Kaiso und CTCF regulieren geprägte Gene in *cis* und in *trans*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

David Langer

geboren am 25.09. 1980 in Mainz

Mainz, Dezember 2012

Dekan: Univ.-Prof. Dr. xxxx yyyyyyyy

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. xxxx yyyyyyy

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. xxxxxx yyyyyyy

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2. 2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

2 Methoden und Material ... 24

2.1 Zellbiologische Methoden ... 24

2.1.1 Kultivierung von Zelllinien ... 24

2.1.2 Kryokonservierung von Zellkulturen ... 24

2.1.3 Anziehen von kryokonservierten Zellkulturen ... 24

2.2 RNA-/DNA-Standardmethoden ... 25

2.2.1 RNA-Isolation aus Zelllinien ... 25

2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung ... 25

2.2.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription ... 26

2.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und Schmelzpunktbestimmung ... 26

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese ... 28

2.3 Protein-Standardmethoden ... 28

2.3.1 Fraktionierte Proteinextraktion ... 28

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten ... 29

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 29

2.3.4 *Western blot* ... 29

2.3.5 Antikörperdetektion von Proteinen im *Western blot* ... 29

2.4 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) ... 30

2.4.1 Ablösen der Zellen und Fixierung des Chromatins ... 30

2.4.2 Zelllyse und Chromatinfragmentierung durch Ultraschall ... 31

2.4.3 Aufreinigung von fixiertem, mittels Ultraschall-fragmentiertem Chromatin ... 31

2.4.4 Bindung von Antikörper und magnetischen *beads* ... 31

2.4.5 Magnetische Immunpräzipitation und Waschschritte ... 32

2.4.6 Enzymatischer Verdau von Immunkomplexen ... 32

2.4.7 DNA-Aufreinigung aus Immunpräzipitaten ... 32

2.5 Einzelklon-Sequenzierung nach ChIP ... 33

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 33

2.5.2 Fällung der DNA aus PCR-Reaktionen ... 34

2.5.3 Ligation und Transformation ... 34

2.5.4 Animpfen von Einzelklon-Kulturen und Vektorrand-PCR ... 34

2.5.5 Aufreinigung von Vektor-DNA und Sequenzierung ... 35

2.6 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) ... 36
2.7 Transfektion humaner Zellkulturen ... 37
2.8 Material ... 38
2.8.1 Chemikalien ... 38
2.8.2 Lösungen und Puffer ... 39
2.8.3 Zellkultur-Bedarf ... 40
2.8.4 Zellkultur-Vollmedien ... 41
2.8.5 Zelllinien ... 41
2.8.6 Antikörper ... 41
2.8.7 Oligonukleotide ... 41
2.8.8 Molekulargewicht- und DNA-Längen-Standards ... 43
2.8.9 Enzyme, Modulatoren und Inhibitoren ... 43
2.8.10 Kits ... 44
2.8.11 Verbrauchsmaterialien ... 44
2.8.12 Geräte und Apparaturen ... 45
3 Ergebnisse ... 47
3.1 Proteinnachweis von CTCF und Kaiso in upd(11p15)mat-Zellen ... 48
3.2 Sequenzanalyse der humanen ICR1 ... 49
3.3 *In vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung durch EMSA ... 51
3.3.1 Funktionalität des EMSA-Protokolls und Kaiso-Bindungsnachweis an die KBS des *MMP7*-Promoters ... 51
3.3.2 Kaiso-Bindungsnachweis an die KBS in der ICR1 ... 53
3.4 Nachweis der CTCF-Bindung an die ICR1 und Funktionalität des ChIP-Protokolls ... 56
3.4.1 Fragmentierung des Chromatins ... 57
3.4.2 CTCF-Bindungsnachweis an die ICR1 ... 59
3.4.3 CTCF-Bindungscharakteristik in der ICR1 ... 61
3.5 Nachweis der Kaiso-Bindung an die ICR1 durch ChIP ... 62
3.5.1 Fragmentierung des Chromatins ... 63
3.5.2 Kaiso-Bindungsnachweis an die ICR1 ... 64
3.5.3 Kaiso-Bindungscharakteristik in der ICR1 ... 65
3.6 Vergleichende Expressionsanalysen von 11p15.5-Genen bei uniparentalen Chromosom 11-Disomien ... 66
3.7 Expressionsanalysen von 11p15.5-Genen bei *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* ... 69

3.7.1 Effizienz der *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* ... 70
3.7.2 Expressionsanalysen beim *CTCF-knockdown* ... 73
3.7.3 Expressionsanalysen beim *Kaiso-knockdown* ... 75
3.7.4 Expressionsanalysen bei Doppel-*knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* ... 77
3.8 Vergleichende Expressionsanalysen von geprägten Genen anderer Chromosomen bei uniparentalen Disomien ... 79
3.9 Expressionsanalysen von geprägten Genen auf anderen Chromosomen bei *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* ... 81
3.9.1 Expressionsanalysen beim *CTCF-knockdown* ... 81
3.9.2 Expressionsanalysen beim *Kaiso-knockdown* ... 82
3.9.3 Expressionsanalysen bei Doppel-*knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* ... 83
4 Diskussion ... 85
4.1 ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso ... 87
4.1.1 Charakterisierung des Proteinstatus von CTCF und Kaiso bei der upd(11p15)mat-Zelllinie… ... 87
4.1.2 ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso ... 88
4.1.3 *Repeat*-Charakteristik der Proteinbindung an die ICR1 ... 94
4.2 Effekte der ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso ... 101
4.3 Bedeutung der CTCF-ICR1-Bindung für geprägte Gene der chromosomalen Region 11p15.5.. ... 106
4.4 Bedeutung von Kaiso-ICR1-Bindung und Kaiso-CTCF-Interaktionen für geprägte Gene in 11p15.5 ... 108
4.5 Bedeutung der ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso für die Expression geprägter Gene auf anderen Chromosomen ... 111
4.6 Ausblick ... 121
5 Zusammenfassung ... 124
6 Literaturverzeichnis ... 125
7 Anhang ... 143
7.1 Datenanhang ... 143
7.2 Publikationen ... 147

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1 Die chromosomale Region 11p15.5 5
Abbildung 1-2 *Enhancer blocking*-Modell zur Regulation der Genexpression im IC1 10
Abbildung 1-3 Chromatin-*Loop*-Modelle zur Regulation der Genexpression im IC1 12
Abbildung 1-4 ICR1 mit Proteinbindestellen 16
Abbildung 1-5 Häufige BWS- und SRS-assoziierte 11p15.5 -Defekte 20
Abbildung 2-1: Übersicht zu Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) und *Repeat*-Fragmentierung 33
Abbildung 3-1: Proteinnachweis von CTCF und Kaiso in der upd(11p15)mat-Zelllinie 48
Abbildung 3-2 Humane ICR1-Sequenz mit Proteinbindestellen 50
Abbildung 3-3: *In vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung an die *MMP7*-KBS 53
Abbildung 3-4: *In vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung an die repetitive ICR1-KBS 55
Abbildung 3-5: *In vitro*-Analyse der Kaiso-Bindung an die B4-KBS der ICR1 56
Abbildung 3-6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Ultraschall-fragmentiertem Chromatin 58
Abbildung 3-7 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit CTCF-Antikörper und verschiedenen Inkubationsbedingungen 61
Abbildung 3-8 Bindungsverteilung von CTCF in der ICR1 62
Abbildung 3-9 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit Kaiso-Antikörper 64
Abbildung 3-10 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit Kaiso-Antikörper 65
Abbildung 3-11 Bindungsverteilung von Kaiso in der ICR1 66
Abbildung 3-12 Genexpression im IC1 bei uniparentalen Disomie-Fällen 68
Abbildung 3-13 Genexpression im IC2 bei uniparentalen Disomie-Fällen 69
Abbildung 3-14 *CTCF*-Expression bei *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* 71
Abbildung 3-15 *Kaiso*-Expression bei *knockdowns* von *Kaiso* und *CTCF* 72
Abbildung 3-16: *CTCF*- und *Kaiso*-Expression bei Doppel-*knockdowns* 73
Abbildung 3-17 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die IC1-Genexpression 74
Abbildung 3-18 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die IC2-Genexpression 75
Abbildung 3-19 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die IC1-Genexpression 76
Abbildung 3-20 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die IC2-Genexpression 76
Abbildung 3-21 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die IC1-Genexpression 78
Abbildung 3-22 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die IC2-Genexpression 79
Abbildung 3-23 Expressionsanalysen von geprägten Genen auf anderen Chromosomen bei uniparentalen Disomien 81
Abbildung 3-24 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die *MEST*-Expression 82

Abbildung 3-25 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die Genexpression von *GRB10*, *PLAGL1* und *PEG3* 83
Abbildung 3-26 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die Expression von *MEST* und *PLAGL1* 84
Abbildung 4-1 Fragestellungen des Dissertationsprojekts 86
Abbildung 4-2 Vergleich der EMSA-KBS-Nukleotide 90
Abbildung 4-3 Vergleich von Ultraschall-fragmentiertem Chromatin 96
Abbildung 4-4 Proteinbindestellen und Primer zur ChIP-Analyse der ICR1 99
Abbildung 4-5 Lage der siRNAs bei *Kaiso-knockdown*-Experimenten 102
Abbildung 4-6 Chromatin-Schleifenmodell zu proteinbasierten *trans*-ICR1-Effekten 115
Abbildung 4-7 Chromosomenübergreifende Effekte der CTCF- und Kaiso-Bindung an die unmethylierte ICR1 und Wechselwirkungen zwischen geprägten Genen auf transkriptioneller Ebene 120

Tabelle 3-1: Analyse der enzymatischen ICR1-Fragmentierung bei CTCF-ChIP-Experimenten 59
Tabelle 3-2: Analyse der enzymatischen ICR1-Fragmentierung bei Kaiso-ChIP 63

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
´	Minute
´´	Sekunde
α	anti-
AK	Antikörper
c	zenti-
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CTS	CTCF *target site* (CTCF-Bindestelle)
ds	doppelsträngig, Doppelstrang
EMSA	*Electrophoretic Mobility Shift Assay*
g	Beschleunigungsmaß bei der Zentrifugation oder Gramm
IgG	Antikörperklasse G
IP	Immunpräzipitation
KBS	Kaiso *binding site* (Konsensussequenz die unmethyliert gebunden wird)
l	Liter
M	Mol
m	Meter oder milli-
miRNA	mikro RNA
mol	molar
mRNA	*messenger* RNA
MW	Mittelwert
n	nano-
nc	*non-coding* (nicht kodierend)
NK	Negativkontrolle
n	Probenanzahl
p	pico-
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (*standard-error of the mean*)
siRNA	*short interfering* RNA
U	Unit
µ	mikro-
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region

1 Einleitung

Die Genetik befasst sich mit der Erforschung der Gene als, durch ihre Sequenz charakterisierte, Grundbausteine der Erbinformation. Damit steht sie als klassische Vererbungslehre im Kontrast zur Epigenetik. Dieser von Conrad Hal Waddington geprägte Begriff (Waddington, 1957) definiert die wissenschaftliche Disziplin, die sich mit vererbbaren Änderungen der Genaktivität beschäftigt, die nicht die Basenabfolge, sondern Modifikationen der DNA betreffen. Epigenetische Regulation findet vor allem durch zwei Hauptmodifikationen statt: die Methylierung von DNA und die Modifikation von Histonproteinen. Darüber hinaus besitzen micro-RNAs, die nukleäre Architektur und die Struktur des Chromatins eine zentrale Bedeutung bei der epigenetischen Regulation (Uribe-Lewis *et al*., 2011). Alle Faktoren gemeinsam sind für die individuelle Ausbildung der Epigenome einzelner Zellen eines Organismus verantwortlich. Die Epigenetik trägt daher dazu bei, zu erklären, warum Zellen mit identischer DNA zu verschiedenen Zelltypen differenzieren, unterschiedlichste Funktionen erfüllen und wie sich dieser Status manifestiert.

Epigenetische Modifikationen

Seit langem ist bekannt, dass die Methylierung der DNA eine vererbbare Modifikation mit Auswirkung auf die Genexpression ist (Holliday und Pugh, 1975). Bei Säugetieren findet die Modifikation fast ausschließlich im CpG-Kontext statt, wenn also auf Cytosin direkt ein Guanin folgt. CpG-Motive liegen oft gehäuft als CpG-Inseln in Zentromer-*Repeats* oder in Promoter-Bereichen von Genen (Bernstein *et al*., 2007; Fatemi *et al*., 2005; Gardiner-Garden, 1987). Die Addition einer Methylgruppe erfolgt an die 5´-Position des Pyrimidin-Rings von Cytosin und findet enzymatisch durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) statt. DNMTs werden in die Klassen 1-3 aufgeteilt und sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten funktionell wirksam. DNMT1 spielt gemeinsam mit dem regulatorischen Faktor UHRF1 (*ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1*) eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung von CpG-Dinukleotiden hemimethylierter DNA im Anschluss an die Replikation (Ooi und Bestor, 2007). Der Verlust von DNMT1 oder UHRF1 geht mit genomweiter Demethylierung und embryonaler Letalität einher (Bostick *et al*., 2007; Li *et al*., 1992). Während DNMT1 somit die stabile Weitergabe des DNA-Methylierungsstatus in somatischen Zellen garantiert, sind DNMT3a und DNMT3b für die *de novo*-Methylierung der DNA nach der genomweiten Demethylierung in primordialen Keimzellen zuständig, die dem Geschlecht des Embryos entsprechend im Laufe der Gametogenese erfolgt (Bird, 2002). Über eine Methyltransferase-Aktivität von DNMT2 bei DNA und auch RNA wird aktuell diskutiert (zusammenfassend: Schaefer und Lyko, 2010). In der Maus konnten keine Hinweise auf eine essentielle, entwicklungsrelevante Funktion des *DNMT2*-Gens gefunden werden (Goll *et al*., 2006; Okano *et al*., 1998). Eine weitere DNMT-Komponente, DNMT3L, weist keine katalytische Aktivität auf, besitzt aber regulatorische Wirkung auf die beiden DNMT3-Varianten a und b (Ooi *et al*., 2007).

Der DNA-Methylierungsstatus steht in engem Zusammenhang mit der Struktur des Chromatins. Euchromatin mit transkriptionell aktiven Genen weist tendenziell eher hypomethylierte Bereiche auf,

wohingegen der kondensierte Status von Heterochromatin mit verstärkter Methylierung einhergeht. Die Methylierung von Promoterregionen wirkt sich i.d.R negativ auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren aus.

Während in normalen Zellen die DNA-Methylierung an Prozessen wie dem genomischen *Imprinting* oder der Dosiskompensation des X-Chromosoms beteiligt ist, spielt aberrante Methylierung bei Krebszellen eine bedeutsame Rolle. Genomweite Hypomethylierung gilt als typisches Frühereignis der Tumorgenese (Karpf und Matsui, 2005; Widschwendter *et al*., 2004), darauf folgt häufig die lokale Hypermethylierung von Promoterbereichen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgenen führt (Jones und Baylin, 2002).

Die zweite epigenetische Hauptmodifikation betrifft nicht die DNA direkt, sondern Strukturproteine, die maßgeblich am Aufbau von Chromatin beteiligt sind. Eukaryotisches Chromatin liegt organisiert in Form von Nukleosomen vor, die aus 146 bp DNA und einem Oktamer aus Histonproteinen gebildet werden. Ein Histon-Oktamer in einer somatischen Zelle besteht aus je zwei Kern-Histonen der Klassen H2A, H2B, H3 und H4. Die C-terminalen Bereiche der verschiedenen Histonproteine sind untereinander relativ ähnlich, wohingegen die N-Termini deutliche Unterschiede aufweisen und besonders reich an Lysin- und Arginin-Bausteinen sind. Histon-Modifikationen treten vor allem an diesen Seitenketten und mehrheitlich N-terminal auf (Cosgrove *et al*., 2007). Es sind etwa 60 modifizierbare Positionen bekannt, an denen eine Vielzahl verschiedener Modifikationsmöglichkeiten (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung u.v.m.) enzymatisch gesetzt und ebenfalls durch Enzyme teilweise reversibel wieder entfernt werden können (zusammenfassend: Kouzarides, 2007; Ruthenburg *et al*., 2007). Zusätzlich zur großen Anzahl unterschiedlicher Modifikationen wird die Variabilität dieser Modifikation vergrößert, da an Lysine ein bis drei und an Arginine ein oder zwei Methylgruppen angehängt werden können. Eine Vielzahl an Effekten von Histon-Modifikationen ist besonders für Acetylierungen und Methylierungen bereits bekannt. Es wurde über Auswirkungen auf die Transkription (ENCODE, 2007; Koch *et al*., 2007), Rekombination (Krivtsov *et al*., 2008), DNA-Reparatur und Replikation (ENCODE, 2007; Groth *et al*., 2007) und auf die chromosomale Organisation (Jenuwein und Allis, 2001; Ruthenburg *et al*., 2007; Routh *et al*., 2008) berichtet. Die beste Datenlage besteht zur Histon-Acetylierung, die in der Regel mit aktivem Chromatinstatus einhergeht, und zur Methylierung von Histonproteinen, die je nach Position und Anzahl der Methylgruppen unterschiedliche Chromatinstatus zur Folge hat (zusammenfassend: Delcuve *et al*., 2009).

Eine Vielzahl an Studien belegen die gegenseitige Beeinflussung von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen (zusammenfassend: Kondo *et al*., 2009; Cedar und Bergmann, 2009). Eine Verbindung der beiden epigenetischen Modifikationen ist durch Proteine gegeben, die an methylierte Promotoren binden (u.a. MeCP2 und Kaiso) und Proteinkomplexe rekrutieren, die Histon-Deacetylasen und -Methyltransferasen enthalten (Bird, 2002; Hendrich und Bird, 1998). Ein weiterer Beleg für die Auswirkung von DNA-Methylierung auf Histon-Modifikationen sind Studien, die beweisen, dass durch sie die Methylierung von H3K4 inhibiert wird (Okitsu und Hsieh, 2007; Weber *et al*., 2007). Andere

Daten zeigen dahingegen eine konträre Beeinflussung, so konnte in Pilzen die Auswirkung von Mutationen Histon-modifizierender Enzyme auf die DNA-Methylierung gezeigt werden (Tamaru und Selker, 2001). Mehrere Arbeitsgruppen lieferten Belege dafür, dass genau genommen nicht die Modifikation von Histonen, sondern die Bindung eines Histon-modifizierenden Faktors Auswirkung auf die Methylierung der DNA besitzt (Dong *et al*., 2008; Tachibana *et al*., 2008). Aufgrund einer Vielzahl an gegensätzlichen Erkenntnissen scheint es gegenwärtig schwer, Gesetzmäßigkeiten für die Interaktion und mögliche Hierarchien der beiden epigenetischen Modifikationen festzulegen. Man geht zurzeit allerdings eher von einer sekundären Rolle der DNA-Methylierung aus (Kondo *et al*., 2009). Diese These wird beispielsweise durch Daten gestützt, die eine protektive Rolle der H3K4-Methylierung vor *de novo* DNA-Methylierung belegen, indem Transkriptionsfaktoren wie CTCF rekrutiert werden, die in Folge DNMT3a und 3b blockieren und dadurch positive Auswirkung auf die Transkription haben (Fan *et al*., 2008).

Genomisches *Imprinting*

DNA-Methylierung und Modifikationen von Histonproteinen beeinflussen in höheren Eukaryoten die Genregulation und die Struktur des Chromatins und haben Auswirkung auf Phänomene wie die X-chromosomale Dosiskompensation, Tumorgenese, komplexe Krankheiten und auch das genomische *Imprinting*. Beim genomischen *Imprinting*, auch als parentale oder genomische Prägung bezeichnet, handelt es sich um einen Prozess, der auf keimbahnspezifischen, also elternabhängigen Markierungen bestimmter Chromosomenregionen basiert (Reik und Walter, 2001). Deren Resultat ist eine elternabhängige allelspezifische Genexpression, so dass geprägte Gene also entweder vom maternalen oder vom paternalen Allel exprimiert werden (Moore und Haig, 1991). Das sogenannte *Reprogramming* sorgt dafür, dass bei der Gametogenese in den primordialen Keimzellen des entwickelnden Embryos ein Löschen der parentalen Prägung stattfindet und diese später, dem Geschlecht entsprechend, neu gesetzt wird (Reik und Walter, 2001). Im Verlauf der somatischen Zellteilungen der postzygotischen Entwicklung wird das *Imprinting* stabil weitergegeben. Die mitotische Stabilität der epigenetischen Markierungen gewährleistet, dass diese im Verlauf von Wachstum und Entwicklung eines Organismus erhalten bleiben. Dass der *Imprinting*-Status nicht immer strikten Gesetzmäßigkeiten unterliegt, zeigt eine Vielzahl an Studien. So findet man bei einigen, dem genomischen *Imprinting* unterliegenden Genen, für das inaktive Allel statt völliger Stilllegung eine Restaktivität der Genexpression und häufig eine Beschränkung der genomischen Prägung auf bestimmte Gewebe, Entwicklungsabschnitte oder Individuen (zusammenfassend: Dolinoy und Jirtle, 2008). Auch aus diesen Gründen ist eine Bestimmung der Anzahl geprägter Gene kompliziert. Aktuell sind etwa 70 Gene beim Menschen bekannt (www: http://igc.otago.ac.nz/table.html), verschiedene Autoren schätzen jedoch eine Gesamtzahl von bis zu 1000 dem genomischen *Imprinting* unterliegenden Genen (Horsthemke, 2010; Jirtle und Weidman, 2007).

Funktionell gesehen ist ein geprägtes Gen mit nur einem aktiven Allel haploid. Das Vorliegen eines diploiden Chromosomensatzes bringt jedoch eindeutig Vorteile mit sich: Defekte durch Mutationen auf

einem Chromosom lassen sich durch eine korrekte Kopie auf dem anderen meist ausgleichen. Aus diesem Grund erscheint die Existenz des genomischen *Imprintings*, mit dem resultierenden inaktiven Status einer Genkopie, aus evolutionärer Sicht zunächst sinnwidrig. Trotz der augenscheinlich erhöhten genetischen Angreifbarkeit geprägter Gene durch Mutationen und zusätzlich durch Veränderungen auf epigenetischer Ebene findet man genomisches *Imprinting* bei allen bis dato erforschten Säugetieren (Smits *et al*., 2008). Durch Versuche mit gyno- und androgenetischen Mausembryonen konnte bewiesen werden, dass die elterliche Herkunft eines Gens wichtig für dessen korrekte Funktion ist und für die embryonale Entwicklung Chromosomensätze beider Elternteile essentiell sind (McGrath und Solter, 1984). Inaktivierungsexperimente mit murinen Genen zeigten für maternal exprimierte Gene einen negativen Einfluss auf das Wachstum, wohingegen paternal exprimierte Gene sich darauf positiv auswirkten (Wood und Oakey, 2006; Tilghman *et al*., 1999). Diese unterschiedlichen Auswirkungen auf das embryonale Wachstum werden von der Konflikt-Hypothese als der am weitesten verbreitete Theorie zur evolutionären Ursache der Entstehung des genomischen *Imprintings* aufgegriffen (zusammenfassend: Wilkins und Haig, 2003). Während der Einfluss paternaler Gene auf maximalste evolutionäre Fitness des Nachwuchses v.a. durch starkes Wachstum abzielt, spielt beim Einfluss maternaler Gene vor allem die Schonung mütterlicher Ressourcen bei der Reproduktion eine Rolle. Evolutionärer Erfolg des Vaters ist, laut dem Modell, durch durchsetzungsfähigen Nachwuchs gegeben, wohingegen die Mutter aus evolutionärer Sicht durch viele Nachkommen erfolgreich ist.

Wenige einzeln im Genom vorliegende geprägte Gene (Choi *et al*., 2005; Smith *et al*., 2003) bilden die Ausnahme von der Regel, dass sie meist in Clustern zu finden sind (Edwards und Ferguson-Smith, 2007). Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass die primäre Kontrolle der Prägung nicht auf Einzelgene beschränkt ist, sondern auf der Ebene chromosomaler Domänen stattfindet. Die Cluster geprägter Gene besitzen i.d.R. mindestens ein Gen für eine nicht proteinkodierende RNA (*non coding*, ncRNA) und werden durch ein von *cis*-agierendes Element, die *Imprinting control region* (ICR), kontrolliert. Epigenetische Markierungen bewirken wiederum die Allelspezifität der Kontrollregionen, die meist in einer monoallelischen Bindung regulierender Proteine resultiert. Ein überwiegender Anteil der Cluster geprägter Gene zeichnet sich durch maternal vererbte Methylierung aus (Edwards und Ferguson-Smith, 2007; www: http://igc.otago.ac.nz/1101Summary-table.pdf).

Die chromosomale Region 11p15.5

In der humanen chromosomalen Region 11p15.5 findet sich ein distales und ein proximales *Imprinting*-Cluster (IC1 und IC2) mit paternal respektive maternal methylierter Kontrollregion (Abbildung 1-1). Das zentromernahe IC2 beinhaltet die geprägten Gene *SLC22A1L*, *SLC22A1LS, KCNQ1DN*, *KCNQ1, CDKN1C* und *KCNQ1OT1* und *IPL*.

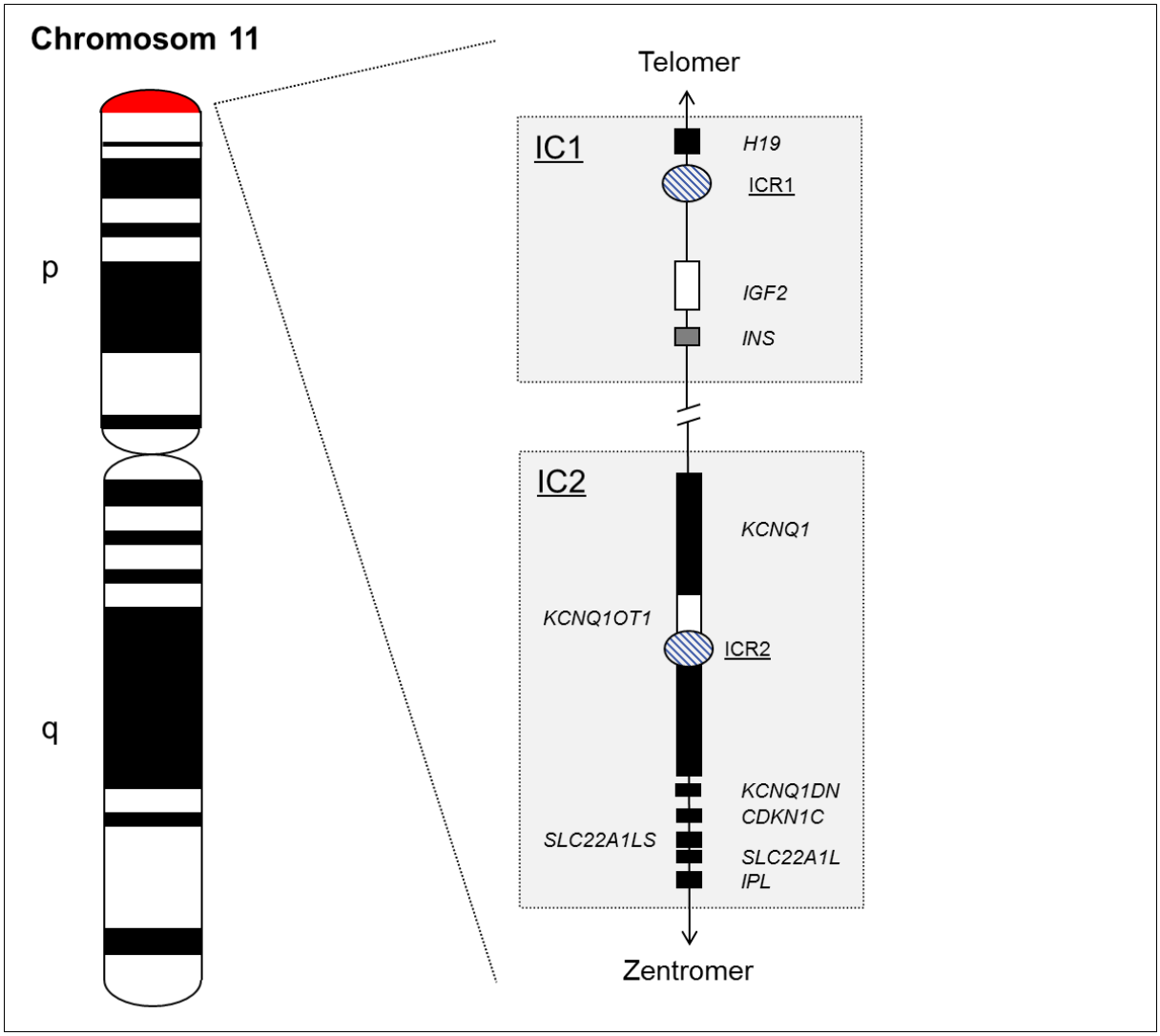


Abbildung 1-1 Die chromosomale Region 11p15.5

Die chromosomale Region 11p15.5 enthält zwei Cluster geprägter Gene, deren Regulation durch *Imprinting*-Kontrollregionen (ICRs) stattfindet. Maternal geprägte Gene sind schwarz, paternal geprägte Gene weiß unterlegt.

CDKN1C ist als maternal exprimiertes Protein essentiell für die normale Entwicklung. *Cdkn1c-knockouts* in der Maus sind letal, der Ausfall kann nicht durch andere Zellzyklus-Inhibitoren kompensiert werden (Joseph *et al*., 2003; Yan *et al*., 1997; Zhang *et al*., 1997). Das Protein ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung, Apoptose und Tumorgenese beteiligt (zusammenfassend: Kavanagh und Joseph, 2011). Das *KCNQ1*-Gen kodiert für strukturelle Bestandteile eines spannungsgesteuerten Kalium-Kanals, die eine Kanal-Untereinheit bilden (Roepke *et al*., 2009; Wang *et al*., 1996), und wird ebenfalls maternal exprimiert. *KCNQ1OT1* (alternativ: *LIT1*) konnte als paternal exprimiertes Transkript, das in *antisense*-Orientierung im Exon 10 des *KCNQ1*-Gens liegt, in vielen humanen Zellen gefunden werden (Mitsuya *et al*., 1999; Lee *et al*., 1999). Dabei konnte auch die differentielle Methylierung einer CpG-Insel auf dem maternalen Allel im nahen intronischen Bereich von *KCNQ1* gefunden werden, der als Promoterregion des nicht-kodierenden Transkripts gilt. Dass es sich bei der Region um eine *Imprinting*-Kontrollregion des IC2

handelt, konnte von mehreren Gruppen bestätigt werden (Horike *et al*., 2000; Lee *et al*., 1999; Smilinich *et al*., 1999). In diesem Zusammenhang wurde die Bindung des, auch in anderen ICRs relevanten Faktors CTCF gezeigt (Fitzpatrick *et al*., 2007). Eine reprimierende Wirkung der *Kcnq1ot1*-RNA auf *Cdkn1c*, *Kcnq1* und andere IC2-Gene konnte für die Maus demonstriert werden (zusammenfassend: Kanduri, 2011). Die Wirkung der RNA basiert dabei auf ihrer Interaktion mit verschiedenen Histon-Methyltransferasen und dem Chromatin, über den genauen Mechanismus herrscht noch Unklarheit (Mohammad *et al*., 2008; Pandey *et al*., 2008).

Das telomerwärts gelegene IC1 enthält neben dem Proinsulin-Gen das maternal exprimierte *H19* und das paternal exprimierte *IGF2* (Abbildung 1-1). Das *IGF2*-Gen besitzt neun Exons, aus denen durch die variable Nutzung von fünf Promotoren verschiedene Transkripte generiert werden können, die sich in ihren 5´-UTRs (untranslatierte Regionen) unterscheiden. Die gemeinsame kodierende Region aller Transkripte umfasst die Exons 7-9 (Monk *et al*., 2006). Bereits frühe Studien belegen Unterschiede zwischen einzelnen Transkripten bezüglich deren Translatierbarkeit und Stabilität (Nielsen und Christiansen, 1992 und 1995; Holthuizen *et al*., 1993). Die Promotoren P2, P3, P4 und P0 sind ausschließlich in fetalen Geweben aktiv, P1 wird dahingegen als der einzige Promoter beschrieben, der in adultem Gewebe (leberspezifisch) aktiv ist (Monk *et al*., 2006; Holthuizen *et al*., 1993; Sussenbach *et al*., 1993). Die Regulation der *IGF2*-Expression gestaltet sich durch die geschilderte variable Promoternutzung sowie gewebs- und stadienspezifische Expressionsunterschiede kompliziert. Zusätzlich wird die Proteinwirkung noch durch ein komplexes System von IGF-bindenden Proteinen (IGFBPs) und verschiedenen Rezeptoren (IGF-Rs) gesteuert (zusammenfassend: Chao und Amore, 2008). Diese Fakten zur Regulation von *IGF2* verdeutlichen, wie wichtig eine korrekte Dosis des Gens für den Organismus ist. Dementsprechend belegen eine Vielzahl von Studien den kausalen Zusammenhang von fehlerhafter *IGF2*-Regulation und der Entstehung von Krebs (zusammenfassend: Chao und Amore, 2008) sowie allgemein mit gestörtem Wachstum und speziell mit Fehlwachstum-assoziierten Syndromen.

Das *H19*-Gen wird im Verlauf der embryonalen Entwicklung stark exprimiert, mit Ausnahme von Herz- und Skelettmuskel findet man jedoch postnatal eine starke Herunterregulation (zusammenfassend: Gabory *et al*., 2010). Erste funktionelle Studien berichteten von einer *H19*-RNA, die nicht für ein Protein kodiert (ncRNA) (Brannan *et al*., 1990). Über eine Aufgabe bei der Muskelzell-Differenzierung wurde bereits früh spekuliert (Poirier *et al*., 1991). Die Beschreibung von *H19* als Onkogen (Rachmilewitz *et al*., 1995) steht im Kontrast zu *H19*-Transfektions-Experimenten, die die reprimierende Wirkung des Gens auf Zellproliferation und Tumorgenese beschrieben und es folglich als Tumorsuppressorgen (TSG) einklassifizierten (Hao *et al*., 1993). Cai und Cullen beschrieben die ncRNA als Vorläufer für eine mikro-RNA (miRNA), die sie miR-675 nannten (Cai und Cullen, 2007). miRNAs bestehen aus 19-25 Nukleotiden und besitzen nach der Prozessierung zu reifen miRNAs unter anderem funktionelle Bedeutung für die Expressionsregulation verschiedener Gene (Zhang *et al*., 2007; Garzon *et al*., 2006; Jovanovic *et al*., 2006). Kürzlich veröffentlichte Daten belegen die onkofetale Funktion von miR-675 beim Menschen (Tsang *et al*., 2010). Berteaux und Kollegen

berichteten von einer neuen transkriptionellen Aktivität des *H19*-Gens, die zu einem bei Mensch und Maus überwiegend maternal exprimierten 120 kb-Transkripts führt, das in *antisense*-Orientierung zum bisherigen *H19*-Produkt steht (Berteaux *et al*., 2008). Die nukleäre RNA trägt den Namen *91H*, besitzt onkogenes Potential und hat beim Menschen Auswirkung auf die Expression von *IGF2* (Berteaux *et al*., 2008). Eine aktuelle Publikation berichtet von einer ersten proteinkodierenden RNA, die ebenfalls in *antisense*-Orientierung zum ursprünglich beschriebenen Transkript steht, auch ausschließlich maternal exprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist (Onyango und Feinberg, 2011). Die Autoren beschrieben eine tumorrelevante Funktion des HOTS (*H19 opposite tumor suppressor*) genannten Proteins im Zusammenspiel mit dem ERH-Protein (*Enhancer of rudimentary homolog*), das für seine vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen bekannt ist (Coverley *et al*., 2005; Richardson *et al*., 2004). Verschiedene Publikationen gehen auf eine murine *trans*-Regulator-Funktion von *H19* ein, die Auswirkung auf die Expression eines Netzwerks geprägter Gene besitzt (zusammenfassend: Gabory *et al*., 2010). Auf diesen Aspekt wird im letzten Teil dieser Einleitung genauer eingegangen.

H19 wird exklusiv maternal, *IGF2* ausschließlich paternal exprimiert. Für die korrekte, reziproke Expression der beiden Gene ist die dazwischen gelegene Kontrollregion ICR1 (*Imprinting control region* 1) wichtig. Sie besitzt einen repetitiven Aufbau aus B- (400 bp) und A-*Repeats* (450 bp) und ist durch etwa 730 bp nichtrepetitiven Bereich in zwei Hälften mit je einem A- und 3-4 B-*Repeats* geteilt (Abbildung 1-4). Die A-*Repeats* enthalten jeweils drei Sequenzmotive, die eine Bindung von OCT4 ermöglichen (Demars *et al*., 2010). In Mausversuchen konnte für die orthologe Struktur, mit murin je zwei OCT-Motiven pro A-*Repeat*, eine Bedeutung auf die Erhaltung des unmethylierten ICR1-Status belegt werden (Hori *et al*., 2002). Kürzlich erschienene Publikation zeigen, dass dieser Mechanismus auch beim Menschen zu finden ist und OCT-Bindestellen an der *Imprinting*-Regulation durch die ICR1 beteiligt sind (Poole *et al*., 2011; Demars *et al*., 2010). Zusätzlich postulieren Demars und Kollegen eine gestörte *Imprinting*-Regulation beim Wegfall einer Bindestelle für den Transkriptionsfaktor SOX2 (Demars *et al*., 2010). In ähnlicher Weise, wie für OCT4 gezeigt, wurde deshalb auch eine mögliche Rolle bei der ICR1-basierten Regulation durch SOX2 vermutet. Der Großteil aller Erkenntnisse zur Genexpressions-Regulation im IC1 bezieht sich jedoch auf die ICR1-Bindung des Zinkfingerproteins CTCF.

Das Zinkfingerprotein CTCF

Seit der erstmaligen Beschreibung von CTCF im Jahr 1990 (Lobanenkov *et al*., 1990) hat sich die Zahl der Erkenntnisse zu verschiedensten Aspekten der Funktion von CTCF vor allem in den letzten Jahren rasant erhöht. Zusammenfassende Publikationen geizen auch nicht mit wertschätzenden Titulierungen des „wahrlich bemerkenswerten Faktors“ (Ohlsson *et al*., 2010). Die Struktur der elf Zinkfinger von CTCF ist beim Interspeziesvergleich zwischen Huhn, Maus und Mensch hochgradig konserviert. Geringfügige Unterschiede weisen dabei die C- und N-Termini der orthologen Proteine auf (Ohlsson *et al*., 2001). Verschiedene Depletions-Studien demonstrieren den hohen Stellenwert des Proteins in verschiedenen Organismen: Homozygote *CTCF-knockouts* bei Mäusen gehen mit

frühembryonaler Letalität einher (Splinter *et al*., 2006), maternale Depletion von *CTCF* in murinen Oocyten verhindert deren normale Entwicklung (Fedoriw *et al*., 2004). Die essentielle Bedeutung des Proteins für den menschlichen Organismus konnte durch Zellkultur-Experimente mit RNAi-basierter Herunterregulation und ektopischer *CTCF*-Überexpression belegt werden, die zu Veränderungen von Proliferation und Differenzierung führten (Torrano *et al*., 2005). Dem scheinbar hohen Stellenwert von CTCF entsprechend findet man im adulten Organismus eine ubiquitäre *CTCF*-Expression auf hohem Niveau, bei der Zelltyp-spezifische Unterschiede bestehen (Phillips und Corces, 2009).

Verschiedene Studien haben sich in Vergangenheit mit der Frage beschäftigt, ob die CTCF-Bindung eine epigenetisch relevante Markierung ist. Voraussetzung hierfür wäre, dass der mögliche Informationsgehalt mitotisch stabil ist. Das muss nicht zwangsläufig durch den Erhalt der Proteinbindung geschehen, sondern kann auch durch die Konservierung relevanter epigenetischer Modifikationen stattfinden. Diesbezüglich konnte für CTCF eine stabilisierende Funktion für die Aufrechterhaltung differentieller Methylierung gezeigt werden, indem dessen Bindung protektiv bei *de novo*-Methylierung wirkt (Schönherr *et al*., 2003). Verschiedene Quellen belegen, dass die Bindung von CTCF mitotisch stabil ist (Rubio *et al*., 2008; Burke *et al*., 2005), stehen damit allerdings im Widerspruch zu den Daten von Wendt und Kollegen, die wenig bis kein CTCF während der Mitose und eine erneute Bindung in der Telophase finden (Wendt *et al*., 2008).

Modifizierte ChIP-Experimente mit verschiedenen murinen und humanen Zellen ergaben unterschiedlich große Zahlen an potentiellen genomweiten CTCF-Bindestellen (zusammenfassend: Phillips und Corces, 2009). In diesem Zusammenhang wurden verschiedene 11-15 bp lange Konsensus-Sequenzen beschrieben (zusammenfassend: Philips und Corces, 2009). Kim und Kollegen fanden bei ChIP-chip-Experimenten mit humanen Fibroblasten etwa 14.000 CTCF-Bindestellen, die zu einem Großteil ein 20 bp-Motiv aufweisen (Kim *et al*., 2007). Die Kernsequenz dieses Motivs ist dem Konsensus sehr ähnlich, der von Bell und Felsenfeld für die humane ICR1 in 11p15.5 beschrieben wurde (Bell und Felsenfeld, 2000).

Die Konsensus-Sequenzen, die im unmethylierten Zustand durch CTCF gebunden werden können und als CTS (CTCF *target sites*) bezeichnet werden, finden sich in allen vollständigen B-*Repeats* (Abbildung 1-4). Ein differenziell methylierter Status mit Methylierung des paternalen Allels konnte in Vergangenheit für alle *Repeats* außer B2 und B4 gezeigt werden (Sparago *et al*., 2004; Cui *et al*., 2001 und 2002; Takai *et al*., 2001; Frevel *et al*., 1999). Die differentielle Methylierung der CTS stellt die Grundlage für eine Wirkung von CTCF bei der *Imprinting*-Regulation im IC1 dar.

CTCF-basierte Modelle zur Genexpressions-Regulation durch die ICR1

Erste funktionelle Untersuchungen von CTCF bei Vertebraten fanden in Zusammenhang mit dem Onkogen *MYC* statt und belegen, dass eine Bindung von CTCF in der vermutlichen Promoterregion bei Test-Konstrukten mit transkriptioneller Repression einhergeht (Filippova *et al*., 1996). Bereits kurze Zeit später konnte jedoch belegt werden, dass die Wirkung von CTCF vielschichtiger ist und seine Bedeutung auch transkriptionell aktivieren kann (Vostrov und Quitschke, 1997). Neben dieser Wirkung

als klassischer Transkriptionsfaktor wurde darauffolgend vor allem eine Funktion bei der Insulation beschrieben. Insulation bezeichnet den Prozess, bei dem bestimmte DNA-Sequenzelemente durch Bindung von Proteinen entweder dazu führen, dass Barrieren ausgebildet werden, die einen offenen Chromatinstatus garantieren, oder eine Blockade entsteht, die den Zugang von *Enhancern* zu Promotoren verhindert (*Enhancer blocking*) (West *et al*., 2002). Bell und Mitarbeiter fanden ein 42 bp-Fragment im 5´-ß-Globin-Insulator des Huhns, das als CTCF-Bindestelle fungiert und für die *Enhancer blocking*-Aktivität in humanen Zellen ausreichend und notwendig ist (Bell *et al*., 1999). Die Autoren vermuteten, dass diese Rolle beim *Enhancer blocking* einem konservierten Mechanismus entspricht, und belegten kurz darauf in Einklang mit einer anderen Arbeitsgruppe die gleiche Wirkweise in der als Insulatorregion bekannten *Imprinting*-Kontrollregion des distalen *Imprinting*-Clusters (ICR1) auf Chromosom 11p15.5 (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark *et al*., 2000). Das auf den Daten basierende *Enhancer blocking*-Modell stellt die Zusammenhänge zwischen der Bindung von CTCF, der allelspezifischen ICR1-Methylierung und der reziproken Expression der angrenzenden Gene *Igf2* und *H19* dar (Abbildung 1-2). Eine Bindung von CTCF kommt nur an unmethylierten ICR1-Bindestellen zustande, dadurch wird auf dem maternalen Allel die Interaktion von *Igf2*-Promotoren und von beiden Genen gemeinsam genutzten *Enhancer*-Strukturen verhindert die *downstream* von *H19* liegen. Resultat ist die exklusiv maternale Expression von *H19*. Aufgrund der paternalen ICR1-Methylierung und dadurch fehlender CTCF-Bindung in Kombination mit ebenfalls methylierter *H19*-Promotorregion wird paternal exklusiv *Igf2* exprimiert. Eine Übertragbarkeit des auf murinen Daten basierenden Modells auf die Situation beim Menschen dürfte trotz struktureller Unterschiede, wie beispielsweise vier muriner und sechs humaner ICR1-CTS, gegeben sein.

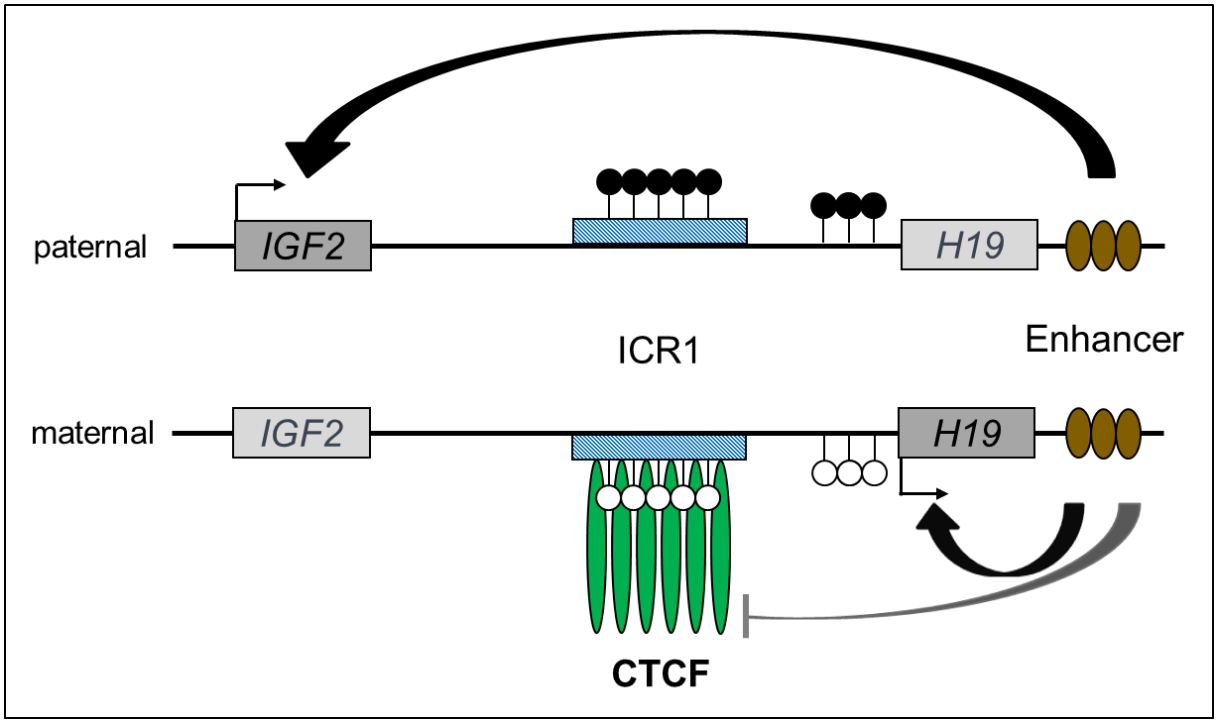


Abbildung 1-2 *Enhancer blocking*-Modell zur Regulation der Genexpression im IC1

Das Modell beschreibt den Zusammenhang zwischen der reziproken Expression von *Igf2* und *H19*, der differentiellen Methylierung der *Imprinting*-Kontrollregion (ICR1) und der methylierungssensitiven Bindung von CTCF. Die Interaktion mit *upstream* von *H19* gelegenen *Enhancer*-Strukturen ist für die korrekte Expression beider Gene notwendig. An die unmethylierte (weiße Kreise) ICR1 des maternalen Allels erfolgt die CTCF-Bindung, die zu einer Blockade des Kontakts zwischen *Enhancern* und *Igf2* führt. Dadurch kommt es auf dem maternalen Allel ausschließlich zur *H19*-Expression. Methylierung (schwarze Kreise) der ICR1 auf dem paternalen Allel verhindert die Bindung des Proteins und ermöglicht durch Interaktion mit den *Enhancern* die *Igf2*-Expression. Die *H19*-Expression wird durch die ebenfalls methylierte Promoterregion des Gens auf dem paternalen Allel verhindert.

