten zwar keine Hinweise auf eine Bindung in diesem Bereich an, dennoch scheint diese Region aufgrund der Menge an Bindesequenzen und ihres stark repetitive Aufbaus prädestiniert für eine Funktion von P53 zu sein. Unklar ist, von welchem Zell- bzw. Entwicklungszustand oder von welcher P53-Modifikation eine Bindung in dieser Region abhängt. Daher bietet es sich an die Bindung initial mithilfe eines EMSAs unter idealisierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Sollte hierbei eine Bindung von P53 nachgewiesen werden, wäre dies ein erster Hinweis auf eine Funktion in dieser Region. Für weitere Analysen könnte sich die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen anbieten, da für diese bereits ein Effekt durch die Induktion von P53 mittels Nutlin-3a auf die Expression von *H19* gezeigt werden konnte (D.F. Lee *et al.*, 2015).

5. Zusammenfassung

Auf Chromosom 11p15.5 befinden sich zwei Cluster geprägter Gene. Die Gene jedes Clusters werden abhängig von ihrer parental differenziell methylierten ICR allelspezifisch exprimiert. (Epi)genetische Veränderungen dieser Region sind häufig mit den seltenen Imprintingkrankungen SRS und BWS assoziiert, aber auch Veränderungen wie beispielsweise auf Chromosom 7 können zu SRS führen. Die betroffenen Gene sind alle Teil eines gemeinsam regulierten IGN. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression verschiedener Gene von Chromosom 7 und 11 sowie des IGN in Fibroblasten von je zwei verschiedenen SRS-(matUPD7 und matUPD11) und BWS-Patienten (patUPD11 und maternale Deletion der ICR1/*H19*) untersucht, um mögliche transkriptionelle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten festzustellen. Für *IGF2* ergab sich eine erhöhte Expression in den BWS-Zellen im Vergleich zu den SRS-Zellen, während es für *H19*, abgesehen von der nicht vorhandenen Expression in den Zellen, welche die maternale Deletion aufweisen, keine signifikanten Unterschied gab. Im IC2 wies das Gen *KCNQ1OT1* mit einer niedrigen Expression in beiden SRS-Zellkulturen und einer erhöhten Expression in den beiden BWS-Zellkulturen reziproke Gemeinsamkeiten auf. Während die Expression des Gens *CDKN1C*, welches laut Literatur direkt von *KCNQ1OT1* beeinflusst sein sollte, nur in SRSUPD11 und BWSUPD11 mit der *KCNQ1OT1*-Expression korrelierte. Im Zusammenhang mit dem IGN wies neben *IGF2* und *KCNQ1OT1* auch das Gen *MEST* mit geringen Transkriptmengen bei SRS und erhöhten bei BWS ein reziprokes Expressionsmuster für die beiden Krankheitsentitäten auf. Ein möglicher regulatorischer Faktor, welcher in der ICR1 bindet ist Kaiso. Verschiedene Analysen zeigten, dass das Kaiso für den Methylierungserhalt der ICR1 und auch für die transkriptionelle Regulierung von *IGF2* und *H19* verantwortlich ist. Ob die ICR1 auf *MEST* und weitere IGN-Gene über eine physische Interaktion regulativ wirken kann, konnte mittels der durchgeführten 4C-Analyse nicht gefunden werden. Eine Interaktionsanalyse mittels T2C lieferte Hinweise für cis-Interaktionen der CS7-Enhancerregion mit ICR1-nahen Bereichen. Etwa 500 Basen entfernt von CS7 konnten mehrere putative P53-Bindestellen lokalisiert werden. Daher wurde die funktionelle Relevanz von P53 mittels Nutlin-3a-Behandlung bzw. Bestrahlung und einem P53-Knockdown untersucht. Für den Nachweis der P53-Bindung wurde im Anschluss an die Stabilisierung mittels Nutlin-3a eine ChIP bzw. ChIP-Seq durchgeführt. Die ChIP (-Seq)-Daten lieferten jedoch keine Hinweise auf eine P53-Bindung für die Region bei CS7, die ICR1, den *H19*-Promoter oder die *IGF2*-Promotoren. Die Expressionsanalysen der verschiedenen P53-Stabilisierungen ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Während nach der Nutlin-3a-Behandlung *IGF2* und *H19* im Mittel unverändert waren, ergab sich nach der Bestrahlung eine Reduktion von *H19* in beiden untersuchten SRS-Zellkulturen. Im Vergleich dazu wurde nach dem P53-Knockdown eine Erhöhung von *IGF2* in den SRS UPD11-Zellen festgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Behandlungen der Zellen differenzielle P53-Effekte hervorrufen können. Darüber hinaus ist eine Bindung an den CS7-Bereich und damit einhergehend weitere Funktionen in anderen Zellen oder Geweben möglich.

6. Abstract

The allele specific expression of the genes of the two imprinting clusters on chromosome 11p15.5 are dependent on the parentally differentially methylation of their ICRs. (Epi)genetic defects on chromosome 11p15.5 are often associated with the rare imprinting disorders SRS and BWS. However, approximately 10 % of the SRS patients can also show epigenetic changes on chromosome 7 including a maternal uniparental disomy. The affected genes are all part of a common regulated IGN. To analyze expressional differences or similarities of SRS and BWS different genes on chromosome 7 and 11 and the IGN were checked for their expression in two different SRS-(matUPD7 and matUPD11) and two different BWS-(patUPD11 and maternale deletion of ICR1/*H19*) patients. *IGF2* showed an increased expression in BWS-cells compared to SRS-cells, whereas no significant changes for *H19* could be observed, with exception for the cells harboring the maternal deletion, which showed no *H19*-transcript. For IC2 SRS-cells showed a low expression of *KCNQ1OT1* and BWS-cells a high expression respectively. Although direct effects of *KCNQ1OT1* on *CDKN1C* are supposed in literature these findings only correlate in SRS UPD11 and BWS UPD11 with the *KCNQ1OT1*-expression. In context of the IGN the gene *MEST*, as well as the genes *IGF2* *KCNQ1OT1*, showed low transcript levels in the SRS-cells and high levels in BWS. One regulatory factor which can bind in the ICR1 is the protein Kaiso. Different analyzes revealed that Kaiso is involved in the methylation maintenance of the ICR1 and transcriptional regulation of *H19* and *IGF2*. 4C analysis did not reveal a regulatory physical interaction between the ICR1 and *MEST* or to other imprinted regions. Further interaction analysis (T2C) suggested cis-interactions of the CS7-enhancer region to areas near the ICR1. Several putative P53-binding sites could be located close to CS7. The functional relevance was analyzed by P53-stabilization via N3a treatment, irradiation or P53-knockdown. Following the N3a stabilization of P53 the binding of P53 to the DNA was checked by CHIP and CHIP-Seq. The CHIP(-Seq) gave no hints for a P53 binding to the region of CS7, the ICR1, the *H19*-promoter or the *IGF2*-promoters. The expression analysis of the various P53-stabilizations revealed different results. While there were no changes of *IGF2* and *H19* after N3a-treatment, there was a significant reduction of *H19* in both SRS-cell cultures following irradiation. In contrast to these findings there was an increase of *IGF2* in the SRS UPP11-cells after P53-knockdown. These results showed that various treatments lead to different P53-effects. However, binding to the area near CS7 is possible and may offer functions in other cells or tissues.

