

Aus dem Zentrum der Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Auswirkungen von Asporin (ASPN) auf die transkriptionelle Regulation von geprägten und nicht-geprägten Genen im Rahmen von Imprinting-Erkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tanja Stefanie Adkins
aus Speyer

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 15.05.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
1. Einleitung/ Ziel der Dissertation.....	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Genomisches Imprinting	2
2.2 Erkrankungen.....	4
2.2.1 Beckwith-Wiedemann- und Silver-Russell-Syndrom.....	4
2.2.2 Transienter neonataler Diabetes mellitus	9
2.2.3 Kagami-Ogata- und Temple-Syndrom.....	10
2.2.4 Angelman- und Prader-Willi-Syndrom	11
2.3 ASPN	13
2.4 Gennetzwerk.....	16
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Zellbiologische Methoden	19
3.1.1 Kryokonservation von Zellen	19
3.1.2 Neubauer Zählkammer.....	19
3.1.3 Knockdown.....	20
3.1.4 Anzucht kryokonservierter Zellen	22
3.1.5 Kultivierung und Erhalt von Zellen.....	22
3.2 Gelelektrophorese.....	23
3.3 RNA/DNA Methoden	25
3.3.1 RNA-Extraktion.....	25
3.3.2 Spektrophotometrie	26
3.3.3 cDNA-Synthese.....	26
3.3.4 Quantitative real time PCR und Schmelzpunktbestimmung.....	29
3.4 Materialien	33
3.4.1 Flüssigkeiten und Chemikalien.....	33
3.4.2 Lösungen und Puffer	34
3.4.3 Nukleotide	34
3.4.4 Kits	37
3.4.5 Zelllinien	38

3.4.6 Nährmedien.....	38
3.4.7 elektronische Geräte und Laborinstrumente	39
3.4.8 Verbrauchsmaterialien.....	40
4. Ergebnisse	42
4.1 Knockdown und quantitative Bestimmung der Genexpression.....	42
4.2 Haushaltsgene	46
4.3 ASPN und Verifizierung des Knockdown	50
4.4 Genauswahl	52
4.5 Gene, bei denen eine gesteigerte Expressionsaktivität erwartet wurde	53
4.5.1 Erwartungsgemäße Steigerung der Expression von IGF2R, PLAGL1 und S100A6 nach ASPN-Knockdown	53
4.5.2 Vorwiegend unveränderte Expressionswerte für NLRP1, DCN und CTSK nach ASPN-Knockdown.....	55
4.5.3 Nicht-erwartungsgemäße Reduktion der Expression von LUM und MEST nach ASPN-Knockdown	58
4.5.4 In den BWS Δ H19/ICR1 mat- Fibroblasten erwartungsgemäße, in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten nicht-erwartungsgemäße gesteigerte Expression von MMP3 und IGFBP3 nach ASPN-Knockdown	60
4.6 Gene, bei denen eine reduzierte Expressionsaktivität erwartet wurde	62
4.6.1 Erwartungsgemäße Reduktion der Expression von IGF2 und H19 nach ASPN-Knockdown	62
4.6.2 Nicht-erwartungsgemäße, gesteigerte Expression von SPARC und COL1A1 nach ASPN-Knockdown	64
4.6.3 Gesteigerte Expression in den BWS Δ H19/ICR1 mat- Fibroblasten und reduzierte Expression in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten von BGN, FSTL3 und FN1 nach ASPN-Knockdown.....	66
4.6.4 Schwankende Expressionslevel von TGF β 2 und NLRP10 nach ASPN-Knockdown.....	68
5. Diskussion	71
5.1 Kontrolle der experimentellen Knockdownversuche	71
5.2 ASPN als regulierendes Element.....	75
5.3 Potenziell durch ASPN beeinflusste Gene.....	76
5.3.1 ASPN als potenzieller Inhibitor	76
5.3.1.1 Potenziell inhibitorische Effekte von ASPN auf die Gene SPARC, COL1A1, BGN, FSTL3 und FN1 bei vorwiegender Korrelation der Expression- swerte mit ASPN.....	77
5.3.1.2 Potenziell inhibitorische Effekte von ASPN auf die Gene MMP3, IGF- BP3, IGF2R, PLAGL1 und S100A6 bei vorwiegend konträren Expression- swerten zu ASPN.....	81

5.3.2 ASPN als potenzieller Aktivator	85
5.3.2.1 Potenziell aktivierende Effekte von ASPN auf die Gene IGF2 und H19 bei vorwiegender Korrelation der Expressionswerte	85
5.3.2.2 Potenziell aktivierende Effekte von ASPN auf die Gene LUM und MEST bei vorwiegend konträren Expressionswerten zu ASPN	88
5.4 Analyse der von ASPN als unbeeinflusst gefundenen Gene	90
5.5 Uneindeutige Resultate.....	91
5.6 Ausblick.....	93
6. Zusammenfassung	95
7. Literaturverzeichnis	96
8. Anhang	102
8.1 Finale Daten.....	102
8.2 RPKM-Werte	112
9. Danksagung.....	113
10. Tabellarischer Lebenslauf	114

Abkürzungsverzeichnis

- **AS** Angelman-Syndrom
- **bp** Basenpaare, aus dem Englischen: *base pairs*
- **BWS** Beckwith-Wiedemann-Syndrom
- **CAFs** Krebs-assoziierte Fibroblasten, aus dem Englischen: *cancer-associated fibroblasts*
- **cDNA** komplementäre DNA, aus dem Englischen: *complementary DNA*
- **CP** Kreuzungspunkt, aus dem Englischen: *crossing point*
- **DMR** differenziert methylierte Region
- **DNA** Desoxyribonukleinsäure, aus dem Englischen: *deoxyribonucleic acid*
- **FPKM** Einheit für die Expressionsstärke eines Gens in der RNA-Sequenzierung, aus dem Englischen: *fragments per kilobase million*
- **GOM** Hypermethylierung, aus dem Englischen: *gain of methylation*
- **ICR** Imprinting-Kontrollregion, aus dem Englischen: *imprinting control region*
- **IGN** Netzwerk imprinteter Gene, aus dem Englischen: *imprinted gene network*
- **KOS** Kagami-Ogata-Syndrom
- **LOM** Methylierungsverlust, aus dem Englischen: *loss of methylation*
- **LRR** Leucin-reiche Wiederholungen, aus dem Englischen: *leucin rich repeats*
- **miRNA** microRNA, kleine einsträngige nicht-kodierende RNA
- **MMD** Multilocusdefekte, aus dem Englischen: *multilocus methylation defects*
- **MMP** Matrix-Metalloprotease(n)
- **ncRNA** nicht-kodierende Ribonukleinsäure, aus dem Englischen: *non-coding ribonucleic acid*
- **NSCLC** nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, aus dem Englischen: *non-small cell lung cancer*
- **PWS** Prader-Willi-Syndrom
- **qRT-PCR** quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit, aus dem Englischen: *quantitative real time polymerase chain reaction*
- **RA** rheumatoide Arthritis
- **RISC** ein Multiribonukleoproteinkomplex, aus dem Englischen: *RNA induced silencing complex*
- **RNA** Ribonukleinsäure, aus dem Englischen: *ribonucleic acid*
- **RPKM** Einheit für die Expressionsstärke eines Gens in der RNA-Sequenzierung, aus dem Englischen: *reads per kilobase million*
- **SGA** zierliche Größe für aktuelles Gestationsalter, aus dem Englischen: *small for*

gestational age

- **siRNA** kleine eingreifende RNA, aus dem Englischen: *small interfering RNA*
- **SLRP** kleines Leucin-reiches Proteoglykan, aus dem Englischen: *small leucin rich proteoglycan*
- **SL siRNA** unspezifische siRNA, die ungezielt an die natürliche RNA bindet, Kontrollelement, aus dem Englischen: *scrambled locus siRNA*
- **SRS** Silver-Russell-Syndrom
- **TNDM** transienter neonataler Diabetes mellitus
- **TS** Temple-Syndrom
- **T2E** TMPRSS2-ERG-Fusionsonkogen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (aus Cytrynbaum et al., 2016): klinische Fotodokumentation charakteristischer Dysmorphien bei Patienten mit SRS.	8
Abbildung 2 (aus Wakeling et al., 2017): Netchine-Harbison clinical scoring system aus dem Consensus statement von 2017 für Patienten mit SRS.	9
Abbildung 3 (aus Rocha, Paiva, 2014): Ideogramm potenzieller molekulargenetischer Ursachen und deren Häufigkeit bei PWS.	13
Abbildung 4 (aus Xu et al., 2015): schematische Darstellung der Molekularstruktur von Klasse I SLRPs.	14
Abbildung 5 (aus Al Adhami et al., 2015): schematische Grafik des IGN.	18
Abbildung 6 (aus VanGuilder et al., 2008): Phasen der PCR.	32
Abbildung 7: grafische Darstellung der Schmelzpunktanalyse durch das Programm des LightCycler 480 II.	44
Abbildung 8: elektrophoretische Darstellung der Amplifikatprodukte folgender Gene: FSTL3, BGN, SPARC, S100A6, MMP3, IGFBP3, DCN, NLRP1, NLRP10, CTSK, COL1A1, FN1, LUM.	45
Abbildung 9 a)-c): grafische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der getesteten Haushaltsgene zu den verschiedenen Zeitpunkten des Knockdown.	48
Abbildung 10 a)-c): grafische Darstellung der Restaktivität von ASPN in [%] nach Knockdown.	50
Abbildung 11: grafische Darstellung der Genaktivität von IGF2R, PLAGL1 und S100A6 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten und den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	54
Abbildung 12 a)-c): grafische Darstellung der Genaktivität von NLRP1, DCN und CTSK in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten und den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	56
Abbildung 13 a) und b): grafische Darstellung der Genaktivität von MEST und LUM in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten und den in den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	58
Abbildung 14 a) und b): grafische Darstellung der Genaktivität von MMP3 und IGFBP3 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten und den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	60
Abbildung 15: grafische Darstellung der Genaktivität von IGF2 und H19 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	62

Abbildung 16: grafische Darstellung der gemessenen Konzentrationen von H19 nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat- und den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	63
Abbildung 17: grafische Darstellung der Genaktivität von SPARC und COL1A1 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	64
Abbildung 18: grafische Darstellung der Genaktivität von SPARC und COL1A1 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten.	65
Abbildung 19: grafische Darstellung der Genaktivität von BGN, FSTL3 und FN1 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	66
Abbildung 20: grafische Darstellung der Genaktivität von BGN, FSTL3 und FN1 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten.	67
Abbildung 21: grafische Darstellung der Genaktivität von TGF β 2 und NLRP10 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten.	69
Abbildung 22: grafische Darstellung der Genaktivität von TGF β 2 und NLRP10 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten.	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SLRP-Familie.	15
Tabelle 2: Ablauf der cDNA-Synthese.	28
Tabelle 3: Ablauf der PCR im LightCycler 480 II von Roche.	31
Tabelle 4: Flüssigkeiten und Chemikalien.	33
Tabelle 5: Lösungen und Puffer.	34
Tabelle 6: Nukleotide.	34
Tabelle 7: Primer.	35
Tabelle 8: Kits.	37
Tabelle 9: Zelllinien.	38
Tabelle 10: Nährmedien.	38
Tabelle 11: elektronische Geräte und Laborinstrumente.	39
Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien.	40
Tabelle 13: Finale Daten.	101
Tabelle 14: RPKM-Werte.	111

1. Einleitung/ Ziel der Dissertation

Das Forschungsgebiet der Epigenetik befasst sich vorrangig mit primär reversiblen Veränderungen des Erbmaterials und deren Einfluss auf die Evolution von Lebewesen. Genetisches Imprinting ist einer der epigenetischen Mechanismen, die Teil dieser Forschung sind. Da fehlerhaftes Imprinting mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde, ist es von Bedeutung diese Defekte genauer zu studieren und zu verstehen, um Fortschritte in der Diagnostik zu erzielen, und die Entwicklung potenzieller Therapieansätze zu fördern.

In der Vergangenheit konnte bereits eine Assoziation und Interaktion verschiedener geprägter Gene nachgewiesen werden. Sie bilden gemeinsam mit nicht-geprägten Genen ein Netzwerk, das erstmals von Varrault *et al.*, und später von Al Adhami *et al.*, etabliert wurde. Möglicherweise führen epigenetische Defekte zu einer Fehlregulation dieses Netzwerkes und tragen so zur Ausprägung der verschiedenen, mit epigenetischen Erkrankungen einhergehenden, Symptome und Phänotypen bei. Das proteinkodierende Asporin-Gen ist Teil dieses Netzwerkes. In Anbetracht der bisherigen Forschung im Bereich des sogenannten *imprinted gene network* (IGN), insbesondere im Rahmen der eigenen Arbeitsgruppe, sollte der Einfluss von ASPN auf die anderen Gene des IGN untersucht werden. Wissenschaftliche Arbeiten von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, auf demselben Gebiet, wiesen wiederholt auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von ASPN und anderen Genen des Netzwerkes hin. Durch eine gezielte Herabregulation der ASPN-Expression sollten die dadurch ausgelösten Veränderungen in der Expression assoziierter Gene beobachtet werden. Für die Versuche wurden daher Patientenzellen verwendet, bei denen ein hoher ASPN-Expressionsgrad festgestellt werden konnte, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Neben bereits bekannten Genen des IGN wurden zusätzlich nicht-geprägte Gene ausgewählt, und deren potenzielle Regulation durch ASPN untersucht. Verwendet wurden ausschließlich erprobte Verfahren, die im Kapitel „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben werden. Hier ist vor allem der Knockdown des ASPN-Gens bedeutsam, der als entscheidendes Regulationselement eingesetzt wurde.

2. Literaturdiskussion

2.1 Genomisches Imprinting

Genomisches Imprinting ist ein Begriff aus der Epigenetik, der ein bestimmtes Expressionsmuster beschreibt, bei dem das mütterliche oder das väterliche Allel eines Gens inaktiviert vorliegt. Man bezeichnet dies auch als *parent of origin* spezifische Expression (Al Adhami *et al.*, 2015). Nach der Entdeckung des Phänomens in den 1980er Jahren durch Cattanach und Kirk, wurde intensiv in diesem Bereich der Epigenetik geforscht (Varrault *et al.*, 2006). Bisher ist nicht vollends aufgeklärt, wie und weshalb sich genomisches Imprinting im Rahmen der Evolution von Säugetieren etabliert hat. Dennoch wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, von denen die bedeutendste, die *parental conflict* oder *kinship* Theorie von Moore und Haig (1991), beziehungsweise Wilkins und Haig (2003), aufgestellt wurde (Varrault *et al.*, 2006). Während die kodierenden Anteile der DNA unverändert vorliegen, wird das imprintete Gen durch verschiedene Vorgänge abgeschaltet. Man bezeichnet dies auch als *gene silencing*. Es liegt dann nur eine elterliche Kopie des Gens vor, die transkribiert und zur Informationsverarbeitung genutzt werden kann. Wichtige epigenetische Mechanismen, die zum Abschalten von Genen beitragen, sind beispielsweise DNA-Methylierungen oder Histonmodifikationen.

Das genomische Imprinting ist für bestimmte Gene beschrieben. Wahrscheinlich sind über 90 menschliche Gene, etwa 1-2% der Säugergene, durch Imprinting-Vorgänge beeinflusst. Die Funktionen von imprinteten Genen sind vielfältig. Sie sind unter anderem beteiligt an Signalinduktion, Nährstofftransport und Stoffwechsel. Außerdem sind sie in die Kontrolle des Zellzyklus sowie Proteinsynthese, -abbau und -sekretion involviert (Al Adhami *et al.*, 2015). Es wird vermutet, dass sie alle eine gemeinsame Rolle in der Regulation von Zellfunktion und -differenzierung spielen. Des Weiteren wird ihnen eine Schlüsselrolle während der embryonalen und postnatalen Entwicklung zugeschrieben (Al Adhami *et al.*, 2015). Aber auch im Erwachsenenalter führt fehlerhaftes Imprinting zu Pathologien und verschiedensten Erkrankungen (Al Adhami *et al.*, 2015). Forschungen zeigten darüber hinaus einen Effekt von Imprinting auf die postnatale Fütterung und Fürsorge für die Nachkommen bei Mäusen (Varrault *et al.*, 2006).

Das imprintete Gen liegt in allen somatischen Körperzellen im inaktiven Zustand vor. Lediglich in den primordialen Keimzellen ist das Methylierungsmuster re-

versibel. Es kann dort neu etabliert werden und wird dementsprechend weitervererbt. Genomisches Imprinting ist somit vererbbar, und gleichzeitig potenziell reversibel (Barlow, 2011). Die imprinteten Bereiche der DNA umfassen nicht nur proteinkodierende Gene, sondern auch nicht-proteinkodierende RNAs, wie beispielsweise das H19-Gen. Diese stehen in Verbindung mit imprinteten, proteinkodierenden Genen (Barlow, 2011).

Meist bilden mehrere imprintete Gene ein sogenanntes *imprinting cluster*, was ursprünglich darauf hinwies, dass das Imprinting nicht gen-spezifisch, sondern über andere Kontrollelemente reguliert wird, die mehrere Gene über weite Strecken beeinflussen (Barlow, 2011). Als exekutierendes Element dieser Kontrollfunktion wurden sogenannte *imprinting control regions* (ICR) identifiziert, die auch als *imprinting control elements* oder *long range control elements* bezeichnet werden (Barlow, 2011). Es handelt sich dabei um DNA-Sequenzen, die die Expression multipler anderer imprinteter Gene eines Clusters regulieren (Barlow, 2011). Dabei ist der epigenetische Imprintingstatus dieser Regionen von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass jeweils ein Allel der ICR methyliert vorliegt, und dadurch seine regulatorische Aktivität verliert, während das korrespondierende Allel unmethyliert bleibt (Barlow, 2011). Während der Keimzellentwicklung wird diese Methylierung durch eine *de novo* Methyltransferase etabliert und in diploiden Zellen durch Mitose weitergegeben, während sie in primordialen Zellen entfernt und neu angelegt werden kann (Barlow, 2011). Die Regulation durch die methylsensitive ICR erfolgt in *cis*-Element-artiger Form (Barlow, 2011). Die unmethylierte regulatorische Form der ICR fungiert als Repressor für proteinkodierende Gene, und gleichzeitig als Aktivator für nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (ncRNAs)- ein weiterer wichtiger epigenetischer Regulator. NcRNAs gelten als potenziell *locus*-spezifische Initiatoren mit weitaus höherer Gewebespezifität als andere epigenetische Regulationsmechanismen (Barlow, 2011). Sie sind ein Indikator dafür, dass die genetisch definierte ICR nicht allein für die Expression von imprintetem Erbgut verantwortlich ist (Barlow, 2011). Stattdessen wird von einem stufenartigen Prozess ausgegangen, bei dem ein epigenetischer Initiator auf ein- von außerhalb der Zelle kommendes- epigenetisches Signal reagiert. Daraufhin wird das Signal durch eine Chromatinänderung am jeweiligen *locus* instand gehalten (Barlow, 2011). DNA-Sequenzen diploider Zellen, die maternal- oder paternalspezifisch methyliert vorliegen, während ein elterliches Chromosom unmethyliert bleibt, werden als differenziell methylierte Regionen (DMR)

bezeichnet (Barlow, 2011). Es handelt sich dabei meist um Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-reiche Inseln im Erbgut (Barlow, 2011).

Al Adhami *et al.* zufolge konnte auf zellulärer Ebene jedoch kein systematischer Antagonismus zwischen paternal und maternal exprimierten Genen nachgewiesen werden, was der *parental conflict theory* widersprechen würde (Al Adhami *et al.*, 2015). Beispielsweise zeigen Imprinting-Erkrankungen, wie das Angelman- und das Prader-Willi-Syndrom, die durch den Verlust reziproker imprinteter Gene charakterisiert sind, dennoch konforme Phänotypen wie Hyperplasie und Hypertrophie. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Zusammenhänge zwischen Zellebene und vollständigem Organismus bisher unzureichend erforscht sind.

2.2 Erkrankungen

Es gibt verschiedene Erkrankungen, die mit dem Prozess des Imprintings assoziiert sind, und daher auch als Imprinting-Erkrankungen bezeichnet werden. Durch verschiedene Pathomechanismen kommt es zu einer fehlerhaften Prägung, die in der jeweiligen Krankheit resultiert. Als Auslöser kommen Mutationen und Aberrationen sowie uniparentale Disomien, aber auch Hypo- und Hypermethylierungen, infrage. In der Diagnostik sind insbesondere Methylierungsanalysen bedeutsam. Es kann das maternale, oder das paternale, Allel eines Gens betroffen sein. Die beiden jeweiligen Erkrankungen desselben *locus* stehen in engem Zusammenhang und zeigen häufig phänotypisch gegensätzliche Merkmale. Im Folgenden werden einige Imprinting-Erkrankungen beispielhaft vorgestellt.

2.2.1 Beckwith-Wiedemann- und Silver-Russell-Syndrom

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist eine der bekanntesten Imprinting-Erkrankungen. Die Prävalenz wird, laut der aktuellen Konsensus-Empfehlung, auf 1:10.340 geschätzt, wobei Jungen und Mädchen etwa gleich häufig betroffen sind (Brioude *et al.*, 2018). Es ist das häufigste genetische Überwuchssyndrom (Pappas, 2015), und zeigt charakteristische phänotypische Erscheinungen. Verursacht wird das Syndrom durch Imprintingdefekte des *locus* 11p15, der aus zwei Domänen besteht. Auf diesem *locus* findet sich ein Gencluster, das unter anderem verschiedene imprintete Gene, wie IGF2, enthält, die das fetale Wachstum regulieren (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Er wird durch zwei unterschiedliche *imprinting control*

regions reguliert, die jeweils durch eine differenziell methylierte Region gekennzeichnet sind (Brioude *et al.*, 2018). Das maternale ICR1-Allel liegt beim Gesunden unmethyliert vor, und ist somit regulatorisch aktiv, während das paternale Allel methyliert ist. Die ICR2 zeigt ein entgegengesetztes Methylierungsmuster (Paganini *et al.*, 2015). Sie enthält außerdem das CDKN1C-Gen, ein negativer Regulator der Zellproliferation, und befindet sich in der Zentromerdomäne (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Die ICR1 in der Telomerdomäne enthält unter anderem das IGF2-Gen und das H19-Gen (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Beide sind Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente.

Die molekulare Ätiologie ist uneinheitlich: Hypomethylierungen der maternalen ICR2 stellen die häufigste Ursache des epigenetischen Defekts dar (50-60% der Fälle laut Paganini *et al.*, 2015) (Pappas, 2015). Aber auch andere Veränderungen, wie Hypermethylierungen der maternalen ICR1 (5-10% der Fälle laut Brioude *et al.*, 2018), Mutationen in CDKN1C-Gen (5-10% der Fälle laut Paganini *et al.*, 2015) oder uniparentale Disomien von 11p15 in Mosaik-Form (~20% der Fälle laut Paganini *et al.*, 2015), können die Erkrankung verursachen (Pappas, 2015). Neben 11p15 können jedoch auch andere differenziell methylierte Regionen von Imprintingdefekten betroffen sein. Derartige Defekte können bei bis zu 10% der Erkrankten nachgewiesen werden- man spricht dann von sogenannten Multilocusdefekten (MMD, aus dem Englischen: *multilocus methylation defects*) (Paganini *et al.*, 2015). Ein gravierender Unterschied im klinischen Erscheinungsbild ist jedoch nicht erkennbar. Selten liegen chromosomale Anomalien dem Syndrom zugrunde (<5%) (Brioude *et al.*, 2018).

Zum Beckwith-Wiedemann-Spektrum werden all diejenigen Patienten gezählt, die klinisch diagnostiziert werden, unabhängig davon, ob ein epigenetischer Defekt nachgewiesen werden kann. Aber auch Patienten mit atypischem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, die phänotypisch unauffällig sind, aber molekulare Veränderungen aufweisen, sowie Patienten mit isolierter Hemihypertrophie, werden zum Spektrum gezählt (Brioude *et al.*, 2018). Methylierungsanalysen sind diagnostisch wegweisend und können in etwa 60% der Fälle relevante Veränderungen nachweisen (Pappas, 2015). In bis zu 20% der Fälle kann die Diagnose molekulargenetisch nicht gesichert werden (Brioude *et al.*, 2018).

Betroffene Kinder fallen schon während der Natalperiode durch den Großwuchs auf. Dieser zeigt sich symmetrisch, in Form einer generellen Makrosomie, oder asymmetrisch, im Rahmen einer isolierten Hemihypertrophie, und ist in diesem

Fall ein bedeutsames Kriterium für die Diagnose des Syndroms (Brioude *et al.*, 2018). Eine Makroglossie, eine Omphalozele oder ein fazialer Nävus flammeus sind weitere Auffälligkeiten, die auf ein Beckwith-Wiedemann-Syndrom hindeuten (Pappas, 2015). Postnatale Hypoglykämien aufgrund eines prolongierten Hyperinsulinismus sind bei betroffenen Kindern keine Seltenheit, und sollten entsprechend beachtet und therapiert werden (Brioude *et al.*, 2018). Besteht die Hypoglykämie für eine Woche oder länger, ist sie wegweisend für die Diagnose (Brioude *et al.*, 2018). Das Risiko für bösartige embryonale Tumoren ist, insbesondere im Kindesalter, erhöht, gleicht sich aber im Laufe des Lebens dem der Normalbevölkerung an (Pappas, 2015). Insbesondere Wilms-Tumore, nicht selten multifokal auftretend, und Hepatoblastome treten nachgewiesen vermehrt auf (Pappas, 2015). Auch Gefäß-, Leber- und Nierenfehlbildungen manifestieren sich häufiger bei BWS-Patienten. Umbilikale Hernien und eine Rectusdiastase sind ebenfalls Teil des Symptomspektrums (Brioude *et al.*, 2018). Die geistige Entwicklung bleibt von der Krankheit meist unbeeinflusst. Phänotypische Variationen, sowie die Stärke der Ausprägung, werden vorwiegend durch das mosaikartige Vorliegen der Veränderungen bestimmt (Brioude *et al.*, 2018). Ein vom Konsensus erstellter Score, der klinische Merkmale nach Haupt- und Nebenmerkmalen wichtet, soll die klinische Diagnose und die Entscheidung für eine molekulare Testung, erleichtern (Brioude *et al.*, 2018).

Das Korrelat zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom, mit paternalem Allelverlust, stellt das wesentlich seltenere Silver-Russell-Syndrom (SRS) dar. Die Inzidenz wird auf 1:30.000-1:100.000 geschätzt (Wakeling *et al.*, 2017). Dass eine molekulargenetische Ursache nicht immer gefunden wird, erschwert die Diagnosestellung. Das SRS zählt zu den Minderwuchs-Syndromen mit zartem Habitus, und wurde erstmals in den 1950er Jahren von Silver *et al.* und Russell beschrieben. Obwohl primär klinisch diagnostiziert wird, ist dies aufgrund der starken Variation in der Ausprägung der Merkmale schwierig (Wakeling, 2011). Bei bis zu 60% der Patienten können genetische und epigenetische Veränderungen, und so der entsprechende Subtyp der Erkrankung, nachgewiesen werden (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Am häufigsten, in etwa 30-60% der Fälle, wird die Erkrankung durch den Verlust von Methylierungen auf dem *locus* 11p15 verursacht (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Seltener, in etwa 10% der Fälle, findet sich als Auslöser eine maternale uniparentale Disomie von Chromosom 7 (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Auch Mikrodu-

plikationen und Mikrodeletionen kommen als Ursache in Betracht (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Einige Kinder zeigen jedoch charakteristische Merkmale des Syndroms, ohne dass eine molekulargenetische Ursache gefunden wird (Wakeling, 2011).

Die Wachstumsretardierung ist bereits intrauterin erkennbar und setzt sich ins Kindesalter fort. Postnatal sind insbesondere gesunde Kinder, deren Gewicht ebenfalls in die Kategorie *small for gestational age* (SGA) fällt, abzugrenzen (Wakeling *et al.*, 2017). Die charakteristischen Merkmale der Erkrankung sind jedoch insbesondere im Neugeborenen- und Säuglingsalter erkennbar, was die klinische Diagnose bei älteren Kindern umso schwieriger macht (Wakeling, 2011). Der Kopfumfang bleibt von der Wachstumsminde- rung meist unbeeinflusst, was zu einer relativen Makrozephalie führt (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Die Patienten zeigen charakteristische Dysmorphiestigmata. Das Gesicht weist eine Dreiecksform mit einem kleinen, spitz zulaufenden Kinn, sowie eine prominente Stirn, und herabhängende Mundwinkel auf. Die Akren zeigen eine Tendenz zur Klinodaktylie, häufig in Form eines ulnaren fünften Fingers (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Im Kindesalter zeigt sich außerdem vermehrt eine skoliotische Fehlbildung der Wirbelsäule (Wakeling *et al.*, 2017). Hemihypoplasien und Hypotonieneigung sind weitere Merkmale, die mit dem Silver-Russell-Syndrom assoziiert sind (Cytrynbaum *et al.*, 2016). Betroffene Säuglinge zeigen häufig eine Trinkschwäche, mit mäßiger Gewichtszunahme, und vermehrt gastrointestinale Komplikationen (Wakeling *et al.*, 2017). In den meisten Fällen entwickeln die Patienten, im Unterschied zu Kindern mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom, eine milde geistige Retardierung. Diese zeigt sich insbesondere bei Patienten mit maternaler uniparentaler Disomie von Chromosom 7, während bei Patienten mit Hypomethylierung der ICR1 vor allem die Dysmorphie von Gesicht und Akren in Erscheinung tritt (Wakeling, 2011). Auch die motorischen Fähigkeiten entwickeln sich bei vielen Patienten langsamer und bleiben dauerhaft eingeschränkt (Wakeling *et al.*, 2017). Das Netchine-Harbi-son *clinical scoring system* soll die klinische Diagnose erleichtern, und ist der bisher einzige Score für die Diagnose von SRS (Wakeling *et al.*, 2017) (siehe Abbildung 2). Eine multidisziplinäre Versorgung der Patienten ist erforderlich (Wakeling *et al.*, 2017). Die Therapie mit Wachstumshormon führt zu einer Verbesserung vieler der oben genannten Symptome. Dabei ist jedoch das damit verbundene Risiko einer metabolischen Entgleisung zu beachten (Wakeling *et al.*, 2017).

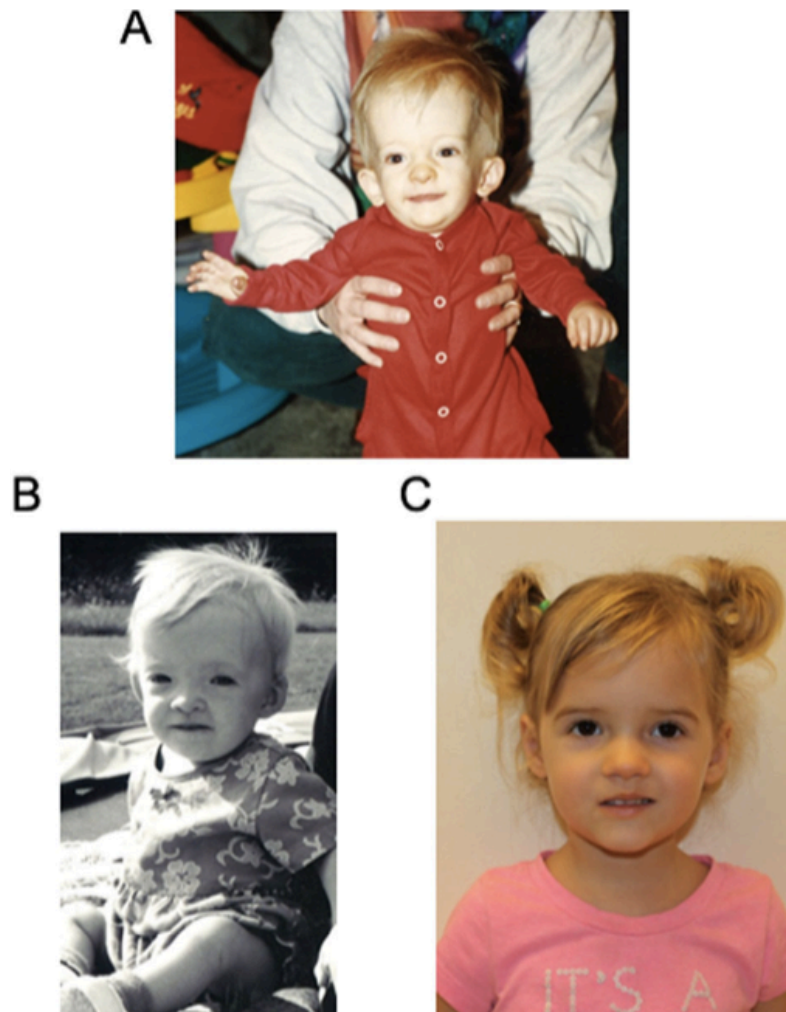


Abbildung 1 (aus Cytrynbaum et al., 2016): klinische Fotodokumentation charakteristischer Dysmorphien bei Patienten mit SRS. Die betroffenen Kinder sind zwölf (A und B) und achtzehn (C) Monate alt und zeigen alle das pathognomonische kleine dreiecksförmige Gesicht mit spitz zulaufendem Kinn (A,C). Erkennbar sind außerdem die prominente Stirn (A,B), der Hypertelorismus (B), die herabhängenden Mundwinkel (B,C) sowie die Otapostasis (A).

Clinical criteria	Definition
SGA (birth weight and/or birth length)	≤ -2 SDS for gestational age
Postnatal growth failure	Height at 24 ± 1 months ≤ -2 SDS or height ≤ -2 SDS below mid-parental target height
Relative macrocephaly at birth	Head circumference at birth ≥ 1.5 SDS above birth weight and/or length SDS
Protruding forehead*	Forehead projecting beyond the facial plane on a side view as a toddler (1–3 years)
Body asymmetry	LLD of ≥ 0.5 cm or arm asymmetry or LLD < 0.5 cm with at least two other asymmetrical body parts (one non-face)
Feeding difficulties and/or low BMI	BMI ≤ -2 SDS at 24 months or current use of a feeding tube or cyproheptadine for appetite stimulation

Clinical diagnosis is considered if a patient scores at least four of six from these criteria. If all molecular tests are normal and differential diagnoses have been ruled out, patients scoring at least four of six criteria, including both prominent forehead and relative macrocephaly should be diagnosed as clinical Silver–Russell syndrome. *Protruding forehead is equivalent to 'prominent forehead' (REF. 164). LLD, leg length discrepancy; SDS, SD score; SGA, small for gestational age.

Abbildung 2 (aus Wakeling et al., 2017): Netchine-Harbison clinical scoring system aus dem Consensus statement von 2017 für Patienten mit SRS. Erfüllt ein Patient mindestens vier der sechs beschriebenen klinischen Kriterien sollte, nach Ausschluss aller weiteren Differentialdiagnosen sowie bei ausbleibendem molekulargenetischem Nachweis, die klinische Diagnose SRS gestellt werden.

2.2.2 Transienter neonataler Diabetes mellitus

Der transiente neonatale Diabetes mellitus ist ebenfalls ein Leiden, das mit epigenetischen Ursachen in Zusammenhang gebracht wird. Er tritt nur in den ersten sechs Lebensmonaten auf und ist vom permanenten neonatalen Diabetes mellitus abzugrenzen, der ~50% der Fälle neonatalen Diabetes ausmacht (Touati et al., 2018 und Gole et al., 2018). Schätzungsweise ist eines von 200.000 Neugeborenen betroffen (Touati et al., 2018). In östlichen Gegenden tritt die Erkrankung häufiger auf, was mit der höheren Rate an Kosanguinität in Zusammenhang gebracht wird (Gole et al., 2018).

Wie beim SRS zeigen auch Patienten mit TNDM eine intrauterine Wachstumsverzögerung. Das postnatale Kardinalsymptom ist jedoch die wiederkehrende Hyperglykämie, die mit Insulin therapiert werden muss, und innerhalb von definitionsgemäß 6, spätestens 18, Monaten vollständig remittiert (Touati et al., 2018). Die Patienten sind dehydriert und nicht ketoazidotisch (Temple, Mackay, 1993). Weitere Hinweise sind Umbilikalhernien sowie eine Makroglossie (Piccini et al., 2018). Die Symptome können im Kindesalter wiederkehren, dann meist im Rahmen eines Infekts (Temple, Mackay, 1993). Nicht selten kommt es jedoch auch zur Manifestation eines Typ 2 Diabetes mellitus im Jugendalter (Piccini et al., 2018). Außerdem leiden weibliche Patienten später häufig an einem Gestationsdiabetes

(Temple, Mackay, 1993).