Das erläuterte *Enhancer blocking*-Modell beschreibt die Funktion von CTCF bei der Genregulation auf einer linearen Ebene. Inwiefern die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen dabei eine Rolle spielt, wird derzeit in zunehmendem Maße untersucht. Das distale *Imprinting*-Cluster auf Chromosom 11p15.5 ist die Region, zu der diesbezüglich am meisten Daten existieren. Die Etablierung der 3C-Technik (*chromatin conformation capture*) (Dekker *et al*., 2002), mit der es möglich ist, Chromatin-Interaktionen nach Fixierung mit geeigneten Agenzien nachzuweisen, war dafür grundlegend. Im murinen *Igf2*-Gen finden sich drei differentiell methylierte Regionen (DMRs): DMR0 vor P0, dem plazentaspezifischen Promoter, DMR1 etwa 3 kb aufwärts von P1 und DMR2 in der 3´-UTR des Gens (zusammenfassend: Monk *et al*., 2006). In der Maus steht die plazentaspezifische maternale DMR0-Methylierung (Moore *et al*., 1997) im Kontrast zur paternalen Methylierung von DMR1 und DMR2 (Feil *et al*., 1994). Reik und Kollegen konnten in Mausversuchen erstmals zeigen, dass die ICR1 allelspezifisch mit der DMR1 und DMR2 interagiert, und entwickelten mit Hilfe dieser Daten ein *Loop*-Modell der *Igf2*/*H19*-Regulation (Murrell *et al*., 2004, Abbildung 1-3 A). Bei Interaktionen, ausgehend von der maternalen unmethylierten ICR1, wurde eine Funktion von CTCF und anderen Proteinen vermutet. Die Auswirkung der *Loop*-Bildung auf die *Igf2*-Expression wurde durch die Lokalisation des Gens in einer aktivierenden paternalen und inaktivierenden maternalen Domäne erklärt. Durch

Erweiterung der untersuchten murinen Region bei 3C-Analysen konnte für das paternale Allel die Interaktion distaler *Enhancer* mit *Igf2*-Promotoren nachgewiesen werden (Kurukuti *et al*., 2006). Das Ausbleiben dieser Promoter-*Enhancer*-Interaktion auf dem maternalen Allel wurde durch die Bindung von CTCF an die ICR1 erklärt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine CTCF-basierte Interaktion zwischen der ICR1, einer der differentiell methylierten Regionen des *Igf2*-Gens (DMR1) und einer *Matrix-Attachement*-Region (MAR3) zumindest in neonatalen Leberzellen zustande kommt (Kurukuti *et al*., 2006, Abbildung 1-3 B). Die daraus resultierende Bildung enger *Loop*-Strukturen wurde als Grund für die maternale *Igf2*-Reprimierung vorgeschlagen. Darüber hinaus postulieren Kurukuti und Mitarbeiter die Bedeutung eines aktivierenden Chromatinknotenpunktes (*active chromatin hub*, ACH), in dem ein Großteil der IC1-Regionen Kontakt zu den *Enhancer*-Strukturen besitzt. In darauffolgenden Publikationen wurde vermutet, dass die Interaktion von ICR1 und *Igf2*-Promotoren, respektive die CTCF-Bedeutung als Transkriptionsfaktor für *H19,* das Zustandekommen von transkriptionell notwendigen Promoter-*Enhancer*-Interaktionen verhindert (Engel *et al*., 2008, Yoon *et al*., 2007). Eine Anwendbarkeit des *Loop*-Modells beim Menschen scheint möglich, da für die DMR0 und die DMR2 auch human eine differentielle Methylierung nachgewiesen werden konnte (Weber, 2006; Sullivan *et al*., 1999). Für die DMR2 geht man dabei von einer exklusiven Methylierung auf dem paternalen Allel aus. Bezüglich der DMR0 bestehen mit exklusiver maternaler (Sullivan *et al*., 1999) oder paternaler (Weber, 2006) Methylierung widersprüchliche Daten. Da die Befunde von Weber allerdings auf Analysen von mehreren Kontrollpersonen im Gegensatz zur Untersuchung von einem Wilms´ Tumor-Patient bei der Studie von Sullivan und Kollegen basieren, ist mit größerer Wahrscheinlichkeit vom gleichen differentiellen Methylierungsstatus der DMR0 und DMR2 auszugehen. Bei der orthologen Region DMR1, mit biallelisch methyliertem Status, handelt es sich scheinbar nicht um eine differentiell methylierte Region (Dupont *et al*., 2004).

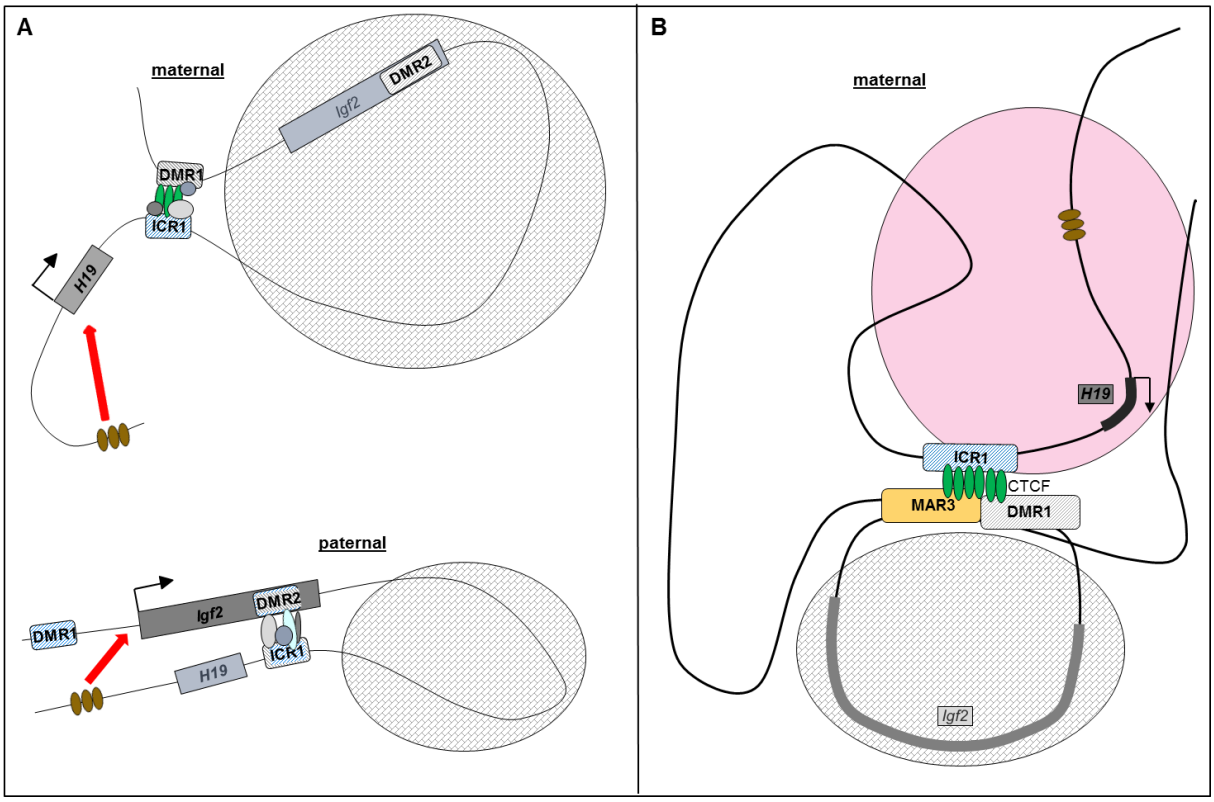


Abbildung 1-3 Chromatin-*Loop*-Modelle zur Regulation der Genexpression im IC1

Die beiden Chromatin-*Loop*-Modelle basieren auf murinen Daten und stellen Theorien zur Auswirkung dreidimensionaler Chromatinstrukturen auf die Genexpression im IC1 dar. **A**: Durch proteinvermittelte Interaktion von ICR1 und DMR1 auf dem maternalen Allel (oben) wird das *Igf2*-Gen in einer inaktivierenden Domäne lokalisiert und dadurch dem Zugang durch meso- und endodermale *Enhancer*-Strukturen entzogen. Auf dem paternalen Allel (unten) erfolgt die Interaktion der ICR1 mit der DMR2, wodurch *Igf2* außerhalb der inaktivierenden Domäne liegt, Zugang zu den *Enhancern* besitzt und exprimiert werden kann. (Abbildung modifiziert nach Murrell *et al*., 2004). **B**: Auf dem maternalen Allel kommt es zu einer CTCF-abhängigen Interaktion von ICR1, DMR1 und *Matrix attachement region* 3 (MAR3). Dadurch liegt *Igf2* in einem engen, inaktivierenden *Loop*, der den *Enhancer*-Zugang verhindert. Das Modell von Kurukuti und Mitarbeitern stellt eine Erweiterung des zuvor beschriebenen Modells dar, das mit der MAR3 die Beteiligung einer weiteren IC1-Region bei den Interaktionen berücksichtigt, und darüber hinaus die Bedeutung eines aktivierenden Chromatinknotenpunktes (*active chromatin hub*, ACH, rosa) annimmt, in dem ein Großteil der IC1-Regionen Kontakt zu den *Enhancer*-Strukturen besitzt. (Abbildung modifiziert nach Kurukuti *et al*., 2006)

Interchromosomale CTCF-basierte Kontakte

Die Erkenntnisse zum *Igf2*/*H19*-Lokus belegen gemeinsam mit Daten zu anderen Regionen mit CTCF-basierten Chromatin-Interaktionen (humaner *MHCII*-Lokus, muriner *ß-Globin*-Lokus), dass CTCF eine wichtige Aufgabe bei der dreidimensionalen Anordnung des Chromatins besitzt (zusammenfassend: Phillips und Corces, 2009). Alle bisher erläuterten Beispiele beschäftigen sich mit Interaktionen der DNA innerhalb eines Chromosoms also in *cis*. Mit einem modifizierten 3C-Ansatz (*Chromatin conformation capture*) konnte bei murinen Fibroblasten neben einer *cis*- auch zwei ICR1-basierte *trans*-Interaktionen nachgewiesen werden (Ling *et al*., 2006). Die Autoren konnten zeigen, dass CTCF für das Zustandekommen der Interaktionen ursächlich ist und die Verhinderung der Proteinbindung sich auf die Genexpression in der interagierenden Region auswirkt. Durch Anwendung der 4C-Technik (*circular* 3C) in murinen Leberzellen konnten von der Gruppe um Ohlsson mehr als hundert

chromosomale Kontakte identifiziert werden (Zhao *et al*., 2006). Ein beträchtlicher Anteil stellt interchromosomale Verbindungen dar, die teilweise Regionen von bis zu vier Chromosomen in räumliche Nähe bringen. Hou und Mitarbeiter konnten einen ersten Beweis für die direkte Interaktion von zwei CTCF-gebundenen Insulatoren *in vivo* erbringen (Hou *et al*., 2008). Dabei konnte durch die Insertion eines humanen Insulators in die Maus die Ausbildung eines aberranten DNA-*Loops* mit Auswirkung auf die Transkription der dortigen Gene gezeigt werden.

CTCF-Interaktionspartner

Die geschilderten Daten lassen eine ausschließlich auf das CTCF-Protein zurückzuführende Interaktion von Chromosomenregion möglich erscheinen. Ein zentraler Punkt, der diesbezüglich zur Erweiterung des Verständnisses beitragen kann, ist die Frage nach weiteren Proteinfaktoren, die eigenständig CTCF-nah an die DNA binden oder auch durch Bildung von Protein-Heterodimeren mit CTCF bei der chromosomalen Interaktion von Bedeutung sein könnten. Ohlsson und Mitarbeiter vermuteten früh, dass bei der CTCF-DNA-Bindung Interaktionen mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle spielen (Ohlsson *et al*., 2001). Die Anzahl der mit CTCF interagierenden Proteinfaktoren ist im Laufe der vergangenen Jahre ständig gestiegen. Dazu gehören unter anderen DNA-bindende Faktoren, Chromatinproteine und diverse multifunktionelle Proteine. Donohoe und Kollegen beschrieben für den ubiquitären 4-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Yy1 eine Bedeutung als Co-Faktor von CTCF bei der X-chromosomalen Inaktivierung (Donohoe *et al*., 2007). Im X-*inactivation center* finden sich zwischen den Genen *Xist* (*X-inactivation-specific transcript*) und *Tsix* (*X-inactivation-specific antisense-transcript*) jeweils in geringen Abständen Bindestellen für beide Proteine und CTCF und Yy1 konnten *in vivo* co-immunpräzipitiert werden. Eine direkte Interaktion findet über den N-Terminus von CTCF statt. Interessanterweise ist Yy1 neben CTCF das einzige Protein, für das bis dato eine *Enhancer blocking*-Funktion beschrieben werden konnte, und Yy1-Bindestellen finden sich in mehreren DMRs, die als *Imprinting*-Kontrollregionen fungieren (Kim *et al*., 2006). Eine deutliche Ähnlichkeit zur CTCF-ICR1-Bindung besteht bei der Bindung von Yy1 an die *Peg3*-DMR, die eine für die umliegenden geprägten Gene regulativ wichtige ICR darstellt (Kim *et al*., 2003 und 2009). Die Bindung hat Auswirkung auf den Erhalt des differentiellen Methylierungsstatus.

Auf die Bedeutung von CTCF als transkriptioneller Regulator wurde im Rahmen dieser Einleitung schon eingegangen. In einzelnen Loci konnte gezeigt werden, dass direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase II (Pol II) eine Rolle spielen (Chernukhin *et al*., 2007). Unter anderem wurde bei den Experimenten mit humanen Zellen gezeigt, dass eine funktionelle CTS in der ICR1 für die Bindung von Pol II nötig ist, und daraus geschlossen, dass CTCF ein funktionelles Äquivalent zum Tata-Box-*binding*-Protein (TBP) ist. Gleichzeitig zeigten Chernukhin und Kollegen aber auch das nur in 10 % der CTCF-bindenden Loci eine Pol II-Bindung festgestellt werden konnte. In einer früheren Studie wurden dagegen Hinweise gefunden, dass CTCF als Bestandteil seiner Insulatorfunktion in der Lokus-Kontrollregion des ß-Globin-Insulators den Pol II-Zugang zu Promotoren verhindert (Zhao und Dean, 2004). Die beschriebenen Befunde belegen, dass die Erkenntnisse zu den funktionellen Zusammenhängen von CTCF und Pol II noch unzureichend verstanden werden. Besonders die

gegensätzlichen beschriebenen Auswirkungen zeigen, dass die Funktion von CTCF-Pol II-Interaktionen wesentlich komplizierter erscheint als der erläuterte TBP-ähnliche Mechanismus es erahnen lässt.

Der wahrscheinlich am besten untersuchte CTCF-Interaktionspartner ist Cohesin. Dieser Proteinkomplex aus vier Untereinheiten wurde bezüglich seiner Funktion bei der Zusammenlagerung der Schwester-Chromatiden im Verlauf der DNA-Replikation in Vergangenheit gut beschrieben (zusammenfassend: Hirano, 2006). Mehrere Publikationen belegen funktionelle Zusammenhänge zwischen Cohesin und CTCF. Eine ganze Reihe verschiedener Zelllinien zeigen, dass die beiden Proteine häufig in der gleichen DNA-Region binden (Wendt *et al*., 2008; Parelho *et al*., 2008). Diese Publikationen belegten auch mit Transfektionsexperimenten, dass eine korrekte Insulation von der Cohesin-Präsenz abhängt, obgleich der *in vivo*-Beweis für diese Hypothese aussteht. In Übereinstimmung mit Rubio und Kollegen wurde ebenfalls von beiden Gruppen beschrieben, dass CTCF für das Zustandekommen einer Cohesin-Bindung an Chromatin notwendig ist (Rubio *et al*., 2008). Für einen ersten Lokus konnte die Bedeutung der Proteininteraktion bei der Ausbildung von Chromatinkontakten gezeigt werden (Hadjur *et al*., 2009). Nativio und Kollegen präsentierten kurz darauf erste Hinweise auf eine Stabilisator-Funktion von Cohesin bei der CTCF-basierten Ausbildung chromosomaler Kontakte, die von der ICR1 auf Chromosom 11p15.5 ausgehen (Nativio *et al*., 2009). In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Hauptaufgabe von CTCF bei chromosomalen Kontakten die spezifische DNA-Bindung ist und Cohesin eher die Rolle des „Verknüpfens“ übernimmt (Herold *et al*., 2012). Die beschriebenen Proteine stellen eine Auswahl von vielen mit CTCF-interagierenden Faktoren dar.

Das Zinkfingerprotein Kaiso

Ein weiteres Zinkfingerprotein, das als Interaktionspartner von Kaiso bekannt ist und darüber hinaus eine putative Bedeutung für die Genexpressions-Regulation in der chromosomalen Region 11p15.5 besitzt, ist Kaiso. Das Kaiso-Protein wurde erstmals durch einen *yeast two hybrid screen* identifiziert, bei dem nach p120- (alternativ: CTNND1, Delta-Catenin) Interaktionspartnern gesucht wurde (Daniel und Reynolds, 1999). Es wird nach seinem Aufbau auch ZBTB33 (*Zinc finger and BTB domain-containing protein 33*) genannt und besitzt N-terminal eine BTB-Domäne (Daniel und Reynolds, 1999), die Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Bardwell und Treismann, 1994). Die DNA-Bindungsfähigkeit basiert auf drei C-terminal gelegenen Zinkfingern. Daniel und Kollegen zeigten, dass die Zinkfinger 2 und 3 für die DNA-Bindung ausreichend und notwendig sind (Daniel *et al*., 2002). Deren Daten stehen damit im Widerspruch zu einer kürzlich erschienenen Publikation, die alle Zinkfinger und weitere Regionen des Proteins als relevant für eine hochaffine Bindung beschreiben (Buck-Koehntop *et al*., 2012). Kaiso besitzt eine dualspezifische Bindungscharakteristik: Neben der häufig beschriebenen Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen (Yoon *et al*., 2003, Prokhortchouk *et al*., 2001) wurde in Vergangenheit auch die Bindung an die unmethylierte Konsensussequenz TNGCAGGA, im Folgenden auch KBS (Kaiso *binding site*) genannt, beschrieben (Spring *et al*., 2005; Daniel *et al*., 2002). Eine im Konsensus enthaltene Kernsequenz (TNGCAG) gilt als ausreichend für

die Kaiso-Bindung (Daniel *et al.*, 2002). Im Kontrast zur bereits zitierten aktuellen Publikation (Buck-Koehntop *et al*., 2012), die eine gleiche Affinität für CGCG- und KBS-Bindung, zumindest im *E-Cadherin*-Promoter beschreibt, geht eine ältere Publikation von einer höheren Affinität des Proteins für das KBS-Motiv aus (Daniel *et al.*, 2002).

Beim Interspeziesvergleich von Maus und Mensch ist Kaiso mit 87 % übereinstimmenden Aminosäure-Positionen sehr ähnlich (Daniel und Reynolds, 1999). Kaiso-*knockout* Mäuse erwiesen sich als lebensfähig, fruchtbar und zeigten keine detektierbaren Abnormalitäten bezüglich Entwicklung und Genexpression (Prokhortchouk *et al*., 2006). Zu den genauen funktionellen Zusammenhängen der Kaiso-DNA-Bindung besteht eine breite Datenlage: Unter anderem ist dessen Bedeutung bei der Modulation cytoplasmatischer Prozesse und bei der neuronalen Differenzierung bekannt (Caballero *et al*., 2009). Vor allem bestehen aber Erkenntnisse zur Auswirkung von Kaiso auf die Transkription. Diesbezüglich wurde in Vergangenheit auch der Zusammenhang von Kaiso mit der Krebsentstehung gezeigt, wie es für andere BTB-Zinkfingerproteine bereits bekannt ist (zusammenfassend: van Roy und McCrea, 2005). Prokhortchouk und Mitarbeiter beschrieben Kaiso als Schlüsselkomponente von Komplexen, die methylierte DNA (CGCG) binden und dadurch transkriptionell inaktivierend wirken (Prokhortchouk *et al*., 2001). Eine reprimierende Bedeutung solcher Komplexe im Allgemeinen (Lopez-Serra *et al*., 2006) und von Kaiso im Speziellen (Lopes *et al*., 2008; De La Rosa-Velázquez *et al*., 2007) auf methylierte Tumorsuppressorgene wurde beschrieben. Durch RNAi-basierte Herunterregulation von Kaiso wird die Expression der Tumorsuppressorgene wiederum aktiviert, ohne Veränderungen der DNA-Methylierung zu bewirken (Lopes *et al*., 2008). Die Daten lassen daher auf eine der Hypermethylierung übergeordnete Bedeutung der Kaiso-Bindung schließen. Dass die transkriptionelle Wirkung von Kaiso nicht ausschließlich inhibierend ist, wurde bei dessen Bindung an den Promoter des *Rapsyn*-Gens gezeigt. Mit Maus- und Huhn-Zelllinien wurde eine muskelspezifische transkriptionelle Aktivierung bei Interaktion mit Ctnnd2 gezeigt (Rodova *et al*., 2004). Neben *Rapsyn* und Tumorsuppressorgenen wie *CDKN2A* sind mit *CDH1*, *Wnt11* und *MTA2* auch weitere Zielgene bekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Mehrere Autoren beschrieben die Kaiso-Bindung an den Promoter des Tumor-induzierenden Faktors *matrilysin* (*MMP7*) (Ogden *et al*., 2008; Spring *et al*., 2005; Daniel *et al*., 2002). Eine Kaiso-Bindung an die Promoter-KBS konnte durch Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) und *bandshift-assays* (EMSA) nachgewiesen werden. In Kontrast zur nukleären Kaiso-Funktion wurde in Vergangenheit eine mögliche Bedeutung der Kaiso-Konzentration im Cytoplasma als prognostischer Faktor bei Krebs diskutiert, die funktionellen Zusammenhänge sind jedoch weitestgehend unklar (Dai *et al*., 2009). Möglicherweise spielt beim Krebs-relevanten Nukleus-Export ins Cytoplasma die Interaktion von Kaiso und p120 eine Rolle (Dai *et al*., 2011). Die Autoren verweisen jedoch darauf, dass zum völligen Verständnis weitere Interaktionsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden müssen. Die Vielzahl bekannter Interaktionspartner ist neben der dualspezifischen Bindungscharakteristik einer der Gründe, der Kaiso zu einem vielfältigen Faktor macht, der in verschiedenen zellulären Situationen entweder allein oder als Teil unterschiedlicher Komplexe wirken kann.

Verschiedene Indizien sprechen dafür, dass Kaiso auch bei der epigenetischen Regulation durch die ICR1 eine Bedeutung besitzt. So existieren neben mehreren potentiell methylierten CGCG-Sequenzen in der ICR1 auch KBS-Motive (Abbildung 1-4). Diese KBS finden sich, außer in B7, mindestens ein Mal in allen vollständigen *Repeats* der Kontrollregion und besitzen mit Cytosin oder Guanin statt Adenin Abweichungen an Position acht im Vergleich zur optimal beschriebenen Konsensussequenz TNGCAGGA (Daniel *et al.*, 2002). Im nicht repetitiven Bereich des verkürzten B4 findet sich zusätzlich eine optimale Konsensussequenz.

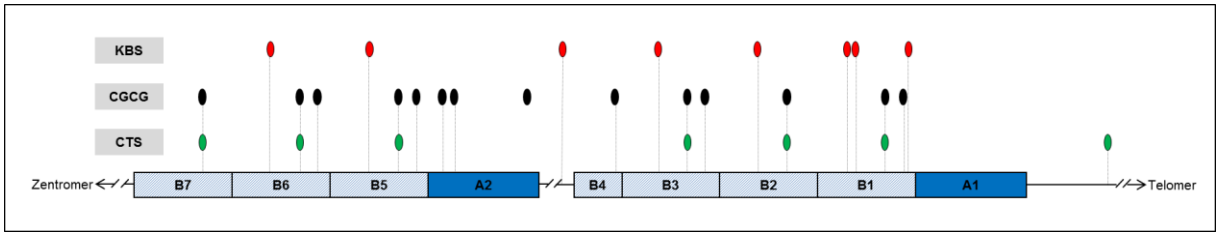


Abbildung 1-4 ICR1 mit Proteinbindestellen

Die ICR1 besitzt einen repetitiven Aufbau aus sieben B- und zwei A-*Repeats,* die in zwei Hälften vorliegen. Das B4-*Repeat* liegt verkürzt vor. Alle vollständigen B-*Repeats* und der Bereich telomerwärts von A1 enthalten Bindestellen für CTCF (CTCF *target sites*, CTS, grün). Im Zentrum der *Repeat*-CTS und an weiteren Stellen finden sich CGCG-Sequenzen (schwarz), an die eine Kaiso-Bindung im methylierten Zustand möglich ist. Alle B-*Repeats* außer B7 enthalten putative unmethylierte Kaiso-Bindestellen, die verschiedene Abweichungen an Position acht im Vergleich zur Konsensus-Sequenz TNGCAGGA aufweisen (KBS, rot).

Filion und Mitarbeiter deuteten an, dass bei ChIP-Experimenten mit murinen Zellen in der ICR1 neben der CGCG-Bindung auch eine solche an die KBS detektiert werden konnte (Filion *et al.*, 2006). Durch ChIP-Experimente konnte ich in einer früheren Arbeit mit Kaiso-Antikörper und Chromatin aus biparentalen Kontrollzelllinien und den ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten upd(11p15)mat-Zellen mit maternaler uniparentaler Disomie der Region 11p15 eine Immunpräzipitation feststellen, die für eine Kaiso-Bindung auch an die maternale humane ICR1 spricht (Langer, 2008).

Defossez und Mitarbeiter beschäftigten sich mit einer, der ICR1 funktionell ähnlichen, Insulator-Region, dem humanen 5´-ß Globin-Insulator, in der sie eine KBS identifizierten, die in nächster Nähe zu einer CTS lag (Defossez *et al.*, 2005). Des Weiteren berichteten sie über eine Interaktion von CTCF und Kaiso, die durch CTCF C-Terminus und die Kaiso BTB-Domäne entsteht. Das Vorhandensein einer intakten KBS wirkte in *Soft-Agar-assays* inhibierend auf die CTCF-Insulatoraktivität. Die einzelnen Befunde lassen eine funktionell relevante Kaiso-Bindung in der ICR1 vermuten. Bei Experimenten mit den Promotoren des Retinoblastom-Gens wurde im Gegensatz zur epigenetisch aktivierenden Wirkung der CTCF-Bindung die methylierungssensitive, mit der Promoter-Inaktivierung einhergehende Bindung von Kaiso an unmethylierte Sequenzen festgestellt (De La Rosa-Velazquez *et al.*, 2007). Im Gegensatz zur Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen ist der Effekt der Kaiso-Bindung an die unmethylierte KBS zurzeit noch nicht umfassend beschrieben.

Beckwith-Wiedemann- und Silver-Russell-Syndrom

Aberrationen genetischer und epigenetischer Natur in *Imprinting*-Domänen führen zu diversen krankhaften Veränderungen (zusammenfassend: Edwards und Ferguson-Smith, 2007; Horsthemke,

2010). Mutationen und Epimutationen in den beiden 11p15.5-Clustern finden sich häufig bei den mit Fehlwachstum-assoziierten Silver-Russell- (SRS) und Beckwith-Wiedemann-Syndromen (BWS).

Das klinische Erscheinungsbild des BWS ist sehr variabel. Die Symptome werden in Haupt- und Nebenmerkmale eingeteilt (zusammenfassend: Weksberg *et al*., 2010; Prawitt *et al*., 2010; Enklaar *et al*., 2006). Die Hauptmerkmale sind prä- und postnataler Überwuchs, definiert als Geburtsgröße oder -gewicht $\geq$ 97. Perzentile, verschiedene Bauchwanddefekte wie Exomphalos Nabelhernie oder *Diastasis recti*, und eine Vergrößerung der Zunge (Makroglossie). Von besonderer therapeutischer Bedeutung sind die Makroglossie aufgrund einer eventuellen Beeinträchtigung der Ernährung und Atmung und eine stark erhöhte Prädisposition für die Entwicklung embryonaler Tumore. Am häufigsten findet man die Nieren betreffende Wilms´ Tumore, mit absteigender Inzidenz aber auch Hepatoblastome, Neuroblastome und Rhabdomyosarkome. Weitere Hauptmerkmale sind charakteristische Ohrkerben, Hemihypertrophie, Viszeromegalie und Auffälligkeiten der Nierenmorphologie. Zu den selteneren Nebenmerkmalen zählt man verschiedene Schwangerschaftsbefunde wie erhöhte Neigung zu Frühgeburt, charakteristische Fazies, neonatale Hypoglykämien, Gaumenspalte, Hämangiome, pathologische Herzauffälligkeiten und fortgeschrittenes Knochenalter. Die klinische Diagnosestellung beruht in der Regel auf dem Vorfinden von drei Hauptmerkmalen oder einer Kombination von zwei Haupt- mit drei Nebenmerkmalen (Prawitt *et al*., 2010). Bei einer überwiegenden Mehrheit von BWS-Fällen lassen sich genetische oder epigenetische Veränderungen diagnostizieren, die die geprägten Gencluster der chromosomalen Region 11p15.5 betreffen (Abbildung 1-5). Nur bei etwa 10-15 % aller BWS-Patienten ist eine familiäre Prädisposition von Bedeutung (Murrell *et al*., 2004), diesbezüglich stellen Mutationen des *CDKN1C*-Gen die häufigste bekannte Ursache dar (Li *et al*., 2001). Des Weiteren konnten vor allem bei familiären BWS-Fällen von verschiedenen Arbeitsgruppen maternale Mikrodeletionen in der ICR1 nachgewiesen werden, die ausnahmslos im Verlust von CTCF-Bindestellen und der Störung des symmetrischen ICR1-Aufbaus resultierten (Sparago *et al*., 2007; Prawitt *et al*., 2005; Sparago *et al*., 2004). Darüber hinaus beschrieben die Autoren auch BWS-Fälle mit Mikrodeletionen und Mutationen, die OCT-Motive und eine SOX-Bindestelle in der Kontrollregion betreffen. In besonderem Maße interessant sind diese Daten, da die Mikrodeletionen und Mutationen zwar immer mit dem Verlust des *Imprintings* (LOI) von *IGF2,* aber nicht zwingend mit der BWS-Symptomatik einhergehen (De Crescenzo *et al*., 2011). Der Phänotyp ist jedoch bei allen Individuen zu finden, die neben den genetischen Veränderungen auch eine ICR1-Hypermethylierung aufweisen. Selten beschriebene Mikrodeletionen im Bereich des *KCNQ1OT1*-Gens erhöhen den Anteil genomischer Defekte geringfügig (Niemitz *et al*., 2004). Bei jeweils etwa 1% der BWS-Fälle findet man entweder Duplikationen von 11p15.5-Abschnitten oder Translokationen und Inversionen mit Bruchpunkten in der Region (Weksberg *et al*., 2010). Die Mehrheit aller BWS-Fälle zeigt jedoch epigenetische Veränderungen. Bei mehr als 50 % der Patienten lässt sich eine Hypomethylierung der ICR2 feststellen. Nur etwa 5 % der BWS-Individuen weisen eine verstärkte Methylierung des *H19*-Promoters oder der ICR1 auf, die mit einem Verlust des *IGF2-Imprintings* einhergeht (zusammenfassend: Prawitt *et al*., 2010). Die Kombination von IC1- und IC2-Defekten geht in der Regel immer mit dem Vorliegen einer uniparentalen Disomie väterlicher Herkunft

(upd(11)pat) einher, die man bei bis zu einem Fünftel der nichtfamiliären BWS-Fälle findet (zusammenfassend: Prawitt *et al*., 2010). Bei einer uniparentalen Disomie (upd) stammen beide Kopien eines Chromosoms oder die chromosomalen Abschnitte bei einer segmentalen upd von einem Elternteil. Korrelationen zwischen der molekularen Ätiologie und der klinischen Symptomatik ermöglichen die Unterteilung von BWS-Fällen in Untergruppen. Beispielsweise besitzen Patienten mit upd(11)pat oder IC1-Hypermethylierung das höchste Tumorrisiko, wohingegen ein Methylierungsverlust der ICR2 und in noch geringerem Maße *CDKN1C*-Mutationen selten mit einer Tumorentstehung einhergehen (zusammenfassend: Weksberg *et al*., 2010). Solche und weitere Zuordnungen sind vor allem für die zielgerichtete Therapie der besonders mit Komplikationen verbundenen Symptome sinnvoll. 11p15.5-betreffende Befunde finden sich bei etwa 80% der bis dato analysierten BWS-Fälle (Weksberg *et al*., 2010; Prawitt *et al*., 2010), was im Umkehrschluss darauf hindeutet, dass auch andere genomische Loci involviert sein können. Die Beteiligung zusätzlicher chromosomaler Regionen wird auch durch Studien belegt, die bei etwa einem Viertel der untersuchten BWS-Patienten Methylierungsverluste in anderen chromosomalen Regionen vorfanden, die bisher nicht mit dem BWS in Verbindung gebracht wurden (Azzi *et al*., 2009).

Wie das BWS ist auch das Silver-Russell-Syndrom (SRS) durch ein variables Erscheinungsbild und, in noch deutlicherem Maße, durch Heterogenie gekennzeichnet. Als Hauptmerkmal findet man beim SRS eine schwere intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung, die durch eine Körpergröße unterhalb der 3. Perzentile definiert ist und mit unzureichendem Aufholwachstum und Untergewicht einhergeht (Netchine *et al*., 2007; Wollmann *et al*., 1995). Des Weiteren finden sich häufig verschiedene Neben-Symptome wie eine relative Makrozephalie, ein SRS-typisches Erscheinungsbild des Schädels, Asymmetrien des Körpers, kleinere Fehlbildungen der Ohren oder Klinodaktylien des 5. Fingers (zusammenfassend: Binder *et al*., 2011) und ophthalmologische Abnormalitäten (Gronlund *et al*., 2011). Für die klinische Diagnostik von SRS wurden verschiedene Algorithmen vorgeschlagen, die, ähnlich wie bei der BWS-Diagnostik, unterschiedliche Kombinationen von Nebenmerkmalen mit der Wachstumsretardierung als Hauptmerkmal enthalten (Binder *et al*., 2011; Netchine *et al*., 2007). Die Mehrheit aller SRS-Fälle tritt sporadisch auf. Hauptsächlich findet man in Verbindung mit dem SRS epigenetische Defekte wie Methylierungsveränderungen und uniparentale Disomien. In selteneren Fällen finden sich strukturelle chromosomale Veränderungen wie Duplikationen (Eggermann *et al*., 2005). In der Vergangenheit wurden immer wieder Aberrationen auf verschiedenen Chromosomen mit dem SRS in Verbindung gebracht (zusammenfassend: Smith *et al*., 2007), nach strikten klinischen Kriterien wurden bei SRS-Patienten jedoch nur Auffälligkeiten der Chromosomen 7, 11 und 17 gefunden (Spengler *et al*., 2010). 5-10 % der SRS-Patienten weisen segmentale oder komplette uniparentale Disomien von Chromosom 7 (upd(7)mat) auf (Kotzot *et al*., 1995). Als funktioneller Zusammenhang zwischen dem SRS-Phänotyp und diesem upd-Genotyp stellt man sich die Beeinflussung geprägter Gene vor. Zwei scheinbar mit dem Krankheitsgeschehen assoziierte Kandidatenregionen auf Chromosom 7 sind p11.2-13 und q31. Die Region 7q31 beinhaltet das maternal inaktive Gen *MEST* (*mesoderm specific transcript*). Zusätzlich zu zwei bekannten Transkripten existiert ein intronisches Transkript (*MESTIT1*), das exklusiv paternal exprimiert wird

(Nakabayashi *et al*., 2002). Für die nicht proteinkodierende RNA (ncRNA) wird eine Rolle bei der *MEST*-Regulation vermutet. Durch Mausversuche konnte bereits früh die wachstumsrelevante Funktion von *Mest* belegt werden, da dessen fehlende Expression mit intrauteriner Wachstumsretardierung einhergeht (Ferguson-Smith *et al*., 1991). Da sowohl die DNA- als auch die Aminosäure-Sequenz von *MEST* starke Homologien zwischen Maus und Mensch aufweisen (Nishita *et al*., 1996; Riesewijk *et al*., 1997), kann von einer vergleichbaren Wirkung beim Menschen ausgegangen werden.

Obwohl das Gen bei allen bekannten Fällen segmentaler upd von Chromosom 7 betroffen ist (Spengler *et al*., 2010), ließen sich bis vor kurzem keine klaren Hinweise wie Punkt-Mutationen oder Methylierungsdefekte finden, die eine Beteiligung von *MEST* an der SRS-Ätiologie belegen. In einer aktuellen Publikation beschrieben Eggermann und Kollegen erstmals einen SRS-Fall, bei dem durch molekulare Karyotypisierung eine Deletion des paternalen Chromosom 7-Allels gefunden wurde, die das *MEST*-Gen betrifft (Eggermann *et al*., 2012).

Ein möglicherweise SRS-ursächliches Gen aus der anderen Kandidatenregion auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 ist *GRB10* (g*rowth factor receptor-bound protein*). Das Gen ist Gewebe- und Isoform-spezifisch, meist paternal inaktiv (Blagitko *et al*., 2000). Die wachstumsrelevante Funktion von *GRB10* wurde bereits vielfach beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten die direkte oder indirekte Bindung an den Insulin- und Igf1-Rezeptor (InsR und Igf1R) (Giavannone *et al*., 2003; Miyoshi *et al*., 1998; Liu und Roth, 1995). Miyoshi und Kollegen demonstrierten einen inhibierenden Effekt der Grb10-Bindung auf die Kinase-Aktivität, die Teil der wachstumsfördernden Wirkung von Insulin und beider IGF-Proteine ist. Yoshihashi und Kollegen lieferten erste Hinweise auf eine *GRB10*-Beteiligung an der SRS-Ätiologie, indem sie zwei SRS-Patienten beschrieben, die Mutationen aufwiesen, die zu einem Aminosäureaustausch beim GRB10-Protein führten (Yoshihashi *et al*., 2000).

Da bis dato jedoch nur sehr vereinzelte Erkenntnisse zu Mutationen und keine Daten zu Methylierungsfehlern bestehen, die *GRB10* oder *MEST* direkt betreffen, sind die funktionellen Konsequenzen von SRS-assoziierten Chromosom 7-upds und -Duplikationen derzeit unklar.

Die Mehrzahl aller bei SRS-Patienten diagnostizierten (epi)genetischen Defekte befinden sich in der chromosomalen Region 11p15.5 (Abbildung 1-5). Mehr als 40% der SRS-Fälle weisen eine Hypomethylierung der ICR1 des distalen Clusters auf, die in Fibroblasten Auswirkung auf die *H19*- und *IGF2*-Genexpression besitzt (Gicquel *et al*., 2005). Obwohl einzelne SRS-Fälle mit ICR2-Defekten bekannt sind (Schönherr *et al*., 2007; Azzi *et al*., 2009; Chiesa *et al*., 2012), scheint das proximale Cluster beim SRS eine unbedeutendere Rolle zu spielen.

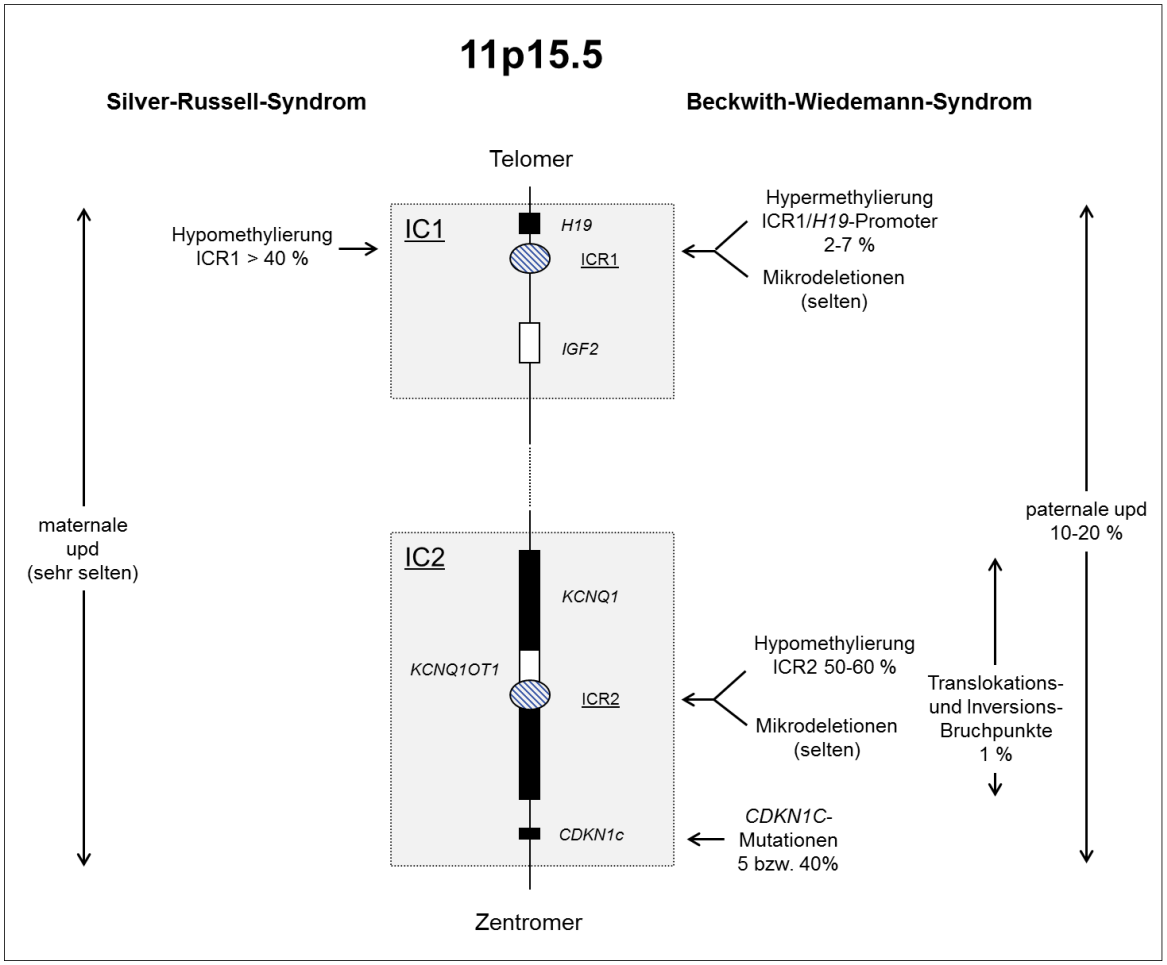


Abbildung 1-5 Häufige BWS- und SRS-assoziierte 11p15.5 -Defekte

Im Zentrum der Abbildung sind die beiden *Imprinting*-Cluster (IC1 und IC2) der Chromosomenregion 11p15.5 mit einem Teil der dort lokalisierten geprägten Gene dargestellt. Maternal geprägte Gene sind schwarz, paternal geprägte Gene weiß unterlegt. An den Seiten sind mit Häufigkeitsangaben molekulare Defekte in 11p15.5 dargestellt, die assoziiert mit dem Auftreten von Silver-Russell- oder Beckwith-Wiedemann-Syndrom vorliegen. (ICR, *Imprinting* Kontrollregion; upd, uniparentale Disomie)

Neuere Studien zeigen, dass bei etwa einem Zehntel aller SRS-Patienten neben ICR1-Hypomethylierungen auch solche anderer Loci auftreten (Kannenberg *et al*., 2012; Azzi *et al*., 2009; Horike *et al*., 2009). Azzi und Kollegen konnten darüber hinaus auch bei etwa einem Viertel der BWS-Patienten in ihrer Studie solche Multi-Lokus-Hypomethylierungen nachweisen (Azzi *et al*., 2009).

Ein Netzwerk geprägter Gene

Die Erkenntnisse zu krankheitsrelevanten Hypomethylierungen in verschiedenen IC1-fernen genomischen Loci und die erläuterten Hinweise auf BWS- und SRS-relevante Regionen außerhalb von Chromosom 11 stehen in Einklang mit einem Modell, das, auf murinen Daten basierend, Interaktionen geprägter Gene beschreibt. Zu denen im *„Imprinted Gene Network“* (IGN) beschriebenen interagierenden Genen zählen neben verschiedenen Chromosom 7- und 11-orthologen murinen Genen wie *Mest*, *Grb10, H19*, *Igf2* und *Cdkn1c* auch *Gnas*, *Peg3* und *Plagl1*.

Die Region, in der *GNAS* (*alpha-stimulating Guanine nucleotide-binding protein*) auf Chromosom

20q13.11 liegt, besitzt einen komplizierten Aufbau mit drei unterschiedlich differentiell methylierten Regionen (DMRs) und einer Vielzahl an überlappenden Transkripten, deren Funktionen unterschiedlich gut verstanden sind (zusammenfassend: Kelsey, 2010). Vor allem der *Imprinting*-Status des am besten bekannten Transkripts (*GNAS*) ist hochgradig gewebeabhängig, meistens findet man dessen biallelische Expression. Die restlichen Transkripte (*GNASXL*, *NESP55, GNAS1A* und *NESPAS*) werden nicht ubiquitär exprimiert, sind nur teilweise proteinkodierend und deren monoallelische Expression erfolgt auf striktere Weise (zusammenfassend: Kelsey, 2010). Mutationen im *GNAS*-Lokus sind assoziiert mit dem Auftreten des AHO-Syndroms (*Albright hereditary osteodystrophy*), das unter anderem mit Minderwuchs einhergeht (Ahrens *et al*., 2001).

PEG3 kodiert für ein Zinkfingerprotein mit Bedeutung bei Zellproliferation, Apotose und möglicher Tumorsuppressor-Aktivität (zusammenfassend: Kim *et al*., 2003 und 2009). Das Gen ist in der chromosomalen Region 19q13.43 lokalisiert, einer Domäne mit sechs weiteren geprägten Genen und drei differentiell methylierten Regionen (DMRs) (zusammenfassend: Kim *et al*., 2012). In der Maus konnte lediglich für die nahe *Peg3* gelegene DMR eine in der Keimbahn generierte, für das maternale Allel exklusive Methylierung belegt werden (Huang und Kim, 2009). Die evolutionär konservierte DMR besitzt einen repetitiven Aufbau, die einzelnen *Repeats* besitzen Motive zur methylierungssensitiven Bindung des Transkriptionsfaktors Yy1 (Kim *et al*., 2003). Murine Deletions-Versuche belegen eine Funktion der *Peg3*-DMR als methylierungssensitiver Insulator, der die Expression der geprägten Gene in der *Peg3*-Domäne reguliert (Kim *et al*., 2012). YY1 ist neben dem bereits in dieser Einleitung thematisierten CTCF das einzige Protein, das eine solche insulatorische Wirkung besitzt.

Erste Erkenntnisse zum Netzwerk geprägter Gene basieren auf Studien, bei denen die Bedeutung des paternal exprimierten geprägten Gens *Plagl1* (*Pleomorphic adenoma gene like* 1) bei der embryonalen Entwicklung untersucht werden sollte (Varrault *et al*., 2006). *PLAGL1* befindet sich auf Chromosom 6q24, kodiert für ein Zinkfingerprotein mit apoptotischer und wachstumsinhibierender Wirkung (Spengler *et al*., 1997) und wurde als putativer Tumorsuppressor beschrieben (Abdollahi *et al*., 2007). Es ist eine Vielzahl unterschiedlicher Transkripte mit scheinbar identischen Funktionen bekannt (Varrault *et al*., 1998). Varrault und Kollegen beschrieben für *Plagl1*-KO-Mäuse eine Beeinträchtigung des intrauterinen Wachstums (IUGR), veränderte Knochenbildung und eingeschränkte postnatale Lebensfähigkeit (Varrault *et al*., 2006). In einer Metaanalyse, bei der die Autoren 116 frei zugängliche, murine *micro array*-Datensets, mit dem Ziel *Plagl1*-co-exprimierte Gene zu identifizieren, verglichen, fand man dabei auf statistisch signifikante Weise überrepräsentiert Gemeinsamkeiten von *Plagl1* mit anderen geprägten Genen. Eine Fokusierung auf alle 60, in den Datensets enthaltenen, geprägten Gene und deren Verbindungen zu anderen Genen, führte zur Erstellung des IGN (Varrault *et al*., 2006). In Experimenten mit *Plagl1*-überexprimierenden und *Plagl1*-defizienten Zellen konnte die Auswirkung aberranter RNA-Mengen auf die Expression verschiedener IGN-Gene gezeigt werden. Durch *bandshift-assays* (EMSA) und Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) konnte eine Plagl1-Bindung an den *H19*-Promoter und mit höherer Affinität an einen 3´ von *H19* gelegenen *Enhancer* gezeigt werden. Transfektions-Experimente demonstrierten eine

Transaktivierung durch die Bindung an die Promotoren von *H19* und *Igf2* (Varrault *et al*., 2006). Diese Befunde werden durch die Beobachtung einer übergeordneten Funktion von PLAGL1 bei der Regulation im proximalen 11p15.5-Cluster (IC2) unterstützt (Arima *et al*., 2005). Eine Bindung von PLAGL1 an die ICR2 wirkte dabei inhibitorisch auf die Expression von *CDKN1C*. Varrault und Kollegen beschrieben mit dem IGN ein konkretes Modell zur bereits häufig vermuteten, gemeinsamen Wirkung geprägter Gene und bestimmten Plagl1 in Übereinstimmung mit älteren Daten als Regulationsfaktor des Netzwerks mit einer definierten Funktion bei der Regulation geprägter Gene in 11p15.5.