7. Literaturverzeichnis

A

- Abi Habib, W., Azzi, S., Brioude, F., Steunou, V., Thibaud, N., Das Neves, C., Le Jule, M., Chantot-Bastaraud, S., Keren, B., Lyonnet, S., Michot, C., Rossi, M., Pasquier, L., Gicquel, C., Rossignol, S., Le Bouc, Y., & Netchine, I. (2014).** Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*, 23(21), 5763-5773.
- Abraham, R. T. (2001).** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 15(17), 2177-2196.
- Al Adhami, H., Evano, B., Le Digarcher, A., Gueydan, C., Dubois, E., Parrinello, H., Dantec, C., Bouschet, T., Varrault, A., & Journot, L. (2015).** A systems-level approach to parental genomic imprinting: the imprinted gene network includes extracellular matrix genes and regulates cell cycle exit and differentiation. *Genome Res*, 25(3), 353-367.
- Alders, M., Maas, S. M., Kadouch, D. J., van der Lip, K., Bliiek, J., van der Horst, C. M., & Mannens, M. M. (2014).** Methylation analysis in tongue tissue of BWS patients identifies the (EPI)genetic cause in 3 patients with normal methylation levels in blood. *Eur J Med Genet*, 57(6), 293-297.
- Alzhanov, D. T., McInerney, S. F., & Rotwein, P. (2010).** Long range interactions regulate Igf2 gene transcription during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*, 285(50), 38969-38977.
- Arima, T., Kamikihara, T., Hayashida, T., Kato, K., Inoue, T., Shirayoshi, Y., Oshimura, M., Soejima, H., Mukai, T., & Wake, N. (2005).** ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res*, 33(8), 2650-2660.
- Arney, K. L. (2003).** H19 and Igf2--enhancing the confusion? *Trends Genet*, 19(1), 17-23.
- Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K., & Schapira, M. (2012).** Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 11(5), 384-400.
- Azzi, S., Abi Habib, W., & Netchine, I. (2014).** Beckwith-Wiedemann and Russell-Silver Syndromes: from new molecular insights to the comprehension of imprinting regulation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(1), 30-38.

Azzi, S., Salem, J., Thibaud, N., Chantot-Bastaraud, S., Lieber, E., Netchine, I., & Harbison, M. D. (2015). A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypical-genotypical correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*, *52*(7), 446-453.

B

Baba, Y., Noshu, K., Shima, K., Huttenhower, C., Tanaka, N., Hazra, A., Giovannucci, E. L., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2010). Hypomethylation of the IGF2 DMR in colorectal tumors, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastroenterology*, *139*(6), 1855-1864.

Bachmann, N., Crazzolara, R., Bohne, F., Kotzot, D., Maurer, K., Enklaar, T., Prawitt, D., & Bergmann, C. (2017). Novel deletion in 11p15.5 imprinting center region 1 in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome provides insight into distal enhancer regulation and tumorigenesis. *Pediatr Blood Cancer*, *64*(3).

Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., & Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem*, *56*(8), 711-721.

Baskin, B., Choufani, S., Chen, Y. A., Shuman, C., Parkinson, N., Lemyre, E., Micheil Innes, A., Stavropoulos, D. J., Ray, P. N., & Weksberg, R. (2014). High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet*, *133*(3), 321-330.

Bell, A. C., & Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature*, *405*(6785), 482-485.

Beygo, J., Citro, V., Sparago, A., De Crescenzo, A., Cerrato, F., Heitmann, M., Rademacher, K., Guala, A., Enklaar, T., Anichini, C., Cirillo Silengo, M., Graf, N., Prawitt, D., Cubellis, M. V., Horsthemke, B., Buiting, K., & Riccio, A. (2013). The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet*, *22*(3), 544-557.

Bhusari, S., Yang, B., Kueck, J., Huang, W., & Jarrard, D. F. (2011). Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer. *Prostate*, *71*(15), 1621-1630.

Binder, G., Begemann, M., Eggermann, T., & Kannenberg, K. (2011). Silver-Russell syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, *25*(1), 153-160.

- Blagitko, N., Mergenthaler, S., Schulz, U., Wollmann, H. A., Craigen, W., Eggermann, T., Ropers, H. H., & Kalscheuer, V. M. (2000).** Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion. *Hum Mol Genet*, *9*(11), 1587-1595.
- Blattler, A., Yao, L., Wang, Y., Ye, Z., Jin, V. X., & Farnham, P. J. (2013).** ZBTB33 binds unmethylated regions of the genome associated with actively expressed genes. *Epigenetics Chromatin*, *6*(1), 13.
- Blattner, C., Sparks, A., & Lane, D. (1999).** Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol*, *19*(5), 3704-3713.
- Blik, J., Maas, S. M., Ruijter, J. M., Hennekam, R. C., Alders, M., Westerveld, A., & Mannens, M. M. (2001).** Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet*, *10*(5), 467-476.
- Bohne, F. (2013).** Untersuchungen zu Effekten einer Kaiso (ZBTB33)-Bindung an die differentiell methylierte ICR 1.
- Botta, M., Haider, S., Leung, I. X., Lio, P., & Mozziconacci, J. (2010).** Intra- and inter-chromosomal interactions correlate with CTCF binding genome wide. *Mol Syst Biol*, *6*, 426.
- Brandt, J. (2013).** Funktionelle und strukturelle Charakterisierung trans-interagierender Regionen in Abhängigkeit des methylierungsspezifischen Status der H19/IGF2-Imprintingkontrollregion.
- Brioude, F., Kalish, J. M., Mussa, A., Foster, A. C., Blik, J., Ferrero, G. B., Boonen, S. E., Cole, T., Baker, R., Bertolotti, M., Cocchi, G., Coze, C., De Pellegrin, M., Hussain, K., Ibrahim, A., Kilby, M. D., Krajewska-Walasek, M., Kratz, C. P., Ladusans, E. J., Lapunzina, P., Le Bouc, Y., Maas, S. M., Macdonald, F., Ounap, K., Peruzzi, L., Rossignol, S., Russo, S., Shipster, C., Skorka, A., Tatton-Brown, K., Tenorio, J., Tortora, C., Gronskov, K., Netchine, I., Hennekam, R. C., Prawitt, D., Tumer, Z., Eggermann, T., Mackay, D. J. G., Riccio, A., & Maher, E. R. (2018).** Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol*.

Buck-Koehntop, B. A., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2012). Kaiso uses all three zinc fingers and adjacent sequence motifs for high affinity binding to sequence-specific and methyl-CpG DNA targets. *FEBS Lett*, 586(6), 734-739.

C

Carrera, I. A., de Zaldivar, M. S., Martin, R., Begemann, M., Soellner, L., & Eggermann, T. (2016). Microdeletions of the 7q32.2 imprinted region are associated with Silver-Russell syndrome features. *Am J Med Genet A*, 170(3), 743-749.

Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J., & Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, 16(19), 2491-2496.

Chaudhary, R., & Lal, A. (2017). Long noncoding RNAs in the p53 network. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(3).

Chiesa, N., De Crescenzo, A., Mishra, K., Perone, L., Carella, M., Palumbo, O., Mussa, A., Sparago, A., Cerrato, F., Russo, S., Lapi, E., Cubellis, M. V., Kanduri, C., Cirillo Silengo, M., Riccio, A., & Ferrero, G. B. (2012). The KCNQ1OT1 imprinting control region and non-coding RNA: new properties derived from the study of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome cases. *Hum Mol Genet*, 21(1), 10-25.

Choufani, S., Shuman, C., & Weksberg, R. (2010). Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 154c(3), 343-354.

Court, F., Baniol, M., Hagege, H., Petit, J. S., Lelay-Taha, M. N., Carbonell, F., Weber, M., Cathala, G., & Forne, T. (2011). Long-range chromatin interactions at the mouse *Igf2/H19* locus reveal a novel paternally expressed long non-coding RNA. *Nucleic Acids Res*, 39(14), 5893-5906.

Court, F., Tayama, C., Romanelli, V., Martin-Trujillo, A., Iglesias-Platas, I., Okamura, K., Sugahara, N., Simon, C., Moore, H., Harness, J. V., Keirstead, H., Sanchez-Mut, J. V., Kaneki, E., Lapunzina, P., Soejima, H., Wake, N., Esteller, M., Ogata, T., Hata, K., Nakabayashi, K., & Monk, D. (2014). Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res*, 24(4), 554-569.

Crouse, H. V. (1960). The Controlling Element in Sex Chromosome Behavior in *Sciara*. *Genetics*, 45(10), 1429-1443.