Verschiedene genetische Aberrationen konnten als Ursache identifiziert werden. Am häufigsten wird die Störung durch einen Defekt des *locus* 6q24 hervorgerufen (Gole *et al.*, 2018). Ursächlich ist eine Überexpression des paternal exprimierten PLAGL1-Gens, sowie des HYMAI-Gens (Touati *et al.*, 2018). Diese wird in den meisten Fällen (~ 40%) durch eine paternale uniparentale Disomie von Chromosom 6 herbeigeführt, seltener (~ 32%) durch eine Duplikation des paternalen *locus*. In ~ 28% der Fälle liegt ein Methylierungsverlust der maternalspezifisch differenziell methylierten Region von PLAGL1 vor (Touati *et al.*, 2018). Multilocusdefekte konnten in diesem Zusammenhang vermehrt nachgewiesen werden (Touati *et al.*, 2018). Betroffene Patienten sind häufig hypoton, und haben angeborene Herzfehler und Nierenfehlbildungen. Multilocusdefekte sind außerdem mit Taubheit assoziiert (Temple, Mackay, 1993). Als weitere Ursache konnten Mutationen von Genen nachgewiesen werden, die für Untereinheiten des ATP-sensitiven Kaliumkanals im Pankreas kodieren, welcher eine entscheidende Rolle für die Insulinsekretion spielt. Bei ~ 10% der Patienten kann kein genetischer Defekt nachgewiesen werden (Piccini *et al.*, 2018).

2.2.3 Kagami-Ogata- und Temple-Syndrom

Ein weiterer epigenetisch geprägter *locus* auf Chromosom 14 ist 14q32.2. Er enthält sowohl paternal, als auch maternal exprimierte Gene, sowie eine differenziell methylierte Region. Kommt es zum Verlust der maternalen Genexpression, führt dies zur Erscheinung des Kagami-Ogata-Syndroms (KOS), eine weitere nennenswerte Imprinting-Erkrankung (Ogata, Kagami, 2016). Charakteristische Merkmale betroffener Patienten sind insbesondere das pränatal erhöhte Gewicht bei Polyhydramnion und vergrößerter Plazenta, sowie der pathognomonische glockenförmige Thorax mit sogenannten *coat hanger* Rippen. Weitere Auffälligkeiten in der Gestalt sind ein verkürzter, breiter Nacken, eine Mikrognathie, volle Wangen und eine eingesunkene Nasenwurzel bei prominentem Philtrum. Es bestehen klinische Parallelen zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom: neben dem Überwuchs leiden Patienten mit KOS ebenfalls an Bauchwanddefekten und erhöhtem Tumorrisiko. Betroffene Kinder zeigen eine mentale Retardierung und versterben häufig früh an der Erkrankung.

Eine paternale uniparentale Disomie von Chromosom 14 kann Auslöser des Syndroms sein. Diese kann selten auch in Mosaikform vorliegen, und führt dann zu einer milderer Ausprägung des Syndroms (Haug *et al.*, 2018). Außerdem kommen Defekte der DMR maternalen Ursprungs infrage, wie Epimutationen und Mikrodeletionen, die zum Verlust der Expression maternaler Gene führen (Ogata, Kagami, 2016).

Das Temple-Syndrom (TS), erstmals 1991 durch Temple *et al.* beschrieben, stellt den analogen Defekt mit paternalem Genverlust dar (Temple *et al.*, 1991). Ähnlich dem SRS zeigen Betroffene ein prä- und postnatales Wachstumsdefizit mit verminderter Endgröße (Kagami *et al.*, 2017). Die Patienten haben auffallend kleine Hände, sind tendenziell hypoton und der Eintritt in die Pubertät erfolgt frühzeitig (Kagami *et al.*, 2017). Insgesamt sind sie jedoch nur gering beeinträchtigt. Aufgrund der fehlenden gravierenden klinischen Merkmale fällt die Diagnose schwer (Bertini *et al.*, 2017). Neben einer maternalen uniparentalen Disomie von Chromosom 14, können auch hier Epimutationen und Mikrodeletionen der paternal geprägten Region ursächlich sein. Während beim KOS eine Hypermethylierung, ein *gain of methylation* (GOM), der maternal geprägten Region vorliegt, kommt es beim TS zu einem *loss of methylation* (LOM) der entsprechenden, paternal geprägten, Region (Kagami *et al.*, 2017)

2.2.4 Angelman- und Prader-Willi-Syndrom

Eine weitere Erkrankung, die auf epigenetische Defekte zurückzuführen ist, ist das Angelman-Syndrom (AS)- erstmals 1965 durch den englischen Arzt Harry Angelman beschrieben. Es wird durch fehlerhaftes Imprinting des UBE3A-Gens verursacht. Dieses wird bei gesunden Individuen maternal exprimiert, während das paternale Allel imprintet vorliegt (Margolis *et al.*, 2015). Es kodiert für eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase. In den meisten Fällen (70-80%) wird das Syndrom durch eine maternale *de novo* Deletion des *locus* 15q11-q13 verursacht (Margolis *et al.*, 2015). Patienten, bei denen diese Deletion als Krankheitsursache nachgewiesen wird, sind meist schwer betroffen und zeigen stark ausgeprägte Krankheitsmerkmale (Margolis *et al.*, 2015). In 10-20% der Fälle konnten außerdem Mutationen des maternalen Allels von UBE3A nachgewiesen werden (Margolis *et al.*, 2015). Nur selten (3-5%) sind eine paternale uniparentale Disomie von 15q11-q13 oder Imprintingdefekte des maternalen Allels die Ursache für die Erkrankung (Margolis

et al., 2015). In 10% der Fälle bleibt die Ätiologie ungeklärt (Ranasinghe *et al.*, 2015). Das Angelman-Syndrom tritt bei etwa 1:15.000-20.000 Neugeborenen auf und geht mit einer schwerwiegenden Entwicklungsverzögerung, und kognitiver Beeinträchtigung, einher. Verhaltensauffälligkeiten, wie Hyperaktivität und pathologisches Lachen, sind charakteristisch. Motorische Störungen, wie Tremor und Ataxie, sind wegweisend. Die Entwicklung der Motorik ist beim Angelman-Syndrom stark verzögert, und beeinträchtigt auch die Fähigkeit zu sprechen. Die Mehrheit der Kinder spricht nicht. Auch bei milder Ausprägung werden meist nur wenige Worte gesprochen (Margolis *et al.*, 2015). Autismus-Spektrum-Störungen treten häufig als Komorbidität zum Angelman-Syndrom auf (Margolis *et al.*, 2015). Außerdem treten gehäuft epileptische Ereignisse auf. Meist besteht eine generell erleichterte Erregbarkeit, die mit hypermotorischem Verhalten und ruckartigen Bewegungen assoziiert ist. Äußerlich sind die Kinder, bis auf eine leichte Mikrozephalie, meist unauffällig, weshalb die Diagnose nicht selten erst im Schulkindalter, im Zuge der psychomotorischen Entwicklungsverzögerung, gestellt wird. Die Lebenserwartung ist nicht wesentlich eingeschränkt.

Kommt es hingegen zum paternalen Allelverlust desselben *locus*, führt dies zur Erscheinung des Prader-Willi-Syndroms (PWS). Es tritt mit etwa 1:10.000 Kindern seltener auf, als sein genetisches Pendant. Zwei genetische Phänomene dominieren als Ursache des Defekts: die paternale Deletion von 15q11-q13 (65-75%), sowie eine maternale uniparentale Disomie 15 (20-30%) (Angulo *et al.*, 2015). Andere Imprintingdefekte verursachen nur etwa 1-3% der Erkrankungen (Angulo *et al.*, 2015). Auch beim Prader-Willi-Syndrom gelten Methylierungsanalysen als Mittel der Wahl in der Diagnostik, insbesondere auch zur Abgrenzung zum Angelman-Syndrom (Angulo *et al.*, 2015).

Das Auftreten eines metabolischen Syndroms, als Begleiterscheinung des Prader-Willi-Syndroms, ist pathognomonisch für die Erkrankung. Die Patienten sind, schon bei Geburt, meist hypoton (sog. *floppy infants*). Trotz anfänglicher Trinkschwäche im Neugeborenenalter, neigen die Betroffenen später zu stetiger Gewichtszunahme und leiden an unstillbarem Appetit. Dies resultiert in kindlicher Adipositas und frühzeitigem Diabetes mellitus Typ 2. Das dadurch erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und deren Komplikationen gilt als Hauptursache für die erhöhte Mortalität von Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (Angulo *et al.*, 2015). Es besteht außerdem häufig ein Minderwuchs, mit insbesondere kleinen

Händen und Füßen, und ein Hypogonadismus, die beide mit einer Fehlregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse in Verbindung gebracht werden. Diese Fehlregulation ist auch Ursache anderer Symptome, die häufig mit dem Syndrom in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen beispielsweise Hyperphagie, Störungen der Temperaturregulation, obstruktives Schlafapnoe Syndrom, sowie eine erhöhte Schmerztoleranz (Angulo *et al.*, 2015). Die Mehrzahl der Betroffenen zeigt eine milde bis mittelschwere geistige Retardierung, mit Verlust kognitiver Fähigkeiten (IQ Werte ≈ 65) (Angulo *et al.*, 2015). Auch Verhaltensanomalien sind bei den betroffenen Individuen häufig zu beobachten (Angulo *et al.*, 2015). Dazu zählen diverse Störungen der Impulskontrolle sowie selbstverletzendes Verhalten, insbesondere durch Manipulation der Haut. Die Therapie erfolgt bisher rein symptomatisch

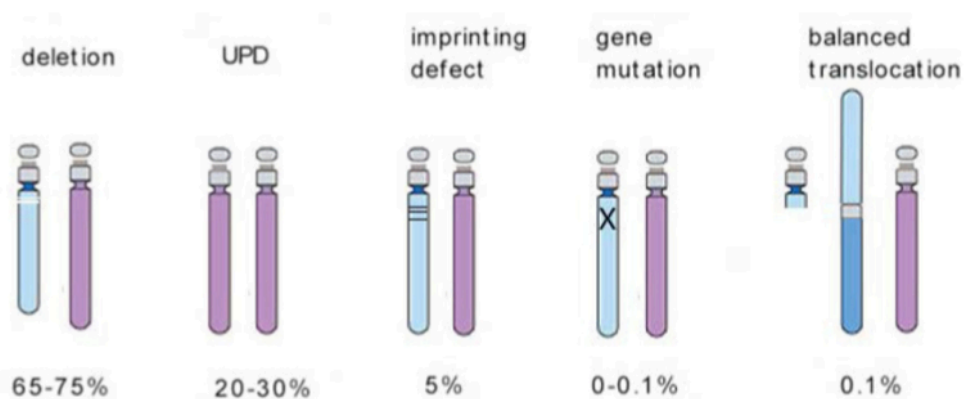


Abbildung 3 (aus Rocha, Paiva, 2014): Ideogramm potenzieller molekulargenetischer Ursachen und deren Häufigkeit bei PWS. Das maternale Chromosom 15 ist in lila, das paternale Chromosom 15 in blau dargestellt.

2.3 ASPN

Das proteinkodierende ASPN-Gen (Asporin) ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisiert (9q22.31) und liegt dort als Teil eines Genclusters vor (Xu *et al.*, 2015). Es wurde erstmalig 2001 durch Lorenzo *et al.*, Henry *et al.* und Yamaba *et al.* identifiziert und benannt (Xu *et al.*, 2015). Die ursprüngliche Bezeichnung lautete PLAP1 (*periodontal ligament-associated protein 1*). Sein Genprodukt, das Asporinprotein, gehört zur Familie der *small leucine rich* Proteoglykane (SLRP), unterscheidet sich von diesen allerdings darin, dass es definitionsgemäß kein Proteoglykan ist; eine Bindungsstelle für Glykosaminoglykanseitenketten ist nicht

vorhanden (Xu *et al.*, 2015). Aufgrund alternativen Splicings gibt es eine Vielzahl an Transkriptvarianten. Es besteht aus 380 Aminosäuren mit 4 Cysteinen am N-terminalen Ende und zwei Cysteinen am C-Terminus (Xu *et al.*, 2015). Seine Sequenz enthält ein Propeptid, das gemeinsam mit ASPN sezerniert wird (Xu *et al.*, 2015).

Die Familie der SLRPs umfasst 18 Proteine (siehe Tabelle 1), die wiederum nach ihrer Sequenz beziehungsweise ihrer Kernstruktur in 5 Klassen unterteilt werden (Xu *et al.*, 2015). SLRPs sind nicht nur Strukturproteine, sondern auch Teil multipler intrazellulärer Signalkaskaden (Schaefer *et al.*, 2008). ASPN ordnet sich, neben Decorin und Biglykan, in die Klasse I der SLRPs ein (Lorenzo *et al.*, 2001). Sie alle tragen einen Abschnitt mit 10 *tandem leucin rich repeats* (LRR) (Lorenzo *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den anderen beiden Klassenmitgliedern weist Asporin eine Strecke von Aspartat-(D)-repeats auf, die in der Anzahl von 9 bis 20 variiert (Xu *et al.*, 2015). Dieses Merkmal zeigen ebenfalls Mitglieder der Klassen II, III und V. Dies unterstreicht, dass die Einteilung der SLRPs weniger nach Struktur, sondern nach Homologien auf genomischer Ebene erfolgte (Schaefer *et al.*, 2008). Typische N-terminale Cystein-reiche Cluster charakterisieren ebenfalls die unterschiedlichen Gruppen. Eine schematische Darstellung der Struktur von Klasse I SLRPs ist Abbildung 4 zu entnehmen.

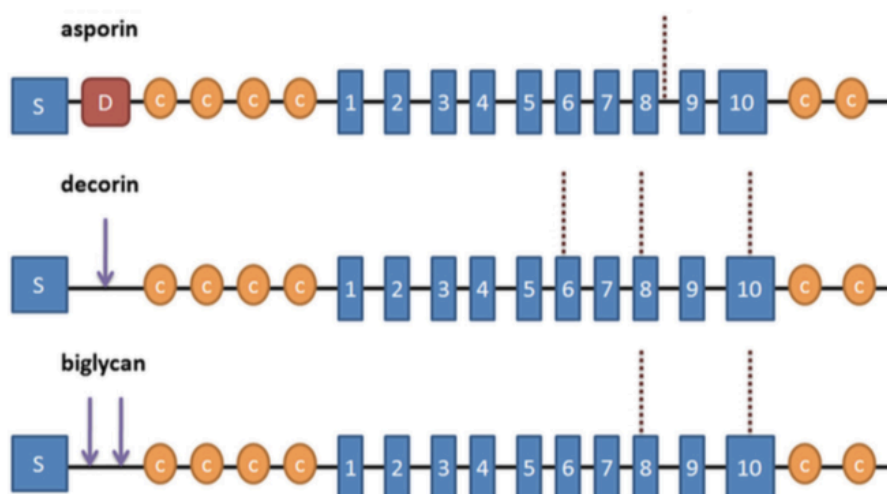


Abbildung 4 (aus Xu *et al.*, 2015): schematische Darstellung der Molekularstruktur von Klasse I SLRPs. Da Asporin keine Bindungsstellen für Glykosaminoglykanseitenketten aufweist, ist es definitionsgemäß kein Proteoglykan im Gegensatz zu den anderen Klasse I-SLRP-Mitgliedern. S: Signalpeptide; C: Cysteinregion; D: Aspartat-(D)-repeats; 1-10: LRR; Pfeile und gestrichelte Linien: Glykosylierungsstellen.

SLRP Klasse	Klassenmitglied	Chromosom
Klasse I	Biglycan (BGN)	X
	Decorin (DCN)	12
	Asporin (ASPN)	9
	ECM2	9
	ECMX	X
Klasse II	Fibromodulin (FMOD)	1
	Lumican (LUM)	12
	PRELP	1
	Keratocan (KERA)	12
	Osteoadherin (OMD)	9
Klasse III	Epiphykan (EPYC)	12
	Opticin (OPTC)	1
	Osteoglycin (OGN)	9
Klasse IV	Chondroadherin (CHAD)	17
	Nyctalopin (NYX)	X
	Tsukushi (TSKU)	11
Klasse V	Podocan (PODN)	1
	<i>Podocan like protein 1</i> (PODNL1)	19

Tabelle 1: SLRP-Familie. *Ersichtlich sind die Klassen I-V der SLRPs mit ihren 18 Mitgliedern sowie deren chromosomale Lokalisation (Schaefer, Iozzo, 2008 und Ni et al., 2014).*

Asporin wird im menschlichen Organismus vor allem im Gelenkknorpel und in den Menisken exprimiert. Es ist Teil der extrazellulären, speziell der kartilaginären, Matrix. Es konnte aber auch in der glatten Muskulatur großer Gefäße und des Uterus sowie in Herz und Leber nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2015). Asporin bindet TGF β und inhibiert so die Expression TGF β -induzierter Gene. Diese Funktion ist mit der Regulation von Chondrogenese und Fibrillogenese und somit der Entwicklung und dem Ausbau der extrazellulären Matrix (ECM) assoziiert (Xu *et al.*, 2015). Es wird eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der ASPN-Expression im Gelenkknorpel und dem Auftreten von Osteoarthritis, eine progressive degenerative Gelenkerkrankung, beschrieben (Xu *et al.*, 2015). Eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Polymorphismus der Aspartat-(D)-repeats und

der Empfänglichkeit für Osteoarthritis zeigte, das die verschiedenen ASPN-Allele sowohl protektiv als auch als Risikofaktor fungieren (Xu *et al.*, 2015). Neben der Beeinflussung von TGF β trägt auch der positive Effekt auf die Mineralisierung von Kollagen zur Krankheitsentstehung bei (Xu *et al.*, 2015). Die Mineralisierung wird durch die Bindung von Kollagen und Calcium durch Asporin induziert (Xu *et al.*, 2015)- ein weiteres Kriterium, das ASPN von den restlichen SLRPs unterscheidet. Hierdurch kommt es zur Ablagerung von Hydroxyapatit in den Gelenken. Dennoch unterdrückt ASPN in anderen Geweben, wie dem Parodontalligament/ Desmodont, den Prozess der Mineralisierung (Yamaba *et al.*, 2015) durch Inhibition des BMP2-Signals (*bone morphogenetic protein 2*). ASPN spielt somit durch seine vielseitige Funktion eine entscheidende Rolle in der Homöostase extrazellulärer Matrix. ASPN kann des Weiteren durch die Aktivierung der Akt/Erk- und TGF β /SMAD-Signalwege die Apoptose inhibieren und kolorektale Karzinomzellen zur Proliferation, Migration und Invasion anregen und wurde aufgrund dessen von Li *et al.* als potenzieller prognostischer Biomarker für Patienten mit kolorektalem Karzinom identifiziert (Li *et al.*, 2019). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ASPN mit SMAD2/3 interagiert, dessen Translokation in den Zellkern fördert und die Expression von Genen steigert, die mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert sind (Li *et al.*, 2019).

2.4 Gennetzwerk

Al Adhami *et al.* zeigten, dass einige der imprinteten Gene in einem Netzwerk, gemeinsam mit biallelisch exprimierten nicht-imprinteten Genen, koexprimiert werden (Al Adhami *et al.*, 2015). Dieses Netzwerk wird auch als *imprinted gene network* bezeichnet. Bereits Varrault *et al.* konnten 2006 eine derartige Koexpression von imprinteten Genen nachweisen (Al Adhami *et al.*, 2015). Es wird angenommen, dass die Entstehung und Entwicklung des IGN nicht *ex nihilo* erfolgte, sondern eine Weiterentwicklung, eines zuvor bestehenden Systems in Beutelsäugern, darstellt, dessen Zunahme in Komplexität mit der gesteigerten embryonalen Entwicklung einherging (Al Adhami *et al.*, 2015).

Die imprinteten Gene dieses Netzwerks zeigten unterschiedlich starke Zusammengehörigkeiten, wobei die Mehrzahl der Gene stark koexprimiert wurde, unabhängig von Datenauswertung oder Spezies (Al Adhami *et al.*, 2015). Viele dieser

koregulierten Gene sind, wie ASPN, an der Ausbildung, Organisation und Regulation der extrazellulären Matrix beteiligt (Al Adhami *et al.*, 2015). Sie kodieren beispielsweise für Aktinfaserkomponenten. Sie sind außerdem in Vorgänge involviert, die Zell-Zell-Verbindungen, Zellkommunikation und durch Wachstumsfaktor induzierte Signale betreffen (Al Adhami *et al.*, 2015). Mott *et al.* konnten nachweisen, dass auch nicht-imprintete Gene *parent of origin* Effekte, durch Kommunikation mit imprinteten *loci*, generieren können (Al Adhami *et al.*, 2015).

Die Hauptfunktion des Netzwerkes besteht in der Kontrolle des Zellzyklus, dem Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus sowie der Zellproliferation und -differenzierung, möglicherweise durch Veränderung der Zusammensetzung der ECM (Al Adhami *et al.*, 2015). Es wird außerdem vermutet, dass auch das Verhalten von Stammzellen durch die ECM Modulation beeinflusst wird, und das IGN daher in das Schicksal von Stammzellen, sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch im Erwachsenenalter, involviert ist. Aufgrund seiner Funktionen ist das IGN vor allem während der Embryonalperiode bedeutsam (Varrault *et al.*, 2006).

Al Adhami *et al.* konnten zeigen, dass imprintete Gene signifikant herunter reguliert werden, sobald die Zellen aus der G0-Phase in den Zellzyklus eintreten und durch Konfluenz *in vitro*, in Folge von Zell-Zell-Kontakt, induziert werden. Dies konnte *in vivo*, im Versuch an Mäusen, vergleichbar dargestellt werden (Al Adhami *et al.*, 2015). Die zeitweise starke Induktion von imprinteten Genen ließ vermuten, dass das jeweils abgeschaltete Allel intermittierend aktiviert und von der Zelle genutzt wird. Al Adhami *et al.* konnten jedoch darlegen, dass die Regulation von imprinteten Genen weder durch Modifikation der Methylierung, noch durch Wechsel von mono- und biallelischer Expression, erfolgt. Die Nutzung des jeweils maternalen oder paternalen Allels, sowie das Methylierungsmuster, blieben, unabhängig vom Proliferationsstatus der Zelle, gleich (Al Adhami *et al.*, 2015). Die Koregulation von imprinteten und nicht-imprinteten Genen innerhalb des IGN, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und *in cellulo* nachgewiesen werden (Al Adhami *et al.*, 2015).

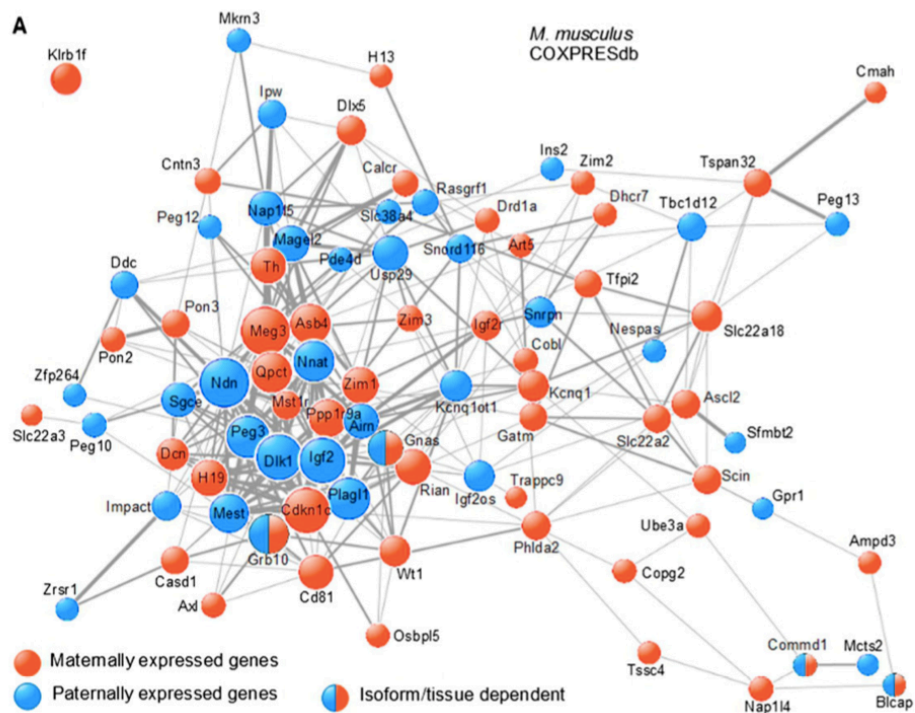


Abbildung 5 (aus Al Adhami et al., 2015): schematische Grafik des IGN. Dargestellt ist die Koexpression muriner IGs, basierend auf Ergebnissen einer COXPRESdb-Metaanalyse von Microarraydaten. Maternale Gene sind als orange Knotenpunkte, paternale Gene als blaue Knotenpunkte dargestellt. Die Knotengröße ist proportional der Koexpression.

3. Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturmethoden wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

3.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Ein Teil der Zellen konnte nach Anzucht in der Kulturflasche, im Zuge eines Erhaltungssplits oder anstelle einer Termination, kryokonserviert werden.

Hierfür wurde das Medium zunächst aus der Kulturflasche entfernt, und die Zellen zweifach mit ca. 5ml D-PBS gewaschen. Anschließend wurden 2ml Trypsin hinzugegeben, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Durch die Hydrolase erhielten die Zellen eine kugelige Form, und schwammen frei im Medium. Nach fünf bis sieben Minuten wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von 10ml Medium abgestoppt, und die Suspension in ein Falcon überführt. In der Zwischenzeit wurde die Zentrifuge, bei geschlossenem Deckel, auf 4°C vorgekühlt. Durch zehnmündige Zentrifugation, wurde das Medium bei .9x1000 Umdrehungen pro Minute von den Zellen abzentrifugiert, und anschließend mit der Pasteurpipette aus dem Falcon entfernt. Zur Ablösung und Suspension des überbleibenden Zellpellets wurde 1ml einer 10%igen DMSO-Lösung verwendet. Jeweils 1ml der Suspension wurde dann in ein geeignetes Eppendorfgefäß für die Kryokonservierung gegeben. Die Zellen wurden zunächst über eine Woche bei -80°C, in einer Isopropanolbox, langsam abgekühlt. Die Temperaturerniedrigung betrug ca. 1°C pro Minute. Im Anschluss wurden die Zellen für die endgültige Kryokonservierung in den Flüssigstickstofftank überführt.

3.1.2 Neubauer Zählkammer

Mithilfe der Neubauer *Improved* Zählkammer erfolgte das Zählen und Hochrechnen von Zellen in der Zellkultur.

Zunächst wurde die Kammer durch gründliches Reinigen und Desinfizieren vorbereitet. Beide Ränder der Kammer sowie der Steg sollten frei von Staub und Verunreinigung sein. Ein entsprechendes Deckglas wurde dann angehaucht und fest auf die Kammer gedrückt. Auf beiden Seiten der Kammer sollten Newtonsche Ringe erkennbar sein.

Die gewünschten Zellen, die ausgezählt werden sollten, wurden wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben mit Trypsin behandelt und vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Falls nötig wurde die Zellsuspension mit dem Inhalt weiterer Kulturgefäße vereinigt. Dann wurden jeweils 10µl der Suspension von oben und unten auf den Steg der Kammer unter das Deckglas appliziert. Rechts und links des Steges wurden jeweils vier Quadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und aus allen vier Werten der Mittelwert bestimmt. Eine Differenz beider Mittelwerte von ≤ 5 wurde toleriert. Die Summe der Auszählung entsprach bei der verwendeten Kammer einer Zellzahl von $X \times 10.000/\text{ml}$ in der Zellsuspension.

3.1.3 Knockdown

Zur Untersuchung der Beeinflussung des *Imprinted Gene Network* durch das ASPN-Gen, wurde dieses experimentell herunter reguliert. Dieser Eingriff wurde an zwei Zelllinien vorgenommen, die im nativen Zustand eine hohe ASPN-Expression aufweisen: BWS $\Delta\text{H19/ICR1}$ mat und SRS UPD(7)mat(I). Für den Knockdown wurde eine genspezifische siRNA (aus dem Englischen: *small interfering RNA*) verwendet, die an das entsprechende Transkript bindet und so die Expression verhindert.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben geteilt und so auf 22,1cm² Kulturplatten übertragen, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50-70% erreichten. Dies ist nur bei einem der Knockdownversuche gelungen. Bei den anderen beiden Ansätzen erreichten die Zellen jeweils eine zu hohe Konfluenz von 90-100%. Sie wurden daher erneut trypsiniert, vereinigt, ausgezählt und dementsprechend auf Kulturschalen gegeben und mit Nährmedium angereichert. Dieses wurde diesmal nicht mit Penicillin-Streptomycin versetzt. Die Aussaat betrug zwischen $2,4$ und $3,4 \times 10^5$ Zellen pro Kulturplatte. Für die Auszählung wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet (siehe Abschnitt 3.1.2). Es wurden jeweils zwei Kulturplatten für die drei Zeitpunkte angesetzt, zu denen die Bestimmung der Genexpression später erfolgen sollte. Für jede Platte wurde außerdem eine Kontrolle erstellt, die später nicht mit der ASPN-spezifischen siRNA behandelt wurde. Aus den jeweils zwölf Schalen, die mit Zellen bestückt wurden, wurden sechs ausgewählt, die am gleichmäßigsten bewachsen waren und dann für den Knockdown weiterverwendet.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst die für den Knockdown verwendete Mischung vorbereitet. In einem 1ml Eppendorfgefäß wurden 750µl Opti-MEM Kulturmedium mit 45µl der siRNA vereint. Da zwei verschiedene ASPN-spezifische siRNAs verwendet wurden, wurden hiervon jeweils 22,5µl verwendet. Bei der siRNA handelt es sich um ein kurzes einzelsträngiges RNA-Molekül, das posttranskriptional an die natürliche RNA in der Zelle bindet und so deren Funktion inhibiert. Handelt es sich dabei um das Transkript eines bestimmten Gens, wird dessen Expression verhindert. Man bezeichnet dies auch als RNA-Interferenz. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurde anstelle der genspezifischen siRNA die *scrambled locus* siRNA als Kontrollelement hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische siRNA, die ungezielt an die natürliche RNA bindet. Beide Ansätze wurden mit 8µl Plus-Reagenz angereichert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem 15ml Falcon Röhrchen wurden 6500µl Opti-MEM Medium und 39µl Lipofectamine 3000 gemischt. Auch hiervon wurden zwei Ansätze erstellt. Für beide Substanzen wurde ein Pipettierfehler in das verwendete Volumen mit einberechnet. Dann wurde jeweils der Falconinhalt mit dem Inhalt eines Eppendorfgefäßes zusammengeführt und die Mischung erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, während sich die Komplexe ausbildeten. In der Zwischenzeit konnten die Zellen vorbereitet werden. Das Nährmedium vom Vortag wurde entfernt und die Zellen zweimal mit circa 2ml Opti-MEM Medium gewaschen. Dann wurden erneut 715µl hinzugegeben und auf den Zellen belassen. Es wurde dann mit der Transfektion begonnen. Die Mischung wurde dazu sukzessive auf die Kulturplatte mit den Zellen getropft. Diese wurde dabei leicht geschwenkt, so dass die Komplexe sich möglichst gleichmäßig verteilten. Es wurden mindestens 2285µl verwendet. Die verbliebene Mischung wurde dann einheitlich auf die Zellen verteilt. Die transfizierten Zellen wurden dann vier bis fünf Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Zuletzt wurde die Flüssigkeit aus den Schalen entfernt und durch 5000µl Opti-MEM Medium ersetzt. Dieses wurde diesmal zusätzlich mit 500µl fetalem Kälberserum versetzt.

Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen im Zuge der RNA Präparation lysiert und von der Schale abgeschabt (siehe Abschnitt 3.3.1). Verwendet wurden jeweils eine Schale, die mit ASPN-spezifischer siRNA behandelt worden war und eine Schale, die mit *scrambled locus* siRNA transfiziert worden war.

3.1.4 Anzucht kryokonservierter Zellen

Für alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Zellen verwendet, die zunächst im Flüssigstickstofftank bei -196°C aufbewahrt wurden, und kryokonserviert vorliegen.

Die Kryoröhrchen waren mit jeweils 1ml Zellsuspension befüllt. Diese bestand aus den jeweiligen Zellen einer Zelllinie und einem DMSO-Einfriermedium. Die Konzentration betrug entweder 1:3 oder 1:1 einer T175-Zellkulturflasche. Nach der Entnahme aus dem Tank wurden die Röhrchen in der Hand aufgewärmt. Der gesamte Inhalt wurde in ein Falcon überführt und mit 1ml eines geeigneten Nährmediums angereichert. Verwendet wurden die Kulturmedien RPMI und DMEM, die jeweils mit 50ml fetalem Kälberserum und 6ml Penicillin-Streptomycin angereichert wurden. Für die Zelllinien SRS UPD(7)mat(I) und SRS UPD(11)mat wurde das DMEM außerdem mit 1% Natriumpyruvat versetzt. Vor Einsatz des Mediums war dieses im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt worden. Das Falcon wurde dann zehn Minuten bei 9.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wodurch sich die Zellen am Boden des Gefäßes sammelten. Die überstehende Flüssigkeit konnte dann mit der Pasteurpipette abgesaugt werden und das Zellpellet wurde in 10ml frischem zellspezifischem Kulturmedium gelöst. Die Suspension wurde dann in eine Zellkulturflasche überführt und das Volumen auf 25ml mit Nährmedium aufgefüllt. So wurden die Zellen im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

3.1.5 Kultivierung und Erhalt von Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen kultiviert, in denen sie am Boden haftend, und mit dem jeweiligen Nährmedium bedeckt, vorlagen. Die Flaschen wurden im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO_2 aufbewahrt. Wenn lichtmikroskopisch eine Konfluenz der Zellen von etwa 80% am Boden der Kulturflasche erkennbar war, wurde ein sogenannter Erhaltungssplit durchgeführt. Hierfür wurde ein Teil der Zellen verworfen, oder auf ein weiteres Kulturgefäß expandiert. Derartige Teilungen erfolgten für alle Zelllinien alle drei bis vier Tage. Wenn zu diesem Zeitpunkt noch keine ausreichende Konfluenz vorlag, wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt, um ein weiteres Wachstum zu gewährleisten.

Zunächst wurde das Nährmedium mit der Pasteurpipette abgesaugt, und verbliebenes Medium durch zweimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Die Zellen wurden dann mit 2ml Trypsin bedeckt, und fünf bis sieben Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Danach erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung: sobald die Zellen sich ausreichend vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von frischem Kulturmedium abgestoppt, und die Zellen darin suspendiert. Die verwendete Menge richtete sich hierbei nach der angestrebten Verdünnung der Zellsuspension. In der Regel wurden 10ml oder 12ml verwendet, um 1:3-, 1:4- und 1:5-Verdünnungen zu erzielen. Der gewünschte Anteil der Zellen wurde in der Flasche belassen, und die restliche Suspension, je nach Bedarf, verworfen oder in ein neues Kulturgefäß überführt- hierzu zählen Zellkulturflaschen im Rahmen einer Expansion, 150er Zellkulturschalen zur RNA-Präparation von nativen Zellen und 60er Kulturschalen zur Aussaat der Zellen für die Knockdownversuche. Der Inhalt der Kulturflasche wurde dann mit dem jeweiligen Nährmedium auf 25ml aufgefüllt, und die Flasche bis zur nächsten Passage erneut im Zellkulturschrank inkubiert.

Da es sich bei allen verwendeten Zelllinien um mortale Zellen handelt, konnten nur bis zu 25 Passagen toleriert werden, um die Qualität der Zellen zu gewährleisten. Die Termination der Zellen erfolgte frühestens nach der 13. Passage (SRS UPD(7)mat(II)) und spätestens nach der 22. Passage (SRS UPD(11)mat.).

3.2 Gelelektrophorese

Wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, wurden in der quantitativen *real time* PCR (qRT-PCR) alle doppelsträngigen Produkte einer Probe mithilfe des SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoffes detektiert und gemessen. Um zu überprüfen, ob es sich bei den entstandenen PCR-Produkten um die richtigen Erzeugnisse, und nicht beispielsweise um Primerdimere handelt, wurden die entsprechenden Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zu jedem Schmelzpunkt, der für ein Gen gemessen wurde, wurde mindestens eine, höchstens jedoch zwei Proben aufgetragen.

Hierfür wurde eine entsprechende Gelschale verwendet und mit TBE aufgefüllt bis das Plateau des Schlittens bedeckt war. Das Agarosepulver wurde mit TBE in einem Erlenmeyerkolben vermischt und anschließend drei Minuten in der Mikrow-

elle erhitzt. Die verwendete Menge richtete sich hierbei nach der Anzahl der Proben und der damit verbundenen Gelgröße. Es wurden ein 30ml und ein 50ml Tray verwendet. Da es sich bei den entstandenen PCR-Produkten ausschließlich um kurzstreckige Doppelstränge in der Größenordnung 150-300bp handelte, wurde ein hochprozentiges Gel angefertigt (2%). Bei 80ml Gel entspricht dies der Verwendung von 1,6g Agarose.