Darauffolgend gelang es, eine IGN-Untergruppe von elf dem genomischen *Imprinting* unterliegenden Genen zu identifizieren, deren Expression postnatal in verschiedenen Geweben deutlich reduziert wird (Lui *et al*., 2008). Literaturrecherchen belegten, dass nahezu alle diese Gene funktionell mit dem Körperwachstum assoziiert sind. In der IGN-Untergruppe sind sowohl wachstumsstimulierende als auch -inhibierende Gene enthalten. Beim Vergleich des postnatalen Rückgangs von Genexpression und murinem Körperwachstum ergaben sich ähnliche zeitliche Muster. Die Autoren äußerten aufgrund ihrer Daten die Theorie, dass fetales Wachstum durch mehrere geprägte Gene mit stimulierender und inhibierender Wirkung reguliert wird und deren postnatale Herunterregulation in vielen Organen koordiniert im Verbund stattfindet. Die Hypothese, dass ein Methylierungsanstieg relevanter Regionen an der Abnahme der Genaktivität beteiligt ist, wie es beispielsweise für Tumorsuppressorgene bei der Krebsentstehung bekannt ist, konnte nicht bestätigt werden. Für die untersuchten differentiell methylierten Regionen (DMRs) von *Mest*, *Peg3* und *Plagl1* konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Lui und Kollegen bestätigten mit ihren Daten die Existenz des IGN und identifizierten eine Untergruppe, deren Relevanz sie für die Wachstumsregulation eindrucksvoll darstellen konnten. Trotz des Ausschlusses der DMR-Hypermethylierung als generellen Stilllegungs-Mechanismus bei der Herunterregulation von IGN-Genen bleibt jedoch die Frage nach weiteren Regulations-relevanten Faktoren. Versuche mit transgenen Mäusen lieferten Beweise, dass die *H19*-RNA eine solche Funktion besitzt (Gabory *et al*., 2009). Hinweise auf eine Bedeutung von *H19* für die *Igf2*-Expression bestehen schon relativ lange, so konnte in murinen Kreuzungsexperimenten durch *H19*-Deletionen *in trans*-vermittelte Veränderungen der *Igf2*-Methylierung festgestellt werden (Forné *et al*., 1997). *In vitro*-Versuche mit cDNA-Transfektionen belegen sowohl für die *sense*- als auch die *antisense*-RNA von *H19* eine *Igf2*-modulierende Wirkung (Wilkin *et al*., 2000). Gabory und Mitarbeiter bestätigten die Auswirkung von *H19*-Deletionen auf die *Igf2*-Expression und darüber hinaus auch auf 5 weitere Gene des IGN (Gabory *et al*., 2009). Mit einer Ausnahme war der *H19*-Deletionseffekt auf die Expression der IGN-Gene durch Einfügen eines *H19*-Transgens reversibel. Es wurde keine Veränderung der Expression von *Plagl1* festgestellt, was verglichen mit dessen Regulatorrolle, wie sie initial von Varrault und Mitarbeitern beschrieben wurde, auf eine untergeordnete Bedeutung von *H19* schließen lässt. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand stellt das IGN eine Gruppe wachstumsrelevanter, geprägter Gene dar, deren Expression untereinander genau koordiniert wird, um kompensatorisch auf Veränderungen einzelner Bestandteile des Netzwerks reagieren zu können.

Zielsetzung der Arbeit

Die ICR1 im distalen Cluster geprägter Gene von Chromosom 11p15.5 und die dortige Bindung von CTCF sind essentielle Elemente für die korrekte Genregulation und besitzen Relevanz für Pathogenese und Entwicklung. In verschiedenen Modellen wird die Bedeutung weiterer Proteine bei der ICR1-basierten Expressionsregulation vermutet. In dieser Arbeit sollte daher neben der Analyse der ICR1-Bindung von CTCF die Bindung des neuen putativen ICR1-relevanten Faktors Kaiso gezeigt werden. Kaiso kann sowohl an methylierte CGCG- als auch an unmethylierte KBS-Sequenzen binden. Die Verwendung einer SRS-Fibroblastenzelllinie mit upd(11p15)mat ermöglichte die isolierte Betrachtung der KBS-Bindung an die unmethylierte Kontrollregion. Durch *bandshift-assays* (EMSA) und Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) sollten die Proteinbindungen nachgewiesen werden. Um die besondere repetitive Struktur der ICR1 zu beachten, sollte anschließend die genaue Bindungshäufigkeit von CTCF und Kaiso an die *Repeats* der Kontrollregion durch Einzelklon-Sequenzierung von Immunpräzipitaten analysiert werden. Auf den Nachweis und die Charakterisierung der Bindungen folgend, sollte der Effekt von CTCF und Kaiso in der ICR1 durch deren siRNA-vermittelte Herunterregulation untersucht werden. Hier wurde ebenfalls die upd(11p15)mat-Zelllinie verwendet, um separat die Effekte der Kaiso-Bindung an das unmethylierte, maternale Allel zu analysieren. Aktuelle Modelle beschreiben eine Auswirkung der CTCF-Bindungen *in cis* auf die Expression benachbarter Gene. Daher wurde sowohl die Expression von Genen des distalen (*H19* und *IGF2*) als auch des proximalen Clusters (*KCNQ1OT1* und *CDKN1C*) durch quantitative PCR (qPCR) analysiert. Mehrere Studien zeigen, dass proteinvermittelte *trans*-Kontakte der ICR1 mit Regionen anderer Chromosomen existieren. Dazu gehören krankheitsassoziierte Aberrationen auf anderen Chromosomen mit möglicher Auswirkung auf 11p15.5 und nachgewiesene *trans*-Interaktionen, die auf CTCF basieren. Zusätzlich wäre es gut vorstellbar, dass, wie für die Maus beschrieben, auch beim Menschen ein Netzwerk geprägter Gene besteht. Bestandteil dieses Netzwerks von Genen, die sich auf transkriptioneller Ebene gegenseitig beeinflussen, könnten auch die genannten 11p15.5-Gene sein. Aus diesen Gründen wurden auch mögliche Effekte der ICR1-Proteinbindung auf die Expression von orthologen humanen Genen des murinen IGN (*PLAGL1*, *GNAS*, *PEG3*, *MEST* und *GRB10*) per qPCR untersucht. Um mögliche Proteineffekte klar auf eine ICR1-Bindung zurückführen zu können, wurden die Expressionsanalysen zusätzlich bei untransfizierten Fibroblastenzelllinien durchgeführt, die eine maternale oder paternale uniparentale Disomie der Chromosom 11-Region besitzen, und daher dort entweder eine biallelische oder gar keine Proteinbindung vorliegen sollte. Darüber hinaus sollten sich durch diese Analysen auch Erkenntnisse zur möglichen Existenz eines humanen Netzwerks geprägter Gene finden lassen. Eine gleichzeitige Bindung von CTCF und Kaiso an die maternale ICR1 würde die Frage aufwerfen, ob die beiden Proteine in der Region interagierend wirken. Daher wurden neben Einzel-*knockdowns* gegen CTCF oder Kaiso auch Doppel-*knockdowns* durchgeführt, die die Herunterregulation beider Proteine bewirken.

2 Methoden und Material

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien fand in unterschiedlichen Medien mit verschiedenen Supplementen (Übersicht: 2.8.4 und 2.8.5) bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchte statt. Medienwechsel wurden nach Bedarf im Abstand von einigen Tagen durchgeführt. Bei Konfluenz der Kulturen wurden die Zellen entweder für Experimente genutzt oder eine Passagierung vorgenommen. Dafür wurden die Zellen nach dem Dekantieren des Mediums ein bis zwei Mal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (12-30 µl/cm^2, 37°C, 3´-10´) abgelöst, je nach Zellart und geplanter Verwendung zu verschiedenen Anteilen neu in Kulturgefäße eingesetzt und mit Medium aufgefüllt (0,12-0,2 ml/cm^2). Das vollständige Ablösen der Zellen durch Trypsin/EDTA wurde durch ein Lichtmikroskop kontrolliert und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von Voll-Medium mit fetalem Kälberserum (FCS) abgestoppt.

2.1.2 Kryokonservierung von Zellkulturen

Um im Verlauf der Arbeit zu verschiedenen Zeitpunkten Zugriff auf junge Zellkulturen zu besitzen und für Folgeprojekte Reserven zu besitzen, wurden Aliquote der Kulturen im Rahmen der Erstkultivierung konserviert. Die Größe der Aliquote betrug ungefähr 30-50 % der Zellmenge bei Konfluenz im jeweiligen Kulturgefäß, in dem eine Wiederanzucht stattfinden sollte. Bei Fibroblasten-Kulturen wurden i.d.R. 10^6 Zellen für die Wiederanzucht auf 175 cm^2 konserviert. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie unter 2.1.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und in PP-Röhrchen zehn Minuten bei 1200 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Medium-Überstand wurde anschließend dekantiert, die Zellen in Kryokonservierungs-Medium (jeweiliges Vollmedium mit 10 % DMSO) aufgenommen, durch behutsames Pipettieren resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Der Einfriervorgang erfolgte für ein bis drei Tage in einem Styroporgefäß bei -80°C. Anschließend wurden die Zellen in Flüssigstickstoff gelagert.

2.1.3 Anziehen von kryokonservierten Zellkulturen

Für die Wiederanzucht wurden die Zellkulturen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und zügig durch Handwärme aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in temperiertes Vollmedium (37°C) aufgenommen und in 15 ml-Falcons 5 Minuten bei 900 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert, um das DMSO im Kryokonservierungs-Medium zu entfernen. Der Medium-Überstand wurde in Folge dekantiert und das Zellpellet in temperiertem Medium (37°C) behutsam durch Pipettieren resuspendiert und ins Kulturgefäß überführt. Nach einem Tag sollte eine Kontrolle im Mikroskop erfolgen, um bei suboptimalem Anwachsen der Zellen (abgestorbene Zellen und Zelltrümmer im Medium) einen ersten Mediumwechsel durchzuführen.

2.2 RNA-/DNA-Standardmethoden

2.2.1 RNA-Isolation aus Zelllinien

Für die Expressionsanalysen verschiedener Gene wurde RNA aus transfizierten und unbehandelten Zellen isoliert. Dies wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Bei den einzelnen Arbeitsschritten kamen ausschließlich autoklavierte Einmalgefäße und sterile, gestopfte Spitzen zur Anwendung. Alle Zentrifugations-Schritte fanden bei Raumtemperatur statt, damit die Bindeeigenschaften der Silika-Membranen nicht beeinträchtigt wurden. Alle anderen Schritte mit isolierter RNA wurden auf Eis durchgeführt.

Verschiedene Zellanzahlen (maximal 10^6 pro Ansatz) lagen in 350 oder 600 µl RLT-Puffer mit 1 % ß-Mercapto-Ethanol vor. Bei Bedarf wurden die Proben wenige Minuten bei Handwärme inkubiert, um Präzipitate wieder in Lösung zu bringen. Zur Homogenisierung wurden die Ansätze auf QIAshredder-Säulen pipettiert und zwei Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Das homogenisierte Zelllysat im Sammelgefäß wurde mit einem Volumen 70 % Ethanol versetzt, durch Resuspendieren gemischt und auf RNeasy-Säulen pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation (15´´, 10.000 UpM) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit einem Volumen Puffer RW1 gewaschen (Zentrifugation: 15´´, 10.000 UpM). Um DNA-Anteile loszuwerden, wurde darauffolgend ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen) vorgenommen. Dabei wurde pro Ansatz 80 µl Verdau-Mastermix (30 Kunitz-U DNaseI (10 µl) + 70 µl RDD-Puffer) auf die Säule pipettiert und diese 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 oder 600 µl Puffer RW1 gewaschen. Zwei weitere Waschschritte erfolgten mit je 500 µl RPE-Puffer (15´´ bzw. 2´, 10.000 UpM). Um die Verschleppung von Pufferresten zu vermeiden, wurde die Säule erneut in einem frischen Sammelgefäß zentrifugiert (1´, 10.000 UpM). Zur Elution der RNA wurden 30-50 µl Wasser auf die Säule pipettiert und nach zweiminütiger Inkubation zwei Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Jeder Ansatz wurde mit 40 U RNase-Inhibitor supplimentiert und die RNA entweder bei -80°C gelagert oder nach der Konzentrationsbestimmung (2.2.2) direkt durch Reverse Transkription (2.2.3) in cDNA umgeschrieben.

2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen isolierter RNAs wurden mit einem Spektrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific) bestimmt. Dabei wurde 1 µl der RNA-Lösung zwischen die optischen Fasern des Geräts pipettiert und zwei aufeinanderfolgende Messungen bei 260 nm durchgeführt, von denen bei Deckungsgleichheit ein Mittelwert errechnet oder andernfalls erneut pipettiert und gemessen wurde. Die Konzentration wird durch eine Software des Herstellers nach dem Lambert Beerschen Gesetz ($E_\lambda = e_\lambda \times C \times D$; E_λ=Extinktionskoeffizient; e_λ=molarisch dekadischer Extinktionskoeffizient; C=Konzentration; D=Weglänge des Lichts) berechnet. Ein Abgleich der Messung erfolgte durch das Pipettieren einer Wasserprobe zu Beginn jeder Messreihe und wurde durch die Messung von Wasserproben zum Ende der Messreihe kontrolliert.

2.2.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für alle Expressionsanalysen wurde RNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde M-MLV Reverse Transkriptase (MMLV-Kit, Invitrogen) verwendet. Das poly-A-Ende der mRNA und die Verwendung eines Oligo-dT-Primers ermöglichen die Herstellung von cDNA auf Basis der RNA-Matritze. Für die Erstellung der cDNA wurden jeweils 2-5 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Zur Beseitigung der Sekundärstrukturen wurde das Gemisch zunächst 10´ bei 70°C und anschließend für wenige Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von je 1 mM aller vier dNTPs, 4 µl Dithiothreitol (DTT; 0,1 M); 0,5 µg Oligo-dT-Primer, 5x Puffer, 80 U RNase-Inhibitor und MMLV-Reverser Transkriptase in 20 µl Gesamtvolumen folgte die cDNA-Synthese in einer 100-minütigen Inkubation bei 37°C. Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch zehnminütige Inkubation bei 94°C durchgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 4°C heruntergekühlt. Zum Aufspüren eventueller DNA-Kontaminationen wurden parallel zu jedem Ansatz Reaktionen ohne reverse Transkriptase durchgeführt (RT Minus). Anschließende Test-PCRs wurden mit den genspezifischen Primern zur Absicherung anfangs immer auch mit dieser RT Minus-Probe vorgenommen. Die cDNA wurde langfristig bei -20°C und Verdünnungen zur Analyse durch PCR kurzfristig bei 4°C gelagert.

2.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und Schmelzpunktbestimmung

Quantitative PCR

Sowohl für die quantitative Analyse immunpräzipitierter DNA durch ChIP als auch für die in dieser Arbeit dargestellten RNA-Expressionsstudien bei uniparentalen Disomie-Zelllinien und nach siRNA-*knockdwons* wurde quantitative PCR (qPCR) angewendet. Bei dieser Methode wird ein Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR-Green*) genutzt, der sich an neu synthetisierte doppelsträngige DNA und cDNA anlagert und der mit einer hochauflösenden Kamera die Detektion der im PCR-Verlauf zunehmenden DNA-Menge in namensgebender „Echtzeit“ (*Real Time*) ermöglicht. Die qPCR-Reaktionen wurden mit dem LightCycler 480 II der Firma Roche durchgeführt.

Pro qPCR-Reaktion wurden 5 µl qPCR-Master-Mix (LC 480 SYBR-Green I Master, Roche) mit jeweils 5 µM *Forward*- und *Reverse*-Primer und 1 µl cDNA- oder DNA-*Template* in 10 µl Gesamtvolumen verwendet. Die Reaktionen fanden in 96-well-qPCR-Platten statt. Alle Reaktionen wurden in Doppelansätzen (Replika) durchgeführt. Nach zehn Minuten initialer Denaturierung bei 95°C folgte eine bis zu 50-fache zyklische Wiederholung der folgenden Schritte: Denaturierung bei 95°C (5´´- 10´´), Annealing bei verschiedenen Temperaturen (2´´- 10´´) und Elongation bei 72°C (3´´- 20´´). Die genauen Annealing-Temperaturen sind im Materialteil bei Listung der Oligonukleotide dokumentiert (2.8.7).

Zur Errechnung relativer Konzentrationen zu analysierender *Templates* wurden in allen Versuchen DNA- oder cDNA-Verdünnungsreihen mitamplifiziert. Bei der Quantifizierung wird für jede einzelne

Probe der *Crossing Point* (CP) ermittelt. Der CP gibt den PCR-Zyklus an, bei dem die Amplifikation ihre exponentielle Phase erreicht und die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und somit einen Zeitpunkt darstellt, der auf verlässliche Weise proportional zur initialen Konzentration einer Probe ist. Die CPs der Verdünnungsreihe werden durch das LightCycler-Programm in einem Diagramm aufgetragen, bei dem die Abzissen-Achse, die logarithmischen Konzentrationswerte und die Ordinatenachse die CPs darstellt. Die Steigung der so gewonnenen Standardkurve (*slope)* beschreibt die Kinetik der qPCR-Amplifikation und besitzt einen optimalen Wert von -3,3. Der *slope* der Standardkurve steht in Bezug mit der Effizienz der qPCR, die sich mit der Formel: $E=10^{-1/slope}$ errechnen lässt. Ein perfekter *slope* entspricht folglich einer optimalen PCR-Effizienz von 2, also einer Verdoppelung der *Template*-Menge mit jedem PCR-Zyklus. Das Mitführen einer Verdünnungsreihe dient somit zusätzlich zur Ermittlung relativer Konzentrationswerte, auch zur Bestimmung verschiedener qualitativer Reaktionsparameter. Neben den Effizienzwerten (*slope* und Effizienz) wird durch das Programm der *Error*-Wert angegeben, der den mittleren quadratischen Fehler der einzelnen Datenpunkte (hier: Replikate) zur Standardkurve darstellt. Laut Herstellerangaben soll er <0,2 sein. Eine Beurteilung der Regelmäßigkeit der Verdünnungsreihe kann über den *Link* ausgedrückt werden, der bei akkuratem Pipettieren einem Wert = 0 entsprechen sollte. Bei den verschiedenen Experimenten und Analysen wurde darauf geachtet, dass *slope* und Effizienz nicht stark variieren. Der Link sollte in allen ausgewerteten Experimenten bei 0 sein. Beim *Error*-Wert wurde auf die Einhaltung der Herstellerangaben geachtet.

Fehlerberechnung bei den qPCR-Analysen

Für die Doppelansätze (Replika) der verschiedenen qPCR-Proben wurde mittels Microsoft Excel (STABW-Funktion) oder mit der Roche Software (LC480 Software Release 1.5.0) die Standardabweichung (SD) berechnet. Der Fehlerindikator entspricht in allen Abbildungen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der sich anhand der Formel **SEM=SD/Wurzel(n)** errechnet (n, Probenanzahl). Bei den Daten zur Analyse der enzymatischen ICR1-Fragmentierung bei ChIP-Experimenten wurde für die Standardabweichung der Verhältniswerte von Standard- und Verdauansätzen die Fehlerfortpflanzung mit der Formel $\mathbf{((SD\ Standardansatz\ /\ MW\ Standardansatz)^2 + ((SD\ Verdauansatz\ /\ MW\ Verdauansatz)^2)^2}$ berechnet (MW, Mittelwert). Bei den Bindungsnachweisen durch ChIP wurde für die x-fach IgG-Werte der einzelnen ChIP-Experimente die Fehlerfortpflanzung mit der Formel $\mathbf{((SD\ Antikörper\text{-}IP\ /\ MW\ Antikörper\text{-}IP)^2 + ((SD\ IgG\text{-}IP\ /\ MW\ IgG\text{-}IP)^2)^2}$ berechnet (MW, Mittelwert; IP, Immunpräzipitation).

Schmelzpunktbestimmung

Die Temperatur, bei der ein DNA-Strang einzelsträngig wird, ist sehr variabel und hängt von Faktoren wie Stranglänge, Nukleotidabfolge und GC-Gehalt ab. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Amplifikate daher in einem Schmelzkurvenprogramm kurzfristig auf 95°C erhitzt und darauffolgend mit einer Geschwindigkeit von 2,2°C pro Sekunde von 65°C auf 95°C erhitzt. Dabei wurde kontinuierlich die mit steigender Temperatur abnehmende Fluoreszenzintensität der Ansätze gemessen. Durch die

LightCycler-Software wurde die negative Ableitung der Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Temperatur in Relation zur jeweiligen Temperatur dargestellt (-dF/dT gegenüber T). Hierbei ergeben sich amplifikatspezifische Schmelzpunktkurven, bei denen das Aufschmelzen von Abschnitten oder des ganzen Amplifikats durch einen oder mehrere Peaks angezeigt wird. Parallel zu den stets absolvierten Schmelzkurvenanalysen wurden Reaktionsansätze mit allen Primern wiederholt durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert, um die durch Sequenzdatenbank-Abgleiche erhaltenen Amplifikatgrößen kontrollieren zu können.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA- oder cDNA-Amplifikaten wurde in ein- bis zweiprozentigen Agarosegelen in 1x TBE-Laufpuffer durchgeführt. Zu den DNA- und cDNA-Lösungen wurden etwa ein Viertel Orange G-Laufpuffer (5x) gegeben. Die Auftrennungen fanden mit verschiedenen DNA-Längen-Standards bei 90-130 V statt. Die Agarosegele wurden in Ethidiumbromid-Lösung für 10-20 Minuten gefärbt und anschließend 5 bis 20 Minuten in Wasser entfärbt, so dass die Detektion der Nukleinsäuren mit Hilfe von ultraviolettem Licht erfolgen konnte.

2.3 Protein-Standardmethoden

2.3.1 Fraktionierte Proteinextraktion

Proteinextraktion von Zytoplasma- und Nukleus-Fraktionen wurde sowohl für *Western blot* als auch für EMSA-Experimente durchgeführt. Dafür wurden konfluente Zellen in 15 cm-Schalen zunächst zwei Mal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem starren Zellschaber gelöst. Danach wurden die Zellen für 10´ bei 4°C mit 4000 UpM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5´ bei 4°C mit 4000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl frisch supplimentierten Lysepuffer I resuspendiert und für 10´ auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Spritze (1 ml Volumen) mit Kanüle (20G) mit Lysepuffer I gespült und das Zelllysat nach der zehnminütigen Inkubationszeit vier Mal schnell aufgezogen und zurück ins Reaktionsgefäß gespritzt. Darauf folgte wiederum eine Zentrifugation (3´, 4°C, 4000 UpM). Der Überstand (Proteinfraktion aus dem Cytoplasma) wurde abgenommen und bei Bedarf gelagert (-20°C). Das Pellet aus Nuklei wurde anschließend zwei Mal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen (Zentrifugation: 2´, 4°C, 4000 UpM) und in frisch supplimentiertem Lysepuffer II resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 20´ bei 4°C auf einem Rad-Inkubator (*end over end*). Nach einer finalen Zentrifugation (7´, 4°C, 14000 UpM) wurde der Überstand mit der nukleären Proteinfraktion abgenommen, kurzzeitig auf Eis gelagert und die Konzentration bestimmt (2.3.2). Die längerfristige Lagerung muss bei -80°C erfolgen. Um Qualitätseinbußen durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren vorzubeugen, sollte der Extrakt vor dem Wegfrieren in bedarfsgerechten Portionen alliquotiert werden.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Konzentrationsbestimmung aller Proteinextrakte wurde durch den Bradford-Test durchgeführt. Dafür wurde 1 µl Proteinextrakt in 800 µl destilliertem Wasser aufgenommen und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach dem Mischen durch Invertieren und einer fünfminütigen Inkubation bei RT erfolgte die Messung im Photometer bei 595 nm. Vor der Probenmessung wurde auf eine Kontrolle mit 200 µl Wasser und 800 µl Bradford-Reagenz abgeglichen. Die Konzentrationswerte für die Proben wurden anhand einer Eichgeraden (BSA-Verdünnungsreihe) ermittelt.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Art der Elektrophorese werden Proteine unter Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine und führt zu einer konstanten Ladungsverteilung, so dass die elektrische Auftrennung der Proteine ausschließlich aufgrund der negativen Ladung des SDS und somit abhängig von der Molekülgröße beim Durchwandern des Gels stattfindet. Die Auftrennung wurde diskontinuierlich vollzogen, da die Proteine zuerst ein weitporiges Sammelgel durchwanderten, auf das ein Trenngel mit engeren Poren folgte. Die in 2x Ladepuffer gelösten Proteine wurden durch Aufkochen (8´) denaturiert, kurz zentrifugiert, um die Lösung zu sammeln, und in jede Gelspur 70 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zu Beginn wenige Minuten bei 90 V und anschließend für 1-1,5 h bei 100 V.

2.3.4 *Western blot*

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden sie mittels *Western blot* auf eine Membran transferiert. Das PAGE-Gel, die Nitrocellulose-Membran, WB-Filterpapiere und Schwamm-Pads der Blotting-Apparatur wurden zu Beginn in WB-Transferpuffer inkubiert. Die Handhabung der Membran sollte, um Schäden daran zu vermeiden, ab diesem Moment nur noch mit einer Pinzette erfolgen. Für den *Western blot* wurde ein Tank-System der Fa. Biorad verwendet. Der Aufbau des Blots wurde folgendermaßen vorgenommen:

Anode → Schwamm-Pad → 2 x Filter-Papier → Nitrozellulose-Membran → SDS-PAGE Trenngel → Filter-Papier → Schwamm-Pad → Kathode

Die derart zusammengesetzte „Blotkassette“ wurde in das vorgekühlte Elektrodenmodul eingesetzt, dieses mit vorgekühltem Transferpuffer befüllt und eine vorbereitete Kühleinheit mit Eis daraufgesetzt. Eine gleichmäßige Kühlung der *Western blot*-Einheit wurde zudem durch Vermischung mittels Magnetrührer erreicht. Der Blot erfolgte für etwa 1 h bei 350 mA. Daraufhin wurde der Molekulargewicht-Standard mit Fettstift auf die Membran übertragen und das Gel verworfen.

2.3.5 Antikörperdetektion von Proteinen im *Western blot*

Im Anschluss an den *Western blot* sollten einzelne Proteinfraktionen durch Antikörper nachgewiesen werden. Dafür wurde die Nitrozellulose-Membran in Stücke zerteilt, die den einzelnen Laufspuren

entsprachen, und diese abhängig vom zu verwendenden Antikörper in PBS-Tween (0,05 %) oder TBS-Tween (0,1 %) mit Magermilchpulver oder BSA (50 mg/ml) für eine Stunde unter ständigem Schütteln geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den spezifischen Erst-Antikörpern gegen CTCF oder Kaiso in den jeweiligen Block-Lösungen. Vom CTCF-Antikörper (Ab70303) wurden 0,03 µg/ml in PBS-Tween-Magermilch, vom Kaiso-Antikörper (Ab12723) 1 µg/ml in TBS-Tween-Magermilch eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht entweder in 5 ml Gesamtvolumen in einem 50 ml-PP-Röhrchen auf dem Rollenmischer oder in einer abgedeckten Schale mit 15 ml Gesamtvolumen unter ständigem Schütteln. Ungebundene Antikörper wurden am nächsten Tag von den Membranen entfernt, indem diese drei Mal für 45´ mit TBS-Tween oder PBS-Tween bei RT gewaschen wurden. Daraufhin fand eine Inkubation mit passendem Sekundär-Antikörper (HRP-gekoppelter α-rabbit oder α-mouse) in der Konzentration 1:5000 im jeweiligen Blockpuffer für 1 h bei RT statt. Danach wurden die Membranen drei Mal 15 Minuten mit TBS-Tween oder PBS-Tween bei RT gewaschen. Es folgte ein abschließender zehnminütiger Waschschritt in TBS oder PBS.

Die Detektion der Proteine fand anhand der an den sekundären Antikörper gekoppelten *horseradish* Peroxidase (HRP) statt. Durch die Oxidation von Luminol, welche von HRP zusammen mit H_2O_2 katalysiert wird, gerät Luminol in einen angeregten Zustand und ist chemolumineszent. Die Chemolumineszenz kann mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden. Dadurch können die Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht werden. Zur Detektion wurde die Membran 2 Minuten in ECL-Lösung inkubiert, anschließend in Plastikfolie gehüllt und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Detektion der Proteinbanden fand in der Dunkelkammer durch ein- bis dreiminütiges Auflegen eines Röntgenfilms statt.

2.4 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem LowCell-Kit der Firma Diagenode durchgeführt. Das mitgelieferte Protokoll wurde den speziellen Anforderungen entsprechend modifiziert. Eine schematische Übersicht der einzelnen Schritte des verwendeten ChIP-Protokolls findet sich am Ende dieses Kapitels (Abbildung 2-1 A).

2.4.1 Ablösen der Zellen und Fixierung des Chromatins

Für die ChIP wurde Chromatin aus upd(11p15)mat-Fibroblasten-Zelllinien verwendet. Um Bindungen von Proteinen und DNA für das weitere Prozedere zu stabilisieren, wurde zunächst eine Fixierung durchgeführt. Die Zellen wurden durch Trypsin abgelöst (2.1.1) und die Reaktion mit Standardmedium ohne FCS inhibiert. Jeweils 10^6 Zellen wurden in einem 15 ml-PP-Röhrchen portioniert und pelletiert (Zentrifugation: 5´, 1300 UpM, RT). Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS gelöst und die Lösung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von 1 % Formaldehyd und einer achtminütigen Inkubation, nachdem der Ansatz kurz gevortext wurde. Das Abstoppen der Fixierungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 125 mM Glycin, kurzem Vortexen und fünf Minuten Inkubation. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen durch Zentrifugation (10´, 470 g, 4°C, langsames

Auslaufen des Rotors) gesammelt und der Überstand bis auf einen geringen Rest abgezogen. Die Zellpellets wurden entweder direkt in Experimenten verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.4.2 Zelllyse und Chromatinfragmentierung durch Ultraschall

Alle Schritte dieses und der folgenden Experiment-Teile erfolgten nach Möglichkeit auf Eis. Alle verwendeten Puffer wurden mit Proteinase-Inhibitormix (Diagenode) versetzt. Die fixierten Zellpellets (2.4.1) wurden jeweils in 500 µl PBS durch leichtes Vortexen und Resuspendieren mit großem Spitzenlumen gelöst und zwei Mal gewaschen (Zentrifugation: 10´, 470 g, 4°C, langsames Auslaufen des Rotors). Nach dem letzten Waschen wurden jeweils 2 x 10^5 Zellen in 130 µl Puffer B, bei dem sich das SDS vollständig in Lösung befinden muss, aufgenommen und in 0,5 µl-Reaktionsgefäße transferiert. Für die Ultraschall-Fragmentierung wurden die Gefäße in der Schallkammer eingespannt, in ein Eiswasserbad gesetzt und die Sonde zentral in der Lösung platziert, um die Gefahr eines Hochkochens der Ansätze zu minimieren. Die Fragmentierung erfolgte bei 35 % Amplitude in drei Zyklen á 25 Sekunden mit jeweils 59 Sekunden Pause. Im Anschluss wurden die Ansätze in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen jeweils mit 870 µl Puffer A aufgefüllt und für die Immunpräzipitation verwendet.

2.4.3 Aufreinigung von fixiertem, mittels Ultraschall-fragmentiertem Chromatin

Zur Überprüfung der Chromatinfragmentierung (2.4.2) wurden Ansätze in Puffer B nach der Ultraschallbehandlung mit Wasser auf 300µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gevortext und 10´ bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 UpM (RT), bei der sich verschiedene Phasen im Reaktionsgefäß bilden sollten. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) durch Vortexen gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase erneut in einem frischen Reaktionsgefäß mit 2,5 Volumen Ethanol und einem Zehntel NaAcetat (3M) in flüssigem Stickstoff gefällt. Nach Zentrifugation (45´, 4°C. 13.000 UpM) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet nochmals mit 70% Ethanol gewaschen (10´, 4°C. 13.000 UpM). Daraufhin wurde das Pellet einige Minuten kopfüber bei Raumtemperatur und anschließend zehn Minuten bei Wärme in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 10µl Wasser gelöst und elektrophoretisch im Agarose-Gel (1,5%) aufgetrennt.

2.4.4 Bindung von Antikörper und magnetischen *beads*

Für jeden ChIP-Ansatz wurden 7,35 - 11 µl *beads* zwei Mal mit Puffer A gewaschen (Zentrifugation: 5´, 1300 UpM, 4°C). Die gewaschenen *beads* wurden in 90 µl Puffer A aufgenommen und in 200 µl Reaktionsgefäße überführt. Zu den Ansätzen wurde entweder Antikörper oder IgG-Mix pipettiert (αCTCF: 2 µg, αKaiso: 10-15 µg, IgG: 1,5 µg) und diese mindestens zwei Stunden auf einem Rad inkubiert (40 UpM, 4°C). Anschließend wurden die AK-*bead*-Komplexe durch einen magnetischen Ständer aufgereinigt und direkt für die Immunpräzipitation verwendet. Einmalig wurden die

gewaschenen *beads* zu bereits mit Antikörpern inkubiertem Chromatin gegeben.

2.4.5 Magnetische Immunpräzipitation und Waschschritte

Zu den aufgereinigten AK-*bead*-Komplexen (2.4.4) wurde jeweils ein Zehntel des geschallten Chromatinansatzes (2.4.2) pipettiert, der 2 x 10^4 Zellen entsprach. Die Inkubation erfolgte in drei Zyklen (5 Minuten auf Eis + 10 Minuten im Ultraschall-Eiswasserbad) oder in einem Fall für drei Stunden auf einem Rad-Inkubator (*end over end*, 40UpM) bei 4°C. Zwischen den Inkubationsschritten auf Eis und im Wasserbad wurden die Reaktionsgefäße mehrmals invertiert. An dieser Stelle wurde auch ein Zehntel des geschallten Chromatins (2.4.2) als *input*-Kontrolle entnommen und bis zur gemeinsamen Aufreinigung mit den Immunpräzipitationen bei 4°C gelagert.

Die gebildeten Immunkomplexe wurden in einem magnetischen Ständer aufgereinigt und jeder Ansatz in 100 µl Puffer A aufgenommen. Die Ansätze wurden halbiert und die beiden Hälften entweder direkt auf einem Rad-Inkubator drei Mal mit Puffer A sowie ein Mal mit Puffer C gewaschen (Puffervolumina: 50 µl, Inkubation: 4 Minuten, 40 UpM, 4°C) oder davor einem enzymatischen Verdau (2.4.6) unterzogen.

2.4.6 Enzymatischer Verdau von Immunkomplexen

Zur vollständigen Trennung der einzelnen B-*Repeats* wurde ein enzymatischer Verdau mit verschiedenen spezifischen Restriktions-Endonukleasen vorgenommen (Abbildung 2-1 B). Für den Verdau wurden die Immunkomplexe in Puffer zunächst im Magnetständer aufgereinigt und anschließend in je 50 µl Verdauansatz (Puffer NEB 4 mit BanI (40 U), PvuII (20 U), DdeI (20 U)). aufgenommen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im PCR-Gerät. Alternativ wurde ein reduzierter Verdau (2 h) unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach der Verdau-Inkubation wurden alle Ansätze gewaschen (2.4.5) und die DNA daraus aufgereinigt (2.4.7).

2.4.7 DNA-Aufreinigung aus Immunpräzipitaten

Zur DNA-Aufreinigung wurden die Ansatzhälften jeweils in 50 µl *purifying slurry* aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Zur Aufreinigung des *inputs* wurden davon 100 µl mit gleichem Volumen *slurry* versetzt. Darauf wurden alle Proben zehn Minuten gekocht und anschließend wenige Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach erfolgte ein Verdau mit Proteinase K im Thermomixer (30 Minuten, 1000 UpM, 55°C). Pro Ansatz-Hälfte wurden dabei 0,5 µl und für den *input* 2 µl Enzym-Stock aus dem Kit verwendet. Nach dem Verdau wurden die Proben erneut zehn Minuten gekocht. Darauf folgte eine einminütige Zentrifugation bei 12.000 UpM und 4°C. Anschließend wurde aus den Verdau-Hälften 25 µl und aus dem *input* 150 µl Überstand abgenommen. Zu den Ansatz-Hälften wurde darauffolgend 50 µl Wasser zugegeben, kurz gevortext, erneut zentrifugiert und anschließend 50 µl Überstand daraus mit den ersten 25 µl vereint. Die *input*-Kontrollen wurden 1:10 oder 1:100 verdünnt. Alle Proben wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt durch qPCR analysiert. Zur quantitativen Beurteilung der immunpräzipitierten ICR1-*Repeats* wurden Primer

genutzt, die ein Amplifikat innerhalb der vollständigen B-*Repeats* produzieren (B-intra, Abbildung 2-1 C). Durch die Verwendung von Primern, die eine Amplifikation über die *Repeat*-Grenzen ermöglichen, (B-inter) war es möglich, die Effizienz des enzymatischen Verdaus zu bewerten (Abbildung 2-1 C).

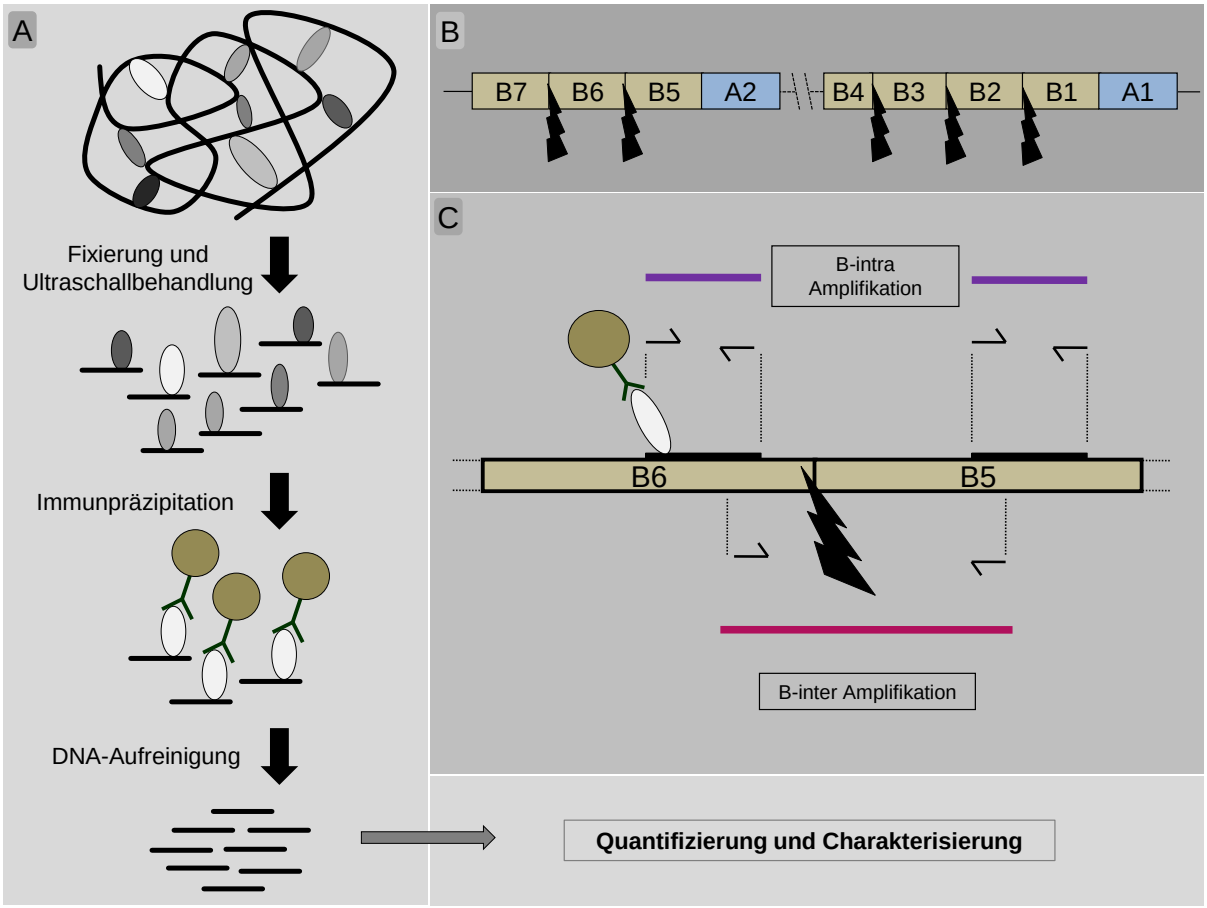


Abbildung 2-1: Übersicht zu Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) und *Repeat*-Fragmentierung

Die Abbildung stellt die einzelnen Schritte der ChIP schematisch dar. **A**: Das Chromatin im Zellkern wird nach Formaldehyd-Fixierung durch Ultraschallbehandlung statistisch fragmentiert. Darauf folgt die Immunpräzipitation, die zu einem Komplex aus *bead*-Antikörper gebundenem Zielprotein mit einem DNA-Fragment führt. **B**: Die Trennung der B-*Repeats* erfolgt durch den Verdau mit einem Mix aus Restriktions-Endonukleasen. **C**: Die so angereicherten DNA-Fragmente stehen nach der Aufreinigung für die weitere Analyse durch qPCR mit *Repeat*-internen Primern (B-intra) zur Verfügung. Durch *Repeat*-übergreifende Primer (B-inter) wird der notwendige Verdau zur Vereinzelung der B-*Repeats* kontrolliert.

2.5 Einzelklon-Sequenzierung nach ChIP

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Immunpräzipitierte DNA aus den ChIP-Experimenten wurde mit einer thermostabilen Polymerase (Taq) und Oligonukleotiden (Primer) vervielfätigt, die spezifisch für Sequenzen innerhalb aller vollständigen B-*Repeats* außer B7 (B-intra) sind (Abbildung 2-1 C). Pro PCR-Reaktion wurde 5 µl aufgereinigte ChIP-DNA in 50 µl-Ansätzen verwendet. Ein PCR-Ansatz bestand aus 10x PCR-Puffer, 20 µM dNTPs, je 5 µM Primer, 5 % Glycerol und 3 µl der laboreigenen Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikationen in verschiedenen PCR-Geräten (PTC 100 und 200, MJ

Research) bestand aus fünf Minuten initialer Denaturierung der DNA bei 94°C, zyklischen 40-fachen Wiederholungen von drei einminütigen Phasen (Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 60°C, Elongation bei 72°C), einer abschließenden drei- bis fünfminütigen Elongation bei 72°C und dem Herunterkühlen der Ansätze auf 4°C. Bei allen PCR-Reaktionen wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen Wasser anstelle von DNA verwendet wurde. Dies diente der Detektion von DNA-Kontaminationen in den verwendeten Reaktions-Materialien. Zur Überprüfung der Größe der amplifizierten Produkte wurden 5 µl bis 7,5 µl der PCR-Redaktion in 1,5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5) und durch Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.5.2 Fällung der DNA aus PCR-Reaktionen

Für die Aufreinigung von DNA aus den PCR-Reaktionen wurde eine kalte Ethanol-Fällung durchgeführt. Dafür wurde der restliche PCR-Ansatz mit Wasser auf 300 µl aufgefüllt, ein Zehntel Volumen Na-Acetat (3M, pH 5,2-5,5) und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für etwa drei Sekunden in N_2 gehalten und für 45 Minuten bei 14.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit Ethanol (70 %) bei Raumtemperatur gewaschen. Die Trocknung des Pellets erfolgte erst für etwa zehn Minuten bei Raumtemperatur und dann für 10 - 20 Minuten in einer Vakuumzentrifuge bei leichter Erwärmung. Abschließend wurde das Pellet in 4 µl Wasser gelöst.

2.5.3 Ligation und Transformation

Die Ligation der gefällten Amplifikate (2.5.2) wurde mit dem TOPO TA Cloning-Kit (Invitrogen) durchgeführt. Ein Ligationsansatz bestand aus 4 µl Amplifikat, 1 µl Salt Solution und 1 µl pCRII-TOPO-Vektor (entspricht 1 ng), die in einem Rundboden-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und vorsichtig gemischt wurden. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz entweder direkt in der Transformation verwendet oder für kurze Zeit auf Eis gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente DH5α-Bakterien verwendet, die zu dem kompletten Ligations-Ansatz gegeben wurden. Darauf erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, ein einminütiger Hitzeschock im Wasserbad (42°C) und eine einminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 1 ml auf 37°C temperiertem LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) aufgenommen und etwa eine Stunde in den Schüttelinkubator (220 UpM, 37°C) gestellt. Nach dieser Inkubation wurden 50 - 200 µl Transformations-Ansatz auf 10 cm-Kulturschalen mit LB-Agar mit Ampicillin (0,1 mg/ml) XGal (40 µg/ml) und IPTG (0,05 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.4 Animpfen von Einzelklon-Kulturen und Vektorrand-PCR

Nach der Inkubationsphase über Nacht sollten in den Agar-Schalen einzelne Bakterienkolonien gewachsen sein. Durch Blau-Weiß-Selektion konnte die Transformation mit dem korrekten Vektor

kontrolliert werden. Weiße Kolonien sollten eine Transformation mit dem pCRII-TOPO und B-intra-Ligat signalisieren. Um die Farbunterschiede der einzelnen Kolonien zu intensivieren, wurden die Kulturschalen für etwa eine Stunde zu 4°C gestellt. Anschließend wurden einzelne weiße Kolonien mit frischen sterilen Pipettenspitzen gepickt und die Spitzen in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit jeweils 100 µl LB-Medium mit Ampicillin getaucht. Darauf folgte eine zwei- bis dreistündige Inkubation im Inkubator bei 37°C.

Mit den Einzelklon-Kulturen wurde anschließend eine Vektorrand-PCR mit M13-Primern in 96-Well-PCR-Platten durchgeführt, um die einligierten Amplifikate zu vervielfältigen. Dadurch konnte die Ligation des richtigen Ligats in die transformierten Vektoren verifiziert werden. Bei dem verwendeten pCRII-TOPO-Vektor und dem einligierten B-intra-Amplifikat sollten bei erfolgreicher Ligation durch die M13-Primer ein 394 bp-Produkt entstehen. Pro PCR-Reaktion wurde 1 µl Kultur verwendet. Ein PCR-Ansatz bestand aus 10x PCR-Puffer, 30 µM dNTPs, je 15 µM M13-Primer und 3 µl der Labor-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikationen in verschiedenen PCR-Geräten (PTC 100 und 200, MJ Research) bestand aus drei Minuten initialer Denaturierung der DNA bei 95°C, zyklischen 40-fachen Wiederholungen von drei einminütigen Phasen (Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 58°C, Elongation bei 72°C), einer abschließenden sechsminütigen Elongation bei 72°C und dem Herunterkühlen der Ansätze auf 4°C. Bei den PCR-Reaktionen wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen LB-Medium mit Ampicillin anstelle von Kultur verwendet wurde. Dies diente der Detektion von DNA-Kontaminationen in den verwendeten Reaktions-Materialien. 5 bis 10 µl der PCR-Reaktionen wurden in Agarosegelen (1,5 %) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.5.5 Aufreinigung von Vektor-DNA und Sequenzierung

Aufreinigung von Vektor-DNA (ExoSAP)

Aus den Kulturen, bei denen die Transformation eines korrekt ligierten Vektors stattgefunden hatte, wurde im Anschluss DNA für die Sequenzierung aufgereinigt. Dafür wurde eine einfache Methode unter Verwendung von Exonuklease I und *shrimp alcaline phosphatase* (SAP) angewendet. Die Exonuklease zerstört noch bestehende Primer, wohingegen die Phosphatase die verbliebenen dNTPs abbaut. 20 µl Kultur wurden mit 4 U Exonuklease I und 0,8 U SAP in 25 µl Gesamtvolumen gemischt und 30 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 85°C im PCR-Gerät inkubiert. Nach dem Herunterkühlen wurden die Ansätze in die Sequenzierreaktion eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wurden 5 µl aus dem ExoSAP-Ansatz, 1 µl BigDye-Sequenziermix, 1 µl Sequenzierpuffer und 5 µM M13-*Forward*-Primer in 10 µl Gesamtvolumen gemischt und in die Vertiefungen einer 96-Well-Sequenzierplatte pipettiert. Die Sequenzierreaktionen in verschiedenen PCR-Geräten (PTC 100 und 200, MJ Research) bestanden aus einer Minute initialer Denaturierung

bei 96°C, zyklischen 25-fachen Wiederholungen von drei Phasen (zehn Sekunden 96°C, fünf Sekunden 50°C, vier Minuten 60°C) und dem Herunterkühlen der Ansätze auf 10°C.

Fällung der Sequenzierreaktion

Für die Fällung der Sequenzierreaktionen wurde eine Lösung mit 83,3 % Ethanol und einem Zehntel Natriumacetat (3M, pH 5,2-5,5) mit HPLC-Wasser erstellt. Zu jedem Reaktions-Ansatz wurden 62 µl zupipettiert und durch einminütiges Vortexen gemischt. Im Anschluss wurde 70 - 90 Minuten bei 3200 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgegossen und anhaftende Tröpfchen durch intensives Ausklopfen auf einem Tuch entfernt. Danach wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 45´, 3200 UpM, RT), wiederum abgegossen und ausgeklopft und die Platte für etwa 15 Minuten auf dem Heizblock getrocknet. Wenn die Proben nicht direkt gelöst und auf das Sequenzier-Gel aufgetragen wurden, fand die Lagerung mit Folie abgedeckt bei -20°C statt. Zum Lösen wurde pro Reaktion 15 µl Formamid zupipettiert und durch Resuspendieren gemischt. Die Auftrennung im Sequenzier-Gel und Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde im ABI Genetic Analyzer 3130 durchgeführt.

Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzauswertung erfolgte mit dem Sequencher-Programm (Gene Codes, USA). Die einzelnen Sequenzen wurden verglichen und mit Hilfe von *Repeat*-spezifischen Nukleotiden den B-*Repeats* 1-6 zugeordnet. Die relative Anzahl der Einzelklone mit *Repeat*-spezifischer Sequenz führte zur Ermittlung der relativen Bindungshäufigkeit der untersuchten Proteine an die einzelnen B-*Repeats*.