D

- Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B., & Baig, A. (2002).** The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res*, 30(13), 2911-2919.
- De Crescenzo, A., Coppola, F., Falco, P., Bernardo, I., Ausanio, G., Cerrato, F., Falco, L., & Riccio, A. (2011).** A novel microdeletion in the IGF2/H19 imprinting centre region defines a recurrent mutation mechanism in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Med Genet*, 54(4), e451-454.
- De La Rosa-Velazquez, I. A., Rincon-Arano, H., Benitez-Bribiesca, L., & Recillas-Targa, F. (2007).** Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res*, 67(6), 2577-2585.
- Delcuve, G. P., Rastegar, M., & Davie, J. R. (2009).** Epigenetic control. *J Cell Physiol*, 219(2), 243-250.
- Demars, J., Shmela, M. E., Rossignol, S., Okabe, J., Netchine, I., Azzi, S., Cabrol, S., Le Caignec, C., David, A., Le Bouc, Y., El-Osta, A., & Gicquel, C. (2010).** Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet*, 19(5), 803-814.
- Diaz-Meyer, N., Day, C. D., Khatod, K., Maher, E. R., Cooper, W., Reik, W., Junien, C., Graham, G., Algar, E., Der Kaloustian, V. M., & Higgins, M. J. (2003).** Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet*, 40(11), 797-801.
- Diaz-Meyer, N., Yang, Y., Sait, S. N., Maher, E. R., & Higgins, M. J. (2005).** Alternative mechanisms associated with silencing of CDKN1C in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet*, 42(8), 648-655.
- Ding, L. H., Shingyoji, M., Chen, F., Hwang, J. J., Burma, S., Lee, C., Cheng, J. F., & Chen, D. J. (2005).** Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res*, 164(1), 17-26.
- Drewell, R. A., Arney, K. L., Arima, T., Barton, S. C., Brenton, J. D., & Surani, M. A. (2002).** Novel conserved elements upstream of the H19 gene are transcribed and act as mesodermal enhancers. *Development*, 129(5), 1205-1213.

Du, M., Zhou, W., Beatty, L. G., Weksberg, R., & Sadowski, P. D. (2004). The KCNQ1OT1 promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15.5. *Genomics*, *84*(2), 288-300.

Dugimont, T., Montpellier, C., Adriaenssens, E., Lottin, S., Dumont, L., Iotsova, V., Lagrou, C., Stehelin, D., Coll, J., & Cury, J. J. (1998). The H19 TATA-less promoter is efficiently repressed by wild-type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene*, *16*(18), 2395-2401.

Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*(6), 457-467.

E

Eggermann, K., Blied, J., Brioude, F., Algar, E., Buiting, K., Russo, S., Tümer, Z., Monk, D., Moore, G., Antoniadi, T., Macdonald, F., Netchine, I., Lombardi, P., Soellner, L., Begemann, M., Prawitt, D., Maher, E. R., Mannens, M., Riccio, A., Weksberg, R., Lapunzina, P., Gronskov, K., Mackay, D. J., & Eggermann, T. (2016). EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of chromosome 11p15 imprinting disorders: Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*, *24*(10), 1377-1387.

Eggermann, T., Brioude, F., Russo, S., Lombardi, M. P., Blied, J., Maher, E. R., Larizza, L., Prawitt, D., Netchine, I., Gonzales, M., Gronskov, K., Tümer, Z., Monk, D., Mannens, M., Chrzanowska, K., Walasek, M. K., Begemann, M., Soellner, L., Eggermann, K., Tenorio, J., Nevado, J., Moore, G. E., Mackay, D. J., Temple, K., Gillessen-Kaesbach, G., Ogata, T., Weksberg, R., Algar, E., & Lapunzina, P. (2016). Prenatal molecular testing for Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: a challenge for molecular analysis and genetic counseling. *Eur J Hum Genet*, *24*(6), 784-793.

Eggermann, T., De Nanclares, G. P., Maher, E. R., Temple, I. K., Tümer, Z., Monk, D., Mackay, D. J. G., Grønskov, K., Riccio, A., & Linglart, A. (2015). Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics*, *7*(1), 123.

Eggermann, T., Eggermann, K., & Schonherr, N. (2008). Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet*, *24*(4), 195-204.

Eggermann, T., Heilsberg, A. K., Bens, S., Siebert, R., Beygo, J., Buiting, K., Begemann, M., & Soellner, L. (2014). Additional molecular findings in 11p15-associated imprinting disorders: an urgent need for multi-locus testing. *J Mol Med (Berl)*, *92*(7), 769-777.

Eggermann, T., Netchine, I., Temple, I. K., Tumer, Z., Monk, D., Mackay, D., Gronskov, K., Riccio, A., Linglart, A., & Maher, E. R. (2015). Congenital imprinting disorders: EUCID.net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. *Clin Epigenetics*, 7, 23.

Eggermann, T., Spengler, S., Begemann, M., Binder, G., Buiting, K., Albrecht, B., & Spranger, S. (2012). Deletion of the paternal allele of the imprinted MEST/PEG1 region in a patient with Silver-Russell syndrome features. *Clin Genet*, 81(3), 298-300.

Ekstrom, T. J., Cui, H., Li, X., & Ohlsson, R. (1995). Promoter-specific IGF2 imprinting status and its plasticity during human liver development. *Development*, 121(2), 309-316.

Espinosa, J. M. (2008). Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene*, 27(29), 4013-4023.

F

Fei, P., & El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5774-5783.

Ferguson-Smith, A. C. (2011). Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet*, 12(8), 565-575.

Ferguson-Smith, A. C., Cattanach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V., & Surani, M. A. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature*, 351(6328), 667-670.

Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36(28), 3943-3956.

Fitzpatrick, G. V., Soloway, P. D., & Higgins, M. J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet*, 32(3), 426-431.

Fryssira, H., Amenta, S., Kanber, D., Sofocleous, C., Lykopoulou, E., Kanaka-Gantenbein, C., Cerrato, F., Ludecke, H. J., Bens, S., Riccio, A., & Buiting, K. (2015). A novel large deletion of the ICR1 region including H19 and putative enhancer elements. *BMC Med Genet*, 16, 30.

G

Gabory, A., Jammes, H., & Dandolo, L. (2010). The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays*, 32(6), 473-480.

Gabory, A., Ripoche, M. A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyat, A., Forne, T., Jammes, H., Ainscough, J. F., Surani, M. A., Journot, L., & Dandolo, L. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development*, 136(20), 3413-3421.

Gardner, R. J., Mackay, D. J., Mungall, A. J., Polychronakos, C., Siebert, R., Shield, J. P., Temple, I. K., & Robinson, D. O. (2000). An imprinted locus associated with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet*, 9(4), 589-596.

Ghirlando, R., & Felsenfeld, G. (2016). CTCF: making the right connections. *Genes Dev*, 30(8), 881-891.

Gicquel, C., & Le Bouc, Y. (2006). Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res*, 65 Suppl 3, 28-33.

H

Hall, B. K. (1992). *Evolutionary Developmental Biology*.

Hannula-Jouppi, K., Muurinen, M., Lipsanen-Nyman, M., Reinius, L. E., Ezer, S., Greco, D., & Kere, J. (2014). Differentially methylated regions in maternal and paternal uniparental disomy for chromosome 7. *Epigenetics*, 9(3), 351-365.

Hansen, A. S., Pustova, I., Cattoglio, C., Tjian, R., & Darzacq, X. (2017). CTCF and cohesin regulate chromatin loop stability with distinct dynamics. *Elife*, 6.

Hattman, S., Kenny, C., Berger, L., & Pratt, K. (1978). Comparative study of DNA methylation in three unicellular eucaryotes. *J Bacteriol*, 135(3), 1156-1157.

Hitchins, M. P., Bentley, L., Monk, D., Beechey, C., Peters, J., Kelsey, G., Ishino, F., Preece, M. A., Stanier, P., & Moore, G. E. (2002). DDC and COBL, flanking the imprinted GRB10 gene on 7p12, are biallelically expressed. *Mamm Genome*, 13(12), 686-691.

Holliday, R. (1994). Epigenetics: an overview. *Dev Genet*, 15(6), 453-457.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., & Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 22(17), 3551-3555.