Die erhitzte Mixtur wurde mit Wasser auf 80ml aufgefüllt, um das verdampfte Wasser zu ersetzen und dann in den Schlitten gegossen. Dieser wurde hierzu zunächst umgedreht in die Gelschale eingesetzt. Luftblasen galt es zu vermeiden. Zuletzt wurden die Gelkämme eingesetzt und erst gezogen nachdem das Gel erkaltet und somit gefestigt war. Der Schlitten wurde dann wieder gedreht und die Proben in die Gelkammern aufgetragen. Jede Probe setzte sich aus 4µl *orange dye* und 5µl der jeweiligen PCR-Probe zusammen. Beide Komponenten (9µl) wurden auf einen Monofilm aufgetragen, vermischt und dann in die Geltasche pipetiert. Das *orange dye* diente dem Beschweren der Probe. Für die Applikation auf den Monofilm wurde eine mechanische Dispenserpipette (mit der kleinsten Spitze 1=2µl) verwendet. Zur Kontrolle der Elektrophorese wurde außerdem ein 100bp DNA-Längenstandard aufgetragen.

Der Deckel der Gelschale wurde dann geschlossen und die Spannung mit zunächst 96V einlaufen gelassen. Nach 20-30 Minuten wurde überprüft, ob die Probe die Tasche verlassen hat. Dann konnte die Spannung auf 130V erhöht werden.

Bevor die Lauffront das Gelende erreichte, wurde der Stromfluss gestoppt. Das Gel wurde vorsichtig vom Schlitten gelöst und in eine Wasserschale gegeben, die zuvor mit 200µl Ethidiumbromid versetzt worden war. Darin wurde das Gel zehn Minuten lichtgeschützt geschwenkt. Dieser Vorgang wurde anschließend in reinem Wasser wiederholt.

Zuletzt wurde zur Bewertung des Gels ein Foto mithilfe des Geldetektionssystems von peqlab angefertigt. Das Gel wurde im Weißlicht auf die Tragfläche gelegt und dann mit UV-Licht bestrahlt. Das Gel konnte nachpositioniert und die Kameraeinstellung optimiert werden. Das so gefertigte Foto wurde gedruckt und ausgewertet (siehe Abschnitt 4.1)

3.3 RNA/DNA Methoden

3.3.1 RNA-Extraktion

Um Zielgene in den verschiedenen nativen und experimentell modifizierten Zellen quantifizieren zu können, wurde zunächst die RNA aus den Zellen extrahiert. Dazu wurde das peqGOLD Total RNA Kit verwendet und nach Herstellerangaben für Monolayer-Zellen verwendet.

Das Nährmedium wurde aus der Kulturschale entfernt und die Zellen mit 400µl RNA *lysis buffer* versetzt. Nach 30-60 Sekunden wurden die Zellen mit einem Spatel vom Boden der Schale abgeschabt und in ein 5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden entweder zuerst bei -20°C eingefroren und gesammelt oder direkt gemäß Protokoll behandelt.

Die RNA-Extraktion basiert auf der Verwendung von Säulen mit verschiedenen PerfectBind-Silikamembranen, die sich durch ihre Bindungseigenschaften unterscheiden. Die Probe wurde zunächst auf eine DNA *removing column* geladen. Die in der Probe enthaltene DNA bleibt an der Membran haften und kann durch Zentrifugation vom Rest der Probe getrennt werden. Nach diesem Wirkprinzip wurden folgende weitere Schritte durchgeführt: Der Überstand wurde mit der gleichen Menge an 70% Ethanol versetzt und über eine RNA *removing column* zentrifugiert. Diese Säule, mit der entsprechenden Membran, enthielt fortan das gewünschte Material. Nach einmaligem Waschen mit 500µl RNA *wash buffer* I wurde bei allen Proben ein optionaler DNase Verdau durchgeführt, um eventuell zurückgebliebene DNA zu eliminieren. Dazu wurden 75µl eines Reaktionsmixes, bestehend aus 73,5µl DNase I *digestion buffer* und 1,5µl RNase-freier DNase I, auf die Membran gegeben. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde erneut mit RNA *wash buffer* I gewaschen. Dann wurden zusätzlich zwei Waschschrte mit dem komplettierten RNA *wash buffer* II durchgeführt und die Probe durch Zentrifugation getrocknet. Zuletzt konnte die RNA mit 50µl sterilem RNase-freiem dH₂O in ein Sammelgefäß eluiert werden. Die genauen Angaben zu den einzelnen Schritten und der Zentrifugation, sowie wichtige Hinweise und die Bestandteile des Kits können dem Isolierungsprotokoll des peqGOLD Total RNA Kit entnommen werden.

Generell liefen die Präparationen mithilfe des Kits problemlos ab. Lediglich bei der

RNA-Extraktion aus den BWS Δ H19/ICR1 mat II und SRS UPD(7)mat(I) Knock-downzellen schien die Zentrifugation der Probe über die DNA *removing column* unzulänglich und der Vorgang wurde wiederholt, um ein größeres Volumen an Säulendurchfluss zu erzielen. Es ist zu vermuten, dass die Proben, die in diesem Fall dem Gefrierschrank entnommen wurden, noch zu kalt waren und so die Säule verstopften.

Aus dem gewonnenen Material wurden 2 μ l Aliquot entnommen, das zur Messung der RNA-Konzentration mittels Spektroskopie verwendet wurde.

3.3.2 Spektrophotometrie

Im Anschluss an die Extraktion aus den Zellen wurde die Konzentration der gewonnenen RNA im eluierten Volumen bestimmt. Hierfür wurde ein 2 μ l Aliquot aus der gesammelten Menge entnommen. Für die Messung wurde das NanodropOne Spektrophotometer von Thermo Fischer Scientific verwendet. Das Gerät dient photometrischen Messungen kleinster Proben und verwendet Wellenlängen zwischen 220nm und 750nm. Jede Probe wurde zweimal gemessen; dafür wurde jeweils 1 μ l verwendet. Der Tropfen wird auf das Ende eines fiberoptischen Kabels geladen, und verbindet dieses durch Herunterklappen des Messarms mit einem weiteren fiberoptischen Kabel. So kann das Licht, ausgehend von der Lichtquelle, die Probe passieren und zum Detektor für die Absorptionsbestimmung gelangen. Die Absorption wurde jeweils bei 230nm, 260nm und 280nm Wellenlänge bestimmt. Das Gerät errechnet dann das Verhältnis der 260nm- zur 280nm-Messung. Für RNA-Proben wird vom Hersteller ein Verhältnis von \sim 2 als rein vorgegeben. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch beispielsweise Proteine oder Phenole hin. Des Weiteren wird das Verhältnis der 260nm- zur 230nm-Messung angegeben. Hier werden Reinheitswerte zwischen 1,8 und 2,2 vorgeschlagen. Außerdem wird die Konzentration der gemessenen Probe bei 260nm in ng/ μ l angezeigt.

3.3.3 cDNA-Synthese

Die zuvor aus den Zellen isolierte RNA wurde mithilfe des Thermocyclers von Biometra in doppelsträngige cDNA (aus dem Englischen: *complementary DNA*) umgeschrieben. Der Vorgang hatte zum Ziel das gesamte Transkriptom in doppelsträngiger Form vorliegen zu haben, um es anschließend in der quantitativen *real*

time PCR quantifizieren zu können.

Das Gerät wurde zunächst auf 50°C vorgeheizt, während die RNA vorbereitet wurde. In einem 2ml Eppendorfgefäß wurde sie mit dem Mastermix 1 vereint. Dieser besteht zum einen aus 2µl oligoDT-Primern, welche an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden, und zum anderen aus 4µl freien dNTPs, die die Bausteine für die cDNA darstellen.

Die Menge der verwendeten RNA richtete sich nach der niedrigsten gemessenen Konzentration in den Proben. Es wurden zwischen 100 und 168ng/ µl eingesetzt. Das jeweilige Volumen wurde mit reinem Wasser auf 10µl aufgefüllt, um gleichmäßige Volumina zu erhalten.

Die Proben wurden dann in das Gerät gegeben, und fünf Minuten bei 80°C denaturiert. Dies diente der Auftrennung von Doppelsträngen, die sich womöglich innerhalb der RNA gebildet hatten. Die Proben wurden dann auf 4°C abgekühlt, und der Mastermix 2 konnte hinzugegeben werden. Hier ist die Reverse Transkriptase besonders bedeutsam- ein virales Enzym, das für den Vorgang genutzt wurde. Die Reverse Transkriptase kann an die oligoDT-Primer binden, und von hier ausgehend Doppelstränge synthetisieren. 1µl davon wurde nun, zusammen mit 2µl *buffer* und 1µl RNase-Inhibitor, appliziert. Die beiden weiteren Komponenten tragen zur Stabilisierung der Probe bei. Die Proben wurden dann, für eine Stunde, auf 42°C erhitzt. Bei dieser Temperatur zeigt die Reverse Transkriptase optimale Aktivität.

Für einige der Proben wurden Duplikate angefertigt, bei denen auf die Zugabe der Reversen Transkriptase verzichtet wurde (RT-). Stattdessen wurde 1µl reines Wasser hinzugegeben. Durch die anschließende PCR-Quantifizierung konnten so, bereits vorher vorgelegene Doppelstränge detektiert werden. Dies hätte auf eine Kontamination der Probe mit DNA rückschließen lassen, beispielsweise durch unzureichende Entfernung während der RNA Extraktion.

Im Anschluss an die Synthese erfolgte eine zehnmünütige Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 90°C. Bis zur Entnahme wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Schritt	Zugaben	Details
Vorheizen des Gerätes		50°C, bis zur Fortsetzung des Programms
Zugabe der Proben bestehend aus	10µl der eluierten RNA, anteilig mit H ₂ O verdünnt um gleichmäßige Konzentrationen zu erhalten	
	2µl oligodT-Primer	
	4µl dNTPs	
kurze Denaturierung von doppelsträngigen Sekundärstrukturen der RNA		5 Minuten, 80°C
Kühlen der Proben		4°C, bis zur Fortsetzung des Programms
Ergänzung der Proben durch Zugabe von	1µl M-MuIV Reverse Transcriptase, bzw. 1µl RNase freies Wasser bei RT- Proben	
	1µl RiboLock RNase Inhibitor	
	2µl M-MuIV Reverse Transcriptase Buffer	
Anlage des Primers an die RNA und Aktivierung der Reversen Transkriptase, Synthese der Doppelstränge		1 Stunde, 42°C
Inaktivierung der Reversen Transkriptase		10 Minuten, 90°C
Lagerung der Proben bis zur Entnahme		4°C, bis zur Beendigung des Programms

Tabelle 2: Ablauf der cDNA-Synthese. Gelistet sind die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese mithilfe des Thermocyclers von Biometra.

3.3.4 Quantitative *real time* PCR und Schmelzpunktbestimmung

Die quantitative *real time* PCR diente der Quantifizierung der zuvor gewonnenen Proben. Bestimmt wurde die quantitative Expression verschiedener Gene in den nativen Zellen sowie in den Knockdownproben anhand der cDNA *templates*. Das Funktionsprinzip der Polymerasekettenreaktion (aus dem Englischen: PCR, *polymerase chain reaction*) basiert auf zyklusartigen Temperaturveränderungen, die die Prozesse der Denaturierung des *templates*, des *annealings* des Primers und der Elongation des Doppelstranges zulassen, und wiederholt ablaufen lassen. Die Reaktion, beziehungsweise die daraus entstehenden Produkte, werden in Echtzeit detektiert und am Computer grafisch dargestellt, daher der Name der quantitativen *real time* PCR. Für die Messung der entstandenen Produkte wurde der SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine interkalierende, an doppelsträngige DNA bindende Chemikalie, deren Fluoreszenz beim Einbau in den Doppelstrang zunimmt, und dann spektroskopisch gemessen werden kann.

Es wurden verschiedene Targets mithilfe spezifischer Primer amplifiziert und quantifiziert. Für jedes Targetgen wurde zunächst ein Mastermix, bestehend aus dem SYBR-Green-Farbstoff, dem entsprechenden Primer in *forward* und *reverse* Orientierung sowie reinem Wasser, angefertigt. Jeweils 9µl hiervon wurden in die Wells der PCR Platte gegeben und anschließend mit 1µl der jeweiligen Probe versetzt. Verwendet wurden Multiwellplatten mit 96 Wells. Als Referenz für die absolute Quantifizierung der Proben mithilfe des Maximums der zweiten Ableitung, sowie zur Ermittlung der Effizienz der PCR, wurde außerdem eine Standardreihe für jedes Zielgen mit aufgetragen. Hierfür wurde cDNA aus nativen Zellen der Zelllinien BWS ΔH19/ICR1 mat, SRS UPD(7)mat(I), TNDM HypoCT/PLAGL1 und SRS UPD(7)mat(II) verwendet. Zuvor wurde überprüft, ob die jeweilige Zelllinie das Targetgen exprimiert. Die jeweilige cDNA wurde dann mit reinem Wasser 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 verdünnt. Im Idealfall wird die gesamte Produktmenge pro Zyklus verdoppelt. Dies entspricht einer Effizienz von $E=2$. In der verwendeten Standardreihe drückt sich eine derartige Effizienz durch die Zunahme des *crossing point* (CP) um einen Zyklus mit steigender Verdünnung aus. So konnte die Effizienz der PCR beurteilt werden. Wenn bereits eine Standardreihe für

das Zielgen etabliert worden war, konnte außerdem ein Anker als Referenz verwendet werden, und anhand dessen die Standardreihe importiert werden. Die 1:5- und die 1:160-Verdünnung wurden vom Einsatz als Anker ausgeschlossen. Die 1:10-Verdünnung wurde einer Konzentration von 1 gleichgesetzt. Von allen Proben, die auf die Platte aufgetragen wurden, wurden Duplikate erstellt und deren Mittelwert für die Auswertung verwendet. Außerdem wurde jeder Mastermix durch ein Duplikat kontrolliert, dem anstelle der Probe entweder 1µl Wasser oder nichts weiter zugefügt wurde. So konnte eine Verunreinigung des Mastermixes ausgeschlossen werden. Die befüllte PCR-Platte wurde mit selbstklebender Folie abgedichtet, und abzentrifugiert, bevor sie in das Gerät gegeben wurde.

Für Primer, die zuvor bereits laborintern genutzt worden waren, waren die Parameter für die qRT-PCR bekannt. Alle weiteren Primer wurden mithilfe der Primerblast Webseite www.ncbi.nlm.nih.gov designed und bestellt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Primerpaare exonübergreifend lagen, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Es wurde außerdem ein GC-Gehalt von 45-60%, sowie eine Primerlänge von 18-22bp, angestrebt. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 58°C und 62°C betragen. Die neu bestellten Primer mussten zunächst etabliert werden, bevor die Proben unter optimalen Bedingungen gemessen werden konnten. Hierfür wurde zunächst nur eine Standardreihe auf die Platte aufgetragen, und eine nach dem GC-Gehalt des Primers errechnete *annealing* Temperatur für die Amplifikation verwendet. Je nach gemessener Effizienz der PCR, und Abweichung der Probenduplikate, musste die Temperatur angepasst werden. Als Optimum für die Produktgröße wurde eine Länge von 130-230 bp erachtet. Dies wurde bei der Auswahl neuer Primer berücksichtigt. Eine Liste der verwendeten Primer und entsprechende Details zeigt Tabelle 7.

Für die Genexpressionsanalysen wurde der LightCycler 480 II von Roche verwendet. Hierin erfolgte der Ablauf der PCR in vier Schritten. Zunächst erfolgte eine initiale Denaturierung der Proben für drei Minuten bei 95°C, um die thermosensitiven Reagenzien zu aktivieren. Im Anschluss wurde mit dem ersten von 45 Zyklen begonnen. Zu Beginn jedes Zyklus wurden die Proben auf 95°C erhitzt, wodurch die Doppelstränge denaturiert wurden. Danach erfolgte bei einer primerspezifischen Temperatur zwischen 58°C und 62°C das *annealing* der Primer, und der komplementäre Strang wurde bei 72°C synthetisiert.

Im Verlauf der Zyklen wird deutlich, dass jede PCR drei Phasen der Produktsynthese durchläuft (VanGuilder *et al.*, 2008). Zunächst ist die Menge an Produkt zu

gering und kann durch die Fluoreszenzmessung nicht erfasst werden. Die Menge an Enzym und Reagenzien ist jedoch hoch, und die Synthese kann exponentiell ablaufen. Die Reaktion erreicht den sogenannten *crossing threshold* oder *crossing point* (CP), an dem die Produktmenge eine messbare Dosis erreicht. Dieser ist abhängig von der Ausgangsmenge des zu amplifizierenden Targets. Die Fluoreszenz der Proben übersteigt dann das Signal der Hintergrundfluoreszenz. Im weiteren Verlauf nimmt die Menge an Reagenzien ab, und das Produktquantum zu. Die gemessene Fluoreszenz steigt kontinuierlich an. Die PCR erreicht die lineare Phase, die schließlich in einer Plateauphase endet, in der kein weiteres Produkt synthetisiert wird (siehe Abbildung 6). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte durch eine Detektionseinheit am Ende jeder Elongationsphase bei 530nm .

Dann erfolgte eine Schmelzpunktanalyse der Amplifikate. Hierfür erhöht das Gerät kontinuierlich die Temperatur und misst gleichzeitig die Fluoreszenz der Probe. Beim Aufschmelzen des Doppelstrangs kommt es zum Abfall der Fluoreszenz in der Probe, so dass für alle entstandenen Produkte eine spezifische Schmelztemperatur ermittelt werden kann, welche durch Produkteigenschaften wie Länge und GC-Gehalt bedingt wird. Anhand der Schmelzkurve kann die Echtheit der Produkte überprüft werden, da sich die Schmelzpunkte sekundärer Produkte, wie Primerdimere, deutlich von denen der authentischen Amplifikate unterscheiden (siehe Abschnitt 4.1). Zuletzt wurden die Proben bis zur Entnahme bei 40°C gekühlt.

	Vorgang	Temperatur in °C	Dauer	Anzahl Zyklen
pre-incubation	initiale Denaturierung, Aktivierung thermosensitiver Reagenzien	95	5m	1
amplification	Denaturierung	95	5s	45
	Annealing	in Abhängigkeit des Zielgens zwischen 58 und 62	5s	
	Elongation	72	1s	
melting curve	Aufschmelzen der entstandenen Produkte	kontinuierliche Erhöhung von 65 bis 97	1min/°C	1

	Vorgang	Temperatur in °C	Dauer	Anzahl Zyklen
cooling	Kühlen, Lagerung	40	30s	1

Tabelle 3: Ablauf der PCR im LightCycler 480 II von Roche. Auflistung und Details zu den einzelnen Schritten der qRT-PCR.

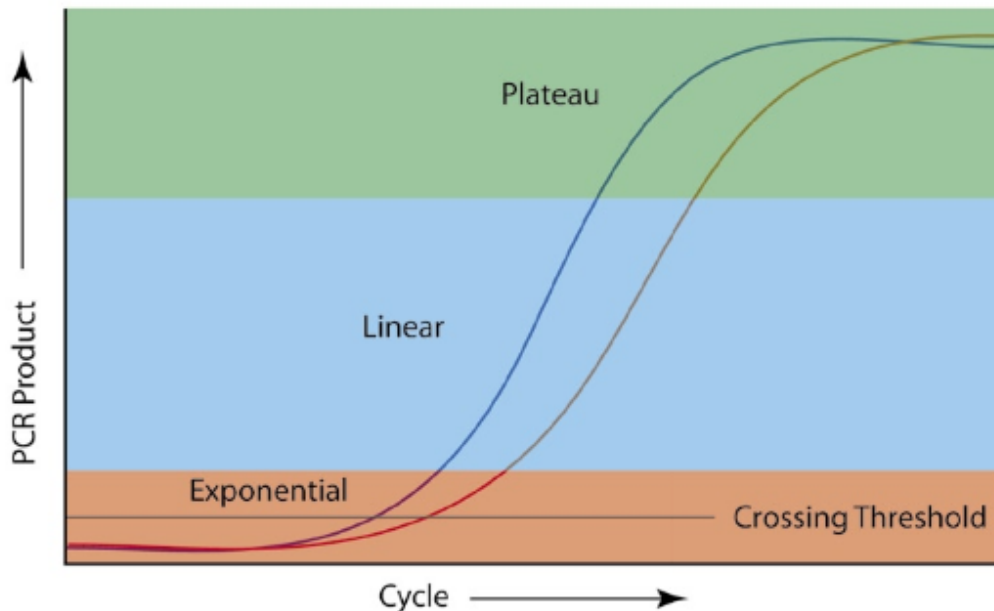


Abbildung 6 (aus VanGuilder et al., 2008): Phasen der PCR. Jede PCR durchläuft drei wichtige Phasen während die Zyklen nacheinander ablaufen und das Produkt sich stetig vermehrt. Initial ist die Verfügbarkeit der Reaktionskomponenten hoch, und die Produktsynthese verläuft exponentiell mit einer Effizienz von nahezu 100% ab. Die Detektion dieser Phase durch Fluoreszenz ist jedoch limitiert, da nur wenig Produkt vorhanden ist und wird erst regelrecht abgebildet, wenn die Produktmenge den crossing threshold überschreitet. In der linearen Phase akkumuliert das Produkt zunehmend, die Effizienz der PCR nimmt ab und die Reagenzien limitieren zunehmend die Produktsynthese. In der finalen Plateauphase ist die Produktsynthese erschöpft.

3.4 Materialien

3.4.1 Flüssigkeiten und Chemikalien

Produkt	Hersteller	Details
Agarose	StarLab	-
Aqua	B. Braun	1l
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Co.	50ml
Distilled Water	Nalgene	500ml
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	gibco by life technologies	500ml
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	gibco by life technologies	500ml
Ethanol $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH	2,5l
Ethanol 70%	-	-
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH	1%, 10mg/ml
fetal calf serum (FCS)	gibco by life technologies	50ml
Gel Loading Dye Blue (6x) Molekulargewichtstandard	New England BioLabs Inc.	1,5ml, 6x, 100bp
KAPA SYBR FAST LC480 qPCR Master Mix	KAPABiosystems	1ml
Lipofectamine 3000 Transfection Kit	invitrogen by Thermo Fisher Scientific	0,75 ml
Opti-MEM Reduced Serum Medium	gibco by life technologies	500ml
Orange Dye	Sigma-Aldrich Co.	-
Penicillin-Streptomycin (P/S)	gibco by life technologies	6ml
Plus Reagent	invitrogen by Thermo Fisher Scientific	0,85ml, 3mg/ml
RPMI Medium 1640	gibco by life technologies	500ml
Sodium pyruvate solution	Sigma-Aldrich Co.	100mM, 100ml

Produkt	Hersteller	Details
TBE buffer	-	pH 8,3
Terralin liquid Desinfektionsmittel	Schülke&Mayr GmbH	1l
Trypsin	Sigma-Aldrich Co.	-

Tabelle 4: Flüssigkeiten und Chemikalien.

3.4.2 Lösungen und Puffer

Mixtur	Bestandteil	Details
Agarosegel 2%	Agarose	1,6g, 4g
	TBE buffer	80ml, 200ml
Ethanol 70%	Ethanol	-
	Wasser	-
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	1%, 10mg/ml
	Wasser	1l
Orange Dye	Sucrose/ Saccharose	30%
	Orange G	0.35%
TBE buffer	Tris	90mM
	Borsäure	90mM
	EDTA	1,25mM

Tabelle 5: Lösungen und Puffer.

3.4.3 Nukleotide

Produkt	Hersteller	Details
dNTPs	-	-
FlexiTube siRNA ASPN 12	qiagen	5nmol
FlexiTube siRNA ASPN 7	qiagen	5nmol
oligodT Primer	metabion international AG	38,4nmol
Scrambled Locus siRNA	qiagen	20nmol

Tabelle 6: Nukleotide.

Zielgen		Sequenz (3' → 5')	Produktlänge in bp	Amplifikations- temperatur in °C
ACTB	F	GGCATCCTCACCTGAAGTA	132	60
	R	GGGGTGTGGAAGGTCTCAA		
ASPN	F	TTGTGCTCTGCCAAACCCTT	268	60
	R	ATGGAATGTTGGTTGG- GACTGA		
ATP5J	F	CTCGGGACTGAGTGCAAGAA	94	61
	R	CCTCCGCAAATGGACTGAGA		
B2M	F	ATGAGTCCTGCCGTGTGA	98	60
	R	GGCATCTTCAAACCTCCATG		
BGN	F	ACACCGGACAGATAGACGTG	218	60
	R	AAGCTTCCTCATCGTTCATCA		
COL1A1	F	GACACAGAGGTTTCA- GTGGTT	188	60
	R	AGTAGCACCATCATTCCAC- GA		
CTSK	F	AGTACCCCTGTCTCATTCCC	226	62
	R	ATCCACTAGGTTCTGGGGAC		
DCN	F	TCTGGACAAAGTGCCAAAGG	188	58
	R	GTCGTTCCAACCTTCAC- CAAAG		
FN1	F	CGCCGAATGTAGGACAAGA	236	62
	R	CTCTTCCCGAACCTTATGCC		
FSTL3	F	ACCTGAGCGTCATGTACCG	181	60
	R	TAGGTGACGTTGTTGTTGCC		
H19	F	GGCCTTCCTGAACACCTTAG	142	61
	R	TGAGCTGGGTAGCACCATTT		
HMBS	F	GGAGACCAGGAGTCA- GACTG	121	61
	R	AAGTAGGCTGTGTGTGGGTG		

Zielgen		Sequenz (3' → 5')	Produktlänge in bp	Amplifikations-temperatur in °C
HPRT	F	ATTGACACTGGCAAAA-CAATGC	110	61
	R	TCCAACACTTCGTGGGGTCC		
IGF2	F	CCGTGCTTCCGGACAACACT	69	62
	R	CTGCTTCCAGGTGTCA-TATTGG		
IGF2R	F	CTCATCTCCCTGGACAAGCA	150	62
	R	AGCCTCATAACCACCAGTGC		
IGFBP3	F	TCCCAGGGGTGTACACATTC	177	62
	R	CTCTGCATGCTGTAGCAGTG		
LUM	F	CGAACTGGCTGATAGTGGAA	197	60
	R	TGGAGTAGGATAATGGCCCC		
MEST	F	CCCACCCCCAACAGGAATTC	87	61
	R	AAGGCATGTGCCATAACGT		
MMP3	F	CCTCCAACCGTGAGGAAAAT	137	60
	R	GCTATTTGCTTGGGAAAGCC		
NLRP1	F	TTCCACCTCTACCTGATCCC	133	58
	R	CAGTGTAACGACAGCCCATA		
NLRP10	F	GAACCTGTTGGAACCTTGTG-GA	130	58
	R	CACCTGGTTGTATCTGCCATT		
PLAGL1	F	GATTGCTGTCACGTCTAATGT	125	60
	R	GTCCCATTAGGTTTCTGTCG		
PPIA	F	ACGTGGTATAAAAGGGGCGG	163	61
	R	TGTCTGCAAACAGCT-CAAAGG		
S100A6	F	CGCGAATGTGCGTTGTGTA	249	62
	R	TTGTGGAAGATGGCCACGA		
SPARC	F	TTTTCGAGACCTGTGACCTG	170	62
	R	ACATTGGGGGAAACACGAAG		
TBP	F	GGATAAGAGAGCCACGAAC-CA	139	66

Zielgen		Sequenz (3' → 5')	Produktlänge in bp	Amplifikations-temperatur in °C
	R	TTAGCTGCTGGAAAACC-CAACTTCTG		
TGFβ2	F	GCTGAACAACGGATTGAGC	124	60
	R	ATCGAAGGAGAGCCATTTCGC		

Tabelle 7: Primer.

3.4.4 Kits

Kit	Bestandteil	Hersteller	Details
cDNA Synthese Kit	M-MuIV Reverse Transcriptase	New England BioLabs Inc.	200.000 U/ml
	RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	40U/μl, 2500U
	M-MuIV Reverse Transcriptase Buffer	New England BioLabs Inc.	1,5ml
	oligodT Primer	metabion international AG	38,4nmol
	dNTPs	-	-
peqGOLD DNase I Digestion Kit von pqlab	DNase I (RNase free)	peqlab	1.500 U, 20U/μl
	Digestionbuffer for DNase I (RNase free)	peqlab	-
peqGOLD Total RNA Kit von pqlab (200 Preparations)	RNA Lysis Buffer T	peqlab	100ml
	RNA Wash Buffer I	peqlab	200ml
	RNA Wash Buffer II	peqlab	20ml, komplettiert mit 80ml 100% Ethanol
	RNase free water	peqlab	20ml
	PerfectBind RNA Columns	peqlab	-
	DNA Removing Columns	peqlab	-
	Collection Tubes	peqlab	2ml
	Ethanol ≥99,5%	Carl Roth GmbH	2,5l

Kit	Bestandteil	Hersteller	Details
	Ethanol 70%	-	-

Tabelle 8: Kits.

3.4.5 Zelllinien

Name	Klinische Diagnose
BWS UPD(11)pat	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
BWS ΔH19/ICR1 mat	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
SRS UPD(11)mat	Silver-Russell-Syndrom
SRS UPD(7)mat(I)	Silver-Russell-Syndrom
SRS UPD(7)mat(II)	Silver-Russell-Syndrom
TNDM HypoCT/PLAGL1	Transienter neonataler Diabetes mellitus

Tabelle 9: Zelllinien.

3.4.6 Nährmedien

Zelllinien	Bestandteile	Hersteller	Details
BWS ΔH19/ICR1 mat BWS UPD(11)pat	RPMI Medium 1640	gibco by life technologies	500ml
	fetal calf serum (FCS)	gibco by life technologies	50ml
	Penicillin-Streptomycin (P/S)	gibco by life technologies	6ml
SRS UPD(7)mat(I) SRS UPD(11)mat	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	gibco by life technologies	500ml
	fetal calf serum (FCS)	gibco by life technologies	50ml
	Penicillin-Streptomycin (P/S)	gibco by life technologies	6ml
SRS UPD(7)mat(II) TNDM HypoCT/PLAGL1	Sodium pyruvate solution	Sigma-Aldrich Co.	100mM, 100ml
	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	gibco by life technologies	500ml

Zelllinien	Bestandteile	Hersteller	Details
	fetal calf serum (FCS)	gibco by life technologies	50ml
	Penicillin-Streptomycin (P/S)	gibco by life technologies	6ml

Tabelle 10: Nährmedien.

3.4.7 elektronische Geräte und Laborinstrumente

Produkt	Hersteller, Details
Auszählhilfe	ENM
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, 250ml
EASY-CAST Electrophoresis System	Owi Scientific Inc.
EBA 12 R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Electrophoresis Power Supply EPS 1000 Netzgerät	Pharmacia Biotech
Erlenmeyerkolben	Corning, 250ml
Finnpipette F2	Thermo Fisher Scientific, 0,2-2µl, 1-10µl, 5-50µl, 20-200µl, 100-1.000µl
Geldetektionssystem	peqlab
Gelkämme	peqlab
Heraeus Hera cell Zellkulturschrank	Kendro, 37°C, 5% CO2
Heraeus LaminAir Sterilbank	Heraeus Instruments GmbH, HLB 2448 GS
Lichtmikroskop ID03	Zeiss
LightCycler 480 II Real-Time PCR Instrument	Roche
Matrix Electronic Pipette	Thermo Fisher Scientific, 250µl Dispenserpipette
Messzylinder	Nalgene, 100ml
Micro-Chef 3310 Mikrowelle	Moulinex
Mini-Vac power	peqlab
Multipipette plus	eppendorf
NanodropOne	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Improved Zählkammer	la fontaine, 0,100mm Tiefe, 0,0025mm ²
Perfect Spin P Plattenzentrifuge	peqlab

Produkt	Hersteller, Details
pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph
Sartorius digitale Laborwaage	AS Wägetechnik
Skalpell	-
Sorvall RT 6000D Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Styroporkühlbox	-
T Professional Thermocycler	Biometra
Vortexer	StarLab und Heidolph

Tabelle 11: elektronische Geräte und Laborinstrumente.

3.4.8 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller, Details
96 Well PCR Platte	greiner bio-one, 0,2ml, weiß, halber Rand
cellstar Rörchen	greiner bio-one, 15ml, 50ml
Combitip plus	eppendorf, 0,2ml 1=4µl
Deckgläser	Menzel-Gläser, 21x26mm
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH
Eppendorfgefäße	-
Handschuhe	sempercare, Nitrit, Latex-free, Powder-free
Handschuhe	sempercare, Latex-free, Powder-free
Integrity Filter Tips	Thermo Fisher Scientific, 250µl
Kryorörchen	-
Parafilm M Laboratory Film	American National Can, 4 in. x 125 ft. roll
Pasteurpipetten	-
Serologische Pipette	greiner bio-one, 5ml, 10ml, 25ml
Spatel	-
TC-Flasche T175	Sarstedt, belüftete Kappe
TC-Schale 150	Sarstedt
TipOne Graduated Filter Tip	star lab, 10/20µl, 200µl, 1000µl
Tissue-Box	Carl Roth GmbH
Viewseal Abdeckfolie	greiner bio-one, transparent

Produkt	Hersteller, Details
Zellkulturschale 60	TPP, 22,1cm ² Wachstumsfläche

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien.

4. Ergebnisse

4.1 Knockdown und quantitative Bestimmung der Genexpression

Der Knockdown (aus dem Englischen: niederschlagen, abreißen) wurde mithilfe von synthetisch hergestellten siRNAs durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.3), sogenannte *small interfering* RNAs, die an das Transkript des Targets binden und so die Translation der Information unterbinden. Es handelt sich dabei um kurze doppelsträngige RNAs, die Homologien zur Target-RNA aufweisen. Sie weisen einen charakteristischen Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende auf (Prawitt *et al.*, 2004). Man bezeichnet dieses posttranskriptionale Unterbinden der Genexpression auch als RNA-Interferenz. RNA-Interferenz ist nicht nur eine Technik der molekularen Biologie. Sie kommt auch in diversen Organismen wie Protozoen, Insekten, Pilzen und Wirbeltieren vor, und dient dort insbesondere der zellulären Kontrolle (Prawitt *et al.*, 2004). Der Mechanismus wurde erstmals 1998 von Fire und Mitarbeiter erklärt (zusammengefasst in Cullen, 2014). RNA-Interferenz wurde erstmals im Fadenwurm *C. elegans* beobachtet, als Reaktion auf eine kleine doppelsträngige RNA (dsRNA), die zu einem sequenz-spezifischen *gene silencing* führte (Han, 2018). Die siRNA wird mithilfe eines Multiribonukleoproteinkomplexes, dem sogenannten RISC (*RNA induced silencing complex*), in Einzelstränge geteilt. Einer der siRNA-Einzelstränge wird als Template für das Auffinden und Binden der homologen Target-RNA verwendet (Prawitt *et al.*, 2004). Bei dieser einzelsträngigen RNA handelt es sich um eine miRNA (*micro* RNA, aus dem Englischen: klein, winzig); eine endogen kodierte, einsträngige RNA, die, als Teil des RISC, ihr Target, die *messenger* RNA, blockiert (Cullen, 2014). Durch Endo- und Exonukleaseaktivitäten des RISC wird die Target-RNA schließlich degradiert (Prawitt *et al.*, 2004). Der Prozess des Knockdown ist zeitlich begrenzt, weshalb im Rahmen der Untersuchungen der zeitliche Verlauf der Genexpressionslevel nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden verfolgt und dokumentiert wurde. Für jede Knockdownprobe wurde außerdem eine Negativkontrolle erstellt, für die anstelle der genspezifischen siRNA die *scrambled locus* siRNA verwendet wurde. Zur Untersuchung der Auswirkungen von ASPN auf die transkriptionelle Regulation von bestimmten Genen im Rahmen von Imprinting-Erkrankungen, wurden zunächst humane Fibroblastenzelllinien aus Spenderzellen von Patienten mit entsprechenden epigenetischen Defekten herangezogen und auf deren ASPN-Expressionslevel un-

tersucht.

Folgende Zelllinien wurden hierfür initial herangezogen: BWS Δ H19/ICR1 mat, SRS UPD(7)mat(I), BWS UPD(11)pat, SRS UPD(7)mat(II), TNDM HypoCT/PLAGL1 und SRS UPD(11)mat. Jede dieser Fibroblastenkulturen weist einen epigenetischen Defekt auf, der zur klinischen Diagnose einer Imprinting-Erkrankung führte (siehe Tabelle 9). Aus den angezüchteten Zellen wurde entweder direkt oder nach Transfektion im Rahmen der Knockdownversuche, die RNA mithilfe des peq-GOLD Total RNA Kit aus den humanen Fibroblasten extrahiert (siehe Abschnitt 3.3.1). Dabei wurde angestrebt, eine Verunreinigung der Proben mit DNA möglichst zu vermeiden. Die Konzentration im gewonnenen Volumen wurde mittels Aliquot spektrophotometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.2). Im Anschluss wurde die RNA unter Verwendung von Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 3.3.3), um dann im Rahmen der PCR vervielfältigt werden zu können (siehe Abschnitt 3.3.4). Mithilfe der Schmelzpunktanalyse und der Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2) wurde die Authentizität der entstandenen Produkte gewährleistet. Sekundäre Produkte wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Mithilfe einer Standardreihe, beziehungsweise eines Ankers, wurde die Effizienz der PCR bestimmt. Diese sollte für alle untersuchten Gene $\geq 1,9$ betragen. Des Weiteren diente die Standardreihe als Referenz für die absolute Quantifizierung der Proben, die mittels dem Maximum der zweiten Ableitung erfolgte. Für die Quantifizierung ist von Bedeutung, dass die gemessenen *crossing points* auf einer Geraden liegen (Link=0), daher wurden gegebenenfalls Werte aus der Berechnung ausgeschlossen, die über oder unterhalb der Geraden lagen. Für jede Probe wurde ein Duplikat erstellt, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Aus den Duplikaten einer Probe wurde ein mittlerer *crossing point* sowie die Standardabweichung dessen ermittelt. Hierbei wurden Werte $<0,2$ angestrebt. Wurde dies nicht erreicht, wurde die PCR für diese Proben gegebenenfalls wiederholt. Für die folgenden Proben war dies der Fall:

17 Proben aus Knockdownversuch BWS Δ H19/ICR1 mat I (IGF2 SL 48h, IGF2 SL 72h, IGF2R ASPN 24h, IGF2R ASPN 48h, IGF2R SL 48h, H19 SL 24h, H19 SL 72h, ZAC1 ASPN 24h, ZAC1 ASPN 48h, ZAC1 ASPN 72h, ZAC1 SL 24h, ZAC1 SL 48h, ZAC1 SL 72h, NLRP1 SL 72h, NLRP10 ASPN 48h, NLRP10 SL 72h, CTSK ASPN 48h).