2.6 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Beim EMSA sollen Proteinbindungen an die DNA durch die Inkubation von künstlichen Oligonukleotiden mit Proteinextrakten nachgewiesen werden. Alle Oligonukleotid-Verdünnungsschritte erfolgten mit 1x TE-Puffer. Die Lagerung von Vorräten fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide (20 pmol) wurde generell bei -20°C in braunen lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen durchgeführt, Arbeitsverdünnungen (0,33-0,66 pmol) wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Das *Annealing* von Fluoreszenz- und unmarkierten (IRDye^{TM}) Oligonukleotiden (Metabion) fand durch langsames Abkühlen (1 Stunde bis ü.N.) nach einer fünfminütigen Inkubation im PCR-Gerät bei 95°C statt. Dabei ist zu beachten, dass das Gerät nach den 5 Minuten direkt ausgeschaltet werden sollte, um die automatische Kühlung zu unterbinden. Für das *Annealing* wurden gleiche Anteile an *Forward*- und *Reverse*-Strängen in Gesamtvolumina von 10 - 60 µl in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. 0,33 - 0,66 pmol markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid (Sonde) wurde mit 0,5 - 2 µl HEK293-Nukleärextrakt, 1 µl Bindepuffer; 0,25 mmol DTT; 0,25 % Tween; 0,025 µg Lachssperma und 15 ng dIdC in 10-13,5 µl Volumen experimentabhängig auf verschiedene Weisen inkubiert. Bei Reaktionen mit Antikörpern und relevanten Kontrollen wurde zunächst Nukleärextrakt, Bindepuffer, Tween, DTT und zusätzlich 0,01 µg BSA mit 4 ug Antikörper (αKaiso, αHIF1α) und 4 µl IgG-Mix (Diagenode) für

30´ bei RT inkubiert und anschließend mit dIdC, Lachssperma und Sonde auf Eis für 20´ belassen. In Kompetitions-Experimenten wurde zuerst Nukleärextrakt mit Bindepuffer, DTT und Tween für 20´ bei RT inkubiert und in einem zweiten Schritt Lachssperma, dIdC und Kompetitor in verschiedenen Überschüssen auf Eis für 15´ zugegeben. Zum Abschluss erfolgte nach Zugabe der Sonde noch eine Inkubation auf Eis für 15´. Die einzelnen Reaktionen wurden mit jeweils 1,5 - 2 ul OrangeG-Laufpuffer versetzt, auf ein natives Polyacrylamidgel (4,7 %) aufgetragen und bis zum Auslaufen des Puffers elektrophoretisch aufgetrennt (70´ bei 90V). Das Scannen der Gele in den Glasplatten (Biorad, TetraCell) fand in der Regel mit den Einstellungen *Resolution*: 169 µm, *Quality*: medium, *Intensity*: 6-8 mit einem Laser-Scanner (Licor Odyssey) statt. Nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit der Software des Herstellers.

2.7 Transfektion humaner Zellkulturen

Die Herunterregulation von *CTCF*-und *Kaiso*-RNA in upd(11p15)mat-Fibroblasten wurde durch Lipid-basierte siRNA-Transfektion durchgeführt. Dafür wurden 20 Stunden vor Transfektions-Beginn 170.000 Zellen in 6cm-Zellkulturschalen mit Standard-Medium ohne Penicillin/Streptomycin ausplattiert. Beim Verteilen der zuvor durch Trypsin/EDTA abgelösten Zellen muss größter Wert auf ausreichende Homogenisierung gelegt werden. Zum Transfektions-Zeitpunkt sollten die Zellen zwischen 50 % und 75 % Konfluenz aufweisen. Für die einzelnen Transfektions-Ansätze wurden jeweils 250 µl OMEM-Medium ohne Zusätze mit 8 µl Reagent plus und 15 µl siRNA (Konzentration: 300 µM/Ansatz) gemischt. In dieser Arbeit wurden immer zwei unterschiedliche siRNAs (Teile A und B) zu gleichen Teilen für jede Ziel-mRNA verwendet. Bei den *Kaiso-knockdowns* wurden in verschiedenen Experimenten bezüglich Sequenz und Hersteller unterschiedliche siRNAs eingesetzt (K-Q: Qiagen, K-S: SABiosciences). Für die Doppel-*knockdown*-Ansätze, die gegen *CTCF* und *Kaiso* gerichtet waren, wurde die gleiche siRNA-Gesamtmenge verwendet und dementsprechend jeweils halbierte siRNA-Mengen für jede Ziel-mRNA. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 12 µl Lipofectamine 2000 und 2 ml OMEM-Medium ohne Zusätze zupipettiert und die Lösung für weitere 15 - 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Ende der Inkubationszeit wurden die tags zuvor ausplattierten Zellen zwei Mal mit PBS und ein Mal mit OMEM gewaschen und anschließend 760 µl Medium aufgefüllt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektions-Mix unter ständigem Schwenken der Zellkulturschale in einzelnen Tropfen auf die Zellen pipettiert. Als Negativkontrolle für die *knockdown*-Experimente wurde anstatt siRNAs mit jeweiligen Ziel-mRNAs eine *scrambled locus* siRNA verwendet, die in gleicher Konzentration eingesetzt wurde. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit OMEM, supplimentiert mit 4 % FCS. Nach 96 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das Ablösen der transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion erfolgte durch einen Zellschaber. Die Zellen wurden in RLT-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) mit 1 % ß-Mercaptoethanol aufgenommen und bis zur gemeinsamen RNA-Aufreinigung (2.2.1) aller Ansätze eines Versuchs bei -20°C gelagert.

2.8 Material

2.8.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	Applichem (Darmstadt, D)
Agarose	Starlab (Ahrensburg, D)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm, D)
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Bacto-Agar	BD (Le Pont de Claix, F)
ß-Mercaptoethanol	Biorad (München, D),Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Bradford-Reagenz	Biorad (München, D)
BSA (WB)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
BSA (EMSA)	NEB
DTT (Dithiothreitol)	Roth (Karlsruhe, D)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Applichem (Darmstadt, D)
Ethanol	Applichem (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, D), QBiogene
Formaldehyd (Methanol-frei, 16%)	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Formaldehyd (37%)	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Formamid (Hi-Di)	Applera (D)
Glycerol	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Glycin	Roth (Karlsruhe, D)
HPLC-Wasser	Merck (Darmstadt, D)
IPTG	Applichem (Darmstadt, D)
Iso-Propanol	Merck (Darmstadt, D)
Iso-Amylalkohol	Merck (Darmstadt, D)
Lachssperma	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Natrium-Chlorid	Roth (Karlsruhe, D)
NP40 (fraktionierte Proteinextraktion)	LKB Bromma
OrangeG	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
PMSF	Roth (Karlsruhe, D)
Poly-Acrylamid (Rotiphorese Gel 30; 37,5:1)	Roth (Karlsruhe, D)
poly-dIdC	Thermo Scientific
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Gerbu (Gaiberg, D)
Sucrose	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
TEMED	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Tris	Roth (Karlsruhe, D)

Tris-HCl	Roth (Karlsruhe, D)
Tween20	Merck (Darmstadt, D)
X-Gal	Applichem (Darmstadt, D)

2.8.2 Lösungen und Puffer

Lösung	**Ansatz**
Agarosegel (x-prozentig)	x g Agarose / 100 ml 1x TBE
Ampicillin	Stammlösung: 10 mg/ml aqua dest.
APS (10%)	1 g APS / 10 ml aqua dest.
Bindepuffer (10x, EMSA)	100mM Tris, 500mM NaCl, 10mM DTT (pH 7,5)
Block-Lösung (WB)	TBS-Tween oder PBS-Tween, 50 mg/ml BSA oder Magermilchpulver
BSA-Lösung (EMSA, fertig von NEB)	10 mg/ml
DTT-Tween-Lösung (EMSA)	2,5% Tween20, 25mM DTT
Ethidiumbromid-Färbelösung	2mg / 1 l aqua dest.
Glycin (10x)	1,25 M
Laufpuffer (EMSA, TGE-Puffer)	25mM Tris, 192 mM Glycin, 10mM EDTA
Laufpuffer (10x, WB)	24.8mM Tris, 192mM Glycin, 1% SDS
LB-Agar	15g Bacto-Agar auf 1l LB-Medium (autoklavieren)
LB-Agar (mit Ampicillin, X-Gal, IPTG)	100mg Ampicillin, 40mg X-Gal-Lösung, 0,048g IPTG in 1l handwarmen (ca. 50°C) LB-Agar
LB-Medium	10g Bacto-Tryptone, 5g Bacto Yeast-Extract, 10g NaCl auf 1l aqua dest. (autoklavieren)
LB-Medium mit Ampicillin	1g Ampicillin pro ml LB-Medium
NEB-Puffer 4	50 mM Na-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesium-Acetat, 1 mM DTT (pH 7,9)
OrangeG-Laufpuffer (5x, Agarosegel)	15g Sucrose; 0,175g OrangeG in 50ml aqua dest
OrangeG-Laufpuffer (10x, EMSA)	1,3g Sucrose; 0,006g OrangeG, 20µl 1M Tris, 40µl 0,5M EDTA in 2ml aqua dest.
PBS	1,36M NaCl, 27mM KCl, 43mM Na_2HPO_4, 14,7mM KH_2PO_4
PBS-Tween	PBS-Puffer mit 0,05 % Tween 20
PBS-Tween-Magermilch	50 mg Magermilch-Pulver pro ml PBS-Tween
PCR-Puffer (10x)	500mM KCl, 100mM TrisHCl pH 8,3; 15mM $MgCl_2$
Protein-Ladepuffer (6x)	350mM Tris-HCl (pH 6,8); 34,4% Glycerol, 10% SDS, 10% ß-Mercaptoethanol; 0,06% Bromphenolblau
Protein-Lysepuffer I	10mM Hepes/KOH (pH 7,9), 1,5mM MgCl2, 10mM KCl **pro ml frisch supplimentieren:** 20µl Proteinase-InhibitorMix Roche complete (50x), 1µl Benzonase (1:1000), 5µl DTT (0,1M), 10µl NP40 (25%)

Protein-Lysepuffer II	20mM Hepes/KOH (pH 7,9); 1,5mM MgCl2, 420mM NaCl; 0,2mM EDTA, 25 % Glycerin **pro ml frisch supplimentieren:** 20µl Proteinase-InhibitorMix Roche complete (50x), 1µl Benzonase (1:1000), 5µl DTT (0,1M), 10µl NP40 (25%)
Polyacrylamidgel (EMSA)	30% Acrylamid (37,5:1), 1 M Tris pH 7,5; 1 M Glycin, 0,5 M EDTA, 10% APS;, 7,5µl Temed in 10ml Gesamtvolumen
Polyacrylamidgel (WB, Sammelgel)	415µl Acrylamid (30%; 37,5:1), 157,5µl Tris (2M, pH 6,8), 12,5µl SDS (20%), 25µl APS (10%), 2,5µl Temed in 2,5ml Gesamtvolumen
Polyacrylamidgel (WB, Trenngel)	1,3ml Acrylamid (30%; 37,5:1), 1,3ml Tris (1,5M, pH 8,8), 25µl SDS (20%), 50µl APS (10%), 2µl Temed in 5ml Gesamtvolumen
Salt Solution (TOPO TA Cloning-Kit)	1,2 M NaCl; 0,06 M $MgCl_2$
Sequenzierpuffer	Genterprise (Mainz, D)
TBE-Puffer (1x)	90mM Tris, 90mM Borsäure; 1,25 mM Na_2EDTA (pH 8,3)
TBS (10x)	24,2g Tris; 80g NaCl pH 7,6 einstellen pro 1l aqua dest.
TBS-Tween	TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20
TBS-Tween-Magermilch	50mg Magermilch-Pulver pro ml PBS-Tween
TE-Puffer (10x)	100mM Tris-HCl pH 7-8, 10mM EDTA
Transferpuffer (WB)	wie Laufpuffer (WB) ohne SDS
X-Gal-Lösung	20mg X-Gal in 1ml Di-Methylformamid

Zur Herstellung der einzelnen Lösungen wurde entweder entionisiertes Leitungswasser (Wasser) oder steriles, destilliertes Wasser (aqua dest.) verwendet und bei Notwendigkeit nach dem Ansetzen der Lösung autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.8.3 Zellkultur-Bedarf

Medium / Suppliment / sonstiges	**Artikelnummer**	**Firma**
DMEM	41965	life technogies
DMSO	D8418	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FCS	10270	life technogies
L-Glutamin	25030	life technogies
Natrium-Pyruvat	11360	life technogies
PBS	14190	life technogies
Penicillin/Streptomycin	15140	life technogies
OMEM	11058	life technogies
RPMI	31870	life technogies
Trypsin/EDTA (0,05 %)	25300	life technogies

2.8.4 Zellkultur-Vollmedien

Medium	Zusammensetzung
DMEM	+ 10% FCS; 1mM Natrium-Pyruvat; 100U/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin
Kryokonservierungs-Medium	jeweiliges Vollmedium mit 10 % DMSO
OMEM	ohne Supplimente oder mit 4 % FCS
RPMI	+10% FCS; 2mM Glutamin; 100U/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin

2.8.5 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Vollmedium	Besonderheiten
HEK293	DSMZ (Deutschland)	DMEM	-
K-SE	Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Mainz	DMEM	-
K-YR	Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Mainz	DMEM	-
upd(11p15)mat	prim. Zellkultur (SRS-Patient)	DMEM	upd(11p15)mat
upd(11p15)pat	prim. Zellkultur (BWS-Patient)	RPMI	upd(11p15)pat

2.8.6 Antikörper

Antikörper	Firma	Artikelnr.	Verwendung
αCTCF	Abcam	ab70303	ChIP, WB
IgG-Gemisch (α-rabbit)	Diagenode	kch-504-250	ChIP, EMSA
αHIF1α	Novus	NB100-105	EMSA
αKaiso	Abcam	ab12723	ChIP, EMSA, WB
Sekundärantikörper (α-rabbit)	Santa Cruz	-	WB
Sekundärantikörper (α-mouse)	Dako (D)	-	WB

2.8.7 Oligonukleotide

Primer

Name	Sequenz (5´- 3´)	Annealing (°C)	Amplifikat (bp)
ChIP-Primer (DNA):			
B-intra	GGG CTC TTG CRT AGC ACA TG	61	131
	TGT GAT GTG KGA GCC TGC AC		
B-inter	GTG CAG GCT CMC ACA TCA CA	61	315
	CAT GTG CTA YGC AAG AGC CC		
B4-intra	AGG TGA TCA TGA CTG GGA CC	61	128
	AGA CTC CAG GAA CAC TGT GC		
B7-intra	CCA AAG AAC TTG AGC CCA AG	62	266
	Reverse-Primer ist regulärer B-intra		

Expressionsprimer (cDNA):			
CDKN1C	TGC TAC ATG AAC GGT CCC AG TGT CCG GGC CTC TGA TCT C	64	240 / 245
CTCF	AGA GCC TCA GCC TGT GAC C GCG TGA GGT CTC CGT TGG	61	241
GNAS	CCA TTG TGA AGC AGA TGA GGA TGC ACT TTG GTT GCC TTC TC	61	70 / 73 / 115 / 118
HPRT	ATT GAC ACT GGG AAA ACA ATG C TCC AAC ACT TCG TGG GGT CC	61	110
H19	GGC CTT CCT GAA CAC CTT AG TGA GCT GGG TAG CAC CAT TT	61	142
GRB10	GAC CAC GGG CTC TGC ATA TCT GCT GAG GGA TTC GGT AA	61	163
IGF2	CCG TGC TTC CGG ACA ACT CTG CTT CCA GGT GTC ATA TTG G	62	69
Kaiso	GAG TGC GGC TTC TTC TTG TT GAG TTC AGC AGA CTG CCA GAG	61	245 / 143
KCNQ1OT1	TGG AAC TGT GGC GGT AAA GA TTC AGC TTG CTT GGC TTT GC	59	153
MEST	CCC ACC CCC AAC AGG AAT TC AAG GCA TGT GCC CAT AAC GT	61	87
PDH	GAC CAA TGG ACA TGG AAA CC TGG CAA CCG TAA CAG ACA AA	61	483
PEG3	GAC CCG GAA CAG AAG AGA GT CCA CCA CAG GAA GGG AAA GA	60	170 / 173
PLAGL1	GAT TGC TGT CAC GTC TAA TGT GTC CCA TTA GGT TTC TGT CG	60	125
Vektorrand-Primer:			
M13	GTT TTC CCA GTC ACG AC CAG GAA ACA GCT ATG AC	58	394 (mit B-intra-Ligat in pCRII-TOPO-Vektor)

Im Falle von Mehrfachnennungen der Amplifikatgrößen existieren verschiedene Transkriptionsvarianten die durch die Primer gleichermaßen amplifiziert werden können.

EMSA-Sonden

Name	Sequenz
B4-KBS	5´ - IRDye700 - GGC CTT TGG CAG GAA CAG G - 3´
	5´ - IRDye700 - CCT GTT CCT GCC AAA GGC C - 3´
ICR1-KBS (auch Kompetitor)	5´ - IRDye700 - AGG GTC TCT GGC AGG CAC AGA GCC - 3´
	5´ - IRDye700 - GGC TCT GTG CCT GCC AGA GAC CCT - 3´
MMP7-KBS (auch Kompetitor)	5´ - IRDye700 - GTG CTT CCT GCC AAT AAC G - 3´
	5´ - IRDye700 - CGT TAT TGG CAG GAA GCA C - 3´

siRNAs

Name	Hersteller	Sequenz	Position (Sequenz)	Exon
CTCF-A	Qiagen	5´-TGCGATTACGCCAGTGTAGAA-3´	549-569 (NM_001191022.1)	5
CTCF-B	Qiagen	5´-AGGGTGATTATGAGTGGTTCA-3´	2563-2583 (NM_001191022.1)	12
Kaiso-A (Q)	Qiagen	5´-ACCGTTATTGTGGAAGACCGA-3´	430-450 (NM_001184742.1)	3
Kaiso-B (Q)	Qiagen	5´-TCCGATAGATCAAGCACTATT-3´	2128-2148 (NM_001184742.1)	3
Kaiso-A (S)	SABiosciences	5´-ACATCTGACTCCCAATATTAT-3	1149-1169 (NM_001184742.1)	3
Kaiso-B (S)	SABiosciences	5´-AGAGATCTTTGCAGAAATTCT-3	552-572 (NM_001184742.1)	3

2.8.8 Molekulargewicht- und DNA-Längen-Standards

Standard	Firma
Protein-Standard (Color Plus Prestained, 10-230 kDa)	NEB
DNA-Standard (Quick-Load 1 kb)	NEB
DNA-Standard (Quick-Load 100 bp)	NEB
DNA-Standard (100 bp)	Invitrogen (D)
DNA-Standard (1 kb)	Invitrogen (D)
DNA-Standard (2log)	Invitrogen (D)

2.8.9 Enzyme, Modulatoren und Inhibitoren

Standard	Firma
BanI	NEB
Benzonase	Merck (Darmstadt, D)
BigDye-Sequenzier-Mix	Genterprise (Mainz, D)
DdeI	NEB
Exonuklease I	NEB

LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche (D)
Protease Inhibitor (Complete)	Roche (D)
Protease Inhibitor (200x-Mix, aus LowCell-Kit)	Diagenode (Liège, BE)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB (Ohio, USA)
Proteinase K	Diagenode (aus LowCell-Kit, Liège, BE)
PvuII	NEB
Ribonuclease Inhibitor (RiboLock)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Reverse Transkriptase (MMLV-RT-Kit)	Invitrogen (Basel, CH)
Taq-Polymerase	Labor-Taq AG-Prawitt

2.8.10 Kits

Kit	Firma
LowCell ChIP-Kit	Diagenode (Liège, BE)
MMLV-Reverse Transkriptase-Kit	Invitrogen (Basel, CH)
Rneasy-Kit	Qiagen (Hilden, D)
TOPO TA Cloning-Kit (mit pCR®II-TOPO-Vektor)	Invitrogen (Basel, CH)

2.8.11 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Matrix für Sequenzierreaktion (Pop7)	Apllera (D)
Filter (Steril-)	Whatman bzw. Schleicher&Schuell (Dassel, D)
Filterpapier (WB)	Whatman, GE
Kanüle (20G)	Braun (Melsungen, D)
Kryoröhrchen (1,8ml)	Corning, Thermo Scientific
Kulturschalen (Bakterien)	TPP (Trasadingen, CH), Greiner (Frickenhausen, D)
Küvetten (Photometer)	Eppendorf (Hamburg, D)
Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, WB)	Amersham (USA)
Parafilm	Pechiney (FR)
PP-Röhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Biozym (Wien, A)
Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Peqlab (Erlangen, D)
Reaktionsgefäß, *low-bind* (0,6 ml)	Biozym (Wien, A)
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reaktionsgefäß (1,5 ml; lichtgeschützt)	Starlab (Ahrensburg, D), Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäß (2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Rundboden-Reaktionsgefäß (14ml)	Becton Dickinson, D
Spritze (1ml)	Braun (Melsungen, D)
Strips (8er; 0,2 ml)	Diagenode (Liége BE), Starlab (Ahrensburg, D)
WB-Film	Amersham
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner (Frickenhausen, D), Nunc (Roskilde, DK)

Zellkulturschalen (6cm, 10cm, 15cm)	TPP (Trasadingen, CH)
Zellschaber (starr)	Corning (New York, USA)
96-Well-Platte (qPCR)	Biozym (Wien, A), Roche (D)
96-Well-Platte #AB0600 (PCR, SAP)	Thermo Scientific
96-Well-Platte #712220 (Sequenzierung)	Biozym (Wien, A)

2.8.12 Geräte und Apparaturen

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav	LVSA 40/60	Zirbus (Bad Grund, D)
Elektrophorese-Spannungsgeräte	EV231, EPS 1000	Peqlab (Erlangen, D), Pharmacia Biotech (Waldkirch, D)
Entwicklermaschine (WB-Röntgenfilme)	FPM-3800 AD	Fuji Film (Düsseldorf, D)
Geldokumentationssystem	E-Box	Peqlab (Erlangen, D)
Gelkammern (Agarosegele)	diverse	Owl Scientific (USA), Peqlab (Erlangen, D), Renner (Dannstadt ,D)
Gelkammer (PAA-Gele)	TetraCell	Biorad (D)
Heizplatte	H22	Gerhard (D)
Inkubator (Zellkultur)	Hera cell	Heraeus (Osterode, D)
Kühlfalle	Jet II	UniEquip (Martinsried, D)
Laser-Scanner	Odyssey	LI-COR (Bad Homburg, D)
Magnet-Heizrührer	IKAMAG RCT	Janke&Kunkel (Staufen, D)
Magnet-Rührer	IKA KOMBIMAG REO	Janke&Kunkel (Staufen, D)
Mikroskop (Zellkultur)	DIAVERT	Leitz (D)
PCR-Gerät (qPCR)	LightCycler 480 II	Roche (D)
PCR-Gerät (reguläre PCR)	PTC-100, PTC-200	MJ-Research (USA)
pH-Meter	inoLab Level 1	WTW (Weilheim, D)
Rad-Inkubator (EOE)	Rotator SB3	Stuart (Staffordshire, UK)
Rollenmischer	RM5 80V	Cat (Staufen, D)
Schüttler (WB)	Vibrax VXR	IKA (Staufen, D)
Schüttelinkubator (Bakterien)	10X400	Gallenkamp (D)
Sequenziergerät	Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems (Weiterstadt, D)
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific (USA)
Spektrometer	Biophotometer Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Sterilbank (Bakterienkultur)	BT	Beck&Thies (Langenfeld, D)
Sterilbank (Zellkultur)	LaminAir1	Holten
Thermomixer	comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifugen	FugeOne, C1301B-230V	Starlab (Ahrensburg, D)
Tisch-Zentrifuge (96well-qPCR-Platten)	Perfect Spin P	Peqlab (Erlangen, D)
Ultraschallgerät (Sonicator)	HTU SONI130	Heinemann (Schwäbisch

		Gmünd, D)
Vakuumabsaugpumpe (Zellkultur)	MiniVac power	Peqlab (Erlangen, D)
Vakuumzentrifuge	UNIVAPO 100 H	UniEquip (Martinsried, D)
Vortexer	Wizard x REAX2000	Starlab (Ahrensburg, D) Heidolph (Schwabach, D)
Waage (Feinwaage)	R160 P-D1	Sartorius (Göttingen, D)
Waage (Laborwaage)	BA BA 200	Sartorius (Göttingen, D)
Wasserbad (Zellkultur)	SW21	Julabo (Seelbach, D)
Wasserbad	V15 / D10	Thermo Scientific (Karlsruhe, D)
Wasserbad	IKA Ter2	Janke&Kunkel (Staufen, D)
Zentrifuge (Zellkultur)	Omnifuge 2.0 RS (Sepatech)	Heraeus (Osterode, D)
Zentrifuge (RNA)	EBA 12 R	Hettich (Tuttlingen, D)
Zentrifuge (96-Well-Sequenzierplatten)	Rotanta 460R	Hettich (Tuttlingen, D)
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge	Fresco 21	Heraeus (Osterode, D)

3 Ergebnisse

Die chromosomale Region 11p15.5 enthält zwei Cluster geprägter Gene (IC1 und IC2). Die reziproke Expression von *H19* und *IGF2* im distal gelegenen IC1 wird durch die Kontrollregion ICR1 reguliert (Hark *et al*., 2000; Bell und Felsenfeld, 2000). Dieses von *cis* agierende Element besitzt einen repetitiven Aufbau aus sieben B- und zwei A-*Repeats* (Abbildung 1-4). Mit Ausnahme des verkürzt vorliegenden B4 enthält jedes *Repeat* eine Bindestelle für das Protein CTCF (CTS, CTCF *target site*). Die CTCF-Bindung an die CTS findet ausschließlich bei der unmethylierten ICR1 des maternalen Allels statt und verhindert dort laut gängigen Modellen die *IGF2*-Expression (Hark *et al*., 2000; Bell und Felsenfeld, 2000; Murrell *et al*., 2004; Kurukuti *et al*., 2006). Eine Expression von *H19* wird dagegen durch die Methylierung der Promoterregion vom paternalen Allel verhindert (Zhang *et al*., 1993). CTCF gehört zur Gruppe der Zinkfingerproteine, welche mit ihren DNA- und proteinbindenden Eigenschaften eine wichtige Gruppe genomischer Regulatoren darstellen. Ein weiteres Zinkfingerprotein mit putativer Bedeutung für die ICR1-vermittelte Genregulation ist Kaiso. Das Protein besitzt eine N-terminale Domäne zur Interaktion mit anderen Proteinen (Daniel *et al*., 1999) sowie drei C-terminal gelegene Zinkfinger, von denen mindestens zwei für seine dualspezifische DNA-Bindungscharakteristik notwendig sind (Daniel *et al*., 2002; Buck-Koehntop *et al*., 2012). Neben der häufig beschriebenen Kaiso-Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen (Prokhortchouk *et al*., 2001; Yoon *et al*., 2003) wurde in Vergangenheit auch die Bindung an die unmethylierte Konsensussequenz TNGCAGGA, im Folgenden auch KBS (Kaiso *binding site*) genannt, beschrieben (Daniel *et al*., 2002; Spring *et al*., 2005). Für den humanen 5´-ß-Globin-Insulator konnten Hinweise auf eine Interaktion von CTCF und Kaiso gefunden werden, da das Vorliegen einer intakten KBS in nächster Nähe zu einer CTS inhibierend auf die CTCF-Insulatoraktivität wirkt (Defossez *et al*., 2005). In der Kontrollregion ICR1 finden sich sowohl CGCGs als auch KBS-Sequenzen. Für die murine ICR1 konnte neben der CGCG-Bindung auch die Interaktion von Kaiso mit den KBS durch ChIP gezeigt werden (Filion *et al*., 2006). Durch den Vergleich von ChIP-Experimenten mit einer maternalen upd-Zelllinie und bi-parentalen Kontrollen lässt sich auch beim Menschen eine ICR1-KBS-Bindung nicht ausschließen (Langer, 2008).

In der vorliegenden Dissertation sollte die putative Bindung von Kaiso an die ICR1 *in vitro* und in proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Die bereits bekannte ICR1-Bindung durch CTCF sollte im Vergleich untersucht und als Positivkontrolle für die Etablierung eines Bindungsnachweises genutzt werden. Darauffolgend sollte die *Repeat*-Spezifität der Bindung beider Proteine bestimmt und deren Bedeutung für die Regulation des genomischen *Imprintings* durch *knockdown*-Experimente mit uniparentalen Disomie (upd)-Zelllinien untersucht werden.

3.1 Proteinnachweis von CTCF und Kaiso in upd(11p15)mat-Zellen

Beide Methoden zum Bindungsnachweis von CTCF und Kaiso an die ICR1 (EMSA und ChIP) sowie die erweiterte Sequenzierungsanalyse nach den ChIP-Experimenten zur genauen Bindungsstellen-Charakterisierung basieren auf der Bindung von Proteinen durch einen spezifischen Antikörper. Das Chromatin für die ChIP wurde aus Zellen mit einer maternalen uniparentalen Disomie (upd(11p15)mat) isoliert. Diese Fibroblasten-Zelllinie mit rein mütterlichem Status ermöglicht in dieser Arbeit die gezielte Untersuchung der Kaiso-Bindung an die unmethylierten KBS-Sequenzen. In regulären Zellen mit bi-allelischem Status wäre durch die mögliche Kaiso-Bindung an die CGCG-Sequenzen des paternalen Allels keine gesonderte Betrachtung der KBS-Bindung möglich. Mit nukleärem Proteinextrakt aus den upd-Zellen wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließendem *Western blot* durchgeführt (2.3.4, 2.3.5). Dabei wurden verschiedene Antikörper gegen CTCF und Kaiso getestet. Die jeweils funktionellsten Antikörper wurden für die folgenden Experimente zur Bindungsanalyse ausgewählt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Nukleärextrakte und deren Transfer auf eine Membran fand die Inkubation mit den Antikörpern statt. Der Nachweis mittels Chemolumineszenz zeigte jeweils einzelne distinkte Banden bei 130 kDa (CTCF-Antikörper) und 85 kDa (Kaiso-Antikörper) mit geringer Hintergrund-Chemolumineszenz der Membran (Abbildung 3-1).

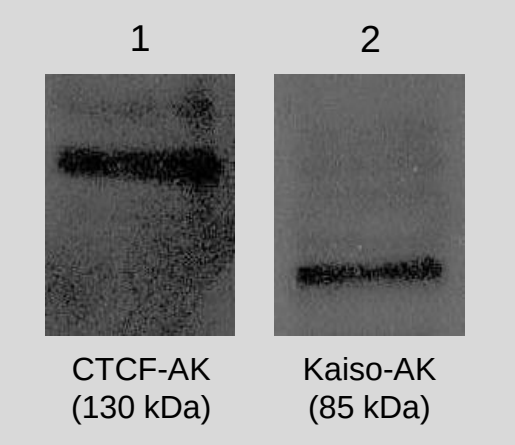


Abbildung 3-1: Proteinnachweis von CTCF und Kaiso in der upd(11p15)mat-Zelllinie

Die Abbildung zeigt Membranausschnitte eines *Western blots* nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Der Antikörpernachweis nach Visualisierung durch Chemilumineszenz zeigt zwei einzelne distinkte Banden bei 130 kDa (CTCF-Antikörper, Spur 1) und 85 kDa (Kaiso-Antikörper, Spur 2). (AK, Antikörper)

Trotz abweichender errechneter Proteinmassen von CTCF und Kaiso belegen die *Western blot*-Ergebnisse aufgrund der Übereinstimmungen der Bandengrößen mit aktuellen Publikationen (Valle-Pérez *et al*., 2011; Majumder und Boss, 2010; Majumder *et al*., 2008; Prokhortchouk *et al*., 2001) die Funktionalität der verwendeten Antikörper und ein Vorhandensein der Proteine in der upd(11p15)mat-Zelllinie.

3.2 Sequenzanalyse der humanen ICR1

Eine Bindung von Kaiso wurde in menschlichen Zellen bereits an methylierte (Yoon *et al*., 2003) und unmethylierte (Spring *et al*., 2005; Rodova *et al*., 2004) Regionen nachgewiesen. Die Bindung findet an methylierte CGCG-Sequenzen statt, die man auch in der humanen ICR1 häufig findet (Abbildung 3-2). Von besonderem Interesse in dieser Arbeit war jedoch die Bindung des Zinkfingerproteins an unmethylierte Sequenzen. In einer früheren Arbeit wurden bereits mehrere putative KBS-Sequenzen in der humanen ICR1 identifiziert (Langer, 2008). Für die vorliegende Arbeit wurde die Sequenz der Kontrollregion erneut auf mögliche Bindestellen untersucht. Dabei wurde im Unterschied zur zitierten Diplomarbeit als Kriterium das Vorliegen der Kern-Sequenz TNGCAG gewählt, die von Daniel und Mitarbeitern als ausreichend für die Kaiso-Bindung beschrieben wurde (Daniel *et al*., 2002). Durch diese Vorgehensweise wurden zwei zusätzliche putative KBS im B2- und im verkürzten B4-*Repeat* identifiziert. Insgesamt liegen somit in der Kontrollregion zehn putative KBS vor (Abbildung 3-2). Nur eine mögliche KBS im B4 entspricht der als optimal beschriebenen (Daniel *et al*., 2002) 8mer-Sequenz TNGCAGGA. Fünf identische Sequenzen finden sich in allen vollständigen *Repeats* außer B7 und besitzen jeweils den gleichen Abstand zu den CTCF-Bindestellen. Diese Sequenzen werden in der vorliegenden Arbeit wegen ihrer regelmäßigen, repetitiven Lage als ICR1-KBS bezeichnet und besitzen an Position 8 einen Basenunterschied (A>C) im Vergleich zur optimalen B4-KBS. Vier zusätzliche putative KBS finden sich in den *Repeats* B1, B2 und B4. Diese Sequenzen sind unregelmäßig an verschiedenen *Repeat*-Stellen lokalisiert und besitzen Veränderungen an den Positionen 2 und 8. Die Existenz von verschiedenen KBS-Sequenzen mit sowohl regelmäßiger als auch unstrukturierter Lokalisation macht eine Bindung von Kaiso an das unmethylierte Allel der ICR1 wahrscheinlich. Daher liegt es auch nahe, über eine Bedeutung des Proteins bei der Regulation der geprägten Gene *H19* und *IGF2* zu mutmaßen.

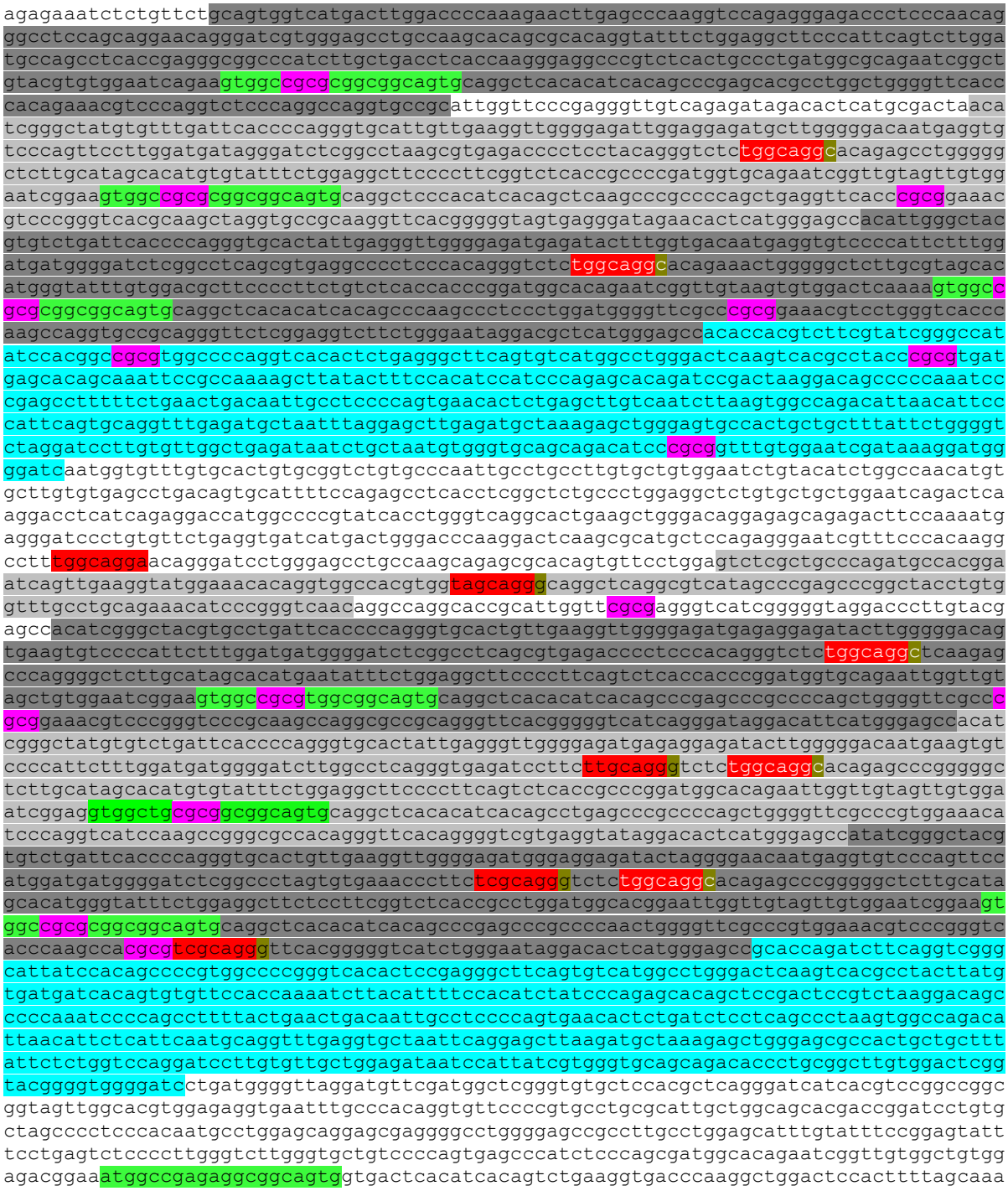


Abbildung 3-2 Humane ICR1-Sequenz mit Proteinbindestellen

In den B-*Repeats* der humanen ICR1 (grau) finden sich neben vielen CGCG-Sequenzen (pink) insgesamt auch zehn putative Kaiso-Bindestellen, die nur im unmethylierten Zustand gebunden werden könnten (KBS, rot). Eine optimale putative KBS (TGGCAGGA, Daniel *et al*., 2002) liegt im oberen nichtrepetitiven Bereich von B4. Fünf weitere mögliche KBS (weiße Buchstaben) liegen in regelmäßigem Abstand zu den CTCF-Bindestellen (CTS, grün) in allen vollständigen *Repeats* außer B7 vor und besitzen eine Veränderung (oliv) an Position 8 (A>C). Zusätzlich zur optimalen B4-KBS und den fünf regelmäßigen ICR1-KBS findet man vier weitere putative KBS mit Veränderungen an den Positionen 2 und 8, die unregelmäßig in der ICR1 lokalisiert sind. (Sequenz: AC123789)

3.3 *In vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung durch EMSA

Ob eine Kaiso-Bindung an die putativen Bindestellen der ICR1 *in vitro* stattfindet, wurde durch EMSA-Experimente (*electrophoretic mobility shift assay*) untersucht. Beim EMSA wird das unterschiedliche Mobilitätsverhalten verschieden großer Teilchen in einer Gel-Matrix genutzt, das bei elektrophoretischer Auftrennung verschiedener Reaktionsansätze dazu führt, dass ungebundene doppelsträngige (ds-) Oligonukleotide von langsamer laufenden Protein-ds-Oligonukleotid-Komplexen unterschieden werden können. Der Nachweis von freien und komplexierten ds-Oligonukleotiden erfolgte durch deren Markierung mit einem Infrarot-Farbstoff (IRDye^{TM}-700), der sich mit einem Laserscanner detektieren lässt (2.6).

3.3.1 Funktionalität des EMSA-Protokolls und Kaiso-Bindungsnachweis an die KBS des *MMP7*-Promoters

Die Ausbildung von Protein-ds-Oligonukleotid-Komplexen im EMSA ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren wie Salzgehalt, pH, Temperatur und Inkubationsdauer (Hellmann und Fried, 2007). Daraus ergeben sich teils erhebliche Unterschiede des experimentellen Aufbaus verschiedener Bindungsnachweise. Die Funktionalität des in dieser Arbeit verwendeten EMSA-Protokolls sollte durch ein Kontrollexperiment überprüft werden. Dabei wurde der Kaiso-enthaltende Nukleärextrakt mit ds-Oligonukleotiden inkubiert, die die als optimal beschriebene KBS im Sequenzkontext der Promotorregion des *MMP7*-Gens (*Matrix Metalloproteinase 7, matrilysin*) beinhalten. Mit diesen ds-Oligonukleotiden konnte durch Daniel und Mitarbeiter bereits eine Kaiso-KBS-Bindung durch EMSA-Versuche nachgewiesen werden (Daniel *et al.*, 2002). Ein entsprechender Nachweis der Bindung an die *MMP7*-KBS wird als Beleg für ein funktionelles, zur speziellen Fragestellung passendes Protokoll gewertet.

In Standardreaktionen (ds-Oligonukleotid mit Nukleärextrakt) lassen sich in der Regel verschiedene Banden mit unterschiedlicher Intensität und Form im Gel nachweisen. Abgesehen von der verwischten Bande am Ende der Gelspur, die dem freien, ungebundenen ds-Oligonukleotid entspricht, kann bei einzeln oder mehrfach auftretenden Banden im oberen Gelabschnitt nicht zweifelsfrei auf deren Entstehung durch die Komplexierung von Zielprotein und ds-Oligonukleotid geschlossen werden. Aus diesem Grund sind beim EMSA unterschiedliche Kontrollreaktionen notwendig. Um die Entstehung von Komplexen auf verwendete ds-Oligonukleotide zurückführen zu können, wurden bei den Experimenten alternativ zu den Standardreaktionen Ansätze mit einem Überschuss an unmarkierten ds-Oligonukleotiden durchgeführt (Kompetition). Dabei wurden spezifische (sequenzgleiche) und unspezifische (ohne Sequenzähnlichkeit) Kompetitoren verwendet. Die Auswirkung von überschüssig eingesetzten spezifischen Kompetitoren sollte die Reduktion des ds-Oligonukleotid-Protein-Komplexes im Gel (*bandshift*) bewirken, wohingegen die Kontrolle mit unspezifischen Kompetitoren nicht zur Beeinträchtigung führen sollte. Eine zweite EMSA-Kontrollreaktion soll belegen, dass der ds-Oligonukleotid-Protein-Komplex durch das Zielprotein zustande kommt. Dafür wurden in verschiedenen Ansätzen spezifischer Antikörper und, als interne Kontrolle, sowohl ein unspezifisches

Antikörpergemisch als auch ein Antikörper gegen das Protein HIF1α eingesetzt, das nicht in der ICR1 bindet. Die Inkubation mit dem Zielprotein-Antikörper sollte zu einem relativ zum ds-Oligonukleotid-Protein-Komplex größeren Teilchen führen, das folglich langsamer in der Gelmatrix wandert. Die dadurch entstehende Bande wird, im Kontrast zum weiter in Richtung Gelmitte befindlichen *bandshift,* als *supershift* bezeichnet. Die Ansätze mit IgG-Gemisch und dem HIF1α-Antikörper dienen zur Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen der verwendeten Antikörperklasse (IgG) an die ds-Oligonukleotide. Die spezifische Kompetition einer *bandshift*-Bande ist gemeinsam mit der Entstehung einer *supershift*-Bande bei Zugabe von spezifischem Antikörper ein deutlicher Beleg für eine Protein-Oligonukleotid-Bindung.

Überschüssige Konzentrationen an spezifischen Kompetitoren führten bei den EMSA-Experimenten mit *MMP7*-ds-Oligonukleotiden zur deutlichen Beeinträchtigung der zentralen Bande (Abbildung 3-3 A). Bereits die zehnfach überschüssige Kompetitor-Konzentration bewirkt die nahezu vollständige Abwesenheit dieser Bande. Durch die höhere Kompetitorkonzentration (30-facher Überschuss) ist keine Steigerung dieses Ergebnisses zu bemerken. Die Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen des unspezifischen Kompetitors zeigen das gleiche Bandenmuster wie die Standardreaktion ohne Kompetitoren. Die *MMP7*-EMSA-Experimente mit den unterschiedlichen Antikörpern und dem IgG-Gemisch zeigten ein klares Ergebnis, bei dem ausschließlich die Zugabe des Kaiso-Antikörpers zur Bildung einer zusätzlichen Bande führt (Abbildung 3-3 B). Diese Bande im oberen Gelabschnitt ist bei keinem der anderen Reaktionsansätze zu sehen. Bei allen vier Ansätzen sind auch zwei schwache Banden in der oberen Gelhälfte ersichtlich, die beim Ansatz mit Kaiso-Antikörper eine geringere Intensität besitzen. Diese Intensitätsminderung findet man nicht bei der zentral gelegenen, prominenten Bande.

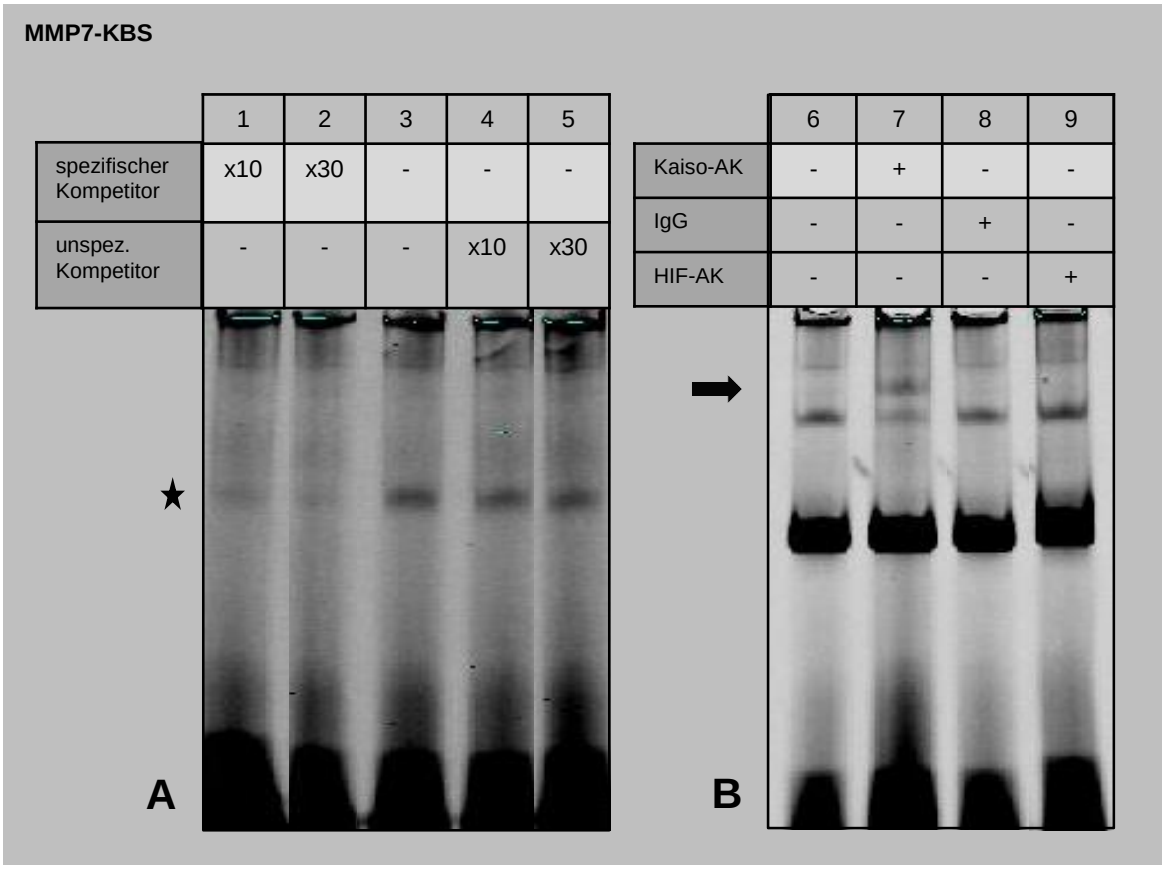


Abbildung 3-3: *In vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung an die *MMP7*-KBS

A: Spezifische Kompetition (Spuren 1 und 2) führt bei *MMP7*-EMSA-Experimenten zur deutlichen Beeinträchtigung der zentralen Bande (Sternchen). Reaktionsansätze mit unspezifischem Kompetitor (Spuren 4 und 5) zeigen das gleiche Bandenmuster wie die Standardreaktion (Spur 3). **B**: Zugabe eines spezifischen Kaiso-Antikörpers (Spur 7) führt exklusiv zur Entstehung einer zusätzlichen Bande (Pfeil), die bei keinem der anderen Reaktionsansätze zu sehen ist. (AK, Antikörper)

Alle EMSA-Kompetitionsexperimente wurden jeweils mindestens drei Mal durchgeführt und zeigen die gleichen Ergebnisse. Nicht abgebildete, niedrigere spezifische Kompetitoren-Überschüsse zeigen undeutlichere Beeinträchtigungen der mittleren Gelbanden im Vergleich mit den zugehörigen Standard- und unspezifischen Kompetitorreaktionen.

Die spezifische Kompetition der zentralen Bande (*bandshift*) ist gemeinsam mit der Entstehung einer zusätzlichen Bande im Bereich darüber (*supershift*) ein deutlicher Beleg für das Zustandekommen einer *in vitro*-Bindung von Kaiso an das markierte Oligonukleotid mit der KBS-Sequenz im Kontext der *MMP7*-Promoterregion. Die Bestätigung der bereits publizierten Kaiso-Bindung (Daniel *et al*., 2002) zeigt auch, dass ein funktionelles Protokoll für die Untersuchung der Kaiso-Bindung an die ICR1-Bindestellen besteht.