Holthuizen, P., Van Dijk, M. A., Rodenburg, R. J., Koonen-Reemst, A. M., & Sussenbach, J. S. (1993). Transcriptional regulation of the major promoters of the human IGF-II gene. *Mol Reprod Dev*, 35(4), 391-393.

Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T. C., Shirayoshi, Y., & Oshimura, M. (2000). Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*, 9(14), 2075-2083.

Hsieh, J. K., Yap, D., O'Connor, D. J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., & Lu, X. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 22(1), 78-93.

Hu, W., Feng, Z., & Levine, A. J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer*, 3(3-4), 199-208.

I

Ibrahim, A., Kirby, G., Hardy, C., Dias, R. P., Tee, L., Lim, D., Berg, J., MacDonald, F., Nightingale, P., & Maher, E. R. (2014). Methylation analysis and diagnostics of Beckwith-Wiedemann syndrome in 1,000 subjects. *Clin Epigenetics*, 6(1), 11.

Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N., & Nakao, M. (2005). Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem*, 280(14), 13928-13935.

Iglesias-Platas, I., Martin-Trujillo, A., Petazzi, P., Guillaumet-Adkins, A., Esteller, M., & Monk, D. (2014). Altered expression of the imprinted transcription factor PLAGL1 deregulates a network of genes in the human IUGR placenta. *Hum Mol Genet*, 23(23), 6275-6285.

Ishihara, K., Hatano, N., Furuumi, H., Kato, R., Iwaki, T., Miura, K., Jinno, Y., & Sasaki, H. (2000). Comparative genomic sequencing identifies novel tissue-specific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in Igf2/H19 imprinting. *Genome Res*, 10(5), 664-671.

Ito, Y., Koessler, T., Ibrahim, A. E., Rai, S., Vowler, S. L., Abu-Amero, S., Silva, A. L., Maia, A. T., Huddleston, J. E., Uribe-Lewis, S., Woodfine, K., Jagodic, M., Nativio, R., Dunning, A., Moore, G., Klenova, E., Bingham, S., Pharoah, P. D., Brenton, J. D., Beck, S., Sandhu, M. S., & Murrell, A. (2008). Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 17(17), 2633-2643.

J

- Jackson, P., Mastrangelo, I., Reed, M., Tegtmeyer, P., Yardley, G., & Barrett, J. (1998).** Synergistic transcriptional activation of the MCK promoter by p53: tetramers link separated DNA response elements by DNA looping. *Oncogene*, *16*(2), 283-292.
- Jeltsch, A. (2002).** Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*, *3*(4), 274-293.
- Jirtle, J. (2017).** Imprinted Gene Database. Retrieved from <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>
- Jirtle, R., & Weidman, J. (2007).** Imprinted and More Equal Why silence perfectly good copies of important genes? The answer may lie in a battle between mother and father staged in the genome of their offspring. *American Scientist*, *95*(2), 143-149.
- Jordan, J. J., Menendez, D., Inga, A., Nouredine, M., Bell, D. A., & Resnick, M. A. (2008).** Noncanonical DNA motifs as transactivation targets by wild type and mutant p53. *PLoS Genet*, *4*(6), e1000104.
- Joyce, C. A., Sharp, A., Walker, J. M., Bullman, H., & Temple, I. K. (1999).** Duplication of 7p12.1-p13, including GRB10 and IGFBP1, in a mother and daughter with features of Silver-Russell syndrome. *Hum Genet*, *105*(3), 273-280.

K

- Kagami, M., Kurosawa, K., Miyazaki, O., Ishino, F., Matsuoka, K., & Ogata, T. (2015).** Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet*, *23*(11), 1488-1498.
- Kagami, M., Sekita, Y., Nishimura, G., Irie, M., Kato, F., Okada, M., Yamamori, S., Kishimoto, H., Nakayama, M., Tanaka, Y., Matsuoka, K., Takahashi, T., Noguchi, M., Tanaka, Y., Masumoto, K., Utsunomiya, T., Kouzan, H., Komatsu, Y., Ohashi, H., Kurosawa, K., Kosaki, K., Ferguson-Smith, A. C., Ishino, F., & Ogata, T. (2008).** Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet*, *40*(2), 237-242.
- Kamakaka, R. T., & Biggins, S. (2005).** Histone variants: deviants? *Genes Dev*, *19*(3), 295-310.
- Kanduri, C. (2011).** Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA. *Semin Cell Dev Biol*, *22*(4), 343-350.

Kaneko, S., Li, G., Son, J., Xu, C. F., Margueron, R., Neubert, T. A., & Reinberg, D. (2010). Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev*, 24(23), 2615-2620.

Kikuchi, T., Toyota, M., Itoh, F., Suzuki, H., Obata, T., Yamamoto, H., Kakiuchi, H., Kusano, M., Issa, J. P., Tokino, T., & Imai, K. (2002). Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene*, 21(17), 2741-2749.

Kolovos, P., van de Werken, H. J., Kepper, N., Zuin, J., Brouwer, R. W., Kockx, C. E., Wendt, K. S., van IJcken, W. F., Grosveld, F., & Knoch, T. A. (2014). Targeted Chromatin Capture (T2C): a novel high resolution high throughput method to detect genomic interactions and regulatory elements. *Epigenetics & Chromatin*, 7(1), 10.

Kondo, M., Suzuki, H., Ueda, R., Osada, H., Takagi, K., Takahashi, T., & Takahashi, T. (1995). Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene*, 10(6), 1193-1198.

Kondo, Y. (2009). Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J*, 50(4), 455-463.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.

Kurukuti, S., Tiwari, V. K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanenkov, V., Reik, W., & Ohlsson, R. (2006). CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(28), 10684-10689.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lahbib-Mansais, Y., Barasc, H., Marti-Marimon, M., Mompert, F., Iannuccelli, E., Robelin, D., Riquet, J., & Yerle-Bouissou, M. (2016). Expressed alleles of imprinted IGF2, DLK1 and MEG3 colocalize in 3D-preserved nuclei of porcine fetal cells. *BMC Cell Biol*, 17(1), 35.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.

Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263.

- Langer, D. (2012).** Kaiso und CTCF regulieren geprägte Gene in cis und in trans
- Lavin, M. F., & Gueven, N. (2006).** The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*, 13(6), 941-950.
- Lee, D. F., Su, J., Kim, H. S., Chang, B., Papatsenko, D., Zhao, R., Yuan, Y., Gingold, J., Xia, W., Darr, H., Mirzayans, R., Hung, M. C., Schaniel, C., & Lemischka, I. R. (2015).** Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. *Cell*, 161(2), 240-254.
- Lee, J. T. (2010).** The X as model for RNA's niche in epigenomic regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(9), a003749.
- Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S. C., Ishino, F., & Surani, M. A. (1997).** Genomic structure and parent-of-origin-specific methylation of Peg1. *Hum Mol Genet*, 6(11), 1907-1915.
- Levine, A. J. (1997).** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323-331.
- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., & Gu, W. (2003).** Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, 302(5652), 1972-1975.
- Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., & Ferguson-Smith, A. C. (2008).** A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell*, 15(4), 547-557.
- Lincoln, R. J., G.A. BOXSHALL & P.F. CLARK. (1982).** *Dictionary of Ecology*.
- Ling, J. Q., Li, T., Hu, J. F., Vu, T. H., Chen, H. L., Qiu, X. W., Cherry, A. M., & Hoffman, A. R. (2006).** CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science*, 312(5771), 269-272.
- Link, N., Kurtz, P., O'Neal, M., Garcia-Hughes, G., & Abrams, J. M. (2013).** A p53 enhancer region regulates target genes through chromatin conformations in cis and in trans. *Genes Dev*, 27(22), 2433-2438.
- Linzer, D. I., & Levine, A. J. (1979).** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17(1), 43-52.

Loughery, J., Cox, M., Smith, L. M., & Meek, D. W. (2014). Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res*, 42(12), 7666-7680.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260.

Lui, J. C., Finkielstain, G. P., Barnes, K. M., & Baron, J. (2008). An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(1), R189-196.