10 Proben aus Knockdownversuch BWS Δ H19/ICR1 mat II (ASPN ASPN 48h, ASPN ASPN 72h, ASPN SL 48h, ZAC1 ASPN 48h, IGF2R SL 24h, IGF2R SL 48h,

H19 ASPN 24h, H19 ASPN 48h, NLRP1 SL 48h, BGN SL 24h).

18 Proben aus Knockdownversuch SRS UPD(7)mat(I) (ASPN ASPN 48h, ZAC1 ASPN 24h, ZAC1 SL 72h, TGF β 2 ASPN 72h, TGF β 2 SL 48h, TGF β 2 SL 72h, IGF2 ASPN 48h, IGF2 ASPN 72h, IGF2 SL 72h, H19 SL 24h, NLRP10 ASPN 24h, NLRP10 ASPN 72h, NLRP10 SL 72h, LUM ASPN 48h, BGN SL 24h, BGN SL 48h, DCN SL 72h, SPARC SL 24h).

Aus beiden ermittelten Konzentrationen der Duplikate wurden ebenfalls der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Für Duplikate, die mehrfach gemessen wurden, wurde jeweils individuell entschieden, welche Werte in die Rechnung einbezogen werden sollten. Wies eine einzelne Probe eine Konzentrationsabweichung der Größenordnung $\pm 0,5E+00$ auf, blieb diese unbeachtet und wurde eliminiert.

Anhand der mittleren Konzentrationen konnte die Aktivität der Gene nach dem Knockdownversuch berechnet werden. Hierzu wurden die gemessenen Konzentrationen zu allen drei Zeitpunkten zu der *scrambled locus* Probe ins Verhältnis gesetzt. Es erfolgte außerdem eine Normalisierung der Werte mithilfe von Haushaltsgenen (siehe Abschnitt 4.2), indem die Konzentrationswerte zusätzlich zum Geomittel der verwendeten Haushaltsgene ins Verhältnis gesetzt wurden.

Im Anschluss an die PCR-Versuche wurden ausgewählte Proben mithilfe einer Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2) untersucht, und die Länge der vervielfältigten Produkte überprüft. Dies diente, ebenso wie die Schmelzpunktanalyse (siehe Abschnitt 3.3.4) der Bestätigung der Authentizität der Produkte. In der *real time* PCR wurden alle doppelsträngigen Produkte einer Probe detektiert und gemessen. Um zu überprüfen, ob es sich bei den entstandenen PCR-Produkten um die richtigen Produkte handelt, wurde zu jedem Schmelzpunkt, der für ein Gen gemessen wurde, mindestens eine Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Anhand der Marker für die Basenpaarlänge im Gel, den sogenannten Längensstandards, konnte die Länge des Produkts zuverlässig bestimmt werden. Zeigte sich ein zusätzlicher Balken im Bereich deutlich unter 100bp, wie beispielsweise bei dem CTSK-Gen (siehe Abbildung 8), wurde dies als Verunreinigung der Probe durch Primerdimere gewertet. Schwere Verunreinigungen oder ein gänzlich falsches Produkt wurde für keine der Proben nachgewiesen. Für die Auswahl der Proben wurden jeweils zwei repräsentative Proben mithilfe des PCR Programms für jedes Gen ausgewählt.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die grafische Darstellung einer Schmelzpunktanalyse, die sogenannte *melting curve*, wie sie am Ende einer jeden qRT-PCR durch Aufschmelzen der Produkte durch das Programm des LightCycler 480 II erstellt wurde. Für die Schmelzpunktanalyse wird die Probe um ein Grad pro Minute erhitzt. Dadurch kommt es zur Auftrennung der Doppelstränge in Einzelstränge. Der interkalierende, in die Doppelstränge eingelagerte fluoreszierende SYBR-Green-Farbstoff, löst sich aus der Doppelhelix und verliert seine Fluoreszenz. Erkennbar sind die abweichenden Schmelzpunkte für Primerdimere und die Wasserkontrolle, sowie der Schmelzpunkt des Amplifikats, der zusätzlich elektrophoretisch überprüft wurde.

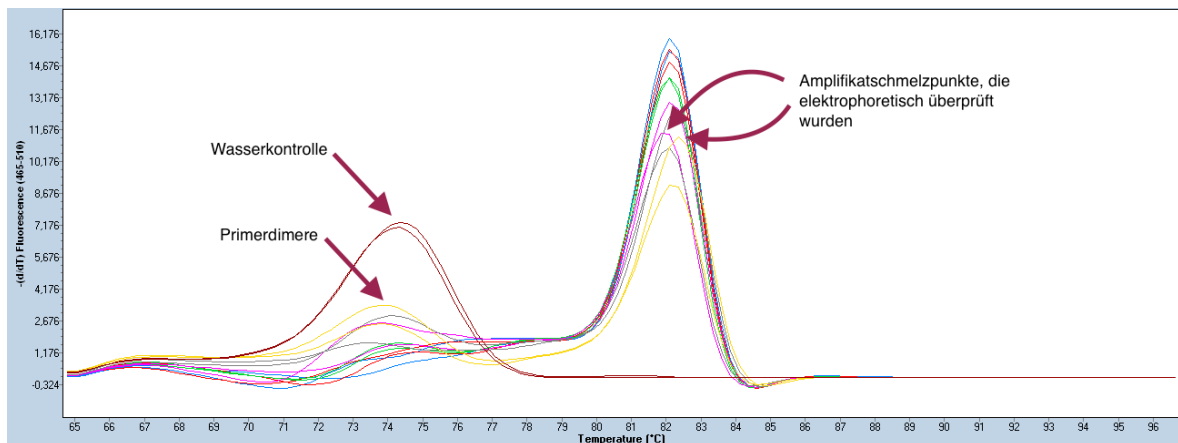


Abbildung 7: grafische Darstellung der Schmelzpunktanalyse durch das Programm des LightCycler 480 II. Grafik am Beispiel des B2M-Gens in den nativen BWS $\Delta H19/ICR1$ mat-Zellen, dessen Schmelzpunkt bei 81,7°C liegt. Erkennbar sind außerdem die abweichenden Schmelzpunkte, verursacht durch Primerdimere und die Wasserkontrolle. Die X-Achse zeigt die Temperatur, die Y-Achse die entsprechende Fluoreszenz der Probe.

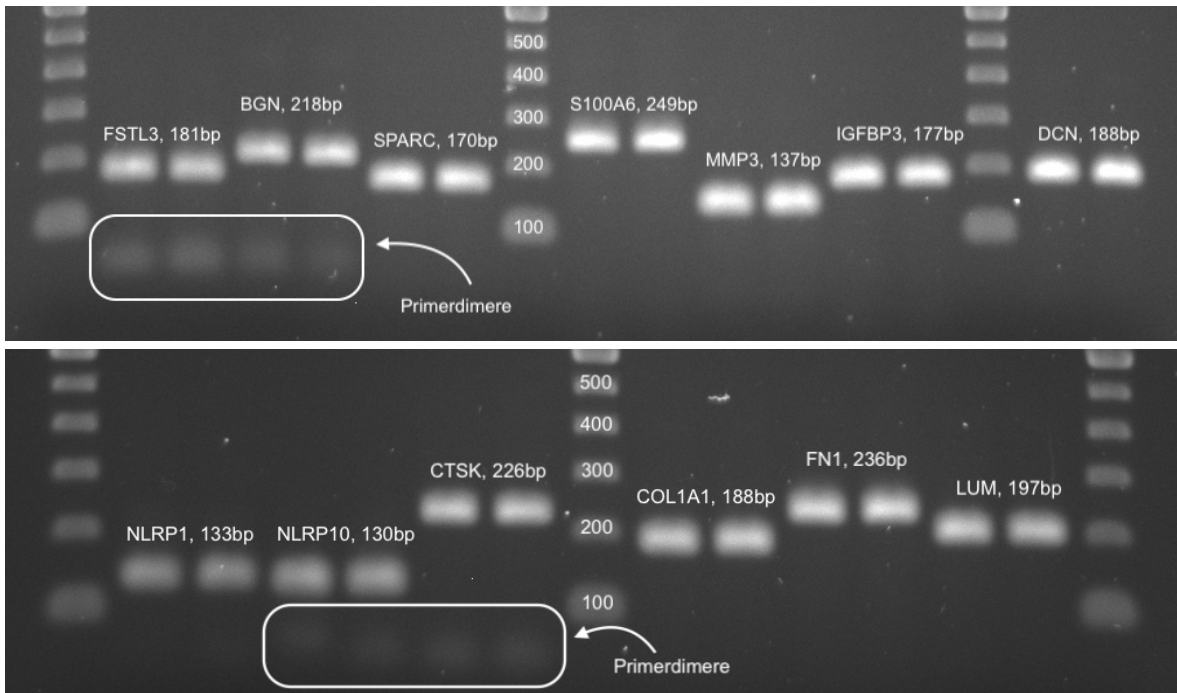


Abbildung 8: elektrophoretische Darstellung der Amplifikatprodukte folgender Gene: FSTL3, BGN, SPARC, S100A6, MMP3, IGFBP3, DCN, NLRP1, NLRP10, CTSK, COL1A1, FN1, LUM. Die Marker für die Produktlänge sind jeweils mit 100, 200, 300, 400 und 500 [bp] markiert. Die jeweiligen Produktlängen sind der Abbildung zu entnehmen. Eine entsprechende elektrophoretische Verifizierung wurde für alle verwendeten Gene durchgeführt.

4.2 Haushaltsgene

Als Haushaltsgene werden Gene bezeichnet, die von vielen Zellen in ähnlicher Form konstitutiv exprimiert werden, im Gegensatz zu regulierten Genen. Ihre Produkte dienen üblicherweise der Erhaltung grundlegender Zellfunktionen und -strukturen, wie beispielsweise dem Energiestoffwechsel und werden unabhängig vom Zelltyp exprimiert. Haushaltsgene können daher zur Normalisierung beim Einsatz unterschiedlicher Templatmengen eingesetzt werden, um die Varianz in der Expressionsstärke der regulierten Gene zu reduzieren. Bei der Auswahl der Haushaltsgene wurde darauf geachtet, dass sie in allen verwendeten Zellen exprimiert werden und dass die potenziellen Kandidaten auch im Rahmen der Knockdownversuche ein gleichartiges Expressionsverhalten zeigten, da sich das Expressionsverhalten unter experimentellen Bedingungen ändern kann. Folgende Haushaltsgene wurden für den etwaigen Einsatz getestet und dafür ihre Expression in den nativen Zellen sowie in den Knockdownproben bestimmt: B2M, ATP5J,

HMBS, PPIA, HPRT, TBP und ACTB. Diese Gene waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und hatten sich für humane Fibroblasten bewährt.

Zunächst wurde nur die Expression von B2M, ACTB und HPRT in den nativen Zellen verglichen. ACTB und HPRT deuteten auf eine relative Templatemenge im Verhältnis von 2,48:1 für die nativen SRS UPD(7)mat(I)-Zellen hin. Für alle weiteren Zelllinien lag das Verhältnis darunter. B2M hingegen zeigte Templatemengen im Verhältnis 15,33:1 für ACTB und 6,25:1 für HPRT in den SRS UPD(11)mat-Zellen. Eine weitere Abweichung zeigte sich in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen- dort deutete B2M auf eine Templatemenge im Verhältnis von 7,02:1 für ACTB hin. B2M wurde aufgrund dieser Abweichungen in der Expressionsstärke von der Auswahl eliminiert. Um eine bessere Normalisierung zu erzielen, wurden dann die weiteren Gene ATP5J, HMBS, PPIA und TBP hinzugezogen, und deren Expression in behandelten und unbehandelten Zellen bestimmt. Verglichen wurden dann die Expressionsmuster im zeitlichen Verlauf in den Knockdownproben (siehe Abbildung 9 a) bis c)).

Obwohl im relativen Muster der verschiedenen Gene einige Übereinstimmungen gefunden werden konnten, zeigte sich kein einheitliches Bild. Übereinstimmungen gab es beispielsweise vermehrt zwischen PPIA und HPRT sowie zwischen PPIA und HMBS, aber auch vereinzelt zwischen ATP5J und HMBS sowie ATP5J und PPIA. Da zwischen TBP und den anderen Genen nur wenige Überschneidungen im relativen Muster auftauchten, und in den Fibroblasten mit ASPN-Knockdown tendenziell niedrigere Konzentrationen gemessen wurden als in den *scrambled locus* Proben, wurde es hier von der Auswahl eliminiert. Auch ACTB wurde von der Verwendung zur Normalisierung der Templatekonzentrationen ausgeschlossen, da die Probenwerte im zweiten Knockdownversuch für die *scrambled locus* Proben, und im dritten Knockdownversuch für alle Proben stark abfiel. Obwohl das HMBS-Gen ein ähnliches Verhalten zeigte, wurde es in die Normalisierung mit eingeschlossen, aufgrund der Überschneidungen im Expressionsmuster mit den anderen Genen. Zur Normalisierung der ermittelten Templatekonzentrationen wurden dementsprechend folgende Haushaltsgene verwendet: ATP5J, HMBS, PPIA und HPRT.

Aus den jeweiligen Konzentrationsmittelwerten der Duplikate wurde das geometrische Mittel aller verwendeten Haushaltsgene bestimmt. Der Mittelwert der Konzentrationen der untersuchten Gene wurde dann durch das Geomittel der Haushaltsgene dividiert. Durch die Bildung dieses Quotienten, wird die Normal-

isierung herbeigeführt. Die Haushaltsgene wurden sowohl für die Quantifizierung der nativen Zellen, als auch für die Quantifizierung der Zellen der Knockdownversuche verwendet. Die Expressionsaktivität der Gene der Knockdownversuche ist als Prozentzahl angegeben, die das Verhältnis der Knockdownprobe zur *scrambled locus* Kontrolle mit einbezieht.

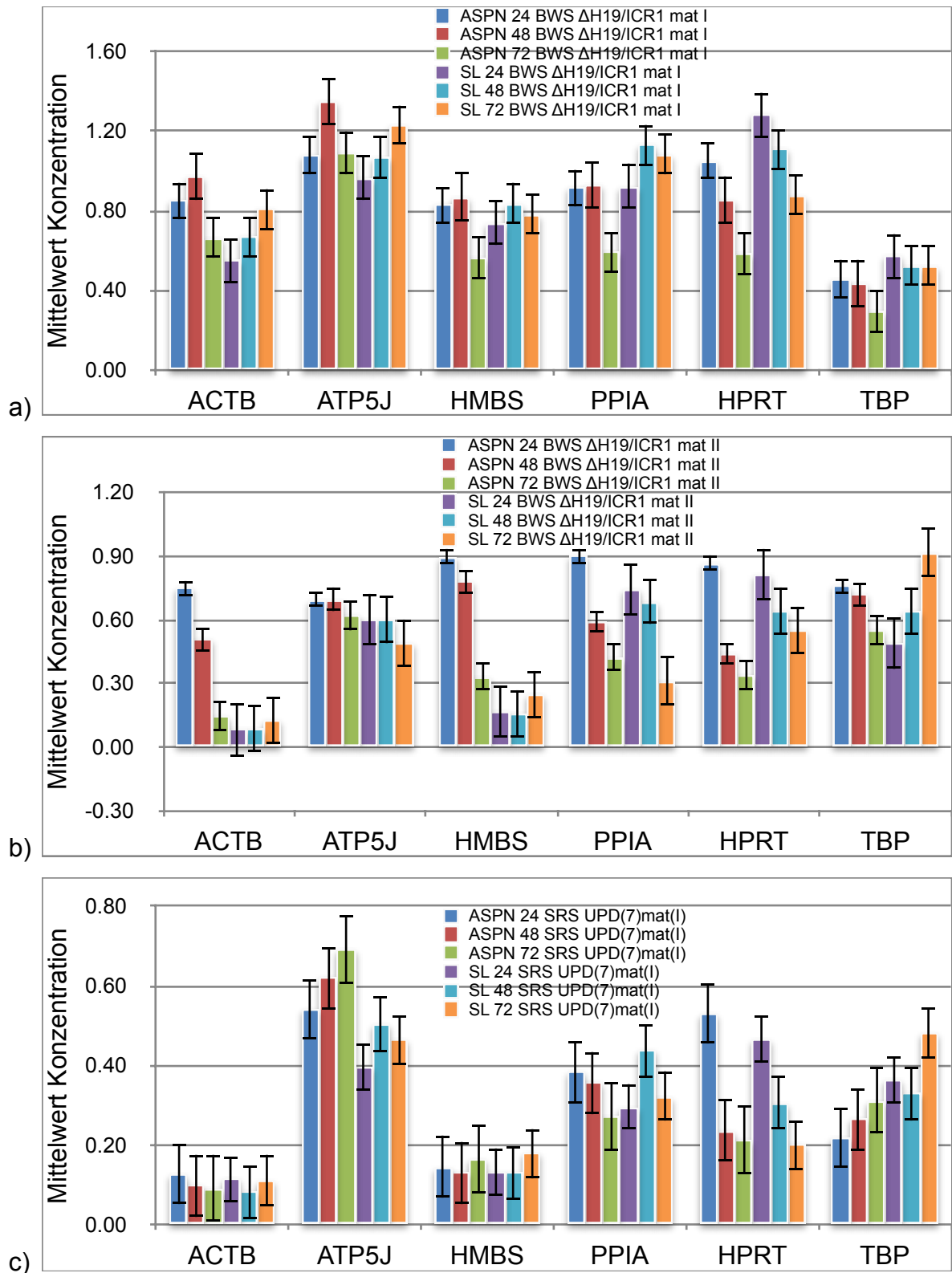


Abbildung 9 a)-c): grafische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der getesteten Haushaltsgene zu den verschiedenen Zeitpunkten des Knockdown.

4.3 ASPN und Verifizierung des Knockdown

Da die BWS Δ H19/ICR1 mat- und die SRS UPD(7)mat(I)-Zelllinie in den nativen Fibroblastenkulturen die höchsten Expressionsraten von ASPN aufwiesen, wurden sie für das Knockdownexperiment weiter verwendet. Das Niveau der ASPN-Expression ist in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen etwas geringer als in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen, und dennoch höher als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Die RPKM-Werte liegen bei 90,29 RPKM für BWS Δ H19/ICR1 mat, 7,46 RPKM für SRS UPD(7)mat(I) und 0,8 RPKM für TNDM HypoCT/PLAGL1. Die qRT-PCR-Werte von ASPN ergaben sich nach Normalisierung mittels der Haushaltsgene wie folgt: BWS Δ H19/ICR1 mat 1,12; SRS UPD(7)mat(I) 0,4; SRS UPD(7)mat(II) 0,2; BWS UPD(11)pat 0,03; SRS UPD(11)mat 0,04 und TNDM HypoCT/PLAGL1 0,04. Zwei der drei Knockdownversuche wurden an BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen durchgeführt, während der dritte Knockdown in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen realisiert wurde.

Für alle untersuchten Gene wurde die Expressionsaktivität nach ASPN-Knockdown bestimmt. Da durch den Knockdown experimentell eine mit der TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellreihe vergleichbare, niedrige ASPN-Expression induziert wurde, wurde verglichen, ob sich die Expression der untersuchten Gene der in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen annäherte. Die untersuchten Gene wurden in zwei Gruppen unterteilt. Diejenigen, bei denen ein Anstieg der Expressionslevel zu erwarten war (siehe Abschnitt 4.5) und diejenigen, bei denen ein Rückgang der Aktivität vermutet wurde (siehe Abschnitt 4.6). Anhand der Ergebnisse wurden zusätzlich Untergruppen erstellt, die Gene zusammenfassen, bei denen vergleichbare Effekte durch den Knockdown gezeigt wurden.

Für das ASPN-Gen wurde bei allen drei Knockdownversuchen eine Restaktivität von $\leq 20\%$ angestrebt, die in jedem Fall erreicht wurde. Für die BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellreihe ergaben sich Restaktivitäten im Verlauf nach 24, 48 und 72 Stunden von 10,42%, 17,15% und 3,76% sowie 3,66%, 1,6% und 1,47%. Die SRS UPD(7)mat(I)-Zelllinie zeigte eine ASPN-Restaktivität von 9,75%, 6,47% und 3,72% im zeitlichen Verlauf. Eine grafische Darstellung der Restaktivität von Asporin ist Abbildung 10 zu entnehmen. Für die Ermittlung der Restaktivität wurde für jede Probe jeweils der Quotient aus dem Konzentrationsmittelwert und dem Ge-

omittel der Haushaltsgene gebildet. Dann wurde die Knockdownprobe für jeden Zeitpunkt 24h, 48h und 72h ins Verhältnis zur jeweiligen *scrambled locus* Kontrolle gesetzt.

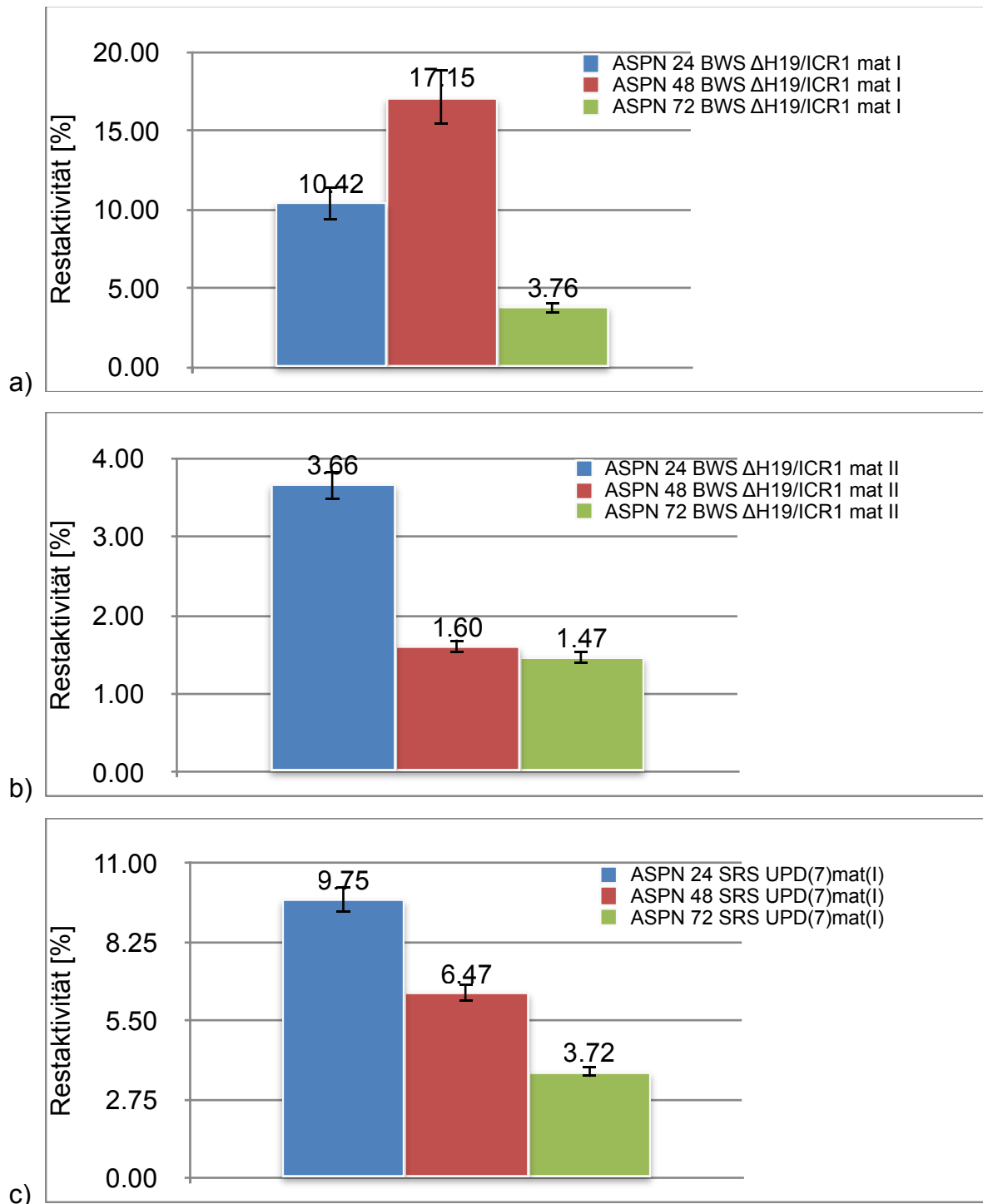


Abbildung 10 a)-c): grafische Darstellung der Restaktivität von ASPN in [%] nach Knockdown. Abb. a) Restaktivität nach Knockdownversuch mit BWS Δ H19/ICR1 mat I; Abb. b) Restaktivität nach Knockdownversuch mit BWS Δ H19/ICR1 mat II; Abb. c) Restaktivität nach Knockdownversuch mit SRS UPD(7)mat(I).

4.4 Genauswahl

In allen initial angezüchteten Zellreihen BWS Δ H19/ICR1 mat, SRS UPD(7)mat(I), BWS UPD(11)pat, SRS UPD(7)mat(II), TNDM HypoCT/PLAGL1 und SRS UPD(11)mat wurde die ASPN-Expression in den nativen Zellen bestimmt. Da die Zellreihen BWS Δ H19/ICR1 mat und SRS UPD(7)mat(I) die höchsten Expression-level aufzeigten, wurden diese für die anschließenden ASPN-Knockdownversuche verwendet.

Es wurde die nach dem ASPN-Knockdown verbliebene quantitative Expression von ASPN, sowie die Expressionslevel von weiteren möglicherweise interessanten Genen, bestimmt: zum einen wurde eine Veränderung der Expression derjenigen Gene untersucht, die bereits in der Vergangenheit wichtige Bestandteile des Gennetzwerks darstellten (PLAGL1, TGF β 2, IGF2, IGF2R, MEST, H19). Diese Gene waren bereits zuvor Bestandteil von Untersuchungen der laborinternen Forschung. Für die Auswahl weiterer Gene wurde ein Vergleich von RNA-Sequenzierungsdaten zu BWS Δ H19/ICR1 mat- und TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen herangezogen. RNA-Sequenzierung ist eine Methode der Molekularbiologie zur Analyse von differentieller Genexpression und alternativem RNA-Splicing im gesamten Transkriptom (Stark et al., 2019). Die Expressionsstärke eines Gens wird in FPKM, aus dem Englischen: *fragments per kilobase million*, oder RPKM, aus dem Englischen: *reads per kilobase million*, angegeben. Die BWS Δ H19/ICR1 mat- und die TNDM HypoCT/PLAGL1-Zelllinie verhalten sich von allen verwendeten Fibroblastenzelllinien am gegensätzlichsten in ihrer ASPN-Expression: während BWS Δ H19/ICR1 mat einen hohen ASPN-Gehalt aufweist (90 RPKM), wird dieses in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen nur wenig exprimiert (0,8 RPKM). Es wurden diejenigen Gene beachtet, die ein besonders ähnliches, oder aber ein entgegen gesetztes Expressionsverhalten zeigen. Hierfür wurde die Wurzelpotenz der RPKM-Werte berechnet und Gene mit Werten ≥ 250 einbezogen. Vergleichbar wurde auch mit der SRS UPD(11)mat-Zelllinie vorgegangen, die ebenfalls einen geringen FPKM für ASPN aufweist (7,5 RPKM). Diese erste Genauswahl wurde noch einmal reduziert. Hierfür wurde besonderer Wert auf eine mögliche Interaktion mit dem ASPN-Gen gelegt, wie beispielsweise gemeinsames Auftreten in bestimmten Geweben oder eine korrelative veränderte Expression im Rahmen bestimmter Erkrankungen. Folgende Gene wurden dementsprechend in die Untersuchung eingeschlossen: NLRP1, NLRP10, CTSK, COL1A1, LUM, BGN, IGFBP3, DCN,

SPARC, FN1, FSTL3, MMP3 und S100A6. Eine ausführliche Beschreibung der Gene und ihrer Funktion ist Kapitel 5 zu entnehmen.

4.5 Gene, bei denen eine gesteigerte Expressionsaktivität erwartet wurde

Im Folgenden sind die Ergebnisse für diejenigen Gene beschrieben, bei denen mit einem Anstieg der Genaktivität gerechnet wurde, da das Expressionslevel in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen höher liegt als in der untersuchten Zelllinie. Einige Gene erfüllten diese Erwartung, während bei drei der Gene ein Rückgang der Genaktivität verzeichnet wurde.

4.5.1 Erwartungsgemäße Steigerung der Expression von IGF2R, PLAGL1 und S100A6 nach ASPN-Knockdown

Die Gene IGF2R, PLAGL1 und S100A6 weisen in den nativen BWS Δ H19/ICR1 mat- und SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten niedrigere Expressionslevel auf als in den nativen TNDM-HypoCT/PLAGL1-Zellen. Die genauen Werte können der Tabelle 14 im Anhang entnommen werden. Da sich die ASPN-Expression dieser Zellen gegensätzlich verhält, wurde beobachtet, ob die untersuchten Zellreihen nach Herabregulation der ASPN-Aktivität ebenfalls einen Anstieg in der Expression der untersuchten Gene zeigen.

Das Expressionsniveau der Gene veränderte sich in allen drei Knockdownversuchen in ähnlichem Maße:

In den BWS- Δ H19/ICR1-mat.-Fibroblastenzellen geht bei allen drei Genen eine gesteigerte Genaktivität mit der Herabregulation von ASPN einher. Die Auswertung der qPCR-Daten ergab jeweils einen Anstieg der Expression von maximal 200-300%, mit Ausnahme des 24h-Wertes für das S100A6-Gen im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten. Hier ergab sich ein Wert von 23.742,13%, der dann in etwa auf das Ausgangsniveau abfiel. Da für die 24h-SL-Probe eine extrem geringe Konzentration gemessen wurde, verglichen mit den anderen Proben des gleichen Knockdown, muss hier von einem Messfehler ausgegangen werden, und der Wert wird von der Betrachtung ausgeschlossen.

Im ersten Knockdownexperiment mit der BWS Δ H19/ICR1 mat-Zelllinie zeigten alle drei Gene eine maximale Genaktivität nach 48 Stunden. Das Expressionslevel

von IGF2R stieg zunächst auf >130% an, mit einem Peak nach 48 Stunden von 327,81%. Im zweiten Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen fiel das Ergebnis weniger ausgeprägt aus, dennoch mit einem Peak nach 48 Stunden von 190,01%. Der 24h-Wert zeigte mit 72,6% sogar einen leichten Rückgang der Genexpression.

Für das PLAGL1-Gen zeigten sich Peakaktivitäten im ersten Versuch nach 48 Stunden mit 309,61% und im zweiten Versuch nach 24 Stunden mit 294,01%.

Bei allen drei Genen konnte demnach, mit Ausnahme des fehlerhaften Wertes für S100A6, in etwa eine Verdopplung der Genaktivität verzeichnet werden, was der erwarteten Steigerung der Genaktivität entspricht. Insbesondere für PLAGL1 konnte dieser Effekt in beiden Knockdownversuchen gut reproduziert werden.

Ebenso wie alle drei Gene in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen verstärkt exprimiert wurden, zeigte sich auch in der Fibroblastenkultur der SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe ein vergleichbarer Einfluss auf das Expressionslevel. Die Werte zeigen eine gesteigerte Genaktivität für alle drei Gene um 30-40%. Die durchschnittliche Genaktivität liegt für IGF2R bei 143,83%, für PLAGL1 bei 138,53% und für S100A6 bei 126,89%. Die Einzelwerte sind Tabelle 13 im Anhang zu entnehmen.

Die erwartungsgemäße Steigerung der Genaktivität ist ein Hinweis auf eine Beteiligung von ASPN an der Expression dieser Gene. Aufgrund der Assoziation von IGF2R und PLAGL1 mit dem IGN ist eine Interaktion mit dem ASPN-Gen naheliegend.

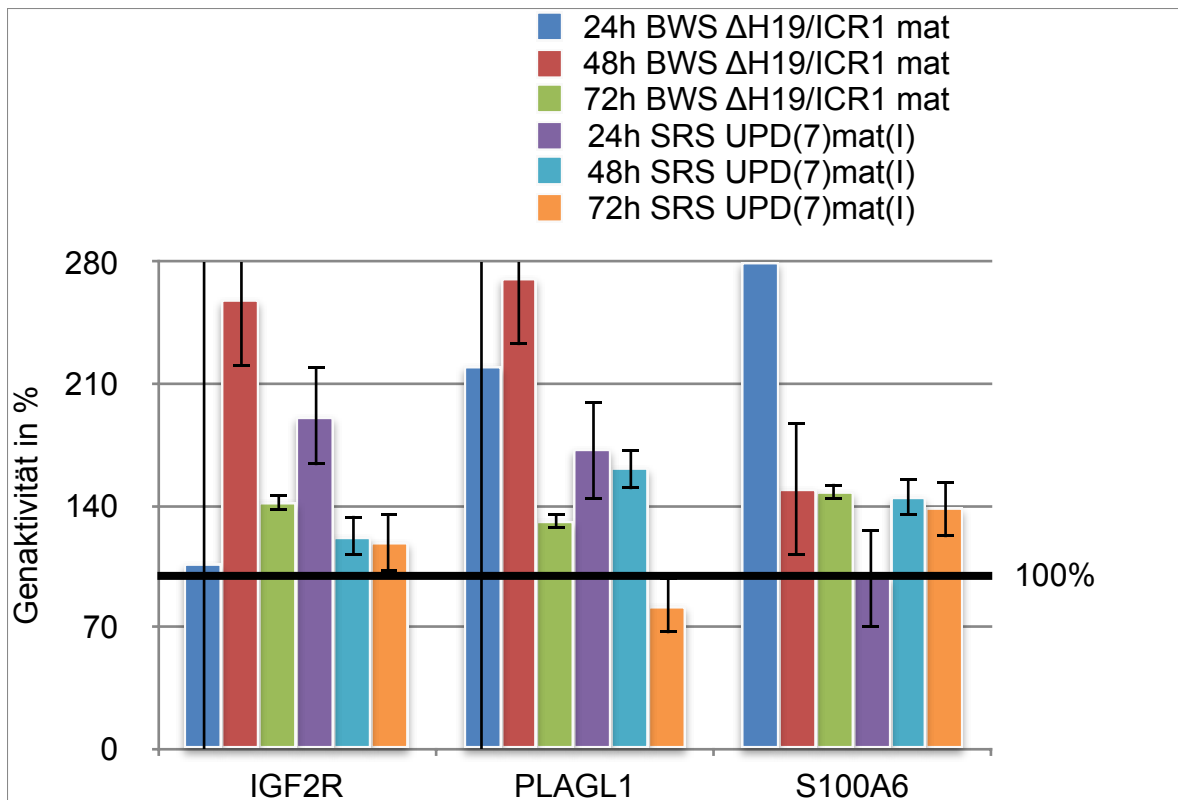


Abbildung 11: grafische Darstellung der Genaktivität von IGF2R, PLAGL1 und S100A6 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten und den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Die blauen, roten und grünen Balken zeigen den ersten und zweiten Knockdownversuch mit den BWS ΔH19/ICR1 mat-Zellen. Es ist jeweils der Mittelwert aus den gemessenen Aktivitäten zu den drei verschiedenen Zeitpunkten angezeigt. Der Balken für den 24h-Mittelwert von S100A6 (7.985,86%) ist aufgrund seiner Fehlerhaftigkeit unterbrochen. Insbesondere bei PLAGL1 ist die Verdoppelung der Genaktivität nach 24h gut erkennbar. Die lila, hellblauen und orangen Balken zeigen den dritten Knockdownversuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen.