3.3.2 Kaiso-Bindungsnachweis an die KBS in der ICR1

Nachdem durch die Untersuchung der *MMP7*-KBS die Funktionalität des Protokolls bestätigt werden konnte, wurde es ohne Modifikationen für die Fragestellung der KBS-Bindungen in der ICR1 angewendet. Als Kriterien für ein valides Ergebnis galten ebenfalls die spezifische Kompetition und die

Entstehung einer *supershift*-Bande durch spezifischen Antikörper.

Von den fünf unterschiedlichen KBS-Varianten, die sich in der ICR1 finden lassen (3.2), wurden zwei für die EMSA-Analysen ausgewählt: Im Vordergrund stand die Untersuchung der Bindung an die repetitive ICR1-KBS (TGGCAGGC), die jeweils im gleichen Abstand zur CTCF-Bindestelle (CTS) in allen vollständigen *Repeats* außer B7 vorliegt. Darüber hinaus sollte die Bindung an die exklusiv in B4 vorliegende, als optimal beschriebene KBS (TGGCAGGA) analysiert werden (Daniel *et al*., 2002).

Kaiso-Bindung an die repetitive ICR1-KBS

Die Zugabe von spezifischen Kompetitoren im Überschuss führt bei den EMSA-Experimenten mit Oligonukleotiden, die die repetitive ICR1-KBS enthalten, zur klaren Beeinträchtigung einer zentralen Bande (Abbildung 3-4 A). Die 60-fache spezifische Kompetitorkonzentration bewirkt eine deutliche Intensitätsverminderung, die durch Kompetitorverdoppelung sogar noch zunimmt. Die Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen unspezifischen Kompetitors zeigen das gleiche Bandenmuster wie die Standardreaktion ohne Kompetitoren. Zusätzlich zu der spezifisch kompetitierbaren Bande in der Gelmitte sind noch drei zusätzliche schwache, diffuse Banden zu sehen, von denen zwei ebenfalls ausschließlich durch die spezifische Kompetition in der Intensität vermindert werden. Die Experimente mit den unterschiedlichen Antikörpern und dem IgG-Gemisch zeigen ein klares Ergebnis: Ausschließlich die Zugabe des Kaiso-Antikörpers führt zur Bildung einer zusätzlichen Bande (Abbildung 3-4 B). Diese Bande im oberen Gelabschnitt ist bei keinem der anderen Reaktionsansätze zu sehen. Bei allen vier Ansätzen sind auch zwei schwache Banden in der oberen Gelhälfte ersichtlich, von denen eine beim Ansatz mit Kaiso-Antikörper eine geringfügig stärkere Intensität aufweist.

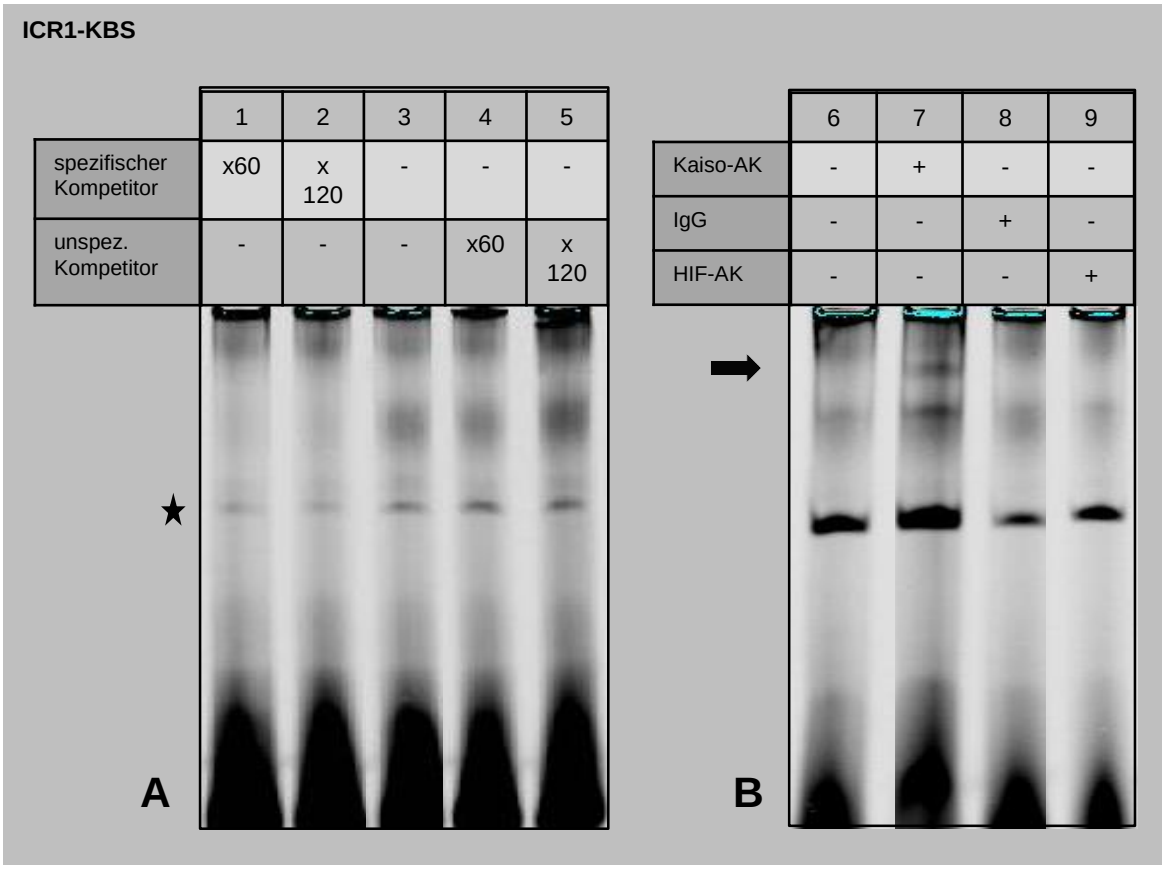


Abbildung 3-4: *In vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung an die repetitive ICR1-KBS

A: Spezifische Kompetition (Spuren 1 und 2) führt bei EMSA-Experimenten zur deutlichen Beeinträchtigung der zentralen Bande (Sternchen). Reaktionsansätze mit unspezifischem Kompetitor (Spuren 4 und 5) zeigen das gleiche Bandenmuster wie die Standardreaktion (Spur 3). **B**: Zugabe eines spezifischen Kaiso-Antikörpers (Spur 7) führt exklusiv zur Entstehung einer zusätzlichen Bande (Pfeil), die bei keinem der anderen Reaktionsansätze zu sehen ist. (AK, Antikörper)

Alle EMSA-Kompetitionsexperimente wurden jeweils mindestens drei Mal durchgeführt und zeigen die gleichen Ergebnisse. Nicht abgebildete, niedrigere spezifische Kompetitoren-Überschüsse zeigen undeutlichere Beeinträchtigungen der mittleren Gelbanden im Vergleich mit den zugehörigen Standard- und unspezifischen Kompetitorreaktionen.

Die Kombination aus spezifischer Kompetitierbarkeit einer zentralen Bande (*bandshift*) und der Entstehung eines *supershift* durch den Kaiso-Antikörper belegt eindeutig das Zustandekommen einer Kaiso-Bindung an die repetitive ICR1-KBS *in vitro*.

Kaiso-Bindung an die KBS des B4-*Repeats* in der ICR1

Die KBS im nicht repetitiven Teil des B4-*Repeats* (B4-KBS) entspricht laut Daniel und Mitarbeitern einer optimalen KBS-Sequenz (Daniel *et al*., 2002), die nur ein Mal in der Kontrollregion des distalen Clusters vorkommt (3.2). Aufgrund dieses besonderen Status wurde sie neben den regelmäßigen ICR1 als zweite putative Bindestelle durch EMSA untersucht.

Eine Standardreaktion mit der optimalen KBS im Sequenzkontext des B4-*Repeats* zeigt im oberen Drittel eine schwache Bande, die sich sowohl durch spezifische als auch durch unspezifische

Kompetition, insbesondere durch die höheren Konzentrationen verändern lässt (Abbildung 3-5 A). Die spezifische Kompetition führt zur Entstehung einer Bande im unteren Gelabschnitt, die in Korrelation zur Kompetitormenge an Intensität zunimmt und weder bei unspezifischer Kompetition noch bei der Standardreaktion zu sehen ist. Alle Reaktionsansätze mit Antikörpern zeigen ein ähnliches Bild: eine intensive Bande in der Gelmitte sowie zwei schwache Banden im oberen Gelabschnitt, die in vergleichbarer Intensität bei allen Ansätzen vorliegen.

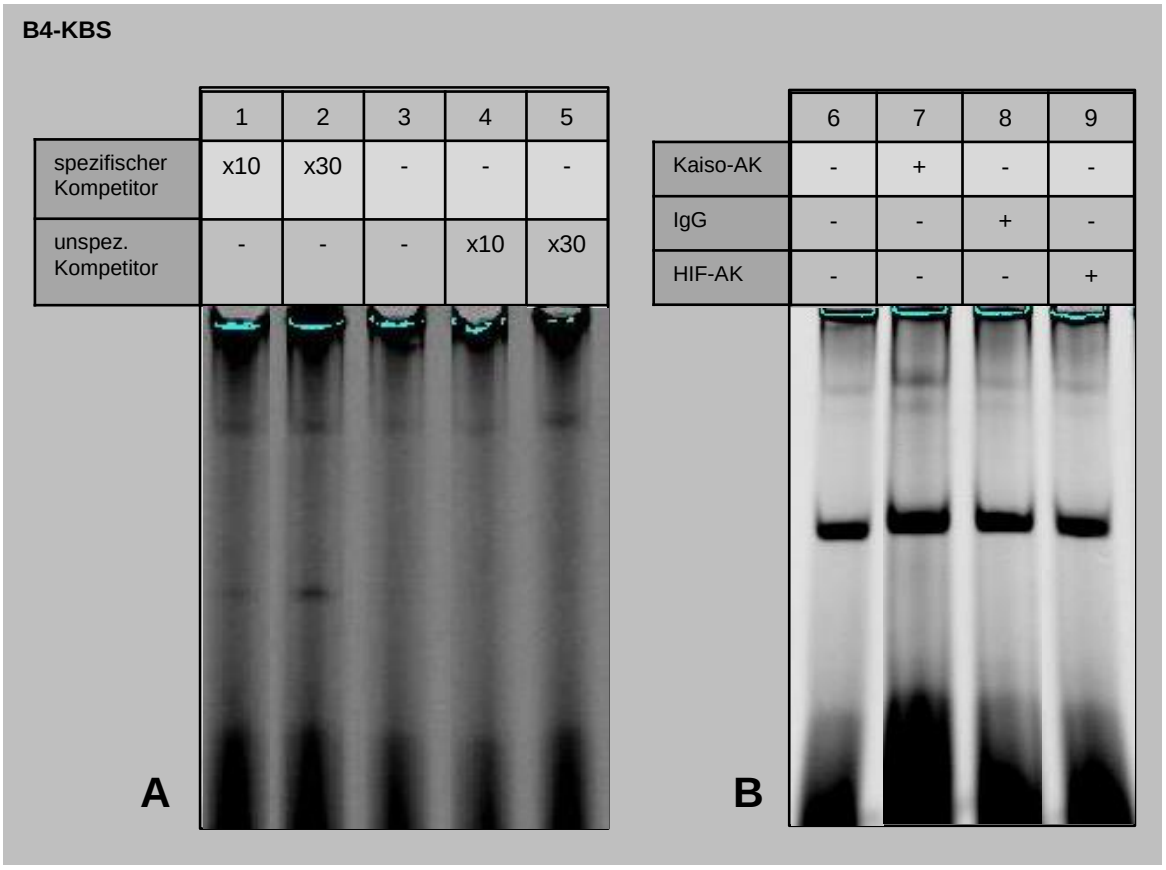


Abbildung 3-5: *In vitro*-Analyse der Kaiso-Bindung an die B4-KBS der ICR1

A: Eine Bande im oberen Gelabschnitt wird sowohl durch spezifische als auch durch unspezifische Kompetition beeinflusst. Vor allem die beiden 30-fachen Kompetitorkonzentrationen (Spuren 2 und 5) führen zu einer Intensitätsverstärkung im Vergleich zur Standardreaktion (Spur 3). Zusätzlich entsteht ausschließlich bei spezifischer Kompetition konzentrationsabhängig eine Bande im unteren Gelabschnitt (Spuren 1 und 2). **B**: Reaktionsansätze mit Kaiso-Antikörper und Kontrollen zeigen ein ähnliches Bild mit dem gleichen Bandenmuster. (AK, Antikörper)

Durch die Kompetitions- und Antikörperansätze findet sich kein Hinweis auf einen Komplex aus markiertem Oligonukleotid und Kaiso. Daher muss davon ausgegangen werden, dass, zumindest *in vitro*, keine Bindung des Proteins an die B4-KBS erfolgt.

3.4 Nachweis der CTCF-Bindung an die ICR1 und Funktionalität des ChIP-Protokolls

Durch die EMSA-Experimente konnte gezeigt werden, dass eine Kaiso-Bindung an die Bindestellen des unmethylierten Allels der ICR1 *in vitro* erfolgen kann. Dass diese Bindung auch im lebenden

Organismus stattfindet, sollte durch Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) gezeigt werden. Dafür wurde fixiertes Chromatin aus Fibroblasten-Kulturen der upd(11p15)mat-Zelllinie verwendet, die durch ihren rein mütterlichen Status der Region eine isolierte Untersuchung der unmethylierten Kaiso-Bindung in der ICR1 ermöglicht. Die ChIP-Methode besteht aus einer Vielzahl von Einzelschritten: Das fixierte Chromatin wird fragmentiert, proteingebundene DNA durch spezifische Antikörper und *beads* immunpräzipitiert und nach mehreren Waschschritten die DNA aufgereinigt (2.4).

In dieser Arbeit wurden zunächst ChIP-Experimente mit einem Antikörper gegen CTCF durchgeführt. Da dessen Bindung an die humane ICR1 bereits durch ChIP gezeigt werden konnte (Ulaner *et al*., 2003) und CTCF als Zinkfingerprotein eine Kaiso-ähnliche Struktur aufweist, sollte sich die CTCF-ChIP für die Etablierung des verwendeten Protokolls und zur Bestätigung dessen Funktionalität eignen.

3.4.1 Fragmentierung des Chromatins

Beim verwendeten ChIP-Protokoll erfolgt zu verschiedenen Zeitpunkten eine Fragmentierung des Chromatins. Anfangs findet eine statistische Scherung durch die Behandlung mit Ultraschall statt (2.4.2), im weiteren Protokollverlauf wird eine spezifische Restriktion durch enzymatischen Verdau durchgeführt (2.4.6).

Fragmentierung durch Ultraschallbehandlung (*sonication*)

Die initiale Fragmentierung des fixierten Chromatins ist ein kritischer Schritt für das Gelingen der folgenden Protokollteile. Die adäquate Größe der Chromatinfragmente spielt sowohl für die Funktionalität der Immunpräzipitation als auch für die ChIP-Analyse durch quantitative PCR eine wichtige Rolle. Die angewendete Ultraschallbehandlung von fixiertem Chromatin sollte optimalerweise zu einer statistischen Fragmentierung des fixierten Chromatins in Stücke von ungefähr 200-1000 bp führen (Collas *et al*., 2010; Das *et al*., 2004).

In Vorversuchen zu den ChIP-Experimenten wurde DNA aus fixiertem Chromatin nach der Ultraschall-Behandlung aufgereinigt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Proben, die mit den gleichen *sonication*-Bedingungen behandelt wurden wie die in dieser Arbeit dargestellten ChIP-Ansätze, zeigten nach der Visualisierung im Agarosegel eine große, diffuse Bande im Bereich von 300 bp bis 800 bp (Abbildung 3-6).

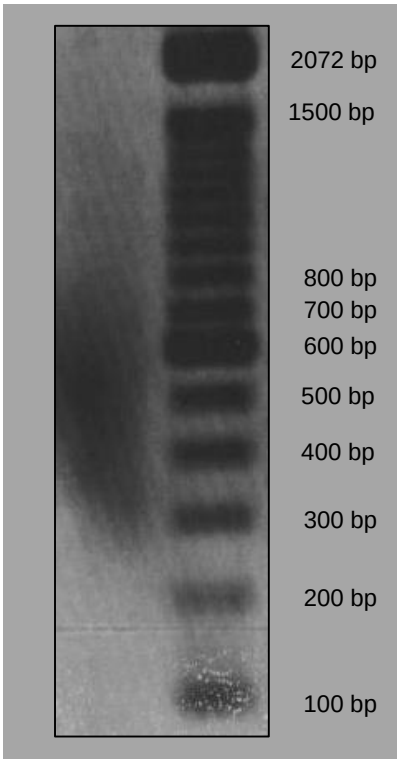


Abbildung 3-6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Ultraschall-fragmentiertem Chromatin

Die Abbildung zeigt neben einem Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennte DNA, die aus fixiertem Chromatin nach Ultraschall-Behandlung aufgereinigt wurde. Hierbei wurden identische Ultraschallbedingungen wie in den in dieser Arbeit beschriebenen ChIP-Experimenten verwendet. Eine diffuse DNA-Bande ist im Kernbereich von 300-800 bp zu erkennen.

Neben den Abbildung 3-6 sehr ähnlichen Bildern waren in nicht dargestellten Ansätzen nach der Auftrennung im Gel auch häufig entweder gar keine oder nur sehr schwache Ethidiumbromid-Färbungen in ähnlichen Größenbereichen ersichtlich.

Durch die dargestellte Fragmentierung des Chromatins mit den getesteten Ultraschall-Bedingungen sind die Rahmenbedingungen für ein funktionelles ChIP-Experiment geschaffen. Es kann angenommen werden, dass ein passender Chromatin-Größenbereich für die Funktionalität der Immunpräzipitation vorliegt und darüber hinaus eine kritische Größe für die ChIP-Analyse durch die verwendeten qPCR-Primer nicht unterschritten wird.

Enzymatische ICR1-Fragmentierung zur Trennung der B-*Repeats*

Neben der statistischen Scherung des Chromatins durch Ultraschall wird bei den ChIP-Experimenten ein spezifischer Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Der Verdau soll zur Trennung der B-*Repeats* führen und ist essentiell für die Sequenzierungsanalysen zur Ermittlung der genauen Bindungscharakteristik an die einzelnen B-*Repeats* der ICR1 (3.4.3). Die ineffiziente Trennung der *Repeats* könnte dabei zu verfälschten Daten führen, indem indirekte Immunpräzipitationen eines *Repeats* durch das daneben liegende stattfindet.

Die Vollständigkeit der enzymatischen *Repeat*-Trennung wurde durch quantitative PCR mit Primern überprüft, die zu einer Amplifikation über die *Repeat*-Grenze führen (B-inter). Bei den ChIP-

Experimenten mit CTCF-Antikörper wurden parallel zu den regulären mit Enzymen behandelten Versuchsansätzen entweder sehr kurz verdaute Ansätze (C-A) oder komplett unverdaute Ansätze (C-B und C-C) mittels qPCR analysiert. Ein 20 Minuten-Verdau bei Experiment C-A zeigt die zehnfache DNA-Konzentration im Vergleich zum Verdau über Nacht (Tabelle 3-1 A). Die unverdauten Ansätze der Experimente C-B und C-C weisen mit der elf- bzw. dreifachen DNA-Konzentration im Vergleich zu den über Nacht verdauten Ansätzen erhebliche Unterschiede auf (Tabelle 3-1 B).

Tabelle 3-1: Analyse der enzymatischen ICR1-Fragmentierung bei CTCF-ChIP-Experimenten

Die Tabelle stellt Mittelwerte der relativen DNA-Konzentrationen von unterschiedlichen ChIP-Ansätzen mit CTCF-Antikörper nach qPCR-Analysen mit dem *Repeat*-übergreifend amplifizierenden B-inter-Primer dar. **A**: Der Vergleich von kurz verdauten und über Nacht verdauten Ansätzen von Experiment C-A ergibt ein mehr als zehnfaches Verhältnis. **B**: Die Verhältnisse der unverdauten (Standard) und verdauten Ansätze von C-B und C-C zeigen mit dem Drei- und Elffachen deutliche Unterschiede. Die Fehlerwerte entsprechen bei den qPCR-Mittelwerten (MW) dem Standardfehler des MW (SEM) und bei den Verhältniswerten der Standardabweichung (SD) mit Fehlerfortpflanzung.

A

	C-A			
	MW	**SEM**	**kurzer : langer Verdau**	**SD**
kurzer Verdau	0,193	0,0040	10,6	1,12
langer Verdau	0,018	0,0013		

B

	C-B				C-C			
	MW	**SEM**	**Standard : Verdau**	**SD**	**MW**	**SEM**	**Standard : Verdau**	**SD**
Standard	6,95	1,44	3,1	0,98	13,4	1,1	11,1	2,89
Verdau	2,28	0,21			1,21	0,2		

Der enzymatische Verdau von Immunkomplexen aus antikörpergebundenem, Ultraschall-fragmentiertem Chromatin beeinträchtigt bei allen drei CTCF-ChIP-Ansätzen die Amplifikation mit dem *Repeat*-überspannenden B-inter-Primer. Dadurch wird belegt, dass nach der Ultraschall-Behandlung allein jeweils noch zusammenhängende *Repeats* vorliegen. Die verschiedenen Verhältniswerte der drei Experimente zeigen die unterschiedliche Effektivität der jeweiligen Verdaue. Die Daten ermöglichen keine genaue Aussage über die Vollständigkeit der einzelnen Restriktionsverdaue. Die großen Verhältniswerte bei C-A und C-C deuten jedoch auf einen guten Verdau hin.

3.4.2 CTCF-Bindungsnachweis an die ICR1

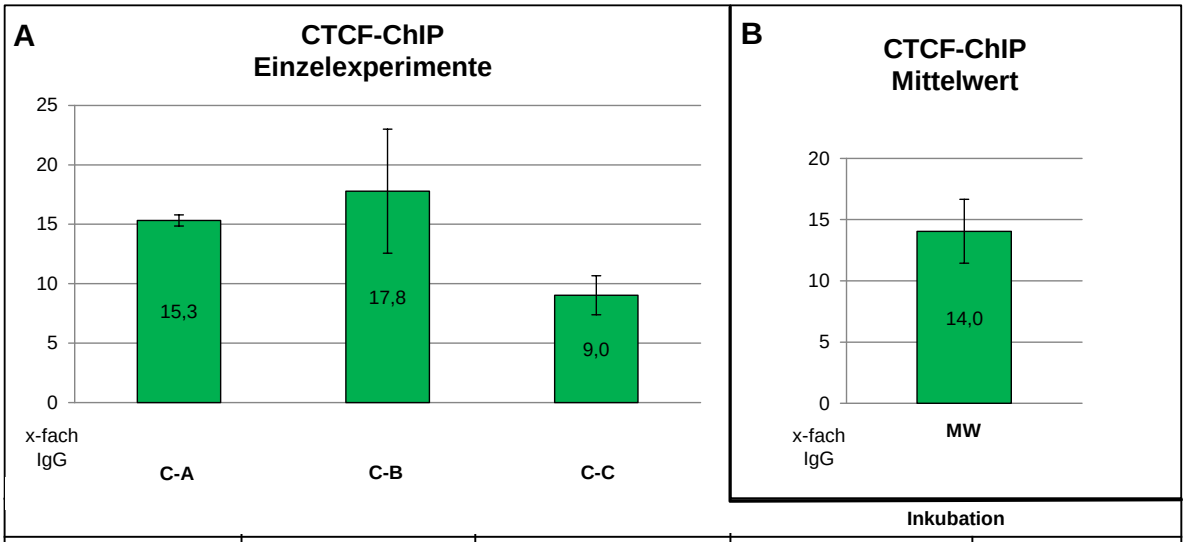
Bei den durchgeführten ChIP-Experimenten wurden jeweils parallel IP-Ansätze mit spezifischem Antikörper und einem unspezifischem IgG-Gemisch durchgeführt. Die IgG-Ansätze dienen als Negativkontrolle und eignen sich darüber hinaus als Maß für die unspezifische Hintergrund-Immunpräzipitation. Bei allen ChIP-Versuchen wurden für beide Ansätze quantitative PCR-Analysen mit Primern durchgeführt, die zu einer Amplifikation innerhalb einzelner B-*Repeats* führen (B-intra). Eine ICR1-Bindung von CTCF ist an CTS (CTCF *target sites*) genannte Bindestellen möglich, die sich in allen vollständigen B-*Repeats* der humanen ICR1 finden. Die B-intra-Primer amplifizieren einen Bereich, der die CTS der *Repeats* B1, B2, B3, B5 und B6 einschließt. Eine Untersuchung der CTS in

B7 war durch dessen Sequenzunterschiede zu den anderen *Repeats* nicht möglich.

Für die verschiedenen ChIP-Experimente wurde jeweils ein Verhältniswert der relativen DNA-Konzentrationen von Antikörper- und IgG-IP ermittelt (x-fach IgG), der zur Beurteilung der Funktionalität der ChIP und der Effizienz der Immunpräzipitationen genommen wurde. Eine Proteinbindung sollte bei einer funktionellen ChIP mit spezifischem Antikörper mit einer relativen DNA-Konzentration einhergehen, die deutlich über dem Hintergrund-Niveau der zugehörigen IgG-ChIP liegt.

Die ChIP-Daten zur CTCF-Bindung an die ICR1-CTS basieren auf drei Einzelexperimenten (C-A, C-B, C-C), die alle mit Chromatin aus der upd(11p15)mat-Zelllinie durchgeführt wurden. Die Protokolle der drei Experimente unterschieden sich geringfügig bezüglich der Inkubationen, die zur Bildung des Immunkomplexes aus DNA mit fixiertem Protein, Antikörper und *bead* führten. Bei C-A und C-C wurde eine Reihenfolge gewählt, bei der zunächst Antikörper und *bead* inkubiert wurden, wohingegen bei C-B erst Chromatin und Antikörper zusammen pipettiert und anschließend die *beads* zugegeben wurden. Die Bindung des Antikörpers an das Chromatin erfolgte bei C-B und C-C im Ultraschallbad und bei C-A eine längere Zeit auf einem Radinkubator.

Die Experimente C-A und C-B weisen bei den CTCF-Immunpräzipitationen in Bezug auf die IgG-Ansätze ca. 15- bzw. 18-fache relative Konzentrationswerte auf (Abbildung 3-7 A). Bei Experiment C-C wurde für den Ansatz mit CTCF-Antikörper das etwa 9-fache des IgG-Werts ermittelt. Die Mittelung der drei Experimente, ohne Berücksichtigung der individuellen Protokoll-Unterschiede, führt zu einem etwa 14-fachen IgG-Wert (Abbildung 3-7 B).



Inkubation				
X		X	AK-*beads* → Chromatin	**Reihenfolge**
	X		AK-Chromatin → *beads*	
	X	X	Ultraschallbad	**Bedingungen**
X			Rad-Inkubator	

Abbildung 3-7 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit CTCF-Antikörper und verschiedenen Inkubationsbedingungen

In der Abbildung sind relative DNA-Konzentrationen (qPCR) von ChIP-Ansätzen mit CTCF-Antikörper im Verhältnis zu den zugehörigen IgG-Werten dargestellt. **A**: Drei Einzelexperimente unterscheiden sich in verschiedenen Protokollschritten, die die Inkubation von Antikörpern, *beads* und Chromatin betreffen. Zum einen wurden unterschiedliche Inkubationsbedingungen des Chromatins und zum anderen Variationen in der Reihenfolge getestet, die zur Bildung des Immunkomplexes führen soll (Tabelle). Die Experimente C-A und C-B weisen zwei- bis dreifach höhere Vielfach-IgG-Werte auf als C-C. **B**: Die Mittelung aller drei Versuche ergibt für den Antikörperansatz einen 14-fachen IgG-Wert. Der Fehlerindikator dieser Mittelung ist als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Fehlerindikatoren der Einzelexperimente entsprechen dem SEM mit Fehlerfortpflanzung (AK, Antikörper)

Trotz der experimentellen Unterschiede belegen die x-fach IgG-Werte, dass mit allen drei Protokollen eine funktionelle Chromatin Immunpräzipitation möglich ist. Die Diskrepanz zwischen den höheren Werten von C-A und C-B im Vergleich zum niedrigeren von C-C lässt jedoch darauf schließen, dass bei den beiden erstgenannten die effizientesten Kombinationen der beiden getesteten Protokollschritte angewendet wurden. Das Gesamtergebnis belegt klar, dass eine Bindung von CTCF an die ICR1 zustande kommt.

3.4.3 CTCF-Bindungscharakteristik in der ICR1

Die einzelnen CTS in der humanen ICR1 variieren untereinander an wenigen Nukleotid-Positionen (Abbildung 3-2) und werden ausschließlich im unmethylierten Zustand gebunden (Hark *et al*., 2000). Ein differenziell methylierter Status mit Methylierung des paternalen Allels konnte in Vergangenheit für alle *Repeats* außer B2 und B4 gezeigt werden (Sparago *et al*., 2004; Cui *et al*., 2001 und 2002; Takai *et al*., 2001; Frevel *et al*., 1999). Die differentielle Methylierung nahezu aller CTS in der ICR1 lässt theoretisch auf eine CTCF-Bindung an alle vollständigen B-*Repeats* schließen. Bis dato bestehen jedoch keine Daten, die die detaillierte Proteinbindung an die einzelnen *Repeats* der ICR1 beschreiben. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung durch eine Erweiterung der ChIP-

Methodik angegangen. Dabei wurden immunpräzipitierte, durch den B-intra-Primer amplifizierte ICR1-DNA-Stücke in Vektoren ligiert und durch Einzelklon-Sequenzierung genau charakterisiert (2.5). Die einzelnen Sequenzen konnten durch *Repeat*-charakteristische Einzelnukleotid-Unterschiede geordnet und die relativen Bindungshäufigkeiten an die verschiedenen CTS ermittelt werden. Zur initialen Amplifikation der Immunpräzipitate wurde der gleiche Primer (B-intra) wie bei der Bindungsanalyse (3.4.2) verwendet. B-intra amplifiziert mit Ausnahme von B7 gleichermaßen alle vollständigen B-*Repeats*. Für die Einzelklon-Sequenzierungsanalysen wurde ChIP C-A verwendet, die im Vergleich zu IgG eine mehr als 15-fache DNA-Konzentration bei der Immunpräzipitation mit CTCF-Antikörper aufweist. Für die Bindungscharakterisierung wurden 122 Klone ausgewertet (Abbildung 3-8). Die prozentuale Verteilung zeigt für die drei *Repeats* der zentromernahen ICR1-Hälfte exakt gleiche Werte. Bei den beiden analysierten *Repeats* B5 und B6 in der telomernahen Hälfte findet man dazu vergleichsweise höhere Prozentzahlen. Mit mehr als 34 % der analysierten Einzelklone weist B6 insgesamt den höchsten Wert auf.

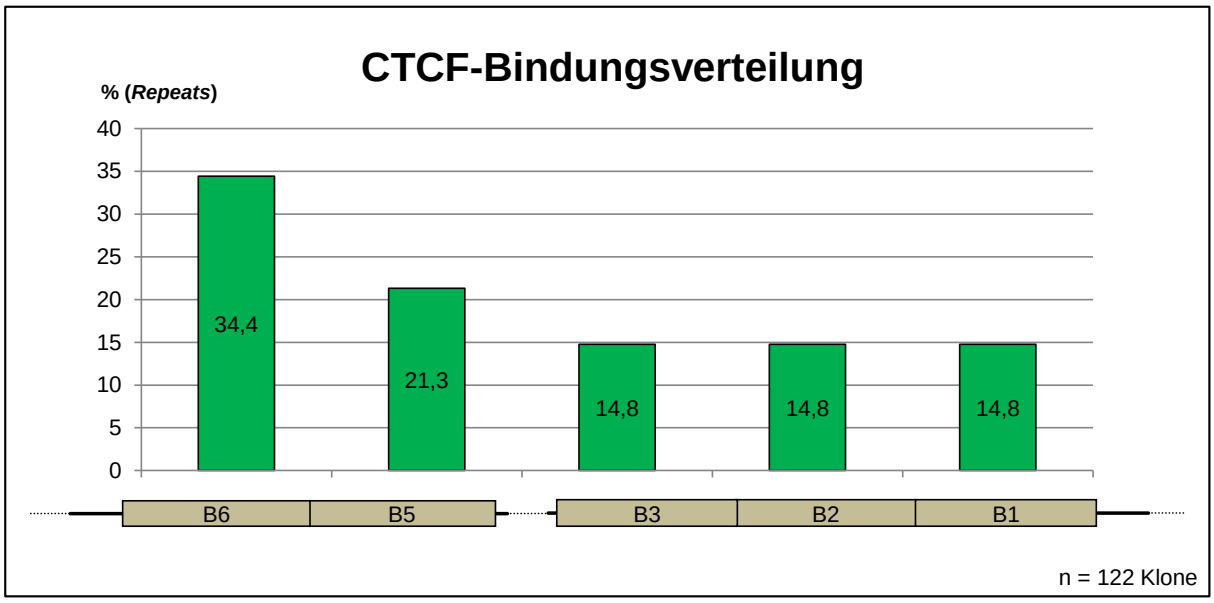


Abbildung 3-8 Bindungsverteilung von CTCF in der ICR1

Die Abbildung stellt die durch spezifische Chromatin Immunpräzipitation und anschließende Einzelklonsequenzierung ermittelte prozentuale Verteilung der CTCF-Bindung an die analysierten ICR1-*Repeats* B1, B2, B3, B5 und B6 dar. Die Ergebnisse basieren auf 122 ausgewerteten Einzelklonen und zeigen identische Werte für die zentromernahen *Repeats* B1-B3. Die telomernahen *Repeats* B5 und B6 weisen im Vergleich dazu höhere Werte mit einem Maximum von mehr als 34 % bei B6 auf.

Die dargestellte prozentuale Bindungsverteilung belegt, dass eine Bindung von CTCF an die CTS aller analysierten B-*Repeats* stattfindet. Die CTS der distalen, telomernahen Hälfte der Kontrollregion werden häufiger durch das Protein gebunden, obwohl mangels B7 nur zwei davon analysiert werden konnten.

3.5 Nachweis der Kaiso-Bindung an die ICR1 durch ChIP

In der humanen ICR1 finden sich insgesamt zehn putative Bindestellen für Kaiso, die teilweise geringfügige Sequenz-Unterschiede aufweisen und sowohl unregelmäßig als auch einheitlich in der

repetitiven Region lokalisiert sind (3.2). Dass eine Bindung des Proteins an die regelmäßig lokalisierten KBS in vitro erfolgt, konnte erstmals in der vorliegenden Arbeit durch EMSA-Experimente gezeigt werden (3.3.2). Ergänzend zu diesen Daten sollte geklärt werden, ob diese Bindung auch im lebenden Organismus stattfindet. Aus diesem Grund wurden ChIP-Experimente mit Kaiso-Antikörpern durchgeführt. Für die Chromatin Immunpräzipitation wurde ein Protokoll verwendet, dessen Funktionalität durch den Bindungsnachweis von CTCF bestätigt wurde (3.4).

3.5.1 Fragmentierung des Chromatins

Die richtige Fragmentierung des Chromatins ist ein essentielles Kriterium für die Funktionalität der ChIP. Sie erfolgt durch eine initiale Ultraschall-Behandlung (2.4.2) und durch einen spezifischen Verdau im Anschluss an die Immunpräzipitation (2.4.6). Die Parameter für eine adäquate Ultraschall-Fragmentierung wurden vorab in Etablierungsansätzen ermittelt und die im ChIP-Protokoll verwendeten Bedingungen überprüft (3.4.1).

Die Funktionalität des spezifischen Verdaus zur Trennung der B-*Repeats* wurde exemplarisch bei einer der beiden ChIP-Experimente mit Kaiso-Antikörper (K-B) untersucht. Dafür wurden der verdaute und der unverdaute Ansatz des Experiments durch qPCR mit dem *Repeat*-überspannenden B-inter-Primer analysiert. Der Vergleich des unverdauten Kontrollansatzes mit dem über Nacht verdauten Ansatz zeigt ein mehr als zweifaches Verhältnis (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Analyse der enzymatischen ICR1-Fragmentierung bei Kaiso-ChIP

Die Tabelle stellt die relative DNA-Konzentration von ChIP-Ansatz K-B mit Kaiso-Antikörper nach qPCR-Analysen mit dem *Repeat*-übergreifend amplifizierenden B-inter-Primer dar. Das Verhältnis des unverdauten (Standard) und verdauten Ansatzes ist mehr als zweifach. Die Fehlerindikatoren entsprechen bei den qPCR-Mittelwerten (MW) dem Standardfehler des MW (SEM) und beim Verhältniswert der Standardabweichung (SD) mit Fehlerfortpflanzung.

	K-B			
	MW	**SEM**	**Standard : Verdau**	**SD**
Standard	2,38	0,50	2,2	1,10
Verdau	1,07	0,31		

Das zweite in dieser Arbeit beschriebene Kaiso-Experiment (K-A) wurde ohne unverdauten Kontrollansatz dargestellt. Daher ist die Beurteilung der enzymatischen Fragmentierung dieser ChIP nur indirekt über die oben dargestellten Ergebnisse von ChIP K-B möglich, bei der der Verdau unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde.

Die Beeinflussbarkeit der B-inter-Amplifikation durch den enzymatischen Verdau weist darauf hin, dass nach der Ultraschallbehandlung noch zusammenhängende B-*Repeats* vorliegen. Die Daten ermöglichen zwar keine detaillierte Aussage über die Vollständigkeit der *Repeat*-Trennung beim Restriktionsverdau, zeigen aber, dass er die Anzahl an zusammenhängender *Repeats* noch weiter reduziert.

3.5.2 Kaiso-Bindungsnachweis an die ICR1

Nach dem *in vitro*-Nachweis der Kaiso-Bindung an die regelmäßigen KBS der ICR1 sollte durch ChIP gezeigt werden, dass eine entsprechende Bindung auch in proliferierenden Zellen stattfindet. Dafür wurde das durch den CTCF-Nachweis (3.4), auf Funktionalität getestete Protokoll verwendet, bei dem die Bindung von Antikörper und *beads* durch eine Vorinkubation zustande kam und die Bindung dieses Komplexes an das Chromatin im Ultraschallbad stattfand. Um separat die Kaiso-Bindung an das unmethylierte maternale Allel untersuchen zu können, wurde auch bei den Kaiso-ChIP-Experimenten Chromatin aus der upd(11p15)mat-Zelllinie verwendet. Die Auswertung wurde wie beim bereits geschilderten CTCF-Versuch durch qPCR mit dem *Repeat*-intern amplifizierenden B-intra-Primer durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Verhältnis der relativen DNA-Konzentrationen von Kaiso-Antikörper- und IgG-Immunpräzipitationen (x-fach IgG) dargestellt.

Die Ergebnisse zur Kaiso-Bindung basieren auf zwei ChIP-Experimenten mit Kaiso-Antikörper. Bei Experiment K-A wurden zwei Ansätze mit verschiedenen Antikörpermengen durchgeführt: K-A1, genauso wie das zweite Kaiso-ChIP-Experiment K-B, mit der regulären Menge (10 µg pro IP) und K-A2 mit 15 µg pro IP. Die drei Experiment-Ansätze zeigen nahezu identische Ergebnisse mit geringsten Abweichungen (Abbildung 3-9). Die Mittelung der Werte von K-A1, K-A2 und K-B ergibt mit Kaiso-Antikörper eine mehr als 22-fache Immunpräzipitation im Vergleich zu IgG.

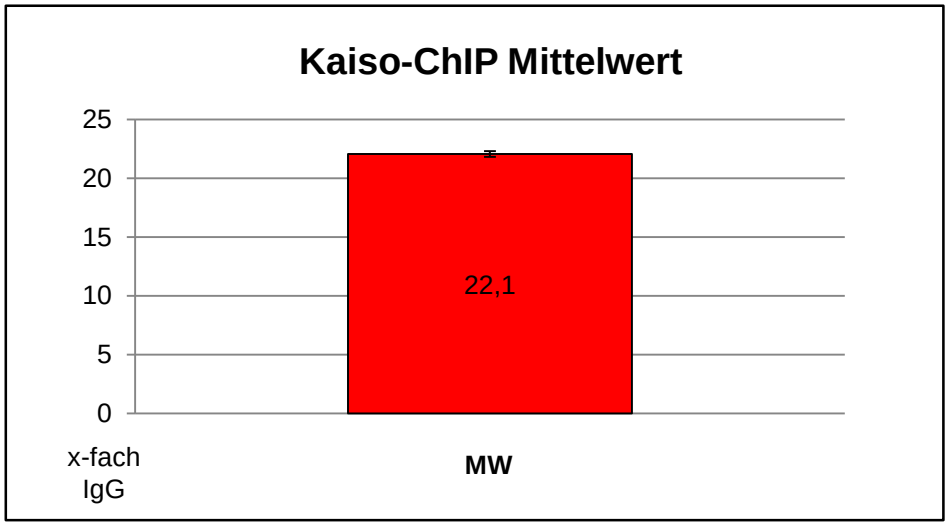


Abbildung 3-9 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit Kaiso-Antikörper

In der Abbildung ist die relative DNA-Konzentration (qPCR mit B-intra-Primer) von ChIP-Ansätzen mit Kaiso-Antikörper im Verhältnis zu den zugehörigen IgG-Werten dargestellt. Die jeweiligen Werte von drei Experimentansätzen, bei denen teilweise verschiedene Mengen Antikörper genutzt wurden, variieren minimal und liegen mit mehr als dem 22-fachen IgG-Wert deutlich über dem Hintergrundniveau der Immunpräzipitation. Der Fehlerwert ist als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Die Vielfach-IgG-Werte der drei ChIP-Ansätze liegen klar über dem Hintergrundniveau der Immunpräzipitation und belegen damit eine Bindung von Kaiso an die ICR1.

Neben den regelmäßigen (ICR1-KBS) und teils zusätzlichen unregelmäßigen KBS in den *Repeats* B1, B2, B3, B5 und B6 findet sich im Bereich des verkürzt vorliegenden B4-*Repeats* eine KBS mit optimaler Konsensussequenz (B4-KBS). Aufgrund der B4-Sequenzeigenheiten kann diese putative

Bindungsstelle nicht mit dem beschriebenen B-intra-Primer untersucht werden. Um die Kaiso-Bindung an B4 trotzdem im Rahmen der ChIP analysieren zu können, wurde ein spezieller Primer genutzt, der exklusiv zu einer B4-spezifischen Amplifikation führt.

Der Mittelwert der x-fach IgG-Werte der beiden ChIP-Ansätze von Experiment K-A liegt bei 4,8 (Abbildung 3-10). Bei den verdauten Ansätzen von ChIP K-B fand keine Amplifikation mit dem B4-intra-Primer statt.

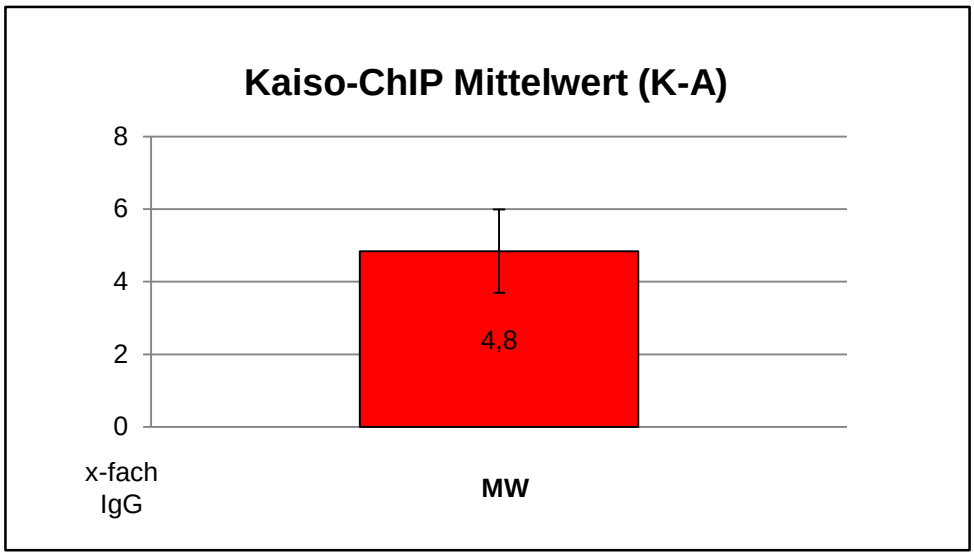


Abbildung 3-10 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit Kaiso-Antikörper

In der Abbildung ist die relative DNA-Konzentration (qPCR mit B4-intra) von ChIP-Ansätzen mit Kaiso-Antikörper im Verhältnis zu den zugehörigen IgG-Werten dargestellt. Die immunpräzipitierte DNA wurde dafür mit einem Primer untersucht, der nur im B4-*Repeat* zu einer Amplifikation führt. Die Mittelung der zwei Ansätze von Experiment K-A, die sich in der Antikörpermenge (10 und 15 µg pro IP) unterscheiden, zeigt einen IgG-Vielfach-Wert unter fünf. Der Fehlerwert ist als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Die Ergebnisse der B4-spezifischen Analyse der ChIP-Experimente ermöglichen keine klare Bewertung der Bindungssituation an die optimale KBS dieses *Repeats*.

3.5.3 Kaiso-Bindungscharakteristik in der ICR1

Die fünf regelmäßig lokalisierten KBS besitzen identische 8-mer-Sequenzen und unterschieden sich nur in einzelnen Basen der umliegenden Sequenzbereiche. Drei zusätzliche putative KBS in B1 und B2 besitzen im Vergleich zu den erläuterten regelmäßigen KBS verschiedene Basenunterschiede an Position acht (Abbildung 3-2). Durch die beschriebenen ChIP-Experimente mit Kaiso-Antikörper würde eine Bindung an alle diese KBS gleichermaßen detektiert. Für eine *Repeat*-spezifische Untersuchung der Kaiso-Bindung in der ICR1 wurden, wie bei der Untersuchung der CTCF-Bindungscharakteristik (3.4.3), Einzelklon-Sequenzierungsanalysen durchgeführt. Aus den beiden ChIP-Experimenten mit spezifischer Immunpräzipitation durch Kaiso-Antikörper (K-A und K-B) wurden Amplifikate des B-intra-Primers in Vektoren ligiert und nach deren Transformation in Bakterien Einzelklone gepickt und sequenziert (2.5).

Von beiden ChIPs wurden in etwa gleiche Klonanzahlen (88 und 93) verwendet. Beim Experiment K-

A, das aus zwei Ansätzen mit verschiedenen Antikörpermengen besteht (A1 und A2), wurden die Einzelklone zusammen ausgewertet. Die Einzelklonsequenzierung zeigte nur geringe Unterschiede bei der prozentualen *Repeat*-Verteilung.

Die prozentuale Verteilung der Einzelklone auf die untersuchten B-*Repeats* weist deutliche Diskrepanzen zwischen den beiden ChIPs auf (Abbildung 3-11). K-A zeigt eine zwischen den beiden ICR1-Hälften relativ ausgeglichene Verteilung. Die Einzelklonsequenzierung von K-B weist nahezu exklusiv das *Repeat* B6 auf, insgesamt weniger als zehn Prozent verteilen sich auf die anderen vier untersuchten *Repeats*.

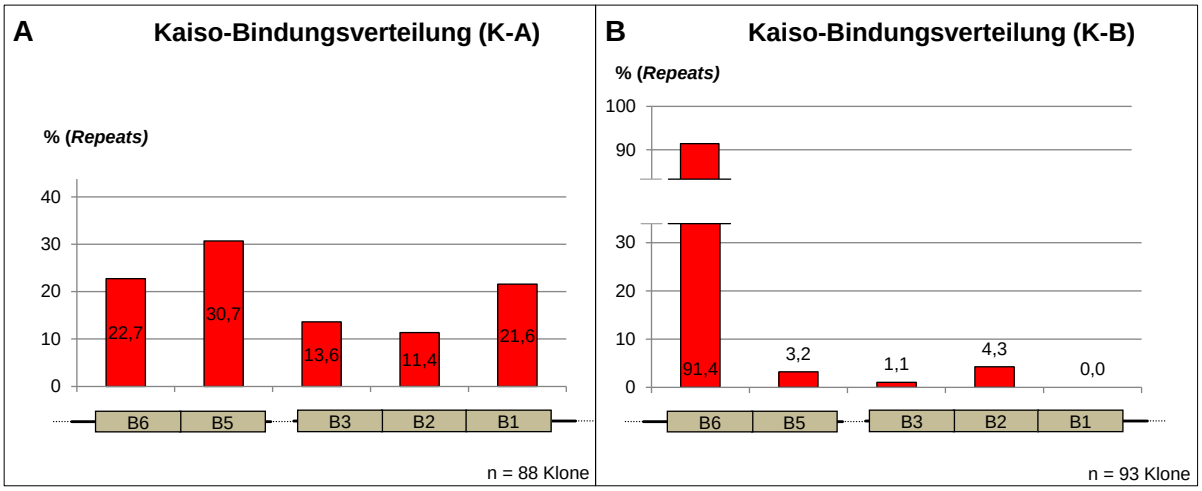


Abbildung 3-11 Bindungsverteilung von Kaiso in der ICR1

Die Abbildung stellt die durch spezifische Chromatin Immunpräzipitation und anschließende Einzelklon-Sequenzierung ermittelte prozentuale Verteilung der Kaiso-Bindung an die analysierten ICR1-*Repeats* B1, B2, B3, B5 und B6 dar. Von den beiden K-A-Ansätzen, die sich in der Menge des eingesetzten Antikörpers unterscheiden, wurden mit 88 und 93 ungefähr gleiche Klonanzahlen ausgewertet. Der Vergleich der beiden Experimente zeigt diskrepante prozentuale Anteile der analysierten *Repeats*. **A**: K-A weist eine zwischen den beiden ICR1-Hälften relativ ausgeglichene Verteilung auf. **B**: Bei K-B wurden nahezu exklusiv B6-Einzelklone identifiziert. (n, Klonanzahl)

Die diskrepanten Ergebnisse von K-A und K-B ermöglichen keine eindeutige Aussage zu der Bindungssituation von Kaiso an die analysierten B-*Repeats*.