Luo, G. Z., Blanco, M. A., Greer, E. L., He, C., & Shi, Y. (2015). DNA N(6)-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(12), 705-710.

Luo, M., Li, Z., Wang, W., Zeng, Y., Liu, Z., & Qiu, J. (2013). Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett*, 333(2), 213-221.

M

Maleszka, R., Mason, P. H., & Barron, A. B. (2014). Epigenomics and the concept of degeneracy in biological systems. *Brief Funct Genomics*, 13(3), 191-202.

Martinet, C., Monnier, P., Louault, Y., Benard, M., Gabory, A., & Dandolo, L. (2016). H19 controls reactivation of the imprinted gene network during muscle regeneration. *Development*, 143(6), 962-971.

Matouk, I. J., DeGroot, N., Mezan, S., Ayesh, S., Abu-lail, R., Hochberg, A., & Galun, E. (2007). The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS One*, 2(9), e845.

Matouk, I. J., Mezan, S., Mizrahi, A., Ohana, P., Abu-Lail, R., Fellig, Y., Degroot, N., Galun, E., & Hochberg, A. (2010). The oncofetal H19 RNA connection: hypoxia, p53 and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1803(4), 443-451.

Matouk, I. J., Raveh, E., Abu-lail, R., Mezan, S., Gilon, M., Gershtain, E., Birman, T., Gallula, J., Schneider, T., Barkali, M., Richler, C., Fellig, Y., Sorin, V., Hubert, A., Hochberg, A., & Czerniak, A. (2014). Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1843(7), 1414-1426.

- McEwen, K. R., & Ferguson-Smith, A. C. (2010).** Distinguishing epigenetic marks of developmental and imprinting regulation. *Epigenetics Chromatin*, 3(1), 2.
- McLure, K. G., & Lee, P. W. (1998).** How p53 binds DNA as a tetramer. *Embo j*, 17(12), 3342-3350.
- Meek, D. W. (2015).** Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J*, 469(3), 325-346.
- Meek, D. W., & Anderson, C. W. (2009).** Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a000950.
- Melo, C. A., Drost, J., Wijchers, P. J., van de Werken, H., de Wit, E., Oude Vrielink, J. A., Elkon, R., Melo, S. A., Leveille, N., Kalluri, R., de Laat, W., & Agami, R. (2013).** eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Mol Cell*, 49(3), 524-535.
- Menendez, D., Inga, A., & Resnick, M. A. (2009).** The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer*, 9(10), 724-737.
- Mersfelder, E. L., & Parthun, M. R. (2006).** The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res*, 34(9), 2653-2662.
- Merz, M. (2015).** Die Rolle von H19 in einem erweiterten Netzwerk geprägter Gene.
- Miyoshi, N., Kuroiwa, Y., Kohda, T., Shitara, H., Yonekawa, H., Kawabe, T., Hasegawa, H., Barton, S. C., Surani, M. A., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. (1998).** Identification of the Meg1/Grb10 imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1102-1107.
- Mizutani, S., Boettiger, D., & Temin, H. M. (1970).** A DNA-dependent DNA polymerase and a DNA endonuclease in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 228(5270), 424-427.
- Monk, D., Sanches, R., Arnaud, P., Apostolidou, S., Hills, F. A., Abu-Amero, S., Murrell, A., Friess, H., Reik, W., Stanier, P., Constancia, M., & Moore, G. E. (2006).** Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet*, 15(8), 1259-1269.

- Monk, D., Wakeling, E. L., Proud, V., Hitchins, M., Abu-Amero, S. N., Stanier, P., Preece, M. A., & Moore, G. E. (2000).** Duplication of 7p11.2-p13, including GRB10, in Silver-Russell syndrome. *Am J Hum Genet*, 66(1), 36-46.
- Monnier, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., Ait-Si-Ali, S., & Dandolo, L. (2013).** H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), 20693-20698.
- Moore, T., & Haig, D. (1991).** Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet*, 7(2), 45-49.
- Morange, M. (2009).** What history tells us XVII. Conrad Waddington and The nature of life. *J. Biosci.*, 34(2), 4.
- Murakami, K., Oshimura, M., & Kugoh, H. (2007).** Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1. *J Hum Genet*, 52(11), 926-933.
- Murata, A., Baba, Y., Watanabe, M., Shigaki, H., Miyake, K., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Iwagami, S., Yoshida, N., Oki, E., Morita, M., Nakao, M., & Baba, H. (2014).** IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 21(4), 1166-1174.
- Murphy, S. K., & Jirtle, R. L. (2003).** Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays*, 25(6), 577-588.
- Murrell, A., Heeson, S., & Reik, W. (2004).** Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet*, 36(8), 889-893.
- Murrell, A., Ito, Y., Verde, G., Huddleston, J., Woodfine, K., Silengo, M. C., Spreafico, F., Perotti, D., De Crescenzo, A., Sparago, A., Cerrato, F., & Riccio, A. (2008).** Distinct methylation changes at the IGF2-H19 locus in congenital growth disorders and cancer. *PLoS One*, 3(3), e1849.

N

- Nakagawa, H., Chadwick, R. B., Peltomaki, P., Plass, C., Nakamura, Y., & de La Chapelle, A. (2001).** Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2), 591-596.

Nakano, S., Murakami, K., Meguro, M., Soejima, H., Higashimoto, K., Urano, T., Kugoh, H., Mukai, T., Ikeguchi, M., & Oshimura, M. (2006). Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Sci*, 97(11), 1147-1154.

Nativio, R., Sparago, A., Ito, Y., Weksberg, R., Riccio, A., & Murrell, A. (2011). Disruption of genomic neighbourhood at the imprinted IGF2-H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Hum Mol Genet*, 20(7), 1363-1374.

Nativio, R., Wendt, K. S., Ito, Y., Huddleston, J. E., Uribe-Lewis, S., Woodfine, K., Krueger, C., Reik, W., Peters, J. M., & Murrell, A. (2009). Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. *PLoS Genet*, 5(11), e1000739.

Neri, G., & Moscarda, M. (2009). Overgrowth syndromes: a classification. *Endocr Dev*, 14, 53-60.

Neverisky, D. L., & Abbott, G. W. (2015). Ion channel-transporter interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 51(4), 257-267.

Nikulenkov, F., Spinnler, C., Li, H., Tonelli, C., Shi, Y., Turunen, M., Kivioja, T., Ignatiev, I., Kel, A., Taipale, J., & Selivanova, G. (2012). Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death Differ*, 19(12), 1992-2002.

O

O'Dell, S. D., & Day, I. N. (1998). Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol*, 30(7), 767-771.

Ogawa, O., Eccles, M. R., Szeto, J., McNoe, L. A., Yun, K., Maw, M. A., Smith, P. J., & Reeve, A. E. (1993). Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*, 362(6422), 749-751.

P

Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H. C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., Cobb, B. S., Yokomori, K., Dillon, N., Aragon, L., Fisher, A. G., & Merkschlager, M. (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*, 132(3), 422-433.

Park, I. Y., Sohn, B. H., Choo, J. H., Joe, C. O., Seong, J. K., Lee, Y. I., & Chung, J. H. (2005). Deregulation of DNA methyltransferases and loss of parental methylation at the insulin-like growth factor II (Igf2)/H19 loci in p53 knockout mice prior to tumor development. *J Cell Biochem*, 94(3), 585-596.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.

Phillips, J. E., & Corces, V. G. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, 137(7), 1194-1211.

Prawitt, D., Enklaar, T., Gartner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Oswald, M., Lausch, E., Schmidtke, P., Reutzel, D., Fees, S., Lucito, R., Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Housman, D. E., Pelletier, J., & Zabel, B. (2005). Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 4085-4090.

Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., & Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*, 15(13), 1613-1618.

Prokhortchouk, A., Sansom, O., Selfridge, J., Caballero, I. M., Salozhin, S., Aithozhina, D., Cerchietti, L., Meng, F. G., Augenlicht, L. H., Mariadason, J. M., Hendrich, B., Melnick, A., Prokhortchouk, E., Clarke, A., & Bird, A. (2006). Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol Cell Biol*, 26(1), 199-208.