4.5.2 Vorwiegend unveränderte Expressionswerte für NLRP1, DCN und CTSK nach ASPN-Knockdown

NLRP1, DCN und CTSK werden in den untersuchten Fibroblastenkulturen geringer exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen, wobei sich das Expressionslevel für das NLRP1-Gen in allen drei Zellreihen nur minimal unterscheidet. Die RPKM-Werte liegen hier bei 4,02 für BWS ΔH19/ICR1 mat, 4,27 für SRS UPD(7)mat(I) und 4,7 für TNDM HypoCT/PLAGL1. Die Werte für die anderen beiden Gene unterscheiden sich deutlicher. Für DCN liegen sie bei 242,02 RPKM (BWS ΔH19/ICR1 mat), 443,87 RPKM (SRS UPD(7)mat(I)) und 536,81 RPKM

(TNDM HypoCT/PLAGL1). Für CTSK lauten sie wie folgt: 33,89 RPKM (BWS Δ H19/ICR1 mat), 178,64 RPKM (SRS UPD(7)mat(I)) und 1750,68 RPKM (TNDM HypoCT/PLAGL1).

In allen drei Knockdownversuchen zeigen diese drei Gene ein ähnliches Aktivitätsmuster, weshalb sie hier gemeinsam aufgeführt werden. Während im ersten Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen eine sehr geringe Veränderung der Genexpression erfolgte, zeigte sich im zweiten Versuch für alle drei Gene ein initialer Anstieg auf >250%, der im zeitlichen Verlauf unter das Ausgangsniveau abfiel.

Das NLRP1-Gen zeigt im ersten Versuch den stärksten Anstieg der Genexpression auf bis zu 158,61% nach 72 Stunden. Die Expression für DCN und CTSK zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle eine schwächere bis ausbleibende Progression mit Maximalwerten von 130,53% nach 48 Stunden (DCN) und 102,85% nach 48 Stunden (CTSK). Im zweiten Versuch hingegen zeigen alle drei Gene eindeutig verstärkte Expressionslevel nach 24 Stunden: 522,52% (NLRP1), 253,27% (DCN) und 435,32% (CTSK). Dieser initiale Anstieg verringerte sich für alle drei Gene im zeitlichen Verlauf, mit Tiefstwerten nach 72 Stunden von 76,03% (NLRP1), 71,1% (DCN) und 93,17% (CTSK).

Der eindeutige Anstieg der Aktivitätslevel im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen nach 24 Stunden, lässt eine Beeinflussung durch das ASPN-Gen nicht ausschließen. Leider konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden.

Beim Knockdownversuch mit der SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe blieb der Expressionsgrad für alle drei Gene weitgehend unverändert. Für das NLRP1-Gen wurde aufgrund der ähnlichen RPKM-Werte für die Knockdownfibroblasten und die TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen keine große Abweichung erwartet. Die anderen beiden Gene zeigten jedoch ebenfalls keinen Anstieg der Genaktivität durch den Knockdown von ASPN. Für die drei Gene ergeben sich folgende Mittelwerte für die Expressionslevel: 90,73% für NLRP1, 100,92% für DCN und 123,45% für CTSK. Es ist hier nicht von einer signifikanten Steuerung durch das ASPN-Gen auszugehen.

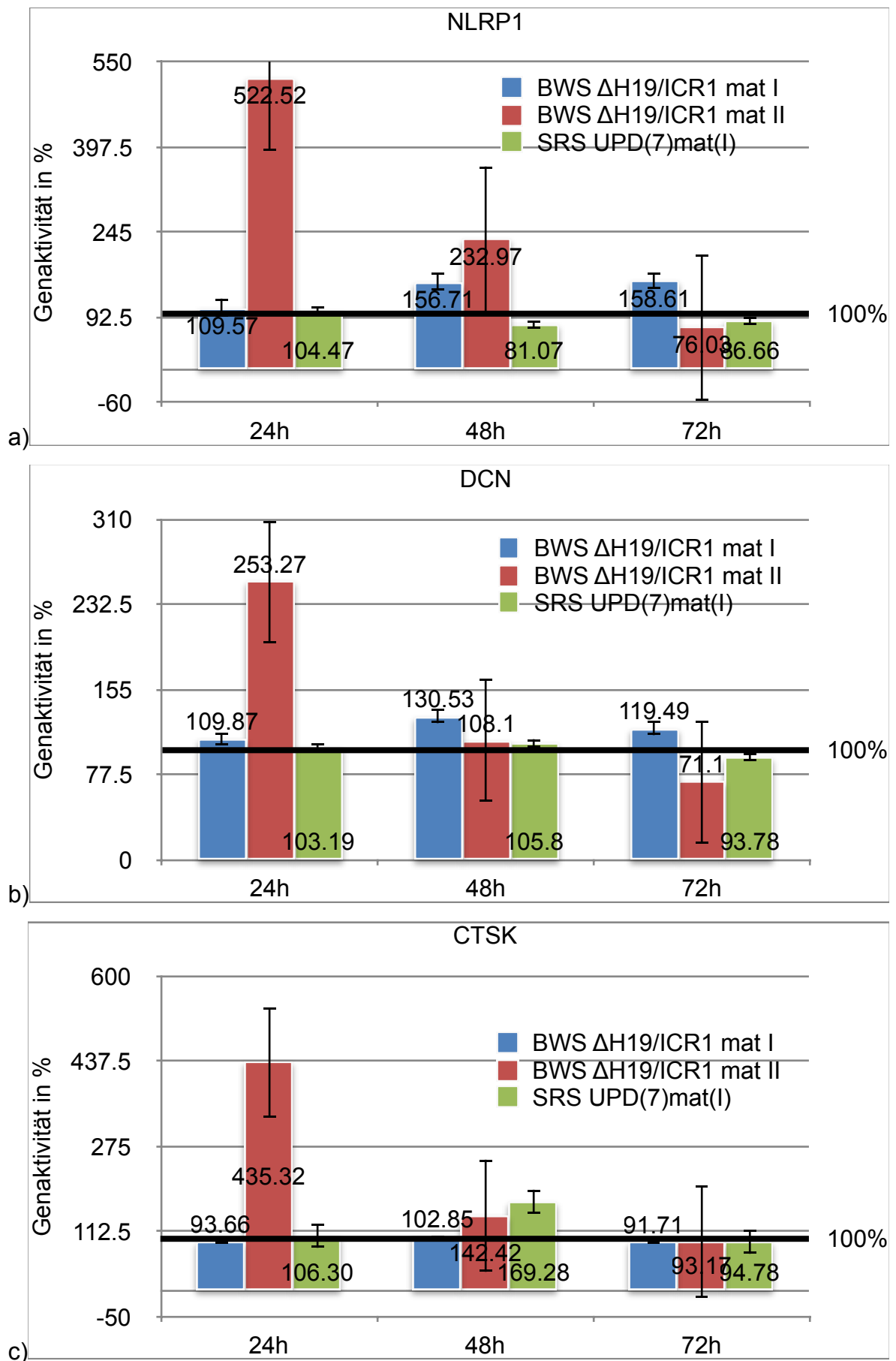


Abbildung 12 a)-c): grafische Darstellung der Genaktivität von NLRP1, DCN und CTSK in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibrob-

lasten und den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Grafik a) zeigt die entsprechenden Werte für das NLRP1-Gen, Grafik b) für das DCN-Gen und Grafik c) für das CTSK-Gen. Gezeigt sind jeweils die Werte im zeitlichen Verlauf 24h, 48h und 72h für alle drei Knockdownversuche. Erkennbar ist der initiale Anstieg der Genexpression im zweiten Knockdownversuch, der im Verlauf unter das Ausgangsniveau abfällt. Im ersten und dritten Knockdownversuch blieb das Expressionsverhalten dagegen größtenteils unverändert.

4.5.3 Nicht-erwartungsgemäße Reduktion der Expression von LUM und MEST nach ASPN-Knockdown

Das LUM-Gen und das MEST-Gen zeigten ebenfalls analoges Expressionsverhalten nach dem Knockdown von ASPN. Beide Gene werden in den für den Knockdown verwendeten Zellreihen geringer exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Dementsprechend wurde durch das Angleichen des ASPN-Gehalts durch die Transfektion, ein Anstieg der Genaktivität erwartet. Wider Erwarten zeigten beide Gene einen Abfall ihrer Expressionslevel.

In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen führte die Herabregulation von APSN zu einem Abfall der Genexpression von MEST auf $\leq 50\%$ in beiden Versuchen. Der Mittelwert liegt bei 44,96% im ersten Versuch und bei 42,35% im zweiten Versuch, mit Minimalwerten von 35,47% und 36,48% nach jeweils 48 Stunden. Die Expression von LUM blieb im ersten Knockdownversuch weitestgehend unverändert ($\emptyset 110,39\%$), fiel jedoch im zweiten Versuch nach 48 Stunden ebenfalls ab, wenn auch nur auf einen Minimalwert von 59,87% nach 72 Stunden.

In der SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe wird das MEST-Gen aufgrund der maternalen uniparentalen Disomie von Chromosom 7 nicht exprimiert. Es wurde dementsprechend weder ein Abfall noch ein Anstieg der Genexpression verzeichnet. Die Expression von LUM zeigte eine mit der BWS Δ H19/ICR1 mat-Zelllinie vergleichbare Beeinflussung: das initial unveränderte Expressionslevel (103,14%) sank im zeitlichen Verlauf auf 71,01% nach 48 Stunden und 60,34% nach 72 Stunden.

Betrachtet man die Ergebnisse für das LUM- und das MEST-Gen gesammelt, erscheint ein Effekt von ASPN auf die Genexpression der beiden Gene denkbar. Eine Beeinflussung durch das ASPN-Gen ist in Betracht zu ziehen.

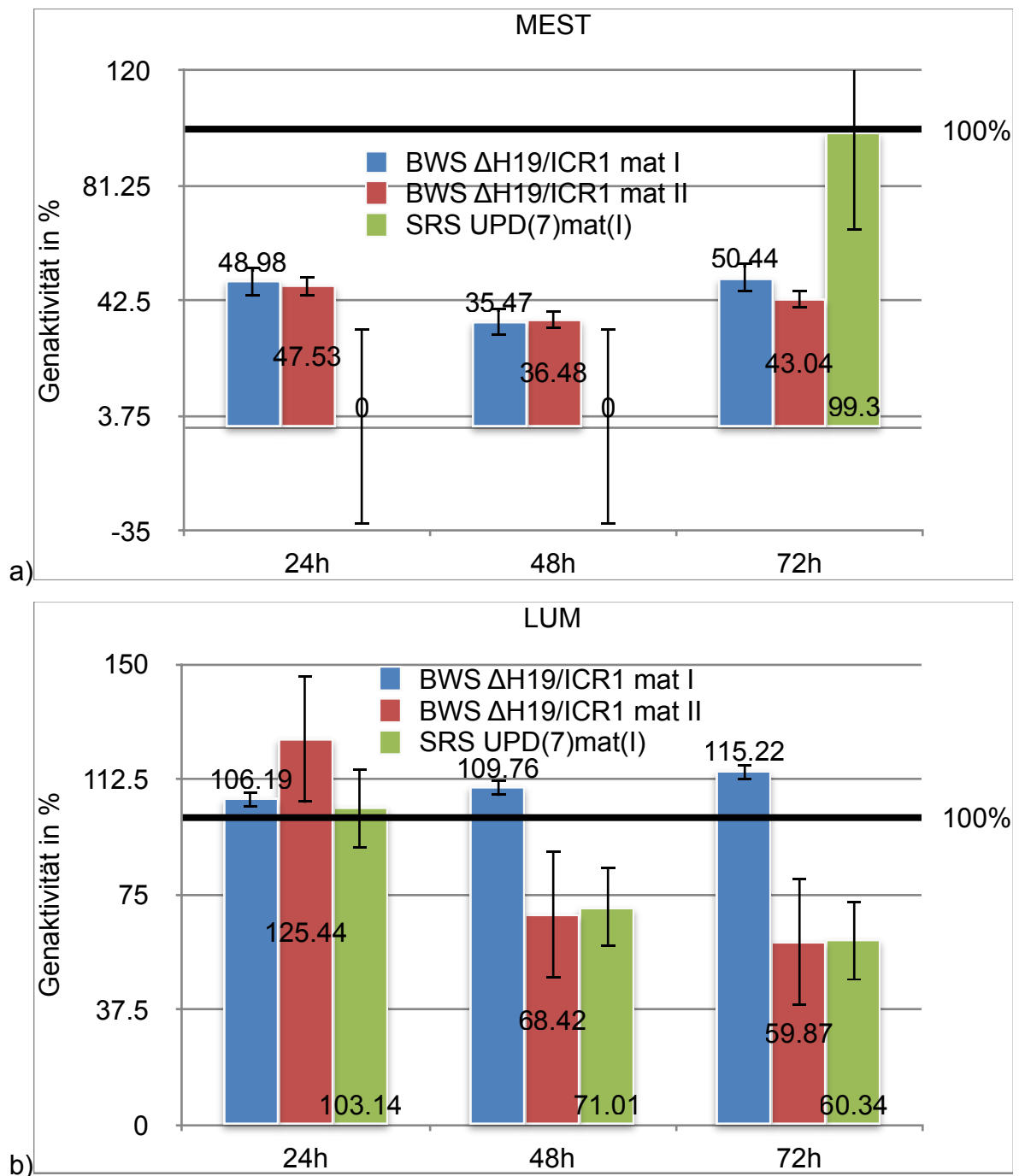


Abbildung 13 a) und b): grafische Darstellung der Genaktivität von MEST und LUM in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten und den in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Dargestellt ist in beiden Abschnitten der zeitliche Verlauf für alle drei Knockdownversuche, für MEST in Abschnitt a) und für LUM in Abschnitt b). Gut dargestellt ist der Abfall der Genaktivität für MEST auf $\leq 50\%$ in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen, in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten wird dieses Gen nicht exprimiert. Für das LUM-Gen zeigt sich der Abfall des Expressionslevels im zeitlichen Verlauf im zweiten und dritten Knockdownversuch.

4.5.4 In den BWS Δ H19/ICR1 mat- Fibroblasten erwartungsgemäße, in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten nicht-erwartungsgemäße gesteigerte Expression von MMP3 und IGFBP3 nach ASPN-Knockdown

Das MMP3-Gen und das IGFBP3-Gen zeigen übereinsprechende Expressionswerte in den nativen untersuchten Zelllinien und analoges Verhalten nach ASPN-Knockdown: die Expression ist jeweils in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen schwächer (MMP3: 0,6 RPKM; IGFBP3: 286,47 RPKM) und in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen stärker (MMP3: 151,15 RPKM; IGFBP3: 1466,36 RPKM) als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen (MMP3: 77,03 RPKM; IGFBP3: 588,03 RPKM). Dementsprechend war, nach der Herabregulation von ASPN, ein Anstieg der Expressionsaktivität in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen und ein Abfall in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen Folgendes: in allen Knockdownversuchen führte die Minderung der ASPN-Expression ausnahmslos zu einem Anstieg der Genexpression. Obwohl im Knockdownversuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen für beide Gene eine Reduktion der Genexpression erwartet wurde, werden sie hier aufgrund der Ausgangssituation in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen und den beobachteten Ergebnissen im Kapitel 4.5 (Gene, bei denen eine gesteigerte Expressionsaktivität erwartet wurde) aufgeführt.

In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen stiegen die Werte für MMP3 im Durchschnitt auf 189,11%, während die Werte für IGFBP3 einen etwas stärkeren Anstieg auf durchschnittlich 279,79% zeigten. Im ersten Versuch kommt es zu Spitzenwerten nach 48 (IGFBP3) und 72 Stunden (MMP3). Beim zweiten Versuch wird der Maximalwert für beide Gene bereits nach 24 Stunden erreicht. Obwohl sich der zeitliche Verlauf in den beiden Versuchen unterscheidet, wurde eine Steigerung der Genexpression von mehr als 180% erreicht.

In den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen zeigte sich wider Erwarten ebenfalls ein Anstieg der Genaktivität. Während der initiale Anstieg nach 24 Stunden bei beiden Genen etwa gleich ausfiel (MMP3: 119,04%; IGFBP3: 112,72%), stiegen die Werte für IGFBP3 im Verlauf stärker an als für MMP3. Dennoch zeigten beide Gene einen konstanten Anstieg im zeitlichen Verlauf. Die Werte für MMP3 stiegen auf ~160%, die Werte für IGFBP3 auf bis zu ~300%. Die Beobachtung, dass in allen drei Knockdownversuchen ein Anstieg der Genaktivität nach ASPN-Knockdown erfolgt,

obwohl dies in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen nicht zu erwarten war, bestätigt die Vermutung, dass ASPN eine Rolle bei der Expression von MMP3 und IGFBP3 spielen könnte.

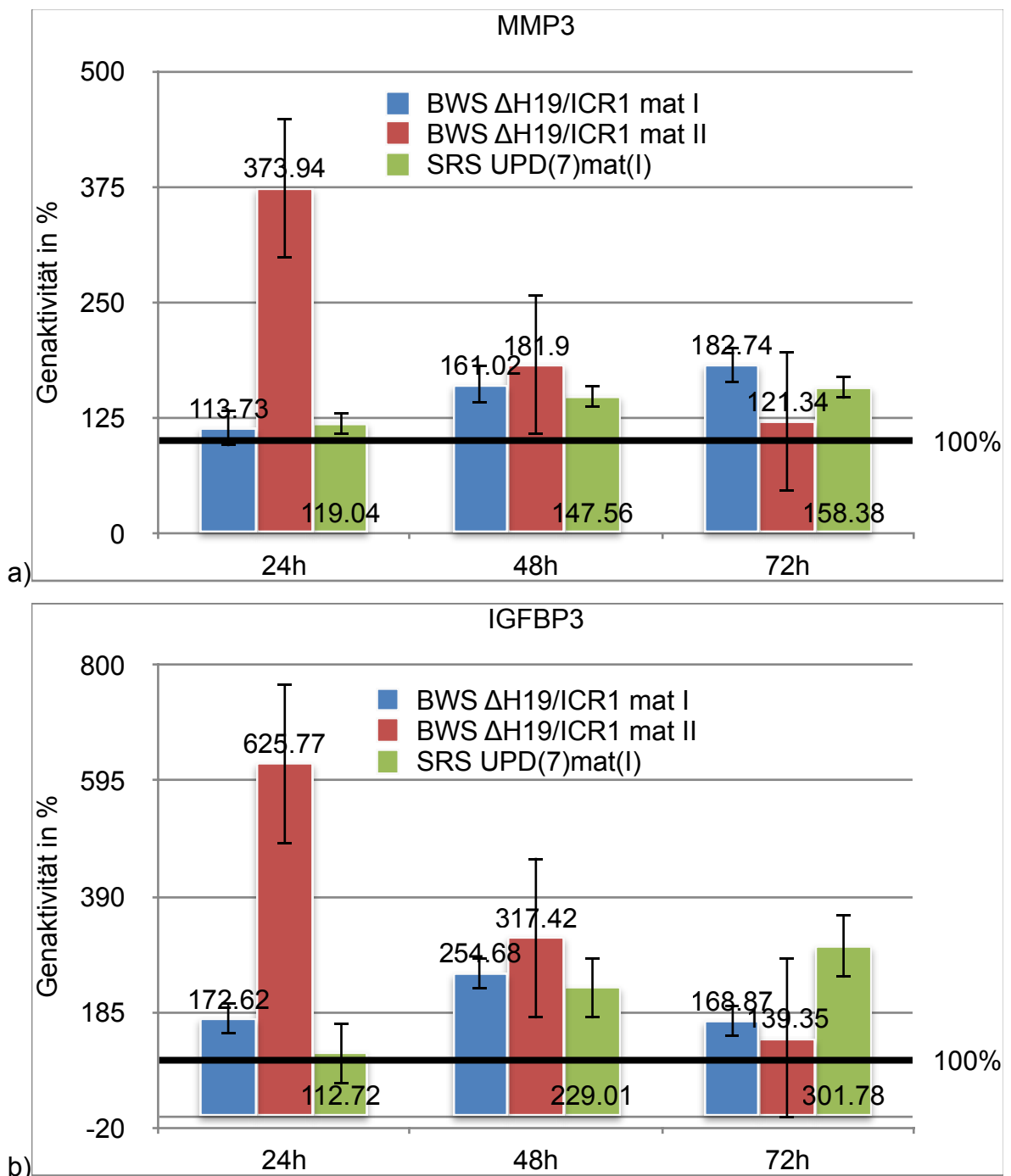


Abbildung 14 a) und b): grafische Darstellung der Genaktivität von MMP3 und IGFBP3 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten und den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Gezeigt sind die Ergebnisse aus allen drei Knockdownversuchen zu allen drei Zeitpunkten für das MMP3-Gen in Abschnitt a) und für das IGFBP3-Gen in Abschnitt b). Es ist ein ausnahmsloser Anstieg der Genexpression für beide Gene zu allen Zeitpunkten erkennbar.

4.6 Gene, bei denen eine reduzierte Expressionsaktivität erwartet wurde

Im Folgenden sind die Ergebnisse für diejenigen Gene beschrieben, bei denen mit einem Abfall der Genaktivität gerechnet wurde, da das Expressionslevel in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen niedriger liegt als in der untersuchten Zelllinie. Einige Gene erfüllten diese Erwartung, während bei einigen Genen ein Anstieg der Genaktivität verzeichnet wurde. Für IGF2 liegt das Expressionslevel in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen minimal höher als in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen. Es wird aufgrund der Ergebnisse dennoch in diesem Kapitel gemeinsam mit H19 aufgeführt.

4.6.1 Erwartungsgemäße Reduktion der Expression von IGF2 und H19 nach ASPN-Knockdown

Die Gene IGF2 und H19 werden hier aufgrund ihrer Expressionslevel und ihres Verhaltens in den Knockdownversuchen gemeinsam aufgeführt.

IGF2 wird in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten stärker exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. In den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen wird IGF2 minimal weniger exprimiert, wobei sich der Expressionsgrad in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen nur minimal von dem in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen unterscheidet. Dementsprechend sollte das Expressionslevel hier weitestgehend unverändert bleiben. In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen wurde ein Abfall der Expressionswerte nach ASPN-Knockdown erwartet. Im ersten Versuch mit der BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblastenkultur stieg die Genaktivität zunächst minimal an (114,12%). Im Verlauf kam es zu einer konstanten Reduktion der IGF2-Transkriptmenge (94,81% nach 48 Stunden und 70,18% nach 72 Stunden). Im zweiten Versuch kam es nach einem initialen Anstieg auf 349,15%, zu einem Abfall auf 45,37% im Mittelwert nach 24 und 72 Stunden. Im Versuch mit der SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblastenkultur zeigte sich wider Erwarten ebenfalls ein einheitlicher Rückgang der Expression von IGF2. Die Werte ergeben im Mittel eine Expressionsaktivität von 61,78% im Vergleich zur Ausgangssituation. Der Minimalwert zeigte sich nach 48 Stunden mit 42,97%. Aufgrund dessen wird IGF2 hier gemeinsam mit H19 aufgeführt.

Das H19-Gen wird weder in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen noch in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen exprimiert. In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen wird dies

durch die maternale Deletion der ICR1 hervorgerufen, wobei die paternale Kopie des Gens inaktiviert vorliegt, da es sich um einen imprinteten *locus* handelt. Dementsprechend ist für H19 in diesem Fall keine Veränderung der Genaktivität zu erwarten. Trotzdem wird es hier gemeinsam mit IGF2 aufgeführt, da die Ergebnisse, insbesondere im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen, ähnlich ausfielen. Die erste Transfektion im Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen ergab Aktivitätswerte von durchschnittlich 101.09%. Die zweite Transfektion zeigte einen Abfall der Genaktivität um ca. 25%, vergleichbar mit den Ergebnissen für IGF2. Die gemessenen Konzentrationen von H19 waren in beiden Versuchen sehr gering (siehe Abbildung 16). Der Knockdown von ASPN führte nicht zu einer Reaktivierung der paternalen Kopie des H19-Gens. Der ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen führte zu einem einheitlichen Abfall der Genexpression von H19, ebenfalls vergleichbar mit den Ergebnissen für IGF2. Der minimale Wert ergab sich auch hier nach 48 Stunden mit 71,69%.

Aufgrund der eindeutigen Reduktion der Transkriptionslevel von IGF2 in allen drei Knockdownversuchen, wäre ein Effekt von ASPN auf IGF2 oder eine Interaktion von IGF2 mit dem ASPN-Gen denkbar. Ein milder Effekt von ASPN auf das H19-Gen wäre ebenfalls möglich, wobei die gewonnenen Informationen aus den hier durchgeführten Knockdownversuchen limitiert sind.

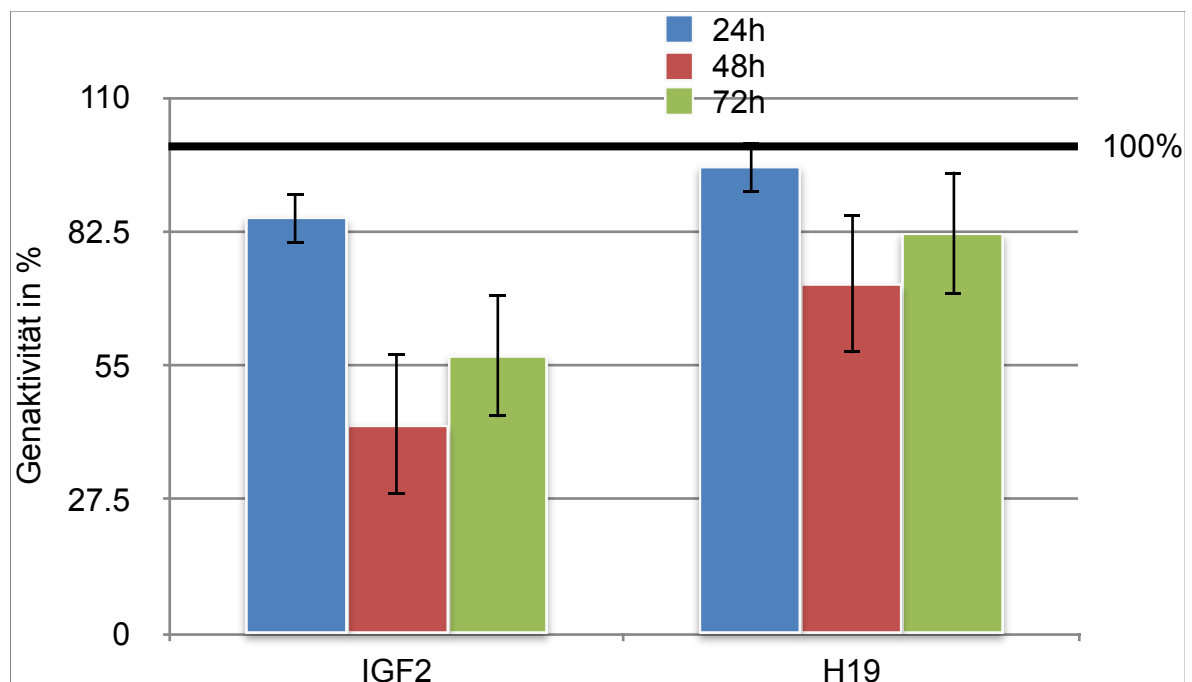


Abbildung 15: grafische Darstellung der Genaktivität von IGF2 und H19 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Erkennbar ist

der Abfall der Genaktivität, sowohl für IGF2 als auch für H19 mit Minimalwerten nach jeweils 48h.

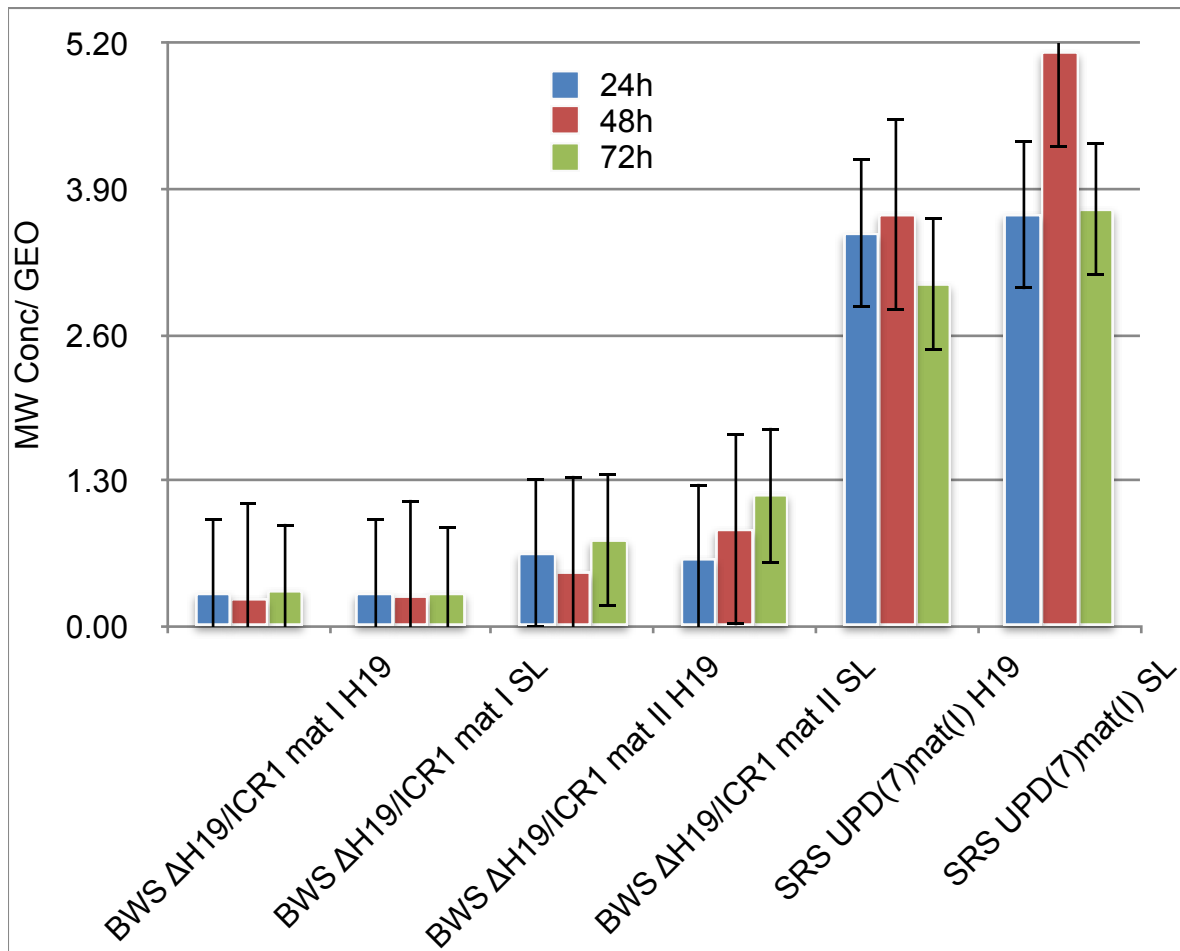


Abbildung 16: grafische Darstellung der gemessenen Konzentrationen von H19 nach ASPN-Knockdown in den BWS ΔH19/ICR1 mat- und den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen von H19 für die drei Zeitpunkte 24h, 48h und 72h in allen drei Knockdownversuchen. Die sehr geringen gemessenen H19-Konzentrationen im Versuch mit den BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten werden hier deutlich.

4.6.2 Nicht-erwartungsgemäße, gesteigerte Expression von SPARC und COL1A1 nach ASPN-Knockdown

Die Gene SPARC und COL1A1 werden in den Zellen, die für den Knockdown verwendet wurden, stärker exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Die RPKM-Werte liegen für SPARC bei 742,35 RPKM (BWS ΔH19/ICR1 mat), 1386,66 RPKM (SRS UPD(7)mat(I)) und 432,11 RPKM (TNDM HypoCT/PLAGL1), und für COL1A1 bei 2377,20 RPKM (BWS ΔH19/ICR1 mat), 3486,16 RPKM (SRS UPD(7)mat(I)) und 1014,19 RPKM (TNDM HypoCT/PLAGL1). Demzufolge wurde

überprüft, ob durch das Angleichen der ASPN-Expression im Rahmen der Transfektion auch die Expressionslevel für diese beiden Gene gesenkt würden. Beide Gene verhielten sich in den Knockdownversuchen ähnlich. Im Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen kam es tendenziell zu einem Anstieg der Genexpression. Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten blieb die Genexpression entweder unverändert oder stieg auf bis zu ca. 200% an.

Im ersten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen zeigte das SPARC-Gen Expressionswerte im zeitlichen Verlauf von ca. 130%, 210% und 120%. Die Expression des COL1A1-Gens stieg auf ca. 120%, 320% und 110% im Verlauf der untersuchten 24, 48 und 72 Stunden. Im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen stiegen die Expressionswerte für beide Gene nach 24 Stunden zunächst auf über 700%, fielen im Verlauf, nach 72 Stunden, jedoch auf unter 100% ab. Im Versuch mit dem SRS UPD(7)mat(l)-Zellen zeigten die Expressionslevel ebenfalls für beide Gene einen moderaten Anstieg. Die Werte für SPARC liegen zwischen 118,21% und 199,97%, die Werte für COL1A1 zwischen 91,66% und 158,5%.

Aufgrund der großen Differenz der Expressionslevel in den verwendeten nativen Zellen und den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen, sind die gleichbleibenden Werte auffällig. Ein Einfluss von ASPN auf die Gene SPARC und COL1A1 ist basierend auf den vorliegenden Werten nicht auszuschließen.

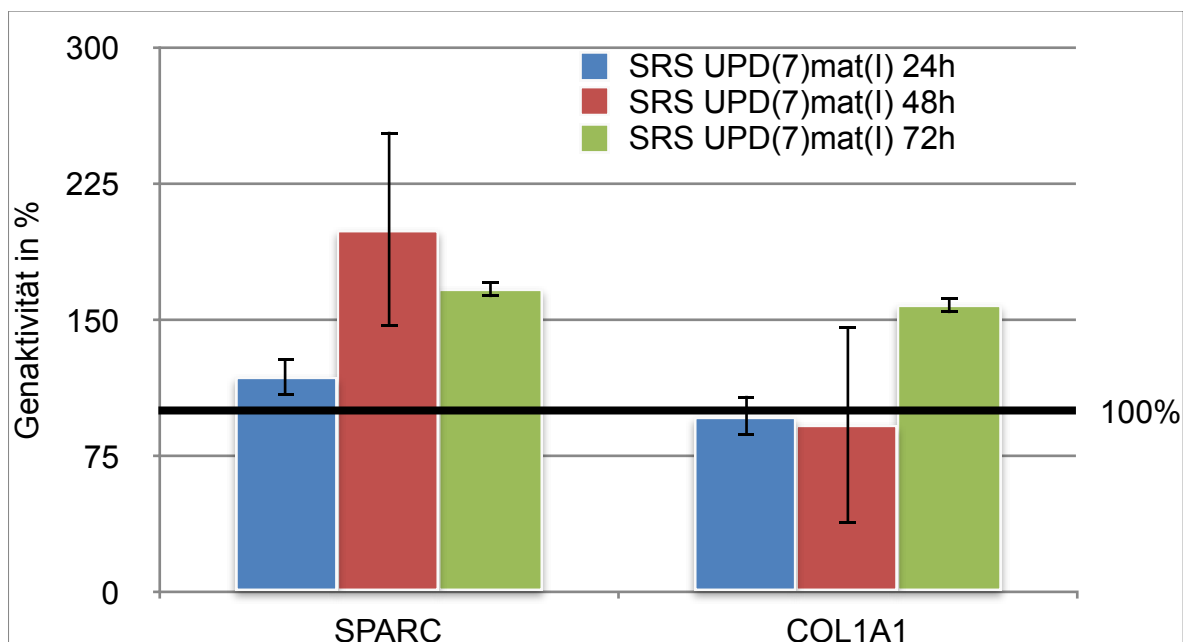


Abbildung 17: grafische Darstellung der Genaktivität von SPARC und COL1A1 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten. Ein geringer Anstieg der Genexpression ist für beide Gene zum 72h-Zeitpunkt

sichtbar. Das SPARC-Gen zeigt auch zu den früheren Zeitpunkten bereits erhöhte Aktivität.