3.6 Vergleichende Expressionsanalysen von 11p15.5-Genen bei uniparentalen Chromosom 11-Disomien

Nachdem eine Bindung von Kaiso an die KBS der humanen ICR1 gezeigt wurde, kann eine Funktion des Proteins bei der Regulation umliegender Gene vermutet werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl Expressionsanalysen von Genen des telomerwärts gelegenen Clusters IC1 (*H19* und *IGF2*) als auch des zentromernahen Clusters IC2 (*KCNQ1OT1* und *CDKN1C*) durchgeführt. Dafür wurde RNA aus Fibroblasten-Kulturen isoliert und durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (2.2.1, 2.2.3). Die so gewonnene cDNA konnte durch quantitative PCR untersucht werden (2.2.4). Um unterschiedliche Expressionsniveaus verschiedener Zellkulturen zu berücksichtigen, wurden die Expressionswerte analysierter Gene auf das geometrische Mittel der

Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* abgeglichen.

Die Untersuchung der Konsequenz von Proteinbindungen an die unmethylierte ICR1 wurde mit Zelllinien durchgeführt, die uniparentale Disomien (upd) von Chromosom 11 aufweisen. Eine upd ist allgemein durch das Vorliegen zweier Homologe eines Chromosomenpaars von nur einem Elternteil gekennzeichnet und kann das ganze Chromosom oder einen Abschnitt davon betreffen. Für die folgend beschriebenen Versuche wurde die bereits im Rahmen der WB-, ChIP- und Einzelklon-Sequenzierungsanalysen (3.1, 3.4, 3.5) beschriebene maternale upd-Zelllinie und eine Fibroblasten-Kultur mit zwei paternalen Kopien (upd(11p15)pat) verwendet. Bei beiden Zelllinien wurde genomische DNA in der Region 11p15 mit MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) untersucht und zeigte jeweils bei beiden *Imprinting*-Clustern Methylierungsveränderungen: IC1-Hypomethylierung und IC2-Hypermethylierung bei der maternalen upd sowie IC1-Hypermethylierung und IC2-Hypomethylierung bei der paternalen upd. Darüber hinaus ließen sich in beiden Fällen keine Hinweise auf Deletionen oder Duplikationen der jeweiligen Kontrollregionen finden. Beim maternalen upd-Fall wurde durch Mikrosatelliten Markeranalyse ein mosaikaler upd-Zustand belegt.

Die Gene *H19*, *IGF2*, *KCNQ1OT1* und *CDKN1C* unterliegen dem genomischen *Imprinting*. Da alle vier von den uniparentalen Disomien betroffen sind, sollte ihre allelspezifische Expression zu deutlichen Expressionsunterschieden zwischen den beiden gegensätzlichen upds führen. Die maternale upd sollte mit einer verstärkten *H19*- und *CDKN1C*-Expression einhergehen, während für *IGF2* und *KCNQ1OT1* bei der paternalen upd erhöhte Werte vorliegen müssten. Aufgrund der Eindeutigkeit der zu erwartenden Ergebnisse dient die Expressionsanalyse mit den upd-Zelllinien auch als Test für die angewendete Methodik, mit der, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, auch durch siRNA modifizierte Zellkulturen untersucht wurden.

Die mRNA-Expression der 11p15.5-Gene wurde für die beiden upd-Zelllinien jeweils in zwei Experimenten aus verschiedenen Zellkulturpassagen ermittelt. Zum Vergleich wurde in beiden Experimenten jeweils RNA aus unterschiedlichen Kontroll-Fibroblastenkulturen mit normalem bi-parentalen Allelstatus untersucht (Experiment 1: K-YR, Experiment 2: K-SE).

Gene des distalen IC1

In beiden Experimenten weist die maternale uniparentale Disomie, im Vergleich zur paternalen, höhere *H19*-Expressionswerte auf (Abbildung 3-12 A). Mit etwa dem Zehnfachen bei Experiment 1 und mehr als dem 30-fachen bei Experiment 2 bestehen jedoch verschiedene Größenverhältnisse. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Experimente in der Expression der Kontrollzelllinien: Der Wert von K-YR beim ersten Experiment liegt zwischen dem der beiden upd-Zelllinien, während K-SE in Experiment 2 einen niedrigeren Wert als beide Disomien aufweist.

Für *IGF2* finden sich in beiden Fällen höhere Expressionswerte bei der paternalen upd (Abbildung 3-12 B). Die beiden Experimente unterscheiden sich dabei bezüglich der Lage der Kontrollzellwerte: Während bei Experiment 1 die Expression von beiden Disomien unterhalb des Werts der Kontrolle liegt, zeigt Experiment 2 eine Kontrollzellexpression zwischen den Werten der upd-Zelllinien. Das

Größenverhältnis der Expressionswerte beider Disomien weist mit dem ca. 27-fachen (Experiment 1) und dem ca. sechsfachen (Experiment 2) klare Unterschiede auf.

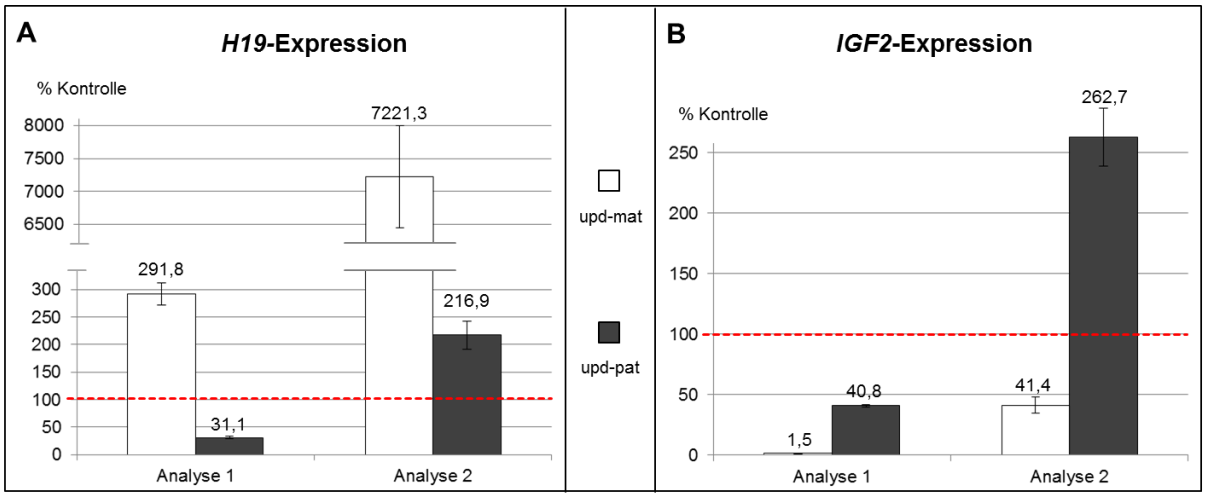


Abbildung 3-12 Genexpression im IC1 bei uniparentalen Disomie-Fällen

Die Abbildung zeigt die Expression der IC1-Gene *H19* und *IGF2* bei gegensätzlichen uniparentalen Disomien. Die zwei Experimente unterscheiden sich in den Zelllinien mit regulärem Allelstatus, die jeweils als Kontrollen verwendet wurden, und den Zellkulturpassagen der upd-Zellen. Die auf Haushaltsgene abgeglichenen Expressionswerte sind in Prozent der jeweiligen Kontrollzelllinie (rote Linie = 100 %) dargestellt. **A**: Die stärkste *H19*-Expression findet sich in beiden Experimenten bei der maternalen upd. Die Kontrollzellexpression liegt bei Experiment 1 zwischen und bei Experiment 2 unter beiden Disomie-Werten. **B**: In beiden Experimenten zeigt die paternale upd die höhere *IGF2*-Expression. Während beide upd-Expressionswerte sich bei Experiment 1 unterhalb des Kontrollzellwerts befinden, liegt dieser bei Experiment 2 zwischen den Werten der gegensätzlichen Disomien. Die Fehlerindikatoren entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Gene des proximalen IC2

Eine höhere *KCNQ1OT1*-Expression findet man in beiden Experimenten bei der paternalen upd (Abbildung 3-13 A). Unterschiede zwischen Experiment 1 und 2 mit etwa dem Zwei- bzw. ca. dem 15-fachen bestehen in den Größenverhältnissen der gegensätzlichen upd-Expressionswerte. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Experimente in der Expression der Kontrollzelllinien: Der Wert von K-YR beim ersten Experiment liegt zwischen den beiden upds, während K-SE in Experiment 2 einen höheren Wert als beide Disomien aufweist.

Bezüglich der Expression von *CDKN1C* findet man in beiden Experimenten höhere Expressionswerte bei der maternalen upd (Abbildung 3-13 B). Die Unterschiede zwischen den Disomien besitzen mit 1,4- bzw. 1,7-fach in etwa das gleiche Größenverhältnis. In beiden Fällen liegen die *CDKN1C*-Werte von den Disomien unterhalb der jeweiligen verwendeten Kontrollen.

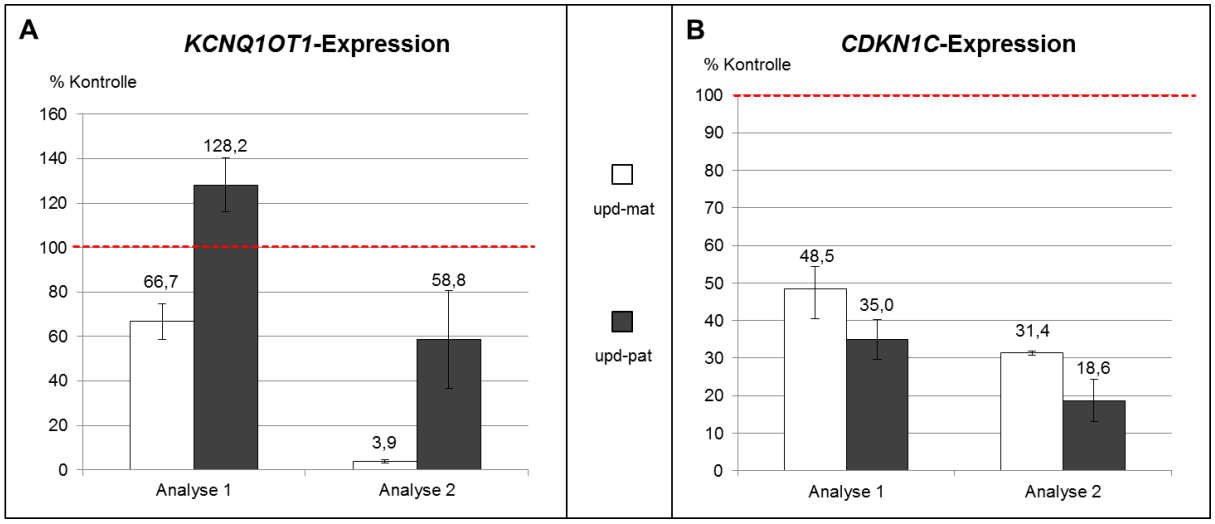


Abbildung 3-13 Genexpression im IC2 bei uniparentalen Disomie-Fällen

Die Abbildung zeigt die Expression der IC2-Gene *KCNQ1OT1* und *CDKN1C* bei gegensätzlichen uniparentalen Disomien. Die zwei Experimente unterscheiden sich in den Zelllinien mit regulärem Allelstatus, die jeweils als Kontrollen verwendet wurden, und der Zellkulturpassage der upd-Zelllinien. Die auf das geometrische Mittel der beiden Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* abgeglichenen Expressionswerte sind in Prozent der jeweiligen Kontrollzelllinie (rote Linie = 100 %) dargestellt. **A**: Die stärkste *KCNQ1OT1*-Expression findet sich in beiden Experimenten bei der paternalen upd. Die Kontrollzellexpression liegt bei Experiment 1 zwischen und bei Experiment 2 unter beiden Disomie-Werten. **B**: In beiden Experimenten zeigt die maternale upd die höhere *CDKN1C*-Expression. Die Expressionswerte der gegensätzlichen upds liegen dabei ausnahmslos unterhalb des jeweiligen Kontrollzellwerts. Die Fehlerindikatoren entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Die Expressionsanalysen belegen, dass die gegensätzlichen uniparentalen Status der Disomien in unterschiedlicher Expression der geprägten Gene resultieren. Das Ergebnis bestätigt damit auch die Funktionalität der gewählten Analysemethode und bildet die Grundlage für weitere derartige Analysen zur allelspezifischen Untersuchung der Bedeutung von ICR1-Proteinbindungen.

3.7 Expressionsanalysen von 11p15.5-Genen bei *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

Der Bedeutung der Bindungen von Kaiso und CTCF an die ICR1 sollte in dieser Arbeit gezielt durch *knockdown*-Versuche nachgegangen werden. Dafür wurden Fibroblasten-Zellen mit siRNA gegen *CTCF* und *Kaiso* transfiziert, die durch den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) zur Degradierung von Ziel-mRNA führt. Um gezielt die Proteinbindung an das unmethylierte Allel untersuchen zu können, wurden für die Experimente Fibroblasten-Kulturen mit der bereits beschriebenen maternalen uniparentalen Disomie verwendet. Die Auswertung der *knockdown*-Versuche wurde wie bei der Analyse der upd-Zelllinien (3.6) durch reverse Transkription (RT) isolierter RNAs mit anschließender qPCR durchgeführt. Zum Expressionsabgleich auf den normalen Zellstatus wurden parallel zu Ansätzen mit spezifischen siRNAs gegen die Ziel-mRNAs immer auch identische Zellkulturansätze mit *scrambled locus*-siRNAs transfiziert. Diese Kontroll-RNAs besitzen keine komplementäre Sequenz im Transkriptom und zeigen somit lediglich mögliche unspezifische Auswirkungen des Transfektions- und RNAi-Ereignisses. Um unterschiedliche Expressionsniveaus verschiedener Zellkulturen zu berücksichtigen, wurden die Expressionswerte der analysierten Gene

auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* abgeglichen.

3.7.1 Effizienz der *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

Um Effekte einer Bindung von CTCF und Kaiso auf die Genexpression bestimmter Gene untersuchen zu können, muss eine funktionelle Herunterregulation der Faktoren und damit eine Reduktion der ICR1-Bindungswahrscheinlichkeit gewährleistet sein. Daher wurden zunächst quantitative PCR-Analysen mit Primern durchgeführt, die eine Amplifikation der spezifisch durch siRNA herunterregulierten Zielgene (*CTCF* und *Kaiso*) ermöglichen, um die Funktionalität der *knockdowns* und die jeweilige Effizienz zu überprüfen.

Ein Wert, der Auskunft über die Effizienz der erläuterten RNAi-Experimente ermöglicht, ist der Bezug der spezifischen mRNA-Expression eines *knockdown*-Ansatzes auf die der *scrambled locus*-Kontrolle, die als Maß für die Normal-Expression nach der Manipulation durch die Transfektion steht. Um das zeitliche Optimum von *knockdowns* auf mRNA-Ebene identifizieren zu können und um bei der Analyse von putativ beeinflussten Genen einen Effekt zeitversetzt detektieren zu können, wurden die Transfektionen zu verschiedenen Zeitpunkten durch qPCR analysiert. Für die Auswirkung der Transfektion auf möglicherweise beeinflusste Gene ist, streng genommen, der *knockdown* der Zinkfingerproteine auf Proteinebene ausschlaggebend. Die Untersuchung der Transfektionsauswirkungen im Zeitverlauf sollte allerdings auch ohne gesonderte Analyse von CTCF und Kaiso auf Proteinebene aussagekräftige Werte zu den Effekten auf andere Gene liefern.

Effizienz des CTCF-*knockdowns*

Zur Beurteilung der *knockdown*-Effizienz wurde cDNA durch qPCR mit *CTCF*-spezifischen Primern analysiert. Die Ansätze mit *CTCF*-spezifischen siRNAs ergaben zu allen analysierten Zeitpunkten eine Reduktion der *CTCF*-RNA-Expression auf Werte unter 35 % der relevanten *scrambled locus*-Kontrollen (Abbildung 3-14). Tendenziell findet man mit zunehmendem Abstand vom Transfektions-Zeitpunkt einen Anstieg der *CTCF*-Expression, der jedoch mit einem Tiefpunkt bei 96 h und einem Zwischenabfall bei 168 h unstetig verläuft.

Die *CTCF*-Expression wurde zusätzlich auch für in den gleichen Experimenten erstellte *knockdown*-Ansätze mit einer der beiden verwendeten *Kaiso*-spezifischen siRNAs (K-Q, 2.8.7) ermittelt. Alle analysierten Zeitpunkte zeigen Werte größer als 100 % der relevanten *scrambled locus*-Transfektionen. Der 72 h-Wert zeigt mit dem 1,9-fachen der *scrambled locus*-Kontrolle den höchsten Wert, die restlichen Zeitpunkte zeigen geringere Abweichungen vom Kontrollwert. Die Expressionswert-Schwankungen des *Kaiso-knockdowns* korrelieren im zeitlichen Verlauf, mit Ausnahme des 168 h-Werts, mit denen des *CTCF-knockdowns*.

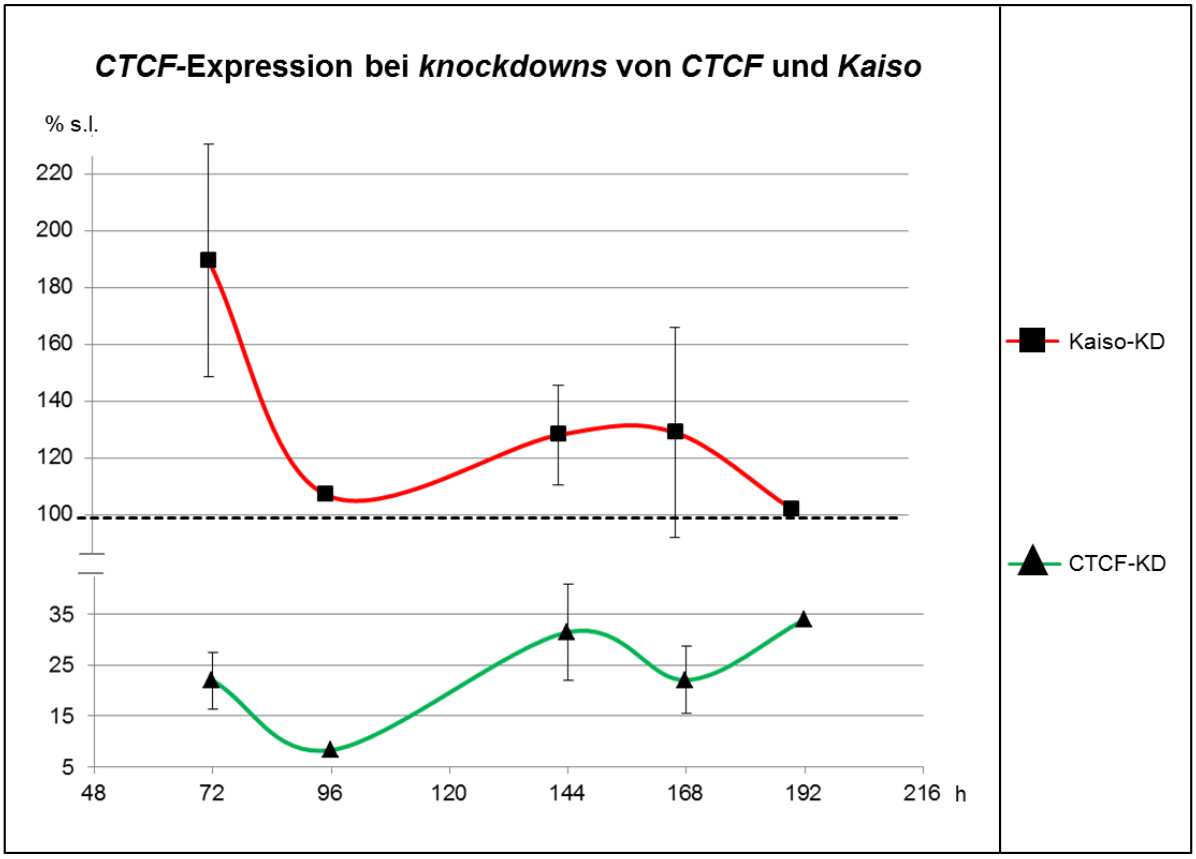


Abbildung 3-14 *CTCF*-Expression bei *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte RNA-Expression von *CTCF* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Der im Zeitverlauf tendenzielle Expressionsanstieg bei *CTCF-knockdowns* (grün) verläuft schwankend und besitzt einen Tiefpunkt bei 96 h. Auf ähnliche Weise schwankend findet man die Werte bei *Kaiso-knockdowns* (rot), die alle über den relevanten % s.l.-Kontrollen liegen. Das Maximum weist dabei der 72 h-Zeitpunkt mit dem 1,9-fachen % s.l.-Wert auf. Die restlichen Zeitpunkte zeigen geringere Abweichungen. Die Zeitpunkte 72 h, 144 h und 168 h wurden drei Mal analysiert, bei 96 h und 192 h wurden Analysen jeweils nur einmalig durchgeführt. Fehlerindikatoren stellen bei den dreifach-analysierten Zeitpunkten den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die *CTCF*-Expressionsanalysen belegen deutlich die Funktionalität der *knockdown*-Experimente. Die Transfektion mit *CTCF*-spezifischer siRNA führt zu einer effizienten Herunterregulation der Ziel-mRNA. Die *Kaiso*-siRNA-Transfektionen rechtfertigen durch die geringen Unterschiede zu den *scrambled locus*-Ansätzen deren Verwendung als Abgleichswert für die Normalexpression.

Effizienz des *Kaiso-knockdowns*

Die *knockdown*-Experimente zur Herunterregulation von Kaiso wurden redundant mit zwei siRNAs von verschiedenen Herstellern durchgeführt, die auf unterschiedliche Zielsequenzen des *Kaiso*-Transkripts abzielen (K-Q und K-S, 2.8.7), die jedoch immer in Exon 3 liegen. Die beiden experimentellen Bedingungen äußern sich in unterschiedlich intensiven Auswirkungen auf die *Kaiso*-Expression: Der Reduktion auf Werte teils deutlich unter einem Fünftel der *scrambled locus*-Expression mit klar ansteigender Tendenz bei K-S steht eine insgesamt geringere Expressionsminderung mit sprunghaftem Anstieg des 192 h-Werts bei K-Q gegenüber (Abbildung 3-15). Die *Kaiso*-Expression wurde zusätzlich auch für in den gleichen Experimenten erstellte *knockdown*-Ansätze mit der *CTCF*-

spezifischen siRNA ermittelt. Die analysierten Zeitpunkte zeigen 1,1- bis 1,4-fache Werte der relevanten *scrambled locus*-Transfektionen.

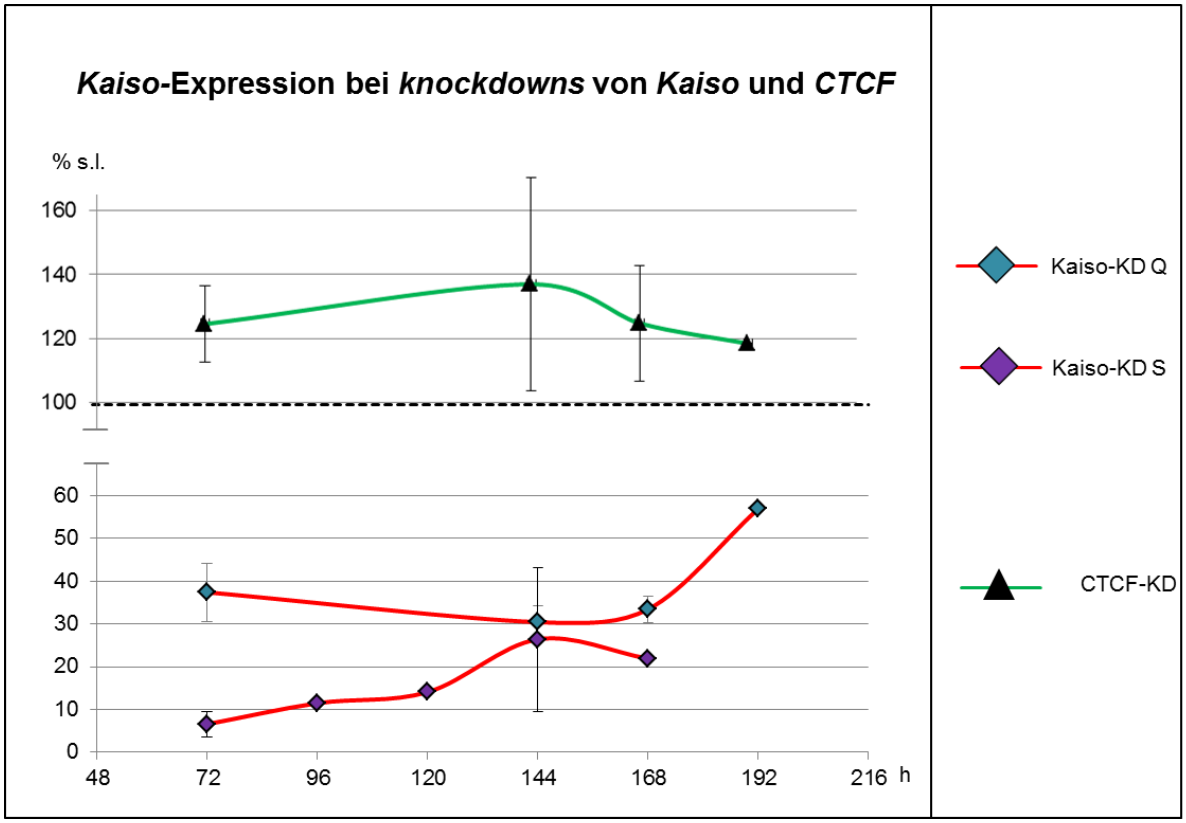


Abbildung 3-15 *Kaiso*-Expression bei *knockdowns* von *Kaiso* und *CTCF*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte RNA-Expression von *Kaiso* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Zwei unterschiedliche *Kaiso*-spezifische siRNAs (K-Q und K-S) unterscheiden sich in der Intensität der Herunterregulation von *Kaiso*-RNA: K-S (rot und lila) zeigt eine deutlichere Reduktion mit im Zeitverlauf ansteigender Tendenz, K-Q (rot und gelb) weist allgemein höhere % s.l.-Werte mit einem sprunghaften Anstieg bei 192 h auf. Die *Kaiso*-Expression bei *CTCF-knockdowns* liegt immer über den Werten der relevanten % s.l.-Ansätze und ist im Zeitverlauf mit dem 1,1- bis 1,4-fachen relativ konstant. Die Zeitpunkte 72 h, 144 h und 168 h wurden jeweils drei Mal analysiert, die dargestellten 96 h- und 192 h-Analysen wurden jeweils nur einmalig durchgeführt. Fehlerindikatoren stellen bei den dreifach analysierten Zeitpunkten den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die Expressionsanalysen belegen, dass beide *Kaiso*-spezifischen siRNAs, zumindest bis inklusive 168 h nach ihrer Transfektion, eine deutliche Reduktion der *Kaiso*-RNA bewirken. Die konstanten *Kaiso*-Expressionswerte der ebenfalls untersuchten *CTCF-knockdowns* demonstrieren aufgrund der geringen Unterschiede zu den *scrambled locus*-Kontrollen, dass diese sich für den Abgleich auf die Normal-Expression gut eignen.

Effizienz des Doppel-*knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

Um mögliche Interaktionen beim Wirken der beiden Zinkfingerproteine untersuchen zu können, wurden parallel zu den bereits beschriebenen Versuchen auch Doppel-*knockdown*-Experimente durchgeführt. Dabei wurden siRNAs gegen beide Gene in gleichem Verhältnis und in einer zu den Einzelexperimenten identischen Gesamt-RNAi-Menge eingesetzt. Um unterschiedliche Auswirkungen

der verschiedenen *Kaiso*-siRNAs (K-Q und K-S) beim Vergleich des Doppel- mit dem Einzel-*knockdown* zu berücksichtigen, wurden nur die Expressionsdaten verwendet, die auf den gleichen *Kaiso*-siRNAs basieren, die auch im Doppelansatz verwendet wurden (K-Q).

Die Doppel-*knockdowns* führen bei allen analysierten Zeitpunkten zu einer Reduktion der *CTCF*-Expression um mehr als die Hälfte im Vergleich zu den *scrambled locus*-Kontrollen (Abbildung 3-16 A). Bis auf den 96 h-Wert nimmt die Expression im Zeitverlauf kontinuierlich von 28 % *scrambled locus* bei 72 h auf 41 % *scrambled locus* bei 192 h zu. Im Vergleich zu Ansätzen, in denen ausschließlich *CTCF* herunterreguliert wurde, ist die Reduktion der Expression bei den Doppel-*knockdowns* zu allen Zeitpunkten geringfügig niedriger.

Die *Kaiso*-Expression bei den Doppel-*knockdowns* zeigt mit 30 % der *scrambled locus*-Kontrolle bei 72 h den niedrigsten Wert und ist gefolgt von einem stetigen Expressionsanstieg auf 73 % beim spätesten Zeitpunkt (Abbildung 3-16 B). Im Vergleich mit den relevanten Werten des *Kaiso*-Einzel-*knockdowns* weist lediglich der 72 h-Zeitpunkt beim Doppelansatz einen niedrigeren Expressionswert auf. Alle späteren Zeitpunkte zeigen geringere Expressionsreduktionen durch den Doppel-*knockdown*.

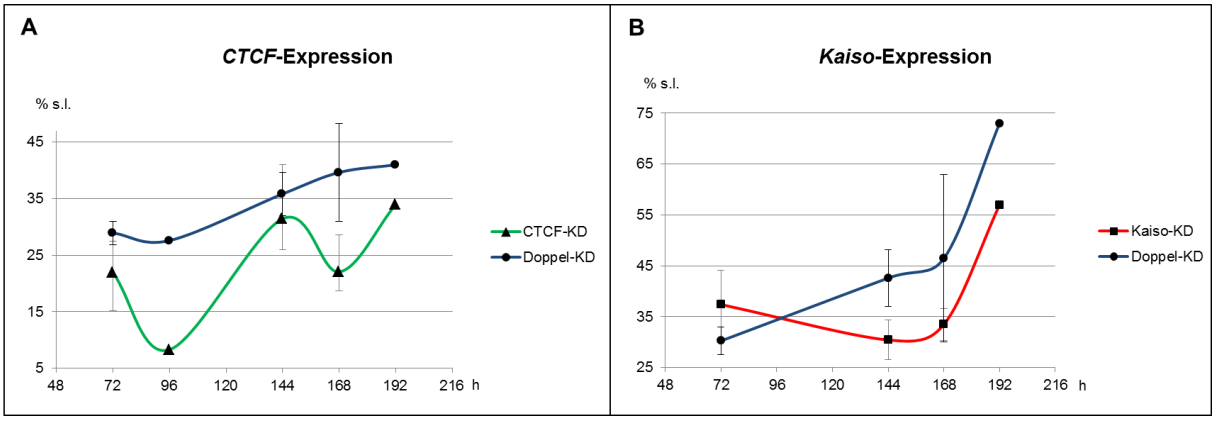


Abbildung 3-16: *CTCF*- und *Kaiso*-Expression bei Doppel-*knockdowns*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte RNA-Expression von *CTCF* bzw. *Kaiso* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). In Doppelansätzen (blau) wurden gleichzeitig siRNAs gegen *Kaiso* und *CTCF* transfiziert. Die relevanten Einzel-*knockdowns* sind zum Vergleich dargestellt (*CTCF*: grün, *Kaiso*: rot). **A**: Die *CTCF*-Expressionswerte der Doppelansätze liegen zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den Einzel-*knockdowns* höher und weisen mit Ausnahme des 96 h-Werts einen kontinuierlichen Anstieg auf. **B**: Die *Kaiso*-Expressionswerte zeigen mit Ausnahme des 72 h-Werts beim Doppelansatz immer geringere Reduktionen als die Einzel-*Kaiso-knockdowns*. Im zeitlichen Verlauf steigt die Expression der Doppelansätze kontinuierlich an. Die Zeitpunkte 72 h, 144 h und 168 h wurden zwei Mal analysiert, die dargestellten 96 h- und 192 h-Analysen wurden jeweils nur einmalig durchgeführt. Fehlerindikatoren stellen bei den mehrfach-analysierten Zeitpunkten den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Der Vergleich der Doppel-*knockdowns* mit den relevanten Einzelansätzen zeigt, dass die gleichzeitige Transfektion mit beiden siRNAs mit einer geringfügig niedrigeren Effizienz der Herunterregulation einhergeht. Zumindest bei den Zeitpunkten bis inklusive 168 h sollte dadurch eine Vergleichbarkeit von Einzel- und Doppelansätzen für die Untersuchung von beeinflussten Genen gewährleistet sein.

3.7.2 Expressionsanalysen beim *CTCF-knockdown*

Ein *Ctcf-knockout* in Mäusen geht mit frühembryonaler Letalität einher (Heath *et al*., 2008; Splinter *et*

al., 2006). Den gängigen, auf murinen Daten basierenden *Enhancer blocking*- und *Loop*-Modellen (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark *et al*., 2000; Murrell *et al*., 2004; Kurukuti *et al*., 2006) entsprechend ist Ctcf für die korrekte Expression von *Igf2* essentiell. Direkte oder indirekte Auswirkungen von CTCF auf *H19* und Gene des IC2 sind auch beim Menschen denkbar und wurden aus diesem Grund durch Expressionsanalysen untersucht.

Gene des distalen IC1

Die RNAi-basierte Herunterregulation des *CTCF*-Transkripts resultiert sowohl für *IGF2* als auch für *H19* in einem Expressionsanstieg, der allerdings ausschließlich 168 h nach der Transfektion vorliegt und bei *IGF2* mit 276 % der *scrambled locus*-Kontrolle wesentlich deutlicher ausfällt (Abbildung 3-17). Zu frühen Zeitpunkten zeigen die *knockdowns* bei beiden Genen auf ähnliche Weise eine geringfügig niedrigere Expression als die Kontrollen.

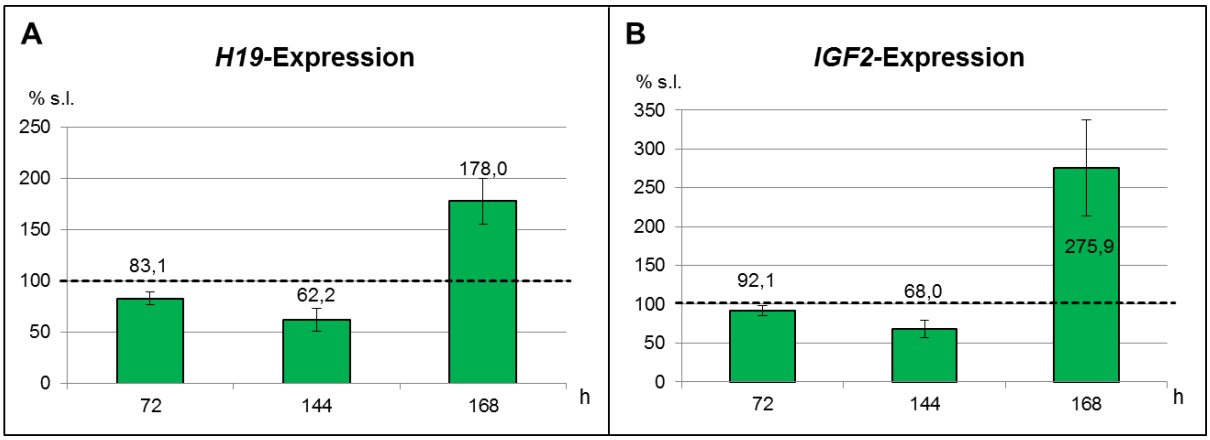


Abbildung 3-17 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die IC1-Genexpression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte mRNA-Expression von *H19* (**A**) und *IGF2* (**B**) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Expressionssteigerungen liegen bei beiden Genen ausschließlich bei den 168 h-Werten vor und fallen bei *IGF2* deutlicher aus. Ebenfalls bei beiden Genen geht die Herunterregulation von *CTCF* bei den früheren Werten mit geringfügig erniedrigter Expression einher. Alle Zeitpunkte wurden drei Mal in Einzelexperimenten analysiert. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Gene des proximalen IC2

Es wurden drei separate *knockdown*-Experimente mit *CTCF*-siRNA in upd(11p15)mat-Fibroblasten durchgeführt, deren Expressionsanalysen mit *CDKN1C*-Primer diskrepante Ergebnisse ergaben: Die Experimente C-1 und C-2 mit einer deutlichen Steigerung der Expression zum frühen Zeitpunkt (72 h) und geringfügig erhöhten Werten bei 144 h und 168 h stehen dabei im Kontrast zur durchgängig auf 20-30 % des *scrambled locus*-Werts erniedrigten Expression von C-3 (Abbildung 3-18 A).

Die *KCNQ1OT1*-Expression wurde nur in einem Experiment analysiert. Dabei findet man zu allen drei Zeitpunkten erniedrigte Expressionswerte vor, die 72 h nach der Transfektion mit 40 % des *scrambled locus*-Werts am deutlichsten ausfallen (Abbildung 3-18 B).

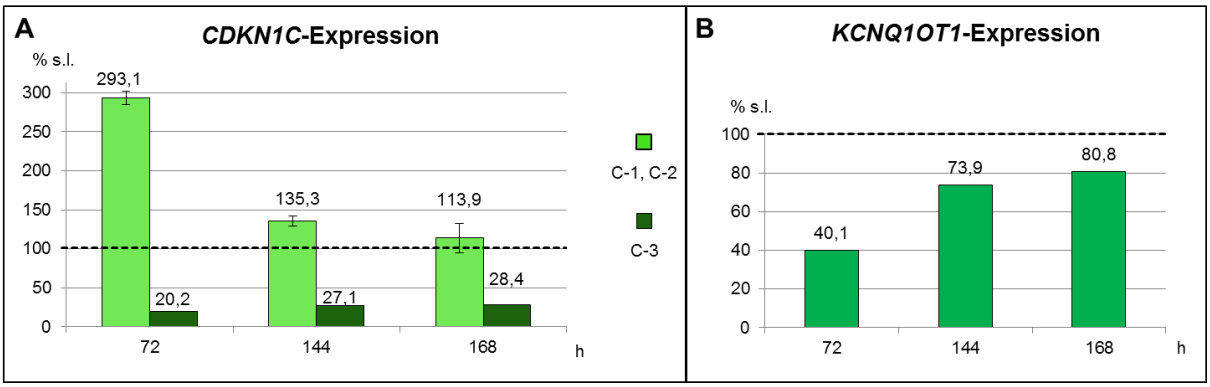


Abbildung 3-18 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die IC2-Genexpression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte mRNA-Expression von *CDKN1C* und *KCNQ1OT1* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion in upd(11p15)mat-Fibroblasten als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). **A**: Die *CDKN1C*-Expressionswerte von drei *knockdown*-Experimenten fallen unterschiedlich aus: Expressionsanstiege von C1 und C2, vor allem zum 72 h-Zeitpunkt, stehen im Kontrast zur durchgängig erniedrigten Expression von C-3. **B**: *KCNQ1OT1* wurde nur bei einem *knockdown*-Experiment analysiert und zeigt dort zu allen drei Zeitpunkten eine erniedrigte Expression. Die Fehlerindikatoren stellen bei den mehrfach analysierten Werten den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die Auswirkung der Herunterregulation von *CTCF* auf die *IGF2*-Expression bestätigen die in der Fachliteratur beschriebene reprimierende Funktion des Proteins und demonstrieren damit auch die Funktionalität der *knockdown*-Experimente mit *CTCF*-siRNA. Weniger deutliche Auswirkungen auf die *H19*- und *KCNQ1OT1*-Expression sowie die diskrepanten Ergebnisse zu *CDKN1C* schließen einen Effekt auf weitere 11p15.5-Gene nicht aus.

3.7.3 Expressionsanalysen beim *Kaiso-knockdown*

Gene des distalen IC1

Die Transfektion von verschiedenen *Kaiso*-siRNAs (K-Q und K-S) resultiert in unterschiedlich intensiver Auswirkung auf die *Kaiso*-Expression (Abbildung 3-15) und weist auch bezüglich der Auswirkungen auf *H19* und *IGF2* Unterschiede auf.

Beide experimentellen Ansätze gehen mit Steigerungen der *H19*-Expression einher, die jedoch unterschiedliche zeitliche Muster aufweisen (Abbildung 3-19 A). Die K-Q-Transfektionen zeigen mit mehr als dem Achtfachen das Maximum zum frühen Zeitpunkt (72 h), während mit K-S ein noch höheres Maximum bei 144 h vorliegt. Alle anderen Zeitpunkte zeigen bei beiden siRNAs etwa dreifache *scrambled locus*-Werte. Wie bei *H19* führen beide siRNAs auch zu gesteigerten *IGF2*-Werten (Abbildung 3-19 B). Dabei stehen jedoch deutliche, ca. vier- bis achtfache Steigerungen mit K-Q im Kontrast zum moderateren Expressionsanstieg, der mit K-S bei den späteren Werten (144 h und 168 h) vorliegt.

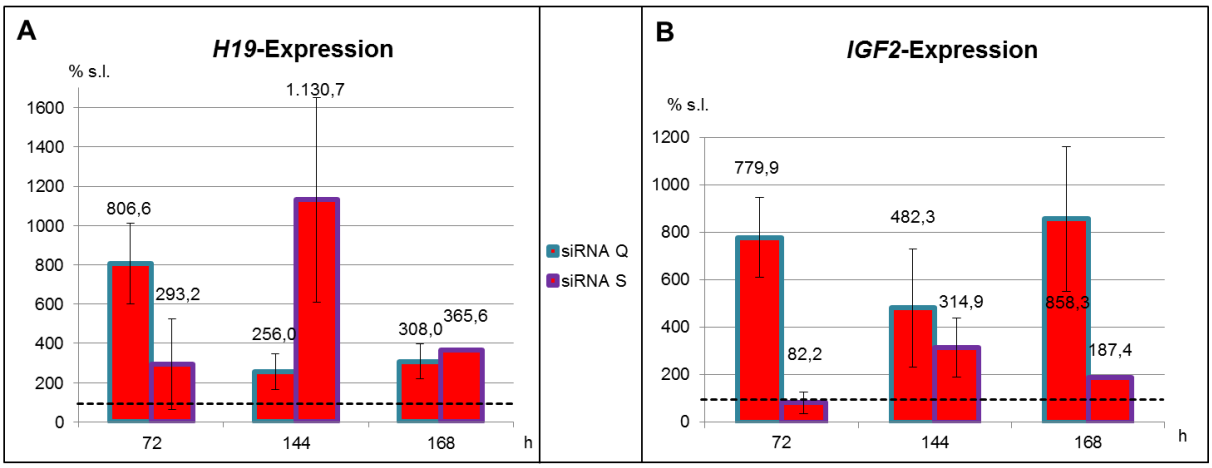


Abbildung 3-19 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die IC1-Genexpression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte mRNA-Expression von *H19* und *IGF2* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Dargestellt sind Mittelwerte von Experimenten mit bezüglich Zielsequenz und Hersteller unterschiedlichen *Kaiso*-siRNAs (K-Q, K-S). **A**: Die siRNAs führen beide durchgängig zu *H19*-Expressionssteigerungen mit unterschiedlichen hohen Maxima zu verschiedenen Zeitpunkten. **B**: Deutliche Anstiege der *IGF2*-Expression mit K-Q-siRNA zu allen Zeitpunkten stehen im Kontrast zu Transfektionen mit K-S, die nur bei den späteren Zeitpunkten zu moderaten Anstiegen führt. Bis auf den 168 h-Wert mit K-S wurden alle Ansätze zwei bis drei Mal in unabhängigen Experimenten analysiert. Die Fehlerindikatoren stellen dabei den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Gene des proximalen IC2

Die Transfektion mit *Kaiso*-siRNA geht mit einer moderaten Steigerung der *CDKN1C*-Expression beim 72 h-Zeitpunkt einher (Abbildung 3-20 A). Die Expressionswerte der späteren Zeitpunkte unterscheiden sich nur geringfügig von den *scrambled locus*-Werten. Die Expression von *KCNQ1OT1* wurde lediglich bei einem Experiment analysiert und schwankt im Zeitverlauf mit 0,75- bis 1,3-fachen Werten um die relevanten Kontrollwerte (Abbildung 3-20 B).

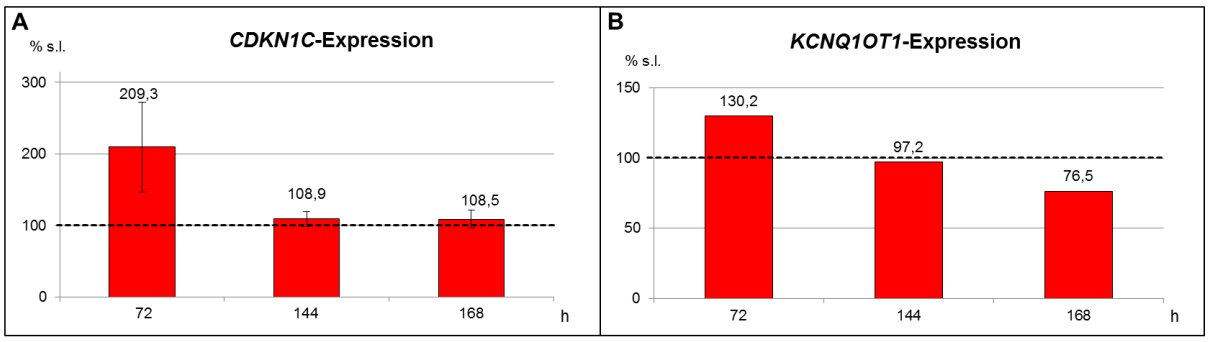


Abbildung 3-20 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die IC2-Genexpression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte mRNA-Expression von *CDKN1C* und *KCNQ1OT1* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Die Transfektionen gehen mit einer moderaten Steigerung der *CDKN1C*-Expression beim frühen Zeitpunkt einher, während die späteren Zeitpunkte geringfügig von den Kontrollen abweichende Werte zeigen. Die *KCNQ1OT1*-Expression weist zu allen drei Zeitpunkten nur geringfügige Abweichungen vom 100 % *scrambled locus*-Wert auf. Die *CDKN1C*-Daten basieren je nach Zeitpunkt auf drei bis fünf analysierten Experimenten mit den bezüglich Zielsequenz und Hersteller unterschiedlichen *Kaiso*-siRNAs (K-Q, K-S). Die *KCNQ1OT1*-Expression wurde für jeden Zeitpunkt nur ein Mal analysiert. Die Fehlerindikatoren stellen bei den mehrfach analysierten Ansätzen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die Expressionsanalysen demonstrieren, dass Kaiso deutliche Auswirkungen auf die Expression von beiden analysierten IC1-Genen besitzt. Darüber hinaus kann ein Effekt von Kaiso auf die IC2-Genexpression, zumindest auf *CDKN1C*, vermutet werden. Die Verwendung von unterschiedlichen *Kaiso*-siRNAs geht mit Diskrepanzen in der Intensität und im zeitlichen Verlauf von Expressionssteigerungen einher, führt aber tendenziell immer zum gleichen Ergebnis.

3.7.4 Expressionsanalysen bei Doppel-*knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

In Doppel-*knockdowns* wurden siRNAs gegen *CTCF* und *Kaiso* im gleichen Verhältnis und in einer zu den Einzelexperimenten identischen Gesamt-siRNA-Menge eingesetzt. Die Experimente sollten die Analyse möglicher interaktiver Auswirkungen der beiden Proteine ermöglichen. Dafür wurden die Expressionsergebnisse der Doppel-*knockdowns* mit den relevanten Einzelansätzen verglichen.

Gene des distalen IC1

Der Doppel-*knockdown* von *CTCF* und *Kaiso* resultiert sowohl für *H19* als auch für *IGF2* in gesteigerten Expressionswerten. Mit ca. dem 2,5-fachen findet man die höchste *H19*-Expression bei 72 h und 168 h (Abbildung 3-21 A). Zu allen Zeitpunkten liegen die Werte des Doppel-*knockdowns* zwischen den höheren *Kaiso*- und den niedrigeren *CTCF*-Ansätzen. Mit zunehmendem Abstand vom Transfektions-Ereignis gleichen sich alle drei Werte zunehmend an. Die beiden früheren Zeitpunkte zeigen für die *IGF2*-Expression Werte, die geringfügig über den *scrambled locus*-Kontrollen liegen, ausschließlich der späte 168 h-Zeitpunkt weist mit dem 2,6-fachen eine deutlichere Steigerung auf (Abbildung 3-21 B). Die Doppel-*knockdown*-Werte liegen zu allen drei Zeitpunkten im Bereich der *CTCF*-Ansätze und damit gemeinsam deutlich unter den stark erhöhten *Kaiso*-Werten.