Q

Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P. V., Grimaldi, G., Riccio, A., & Trono, D. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell*, 44(3), 361-372.

R

Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E., & Feinberg, A. P. (1993). Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, 362(6422), 747-749.

Reik, W., Santos, F., & Dean, W. (2003). Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 59(1), 21-32.

Reik, W., & Walter, J. (2001). Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet*, 27(3), 255-256.

Rekosh, D. M., Lodish, H., & Baltimore, D. (1970). Protein synthesis in Escherichia coli extracts programmed by poliovirus RNA. *J Mol Biol*, 54(2), 327-340.

- Ribarska, T., Goering, W., Droop, J., Bastian, K. M., Ingenwerth, M., & Schulz, W. A. (2014).** Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer. *Epigenetics*, 9(5), 704-717.
- Riesewijk, A. M., Hu, L., Schulz, U., Tariverdian, G., Hoglund, P., Kere, J., Ropers, H. H., & Kalscheuer, V. M. (1997).** Monoallelic expression of human PEG1/MEST is paralleled by parent-specific methylation in fetuses. *Genomics*, 42(2), 236-244.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008).** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 402-412.
- Rodova, M., Kelly, K. F., VanSaun, M., Daniel, J. M., & Werle, M. J. (2004).** Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol Cell Biol*, 24(16), 7188-7196.
- Ronaghi, M. (2001).** Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*, 11(1), 3-11.
- Rubio, E. D., Reiss, D. J., Welsh, P. L., Distèche, C. M., Filippova, G. N., Baliga, N. S., Aebersold, R., Ranish, J. A., & Krumm, A. (2008).** CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(24), 8309-8314.
- Russo, V. E. A., Martienssen, A., & Riggs, A. D. (1996).** *Epigenetic mechanisms of gene regulation*.

S

- Sachwitz, J., Strobl-Wildemann, G., Fekete, G., Ambrozaityte, L., Kucinkas, V., Soellner, L., Begemann, M., & Eggermann, T. (2016).** Examinations of maternal uniparental disomy and epimutations for chromosomes 6, 14, 16 and 20 in Silver-Russell syndrome-like phenotypes. *BMC Med Genet*, 17, 20.
- Sampaoli, C., Cerquetti, L., Gawhary, R. E., Bucci, B., Amendola, D., Marchese, R., Misiti, S., Novelli, G., Toscano, V., & Stigliano, A. (2012).** p53 Stabilization induces cell growth inhibition and affects IGF2 pathway in response to radiotherapy in adrenocortical cancer cells. *PLoS One*, 7(9), e45129.
- Sandhu, K. S., Shi, C., Sjolinder, M., Zhao, Z., Gondor, A., Liu, L., Tiwari, V. K., Guibert, S., Emilsson, L., Imreh, M. P., & Ohlsson, R. (2009).** Nonallelic transvection of multiple imprinted loci is organized by the H19 imprinting control region during germline development. *Genes Dev*, 23(22), 2598-2603.

- Schagdarsurengin, U., Lammert, A., Schunk, N., Sheridan, D., Gattenloehner, S., Steger, K., Wagenlehner, F., & Dansranjav, T. (2017).** Impairment of IGF2 gene expression in prostate cancer is triggered by epigenetic dysregulation of IGF2-DMR0 and its interaction with KLF4. *Cell Commun Signal*, 15(1), 40.
- Schwienbacher, C., Gramantieri, L., Scelfo, R., Veronese, A., Calin, G. A., Bolondi, L., Croce, C. M., Barbanti-Brodano, G., & Negrini, M. (2000).** Gain of imprinting at chromosome 11p15: A pathogenetic mechanism identified in human hepatocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10), 5445-5449.
- Shiloh, Y. (2003).** ATM: ready, set, go. *Cell Cycle*, 2(2), 116-117.
- Soejima, H., Nakagawachi, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Urano, T., Matsukura, S., Kitajima, Y., Takeuchi, M., Nakayama, M., Oshimura, M., Miyazaki, K., Joh, K., & Mukai, T. (2004).** Silencing of imprinted CDKN1C gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer. *Oncogene*, 23(25), 4380-4388.
- Sparago, A., Cerrato, F., & Riccio, A. (2018).** Is ZFP57 binding to H19/IGF2:IG-DMR affected in Silver-Russell syndrome? *Clin Epigenetics*, 10, 23.
- Sparago, A., Cerrato, F., Vernucci, M., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., & Riccio, A. (2004).** Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*, 36(9), 958-960.
- Sparago, A., Russo, S., Cerrato, F., Ferraiuolo, S., Castorina, P., Selicorni, A., Schwienbacher, C., Negrini, M., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., Anichini, C., Larizza, L., & Riccio, A. (2007).** Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet*, 16(3), 254-264.
- Spengler, S., Gogiel, M., Schonherr, N., Binder, G., & Eggermann, T. (2009).** Screening for genomic variants in ZFP57 in Silver-Russell syndrome patients with 11p15 epimutations. *Eur J Med Genet*, 52(6), 415-416.
- Sredni, S. T., de Camargo, B., Lopes, L. F., Teixeira, R., & Simpson, A. (2001).** Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer*, 37(5), 455-458.

Su, D., Wang, X., Campbell, M. R., Song, L., Safi, A., Crawford, G. E., & Bell, D. A. (2015). Interactions of chromatin context, binding site sequence content, and sequence evolution in stress-induced p53 occupancy and transactivation. *PLoS Genet*, *11*(1), e1004885.

Sullivan, M. J., Taniguchi, T., Jhee, A., Kerr, N., & Reeve, A. E. (1999). Relaxation of IGF2 imprinting in Wilms tumours associated with specific changes in IGF2 methylation. *Oncogene*, *18*(52), 7527-7534.

Szyf, M. (2007). The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci*, *100*(1), 7-23.

Szyf, M., McGowan, P., & Meaney, M. J. (2008). The social environment and the epigenome. *Environ Mol Mutagen*, *49*(1), 46-60.

T

Temple, I. K., Cockwell, A., Hassold, T., Pettay, D., & Jacobs, P. (1991). Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet*, *28*(8), 511-514.

Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., & Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*, *31*(20), e122.

Toledo, F., & Wahl, G. M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, *6*(12), 909-923.

V

Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Akin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., Pavlidis, P., & Journot, L. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell*, *11*(5), 711-722.

Veprintsev, D. B., & Fersht, A. R. (2008). Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. *Nucleic Acids Res*, *36*(5), 1589-1598.

Verfaillie, A., Svetlichnyy, D., Imrichova, H., Davie, K., Fiers, M., Kalender Atak, Z., Hulselmans, G., Christiaens, V., & Aerts, S. (2016). Multiplex enhancer-reporter assays uncover unsophisticated TP53 enhancer logic. *Genome Res*, *26*(7), 882-895.

Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*(6810), 307-310.

Vu, T. H., Jirtle, R. L., & Hoffman, A. R. (2006). Cross-species clues of an epigenetic imprinting regulatory code for the IGF2R gene. *Cytogenet Genome Res*, 113(1-4), 202-208.

Vyas, P., Beno, I., Xi, Z., Stein, Y., Golovenko, D., Kessler, N., Rotter, V., Shakked, Z., & Haran, T. E. (2017). Diverse p53/DNA binding modes expand the repertoire of p53 response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(40), 10624-10629.

W

Waddington, C. H. (1956). *Principles of embryology*.

Wakeling, E. L., Brioude, F., Lokulo-Sodipe, O., O'Connell, S. M., Salem, J., Blied, J., Canton, A. P., Chrzanowska, K. H., Davies, J. H., Dias, R. P., Dubern, B., Elbracht, M., Giabicani, E., Grimberg, A., Gronskov, K., Hokken-Koelega, A. C., Jorge, A. A., Kagami, M., Linglart, A., Maghnie, M., Mohnike, K., Monk, D., Moore, G. E., Murray, P. G., Ogata, T., Petit, I. O., Russo, S., Said, E., Toumba, M., Tumer, Z., Binder, G., Eggermann, T., Harbison, M. D., Temple, I. K., Mackay, D. J., & Netchine, I. (2017). Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol*, 13(2), 105-124.