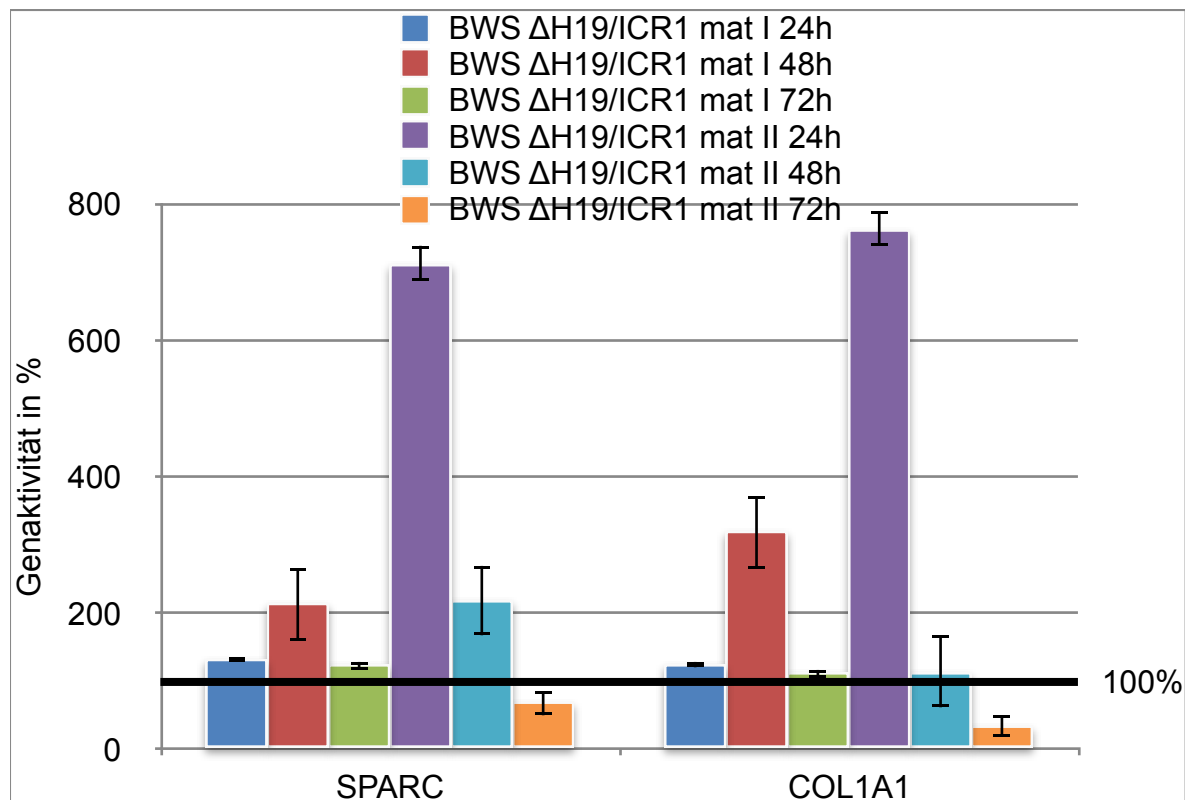


Abbildung 18: grafische Darstellung der Genaktivität von SPARC und COL1A1 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten. Hier wird separat die Genaktivität beider Gene zu allen drei Zeitpunkten nach beiden Knockdownversuchen mit den BWS Δ H19/ICR1 mat Fibroblasten gezeigt. Dadurch wird die gleichartige Änderung in der Genexpression durch den ASPN-Knockdown erkennbar.

4.6.3 Gesteigerte Expression in den BWS Δ H19/ICR1 mat- Fibroblasten und reduzierte Expression in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten von BGN, FSTL3 und FN1 nach ASPN-Knockdown

Die Gene BGN, FSTL3 und FN1 werden in beiden Zellreihen, die für den ASPN-Knockdown verwendet wurden, stärker exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Obwohl ein Rückgang der Expression nach ASPN-Knockdown erwartet wurde, zeigten alle drei Gene eine tendenziell ansteigende Veränderung der Expressionslevel. Im ersten Knockdownversuch mit Zellen der BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellreihe zeigte sich für alle drei Gene ein maximaler Anstieg der Expression nach 48h mit Werten von 213,64% für BGN, 154,31% für FSTL3 und 138,52% für FN1. Im zweiten Knockdownversuch mit BWS Δ H19/ICR1 mat-Fi-

broblasten zeigten alle drei Gene einen maximalen Anstieg nach 24h mit Werten von 1243,09% für BGN, 706,9% für FSTL3 und 1949,38% für FN1. Die Fehlerhaftigkeit des BWS Δ H19/ICR1 mat II-24h-Wertes ist dabei zu berücksichtigen, der wahre Wert sollte hier etwas tiefer liegen. Für diese beiden Versuche zeigt sich eine große Ähnlichkeit im Expressionsverhalten zu den Genen SPARC und COL1A1.

Im Knockdownversuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen zeigten alle drei Gene nur eine geringe Veränderung im Expressionsverhalten. Nach 24h (BGN) und nach 48h (FSTL3) fiel ihre Aktivität auf ~50% ab. Der Minimalwert für FN1 liegt bei 70,77% nach 24h. Die Mittelwerte im zeitlichen Verlauf liegen bei 92,14% (BGN), 73,86% (FSTL3) und 98,91% (FN1).

Aufgrund des Expressionsverhaltens im Knockdownversuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten werden die Gene BGN, FSTL3 und FN1 separat von SPARC und COL1A1 aufgeführt. Obwohl alle fünf Gene nach ASPN-Knockdown keine wesentliche Änderung ihrer Genaktivität zeigten, zeigte die eine Gruppe eher einen leichten Anstieg (SPARC und COL1A1), die andere eher einen leichten Abfall (BGN, FSTL3 und FN1) der Genexpression, der bei BGN und FN1 jedoch gering ausfällt.

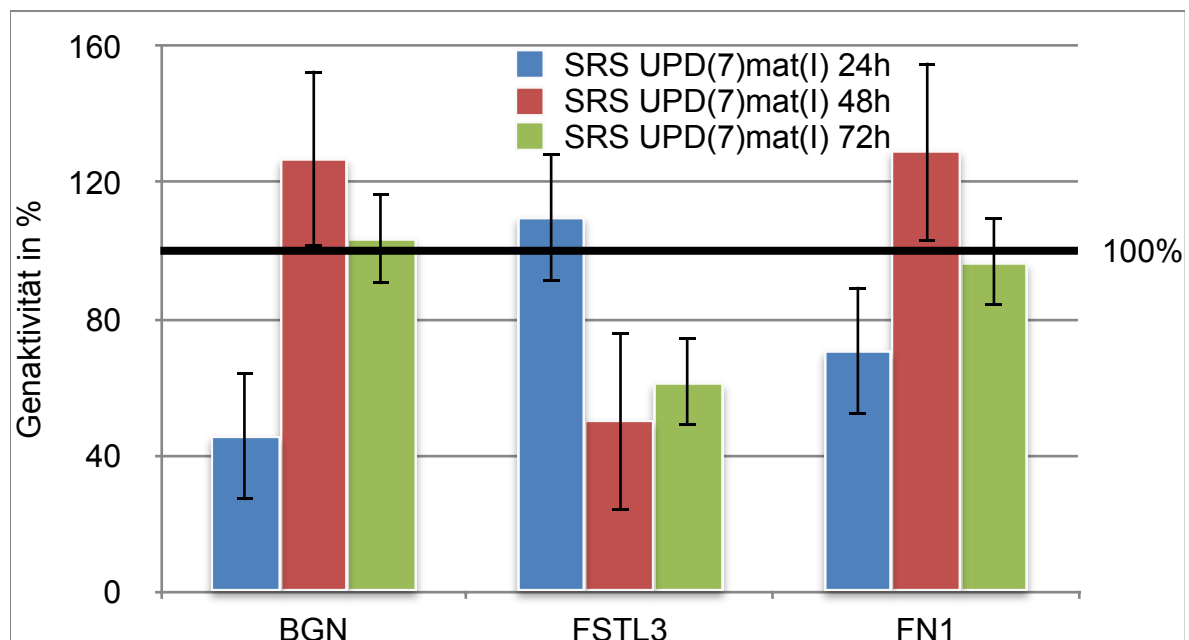


Abbildung 19: grafische Darstellung der Genaktivität von BGN, FSTL3 und FN1 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Ein Abfall der Genexpression auf ~50% ist für BGN nach 24h und für FSTL3 nach 48h erkennbar. Der Minimalwert für FN1 liegt bei 70,77% nach 24h.

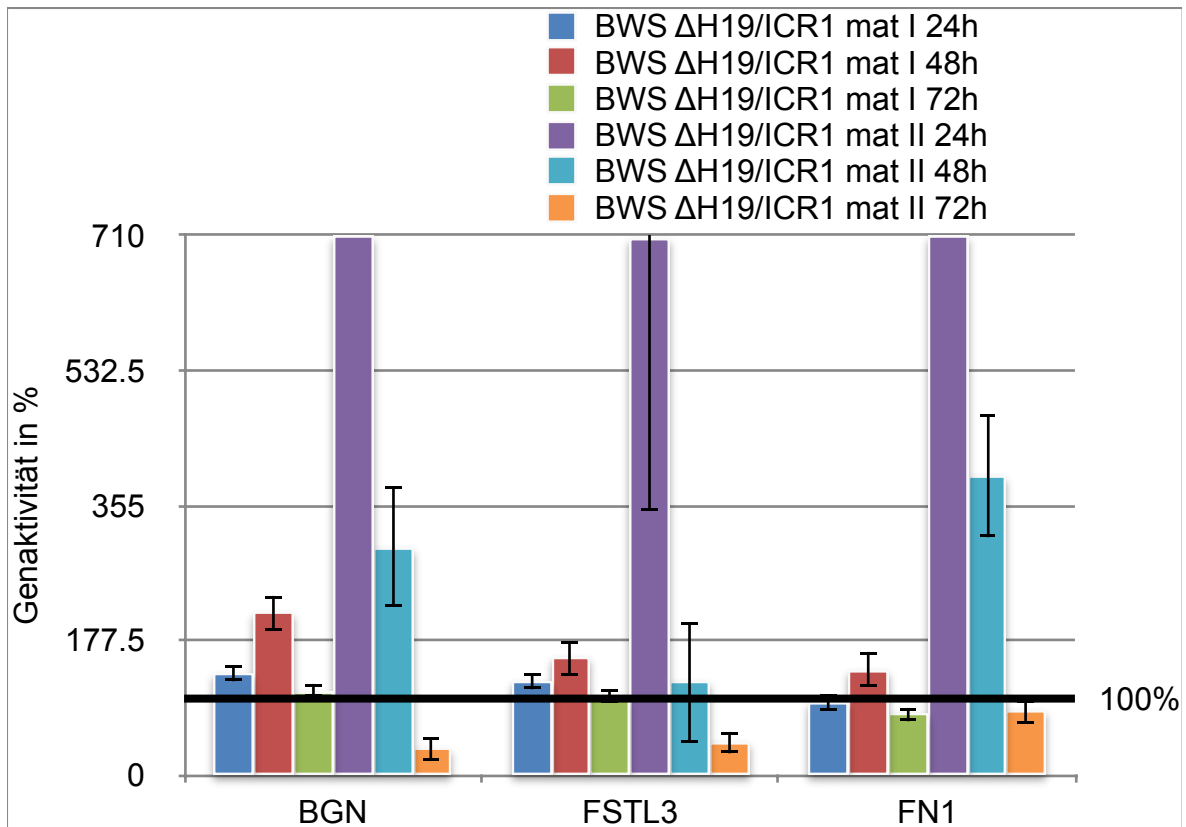


Abbildung 20: grafische Darstellung der Genaktivität von BGN, FSTL3 und FN1 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten. Gemäß der Grafik für die Gene SPARC und COL1A1 wird auch hier separat die Genaktivität aller drei Gene zu allen drei Zeitpunkten nach beiden Knockdownversuchen mit den BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten gezeigt. Die y-Achse wurde zu Darstellungszwecken bei 710% gedeckelt, so dass der BWS ΔH19/ICR1 mat II-24h-Wert für BGN und FN1 nicht in vollem Umfang abgebildet ist. Siehe auch Abbildung 18 für die gleichartige Veränderung der Genaktivität in den Knockdownversuchen mit den BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten.

4.6.4 Schwankende Expressionslevel von TGFβ2 und NLRP10 nach ASPN-Knockdown

TGFβ2 und NLRP10 zeigen ebenfalls höhere Expressionswerte in den Zellen der Knockdownversuche als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen und fallen damit in die Gruppe der Gene, bei denen eine reduzierte Expressionsaktivität nach ASPN-Knockdown erwartet wurde. Als Ausnahme ist hier die Expression von TGFβ2 in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen zu nennen, die minimal geringer ist als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Ein konstanter Rückgang der Genexpression

konnte für keines der beiden Gene nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten sich die Expressionslevel schwankend.

In den Knockdownversuchen mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen liegt der Durchschnitt der Expressionslevel für TGF β 2 bei 88,16%. In beiden Versuchen kommt es einmalig zu einer Steigerung der Genexpression, im ersten Versuch nach 48 Stunden und im zweiten Versuch nach 24 Stunden. Zu den restlichen Zeitpunkten zeigen sich verminderte Expressionslevel, im ersten Versuch leicht vermindert (92,73% und 89,98%) und im zweiten Versuch stark vermindert (49,01% und 42,70%). Für NLRP10 liegt der Durchschnitt der Expressionslevel im Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten bei 104,9%. Es zeigen sich ebenfalls gesteigerte Werte nach 48 Stunden im ersten Versuch und nach 24 Stunden im zweiten Versuch. Zu den restlichen Zeitpunkten zeigen sich ebenfalls verminderte Expressionslevel, jedoch im ersten Versuch stärker vermindert (62,01% und 67,93%) und im zweiten Versuch nur leicht vermindert (87,23% und 93,17%).

Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen liegt die durchschnittliche Expression für TGF β 2 bei 147,00% und ist somit gesteigert, mit einer initialen Verdopplung der Genaktivität und einer anschließenden Reduktion auf eine ca. zwanzigprozentige Steigerung. Für das NLRP10-Gen liegt die Expressionsaktivität im Durchschnitt bei 89,72% und ist somit leicht vermindert. Im zeitlichen Verlauf liegen die Werte hier bei 87,91%, 122,44% und 58,81%.

Für keines der beiden Gene zeigt sich durch den Knockdown von ASPN eine konstante Veränderung in ihrer Genexpression. Bei Verwendung der BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten zeigen sich die Transkriptionslevel durchweg schwankend. Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen kommt es lediglich bei der Untersuchung von TGF β 2 zu einer durchgehenden Steigerung der Genexpression. Unter Einbeziehung aller Werte kann aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse keine eindeutige Aussage bezüglich eines Effekts von ASPN auf die Transkription dieser beiden Gene getroffen werden.

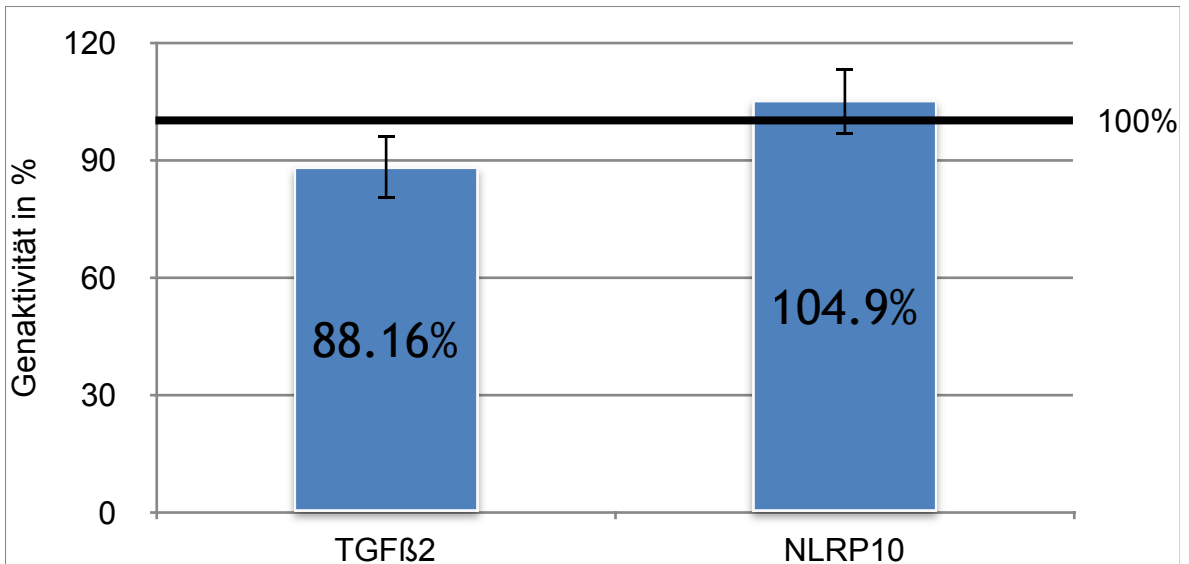


Abbildung 21: grafische Darstellung der Genaktivität von TGFβ2 und NLRP10 in % nach ASPN-Knockdown in den BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus allen drei Zeitpunkten 24h, 48h und 72h von beiden Knockdownversuchen. Beide Gene zeigen keine wesentliche Änderung ihres Expressionslevels nach ASPN-Knockdown.

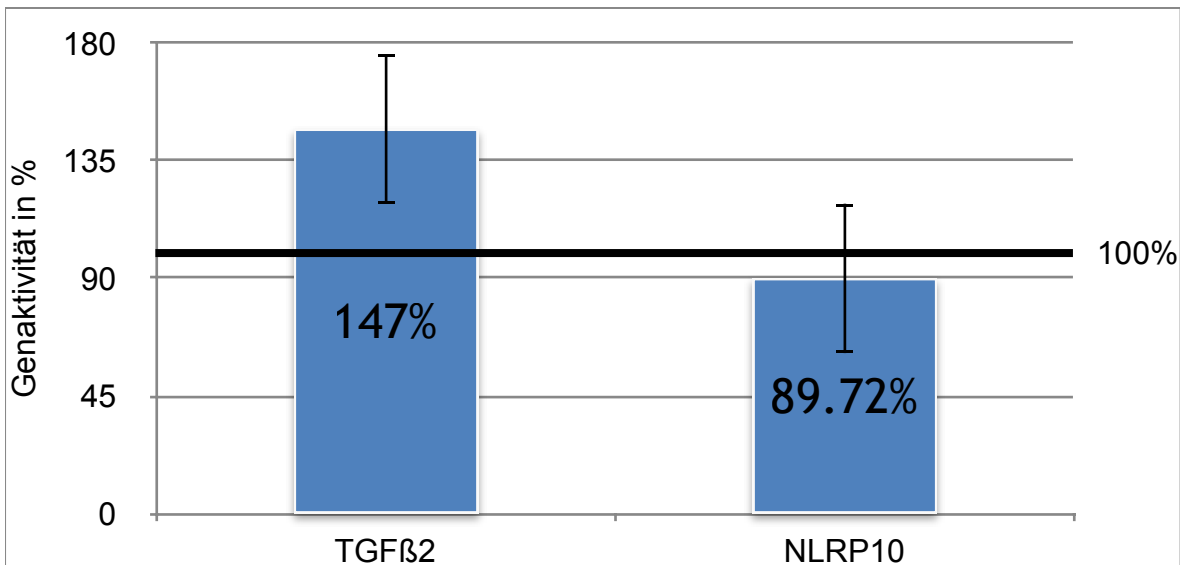


Abbildung 22: grafische Darstellung der Genaktivität von TGFβ2 und NLRP10 in % nach ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Ebenso wie in Abbildung 21 ist jeweils der Mittelwert aus allen drei Zeitpunkten 24h, 48h und 72h dargestellt. NLRP10 zeigt auch im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten keine wesentliche Änderung des Expressionslevels nach ASPN-Knockdown. Für TGFβ2 kommt es dagegen zu einer Steigerung der Genaktivität.

5. Diskussion

Zielsetzung dieser wissenschaftlichen Arbeit war die Untersuchung der Beeinflussung und transkriptionellen Regulation geprägter und nicht-geprägter Gene durch das ASPN-Gen im Rahmen von Imprinting-Erkrankungen bei denen epigenetische Defekte vorliegen. Es wurden hierzu insgesamt drei experimentelle Knockdownversuche an zwei verschiedenen humanen Fibroblastenlinien durchgeführt, die von Spendern mit der klinischen Diagnose Beckwith-Wiedemann- (BWS Δ H19/ICR1 mat) und Silver-Russell-Syndrom (SRS UPD(7)mat(I)) stammen. Die genauere Erforschung solch epigenetischer Defekte ist erforderlich, um Fortschritte in der Diagnostik und Therapie für betroffene Individuen zu erzielen. Epigenetische Defekte sind eine potenzielle Ursache für eine Störung der Interaktion geprägter und nicht-geprägter Gene im Rahmen des IGN. Aufgrund wiederholter Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen ASPN und anderen Genen des Netzwerks, basierend auf bisherigen Forschungsergebnissen in der eigenen Arbeitsgruppe, sollte der Einfluss von ASPN und seine Rolle als potenzieller Mit-/Regulator genauer untersucht werden. Untersucht wurden potenzielle Effekte auf bereits bekannte Gene des IGN, sowie auf zusätzlich ausgewählte, nicht-geprägte Gene.

Ingesamt wurde für 19 Gene untersucht, ob Asporin eine regulierende Funktion und damit Einfluss auf deren Expressionsverhalten haben könnte. Für 14 dieser Gene konnte ein potenzieller Effekt nach ASPN-Knockdown beobachtet werden: IGF2R, PLAGL1, S100A6, LUM, MEST, MMP3, IGFBP3, IGF2, H19, SPARC, COL1A1, BGN, FSTL3 und FN1. Die Expression der Gene NLRP1, DCN und CTSK blieb infolge des Knockdown vorwiegend unverändert, weshalb eine Regulation durch ASPN eher auszuschließen ist. Für die Gene TGF β 2 und NLRP10 kann aufgrund der schwankenden Expressionslevel keine eindeutige Aussage bezüglich einer Mit-/ Regulation durch Asporin getroffen werden.

5.1 Kontrolle der experimentellen Knockdownversuche

Bei der Durchführung der Experimente sollten möglichst korrekte und verlässliche Daten erhoben werden. Dies sollte durch eine Reihe von Maßnahmen sichergestellt werden, die ich im Folgenden erläutern möchte:

Für jede Knockdownprobe wurde eine Negativkontrolle erstellt, um weitere Effekte durch die Transfektion, wie beispielsweise oxidativer Stress auf die Zellen, von der gewünschten Veränderung der Expressionsaktivität abzugrenzen. Hierfür wurde anstelle der genspezifischen siRNA, die *scrambled locus* siRNA verwendet, die ungezielt an die natürliche RNA bindet. Dies soll außerdem der Abgrenzung von genspezifischen Effekten von nicht-sequenz-spezifischen Effekten dienen (Han, 2018). Die aus den Patientenfibroblasten extrahierte RNA wurde nach Umschreibung in cDNA in der *real time* PCR vervielfältigt. Hierbei wurde für jede Probe ein Duplikat erstellt, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Wenn die Messergebnisse aus beiden Proben zu stark voneinander abwichen, wurde die Messung wiederholt. Dies war der Fall für 17 Proben aus Knockdownversuch BWS Δ H19/ICR1 mat I, 10 Proben aus Knockdownversuch BWS Δ H19/ICR1 mat II und 18 Proben aus Knockdownversuch SRS UPD(7)mat(I). Für alle wiederholten Werte wurde individuell entschieden, welche Messwerte in die Berechnung einbezogen wurden. Wies eine einzelne Probe eine Konzentrationsabweichung der Größenordnung $\pm 0,5E+00$ auf, wurde diese eliminiert, um die Fehlerhaftigkeit für die gemessene Probe zu reduzieren.

Die Überprüfung der Authentizität der PCR-Produkte erfolgte mittels Schmelzpunktanalyse und Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.1). In der qRT-PCR wurden alle doppelsträngigen Produkte einer Probe detektiert und gemessen. Um zu überprüfen, ob es sich bei den doppelsträngigen Produkten um die richtigen Erzeugnisse, und nicht beispielsweise um Primerdimere handelt, ist eine Überprüfung der Authentizität der Amplifikate erforderlich. Primerdimere entstehen durch die Hybridisierung von zwei Primermolekülen über komplementäre Basen, was zur Amplifikation des Doppelstrangs und in der Folge zum Verbrauch von PCR-Reagenzien und somit zur Hemmung der Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz führt. Es kann außerdem vorkommen, dass der Primer, insbesondere wenn die Temperatur zum Zeitpunkt des *annealing* nicht optimal eingestellt ist, an eine nicht-vorgesehene Stelle des DNA-Einzelstrangs bindet und infolgedessen ein unerwünschtes Amplifikat entsteht.

Die Schmelzpunktanalyse erfolgte direkt im Anschluss an die qRT-PCR durch parallele kontinuierliche Temperaturerhöhung und Fluoreszenzmessung der jeweiligen Probe. Beim Aufschmelzen des Doppelstrangs kommt es zum Abfall der Fluoreszenz in der Probe durch die Freisetzung des SYBR-Green-Farbstoffes, so dass

für alle entstandenen Produkte eine spezifische Schmelztemperatur ermittelt werden kann. Diese ist durch Produkteigenschaften wie Länge und GC-Gehalt bedingt. Anhand der Schmelzkurve kann die Echtheit der Produkte überprüft werden, da sich die Schmelzpunkte sekundärer Produkte, wie Primerdimere, deutlich von denen der authentischen Amplifikate unterscheiden (siehe Abschnitt 4.1). Obwohl für manche Proben eine Verunreinigung mit Sekundärprodukten festgestellt werden konnte, konnte für jedes gewünschte Amplifikat auch die spezifische Schmelztemperatur ermittelt, und so die Echtheit der Produkte nachgewiesen werden. Für diejenigen Gene, bei denen die PCR nicht ohne Nebenprodukte abgelaufen ist, wurde zur weiteren qualitativen Untersuchung der PCR-Produkte eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Mithilfe der Gelelektrophorese können die PCR-Produkte der Länge nach aufgetrennt und mittels Färbung sichtbar gemacht werden. Es wurden zu jedem Schmelzpunkt, der für ein Gen gemessen wurde, mindestens zwei Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Anhand der Marker für die Basenpaarlänge im Gel, den sogenannten Längenstandards, konnte die Länge des Produkts zuverlässig bestimmt werden. Die Länge der gewünschten PCR-Produkte lag zwischen 69bp (IGF2) und 268bp (ASPN). Zeigte sich ein zusätzlicher Balken im Bereich darunter wurde dies als Verunreinigung der Probe durch Primerdimere gewertet. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen einer Verunreinigung und dem gewünschten Produkt war aufgrund dessen für Zielgene mit einer Länge im Bereich 60bp bis 100bp schwierig. Hierzu gehören IGF2, ATP5J, B2M und MEST. Schwere Verunreinigungen oder ein gänzlich falsches Produkt wurde für keine der Proben nachgewiesen. Für die Auswahl der Proben wurden jeweils zwei repräsentative Proben mithilfe des PCR Programms für jedes Gen ausgewählt (siehe Abschnitt 4.1). Für die Gene FSTL3, BGN, NLRP10 und CTSK konnten in der Gelelektrophorese Verunreinigungen der Probe durch Primerdimere festgestellt werden. Für diese Gene, aber insbesondere bei BGN, NLRP10 und CTSK, waren nur sehr geringe Templatemengen vorhanden, das Auftreten der Primerdimere korreliert also mit der Expressionsstärke des untersuchten Gens. Bei der Überprüfung der restlichen Gene wurden keine Verunreinigungen nachgewiesen und die Authentifizierung war problemlos.

Die drei Knockdownversuche dieser Arbeit wurden an der BWS Δ H19/ICR1 mat- und der SRS UPD(7)mat(I)-Zelllinie durchgeführt. Es handelt sich dabei um die

beiden Zelllinien, die in den nativen Fibroblastenkulturen die höchsten Expressionswerte für ASPN aufwiesen. Für die ersten beiden Versuche wurde die BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellreihe verwendet, für den dritten Versuch die SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe. Für das ASPN-Gen wurde für alle drei Knockdownversuche eine Restaktivität von $\leq 50\%$ angestrebt und jeweils eine Restaktivität von $\leq 20\%$ erzielt. Im zweiten und dritten Knockdownversuch wurden sogar jeweils Restaktivitäten von $<10\%$ erreicht. Es konnte somit in allen drei Versuchen eine hohe Knockdowneffizienz erreicht und reproduziert werden. Die Effektivität des Knockdown unterscheidet sich in der BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellreihe nicht von der in der SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe.

Aufgrund der Verwendung einer zusätzlichen Zelllinie für den dritten Knockdownversuch können bezüglich der verlässlichen Reproduktion der Werte nur der erste und zweite Knockdownversuch direkt verglichen werden. Es wurde die Aktivität von insgesamt 20 Genen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Von 60 Messungen weichen die Werte im ersten und zweiten Versuch mit der BWS Δ H19/ICR1 mat-Zelllinie zehnmal $<10\%$, zweimal $<20\%$, fünfmal $<30\%$, fünfmal $<40\%$, fünfmal $<50\%$, viermal $<60\%$, viermal $<70\%$, viermal $<80\%$, dreimal $<90\%$, und 18 mal $>90\%$ von einander ab. Somit liegt ein Drittel der Werte in Bereich $<40\%$ -Abweichung und fast zwei Drittel der Werte im Bereich $<80\%$ -Abweichung.

Um die durch den Einsatz unterschiedlicher Templatemengen bedingte Varianz in der Expressionsstärke der untersuchten Gene zu reduzieren, wurden Haushaltsgene zur Normalisierung eingesetzt. Haushaltsgene sind Zelltyp-unabhängig konstitutiv exprimierte Gene, deren Produkte üblicherweise der Erhaltung grundlegender Zellfunktionen dienen (siehe Abschnitt 4.2). Idealerweise werden die gewählten Haushaltsgene in allen verwendeten Zellen exprimiert, und zeigen auch im Rahmen der Knockdownversuche ein gleichartiges Expressionsverhalten. Folgende Gene wurden für die Normalisierung in Betracht gezogen, sie waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und hatten sich für humane Fibroblasten bewährt: B2M, ACTB, HPRT, ATP5J, HMBS, PPIA und TBP.

Die Auswahl der zu verwendenden Haushaltsgene gestaltete sich problematisch. Es wurde jeweils die Expression in den behandelten und nativen Zellen bestimmt. Die Expression von HPRT zeigte die beste Konstanz in den ASPN- und SL-Proben und konnte proportional in allen drei Knockdownversuchen reproduziert werden. Beim Vergleich der Expressionsmuster der Gene im zeitlichen Verlauf

zeigten sich starke Schwankungen (siehe Abschnitt 4.2), was problematisch ist, da die verwendeten Haushaltsgene idealerweise ein gleichbleibendes Verhältnis zueinander haben sollten (Vandesompele *et al.*, 2002). Verstärkte Übereinstimmungen gab es zwischen PPIA und HPRT sowie zwischen PPIA und HMBS. Vereinzelt gab es Übereinstimmungen außerdem zwischen ATP5J und HMBS sowie zwischen ATP5J und PPIA. Für das HMBS-Gen wurden im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen proportional höhere Konzentrationen in den Knockdownproben gemessen. Ob der ASPN-Knockdown hier eine Aktivierung des Gens herbeigeführt hat ist fraglich, da dieser Effekt in den anderen beiden Knockdownversuchen nicht beobachtet werden konnte. B2M, TBP und ACTB wurden aufgrund der wenigen Überschneidungen mit den anderen Genen von der Auswahl eliminiert. Für TBP wurden außerdem in den Fibroblasten mit ASPN-Knockdown tendenziell niedrigere Konzentrationen gemessen als in den *scrambled locus* Proben, insbesondere im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten. Der Knockdown von ASPN könnte demnach einen inhibitorischen Effekt auf das TBP-Gen gehabt haben, weshalb die Verwendung von TBP zur Normalisierung ungeeignet wäre. Obwohl die dementsprechend zur Normalisierung verwendeten Haushaltsgene ATP5J, HMBS, PPIA und HPRT kein gänzlich analoges Expressionsmuster aufwiesen, wurden sie aufgrund der zahlreichen Überschneidungen untereinander alle in die Auswahl einbezogen, d. h. aus ihnen wurde der geometrische Mittelwert bestimmt und zur Normalisierung aller untersuchten Gene genutzt.

5.2 ASPN als regulierendes Element

Das Asporinprotein ist das Genprodukt des proteinkodierenden ASPN-Gens. Es gehört zur Familie der *small leucine rich*-Proteoglykane (SLRP), obwohl es definitionsgemäß kein Proteoglykan ist (Xu *et al.*, 2015). Als Strukturprotein ist es Teil der extrazellulären, speziell der kartilaginären, Matrix (Xu *et al.*, 2015). Es ist kein Transkriptionsfaktor im eigentlichen Sinne, der direkt an die DNA bindet und so eine Andockstelle für die RNA-Polymerase bildet. Dennoch ist ein Einfluss von ASPN auf die Expression anderer Gene in verschiedener Form möglich, da es sich bei der Genexpression um einen komplexen, dynamischen Prozess handelt, der verschiedene Angriffsstellen bietet. ASPN kann mit einem *pathway* assoziiert sein,

der wiederum mit der Expression von Genen verlinkt ist. SLRPs wie ASPN sind keine reinen Strukturproteine, sondern auch Teil multipler intrazellulärer Signalkaskaden (Schaefer *et al.*, 2008). So bindet Asporin beispielsweise TGF β und inhibiert so die Expression TGF β -induzierter Gene (Xu *et al.*, 2015). Es konnte auch gezeigt werden, dass ASPN mit SMAD2/3 interagiert, dessen Translokation in den Zellkern fördert und die Expression von Genen steigert, die mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert sind (Li *et al.*, 2019). Infrage kommen auch biologische Prozesse wie chemische Signale oder Manipulationen der lokalen Homöostase, die durch die An- oder Abwesenheit von Asporin modifiziert werden und in der Folge Auswirkungen auf die Expression anderer Gene haben können. Eine wichtige Rolle spielt auch der Ort der Expression und die Differenzierung der Zelle. Die Verwendung von Fibroblastenzellen geht mit einem bestimmten Expressionsmuster einher, bei dem bestimmte Gene ein- oder ausgeschaltet vorliegen. Es ist zu beachten, dass neben dem Knockdown von ASPN viele weitere Faktoren, wie Umweltfaktoren, die Zellteilung, oxidativer Stress, *et cetera*, die Aktivität der Gene beeinflussen können.

5.3 Potenziell durch ASPN beeinflusste Gene

Für einige der analysierten Gene konnte ein potenzieller Zusammenhang zwischen ASPN und der Expression des untersuchten Gens erkannt werden, der eine Mit-/ Regulation durch das ASPN-Gen vermuten lässt. Diese Gengruppen im Speziellen sind: SPARC und COL1A1, BGN, FSTL3 und FN1, MMP3 und IGFBP3, IGF2R, PLAGL1 und S100A6, IGF2 und H19 sowie LUM und MEST. Gemäß der Änderung ihrer Aktivitätslevel infolge des ASPN-Knockdown, ließen sich Gene, auf die ASPN potenziell inhibierende Effekte hat, von solchen unterscheiden, auf die ASPN potenziell aktivierende Effekte hat. Die hier aufgeführten Gene sind abzugrenzen von denjenigen, die als von ASPN unbeeinflusst gefunden wurden (siehe Abschnitt 5.4) und denen mit uneindeutigem Ergebnis (siehe Abschnitt 5.5).

5.3.1 ASPN als potenzieller Inhibitor

Für die Gene SPARC, COL1A1, BGN, FSTL3, FN1, MMP3, IGFBP3, IGF2R, PLAGL1 und S100A6 konnte eine Steigerung der Expressionswerte im Rahmen einer Herabregulation von ASPN beobachtet werden. Dies lässt einen in-

inhibitorischen Effekt von ASPN auf diese Gene vermuten.

5.3.1.1 Potenziell inhibitorische Effekte von ASPN auf die Gene SPARC, COL1A1, BGN, FSTL3 und FN1 bei vorwiegender Korrelation der Expressionsswerte mit ASPN

Das SPARC-Gen und das COL1A1-Gen werden in den Fibroblasten, die für den Knockdown verwendet wurden, stärker exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Wider Erwarten zeigten sie keine eindeutige Reduktion, sondern sogar einen tendenziellen Anstieg ihrer Expression nach ASPN-Knockdown. Insbesondere im Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten zeigen sie starke Ähnlichkeit in ihrem Expressionsmuster. Für beide Gene zeigte sich die gesteigerte Genexpression im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten initial intensiver, jedoch weniger langanhaltend, mit einer Reduktion der Genaktivität unter 100% nach 72 Stunden. Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(l)-Zellen zeigte sich eine vergleichbare Tendenz: die Genexpression blieb entweder unverändert oder stieg auf bis zu ca. 200% an.

Das SPARC (*secreted protein acidic and cysteine rich*)-Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert. Es kodiert für ein zysteinreiches Matrix-assoziiertes Protein, das an der Kalzifizierung von Kollagen im Knochengewebe beteiligt ist, sowie an der Synthese der extrazellulären Matrix. Es kann außerdem Veränderungen der Zellform hervorrufen, ist so an der Invasion von Tumorzellen in Metastasierungs Vorgängen beteiligt und hat damit eine proonkogene Wirkung. Jedoch wurden auch Tumorsuppressorfunktionen des Genprodukts beschrieben. Yan *et al.* wiesen 2018 nach, dass Patienten mit T-Zell-non-Hodgkin-Lymphom ein besseres klinisches Outcome hatten, wenn hohe Expressionslevel von SPARC im Tumorgewebe gemessen wurden. Das Genprodukt hat sowohl die Tumorzellproliferation, als auch die -migration und -invasion signifikant reduziert und die Apoptose in den Tumorzellen gefördert. Ein Verlust der SPARC-Expression im Tumorgewebe konnte mit einer fehlerhaften DNA-Methylierung im SPARC-Gen assoziiert werden (Yan *et al.*, 2018). Eine Hochregulation von ASPN (und GJB2) wurde von Castellana *et al.* im Zusammenhang mit der Progression vom duktalem Karzinom in situ zum invasiven Duktalkarzinom bei Mammakarzinomen ausgemacht. Neben ASPN wurde hier auch SPARC (und FN1) als ursächlich für die epithelial-mesenchymale Transition und Invasion von Tumorzellen eingestuft (Castellana *et al.* 2012).