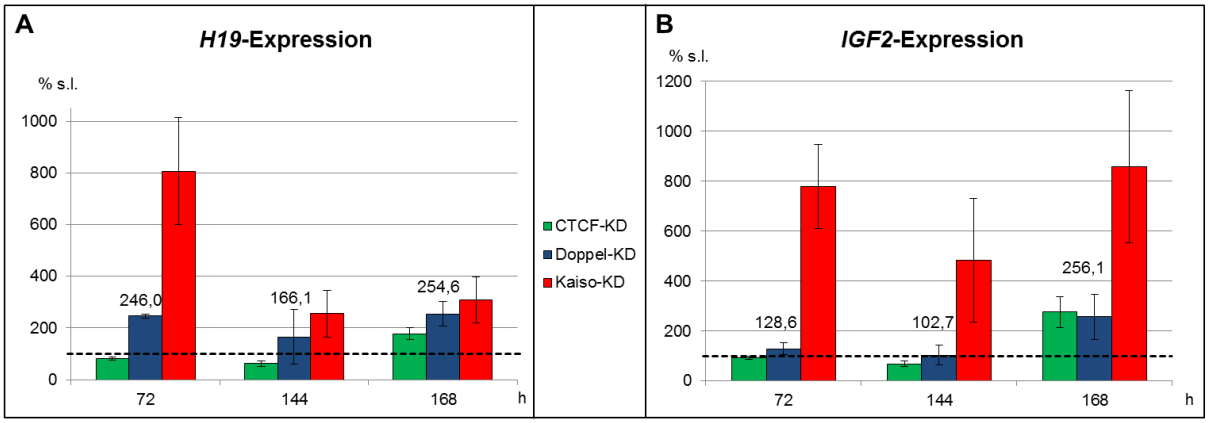


Abbildung 3-21 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die IC1-Genexpression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte mRNA-Expression von *H19* und *IGF2* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Die Werte von Doppel-*knockdown*-Ansätzen (blau) sind jeweils im Vergleich zu den Einzelansätzen dargestellt, bei denen entweder *CTCF*- (grün) oder *Kaiso*-siRNA (rot) verwendet wurde. **A**: Die Expression von *H19* ist zu allen Zeitpunkten gesteigert und zeigt die höchsten Werte bei 72 h und 168 h. In allen Fällen liegen die Werte zwischen denen der relevanten Einzelansätze, die sich jedoch mit zunehmendem Abstand vom Transfektions-Ereignis angleichen. **B**: Die *IGF2*-Expression beim Doppel-*knockdown* liegt zu den frühen Zeitpunkten geringfügig höher als die relevanten *scrambled locus*-Werte und zeigt exklusiv zum spätesten Zeitpunkt eine deutliche Steigerung. Die Doppel- und *CTCF-knockdown*-Werte gleichen sich jeweils und liegen damit gemeinsam unter den stark erhöhten *Kaiso*-Werten. Es wurden zwei separate Doppel-*knockdown*-Experimente analysiert. Die Einzel-*knockdown*-Daten basieren auf jeweils drei Experimenten. Für die *Kaiso-knockdown*-Ansätze wurden nur Daten von Ansätzen mit siRNA K-Q verwendet, die auch beim Doppelansatz genutzt wurden. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Gene des proximalen IC2

Die Herunterregulation von *CTCF* und *Kaiso* im Doppelansatz wurde zwei Mal durchgeführt. Die beiden Experimente unterscheiden sich klar bezüglich ihrer *CDKN1C*-Expression (Abbildung 3-22 A). Die durchgängig erniedrigte Expression in einem Experiment steht im Gegensatz zum Expressionsanstieg bei allen Zeitpunkten im anderen Experiment. Besonders stark sind die Auswirkungen in beiden Fällen zum frühen Zeitpunkt (72 h). Der Vergleich mit den ebenfalls diskrepanten *CTCF-knockdowns* (Abbildung 3-18 B) zeigt bei der niedrigeren Expression jeweils sehr ähnliche Werte und für die höhere Expression jeweils stärkere Anstiege beim Doppelansatz. Der Expressionsanstieg des Doppelansatzes bei 72 h ist wesentlich stärker als der zeitgleiche Anstieg der Expression beim *Kaiso*-Ansatz. Die *KCNQ1OT1*-Expression der Doppel-*knockdowns* schwankt zu allen drei Zeitpunkten um die jeweiligen *scrambled locus*-Werte. Im Vergleich zu den jeweiligen Einzel-*knockdown*-Ansätzen liegen die Doppelansatzwerte im zeitlichen Verlauf an unterschiedlichen Positionen in deren Mitte, über oder unter den Werten für *CTCF* und *Kaiso*. (Abbildung 3-22 B).

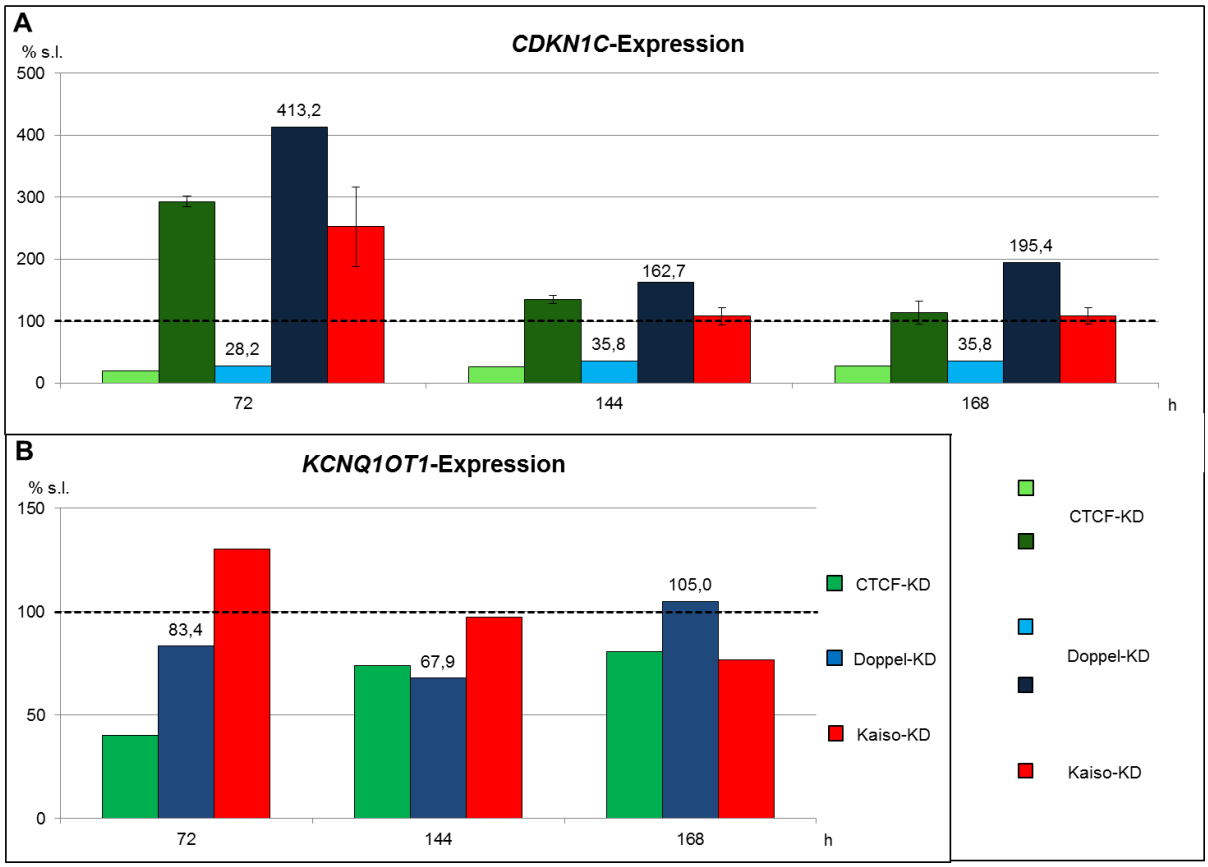


Abbildung 3-22 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die IC2-Genexpression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene normalisierte mRNA-Expression von *CDKN1C* und *KCNQ1OT1* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Die Werte von Doppel-*knockdown*-Ansätzen (blau) sind jeweils im Vergleich zu den Einzelansätzen dargestellt, bei denen entweder *CTCF*- (grün) oder *Kaiso*-siRNA (rot) verwendet wurde. **A**: Die Expression von *CDKN1C* weist in den zwei analysierten Doppel-*knockdowns* mit im Zeitverlauf durchgängig erniedrigten oder erhöhten Werten diskrepante Werte auf. Beim Vergleich mit den jeweils passenden, ebenfalls diskrepanten *CTCF*-Experimenten (Abbildung 3-18 B) findet man zum einen sehr ähnlich erniedrigte Werte und zum anderen noch stärkere Expressionsanstiege bei den Doppelansätzen. **B**: Die *KCNQ1OT1*-Expression der Doppel-*knockdowns* schwankt um die relevanten *scrambled locus*-Werte und variiert im Vergleich zu den beiden Einzelansätzen. Für *CDKN1C* wurden zwei und für *KCNQ1OT1* ein Doppel-*knockdown*-Experiment analysiert. Die Einzel-*knockdown*-Daten basieren auf jeweils drei Experimenten. Für *Kaiso* wurden nur Daten von Ansätzen mit siRNA Q verwendet, die auch beim Doppelansatz genutzt wurden. Die Fehlerindikatoren stellen bei den mehrfach analysierten Ansätzen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die Expressionsanalysen von Doppel-*knockdowns* zeigen beim Vergleich mit den relevanten Einzelansätzen Effekte, die sich durch die individuelle Wirkung von einer der beiden siRNAs erklären lassen. Die halbierte Menge der jeweiligen siRNA in den Doppelansätzen führt bei Veränderungen zu einer geringeren Intensität, mit der Auswirkungen auf die Genexpression auftreten. Die diskrepanten *CDKN1C*-Expressionsergebnisse lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die diesbezügliche Bedeutung der beiden Proteine zu.

3.8 Vergleichende Expressionsanalysen von geprägten Genen anderer Chromosomen bei uniparentalen Disomien

Parallel zu Expressionsanalysen von 11p15.5-Genen wurden bei den upd-Zelllinien auch die Gene

MEST, *PLAGL1*, *GNAS*, *GRB10* und *PEG3* untersucht, die außerhalb der beiden *Imprinting*-Cluster auf anderen Chromosomen liegen. Die analysierten Gene sind ortholog zu murinen Genen, die als Bestandteil eines Netzwerks geprägter Gene (IGN, *Imprinted Gene Network*) beschrieben wurden und deren Expression in der Maus interagierend reguliert wird (Gabory *et al*., 2009; Lui *et al*., 2008; Varrault *et al*., 2006). Zu dem Netzwerk gehören auch *H19*, *Igf2* und *Cdkn1c* und man geht von einer für die Regulation des Netzwerks dominierenden Rolle der ICR1 und einer Funktion von *H19* als *in trans* wirkender Netzwerk-Regulator aus. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob beim Menschen regulative Zusammenhänge zwischen Genen aus der 11p15.5-Region und von anderen Chromosomen bestehen und ob CTCF und Kaiso dabei möglicherweise funktionell involviert sind.

Einer möglichen Bedeutung der ICR1 für die Regulation von IGN-orthologen Genen auf anderen Chromosomen sollte zunächst durch die vergleichende Analyse der beiden uniparentalen Disomien (3.6) nachgegangen werden. Darüber hinaus war es wichtig, die maternale upd als Grundlage für die folgend beschriebenen *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* zu charakterisieren.

Wie bei der upd-Expressionsanalyse der Chromosom 11-Gene wurden die humanen IGN-orthologen Gene in zwei separaten Experimenten mit verschiedenen normalallelischen Kontrollzelllinien untersucht (Experiment 1: K-YR, Experiment 2: K-SE). Ausnahmen bilden diesbezüglich *GRB10,* das nur einmalig analysiert wurde, und *MEST,* bei dem in Experiment 2 keine Kontrollzellwerte ermittelt wurden.

Den stärksten Expressionsunterschied zwischen den gegensätzlichen Disomien findet man bei *MEST*: Beim ersten Experiment findet man eine 24-fach stärkere Expression der paternalen im Vergleich zur maternalen upd und einen dazwischen gelegenen Wert für die Kontrollzellen (Abbildung 3-23 A). Experiment 2 lässt sich mangels Kontrollzellwert und aufgrund des extrem hohen Expressionswerts der paternalen upd, der dem 1,6E+07-fachen der maternalen upd entspricht (Anhang 7-1), nicht grafisch darstellen. Ein kompletter Expressionsverlust von *MEST* bei der upd(11p15)mat-Zelllinie, der den großen Verhältniswert von Experiment 2 in Frage stellen würde, kann ausgeschlossen werden, da die relevanten Replikate der qPCR-Analyse sich durch Ihre Ähnlichkeit bestätigen und die Amplifikation außerhalb des Hintergrundbereichs der qPCR-Reaktion erfolgt.

Ebenfalls deutlich höhere Expressionswerte der paternalen upd ergeben sich für *PLAGL1* (Abbildung 3-23 B). Eine etwa zweifach erhöhte Genexpression der paternalen im Vergleich zur maternalen upd bei Experiment 1 steht im Gegensatz zur mehr als zehnfachen paternalen Expression bei Experiment 2. Dabei liegt nur bei Experiment 1 der Kontrollwert zwischen den upds. Geringe Unterschiede bestehen zwischen den gegensätzlichen uniparentalen Disomien bei der Expression von *GNAS* und *GRB10*. Die im Disomie-Vergleich jeweils sehr ähnlichen *GNAS*-Werte liegen experimentabhängig entweder geringfügig über oder unter der jeweils relevanten Kontrolle (Abbildung 3-23 C). Das einzelne Experiment von *GRB10* zeigt in geringem Maße voneinander abweichende Expressionswerte für die beiden Disomien, die unter dem Kontrollwert liegen (Abbildung 3-23 D). *PEG3* weist in beiden Experimenten für die maternale upd eine ca. fünf- bis siebenfach stärkere Expression auf (Abbildung 3-23 E). Die Kontrollzellwerte liegen in beiden Fällen zwischen denen der

gegensätzlichen upds.

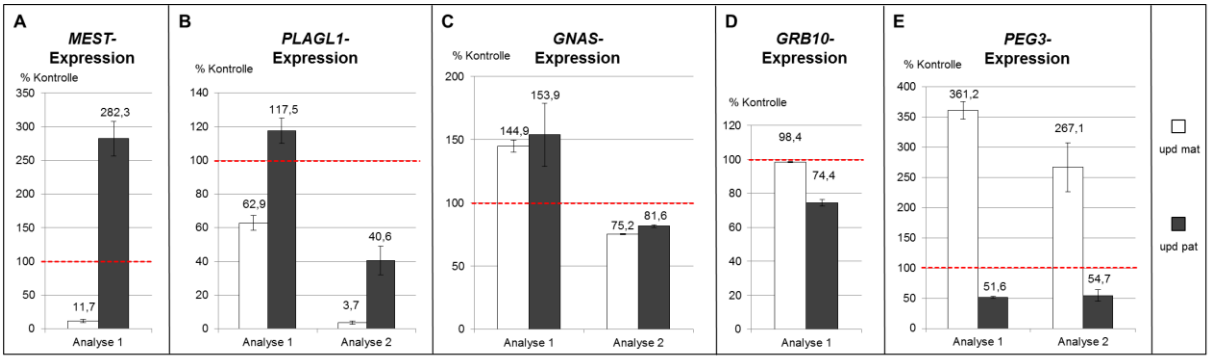


Abbildung 3-23 Expressionsanalysen von geprägten Genen auf anderen Chromosomen bei uniparentalen Disomien

Die Abbildung zeigt die Genexpression bei uniparentalen Disomien (upd-mat weiß, upd-pat grau). Experimente 1 und 2 unterscheiden sich in den Passagen, aus denen RNA gewonnen wurde, und den Zelllinien mit regulärem Allelstatus, die als Kontrollen verwendet wurden. Die auf das geometrische Mittel der beiden Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* abgeglichenen Expressionswerte sind in Prozent der jeweiligen Kontrollzelllinie (rote Linie = 100 %) dargestellt, die Fehlerindikator entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM). **A**: Die *MEST*-Expression wurde nur in einem Experiment gemeinsam mit einer Kontrollzelllinie untersucht und zeigt bei der paternalen upd einen deutlich höheren Wert. Beim zweiten Experiment, ohne Kontrollzellwert, findet man ein 1,6E+07-faches Verhältnis der paternalen zur maternalen upd (Anhang 7-1). **B**: Die *PLAGL1*-Expression weist in beiden Experimenten einen höheren Wert bei der paternalen upd auf. Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen bestehen in der Lage der jeweiligen Kontrollzelllinie und dem unterschiedlichen Größenverhältnis zwischen den gegensätzlichen upds. **C**: Unterschiede zwischen den verschiedenen Disomien bezüglich der *GNAS*-Expression fallen sehr gering aus und unterscheiden sich lediglich durch die Lage der jeweiligen Kontrollzellwerte. **D**: *GRB10* wurde nur ein Mal analysiert, mit einem etwas höheren maternalen upd-Wert bestehen nur geringfügige Unterschiede zwischen den upds. **E**: Als einziges Gen zeigt *PEG3* eindeutig höhere Expressionswerte für die maternale upd.

Die gegensätzlichen deutlichen Expressionsveränderungen bei drei von fünf untersuchten Genen in den upd-Zelllinien lassen darauf schließen, dass von den upds betroffene Chromosom 11-Regionen Auswirkungen auf andere chromosomale Loci besitzen.

3.9 Expressionsanalysen von geprägten Genen auf anderen Chromosomen bei *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

Die vorangehend beschriebenen Expressionsanalysen bei den unterschiedlichen upds erlauben keine genauere Beurteilung, welche der von den upds betroffenen Abschnitte für die Effekte auf die analysierten homologen IGN-Gene verantwortlich sein könnten und ob CTCF und Kaiso dabei eine Rolle spielen. Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit durch siRNA-*knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* nachgegangen, bei denen die maternale upd-Zelllinie genutzt wurde, um exklusiv die unmethylierte Bindung der beiden Proteine an das mütterliche Allel zu untersuchen.

3.9.1 Expressionsanalysen beim *CTCF-knockdown*

In der Maus konnten bereits ICR1-basierte interchromosomale Kontakte nachgewiesen werden, die durch eine Bindung von CTCF zustande kommen (Ling *et al*., 2006). Es darf vermutet werden, dass solche Interaktionen auch Auswirkungen auf die Expression von Genen in beteiligten chromosomalen

Regionen besitzt. Damit wäre es vorstellbar, dass die Herunterregulation von CTCF auf ähnliche Weise wie die upds mit veränderter Expression von Genen einhergeht, die nicht nur auf Chromosom 11 liegen. Um dieser Theorie nachzugehen, wurde die Expression der orthologen IGN-Gene auch bei siRNA-*knockdowns* untersucht. Vier der fünf analysierten Gene zeigten nur geringe Schwankungen (< zweifach und > 0,75-fach) um die relevanten *scrambled-locus*-Transfektionswerte (Anhang 7-2). Einzig für *MEST* wurden bei allen drei Zeitpunkten deutlich gesteigerte Expressionswerte detektiert (Abbildung 3-24). Mit etwa dem Sechsfachen des Kontrollwerts findet man bei 72 h die höchste Expression, die im weiteren Zeitverlauf auf durchgängig mehr als das Vierfache abfällt.

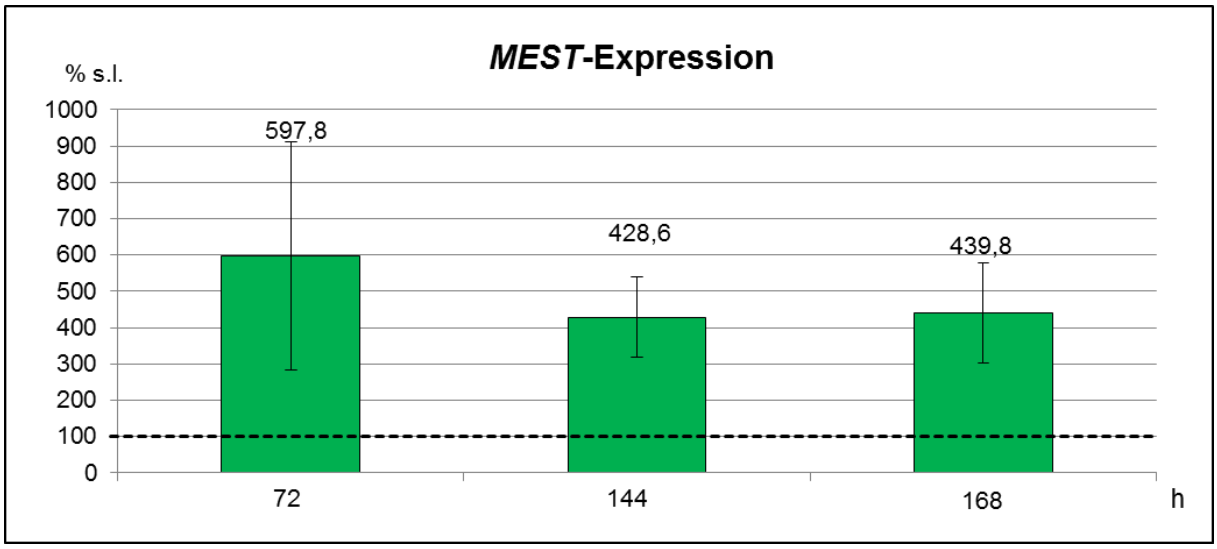


Abbildung 3-24 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die *MEST*-Expression

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* normalisierte mRNA-Expression von *MEST* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Zu allen drei Zeitpunkten findet man eine im Vergleich zu den *scrambled locus*-Ansätzen gesteigerte Expression. Die Daten basieren auf drei (72 h, 168 h) bzw. zwei (144 h) Einzelexperimenten. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die *knockdown*-Experimente zeigen, dass zumindest in einem Fall (*MEST*) die Herunterregulation von *CTCF* auch Auswirkungen auf Gene hat, die nicht auf Chromosom 11 liegen. Hinweise auf eine signifikante Bedeutung des Proteins für die restlichen vier Gene bestehen nicht.

3.9.2 Expressionsanalysen beim *Kaiso-knockdown*

Die Herunterregulation von *Kaiso* geht mit einer klaren Expressionsteigerung von *H19* einher (3.7.3), für das in der Maus eine Funktion als transregulatorischer Faktor für Gene des IGN beschrieben wurde (Gabory *et al*., 2010 und 2009). Aus diesem Grund sollte die mögliche indirekte Auswirkung des *Kaiso-knockdowns* durch Expressionsanalysen der beschriebenen Gene untersucht werden, die nicht auf Chromosom 11 liegen.

Die *GNAS*- und *MEST*-Expression zeigt zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen jeweils nur geringfügig erhöhte Werte (Anhang 7-3). *GRB10 und PLAGL1* zeigen jeweils exklusiv bei 72 h Anstiege der Transkriptmengen auf das Zwei- bis Dreifache der Kontrollwerte (Abbildung 3-25 A und B). Die *PEG3*-Expression weist ebenfalls, beschränkt auf den 72h-Wert, einen starken Anstieg um

mehr als das Neunfache auf (Abbildung 3-25 C). Die späteren Werte von allen drei Genen variieren nur geringfügig von den relevanten *scrambled locus*-Werten.

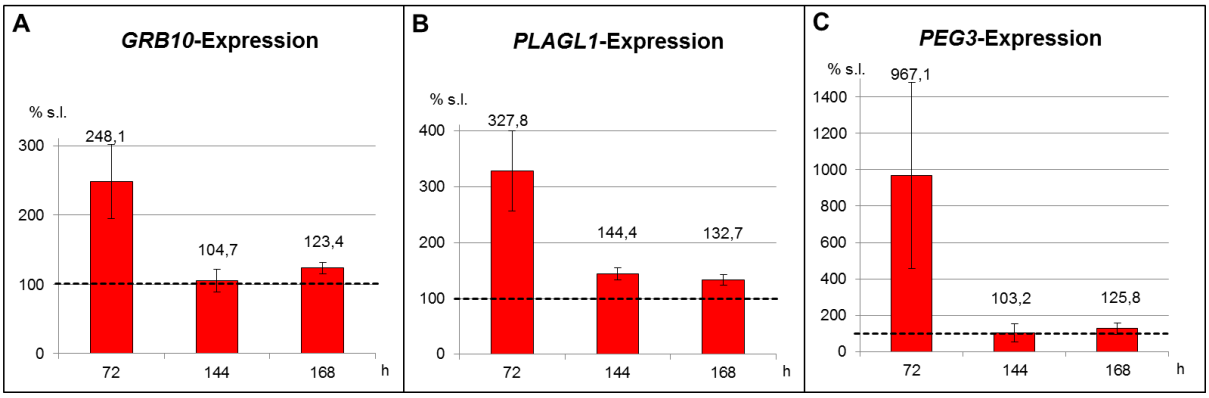


Abbildung 3-25 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die Genexpression von *GRB10*, *PLAGL1* und *PEG3*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* normalisierte RNA-Expression von *GRB10* (**A**), *PLAGL1* (**B**) und *PEG3* (**C**) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Alle drei Gene zeigen exklusiv zum 72 h-Zeitpunkt eine erhöhte Expression, die für *PEG3* besonders deutlich ausfällt. Die Daten basieren auf drei (*GRB10* und *PLAGL1*) bzw. vier (*PEG3*) Einzelexperimenten. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die *knockdown*-Ansätze zeigen, dass eine Herunterregulation von *Kaiso* auch Auswirkungen auf Gene besitzt, die nicht auf Chromosom 11 liegen, und dass diese unterschiedlich stark ausfallen können.

3.9.3 Expressionsanalysen bei Doppel-*knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso*

In Doppel-*knockdown*-Experimenten sollte einer möglichen interaktiven Wirkung von CTCF und Kaiso bei der Expressionsregulation nachgegangen werden. Dafür wurden siRNAs gegen beide Proteine im gleichen Verhältnis und mit einer zu den Einzelexperimenten identischen Gesamt-siRNA-Menge verwendet und, wie vorangehend beschrieben, Expressionsanalysen von Genen durchgeführt, die nicht auf Chromosom 11 liegen.

Bei *GRB10*, *PEG3* und *GNAS* unterscheiden sich die Expressionswerte nur geringfügig (< zweifach und > 0,7-fach) von den Werten der *scrambled locus*-Kontrollen (Anhang 7-4). Im Vergleich mit den beiden Einzel-*knockdowns* sind die Expressionswerte entweder sehr ähnlich oder befinden sich wie bei *GRB10* und *PEG3* jeweils zwischen dem gesteigerten *Kaiso*- und dem auf *scrambled locus*-Niveau liegenden *CTCF-knockdown*-Wert. *MEST* weist mit dem ca. Drei- bis Sechsfachen der Kontrollwerte zu allen Zeitpunkten eine deutlich gesteigerte Expression auf (Abbildung 3-26 A). Im Vergleich mit den *CTCF*-Einzel-*knockdown*-Ansätzen sind die Doppel-*knockdown*-Werte jedoch immer niedriger. *PLAGL1* zeigt ausschließlich zum frühen Zeitpunkt (72 h) eine moderate 2,2-fache Expressionssteigerung, die Expression bei 144 h und 168 h gleicht der bei den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 3-26 B). Die Expressionswerte der Doppel-*knockdown*-Ansätze sind zu allen drei Zeitpunkten sehr ähnlich zu den *CTCF-knockdown*-Ansätzen und stets niedriger als die Werte der *Kaiso-knockdown*-Ansätze.

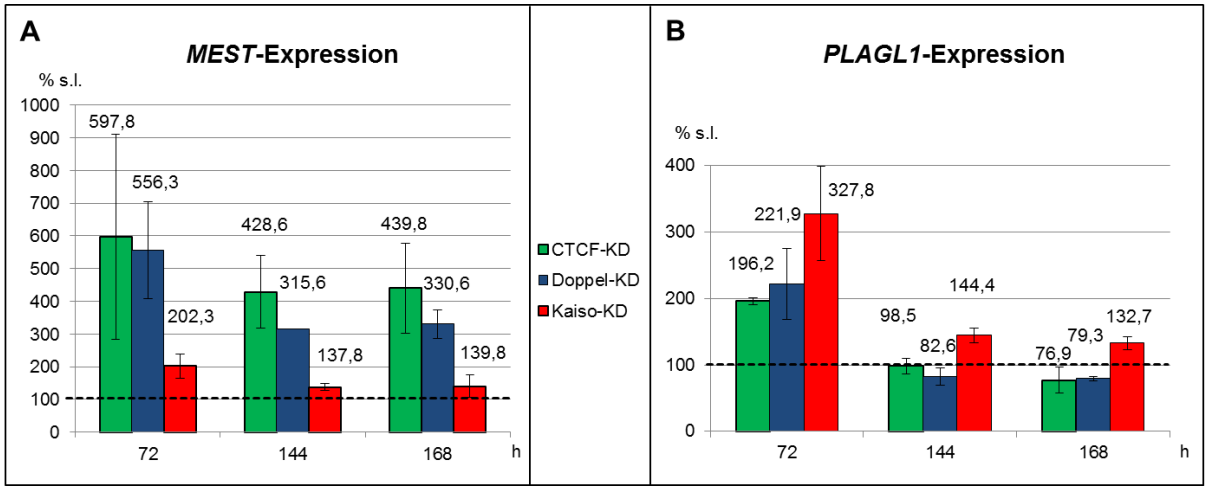


Abbildung 3-26 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die Expression von *MEST* und *PLAGL1*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* normalisierte mRNA-Expression von *MEST* und *PLAGL1* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion mit *CTCF*- (grün) und *Kaiso*-siRNAs (rot) sowie für Ansätze, bei denen beide siRNAs gleichzeitig transfiziert wurden (blau). Die Expression ist als prozentualer Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.) dargestellt. **A**: Gesteigerte *MEST*-Expressionswerte des Doppel-*knockdown*-Ansatzes liegen zu allen Zeitpunkten niedriger als bei *CTCF-knockdowns*. **B**: Die *PLAGL1*-Expression der Doppel-*knockdown*-Ansätze weist große Ähnlichkeit mit den Werten des *CTCF-knockdowns* auf und liegt immer unter den Werten der *Kaiso*-Ansätze. Die Daten für die Einzel-*knockdowns* basieren jeweils auf drei Experimenten mit Ausnahme der 144 h-Werte von *MEST,* die nur in zwei Experimenten analysiert wurden. Die Doppelansatzwerte wurden mit Ausnahme des einmalig untersuchten 144 h-Werts für *MEST* in jeweils zwei Experimenten untersucht. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Die Expressionsanalysen von Doppel-*knockdowns* zeigen beim Vergleich mit den relevanten Einzelansätzen nur Effekte, die sich durch die individuelle Wirkung einer einzelnen siRNA des Doppelansatzes erklären lassen, da schon der *CTCF-knockdown* allein zur Expressionssteigerung von *MEST* und der *Kaiso-knockdown* allein zur Expressionssteigerung von *PLAGL1* führt. Es kann daher davon ausgegangen werden das die halbierte Menge der jeweiligen siRNA in den Doppelansätzen zu einer dosisabhängig geringeren Intensität führt, mit der Auswirkungen auf die Genexpression stattfinden.

4 Diskussion

Ein kleiner Anteil der humanen Gene weist die Besonderheit auf, dass sie nur von einem Teil der elterlichen Chromosomen exprimiert werden. Diese Gene unterliegen dem genomischen *Imprinting* und werden als geprägt bezeichnet. *Imprinting* ist ein epigenetischer Mechanismus, bei dem keimbahnspezifische Markierungen zur mono-allelischen Expression bestimmter Gene führen. Die Mehrheit der bekannten geprägten Gene liegt gehäuft, in *Imprinting*-Clustern, im Genom vor (Edwards und Ferguson-Smith, 2007). Meist finden sich in diesen Clustern eine oder mehrere differentiell methylierte Regionen (DMRs), von denen eine als *Imprinting*-Kontrollregion (ICR) fungiert. Mehrheitlich findet man eine maternale Methylierung der ICRs, die in diesem Fall oft Promotoren für nicht proteinkodierende RNAs entsprechen (Edwards und Ferguson-Smith, 2007). Die selteneren paternal methylierten ICRs sind üblicherweise zwischen einzelnen geprägten Genen lokalisiert. Diese Situation findet sich auch im distalen *Imprinting*-Cluster (IC1) der chromosomalen Region 11p15.5, in der die ICR1 für die reziproke Expression der geprägten Gene *IGF2* und *H19* zuständig ist. Dabei spielt die methylierungssensitive Bindung des Zinkfingerproteins CTCF an die maternale Kontrollregion eine besondere Rolle. Ein weiteres Zinkfingerprotein mit putativer Bedeutung für die Funktion der ICR1 ist Kaiso. Das Protein weist eine dualspezifische DNA-Bindungscharakteristik auf, die eine Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen und an die unmethylierte 8-mer Kaiso *binding site* (KBS) ermöglicht. In der ICR1 finden sich sowohl CGCG als auch KBS-Sequenzen (Abbildung 3-2).

Die zentrale Fragestellung dieser Dissertation war, ob eine Kaiso-Bindung an die KBS der ICR1 zustande kommt und an welche Positionen der repetitiven Kontrollregion Kaiso bindet. Diese *Repeat*-spezifische Bindungscharakteristik sollte im Vergleich zu CTCF ermittelt werden. Die Ergebnisse dazu werden in Kapitel 4.1 diskutiert. Gängige Modelle erklären den Zusammenhang zwischen der geprägten Genexpression im IC1 und der CTCF-Bindung als insulatorischen Mechanismus, der die Interaktion von *Enhancern* und Promotoren reguliert (Hark *et al*., 2000; Bell und Felsenfeld 2000). In Vergangenheit konnten zudem CTCF-basierte intrachromosomale Verbindungen nachgewiesen werden, die zu allelspezifischen Chromatinschleifen mit Auswirkungen auf die Genexpression führen (Murrell *et al*., 2004; Kurukuti *et al*., 2006). Eine Bindung von Kaiso sollte ebenfalls funktionelle Bedeutung für die ICR1-basierte Genregulation haben. Dabei sind vor allem Auswirkungen auf die Genexpression im IC1, aber auch Konsequenzen für das proximale 11p15.5-Cluster vorstellbar. Interaktionen von CTCF mit anderen Proteinfaktoren sind bereits vielfach beschrieben worden (zusammenfassend: Zlatanova und Caiafa, 2009). Im humanen 5´-ß-Globin-Insulator, einer ICR1 funktionell verwandten Region, konnten unter anderem auch Hinweise auf eine Interaktion von CTCF und Kaiso gefunden werden (Defossez *et al*., 2005). In den Kapiteln 4.2 bis 4.4 wird die Bedeutung der ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso sowie Konsequenzen einer möglichen Interaktion für die Genexpression in 11p15.5 diskutiert. Neben den erläuterten intrachromosomalen Verbindungen wurden in Vergangenheit auch interchromosomale Kontakte der ICR1 beschrieben, die auf CTCF basieren (Zhao *et al*., 2006). Unter 4.5 wird diskutiert, inwiefern die Ergebnisse von

Expressionsanalysen von Genen, die nicht auf Chromosom 11 liegen, zur Bedeutung von CTCF und Kaiso bei der Ausbildung solcher Chromosomenverbindungen Erkenntnisse liefern und ob, wie beim Netzwerk geprägter Gene (IGN) der Maus (zusammenfassend: Gabory *et al*., 2010), möglicherweise auch beim Menschen genomweite Verbindungen von wachstumsrelevanten geprägten Genen bestehen und welche Bedeutung diesbezüglich die ICR1 und dort stattfindende Proteinbindungen besitzen. Die einzelnen Diskussionspunkte sind in Abbildung 4-1 grafisch dargestellt.

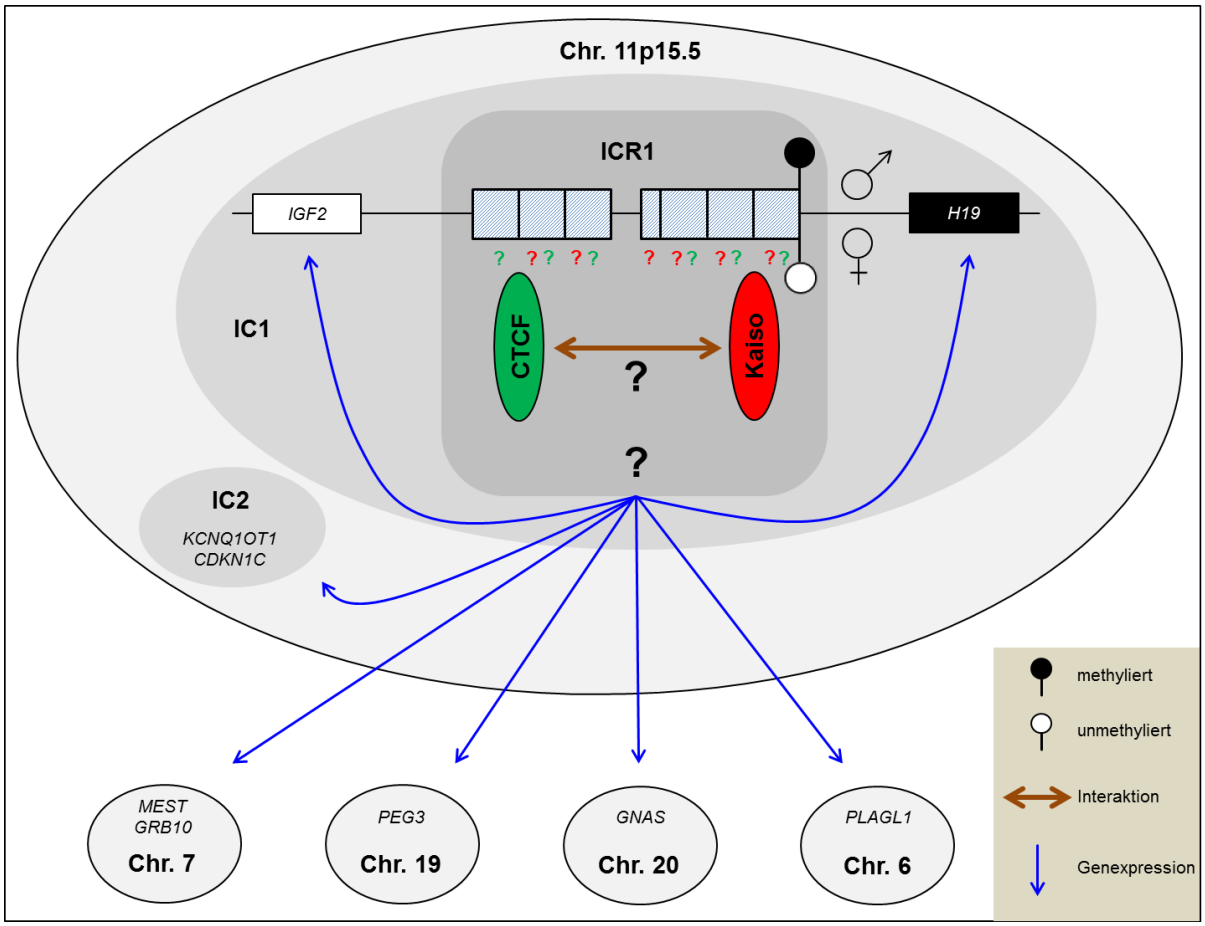


Abbildung 4-1 Fragestellungen des Dissertationsprojekts

Das zentrale Element des Dissertationsprojekts war die Ermittlung der *Repeat*-spezifischen Bindung von CTCF und Kaiso an die maternale unmethylierte ICR1. Durch Expressionsanalysen sollten die funktionellen Aspekte der ICR1-Proteinbindungen auf Gene in beiden 11p15.5-Clustern und auf Gene anderer Chromosomen untersucht werden. Die Daten sollten Rückschlüsse zulassen, ob eine Interaktion der beiden Proteine bei einer ICR1-basierten Funktion eine Rolle spielt und ob sich Hinweise auf eine koordinierte Regulation geprägter Gene wie beim murinen IGN finden lassen. (Chr., Chromosom; IC, *Imprinting*-Cluster; ICR, *Imprinting control region*)

4.1 ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso

4.1.1 Charakterisierung des Proteinstatus von CTCF und Kaiso bei der upd(11p15)mat-Zelllinie

Zellkulturen, insbesondere von Fibroblasten, waren Ressourcen, die auf verschiedene Weise im Verlauf der Promotionsarbeit genutzt wurden. Bei der Mehrheit der Experimente, unter anderem für die Bindungsanalysen durch ChIP, wurde exklusiv oder unter anderem die Zelllinie mit der maternalen uniparentalen Disomie der Region 11p15 (upd(11p15)mat) verwendet. Um zu überprüfen, ob die Zelllinie für die verschiedenen Experimente des Forschungsvorhabens geeignet ist, wurde eine Charakterisierung durch SDS-PAGE mit anschließendem *Western blot* vorgenommen.

In Versuchen mit auch im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Antikörpern gegen CTCF und Kaiso ließen sich die beiden Proteine in Nukleärextrakten der upd-Zelllinie deutlich nachweisen (3.1).

Der Antikörpernachweis bei einer nukleären Proteinfraktion ergab für CTCF eine distinkte Bande bei etwa 130 kDa. In frühen Publikationen zu CTCF im Huhn wird eine errechnete Proteinmasse von 82 kDa für das hochgradig konservierte Protein angegeben (Klenova *et al*., 1997). Für das Huhn und auch bei menschlichen Geweben wurden beim Antikörpernachweis im *Western blot* verschiedene Bandengrößen von 55 kDa bis 180 kDa detektiert (Klenova *et al*., 1997; Torrano *et al*., 2006). Eine Vielzahl an Publikationen beschreibt jedoch bei humanen Zelllinien eine 130 kDa-Bande als validen CTCF-Nachweis im *Western blot* (Majumder *et al*., 2008; Majumder und Boss, 2010).

Die Deutlichkeit der Bande mit korrekter Größe im Ergebnisteil dieser Arbeit, die nach relativ kurzer Entwicklungszeit des Chemolumineszenz-Nachweises entstand, spricht für das Vorliegen von CTCF in der getesteten upd-Zelllinie. Ein Vorhandensein des Proteins in den Fibroblasten-Zellen war zu erwarten, da in vielen humanen Geweben die upiquitäre Expression von CTCF auf Haushaltsgen-Niveau beschrieben wird (Phillips und Corces, 2009).

Der *Western blot*-Ansatz mit Kaiso-Antikörper ergab eine einzelne, deutliche Bande bei ungefähr 85 kDa. Kaiso besitzt eine errechnete Proteinmasse von 80 kDa (Daniel und Reynolds, 1999). Im Kontrast dazu werden in einer Vielzahl an Publikationen für den Proteinnachweis per *Western blot* Bandengrößen zwischen 90 und 100 kDa angegeben (Valle-Pérez *et al*., 2011; Prokhortchouk *et al*., 2001). Die Größenbeurteilung von Proteinbanden mit Molekulargewicht-Standards, die gemeinsam mit den Proben im Gel aufgetragen werden, geht mit gewissen Ungenauigkeiten einher. Bei in dieser Arbeit verwendeten und vielen alternativen Standards ist der Größenbereich zwischen 80 und 100 kDa nicht unterteilt, was eine genaue Definition der Bandengrößen erschwert. Das *blot*-Ergebnis ähnelt in Exklusivität und Deutlichkeit dem publizierter Ergebnisse, bei denen der gleiche Antikörper-Subtyp (6F) verwendet wurde (Daniel *et al*., 2001). Aus diesen Gründen stellt der vorliegende *Western blot* einen klaren Beweis für die Existenz von Kaiso in den Fibroblasten dar, auch wenn die Bandengröße in dieser Arbeit im Vergleich zum aktuellen Literaturstand kleiner bewertet wurde.

Die beiden Proteinnachweise demonstrieren zusätzlich die generelle Funktionalität der verwendeten

Antikörper, auch wenn durch die *Western blot*-Ergebnisse nicht direkt darauf geschlossen werden kann, dass sie für die folgend diskutierten ChIP-und EMSA-Experimente geeignet sind.

4.1.2 ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso

Das Protein Kaiso zeigt eine dual-spezifische Bindungscharakteristik, es kann sowohl methylierte CGCG-Sequenzen als auch unmethylierte KBS-Sequenzen binden (Daniel *et al*., 2002). Im repetitiven Bereich der ICR1 finden sich insgesamt zehn KBS, die sich teilweise in einzelnen Basen an den Positionen zwei und acht sowie durch ihre *Repeat*-internen Positionen unterscheiden (Abbildung 3-2).

In den EMSA-Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kaiso-Bindung sowohl an die in einheitlicher Position in den *Repeats* B6, B5, B3, B2 und B1 liegende ICR1-KBS (Abbildung 3-2) als auch an eine KBS im Promoter der Matrix Metalloproteinase *matrilysin* (*MMP7*) stattfindet (3.3.2, 3.3.1). Im Kontrast dazu konnten keine Hinweise auf eine Bindung des Proteins an die einmalig vorliegende, von der Sequenz her als optimal beschriebene KBS (TNGCAGGA) im B4-*Repeat* gefunden werden (3.3.2). Die Kaiso-Bindung an die *MMP7*-KBS konnte bereits von Daniel und Mitarbeitern gezeigt werden und diente in der vorliegenden Arbeit als experimentelle Positivkontrolle.

Um eine *in vitro*-Bindung mittels EMSA zu belegen, wurden jeweils zwei Experimentteile durchgeführt. HEK293-Nukleärextrakt und markiertes Nukleotid wurden zum einen entweder mit Kaiso-Antikörper oder zur Kontrolle mit unspezifischen IgG-Gemisch bzw. einem irrelevanten Antikörper inkubiert und zum anderen mit spezifischen und unspezifischen Kompetitoren behandelt. Die Spezifität einer *bandshift*-Bande, die dem Komplex aus markiertem Nukleotid und Zielprotein entspricht, sollte durch eine ausschließlich spezifische Kompetition und das Auftreten einer höher gelegenen *supershift*-Bande belegt werden, die exklusiv bei Zugabe des Kaiso-Antikörpers entsteht.

Die entsprechende Kompetitierbarkeit belegt, dass eine Bande spezifisch durch ein bestimmtes Nukleotid zustande kommt. Ein *supershift* demonstriert, dass ein Komplex mit dem Zielprotein vorliegt. Um den *bandshift* zweifelsfrei als Produkt von Kaiso und dem jeweiligen Nukleotid zu identifizieren, würde man bei Zugabe des spezifischen Antikörpers zusätzlich zum *supershift* eine Intensitäts-Reduktion der Bande erwarten, da die zur Verfügung stehende Menge des markierten Nukleotids durch seine Beteiligung am *supershift* reduziert wird. Dies ist weder bei ICR1- noch bei *MMP7*-KBS-Versuchen der Fall. Die beiden Experimentteile, Kompetitions- und Antikörperansätze, unterscheiden sich geringfügig durch ihren methodischen Aufbau (2.6) und zeigen nach Auswertung der Gele im Laserscanner unterschiedliche Intensitäten der *bandshift*-Bande (Abbildung 3-3, Abbildung 3-4). Die stärkere Intensität dieser Bande bei den Antikörperansätzen ließe sich durch eine methodische Begünstigung des Zustandekommens der Protein-Nukleotid-Bindung im Vergleich zu den Kompetitionsansätzen erklären. Demnach führt der *supershift* zwar zu einem geringeren Anteil an fluoreszenzmarkiertem Nukleotid im *bandshift*, dieser wäre aber aufgrund der hohen Intensität der Bande nicht ersichtlich. Eine alternative Erklärung für die höhere Intensität und damit auch für die nicht vorhandene Reduktion wäre, dass zusätzlich zur Kaiso-Bindung ein anderes Protein mit sehr ähnlichem Laufverhalten im nativen Polyacrylamid-Gel an das Nukleotid bindet. Der Vergleich der

ICR1- und *MMP7*-KBS-Nukleotide zeigt, dass außer der identischen KBS nur geringe Übereinstimmungen bestehen (Abbildung 4-2). Da die verwendeten Oligonukleotide mit 19 bzw. 24 bp auch nur sehr kurz sind, ist sowohl die Bindung der Nukleotide durch verschiedene Proteine mit ähnlichem Laufverhalten als auch die Bindung eines Proteins an den identischen Sequenzanteil beider Nukleotide unwahrscheinlich. Die mögliche Bindung eines weiteren Proteins muss daher am wahrscheinlichsten im Bereich der KBS erfolgen. Mögliche Kandidaten für eine solche Bindung wären die Proteine ZBTB4 und ZBTB38, die homologe Zinkfinger besitzen (Filion *et al*., 2006). Da beide mit mehr als tausend Aminosäuren wesentlich größere Massen als Kaiso (674 Aminosäuren) aufweisen ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass es im Falle ihrer Bindung an das Nukleotid zu einer Bande in gleicher Höhe kommen würde.