Wang, B., Xiao, Z., & Ren, E. C. (2009). Redefining the p53 response element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14373-14378.

Wang, C. C., Liao, Y. P., Mischel, P. S., Iwamoto, K. S., Cacalano, N. A., & McBride, W. H. (2006). HDJ-2 as a target for radiosensitization of glioblastoma multiforme cells by the farnesyltransferase inhibitor R115777 and the role of the p53/p21 pathway. *Cancer Res*, 66(13), 6756-6762.

Warters, R. L., Packard, A. T., Kramer, G. F., Gaffney, D. K., & Moos, P. J. (2009). Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation. *Radiat Res*, 172(1), 82-95.

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M. A., Sakaki, Y., & Sasaki, H. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194), 539-543.

Weinberg, R. L., Veprintsev, D. B., & Fersht, A. R. (2004). Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol*, 341(5), 1145-1159.

- Weksberg, R., Nishikawa, J., Caluseriu, O., Fei, Y. L., Shuman, C., Wei, C., Steele, L., Cameron, J., Smith, A., Ambus, I., Li, M., Ray, P. N., Sadowski, P., & Squire, J. (2001).** Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet*, *10*(26), 2989-3000.
- Weksberg, R., Shuman, C., & Beckwith, J. B. (2010).** Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*, *18*(1), 8-14.
- Wendt, K. S., & Peters, J. M. (2009).** How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res*, *17*(2), 201-214.
- Wendt, K. S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., Yahata, K., Imamoto, F., Aburatani, H., Nakao, M., Imamoto, N., Maeshima, K., Shirahige, K., & Peters, J. M. (2008).** Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, *451*(7180), 796-801.
- Wilkins, A. (1997).** Epigenetics. *Bioessays*, *19*(10), 933-935.
- Wilson, G. G., & Murray, N. E. (1991).** Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet*, *25*, 585-627.
- Y**
- Yoon, H. G., Chan, D. W., Reynolds, A. B., Qin, J., & Wong, J. (2003).** N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell*, *12*(3), 723-734.
- Yoon, Y. S., Jeong, S., Rong, Q., Park, K. Y., Chung, J. H., & Pfeifer, K. (2007).** Analysis of the H19ICR insulator. *Mol Cell Biol*, *27*(9), 3499-3510.
- Yoshihara, Y., Wu, D., Kubo, N., Sang, M., Nakagawara, A., & Ozaki, T. (2012).** Inhibitory role of E2F-1 in the regulation of tumor suppressor p53 during DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun*, *421*(1), 57-63.
- Younger, S. T., Kenzelmann-Broz, D., Jung, H., Attardi, L. D., & Rinn, J. L. (2015).** Integrative genomic analysis reveals widespread enhancer regulation by p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*, *43*(9), 4447-4462.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Rago, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1999).** Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(25), 14517-14522.

Yusufzai, T. M., Tagami, H., Nakatani, Y., & Felsenfeld, G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell*, *13*(2), 291-298.

Z

Zhang, L., Kashanchi, F., Zhan, Q., Zhan, S., Brady, J. N., Fornace, A. J., Seth, P., & Helman, L. J. (1996). Regulation of insulin-like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res*, *56*(6), 1367-1373.

Zhang, L., Zhan, Q., Zhan, S., Kashanchi, F., Fornace Jr, A. J., Seth, P., & Helmann, L. J. (1998). p53 regulates human insulin-like growth factor II gene expression through active P4 promoter in rhabdomyosarcoma cells. *DNA and cell biology*, *17*(2), 125-131.

Zhao, J., Ohsumi, T. K., Kung, J. T., Ogawa, Y., Grau, D. J., Sarma, K., Song, J. J., Kingston, R. E., Borowsky, M., & Lee, J. T. (2010). Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell*, *40*(6), 939-953.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H., & Levine, A. J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*, *14*(8), 981-993.

Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjolinder, M., Gondor, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K. S., Singh, U., Pant, V., Tiwari, V., Kurukuti, S., & Ohlsson, R. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet*, *38*(11), 1341-1347.

8. Anhang

Tab. 8-1 Expressionsverhältnisse der Haushaltsgene

In der Tabelle sind die Verhältnisse der getesteten Haushaltsgene zueinander angegeben. In Rot markierte Werte wichen um mehr als 50 % vom Median ab.

	<i>TBP/HPRT</i>	<i>ACTB/HPRT</i>	<i>TBP/ACTB</i>	<i>TBP/ATP5J</i>	<i>ACTB/ATP5J</i>	<i>HPRT/ATP5J</i>
BWS ΔH19/ICR1 1	1,57	1,39	1,13	0,21	0,18	0,13
BWS ΔH19/ICR1 2	1,75	2,11	0,83	0,60	0,73	0,35
BWS ΔH19/ICR1 3	1,50	2,42	0,62	0,59	0,95	0,39
BWS ΔH19/ICR1 4	1,28	2,02	0,63	0,70	1,11	0,55
BWS ΔH19/ICR1 5	1,30	3,09	0,42	0,65	1,54	0,50
BWS ΔH19/ICR1 6	2,09	1,82	1,15	0,47	0,41	0,23
BWS ΔH19/ICR1 7	1,28	1,12	1,14	0,21	0,18	0,16
BWS ΔH19/ICR1 8	1,15	2,27	0,51	0,47	0,93	0,41
BWS ΔH19/ICR1 9	1,26	2,11	0,60	0,39	0,65	0,31
SRS UPD11 1	1,90	3,08	0,62	0,48	0,78	0,25
SRS UPD11 2	5,43	4,83	1,12	0,71	0,64	0,13
SRS UPD11 3	1,42	2,94	0,48	0,26	0,54	0,18
SRS UPD114	1,81	3,66	0,49	0,74	1,49	0,41
SRS UPD11 5	2,02	3,07	0,66	0,70	1,07	0,35
SRS UPD11 6	1,48	2,97	0,50	0,47	0,93	0,31
SRS UPD11 7	1,31	1,88	0,70	0,44	0,62	0,33
SRS UPD11 8	1,98	3,84	0,52	0,54	1,05	0,27
SRS UPD11 9	1,84	2,51	0,74	0,44	0,60	0,24
SRS UPD11 10	1,63	2,81	0,58	0,46	0,79	0,28
SRS UPD11 11	1,55	3,13	0,50	0,43	0,86	0,27
SRS UPD11 12	2,14	3,31	0,64	0,40	0,63	0,19
BWS UPD11 1	1,86	3,08	0,61	0,38	0,63	0,20
BWS UPD11 2	1,72	3,78	0,46	0,31	0,67	0,18
BWS UPD11 3	1,74	2,36	0,73	0,35	0,47	0,20
BWS UPD11 4	1,97	2,32	0,85	0,40	0,47	0,20
BWS UPD11 5	1,25	2,69	0,46	0,26	0,55	0,20
BWS UPD11 6	1,30	2,45	0,53	0,45	0,85	0,35
BWS UPD11 7	1,96	2,32	0,85	0,35	0,42	0,18
BWS UPD11 8	1,90	3,15	0,60	0,54	0,90	0,28
SRS UPD7 1	3,07	1,26	2,44	0,31	0,27	0,13
SRS UPD7 2	2,40	2,13	1,13	0,59	0,74	0,37
SRS UPD7 3	1,60	2,04	0,79	0,33	0,37	0,34
SRS UPD7 4	0,97	1,11	0,88	0,30	0,16	0,16
SRS UPD7 5	1,88	1,05	1,79	0,51	0,78	0,25
SRS UPD7 6	2,03	3,10	0,65	0,42	0,43	0,21
SRS UPD7 7	2,03	2,09	0,97	0,38	0,36	0,19
SRS UPD7 8	2,03	1,91	1,06	0,25	0,22	0,20
SRS UPD7 9	1,30	1,12	1,16	0,47	0,40	0,24
SRS UPD7 10	1,98	1,67	1,19	0,21	0,18	0,13
Mw	1,81	2,46	0,81	0,45	0,66	0,26
STD	0,72	0,85	0,40	0,14	0,33	0,10
% von Mw	39,5	34,6	48,7	31,6	50,8	38,5
Med. – 50 %	0,87	1,18	0,33	0,22	0,31	0,12
Median	1,75	2,36	0,66	0,44	0,63	0,24
Med. + 50 %	2,62	3,55	0,98	0,65	0,94	0,36