COL1A1 (*collagen type I alpha 1 chain*) ist ein proteinkodierendes Gen, dessen Produkt Teil der Kollagenstruktur, nämlich die pro-alpha-1-Ketten des Typ-I-Kolla-

gens bildet. Das Typ-I-Kollagen ist eine Tripelhelix, bestehend aus zwei alpha-1-Ketten und einer alpha-2-Kette, und ist reichlich in Binde- und Knorpelgewebe, sowie in der Dermis zu finden. Mutationen des Gens, das auf Chromosom 17 lokalisiert ist, sind mit Erkrankungen des Bindegewebes und des Knochens, wie dem Ehlers-Danlos-Syndrom, der Osteogenesis imperfecta Typ I-IV und der idiopathischen Osteoporose assoziiert. Es sind zwei Transkriptvarianten des Gens bekannt. Sowohl das COL1A1-Gen als auch die Gene ASPN und TGF β 1 wurden als potenzielle Mitverursacher von Hüft dysplasien im Kindesalter identifiziert (Gkiatas *et al.*, 2019). COL1A1 und ASPN wurden außerdem neben drei weiteren Genen (FN1, VCAN und MUC5AC) als potenzielle prognostische Biomarker bei Magenkarzinomen eingestuft. Sie wurden als *hub* Gene aus einer Gruppe von 117 differenziell exprimierten Genen selektiert (Jiang *et al.*, 2019). Eine weitere in der Literatur beschriebene Gemeinsamkeit zwischen ASPN und COL1A1 besteht im gemeinsamen Auftreten mit MYH9 als Fusionspartner für das USP6-Gen bei der Entstehung bestimmter Sehnenscheidenfibrome. Hier wird außerdem ein weiterer Fall beschrieben, in dem das SPARC-Gen als mitbeteiligter Fusionspartner aufgeführt wird (Pizem *et al.*, 2021).

Für die Gene SPARC und COL1A1 ist eine Co-/ Regulation durch, bzw. eine potenzielle Interaktion mit dem ASPN-Gen nicht auszuschließen. Die in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge zwischen ASPN und SPARC, bzw. COL1A1, sind bisher in erster Linie auf die gemeinsame Bedeutsamkeit im Rahmen von Tumorgeschehen beschränkt. Es wäre denkbar, dass mehrere der untersuchten Gene Bestandteil eines größeren, gemeinsamen Netzwerks sind, das auch mit ASPN assoziiert ist.

Aufgrund der Ähnlichkeit des Expressionsverhaltens von BGN, FSTL3 und FN1 im Vergleich zu SPARC und COL1A1 im Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten, werden diese drei Gene hier ebenfalls aufgeführt.

Sie werden ebenfalls in den für den ASPN-Knockdown verwendeten Fibroblasten stärker exprimiert als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Auch sie zeigten keinen Rückgang ihrer Expression nach ASPN-Knockdown, sondern einen tendenziellen Anstieg ihrer Expressionslevel. Genau wie die Gene SPARC und COL1A1 zeigten sie im ersten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen einen maximalen Anstieg der Expression nach 48 Stunden, und im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen einen maximalen Anstieg

der Expression nach 24 Stunden. Aufgrund des Expressionsverhaltens im Knock-downversuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten sind die beiden Gengruppen jedoch voneinander abzugrenzen, denn obwohl alle fünf Gene nach ASPN-Knock-down keine wesentliche Änderung ihrer Genaktivität zeigten, zeigte die eine Gruppe eher einen leichten Anstieg (SPARC und COL1A1), die andere eher einen leichten Abfall (BGN, FSTL3 und FN1) der Genexpression, der bei BGN und FN1 jedoch auf den 24-Stunden-Zeitpunkt begrenzt ist.

Biglycan (BGN) gehört, wie Asporin und Decorin, zur Klasse I der SLRPs und ist, neben Decorin, der bisher am besten beschriebene Vertreter der SLRPs (Zhang *et al.* 2015). Es wird insbesondere in Knochen und Knorpel reichlich exprimiert. Dort ist es entscheidend an der Regulation der Osteoblastendifferenzierung beteiligt. Bei Störung der Genfunktion kommt es daher vorwiegend zu Knochendysplasien und reduzierter Knochenmasse, -dichte und -stabilität. Weiterhin ist BGN an multiplen *signaling pathways* sowie Proteininteraktionen, wie beispielsweise Kollagenbindungen, beteiligt und trägt dadurch zur Struktur und zur Homöostase der extrazellulären Matrix bei (Cho *et al.*, 2016). Zusätzlich wird BGN auch in Muskel- und Sehngewebe sowie in Zähnen exprimiert (Zhang *et al.* 2015). Es ist darüber hinaus an Alterungs- und Heilungsprozessen beteiligt (Dunkman *et al.*, 2014). Das proteinkodierende BGN-Gen liegt auf dem X-Chromosom (*locus* Xq28) (Burger *et al.*, 2014). Zwei entscheidende Strukturelemente sind am Aufbau von BGN beteiligt: eine Cysteinsequenz sowie ein *leucin-rich repeat* (LRR). Aufgrund von zwei unterschiedlichen Varianten der Aminosäureabfolge des LRR existieren zwei verschiedene humane BGN Moleküle (Cho *et al.*, 2016). Sowohl BGN als auch ASPN sind mit der Progression und einer schlechten Prognose von T2E (TM-PRSS2-ERG-Fusionsonkogen) -negativen Adenokarzinomen der Prostata assoziiert (Gerke *et al.*, 2020). Gerke *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass neben ASPN und BGN auch COL1A1 (sowie RRM2 und TYMS) bedeutsam für die Risikobestimmung und Prognose von T2E-negativen Adenokarzinomen der Prostata, und damit ein potenzieller neuer Biomarker ist (Gerke *et al.*, 2020). Darüber hinaus sind bisher keine bedeutsamen Zusammenhänge zwischen BGN und ASPN in der Literatur beschrieben.

Das Genprodukt von FSTL3, auch bezeichnet als *follistatin-like 3*, *follistatin-related gene protein* oder *follistatin-related protein 3*, ist ein Zytokin (Kralisch *et al.*, 2017). Bislang ist das Glykoprotein spärlich erforscht. Bereits 2006 konnten Mukherjee *et al.* zeigen, dass es sich um einen Antagonisten der TGF β -Superfamilie, im

speziellen um einen Activin- und Myostatinantagonisten, handelt, der an der Regulation des Stoffwechsels mitbeteiligt ist (Mukherjee *et al.*, 2007). Es bindet und inaktiviert Activin, einen Wachstumsfaktor, und wurde außerdem als neues Onkogen für NSCLC identifiziert (Gao *et al.*, 2020). FSTL3 induziert Insulinresistenz und steigert den Anteil viszeralen Fettgewebes (Kralisch *et al.*, 2017). Es ist außerdem durch Lipidakkumulation, Inflammation und Regulation der Expression von CD36 und LOX-1 am Prozess der Atherosklerose beteiligt (Runhua *et al.*, 2019). Exprimiert wird FSTL3 insbesondere in Plazenta und Testis. Das Gen liegt auf Chromosom 19, auf dem *locus* 19p13.3. FSTL3 taucht gemeinsam mit ASPN in der Literatur nur im Rahmen der zuvor erwähnten Studie von Bolton *et al.* zu Biomarkern bei Patienten mit Adipositas auf (Bolton *et al.*, 2017). Weitere Zusammenhänge sind bisher nicht bekannt.

Das FN1-Gen (*fibronectin 1*) liegt auf Chromosom 2 (*locus* 2q35). Das proteinkodierende Gen hat drei Regionen, die dem alternativen Splicing unterliegen, und 20 potenzielle Transkriptvarianten. Fibronectin 1 ist Teil der Fibronectinfamilie. Fibronectin ist das vorwiegende nicht-kollagen Glykoprotein der ECM und Basalmembran (Liu *et al.*, 2020). Fibronectin 1 wird von multiplen Zelltypen exprimiert und kommt sowohl löslich im Zellplasma, als auch an der Zelloberfläche, sowie in der extrazellulären Matrix vor. Es ist an Prozessen der Zelladhäsion und -migration beteiligt (Gao *et al.*, 2016). Ein elementarer Zusammenhang zwischen FN1 und ASPN ist bisher nicht bekannt. Das gemeinsame Auftreten in der Literatur beschränkt sich auf die bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnten Autoren (Abschnitt 5.3.1.1: Jiang *et al.*, 2019, Abschnitt 5.3.1.1: Castellana *et al.*, 2012, Abschnitt 5.3.2.1: Tran *et al.*, 2019).

Aufgrund der interessanten Übereinstimmung dieser Gengruppe im Expressionsverhalten mit COL1A1 und SPARC nach ASPN-Knockdown, insbesondere im Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten, finden diese drei Gene hier ebenfalls Erwähnung. Obwohl keines der drei Gene bisher weiterführend mit ASPN assoziiert ist, halte ich dennoch eine Interaktion oder Mit-/ Regulation durch ASPN für möglich. Interessant ist das wiederholte gemeinsame Auftreten von vielen der in dieser Arbeit untersuchten Gene, neben SPARC und COL1A1 auch BGN und FN1, mit ASPN im Rahmen von Tumorerkrankungen.

5.3.1.2 Potenziell inhibitorische Effekte von ASPN auf die Gene MMP3, IGFBP3, IGF2R, PLAGL1 und S100A6 bei vorwiegend konträren Expressionswerten zu ASPN

MMP3 und IGFBP3 zeigten einen ausnahmslosen Anstieg ihrer Expressionslevel in allen drei Knockdownversuchen mit ASPN. Die Expression von MMP3 und IGFBP3 ist in den nativen BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen jeweils schwächer, und in den nativen SRS UPD(7)mat(I)-Zellen jeweils stärker als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten mit dem höchsten ASPN-Gehalt, ist die Expression beider Gene am geringsten. In den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen mit geringerem ASPN-Gehalt werden die Gene am stärksten exprimiert, während die Expressionslevel in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Fibroblasten bei geringstem ASPN-Gehalt im Mittelbereich liegen. In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen stiegen die Werte für MMP3 im Durchschnitt auf 189,11%, während die Werte für IGFBP3 einen etwas stärkeren Anstieg, auf durchschnittlich 279,79%, zeigten. In den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen zeigte sich wider Erwarten ebenfalls ein Anstieg der Genaktivität für beide Gene. Die Werte für IGFBP3 stiegen im Verlauf stärker an als für MMP3. Der Maximalwert erreichte für IGFBP3 301,78%, für MMP3 158,38%.

Die Proteine der Matrix-Metalloproteinase-Familie sind wesentlich am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt. Für eines von ihnen kodiert das MMP3-Gen. Es befindet sich auf dem *locus* 11q22.2. Das MMP3-Gen ist nicht imprinted. Es wurde jedoch ein interindividueller Promotor-Polymorphismus beschrieben, der die Expression von MMP3 beeinflusst (Huang *et al.*, 2017). Der Kausalzusammenhang mit pathologischen Veränderungen wie Atherosklerose ist Gegenstand aktueller Forschungen. Die Degeneration der ECM findet unter physiologischen Umständen statt, ebenso aber auch im Rahmen von Metastasierungen und anderen pathologischen Vorgängen. Der Abbau der ECM erleichtert den Tumorzellen die Invasion benachbarten Gewebes (Wang *et al.*, 2018). Es gibt jedoch Hinweise auf eine weitere tumorprotektive Funktion von MMP3 (Wang *et al.*, 2018). MMP3 hat eine vergleichbar höhere Substratspezifität als andere Mitglieder der MMP-Familie und besitzt außerdem die Fähigkeit diese zu aktivieren (Huang *et al.*, 2017). Inflammatorische Zytokine induzieren die Sekretion und Aktivität von MMP3 und tragen so zum Gewebeabbau bei (Zhou *et al.*, 2017). Aufgrund seiner Funktion wird es, neben anti-CCP-Antikörpern gegen zyklisches citrulliniertes Peptid, als Serummarker bei degenerativen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA) in Beta-

cht gezogen (Zhou *et al.*, 2017). Eine erhöhte Expression von MMP3, sowie eine erhöhte Proteinmenge, konnten im entzündeten Gewebe und in der Synovia von Patienten mit RA festgestellt werden (Zhou *et al.*, 2017). Sowohl MMP3 als auch ASPN konnten als dysregulierte Gene im Zusammenhang mit Erkrankungen des Knorpels und Knochens bei Mensch und Tier nachgewiesen werden, spezifisch für die Osteoarthritis (Zhang *et al.*, 2012 und Chou *et al.*, 2013) und das Osteosarkom (Simpson *et al.*, 2020). Auch im Zusammenhang mit Magenkarzinomen konnte ein Unterschied in der differentiellen Expression für beide Gene zwischen Tumor und Kontrolle gezeigt werden (Rajkumar *et al.*, 2010). Ferner sind bisher keine weiteren Zusammenhänge zwischen den beiden Genen bekannt.

Das IGFBP3-Gen (kurz für *insulin like growth factor binding protein 3*) kodiert für unterschiedliche Isoformen eines Proteins, das eine Domäne mit Bindekapazität für den *insulin like growth factor* trägt. Es ist vorzufinden auf dem *locus* 7p12.3. Es zählt zum *insulin like growth factor* System, das eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen spielt (Wang *et al.*, 2016). Neben IGFBP3 zählen dazu IGFBP1 bis 6, sowie IGF1 und IGF2 und deren Rezeptoren (Wang *et al.*, 2016). Das IGFBP3 Protein gelangt hauptsächlich durch Sekretion aus Zellen in den Organismus. Dort spielt es eine bedeutende Rolle in verschiedenen molekularen Mechanismen und *pathways* (Song *et al.*, 2016). Ein verändertes Serumlevel von IGFBP3 ist mit vielen verschiedenen Tumortypen und Karzinomen assoziiert. Die epigenetische Modifikation von IGFBP3 ist dabei vermutlich ein Auslöser von ausschlaggebenden Effekten für die Tumorentwicklung (Song *et al.*, 2016). Neben IGFBP3 ist vor allem IGF1 in die Karzinogenese involviert (Wang *et al.*, 2016). In einer Studie von Bolton *et al.* von 2017 konnte IGFBP3 neben fünf weiteren Genen (darunter FSTL3 und SPARC, die ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sind) als potenzieller prognostischer Biomarker für eine erfolgreiche Gewichtskontrolle nach interventioneller Ernährungsumstellung bei Patienten mit Adipositas ausgemacht werden. Die gleiche Studie zeigte eine erhöhte Baseline-Expression von ASPN als TGF β 1-Inhibitor bei Patienten mit anhaltend guter Gewichtskontrolle. Es konnte ein regulatorisches Netzwerk identifiziert werden, bei dem TGF β 1 für die Herabregulation bestimmter Gene während der Ernährungsumstellung verantwortlich ist (Bolton *et al.*, 2017). Des Weiteren interagiert IGFBP3, wie ASPN, ebenfalls mit dem TGF β 1-Signalweg (Kawasaki *et al.*, 2007). Bei der Erforschung oraler Plattenepithelkarzinome, konnte eine Inhibition der IGFBP3-Expression durch TGF β gezeigt werden (Park *et al.*, 2021).

Die Beobachtung, dass in allen drei Knockdownversuchen ein Anstieg der Genaktivität beider Gene nach ASPN-Knockdown erfolgt, lässt vermuten, dass ASPN eine Rolle bei der Expression von MMP3 und IGFBP3 spielen könnte. Es zeigte sich ein einheitlicher Anstieg der Expressionslevel sowie eine interessante Ähnlichkeit in der Expression beider Gene nach ASPN-Knockdown. Sowohl MMP3 als auch IGFBP3 sind im Zusammenhang mit ASPN, oder den damit assoziierten Signalwegen, und verschiedenen Karzinomformen beschrieben. Eine inhibitorische Wirkung von ASPN auf MMP3 und IGFBP3 ist denkbar, da die Expressionslevel beider Gene nach Herabregulation von ASPN ansteigen. Des Weiteren wäre eine regulatorische Funktion der drei Gene im Rahmen der Tumorgenese und -entwicklung denkbar und könnte weiterführend geprüft werden.

IGF2R und PLAGL1 wurden als wichtige Bestandteile des IGN und im Rahmen der bisherigen laborinternen Forschung für die weitergehende Untersuchung in diese Arbeit mit aufgenommen. Beide Gene, IGF2R und PLAGL1, verhielten sich im Knockdownversuch ähnlich dem S100A6-Gen, weshalb sie in einer Gruppe zusammen geschlossen wurden. Alle drei Gene weisen in den nativen BWS Δ H19/ICR1 mat- und SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten niedrigere Expressionslevel auf als in den nativen TNDM-HypoCT/PLAGL1-Zellen. Die ASPN-Expression ist in den BWS Δ H19/ICR1 mat- und SRS UPD(7)mat(l)-Fibroblasten höher als in den TNDM-HypoCT/PLAGL1-Zellen. Es wurde daher untersucht, ob die Versuchszellreihen nach Angleichen der ASPN-Aktivität durch ASPN-Knockdown auch einen Anstieg in der Expression von IGF2R, PLAGL1 und S100A6 zeigen.

Das IGF2R-Gen (*insulin like growth factor 2 receptor*) ist ein proteinkodierendes Gen auf dem *locus* 6q25.3. Der IGF2-Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein, dessen größter Anteil, bis zu 95%, intrazellulär liegt (Hawkes *et al.*, 2004 und Scott *et al.*, 2004). Er bindet *insulin like growth factor 2* und ist an dessen Abbau beteiligt. *Insulin like growth factor 2* ist maßgeblich beteiligt an der Regulation des Stoffwechsels, sowie an Wachstum und Zelldifferenzierung (O'Ddell *et al.*, 1998). Der Rezeptor bindet weitere Liganden wie Mannose-6-Phosphat und *transforming growth factor beta* (TGF β), und ist mitverantwortlich für den intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme vom Golginetzwerk zu den Lysosomen. Exprimiert wird das Gen vor allem in Milz und Fettgewebe. Eine Tumorsuppressorfunktion von IGF2R wird diskutiert, da eine Assoziation zwischen Genverlust und dem Auftreten verschiedenster Tumoren gezeigt werden konnte (Scott *et al.*, 2004).

Das PLAG1 *like zinc finger* 1-Gen (PLAG1 steht dabei für *pleiomorphic adenoma gene-like* 1), auch bezeichnet als ZAC1 oder LOT1, wird in den meisten Geweben paternal, über Imprinting des P1 *downstream* Promotor, exprimiert und kodiert für zwei Isoformen eines C₂H₂ Zinkfinger Proteins, das das Zellwachstum unterdrückt und somit auch eine Tumorsuppressorfunktion innehält. Es zählt zur PLAG Familie, die neben PLAGL1 auch PLAGL2 sowie PLAG1 einschließt (Li *et al.*, 2014). Das Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert (6q24.2). Eine Deletion dieses *locus* konnte bei verschiedensten Krebsformen nachgewiesen werden. Auch epigenetische Modifikationen des *locus* sind mit Malignomen assoziiert (Li *et al.*, 2014). Das Gen gilt als wichtiger Regulator innerhalb des IGN (Vincent *et al.*, 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass PLAGL1 an die *enhancer* Region des IGF2/H19 *locus* bindet und so seine regulatorische Funktion ausübt. Im Versuch mit Mäusen führte der Verlust von PLAGL1 zu schwerer Wachstumsminde rung (Vincent *et al.*, 2016). Insbesondere pränatal scheint PLAGL1 elementär zum fetalen Wachstum beizutragen.

Das S100 *calcium binding protein* A6-Gen, auf dem *locus* 1q21.3, ist proteinkodierend für ein intrazelluläres Protein. Durch die Bindung von Calcium wird eine Konformationsänderung bewirkt, die für die Funktion des Proteins bedeutsam ist (Lesniak *et al.*, 2017). Es ist keine epigenetische Modifikation durch Imprinting beschrieben. Die S100-Familie fungiert in einer Vielzahl an Zellen als Regulator des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung, sowie der intrazellulären Calciumhomöostase (He *et al.*, 2017). Da das Protein auch von Zellen abgegeben werden kann, hat es vermutlich weitere extrazelluläre Funktionen (He *et al.*, 2017). Es wird in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Unter anderem konnten spezifische und varii erende Expressionsmuster von S100A6 beim Prostatakarzinom nachgewiesen werden. Neben S100A6 konnte man dies auch für andere der in dieser Arbeit untersuchten Gene nachweisen, nämlich für ASPN, CTSK, DCN und SPARC (Orr *et al.*, 2012). Die Auswertung der qPCR-Daten ergab einen extrem hohen Anstieg der Expression von S100A6 nach 24 Stunden (23.742,13%) im zweiten Knockdownversuch mit BWS ΔH19/ICR1 mat-Fibroblasten. Für diese Probe wurde eine vergleichsweise extrem geringe Konzentration gemessen. Es muss hier von einem Messfehler ausgegangen werden. Aufgrund der zwei verbleibenden auswertbaren Knockdownversuche wird der Wert von der Betrachtung ausgeschlossen.

Die Expression veränderte sich für alle drei Gene dieser Gruppe größtenteils er-

wartungsgemäß. Der Knockdown von ASPN führte im ersten Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen zu einer Steigerung der Genaktivität, die nach 48 Stunden ihren Höhepunkt erreichte. Dies konnte im zweiten Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten für IGF2R exakt, und für die anderen beiden Gene in ähnlicher Form reproduziert werden. Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(1)-Zellen war das Ergebnis vergleichbar. Der Höhepunkt der Expressionssteigerung wurde hier für S100A6 ebenfalls nach 48 Stunden erreicht, für die anderen beiden Gene bereits nach 24 Stunden.

Die erwartungsgemäße Steigerung der Genaktivität ist ein Hinweis auf eine Beteiligung von ASPN an der Expression dieser Gene. Zu vermuten wäre eine inhibitorische Wirkung, die durch den Knockdown verringert wurde, wenn auch nur vorübergehend, was dem zeitlich begrenzten Charakter des Experiments oder einer Mitbeteiligung weiterer Faktoren auf Expressionsebene geschuldet sein kann. Der schwächere Effekt des ASPN-Knockdown in den SRS UPD(7)mat(1)-Zellen passt zu der geringeren ASPN-Expression in den nativen Zellen im Vergleich zur BWS Δ H19/ICR1 mat-Zelllinie. Aufgrund der Assoziation von IGF2R und PLAGL1 mit dem IGN ist eine Interaktion mit dem ASPN-Gen naheliegend und konnte durch die für diese Arbeit durchgeführten Knockdownversuche bekräftigt werden.

5.3.2 ASPN als potenzieller Aktivator

Für die Gene IGF2, H19, LUM und MEST konnte eine Reduktion der Expressionswerte im Rahmen einer Herabregulation von ASPN beobachtet werden. Dies lässt einen aktivierenden Effekt von ASPN auf diese Gene vermuten.

5.3.2.1 Potenziell aktivierende Effekte von ASPN auf die Gene IGF2 und H19 bei vorwiegender Korrelation der Expressionswerte

IGF2 (*insulin like growth factor 2*) ist ein weiteres geprägtes, paternal exprimiertes, Gen. Die DMR des maternalen Allels liegt methyliert vor. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 11 (*locus* 11p15.5), direkt neben dem Insulingen. Der IGF2 Wachstumsfaktor, für den es kodiert, ist essentiell für eine gesunde Entwicklung und regelrechtes Wachstum. Seine Serumkonzentration ist dreifach höher als die seines Familienmitglieds IGF1 (Livingstone, 2013). Beide Wachstumsfaktoren sind, gemeinsam mit Insulin und IGFBNs (*IGF binding protein*), Teil eines komplexen Systems, das das Wachstum, insbesondere während der Embryogenese,

beeinflusst (Livingstone, 2013). IGF2 besteht aus 67 Aminosäuren und wird vorwiegend in der Leber synthetisiert; Isoformen des Proteins sind beschrieben. Epigenetische Modifikationen dieses *locus* sind sowohl mit BWS als auch mit SRS assoziiert. Eine Überexpression von IGF2 kann in den verschiedensten Tumorentitäten nachgewiesen werden und ist dann mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Livingstone, 2013). Die Expression von IGF2 ist umfangreich reguliert- durch *imprinting* wird eine derartige Überexpression inhibiert. Es kommuniziert über drei verschiedene Rezeptorenkomplexe: IGF1-Rezeptor (IGF1R), Insulinrezeptor Isoform-A (IR-A) und IGF1R-IR-A Hybridrezeptor (Livingstone, 2013). In einer Metaanalyse von Tran *et al.* zur Genexpression in Chondrozyten von Patienten mit Osteoarthritis wurde gezeigt, dass IGF2 ein wichtiges Element für die Knorpelfunktion ist. Neben IGF2 konnte dies auch für weitere Gene, die in dieser Arbeit untersucht wurden, gezeigt werden (ASPN, COL1A1 und FN1) (Tran *et al.*, 2019).

IGF2 wird in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten wesentlich stärker exprimiert als in in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen, wo ASPN nur wenig exprimiert wird, weshalb untersucht wurde, ob nach Reduktion von ASPN in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten auch ein Abfall von IGF2 zu beobachten sei. In beiden Knockdownversuchen mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen zeigte sich ein initialer Anstieg der Genaktivität nach 24 Stunden und eine Reduktion der Transkriptmenge im weiteren zeitlichen Verlauf auf 70,18% im ersten Versuch, beziehungsweise auf 33,52% im zweiten Versuch. Der Expressionsgrad von IGF2 in den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen unterscheidet sich nur minimal von dem in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen, weshalb das Expressionslevel hier weitestgehend unverändert bleiben sollte. Im Versuch mit der SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblastenkultur zeigte sich wider Erwarten, trotz der anderen Ausgangssituation verglichen mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen, ebenfalls ein einheitlicher Rückgang der Expression von IGF2. Die Werte ergeben im Mittel eine Expressionsaktivität von 61,78% im Vergleich zur Ausgangssituation.

Das H19-Gen ist nahe dem IGF2-Gen in einer Imprintingregion auf Chromosom 11 lokalisiert. Während IGF2 paternal exprimiert wird, wird von H19 nur das maternale Allel exprimiert. Es kodiert für eine lncRNA (*long non coding RNA*) mit einer Nukleotidlänge von ca. 2,3kb (Yu *et al.*, 2020), die als Tumorsuppressor fungiert. LncRNAs haben kein proteinkodierendes Potenzial, sind >200 Nukleotide lang und sind an verschiedenen Funktionen beteiligt, wie der Regulation der Gentranskription, der posttranskriptionalen Regulation und der epigenetischen Regulation

(Zhang *et al.*, 2012). Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, sind Imprintingdefekte von H19 mit BWS assoziiert und tragen insbesondere entscheidend zur Tumorgenese der pathognomonischen Wilms-Tumore bei. Aber auch in anderen Krebsformen, insbesondere in Magenkarzinomen, NSCLC (*non-small cell lung cancer*) und kolorektalen Karzinomen, kommt es zur vermehrten Expression von H19 (Yu *et al.*, 2020). Eine Metaanalyse von Yu *et al.* ergab, dass die Expression von H19-lncRNA eng mit dem klinischen Outcome von Krebspatienten korreliert, und in Zukunft ein wichtiger prognostischer Biomarker für verschiedenste Karzinome sein kann (Yu *et al.*, 2020).

Das H19-Gen wird weder in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen noch in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen exprimiert. In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen wird dies durch die maternale Deletion der ICR1 hervorgerufen. Die paternale Kopie des Gens liegt inaktiviert vor, da es sich um einen imprinteten *locus* handelt. Die Expression von H19 zeigte sich im ersten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen unverändert, während die zweite Transfektion eine Reduktion der Genaktivität um ca. 25% zeigte. Es kann festgehalten werden, dass der Knockdown von ASPN nicht zu einer Reaktivierung der paternalen Kopie des H19-Gens führte, was nicht zu erwarten war, da diese nicht durch das Vorhandensein oder Fehlen von Transkriptionsfaktoren bedingt ist, sondern eine Änderung eines Methylierungsmusters erforderlich wäre.

Das H19-Gen zeigte auch im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(l)-Zellen ein erniedrigtes Expressionsniveau, wenn auch weniger ausgeprägt als bei IGF2. Der ASPN-Knockdown führte zu einem einheitlichen Abfall der Genexpression, mit einem Minimum nach 48 Stunden (71,69%).

Die Gene IGF2 und H19 zählen zur Gruppe der Gene, bei denen eine verminderte Expression nach ASPN-Knockdown erwartet wurde. Aufgrund der eindeutigen Reduktion der Transkriptionslevel von IGF2 in allen drei Knockdownversuchen, ist ein Effekt von ASPN auf IGF2 oder eine Interaktion von IGF2 mit dem ASPN-Gen wahrscheinlich. Auch ein milder Effekt von ASPN auf das H19-Gen wäre möglich, wobei die Ergebnisse im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(l)-Zellen weniger ausgeprägt sind. Aufgrund der Deletion im Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen, bieten diese Knockdownversuche nur limitierte Informationen. Für mehr Aussagekraft wäre eine Wiederholung des Knockdownversuchs mit den SRS UPD(7)mat(l)-Zellen oder die Verwendung anderer Spenderzellen notwendig. Eine Regulation von IGF2 und H19 durch ASPN könnte auch mit der physischen Nach-

barschaft der beiden Gene auf Chromosom 11 assoziiert sein.

5.3.2.2 Potenziell aktivierende Effekte von ASPN auf die Gene LUM und MEST bei vorwiegend konträren Expressionswerten zu ASPN

Die beiden Gene LUM und MEST zeigen in den für den Knockdown verwendeten Zellreihen geringere Expressionslevel als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Dementsprechend wurde durch das Angleichen des ASPN-Gehalts durch die Transfektion ein Anstieg der Genaktivität erwartet. Beide Gene zeigten jedoch einen Abfall ihrer Expressionslevel nach ASPN-Knockdown.

In den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen führte die Herabregulation von ASPN zu einem Abfall der Genexpression von MEST auf $\leq 50\%$. Eine Reduktion der Expression von LUM konnte erst im zweiten Knockdownversuch beobachtet werden, mit einem Minimalwert von 59,87% nach 72 Stunden. In der SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe verhielt sich das LUM-Gen ähnlich: das initial unveränderte Expressionslevel sank im zeitlichen Verlauf auf 60,34% nach 72 Stunden. Das MEST-Gen wird in der SRS UPD(7)mat(I)-Zellreihe aufgrund der maternalen uniparentalen Disomie von Chromosom 7 nicht exprimiert. Die Genexpression blieb dementsprechend unverändert.

Das LUM-Gen ist auf Chromosom 12 (*locus* 12q21.33) lokalisiert und kodiert für Lumican, ein Protein der SLRP-Familie. Das Gen wird vorwiegend in Gallen- und Urinblase exprimiert. Lumican ist Bestandteil der extrazellulären Matrix, wo es mit Kollagenfibrillen interagiert und deren Entstehung reguliert. Es ist außerdem an der Angiogenese und der Diapedese von Immunzellen beteiligt, und daher in der Wundheilung von Bedeutung (Karamanou *et al.*, 2018). Des Weiteren wurde eine vermehrte Expression von Lumican in CAFs (*cancer-associated fibroblasts*) im Tumorstroma von Magenkarzinomen nachgewiesen, die positiv mit dem Erkrankungsstadium assoziiert sind. Lumican trägt hier durch Aktivierung des β 1-FAK-Signalweges zur Tumorgenese und Metastasierung bei (Wang *et al.*, 2017). LUM wurde außerdem als potenzieller Biomarker zur Diagnostik von Aortendissektionsgeschehen ausgemacht (Chen *et al.*, 2021). Chen *et al.*, konnten im Mausmodell nachweisen, dass eine verringerte Expression von LUM den TGF β /SMAD-Signalweg sowie die Expression von MMPs beeinflusst und die Mortalität im Zusammenhang mit einer Aortendissektion erhöht. Auch ASPN kann durch die Aktivierung der Akt/Erk- und TGF β /SMAD-Signalwege die Apoptose inhibieren und kolorektale Karzinomzellen zur Proliferation, Migration und Invasion anregen (Li *et*

al., 2019). Sowohl LUM als auch ASPN können also Einfluss auf den TGF β /SMAD-Signalweg nehmen, trotzdem ist ein weiterer Zusammenhang zwischen den beiden Genen in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Das MEST-Gen mit dem *locus* 7q32.2 ist ein geprägtes Gen. MEST steht hierbei für *mesoderm specific transcript*. Das Gen wird auch als *paternally expressed gene 1* (PEG1) bezeichnet; wie der Name bereits preisgibt, wird das Gen vorwiegend paternal exprimiert. Es kodiert für ein Mitglied der alpha/beta-Hydrolase-Superfamilie, das alternativem Splicing unterliegt, und zahlreiche Transkriptvarianten aufweist. LOI (*loss of imprinting*) des MEST-Gens ist mit verschiedenen Karzinomtypen assoziiert. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, ist eine maternale uniparentale Disomie des Chromosoms 7 mit dem Silver-Russell-Syndrom assoziiert. Es konnte außerdem in Mäusen nachgewiesen werden, dass MEST ein wichtiger epigenetischer Faktor in der Entwicklung von Adipositas ist, da es die Akkumulation von Fettsäuren in Adipozyten, und die Expansion von Fettgewebe begünstigt (Prudovsky *et al.*, 2018). Aufgrund der paternalen Expression konnte eine veränderte Genexpression von MEST nach ASPN-Knockdown nur in der BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellreihe beobachtet werden. Im Knockdownversuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Fibroblasten führte die Herabregulation von ASPN auch nicht zu einer Reaktivierung des MEST-Gens, was zur Herabregulation im Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten passt. Für MEST und ASPN sind bisher keine Zusammenhänge bekannt.

Aufgrund des eindeutigen Abfalls der Expressionslevel beider Gene nach ASPN-Knockdown, ist eine Mit-/ Regulation durch ASPN in Betracht zu ziehen. Auch eine aktivierende Funktion wäre denkbar. Insbesondere der Zusammenhang zwischen LUM und ASPN, die beide Mitglieder der SLRP-Familie sind, den TGF β /SMAD-Signalweg beeinflussen können und im Zusammenhang mit Karzinomgeschehen nachgewiesen werden konnten, scheint interessant und sollte Gegenstand intensiverer Nachforschung werden. Obwohl zwischen MEST und ASPN bisher keine bedeutenden Zusammenhänge beschrieben wurden, ist die stark reduzierte Expressionsaktivität nach ASPN-Knockdown in den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen auffällig, und könnte deshalb ebenfalls weiterführend untersucht werden.

Unter Einbeziehung aller potenziell durch ASPN beeinflussten Gene lassen sich verschiedene Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Zielgenen finden, die

auf eine gemeinsame Expression und/ oder Regulation hinweisen.

Für die Gene IGF2R, PLAGL1, MEST, IGF2 und H19 ist eine Assoziation mit dem IGN bekannt. Wie bereits erwähnt treten außerdem eine Vielzahl der Gene in einem onkologischen Zusammenhang auf. Dies ist wiederholt für die Gene SPARC, COL1A1, BGN und FN1 der Fall, die außerdem alle, neben MMP3, auch mit der Struktur und den biologischen Prozessen des Auf- und Abbaus der ECM assoziiert sind. Des Weiteren bestehen Zusammenhänge zwischen der TGF β -Superfamilie und den Genen LUM, IGFBP3, IGF2R, COL1A1 und FSTL3 in Form von Interaktionen mit einem gemeinsamen *pathway* (LUM, IGFBP3), Rezeptor/ Ligand-Interaktion (IGF2R), gemeinsamem Auftreten in der Erforschung eines Krankheitsbildes (COL1A1) sowie in Form von antagonistischen Effekten (FSTL3).

Die Identifizierung von ASPN als gemeinsames Regulationselement würde sowohl das Verständnis für bereits erforschte Regulationsmechanismen erweitern als auch Hinweise auf übergreifende Zusammenhänge zwischen dem IGN und der Regulation zellulärer Prozesse, insbesondere in Zusammenhang mit dem TGF β -Signalweg, geben.

5.4 Analyse der von ASPN als unbeeinflusst gefundenen Gene

Die Gene NLRP1, DCN und CTSK zeigten infolge des ASPN-Knockdown vorwiegend unveränderte Expressionswerte. Für die drei Gene wurde eine gesteigerte Genaktivität nach ASPN-Knockdown erwartet, wobei die Steigerung in ansteigender Reihenfolge für NLRP1, DCN und CTSK aufgrund der RPKM-Werte ausgeprägter vorliegen sollte. Obwohl es im zweiten Knockdownversuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Fibroblasten initial zu einem Anstieg der Genexpression nach 24h kam, fiel diese Steigerung im zeitlichen Verlauf auf das Ausgangslevel zurück, und konnte außerdem in den beiden Versuchen mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen nicht reproduziert werden. Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen blieb eine Änderung der Genaktivität aus. Für NLRP1 liegen die RPKM-Werte der BWS Δ H19/ICR1 mat-, SRS UPD(7)mat(I)- und TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen sehr nah beieinander, so dass die Expressionsstärke in sehr geringem Maße anstieg. Alle drei Gene wurden auf Basis der RNA-Sequenzierungsdaten ausgewählt (siehe Abschnitt 4.4) und tauchten in der Literatur oberflächlich im Zusammenhang mit ASPN auf.