Anhang

Tab. 8-2 DMRs von geprägten Region

Verändert nach Court *et al.* 2014

Chromosom	Start	Ende	Gen Locus
chr1	68515433	68517545	DIRAS3
chr1	68512505	68513486	DIRAS3 Ex2
chr1	40024626	40025540	LOC728448/PPIEL
chr2	207114583	207136544	ZBDF2
chr4	89618184	89619237	NAP1L5
chr6	3849082	3850359	FAM50B
chr6	144328078	144329888	PLAGL1
chr6	160426558	160427561	IGF2R
chr6	170054504	170055618	WDR27
chr7	50848726	50851312	GRB10
chr7	94285537	94287960	PEG10
chr7	130130122	130134388	MEST
chr7	154862719	154863382	HTR5A
chr8	141108147	141111081	PEG13/TRAPPC9
chr8	37604992	37606088	LOC728024/ERLIN2
chr10	121578046	121578727	INPP5Fv2
chr11	2018812	2024740	H19
chr11	2153991	2155112	IGF2 DMR2
chr11	2168333	2169768	IGF2 DMR0
chr11	2719948	2722259	KvDMR1
chr13	48892341	48895763	RB1
chr14	101275427	101278058	IG-DMR
chr14	101290524	101293978	MEG3
chr14	101370741	101371419	MEG8
chr15	23807086	23812495	MKRN3/ miR4508
chr15	23892425	23894029	MAGEL2
chr15	23931451	23932759	NDN
chr15	25068564	25069481	SNRPN
chr15	25093008	25093829	SNRPN
chr15	25123027	25123905	SNRPN
chr15	25200004	25201976	SNURF
chr15	99408496	99409650	IGF1R
chr15	24346736	24347142	SNRPN intragenic CpG32
chr15	24671872	24672679	SNRPN intragenic CpG29
chr15	24722753	24723071	SNRPN intragenic CpG30
chr15	25017924	25018886	SNRPN intragenic CpG40
chr16	3492828	3494463	ZNF597/NAT15
chr16	3481801	3482388	ZNF597
chr19	54040510	54042212	ZNF331
chr19	57348493	57353271	PEG3
chr19	54057086	54058425	ZNF331
chr20	30134663	30135933	MCTS2/HM13
chr20	36148604	36150528	BLCAP/NNAT
chr20	42142365	42144040	L3MBTL
chr20	57414039	57418612	NESP
chr20	57425649	57428033	NESP-AS/GNAS-AS1
chr20	57428905	57431463	GNAS XL
chr20	57463265	57465201	GNAS Ex1A
chr21	40757510	40758276	WRB
chr22	42077774	42078873	NHP2L1

9. Lebenslauf

Akademische Karriere

- 11/2012 - heute Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Prawitt am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin, Mainz
- 11/2011 – 08/2012 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Prawitt
Thema: „Analyse von Effekten einer Kaiso (ZBTB33) – Bindung an der differentiell methylierten ICR1
- 10/2004 – 11/2011 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Diplomfächer: Genetik, Mikrobiologie, Immunologie und Biochemische Psychiatrie
- 03/2003 Allgemeine Hochschulreife
- 08/1994-03/2003 Kurt-Schumacher-Schule, Ingelheim

Berufserfahrung

- 06/2008 – 10/2009 Kurierdienstservice Freeway, Mainz
- 04/2003 – 09/2004 Freiwilliges soziales Jahr beim Rettungsdienst Johanniter e.V., Mainz

Zusatzqualifikationen

Teilnahme an den Fortbildungsseminaren des allgemeinen Promotionskollegs der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

- Akademisches Schreiben
- Interkulturelle Kommunikation
- Präsentationstraining
- Projekt Management

Praktika

- 06/2001 Praktikum am Rechtsmedizinischen Institut
der Universitätsmedizin Mainz
- 03/1998 Praktikum als Chemielaborant bei der Firma Boehringer, Ingelheim

Weitere Fähigkeiten und Kenntnisse

Fremdsprachen	Englisch, fließend in Wort und Schrift
EDV-Kenntnisse	sehr guter Umgang mit Word, Excel und PowerPoint Grundkenntnisse in NGS-Auswertung, Galaxyserverplattform Grundkenntnisse in SPSS Erweiterte Kenntnisse mit dem UCSC Genome Browser

9.1 Publikationen

Kaiso mediates human ICR1 methylation maintenance and H19 transcriptional fine regulation (Clinical Epigenetics, 2016)

F. Bohne, D. Langer, U. Martiné, C. Eider, R. Cencic, M. Begemann, M. Elbracht, L. Bülow, T. Eggermann, U. Zechner, J. Pelletier, B. Zabel, T. Enklaar, D. Prawitt

Novel deletion in 11p15.5 imprinting center region 1 in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome provides insight into distal enhancer regulation and tumorigenesis (Pediatric Blood and Cancer, 2016)

*N. Bachmann, *F. Bohne, *R. Crazzolaro, D. Kotzot, K. Maurer, T. Enklaar, D. Prawitt, C. Bergmann
*geteilte Erstautorenschaft

9.2 Aktive Teilnahme an Tagungen und Kongressen

- 03/2013 Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Dresden
Poster: Allelespecific expression analysis of putative members of a human network of imprinted genes
F. Bohne, U. Martiné, W. Jessen, C. Eider, K. Oexle, B. Zabel, T. Enklaar, D. Prawitt
- 03/2014 Arbeitstagung für pädiatrische Forschung, Göttingen
Vortrag: Uncovering common pathogenic transcriptional dysregulations in Silver-Russell syndrome
F. Bohne, U. Martiné, M. Begemann, T. Eggermann, T. Enklaar, D. Prawitt
- 05/2014 Europäische Imprinting Disorder School, Frankreich
Vortrag: Hints for a human network of imprinted genes due to the use of upd(11p15)mat cells with increased H19 expression
F. Bohne, U. Martiné, M. Begemann, T. Eggermann, T. Enklaar, D. Prawitt
- 05/2015 Europäische Imprinting Disorder School, Frankreich
Vortrag: Studies on effects of new regulatory factors binding to the differentially methylated ICR1
F. Bohne, U. Martiné, L. Bülow, U. Zechner, T. Enklaar, D. Prawitt
- 03/2016 Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Lübeck
Poster: NGS-RNAseq analyses of Silver Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome cases describe functional interactions of human imprinted genes and common syndrome associated dysregulations
F. Bohne, A. Hribek, M. Merz, M. Begemann, T. Eggermann, T. Enklaar, D. Prawitt
- 05/2016 Europäische Imprinting Disorder School, Frankreich
Vortrag: Utilizing RNA-Seq to define SRS/BWS specific transcriptional patterns in ID-patients
F. Bohne, A. Hribek, M. Merz, M. Begemann, T. Eggermann, T. Enklaar, D. Prawitt
- 10/2016 Arbeitstagung für pädiatrische Forschung, Frankfurt
Vortrag: New mechanistic insight into the methylation maintenance at the H19-ICR1 with implications on imprinting diseases and different tumour entities
F. Bohne, D. Langer, T. Eggermann, U. Zechner, J. Pelletier, F. Zepp, T. Enklaar, D. Prawitt
- 05/2017 Kongress der European Society of Human Genetics, Kopenhagen
Poster: Effects of Kaiso (ZBTB33) binding to the differentially methylated ICR1
F. Bohne, D. Langer, U. Martiné, C. Eider, T. Enklaar, U. Zechner, T. Eggermann, J. Pelletier, D. Prawitt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Florian Bohne, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Mainz, den

Florian Bohne