Das NLRP1-Gen (*NLR family pyrin domain containing 1*), auch beschrieben als CARD7, NAC, DEFCAP oder NALP1, liegt auf dem *locus* 17p13.2 (Wei *et al.*, 2017). Es kodiert für ein Protein mit *leucin rich repeats* Domänen der Ced-4 Familie, das, im Rahmen der Apoptose, den programmierten Zelltod reguliert. Dabei spielt die Interaktion mit Caspasen eine bedeutsame Rolle, die durch das Protein, in Form eines Inflammasoms, aktiviert werden können. Durch diesen Mechanismus kann NLRP1 inflammatorische Reaktionen in Zellen hervorrufen (Wei *et al.*, 2017). Obwohl die Expression von NLRP1 ubiquitär nachgewiesen werden konnte, zeigen sich besonders hohe Expressionsraten in Haut- und Gehirnzellen (Tan *et al.*, 2015).

Das DCN-Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert (12q21.33). Es kodiert für das halbmondförmige Decorinprotein, das, wie Asporin, zur Familie der *small leucin rich* Proteoglykane (SLRP) gehört. Decorin ist eines der bisher am besten beschriebenen SLRPs. In der ECM bilden Decorinmoleküle häufig Dimere (Kamma-Lorger *et al.*, 2016), gebunden an Kollagen liegen sie jedoch als Monomer vor (Jarvinen *et al.*, 2015). Neben der Interaktion mit Kollagenfibrillen ist es außerdem beteiligt an der Suppression von Tumorzellen, durch inhibitorische Effekte auf die Angiogenese. Dennoch hat Decorin auch tumorfördernde Eigenschaften. Es ist beispielsweise ein wichtiger Regulator von Entzündungsprozessen und Autophagozytose (Schaefer *et al.*, 2017)- wichtige Vorgänge der Karzinogenese.

CTSK (Cathepsin K) ist ein proteinkodierendes Gen, das vorwiegend in Osteoklasten exprimiert wird und eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielt. Das kodierte Protein ist eine lysosomale Cysteinproteinase aus der Peptidase-C1-Proteinfamilie.

Es gibt keine weiteren Hinweise, die die Hypothese einer Regulation durch das ASPN-Gen unterstützen. Eine Weiterverfolgung der Hypothese ist daher für diese Gengruppe überflüssig.

5.5 Uneindeutige Resultate

TGF β 2 und NLRP10 fallen in die Gruppe der Gene, bei denen eine reduzierte Expressionsaktivität nach ASPN-Knockdown erwartet wurde, da sie höhere Expressionslevel in den Fibroblastenlinien der Knockdownversuche zeigen als in den TNDM HypoCT/PLAGL1-Zellen. Ein konstanter Rückgang der Genexpression

konnte für keines der beiden Gene nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten sich die Expressionslevel in allen drei Knockdownversuchen schwankend.

Im Versuch mit den BWS Δ H19/ICR1 mat-Zellen liegt der Durchschnitt der Expressionslevel für TGF β 2 bei 88,16% und für NLRP10 bei 104,9%, mit jeweils einer Steigerung der Genexpression zu einem Messzeitpunkt und verminderten Expressionswerten zu den restlichen Zeitpunkten. Die Transkriptionslevel zeigen sich hier durchweg schwankend. Im Versuch mit den SRS UPD(7)mat(I)-Zellen liegt die durchschnittliche Expression für NLRP10 bei 89,72% und ist somit leicht vermindert. Es kommt lediglich bei der Untersuchung von TGF β 2 zu einer durchgehenden Steigerung der Genexpression. Hier liegt die Expressionsaktivität im Durchschnitt bei 147,00%.

Ein Effekt von ASPN auf das TGF β 2-Gen wäre dementsprechend denkbar. Unter Einbeziehung aller Werte kann aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden. Um zu einem eindeutigeren Ergebnis zu gelangen, müssten die durchgeführten Knockdownversuche wiederholt und erweitert werden. Elementare Zusammenhänge zwischen TGF β 2 und ASPN sind in der Literatur nicht bekannt.

Das Gen für den *transforming growth factor beta 2* liegt auf Chromosom 1 (*locus* 1q41) und wird vorwiegend in Prostata- und Lungengewebe exprimiert, spielt als Wachstumsfaktor aber, für die Entwicklung verschiedenster Gewebe, eine entscheidende Rolle (Sanford *et al.*, 1997). Das enkodierte Protein ist ein sezernierter Ligand der TGF β -Superfamilie, die über 30 solcher Liganden beinhaltet (Sanford *et al.*, 1997). Über verschiedene Rezeptoren aktivieren diese Proteine SMAD-Transkriptionsfaktoren, und regulieren so die Expression von Genen. Durch Proteolyse entsteht aus dem Präproprotein ein *latency-associated peptide* (LAP), sowie das adulte Protein, das eine latente oder eine aktive Zustandsform einnehmen kann. Störungen des *TGF β /SMAD-pathways* können bei verschiedensten Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. Da TGF β 2 sich in der Vergangenheit als wichtiger Bestandteil des IGN gezeigt hatte, wäre eine Regulation durch das ASPN-Gen eine interessante Entdeckung. Eine Mit-/ Regulation durch weitere Mitglieder des IGN könnte potenziell interessante Erkenntnisse bringen.

Ein tiefergehender Zusammenhang zwischen NLRP10 und ASPN ist bisher ebenfalls nicht bekannt. Das NLRP10-Gen (vollständiger Name: *nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 10*) ist proteinkodierend und befindet sich auf dem *locus* 11p15.4. Das zugehörige Protein

ist Mitglied der NALP-Proteinfamilie, deren Mitglieder strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, unterscheidet sich jedoch durch das Fehlen der C-terminalen *leucine rich repeats* (LRR). Die Expression erfolgt fast ausschließlich in der Epidermis. NLRP10 ist Teil des Inflammasoms und somit des angeborenen Immunsystems (Vacca *et al.*, 2017). Der Proteinkomplex aktiviert proinflammatorische Caspasen. Auch eine Funktion im adaptiven Immunsystem, wie beispielsweise die Regulation von T-Zellzahl und -antwort wird diskutiert. Weiterhin agiert NLRP10 als intrazellulärer Rezeptor für mikrobielle Produkte (Vacca *et al.*, 2017). NLRP-Proteine sind generell von Bedeutung in der Erkennung von Pathogenen und der Infektreaktion (Vacca *et al.*, 2017). Eine Beeinflussung des Gens durch ASPN ist basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten Daten eher auszuschließen.

5.6 Ausblick

Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit wäre eine weiterführende Forschung, insbesondere im Bereich der potenziell durch ASPN beeinflusst gefundenen Gene, denkbar und sinnvoll. Um die Resultate dieser Arbeit zunächst weitergehend zu verifizieren, könnten entsprechende Knockdownversuche wiederholt und/ oder erweitert werden, beispielsweise mittels Verwendung weiterer humaner Fibroblasten von klinisch betroffenen Individuen.

Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 5.3.2.2) zeigte sich der Zusammenhang zwischen LUM und ASPN, die beide Mitglieder der SLRP-Familie sind, den TGF β /SMAD-Signalweg beeinflussen können und im Zusammenhang mit Karzinomgeschehen nachgewiesen werden konnten, als interessant. Darüber hinaus zeigte sich der eindeutige Abfall des Expressionslevels von LUM nach ASPN-Knockdown. Neben einer intensiveren Untersuchung der Regulationsmechanismen beider Gene in Bezug auf das IGN, wäre hier auch eine intensivere Forschung im Bereich des TGF β /SMAD-Signalweges, insbesondere auch von einem onkologischen Standpunkt aus, denkbar.

Ähnliches gilt für das IGFBP3-Gen, das- wie ASPN- ebenfalls mit dem TGF β 1-Signalweg interagiert (siehe Abschnitt 5.3.1.2). Aufgrund des einheitlichen Anstiegs der Expressionslevel von IGFBP3 (und MMP3) in allen drei Knockdownversuchen dieser Arbeit, ist eine inhibitorische Wirkung von ASPN auf die beiden Gene denkbar und könnte nähergehend geprüft werden. Ebenso wäre eine regula-

torische Funktion der Gene im Rahmen der Tumorgenese und -entwicklung denkbar und könnte deshalb ebenfalls fortführend mit onkologischem Schwerpunkt erforscht werden.

Neben LUM und IGFBP3, treten auch die Gene ASPN, SPARC, COL1A1, BGN und FN1 wiederholt gemeinsam im onkologischen Forschungsbereich im Zusammenhang mit verschiedensten malignen und benignen Tumoren auf und wurden teilweise bereits als potenzielle prognostische Biomarker identifiziert.

Es wäre denkbar, dass manche der untersuchten Gene neben dem IGN auch Bestandteil eines weiteren gemeinsamen Netzwerks sind, das an der Regulation zellulärer Prozesse, wie Zellteilung und -migration beteiligt ist. Hier könnte der TGF β -Signalweg als wichtiger Regulator im Rahmen von Zellprozessen, insbesondere auch während der embryologischen Entwicklung, eine besondere Rolle spielen. Neben der tiefgehenden Untersuchung der Regulationsmechanismen von ASPN und weiteren Genen im Rahmen des IGN, wäre daher auch eine Erweiterung des Forschungsfeldes mit Einbeziehung des TGF β -Signalweges sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Erforschung potenzieller Auswirkungen des Asporingens auf andere geprägte und nicht-geprägte Gene vor dem Hintergrund des IGN, sowie epigenetischer Erkrankungen, speziell solcher mit Imprintingdefekten. Die Durchführung erfolgte mittels gezielter Herabregulation der ASPN-Expression in humanen Fibroblastenzelllinien von erkrankten Individuen im Rahmen von Knockdownversuchen, und der Analyse der dadurch ausgelösten Veränderungen in der Expression ausgewählter assoziierter Gene. Durch das Einsetzen diverser Kontrollelemente wurde versucht, möglichst exakte Messwerte zu erzielen. Gene, für die eine konforme Änderung der Expressionslevel zu erwarten war, und die anschließend in den Versuchen ein ähnliches Expressionsverhalten zeigten, wurden zu Gruppen zusammengefasst und dann bezüglich eines potenziellen Einflusses durch ASPN näher analysiert.

Für die Gengruppen LUM und MEST, MMP3 und IGFBP3, COL1A1 und SPARC, BGN, FSTL3 und FN1, IGF2 und H19 sowie IGF2R, PLAGL1 und S100A6 konnte basierend auf der Auswertung der Expressionsanalysen ein potenzieller Zusammenhang mit ASPN, beziehungsweise eine Mit-/ Regulation durch das ASPN-Gen gefunden werden. Einige dieser Gene traten bereits in der Vergangenheit gemeinsam mit ASPN in der Literatur auf, wenn auch nicht im Kontext epigenetischer Erkrankungen, sondern vermehrt im Rahmen von Tumorgeschehen sowie Erkrankungen des Knochens, Knorpels und Bindegewebes. Die Gene NLRP1, DCN und CTSK zeigten sich von ASPN unbeeinflusst. Für die Gene TGF β 2 und NLRP10 kann keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit leisten einen Beitrag zum Verständnis des IGN und bieten eine Grundlage zur weiterführenden Erforschung epigenetischer Regulationsmechanismen. Im Rahmen dieser Forschung könnte neben der Relevanz für die Diagnostik und Therapie von Imprintingerkrankungen auch ein tiefergehendes Verständnis für Zellprozesse im Allgemeinen gewonnen werden und vielversprechende Gene, wie beispielsweise LUM und der damit assoziierte TGF β /SMAD-Signalweg, mit in den Fokus rücken. Des Weiteren konnten vermehrt Assoziationen zwischen den untersuchten Genen und Tumorerkrankungen gefunden werden, was eine Fortführung der Forschung auch von einem onkologischen Standpunkt aus begründen würde.

7. Literaturverzeichnis

Al Adhami, H., et al. (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.

Angulo, M. A., et al. (2015). "Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings." J Endocrinol Invest **38**(12): 1249-1263.

Barlow, D. P. (2011). "Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model." Annu Rev Genet **45**: 379-403.

Bertini, V., et al. (2017). "Maternal Uniparental Disomy 14 (Temple Syndrome) as a Result of a Robertsonian Translocation." Mol Syndromol **8**(3): 131-138.

Bolton, J., et al. (2017). "Molecular Biomarkers for Weight Control in Obese Individuals Subjected to a Multiphase Dietary Intervention." J Clin Endocrinol Metab **102**(8): 2751-2761.

Brioude, F., et al. (2018). "Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement." Nat Rev Endocrinol **14**(4): 229-249.

Burger, M. C., et al. (2014). "The BGN and ACAN genes and carpal tunnel syndrome." Gene **551**(2): 160-166.

Castellana, B., et al. (2012). "ASPN and GJB2 Are Implicated in the Mechanisms of Invasion of Ductal Breast Carcinomas." J Cancer **3**: 175-183.

Chen, S. W., et al. (2021). "Expression and role of lumican in acute aortic dissection: A human and mouse study." PLoS One **16**(7): e0255238.

Cho, S. Y., et al. (2016). "BGN Mutations in X-Linked Spondyloepimetaphyseal Dysplasia." Am J Hum Genet **98**(6): 1243-1248.

Chou, C. H., et al. (2013). "Direct assessment of articular cartilage and underlying subchondral bone reveals a progressive gene expression change in human osteoarthritic knees." Osteoarthritis Cartilage **21**(3): 450-461.

Cullen, B. R. (2014). "Viruses and RNA interference: issues and controversies." J Virol **88**(22): 12934-12936.

Cytrynbaum, C., et al. (2016). "Genomic imbalance in the centromeric 11p15 imprinting center in three families: Further evidence of a role for IC2 as a cause of Russell-Silver syndrome." Am J Med Genet A **170**(10): 2731-2739.

Dunkman, A. A., et al. (2014). "The injury response of aged tendons in the absence of biglycan and decorin." Matrix Biol **35**: 232-238.

Dykxhoorn, D. M., et al. (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 457-467.

- Gao, L., et al. (2020). "Up-Regulation of FSTL3, Regulated by lncRNA DSCAM-AS1/miR-122-5p Axis, Promotes Proliferation and Migration of Non-Small Cell Lung Cancer Cells." Onco Targets Ther **13**: 2725-2738.
- Gao, W., et al. (2016). "Silence of fibronectin 1 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line." Biochem Biophys Res Commun **476**(1): 35-41.
- Gerke, J. S., et al. (2020). "Integrative clinical transcriptome analysis reveals TM-PRSS2-ERG dependency of prognostic biomarkers in prostate adenocarcinoma." Int J Cancer **146**(7): 2036-2046.
- Gkiatas, I., et al. (2019). "Developmental dysplasia of the hip: a systematic literature review of the genes related with its occurrence." EFORT Open Rev **4**(10): 595-601.
- Gole, E., et al. (2018). "A Novel KCNJ11 Mutation Associated with Transient Neonatal Diabetes." J Clin Res Pediatr Endocrinol **10**(2): 175-178.
- Han, H. (2018). "RNA Interference to Knock Down Gene Expression." Methods Mol Biol **1706**: 293-302.
- Haug, M. G., et al. (2018). "Mosaic upd(14)pat in a patient with mild features of Kagami-Ogata syndrome." Clin Case Rep **6**(1): 91-95.
- Hawkes, C. and S. Kar (2004). "The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system." Brain Res Brain Res Rev **44**(2-3): 117-140.
- He, X., et al. (2017). "High Expression of S100A6 Predicts Unfavorable Prognosis of Lung Squamous Cell Cancer." Med Sci Monit **23**: 5011-5017.
- Huang, X., et al. (2017). "Association of matrix metalloproteinase-3 gene 5A/6A polymorphism with the recurrence of ischemic stroke: A prospective observational study." Brain Res **1674**: 55-61.
- Jarvinen, T. A. and S. Prince (2015). "Decorin: A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition." Biomed Res Int **2015**: 654765.
- Jiang, K., et al. (2019). "Differentially expressed genes ASPN, COL1A1, FN1, VCAN and MUC5AC are potential prognostic biomarkers for gastric cancer." Oncol Lett **17**(3): 3191-3202.
- Kagami, M., et al. (2017). "Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome." Genet Med **19**(4): 476-482.
- Kamma-Lorger, C. S., et al. (2016). "Role of Decorin Core Protein in Collagen Organisation in Congenital Stromal Corneal Dystrophy (CSCD)." PLoS One **11**(2): e0147948.

- Karamanou, K., et al. (2018). "Lumican as a multivalent effector in wound healing." Adv Drug Deliv Rev **129**: 344-351.
- Kawasaki, T., et al. (2007). "IGFBP3 promoter methylation in colorectal cancer: relationship with microsatellite instability, CpG island methylator phenotype, and p53." Neoplasia **9**(12): 1091-1098.
- Kralisch, S., et al. (2017). "FSTL3 is increased in renal dysfunction." Nephrol Dial Transplant **32**(10): 1637-1644.
- Lesniak, W., et al. (2017). "S100A6 - focus on recent developments." Biol Chem **398**(10): 1087-1094.
- Li, H., et al. (2019). "Cytoplasmic Asporin promotes cell migration by regulating TGF-beta/Smad2/3 pathway and indicates a poor prognosis in colorectal cancer." Cell Death Dis **10**(2): 109.
- Li, Z., et al. (2014). "Both gene deletion and promoter hyper-methylation contribute to the down-regulation of ZAC/PLAGL1 gene in gastric adenocarcinomas: a case control study." Clin Res Hepatol Gastroenterol **38**(6): 744-750.
- Liu, B., et al. (2020). "MicroRNA-219c-5p regulates bladder fibrosis by targeting FN1." BMC Urol **20**(1): 193.
- Livingstone, C. (2013). "IGF2 and cancer." Endocr Relat Cancer **20**(6): R321-339.
- Lorenzo, P., et al. (2001). "Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan." J Biol Chem **276**(15): 12201-12211.
- Margolis, S. S., et al. (2015). "Angelman Syndrome." Neurotherapeutics **12**(3): 641-650.
- Mukherjee, A., et al. (2007). "FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1348-1353.
- Ni, G. X., et al. (2014). "The role of small leucine-rich proteoglycans in osteoarthritis pathogenesis." Osteoarthritis Cartilage **22**(7): 896-903.
- O'Dell, S. D. and I. N. Day (1998). "Insulin-like growth factor II (IGF-II)." Int J Biochem Cell Biol **30**(7): 767-771.
- Ogata, T. and M. Kagami (2016). "Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region." J Hum Genet **61**(2): 87-94.
- Orr, B., et al. (2012). "Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate." Oncogene **31**(9): 1130-1142.

- Paganini, L., et al. (2015). "Beckwith-Wiedemann syndrome prenatal diagnosis by methylation analysis in chorionic villi." Epigenetics **10**(7): 643-649.
- Pappas, J. G. (2015). "The clinical course of an overgrowth syndrome, from diagnosis in infancy through adulthood: the case of Beckwith-Wiedemann syndrome." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **45**(4): 112-117.
- Park, J., et al. (2021). "The downregulation of IGFBP3 by TGF-beta signaling in oral cancer contributes to the osteoclast differentiation." Biochem Biophys Res Commun **534**: 381-386.
- Piccini, B., et al. (2018). "Transient Neonatal Diabetes Mellitus in a Very Preterm Infant due to ABCC8 Mutation." AJP Rep **8**(1): e39-e42.
- Pizem, J., et al. (2021). "Fibroma of tendon sheath is defined by a USP6 gene fusion-morphologic and molecular reappraisal of the entity." Mod Pathol **34**(10): 1876-1888.
- Prawitt, D., et al. (2004). "RNAi knock-down mice: an emerging technology for post-genomic functional genetics." Cytogenet Genome Res **105**(2-4): 412-421.
- Prudovsky, I., et al. (2018). "Mesoderm-specific transcript localization in the ER and ER-lipid droplet interface supports a role in adipocyte hypertrophy." J Cell Biochem **119**(3): 2636-2645.
- Rajkumar, T., et al. (2010). "Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis." Cancer Cell Int **10**: 45.
- Ranasinghe, J. C., et al. (2015). "Angelman syndrome presenting with a rare seizure type in a patient with 15q11.2 deletion: a case report." J Med Case Rep **9**: 142.
- Rocha, C. F. and C. L. Paiva (2014). "Prader-Willi-like phenotypes: a systematic review of their chromosomal abnormalities." Genet Mol Res **13**(1): 2290-2298.
- Runhua, M., et al. (2019). "FSTL3 Induces Lipid Accumulation and Inflammatory Response in Macrophages and Associates With Atherosclerosis." J Cardiovasc Pharmacol **74**(6): 566-573.
- Sanford, L. P., et al. (1997). "TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes." Development **124**(13): 2659-2670.
- Schaefer, L. and R. V. Iozzo (2008). "Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction." J Biol Chem **283**(31): 21305-21309.
- Schaefer, L., et al. (2017). "Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology." FEBS J **284**(1): 10-26.
- Scott, C. D. and S. M. Firth (2004). "The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumor suppression or garbage disposal?" Horm Metab Res **36**(5): 261-271.

Simpson, S., et al. (2020). "Molecular Characterisation of Canine Osteosarcoma in High Risk Breeds." Cancers (Basel) **12**(9).

Song, G., et al. (2016). "The low IGFBP-3 level is associated with esophageal cancer patients: a meta-analysis." World J Surg Oncol **14**(1): 307.

Stark, R., et al. (2019). "RNA sequencing: the teenage years." Nat Rev Genet **20**(11): 631-656.

Tan, C. C., et al. (2015). "NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model." J Neuroinflammation **12**: 18.

Temple, I. K., et al. (1991). "Maternal uniparental disomy for chromosome 14." J Med Genet **28**(8): 511-514.

Temple, I. K. and D. J. G. Mackay (1993). Diabetes Mellitus, 6q24-Related Transient Neonatal. GeneReviews((R)). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).

Touati, A., et al. (2018). "Transient neonatal diabetes mellitus and hypomethylation at additional imprinted loci: novel ZFP57 mutation and review on the literature." Acta Diabetol.

Tran, T. M., et al. (2019). "A Meta-Analysis of Non-Osteoarthritis and Osteoarthritis Chondrocyte Gene Expression to Determine the Efficacy of Autologous Chondrocyte Transplantation as a Viable Treatment Option." Med Case Rep Short Rev **2**(1).

Vacca, M., et al. (2017). "NLRP10 Enhances CD4(+) T-Cell-Mediated IFN γ Response via Regulation of Dendritic Cell-Derived IL-12 Release." Front Immunol **8**: 1462.

Vandesompele, J., et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.

VanGuilder, H. D., et al. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." Biotechniques **44**(5): 619-626.

Varrault, A., et al. (2006). "Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth." Dev Cell **11**(5): 711-722.

Vincent, R. N., et al. (2016). "Altered DNA methylation and expression of PLAGL1 in cord blood from assisted reproductive technology pregnancies compared with natural conceptions." Fertil Steril **106**(3): 739-748 e733.

Wakeling, E. L. (2011). "Silver-Russell syndrome." Arch Dis Child **96**(12): 1156-1161.

- Wakeling, E. L., et al. (2017). "Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement." Nat Rev Endocrinol **13**(2): 105-124.
- Wang, K. H., et al. (2018). "Optical imaging of ovarian cancer using a matrix metalloproteinase-3-sensitive near-infrared fluorescent probe." PLoS One **13**(2): e0192047.
- Wang, Q., et al. (2016). "Effects of High-Order Interactions among IGFBP-3 Genetic Polymorphisms, Body Mass Index and Soy Isoflavone Intake on Breast Cancer Susceptibility." PLoS One **11**(9): e0162970.
- Wang, X., et al. (2017). "Cancer-associated fibroblast-derived Lumican promotes gastric cancer progression via the integrin beta1-FAK signaling pathway." Int J Cancer **141**(5): 998-1010.
- Wei, Y., et al. (2017). "NLRP1 Overexpression Is Correlated with the Tumorigenesis and Proliferation of Human Breast Tumor." Biomed Res Int **2017**: 4938473.
- Xu, L., et al. (2015). "Asporin and osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **23**(6): 933-939.
- Yamaba, S., et al. (2015). "PLAP-1/Asporin Regulates TLR2- and TLR4-induced Inflammatory Responses." J Dent Res **94**(12): 1706-1714.
- Yan, J., et al. (2018). "SPARC is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in T-cell lymphoma." Exp Cell Res **364**(2): 125-132.
- Yu, H., et al. (2020). "The prognostic value of long non-coding RNA H19 in various cancers: A meta-analysis based on 15 studies with 1584 patients and the Cancer Genome Atlas data." Medicine (Baltimore) **99**(2): e18533.
- Zhang, R., et al. (2012). "Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray." PLoS One **7**(2): e32356.
- Zhang, X., et al. (2015). "The small leucine-rich proteoglycan BGN accumulates in CADASIL and binds to NOTCH3." Transl Stroke Res **6**(2): 148-155.
- Zhou, L., et al. (2017). "Matrix metalloproteinase-3 and the 7-joint ultrasound score in the assessment of disease activity and therapeutic efficacy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **19**(1): 250.

8. Anhang

8.1 Finale Daten

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
ASPN	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	10.42
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	17.15
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	3.76
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	3.66
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	1.60
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	1.47
SRS UPD(7)mat(I) 24	9.75
SRS UPD(7)mat(I) 48	6.47
SRS UPD(7)mat(I) 72	3.72
IGF2	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	114.12
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	94.81
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	70.18
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	349.15
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	57.21
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	33.52
SRS UPD(7)mat(I) 24	85.27
SRS UPD(7)mat(I) 48	42.97
SRS UPD(7)mat(I) 72	57.11

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
IGF2R	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	138.87
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	327.81
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	136.97
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	72.60
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	190.01
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	144.70
SRS UPD(7)mat(I) 24	191.25
SRS UPD(7)mat(I) 48	121.90
SRS UPD(7)mat(I) 72	118.35
MEST	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	48.98
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	35.47
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	50.44
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	47.53
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	36.48
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	43.04
SRS UPD(7)mat(I) 24	0
SRS UPD(7)mat(I) 48	0.00
SRS UPD(7)mat(I) 72	99.30

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
H19	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	101.25
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	92.20
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	109.82
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	108.76
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	56.23
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	66.56
SRS UPD(7)mat(I) 24	95.62
SRS UPD(7)mat(I) 48	71.69
SRS UPD(7)mat(I) 72	82.20
PLAGL1	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	145.49
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	309.61
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	161.34
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	294.01
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	230.79
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	101.72
SRS UPD(7)mat(I) 24	172.25
SRS UPD(7)mat(I) 48	161.19
SRS UPD(7)mat(I) 72	82.15

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
TGFβ2	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	92.73
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	135.02
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	89.98
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	119.49
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	49.01
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	42.70
SRS UPD(7)mat(I) 24	198.00
SRS UPD(7)mat(I) 48	119.41
SRS UPD(7)mat(I) 72	123.60
NLRP1	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	109.57
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	156.71
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	158.61
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	522.52
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	232.97
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	76.03
SRS UPD(7)mat(I) 24	104.47
SRS UPD(7)mat(I) 48	81.07
SRS UPD(7)mat(I) 72	86.66

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
NLRP10	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	62.01
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	133.37
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	67.93
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	185.71
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	87.23
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	93.17
SRS UPD(7)mat(I) 24	87.91
SRS UPD(7)mat(I) 48	122.44
SRS UPD(7)mat(I) 72	58.81
LUM	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	106.19
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	109.76
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	115.22
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	125.44
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	68.42
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	59.87
SRS UPD(7)mat(I) 24	103.14
SRS UPD(7)mat(I) 48	71.01
SRS UPD(7)mat(I) 72	60.34

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
SPARC	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	131.17
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	213.22
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	124.39
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	711.86
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	218.21
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	68.70
SRS UPD(7)mat(I) 24	118.21
SRS UPD(7)mat(I) 48	199.97
SRS UPD(7)mat(I) 72	166.92
FN1	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	94.83
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	138.52
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	79.35
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	1949.38
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	393.91
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	83.74
SRS UPD(7)mat(I) 24	70.77
SRS UPD(7)mat(I) 48	129.11
SRS UPD(7)mat(I) 72	96.85

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
CTSK	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	93.66
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	102.85
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	91.71
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	435.32
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	142.42
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	93.17
SRS UPD(7)mat(I) 24	106.30
SRS UPD(7)mat(I) 48	169.28
SRS UPD(7)mat(I) 72	94.78
BGN	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	133.03
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	213.64
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	110.27
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	1243.09
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	300.05
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	34.50
SRS UPD(7)mat(I) 24	45.87
SRS UPD(7)mat(I) 48	127.08
SRS UPD(7)mat(I) 72	103.48

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
FSTL3	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	123.83
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	154.31
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	103.67
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	706.90
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	121.84
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	42.12
SRS UPD(7)mat(I) 24	110.08
SRS UPD(7)mat(I) 48	50.00
SRS UPD(7)mat(I) 72	61.49
COL1A1	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	124.37
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	319.40
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	112.47
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	763.15
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	114.72
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	35.16
SRS UPD(7)mat(I) 24	97.38
SRS UPD(7)mat(I) 48	91.66
SRS UPD(7)mat(I) 72	158.50

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
MMP3	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	113.73
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	161.02
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	182.74
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	373.94
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	181.90
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	121.34
SRS UPD(7)mat(I) 24	119.04
SRS UPD(7)mat(I) 48	147.56
SRS UPD(7)mat(I) 72	158.38
DCN	
BWS Δ H19/ICR1 mat I 24	109.87
BWS Δ H19/ICR1 mat I 48	130.53
BWS Δ H19/ICR1 mat I 72	119.49
BWS Δ H19/ICR1 mat II 24	253.27
BWS Δ H19/ICR1 mat II 48	108.10
BWS Δ H19/ICR1 mat II 72	71.10
SRS UPD(7)mat(I) 24	103.19
SRS UPD(7)mat(I) 48	105.80
SRS UPD(7)mat(I) 72	93.78

Gen, Knockdownversuch und Zeitpunkt	Restaktivität in %
IGFBP3	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	172.62
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	254.68
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	168.87
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	625.77
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	317.42
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	139.35
SRS UPD(7)mat(I) 24	112.72
SRS UPD(7)mat(I) 48	229.01
SRS UPD(7)mat(I) 72	301.78
S100A6	
BWS ΔH19/ICR1 mat I 24	126.16
BWS ΔH19/ICR1 mat I 48	203.71
BWS ΔH19/ICR1 mat I 72	175.53
BWS ΔH19/ICR1 mat II 24	23742.13
BWS ΔH19/ICR1 mat II 48	96.11
BWS ΔH19/ICR1 mat II 72	119.33
SRS UPD(7)mat(I) 24	98.05
SRS UPD(7)mat(I) 48	144.75
SRS UPD(7)mat(I) 72	137.89

Tabelle 13: Finale Daten. Gelistet sind die für diese Arbeit verwendeten finalen Werte für die Restaktivität in [%] der untersuchten Gene, jeweils zu den drei verschiedenen Zeitpunkten und für alle drei Knockdownversuche.

8.2 RPKM-Werte

	BWS ΔH19/ICR1 mat	SRS UPD(7)mat(I)	TNDM HypoCT/ PLAGL1
ASPN	90.2928004128737	7.45986473809309	0,795167457640968
BGN	404.670002197899	276.945312621822	71.3365507740363
COL1A1	2377.20169251215	3486.16162535032	1014.19391838849
CTSK	33.8893928225357	178.644268948765	1750.68077833286
DCN	242.017268722126	443.868542995499	536.808945842598
FN1	2182.55843534611	1804.72058823747	918.642577355908
FSTL3	7.60376817732502	8.78565141543105	5.00015500692222
H19	0	2.01855446426772	0
HPRT1	17.0229877932326	14.1101781548479	12.3645677180849
IGF2	28.9326620410648	0,0859831122248099	0,373304665814646
IGF2R	22.3118415921691	15.3982290531315	33.9837141519672
IGFBP3	286.473097728862	1466.36173097861	588.033331281021
LUM	111.745308628099	137.945118071091	694.176407803041
MEST	17.6866308568861	0	32.3067942715071
MMP3	0,607924957495655	151.153210242322	77.0264416104925
NLRP1	4.02432077227118	4.27070655051589	4.69984775522953
NLRP10	3.54400532672587	1.14209591233024	0,312537568890255
S100A6	1675.55671816607	1457.51542591383	2093.70725447721
SPARC	742.347654794489	1386.66199612714	432.112398411674
TBP	5.23693966151834	5.09574989009056	5.2424840071805
TGFβ2	8.36634178105103	0,137744495086411	0,407547813668931
ZAC1/ PLAGL1	6.33434225113811	9.41316230736724	16.2167885333444

Tabelle 14: RPKM-Werte. Gelistet sind in alphabetischer Reihenfolge die RPKM-Werte für alle untersuchten Gene in den folgenden Zelllinien: BWS ΔH19/ICR1 mat; SRS UPD(7)mat(I) und TNDM HypoCT/PLAGL1.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt - , der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm und mir die Möglichkeit gab diese Dissertationsschrift abzulegen. Er stand mir stets mit seinem Rat und seiner Erfahrung zur Seite, auch über die Dissertation und das Studium hinaus.

Mein Dank gilt außerdem - , der mich in die Laborarbeit einführte, meine Fragen beantwortete und Zeit und Mühe in das Gelingen meiner Arbeit investierte. Danke für deine Führung und dein Feedback.

Ich danke außerdem - und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich bei meiner Arbeit im Labor unterstützt haben.

Ich bin dankbar dafür, diesen akademischen und persönlichen Fortschritt gemacht haben zu dürfen, und dabei die Menschen kennengelernt zu haben, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie, ohne deren jahrelange Unterstützung und Rückhalt, auch über die Zeit meines Studiums hinaus, ich diesen Weg nicht hätte gehen können. Danke an - für die Unterstützung und die schönen gemeinsamen Stunden in Mainz, die ich immer in Erinnerung behalten werde.

I would also like to thank - , who has shown me unconditional support throughout this time. He has been by my side as we ventured into parenthood and faced adversities together. Thank you for your boundless patience, your guidance and your faith.

„Denken und danken sind verwandte Wörter.“
Thomas Mann

10. Tabellarischer Lebenslauf

Tanja Stefanie Adkins, geb. Mey

Curriculum Vitae

Geburtsdatum 09.03.1993
Geburtsort Speyer
Familienstand verheiratet
Nationalität deutsch

Ausbildung

01/2020 **Erhalt der Approbation**
Landesamt für Soziales, Jugend und Versorgung, Rheinland-Pfalz

04/2012-12/2019 **Studium der Humanmedizin**
Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
mit Abschluss des dritten Staatsexamens (Gesamtnote 2,5)

09/2003-03/2011 **Gymnasialbildung**
Friedrich-Magnus-Schwerd-Gymnasium, Speyer
mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife (Abschlussnote 1,4)

Klinische Erfahrung

08/2019-10/2019 **Praktisches Jahr Pädiatrie**
Schwerpunkt allgemeine Pädiatrie
Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, St. Elisabeth, Mayen

07/2019-08/2019 **Praktisches Jahr Pädiatrie**
Schwerpunkt allgemeine Pädiatrie und Kinderchirurgie
Ostschweizer Kinderspital, St. Gallen, Schweiz

03/2019-06/2019 **Praktisches Jahr Chirurgie**
Schwerpunkt Allgemein- und Viszeralchirurgie
Universitätsklinikum, Hamburg

11/2018-03/2019 **Praktisches Jahr Innere Medizin**
Schwerpunkt Hämatologie/ Onkologie
Universitätsklinikum AKH, Wien, Österreich

08/2014-09/2018 **Nebentätigkeit Anästhesie**
Assistenz bei pädiatrischen Narkosen in der Kinderzahnheilkunde
Praxis Dr. med. Oliver Löwenstein, Mainz

09/2011-09/2015 **Nebentätigkeit Rettungssanitäterin**
Rettungswache Deutsches Rotes Kreuz, Speyer

Famulaturen und Praktika

2017	Famulatur Dermatologie Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie Universitätsklinikum der Ludwigs-Maximilian-Universität, München
2017	Famulatur Gynäkologie Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit Universitätsklinikum der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
2016	Famulatur Allgemeinmedizin Hausarztpraxis Dr. med. Johannes Bohlender, Harthausen
2014	Famulatur Orthopädie/ Unfallchirurgie Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie Dr. med. Thomas Möller, Speyer
2011	dreimonatiges Krankenpflegepraktikum Diakonissen-Stiftungs-Krankenhaus, Speyer

Auslandsaufenthalte

12/2015-03/2016	EF International Language School Honolulu, Hawaii, USA
09/2015-12/2015	EF International Language School Brisbane, Queensland, Australien
08/2008-06/2009	EF International Academy Tarrytown, New York, USA

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Französisch	Basiskenntnisse in Wort und Schrift
Latein	großes Latinum

zusätzliche Informationen

Interessen	Yoga, Literatur, Handarbeit, Reisen
------------	-------------------------------------