Bei den Reaktionen mit *MMP7*- und ICR1-KBS-Nukleotiden findet man im oberen Gelabschnitt jeweils zwischen dem wahrscheinlichen *bandshift* und dem *supershift* noch eine weitere diffuse Bande (Abbildung 3-3, Abbildung 3-4). Die Intensität dieser Bande wird deutlich durch die spezifische Kompetition beeinträchtigt, bleibt durch die unspezifische Kompetition unbeeinflusst und zeigt eine etwas stärkere Intensität bei Zugabe des Kaiso-Antikörpers. Das diffuse Aussehen könnte durch die Dissoziation des zugrundeliegenden Komplexes während Bindereaktion und Gellauf kommen und lässt auf eingeschränkte Spezifität der Interaktion des markierten Oligonukleotids mit einem Bestandteil der Inkubationsreaktion schließen. Aufgrund der Lokalisation der Bande oberhalb des *bandshifts* muss der Komplex, der ihr zugrunde liegt, insgesamt eine größere Masse besitzen als der Protein-Nukleotid-Komplex im *bandshift*. Eine theoretisch mögliche Interaktion mit einer größeren Kaiso-Isoform kann ausgeschlossen werden, da zwar zwei alternative Transkripte existieren, diese aber beide zum Protein mit gleicher Aminosäuresequenz translatiert werden (www.ensembl.org: ENST00000326624, ENST00000557385). Eine weitere mögliche Erklärung für die Entstehung der zusätzlichen Banden wären unterschiedliche post-translationale Modifikationen von Kaiso, die eine Rolle bei dessen Transport in den Nukleus spielen könnten. Zu solchen Modifikationen und möglichen Unterschieden bestehen bis dato allerdings keine Erkenntnisse. Damit bleibt eine dementsprechende Erklärung für die zusätzlichen Banden rein spekulativ. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Banden ist, dass sie durch eine schwache Bindung des Nukleotids an ein Kaiso-ähnliches Protein zustande kommt. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre das bereits weiter oben im Text genannte ZBTB4 mit Kaiso-ähnlichen Zinkfingern, dessen Bindung an die KBS in EMSA-Experimenten gezeigt wurde (Filion *et al*., 2006). Das Protein ist größer als Kaiso (1013 AS) und zeigt in einem publizierten EMSA eine Bande oberhalb des *bandshifts* die sich ebenfalls diffus und im Vergleich weniger intensiv darstellt.

Das Zustandekommen einer Nukleotid-Protein-Bindung, respektive die Deutlichkeit des Nachweises im EMSA, hängen von bestimmten Reaktionsparametern wie Pufferbedingungen, Zeiten, Temperaturen und der Pipettierreihenfolge ab (Holden und Tacon, 2011; Hellman und Fried, 2007; Zannini *et al*., 1992). Die besondere Bedeutung dieser Aspekte wurde auch bei der Etablierung und Optimierung des hier verwendeten Protokolls festgestellt. Die optimalen Reaktionsbedingungen

könnten auch für geringfügig verschiedene Nukleotide unterschiedlich ausfallen. Aus diesem Grund besteht theoretisch die Möglichkeit, dass der fehlende Beweis für eine B4-KBS-Bindung durch ein suboptimales Protokoll für diese Teilfragestellung begründet ist. Gegen diese Theorie sprechen jedoch die überwiegenden Ähnlichkeiten des B4-KBS-Nukleotids mit den Nukleotiden der beiden funktionellen EMSA-Ansätze (Abbildung 4-2). Alle drei besitzen die identische 6-mer-Kernsequenz (TNGCAG), die als ausreichend für eine Kaiso-Bindung beschrieben wird (Daniel *et al*., 2002). ICR1- und B4-KBS-Nukleotid unterscheiden sich nur durch die Base an KBS-Position acht, wenige Basen im KBS-umgebenden Bereich und der Länge des Nukleotids. Der Vergleich mit dem *MMP7*-KBS-Nukleotid zeigt eine geringere Ähnlichkeit des KBS-umgebenden Bereichs bei identischer KBS-Sequenz und -Länge.

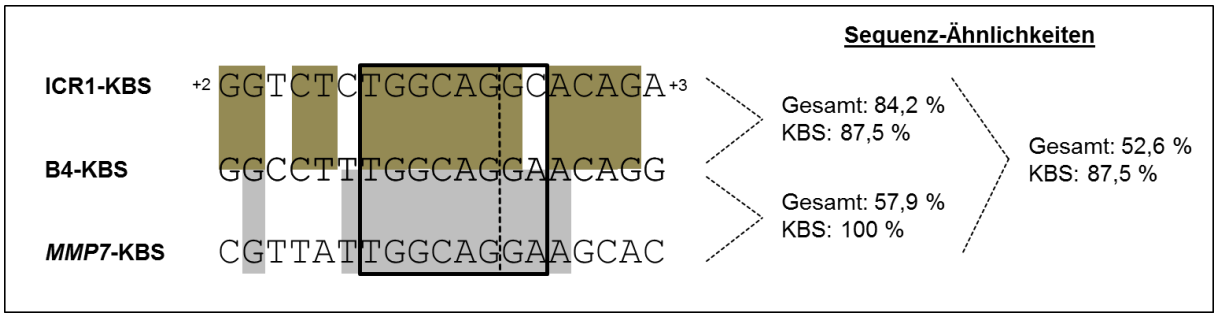


Abbildung 4-2 Vergleich der EMSA-KBS-Nukleotide

Jeweils übereinstimmende Basen des B4-KBS-Nukleotids (Mitte) mit den ICR1- und *MMP7*-KBS-Nukleotiden sind farblich hinterlegt. Verglichen werden die gemeinsamen 19-mer-Sequenzen. Das ICR1-KBS-Nukleotid besitzt mit einer Gesamtlänge von 24 bp an beiden Seiten noch zusätzliche Positionen. Die 8-mer-KBS ist durch einen Rahmen gekennzeichnet, die 6-mer-Kernsequenz durch eine gestrichelte Linie abgetrennt. Die größten Unterschiede bezüglich Nukleotidlänge, KBS- und Gesamtsequenz bestehen zwischen den beiden Nukleotiden, mit denen ein *in vitro*-Bindungsnachweis im EMSA erbracht werden konnte (ICR1- und *MMP7*-KBS).

Obwohl *MMP7*- und ICR1-KBS-Nukleotid die größten Unterschiede im Vergleich der drei aufweisen, findet man mit der exklusiven spezifischen Kompetition und der Entstehung einer zusätzlichen, höher im Gel gelegenen Bande, die ausschließlich bei Zugabe von Kaiso-Antikörper entsteht, nahezu identische Ergebnisse, die mit dem gleichen Protokoll generiert wurden. Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass für den EMSA-Nachweis mit dem B4-Nukleotid gesonderte Protokoll-Bedingungen notwendig wären, und es kann bei der ausbleibenden Kaiso-Bindung an die B4-KBS von einem gültigen Ergebnis ausgegangen werden.

Mit der fehlenden Reduktion der Bandenintensität bei *supershift*-Reaktionsansätzen fehlt der ultimative Beweis, dass es sich bei der mittleren, kompetitierbaren Bande um den *bandshift* handelt. Die klaren Ergebnisse der beiden Experimentteile und die Übereinstimmung des ICR1- mit den *MMP7*-KBS-EMSA, der als Reproduktion eines bereits erfolgten Bindungsbeweises durchgeführt wurde, sprechen jedoch klar für das Zustandekommen einer *in vitro*-Kaiso-Bindung an die ICR1. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das diesbezüglich verwendete 24-mer-Nukleotid den ICR1-KBS im Sequenzkontext der *Repeats* B6, B2 und B1 entspricht. Die *Repeats* B5 und B3 zeigen fünf bzw. zwei Basenunterschiede bei den acht Basen des Oligonukleotids, die 3´-wärts von der KBS liegen (Abbildung 3-2). Deshalb kann durch die Experimente, streng genommen, nur für diese drei

Repeats die *in vitro*-Bindungsfähigkeit bestätigt werden.

EMSA-Experimente sind durch einen relativ einfachen Aufbau, geringen Zeitaufwand und niedrige Kosten gekennzeichnet. Ein positives EMSA-Ergebnis darf jedoch nicht als eindeutiger Beweis für eine Proteinbindung an die DNA verkannt werden, sondern stellt eine künstlich erzeugte Situation dar, die nicht zwangsläufig Gültigkeit für den tatsächlichen Status im Zellkern haben muss. Um in dieser Arbeit die Bindungssituation von Kaiso an die unmethylierte KBS in lebenden Zellen zu ermitteln, wurde Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit Chromatin aus der maternalen upd-Zelllinie angewendet. Neben den Kaiso-ChIPs wurden auch Ansätze mit Antikörpern gegen CTCF durchgeführt. Dass eine CTCF-Bindung an die CTS-Sequenzen der ICR1 (Abbildung 3-2) stattfindet, ist vielfach belegt und konnte bereits durch ChIP nachgewiesen werden (Wendt *et al*., 2008; Ulaner *et al*., 2003). Die CTCF-ChIP-Experimente dienen daher auch als experimentelle Positivkontrolle für das angewendete ChIP-Protokoll.

Die Auswertung der Immunpräzipitationen (IPs) bei den ChIP-Experimenten erfolgte durch quantitative PCR mit Primern, die eine Amplifikation innerhalb aller vollständigen *Repeats* außer B7 ermöglichen (B-intra) (Abbildung 4-4 A). Damit werden die relativen Konzentrationen von Immunpräzipitationen mit spezifischem Antikörper und von Kontrollansätzen mit einem unspezifischen Gemisch von Antikörpern derselben Klasse (IgG) ermittelt. Der IgG-Wert stellt eine Hintergrundkontrolle dar, die als Maß für die unspezifische Immunpräzipitation gilt und als Abgleich für den Antikörper-Wert genutzt wird. Dementsprechend werden in der vorliegenden Arbeit für die einzelnen ChIPs mit Antikörpern jeweils x-fach IgG-Werte angegeben.

Zur validen Beurteilung von ChIP-Experimenten existieren verschiedene Kriterien, die die Gemeinsamkeit besitzen, dass sie alle auf quantitativen PCR-Daten basieren (Struhl, 2007). Neben seltener verwendeten proteinspezifischen Positiv- oder Negativkontrollen, bei denen durch jeweilige Primer DNA-Regionen untersucht werden, mit denen ein Zielprotein eindeutig bzw. sicher nicht interagiert, wird vor allem der Abgleich der spezifischen Immunpräzipitation auf die Gesamt-Chromatinmenge pro Ansatz (*input*) oder auf eine unspezifische Immunpräzipitation genutzt (Struhl, 2007). Der Bezug der IP auf den *input* bietet Vorteile, wenn durch die ChIP-Experimente quantitative Aussagen getroffen werden sollen, beispielsweise wenn das Ausmaß einer Proteinbindung in verschiedenen Regionen vergleichend beurteilt werden soll. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Versuchen ließen sich sowohl experimentintern für Proben, in denen verschieden große *input*-Anteile aufgereinigt und untersucht wurden, als auch im Vergleich mehrerer Experimente mit gleichen Ausgangsbedingungen keine stabilen *input*-Konzentrationswerte per qPCR ermitteln (Daten nicht gezeigt). Dies ist wahrscheinlich durch eine suboptimale Aufreinigung der *inputs* zu erklären, die im Vergleich zu den Antikörper- und IgG-Kontroll-IPs wesentlich höhere Konzentrationen aufweisen. Dadurch ist in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit der ChIP-Beurteilung nach dem %-*input*-Kriterium nicht sinnvoll. Jede Immunpräzipitation bei ChIP-Experimenten enthält auch unspezifisch heruntergezogenen „Hintergrund“, der zur Einschätzung der Reaktion ermittelt werden sollte (Collas, 2010). Die unspezifische Immunpräzipitation, auch *mock*-IP genannt, wird ganz ohne Antikörper (*bead*

only), mit einem für das jeweilige Experiment irrelevanten Antikörper oder, wie in dieser Arbeit, mit einem unspezifischen Antikörpergemisch (IgG) durchgeführt. Die Beurteilung der ChIP-Effizienz und damit des Bindungsstatus der beiden Proteine durch den x-fach IgG-Wert stellt für die vorliegende Fragestellung das passende Kriterium dar, da es vor allem um einen Nachweis der Bindung und in den weiterführenden Sequenzierungsanalysen nach den ChIP-Experimenten um die qualitative Bindungsbeurteilung ging. Der IgG-Wert besitzt als Abgleich des Weiteren den Vorteil, dass er wie die spezifische IP die komplette experimentelle Prozedur durchlaufen hat und dementsprechend individuelle Besonderheiten des Experiments, z.B. unterschiedlich hohe Verluste von Chromatin bei Waschschritten, besser abbildet.

Drei ChIP-Experimente zeigen mit deutlich über dem IgG-Hintergrund liegenden Konzentrationen der Immunpräzipitationen mit CTCF-Antikörper, dass eine Bindung des Proteins an die ICR1 zustande kommt (3.4.2). Variationen von x-fach IgG-Werten der einzelnen Immunpräzipitationen mit CTCF-Antikörper gehen mit methodischen Unterschieden der ChIP-Protokolle einher, die das Zustandekommen des Komplexes aus fixiertem Chromatin, Antikörper und den magnetischen *beads* betreffen (Abbildung 3-7 A). Im Detail betrifft dies die Reihenfolge, in der die Bestandteile des Komplexes zusammen pipettiert wurden, und ob die Inkubation von Chromatin und Antikörpern kurz im Ultraschallbad oder länger auf einem Rad-Inkubator erfolgte.

Die zwei Experimente mit den größeren x-fach IgG-Werten weisen keine methodischen Gemeinsamkeiten in den beiden Punkten auf. Es bestehen jedoch Übereinstimmungen dieser Experimente jeweils in einem Punkt mit der ChIP, die den niedrigsten x-fach IgG-Wert aufweist. Durch die verschiedenen Kombinationen lassen sich keine eindeutigen Rückschlüsse auf Vor- oder Nachteile der einzelnen Varianten der Protokollschritte ziehen. Darüber hinaus liefern die in dieser Arbeit dargestellten Kaiso-ChIPs (3.5.2) mit ihrem einheitlichen, dem CTCF-Experiment mit dem niedrigsten x-fach IgG-Wert entsprechenden Protokoll aufgrund der grundsätzlichen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Zinkfingerproteine Hinweise auf dessen Funktionalität.

Trotz der unterschiedlichen Werte belegen die immer deutlich über dem IgG-Hintergrund liegenden IP-Konzentrationen der drei ChIP-Experimente, dass CTCF an die ICR1 bindet.

Die CTCF-Interaktion mit der maternalen unmethylierten ICR1 ist Bestandteil gängiger Modelle, die sich mit der Genregulation in der Region beschäftigen (Hark *et al*., 2000; Bell und Felsenfeld; 2000, Murrell *et al*., 2004; Kurukuti *et al.,* 2006), und wurde bereits durch ChIP nachgewiesen (Wendt *et al*., 2008; Ulaner *et al*., 2003). Dass dieses Resultat sich in der vorliegenden Dissertationsarbeit auch mit Chromatin aus den Fibroblasten reproduzieren ließ, bestätigt damit auch die Funktionalität des verwendeten Protokolls, das ebenfalls für die Untersuchung der Kaiso-Bindung verwendet wurde und dabei bis auf die eingesetzte Antikörpermenge methodisch einheitlich war. Damit konnte belegt werden, dass Kaiso auch in proliferierenden Zellen an die ICR1 bindet (3.5.2). Drei ChIP-Ansätze, die mit den B-intra-Primern analysiert wurden, zeigen deutlich über dem IP-Hintergrund liegende Konzentrationswerte, die nur geringfügig variieren. Um auch eine Bindung an die KBS im verkürzten B4-*Repeat* untersuchen zu können, wurden die ChIP-Ansätze diesbezüglich mit speziellen Primern

(B4-intra, Abbildung 4-4 B) untersucht. Die Auswertung von zwei Ansätzen mit verschiedenen Kaiso-Antikörpermengen ergibt für die spezifischen Immunpräzipitation ein 4,8-faches IgG-Verhältnis. Dieser, im Vergleich zu den Mittelwerten der CTCF- und Kaiso-ChIPs (14 bzw. 22,1; Abbildung 3-7, Abbildung 3-9), wesentlich niedrigere Wert lässt keine eindeutige Beurteilung der Kaiso-Bindung an eine oder beide KBS in B4 zu. Aus diesen Gründen ist die Frage, ob eine Bindung an das B4-*Repeat* stattfindet, nicht zweifelsfrei zu beurteilen. Aufgrund des geringen Unterschieds zwischen spezifischer Immunpräzipitation und IgG-Kontrolle erscheint die Bindung jedoch eher fraglich. Dieser Befund passt zu dem bereits diskutierten EMSA-Ergebnis, dass mit einem der telomerwärtsgelegenen B4-KBS entsprechenden Nukleotid keine *in vitro*-Bindung stattfindet (3.3.2).

Sowohl bei den B4-Analysen als auch bei der Untersuchung der restlichen *Repeats* zeigt die in einem Fall auf das 1,5-fache erhöhte Konzentration des Antikörpers vergleichsweise kein diskrepantes Ergebnis. Die eingesetzten 10 µg bzw. 15 µg liegen im Vergleich mit allgemeinen Hersteller-Empfehlungen (www.abcam.com) und Angaben in methodischen Publikationen (Nelson *et al*., 2006) deutlich höher. Dementsprechend kann für die Kaiso-ChIP-Versuche dieser Arbeit eine Absättigung des Proteins mit spezifischem Antikörper angenommen werden, die mögliche IP-Konzentrationssteigerungen durch mehr Antikörper verhindert.

Der Vergleich der ICR1-Bindungsergebnisse bei ChIP-Experimenten mit CTCF- und Kaiso-Antikörper zeigt für alle drei Ansätze der CTCF-Immunpräzipitationen geringere x-fach IgG-Werte (Abbildung 3-7, Abbildung 3-9). Dass die Kaiso-ChIPs immer höhere und insgesamt konsistentere Werte aufweisen, stützt die Erkenntnisse zur Kaiso-ICR1-Bindung, da die CTCF-Bindung aufgrund von eigenen und publizierten Daten als sicher angenommen werden kann (Wendt *et al*., 2008; Ulaner *et al*., 2003).

Die höheren x-fach IgG-Werte der Kaiso-ChIPs lassen sich aber theoretisch auch durch eine größere Anzahl an möglichen Bindestellen in der ICR1 erklären. Neben den regelmäßigen ICR1-KBS und der als optimale Bindestelle beschriebenen B4-KBS finden sich noch zusätzliche KBS in den *Repeat*s B4, B2 und B1 (Abbildung 3-2, Abbildung 4-4). Alle zehn KBS der Kontrollregion besitzen die gleiche 6-mer-Kernsequenz, die laut Daniel und Kollegen für eine Kaiso-Bindung ausreicht. Durch den B-intra-Primer zur Untersuchung der Kaiso-Bindung an die vollständigen Sequenzwiederholungen und die enzymatische Fragmentierung, die eine Trennung der *Repeats* bewirkt, könnten maximal acht KBS im Vergleich zu fünf CTS untersucht werden (Abbildung 4-4 A). Diese Gegenüberstellung führt zum Verhältniswert 1,6; den man auch beim Vergleich der x-fach IgG-Mittelwerte der Kaiso- und CTCF-ChIPs findet (Abbildung 3-7, Abbildung 3-9). Aufgrund der eingeschränkten quantitativen Aussagekraft der x-fach IgG-Werte und weil sie auf der Annahme basiert, dass das alle Bindestellen tatsächlich genutzt werden, ist diese Theorie jedoch rein spekulativ und nicht weiter belegbar.

Filion und Mitarbeiter konnten bei Kaiso-ChIP-Experimenten mit Chromatin aus murinen Zellen neben der dominierenden Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen auf geringere Weise auch eine Bindung des Proteins an die KBS des unmethylierten Allels detektieren (Filion *et al*., 2006). Der Vergleich von Kaiso-ChIPs mit Chromatin aus der auch in dieser Arbeit verwendeten maternalen upd-Zelllinie und biallelischen Kontrollzelllinien lieferte in meiner Diplom-Arbeit erstmals Hinweise, dass eine KBS-

Bindung auch in der humanen ICR1 stattfinden könnte (Langer, 2008). Diese Annahme basiert darauf, dass unterschiedliche x-fach IgG-Werte sich durch Unterschiede der insgesamt zur Verfügung stehenden Bindestellen erklären lassen. Durch EMSA-Versuche konnte die Kaiso-Bindung sowohl an KBS des humanen *MMP7*-Promoters (Daniel *et al*., 2002) als auch an KBS im Kontext der murinen ICR1 gezeigt werden (Filion *et al*., 2006). Die ChIP- und EMSA-Daten dieser Arbeit erweitern diese Erkenntnisse und belegen erstmals und übereinstimmend, dass die unmethylierten KBS in den vollständigen *Repeats* des maternalen Allels durch Kaiso gebunden werden.

4.1.3 *Repeat*-Charakteristik der Proteinbindung an die ICR1

Die besondere Struktur der Kontrollregion mit ihren repetitiven Einheiten, die in zwei Hälften vorliegen und auf unterschiedliche Weise Sequenzmotive für CTCF und Kaiso enthalten, führt zwingend zu der Frage, ob und wie diese im Einzelnen genutzt werden. Diesem Aspekt wurde durch eine Erweiterung der ChIP-Methodik nachgegangen, indem die immunpräzipitierten DNA-Fragmente amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert wurden (Sequenzierung nach ChIP, 2.5). Durch Unterschiede einzelner Basen lassen sich die Sequenzen jeweils bestimmten B-*Repeats* zuordnen und ermöglichen somit die Bestimmung der einzelnen Bindungshäufigkeiten.

Eine CTCF-Bindung konnte generell an alle analysierten vollständigen B-*Repeats* nachgewiesen werden (Abbildung 3-8). Höhere Bindungshäufigkeiten wurden für die *Repeats* der telomerwärts gelegenen ICR1-Hälfte, in besonderem Maße für B6, detektiert. Die CTS in B7 konnte wegen der Sequenzunterschiede zu den restlichen *Repeats,* die eine Analyse mit dem B-intra-Primer ausschließen, nicht untersucht werden.

Die beiden Sequenzierungen nach Kaiso-ChIPs ergaben diskrepante Ergebnisse (3.5.3): Das Ergebnis von K-A ähnelt mit der Bindung an alle vollständigen *Repeats* und stärkerer Frequentierung der distalen ICR1-Hälfte der Bindungsverteilung von CTCF, weist zu K-B allerdings den Unterschied auf, dass nicht B6, sondern B5 am häufigsten gebunden wird. K-B zeigt hingegen eine nahezu exklusive Bindung an das B6-*Repeat*.

Ein möglicher Grund für die Diskrepanz der Kaiso-Ergebnisse könnte eine begünstigte Amplifikation des überrepräsentierten B6-*Repeats* bei der initialen PCR im Laufe der Sequenzierungsanalysen sein. Die beiden B-intra-Primer besitzen jeweils eine variable Basenposition (2.8.7). B6 besitzt als einziges *Repeat* komplementär zur variablen Position des *Reverse*-Primers ein Cytosin statt einem Adenin, B5 zeigt komplementär zur variablen Position des *Forward*-Primers exklusiv ein Guanin statt einem Adenin. Ein besseres Zustandekommen der Bindung des *Reverse*-Primers an B6 würde demnach eine mögliche Erklärung für das Ergebnis von K-B liefern. Darüber hinaus passt diese Theorie auch zu der B6-Präferenz der CTCF-ChIP und liefert mit der möglicherweise besseren Bindung des *Forward*-Primers an B5 eine Erklärung für das Ergebnis von Kaiso-ChIP K-A, bei der dieses *Repeat* am häufigsten detektiert wird. Aufgrund der Geringfügigkeit der genannten Komplementaritäts-Unterschiede ist es jedoch relativ unwahrscheinlich, dass damit eine Erklärung für die präferentielle Bindung an die distale Hälfte bzw. für das abweichende Ergebnis von K-B besteht.

Alternativ könnte man die Ergebnisse mit einer eingeschränkte Funktionalität der Immunpräzipitation begründen: Die stets höhere Klonanzahl von B5 oder B6 wäre dementsprechend durch ein bevorzugtes Zustandekommen oder eine höhere Stabilität von IP-Komplexen zu erklären, deren Chromatinbestandteil das B5- oder B6-*Repeat* ist. Diese Theorie basiert auf der Annahme, dass für die Antikörperbindung wichtige Epitope durch interagierende oder benachbart bindende Proteine sterisch gehindert werden und dieser Zustand, beispielsweise durch geringe Variationen der Chromatinfixierung, bei verschiedenen ChIPs für die einzelnen *Repeats* unterschiedlich ist.

Wie die Diskrepanz der Kaiso-Bindungsergebnisse zustande kommt, ist letztlich nicht zweifelsfrei zu klären. Die diskutierten Theorien bieten verschiedene mögliche Erklärungen, wie die *Repeat*-Charakteristik, die K-B zeigt, durch experimentelle Aspekte beeinflusst zustande kommen könnte. Aufgrund der bereits diskutierten Spezifität, mit der die Immunpräzipitation erfolgt, erscheint das Ergebnis von K-A mit der Kaiso-Bindung aller *Repeats* daher wahrscheinlicher als die exklusive B6-Bindung. Auf mögliche Gründe für die geringeren *Repeat*-internen Unterschiede bei den Bindungshäufigkeiten beider Proteine wird im Weiteren noch genauer eingegangen.

Die Größe der Fragmente des fixierten Chromatins spielt eine wichtige Rolle. Dies gilt im Allgemeinen für die Funktionalität der ChIP-Experimente und im Speziellen für die Validität der Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen nach den ChIPs. Für das Zustandekommen des Immunkomplexes aus *beads*, Antikörpern und fixiertem Chromatin muss eine funktionelle Fragmentierung erfolgen, die, übereinstimmenden Angaben verschiedener Autoren entsprechend, ungefähr zu einer Durchschnittsgröße von 500 bp führt (Zeng *et al*., 2006; Nelson *et al*., 2006; Das *et al*., 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten *sonication*-Bedingungen wurden vorab in Versuchen kontrolliert. Dafür wurde die DNA nach der Ultraschall-Behandlung gefällt und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein entsprechendes Agarosegel-Bild zeigte eine diffuse DNA-Bande im Bereich von 300 - 800 bp (Abbildung 3-6) und damit ein zu den Literaturempfehlungen passendes Ergebnis. Die Beurteilung der Fragmentierungsbedingungen in den Versuchen wurde allerdings durch eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert: In alternativen Versuchsansätzen mit ähnlichen und gleichen Bedingungen konnte beim Ethidiumbromid-Nachweis im Agarosegel keine DNA detektiert werden. Eine einfache Erklärung für dieses Bild wäre ein vereinzelt auftretender totaler Verlust der DNA im Laufe der Phenol-Chloroform-Aufreinigung oder der darauffolgenden Ethanol-Fällung. Solche methodischen Defizite bei den Reproduktionsversuchen hätten keine Bedeutung für die Gültigkeit des gezeigten Ergebnisses. Eine weitere mögliche Erklärung würde dagegen die Aussagekraft des dargestellten Ultraschall-Ergebnisses beeinträchtigen: Die deutliche Einschränkung oder der Verlust eines Gelnachweises ließe sich auch dadurch erklären, dass bei den Vorversuchen kein *decrosslink* durchgeführt wurde, bei dem durch Hitze und Proteinase-Verdau die fixierte Bindung von DNA und Proteinen gelöst wird. Eine mögliche Konsequenz davon wäre, dass durch bestehende Verbindungen dieser beiden Komponenten die DNA-Aufreinigung stark eingeschränkt oder komplett verhindert wird. Dies würde die relativ schwache Bande im abgebildeten Vorversuch und andere Vorversuche ohne DNA-Nachweis erklären. In verschiedenen Quellen lassen sich Belege dafür

finden, dass die verwendete Chromatinfragmentierung nach *decrosslink* tatsächlich zu einem veränderten Größenspektrum der DNA führen würde. Ein aktueller Versuch mit Fibroblasten und bis auf eine niedrigere Amplitude (30 %) gleichen Ultraschall-Bedingungen in unserer Arbeitsgruppe führte zu Chromatinfragmenten in allen vom DNA-Standard abgedeckten Größen (ca. 10 kb bis 100 bp) (Abbildung 4-3).

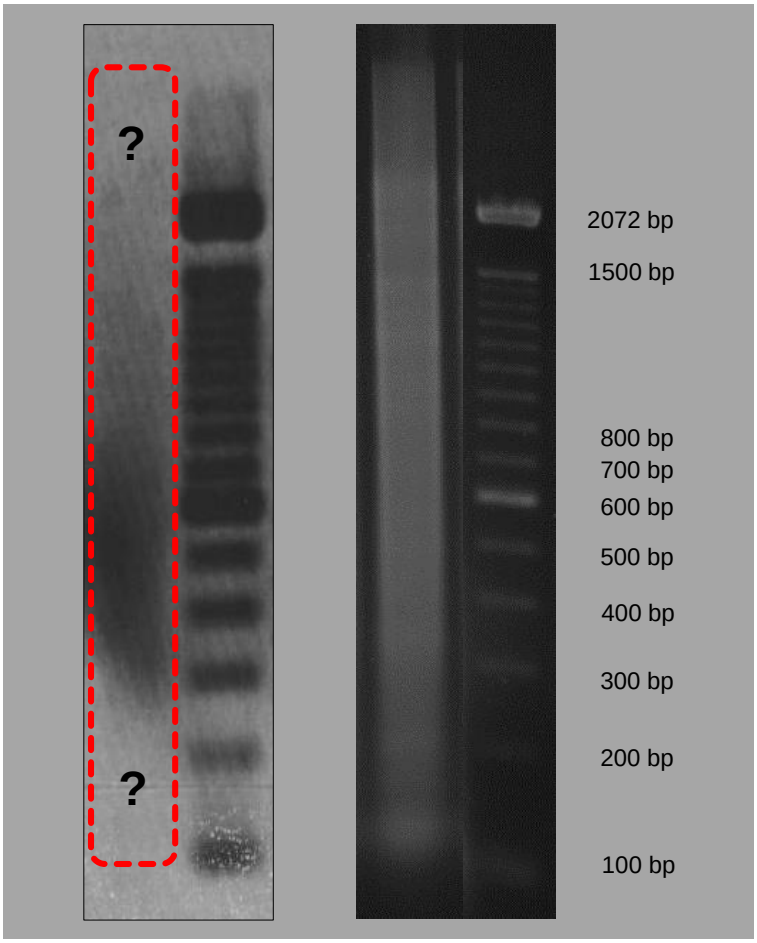


Abbildung 4-3 Vergleich von Ultraschall-fragmentiertem Chromatin

Die Abbildung zeigt elektrophoretisch aufgetrennte DNA, die aus Ultraschall-fragmentiertem Chromatin aufgereinigt wurde. Die bei den ChIP-Versuchen dieser Arbeit verwendeten Bedingungen führten zu einer diffusen Bande im Größenbereich 300 - 800 bp (links). Im Kontrast dazu zeigt ein aktueller Versuch unserer Arbeitsgruppe DNA in allen Größenbereichen (rechts) und unterscheidet sich nur minimal, durch eine geringere Amplitude (30 %), bezüglich der Ultraschall-Bedingungen. Die Unterschiede der Fragment-Größen lassen sich durch die Notwendigkeit eines nur beim rechts dargestellten Experiment durchgeführten *decrosslinks* erklären. Dabei werden die fixierten Verbindungen von DNA und Proteinen gelöst. Das Auslassen des *decrosslinks* könnte zur Einschränkung oder kompletten Verhinderung der DNA-Aufreinigung führen. Dementsprechend muss für die ChIP-Experimente dieser Arbeit ein anderes Größenspektrum der DNA-Fragmente vermutet werden, das in etwa dem des dargestellten aktuellen Experiments entspricht (roter Rahmen).

Diesem Bild entsprechen auch publizierte Ergebnisse mit Chromatin aus Prostatakarzinom-Zellen, die mit gleicher Prozentigkeit fixiert, nur geringfügig kürzer (70 statt 75 Sekunden) bei gleicher Amplitude mit Ultraschall behandelt wurden und ein Größenspektrum von der Tasche des Agarose-Gels bis ca. 50 bp zeigen (Das *et al*., 2004). Dabei wurde vor der DNA-Aufreinigung ein Proteinaseverdau durchgeführt. Es muss daher mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die

verwendeten Ultraschall-Bedingungen eigentlich zu einem Ergebnis führen, das in etwa dem der beiden erläuterten Versuche mit *decrosslink* beinhaltender DNA-Aufreinigung entspricht.

Dies wäre bei der Aufreinigung zukünftiger Fragmentierungsanalysen zu beachten, sollte jedoch keine relevante Bedeutung für die beschriebenen Ergebnisse zur allgemeinen Bindung der Proteine besitzen, da sowohl bei 300 - 800 bp großen DNA-Fragmenten als auch bei einer wesentlich größeren DNA-Menge mit breiterem Größenbereich Chromatinfragmente in funktioneller Größe und gemäß der erläuterten Deutlichkeit der ChIP-Ergebnisse auch in ausreichender Konzentration vorlagen. Das Ausmaß der Chromatinfragmentierung durch die Ultraschall-Behandlung könnte aber aufgrund seiner Auswirkung auf die Effizienz der Restriktionsverdaus eine Bedeutung für die Ergebnisse der *Repeat*-charakteristischen Bindungsanalyse durch die Sequenzierungsanalysen der ChIP-Experimente besitzen. Im Kontrast zur rein statistischen Ultraschall-Fragmentierung wird auf die IP folgend ein spezifischer Restriktionsverdau durchgeführt, der zur Trennung der einzelnen *Repeats* führen soll und deshalb essentiell für die Sequenzierungsanalysen ist. Eine ineffiziente Trennung der einzelnen ICR1-*Repeats* könnte dazu führen, dass ungebundene *Repeats* indirekt durch ein benachbartes gebundenes *Repeat,* immunpräzipitiert würden (Abbildung 2-1 C). In Folge würden auch ungebundene *Repeats* bei den Sequenzierungsanalysen amplifiziert, kloniert, sequenziert und bei der Ermittlung der Bindungshäufigkeiten fälschlicherweise berücksichtigt.

Die Restriktionsverdaus wurden durch quantitative PCR mit Primern kontrolliert, die zu einer Amplifikation über die *Repeat*-Grenzen führt (B-inter) und damit durch den Restriktionsverdau verhindert wird (Abbildung 2-1 B und C). Um die Funktionalität und die Effizienz des Verdaus zu beurteilen, wurden die Ansätze in den meisten ChIP-Experimenten vor dem Restriktionsverdau halbiert und jeweils eine Hälfte als Kontrolle entweder nur kurz oder gar nicht mit Enzymen behandelt. Für jedes Experiment wurde dann das Verhältnis der relativen Konzentrationen (qPCR) von kurz bzw. unverdauten und über Nacht verdauten Ansätzen gebildet.

Die Verdaukontrollen-Verhältniswerte der drei CTCF-ChIPs weisen mit Werten von 3,1 (C-B) und 10,6 bzw. 11,1 (C-A und C-C) (3.4.1) klare Schwankungen auf. Der Wert von Kaiso-ChIP K-B ist auf ähnliche Weise wie C-B sehr niedrig (3.5.1). Beim anderen Kaiso-Experiment wurde keine Verdaukontrolle durchgeführt. Eine wahrscheinliche Erklärung für die großen Unterschiede der Werte ist, wie bereits angedeutet wurde, in der Abhängigkeit des Verdaueffekts von der Effizienz der Ultraschall-Behandlung zu sehen. Die Ultraschall-Fragmentierung des fixierten Chromatins wurde lediglich in Vorversuchen getestet und nicht speziell für die einzelnen Experimente kontrolliert. Daher können keine verlässlichen experimentspezifischen Angaben gemacht werden. Wie bereits diskutiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die gewählten Bedingungen generell zu einer für die Immunpräzipitation funktionellen Fragmentierung führen müssten, also genügend Chromatinfragmente in einer Größe (ca. 500 bp) vorliegen, die ihre IP durch den Antikörper-*bead*-Komplex ermöglichen. Solange dies erfüllt ist, sollte es zur effizienten Bildung eines Immunkomplexes aus *bead*, Antikörper und fixiertem Chromatin und damit zu einer funktionellen IP kommen. Andererseits ist es jedoch gut vorstellbar, dass geringe Unterschiede bei der Ultraschall-

Fragmentierung, die keine Auswirkung auf die IP-Komplex-Bildung besitzen Bedeutung für die Ergebnisse der Verdaukontrollen haben. Eine geringfügig effizientere Ultraschall-Behandlung, die am Gesamtbild auf dem Agarosegel wenig ändert, könnte dazu führen, dass eine größere Menge kleine Fragmente zu Verfügung steht, die bevorzugt immunpräzipitiert werden bzw. mit einer geringeren Rate als größere Fragmente wieder von den Immunkomplexen dissoziieren. Diese Theorie würde eine Erklärung liefern, warum Verdaueffekte in Abhängigkeit von kleineren Schwankungen des Ultraschall-Ergebnisses unterschiedlich ausfallen können. Für diese These sprechen bei den über Nacht verdauten Ansätzen durchgängig relativ späte PCR-Zyklen, zu denen die Amplifikation mit dem *Repeat*-übergreifenden Primer aus dem Fluoreszenzhintergrund tritt (*crossing points*). Dadurch scheint die Voraussetzung gegeben, dass die Kombination aus Ultraschall und Verdau immer zur effizienten *Repeat*-Trennung führt. Darüber hinaus schwanken die *crossing points* der kurz oder gar nicht verdauten Kontrollwertansätze (Daten nicht gezeigt), was mit der Vermutung einhergeht, dass der Ultraschall die *Repeat*-Trennung der immunpräzipitierten Chromatinfragmente unterschiedlich stark beeinflusst.

Die erläuterten Aspekte zeigen, dass die Konzeption der Verdaukontrollen mit dem alleinigen Abgleich der verdauten ChIP-Ansätze auf passende unverdaute Kontrollansätze nicht optimal ist. Für eine eindeutige Beurteilung der Verdauvollständigkeit wäre der Bezug der Konzentrationswerte auf einen absoluten Wert wie den *input* nötig. Die zuletzt geschilderten Indizien, die die Unterschiede bei den Verdaukontrollen-Verhältniswerten mit geringfügigen Schwankungen des Ultraschall-Effekts erklären, lassen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine funktionelle *Repeat*-Trennung schließen, die Voraussetzung für die Gültigkeit der folgend diskutierten Ergebnisse zur Bindungscharakteristik der beiden Proteine ist.

Ein differenziell methylierter Status konnte in Vergangenheit für alle *Repeats* außer für B2 und B4 gezeigt werden (Frevel *et al*., 1999; Takai *et al*., 2001; Cui *et al*., 2001 und 2002; Sparago *et al*., 2004). Dadurch ist für fast alle durch Sequenzierungsanalysen nach der ChIP untersuchten CTS und KBS die Voraussetzung für eine Proteinbindung an die unmethylierte DNA gegeben. Die gleichen Klonanzahlen von *Repeats* der proximalen ICR1-Hälfte bei der CTCF-ChIP lassen trotz des fehlenden Beweises für die differentielle Methylierung von B2 auch hier auf eine CTCF-Bindung schließen.

Im Vergleich zu bisherigen Untersuchungen von CTCF in der humanen ICR1 wurde dessen Bindung in der vorliegenden Arbeit erstmals *Repeat*-charakteristisch untersucht. Unter Berücksichtigung der Primer-Positionen und den Angaben zur Fragmentgröße nach der Ultraschall-Behandlung lassen sich aber auch mit anderen ChIP-Studien Hinweise finden, in welchen Bereichen der ICR1 die CTCF-Bindung wahrscheinlich stattfindet (Abbildung 4-4). Durch die maximale Fragment-Größe kann jeweils ein Bereich zu beiden Seiten der Primer bestimmt werden, in dem eine Bindung theoretisch detektierbar ist. Dabei bleibt zu beachten, dass kleinere Chromatinfragmente wahrscheinlich präferentiell immunpräzipitiert werden und dadurch die Bindungsdetektion mit zunehmendem Abstand von den Primern unsicherer wird. Die Bedingungen bei der Analyse von Ulaner und Kollegen (Ulaner *et al*., 2003) ermöglichen nur die Detektion von CTCF-Bindungen an die proximale ICR1-Hälfte

(Abbildung 4-4 C). Mit den Primer-Positionen in A1 und B1 lässt sich mit relativer Sicherheit auf eine CTCF-Bindung an die CTS in B1 und mit abnehmender Wahrscheinlichkeit an B2 und B3 schließen. Die Daten von Wendt und Kollegen (Wendt *et al*., 2008) zeigen durch die Verwendung von zwei Primer-Paaren, dass eine Bindung auch an die distale ICR1-Hälfte stattfindet (Abbildung 4-4 C). Damit ergeben die bestehenden Daten keine Widersprüche zu dem in dieser Arbeit gezeigten Ergebnis, dass CTCF an alle analysierten *Repeats* bindet. Ob eine Bindung an CTS1 in B7 stattfindet, konnte aufgrund der Sequenzunterschiede zu den restlichen *Repeats* (Frevel *et al*., 1999) mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern nicht untersucht werden. Die Lage der Primer im B7-*Repeat* bei der Studie von Wendt und Kollegen liefert jedoch Indizien, dass eine Bindung auch dort erfolgt.

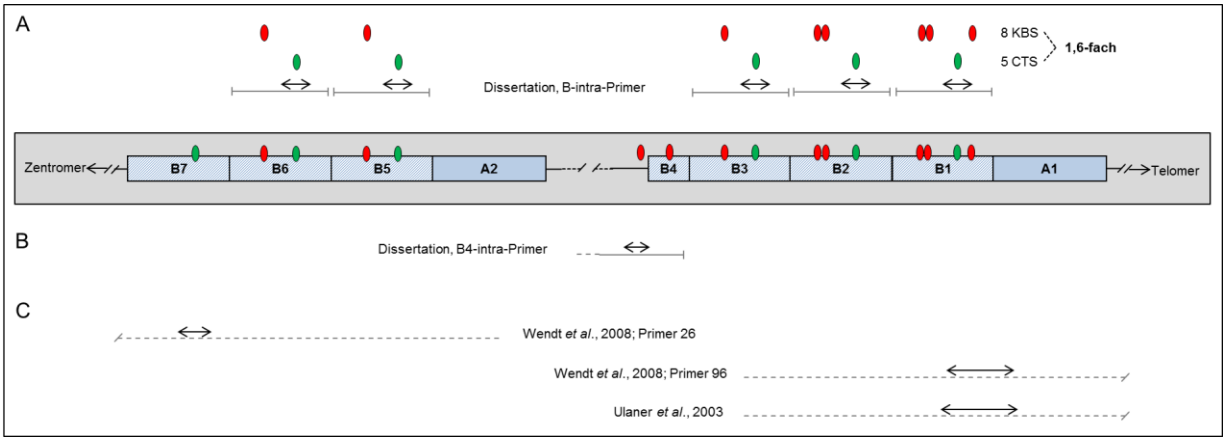


Abbildung 4-4 Proteinbindestellen und Primer zur ChIP-Analyse der ICR1

Die grau hinterlegte Abbildung zeigt die ICR1 mit ihren repetitiven Bestandteilen (B- und A-*Repeats*) und allen möglichen Bindestellen für CTCF (CTS, grün) und Kaiso (KBS, rot). Die Lage von Primern zur Analyse von Chromatin Immunpräzipitationen ist mit Doppelpfeilen dargestellt. **A**: Durch die in der vorliegenden Arbeit genutzten B-intra-Primer können nach der enzymatischen Restriktion die einzelnen *Repeats* einzeln untersucht werden. Diese Untersuchung deckt acht der zehn KBS und fünf der sechs CTS ab. **B**: Die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten B4-intra-Primer ermöglichen die Analyse der Kaiso-Bindung an die beiden putativen KBS des B4-*Repeats*. **C**: Die Primer von Wendt *et al*. und Ulaner *et al*. führen zur Amplifikation innerhalb des B7-*Repeats* bzw. von Bereichen in B1 und A1. Die gestrichelten Linien zeigen das ungefähre Ausmaß untersuchter Bereiche, die unter Berücksichtigung von Angaben zur jeweils verwendeten Ultraschall-Fragmentierung bestimmt werden können.

Die ubiquitäre, aber ungleichmäßige *Repeat*-Bindung von CTCF verleitet zu der Annahme, dass diesbezüglich Unterschiede zwischen den einzelnen CTS bestehen.

Dazu passen aktuelle Daten aus der Gruppe von Ohlsson, die 3C- und 4C-Experimente mit gezielter Mutation einzelner CTS kombinierten (Guibert *et al*., 2012). Mutationen von drei der vier murinen CTS gingen dabei mit dem Verlust von Chromatinschleifen einher, förderten aber andererseits auch die Entstehung neuer *loops*. Eine Erklärung dafür liefern ebenfalls murin gewonnene Erkenntnisse, dass CTCF für die Bindung bestimmter CTS verschiedene Kombinationen seiner elf Zinkfinger nutzt (Kanduri *et al*., 2000). Die unterschiedliche, kombinatorische Verwendung der Zinkfinger bei der DNA-Bindung konnte für verschiedene Regionen, speziesübergreifend und auch beim Menschen gezeigt werden (Ohlsson *et al*., 2001) und lässt vermuten, dass für den DNA-Kontakt von CTCF auch Bereiche außerhalb der CTS relevant sind. Je nach Größe der Bereiche, die man zu beiden Seiten der CTS in der humanen ICR1 vergleicht, findet man diverse Unterschiede. Bereits in einem Bereich,

bei dem die CTS in 5´-Richtung um vier Basen und in 3´-Richtung um acht Basen erweitert wurde, unterscheiden sich die Sequenzen von allen *Repeats*, die eine CTS enthalten (Abbildung 3-2). Damit ist die Voraussetzung gegeben, dass sich die geringfügige, unterschiedliche CTS-Nutzung auch in der humanen ICR1 durch die vielfältigen Bindungsmöglichkeiten des 11-Zinkfingerproteins CTCF erklären lässt.

4.2 Effekte der ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso

Um die Konsequenzen der ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso zu untersuchen, wurden beide Gene selektiv durch die Transfektion spezifischer siRNAs herunterreguliert (*knockdown*). In der Folge fanden Expressionsanalysen verschiedener Gene durch quantitative PCR statt. Um die Kaiso-Bindung an die unmethylierte KBS isoliert von einer möglichen Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen zu untersuchen, wurden die *knockdown*-Experimente mit der bereits in den ChIP-Experimenten genutzten upd(11p15)mat-Zelllinie durchgeführt.

Die verschiedenen *knockdown*-Experimente zeigten besonders zu den frühesten Zeitpunkten nach der Transfektion deutliche Reduktionen der *CTCF*- bzw. *Kaiso*-mRNAs (3.7.1).

Um die Effizienz der Herunterregulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion verlässlich beurteilen zu können, wurden mehrere identische Zellkulturen parallel mit Kombinationen aus je zwei siRNAs gegen das gleiche Zieltranskript transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten daraus RNA isoliert. Jeweils zeitgleich zu Ansätzen mit spezifischen siRNAs wurden mit *scrambled locus*-siRNA transfizierte Zellen untersucht. Der Abgleich der *knockdown*-Expression auf jeweils zeitgleiche *scrambled locus*-Ansätze dient der Berücksichtigung möglicher unspezifischer Effekte durch das Transfektions- oder RNAi-Ereignis. Um unterschiedliche Expressionsstatus auszugleichen, wurden jeweilige Expressionswerte auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* aus den entsprechenden Proben abgeglichen. Die Expressionsanalysen zu den Zeitpunkten 72 h, 144 h und 168 h nach der Transfektion, bei denen auch der Effekt auf verschiedenste Gene getestet wurde, fanden bei den Einzel-*knockdowns* mindestens drei Mal und bei den Doppel-*knockdowns* mit siRNAs gegen beide Proteine zwei Mal statt, um aussagekräftige Werte zu bekommen.

Die relevanten Expressionswerte des *CTCF-knockdowns* weisen im Gegensatz zu denen von *Kaiso*- und Doppelansätzen starke Schwankungen im zeitlichen Verlauf auf: Der stetige Anstieg der 72 h-, 144 h- und 168 h-Werte wird unterbrochen durch, im Vergleich zu den umgebenden Zeitpunkten, tiefe Werte bei 96 h und168 h (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15, Abbildung 3-16). Im Fall des niedrigen 96 h-Werts lässt sich dies experimentell begründen, da dieser Zeitpunkt nur ein Mal analysiert wurde und daher im Vergleich mit den dreifach untersuchten umliegenden Werten auf stärkere Weise Schwankungen unterliegt, die zwischen verschiedenen Versuchen auftreten können. Des Weiteren findet man beim Vergleich der *CTCF*-Expression bei *CTCF*- und *Kaiso-knockdowns* sehr ähnliche Schwankungen im zeitlichen Verlauf. Die *CTCF*-Expression sollte durch die *Kaiso*-siRNAs unbeeinflusst bleiben, was sich durch ihre generelle Ähnlichkeit mit den *scrambled locus*-Werten auch bestätigen lässt. Daher deuten die auf ähnliche Weise schwankenden *CTCF*-Expressionswerte bei *CTCF*- und *Kaiso-knockdowns* auf Zellkultur-spezifische Unterschiede der *CTCF*-Expression hin und liefern damit eine Erklärung für die nicht stetig verlaufenden Werte des *CTCF-knockdowns*.

Für die Herunterregulation von *Kaiso* wurden zwei siRNA-Kombinationen verwendet, die sich jeweils durch ihre Sequenzen und die kommerziellen Hersteller unterscheiden. Die Expression von Versuchen mit K-S ist zu allen Zeitpunkten und besonders deutlich zum frühesten Zeitpunkt niedriger

als bei der Verwendung der K-Q siRNAs (Abbildung 3-15). SiRNA-Zielsequenzen mit geringen Abständen zu den jeweiligen Start- und Stop-Codons eines Transkripts können zu eingeschränkter Effektivität bei der mRNA-Degradierung führen (Mocellin und Provenzano, 2004). Diesbezüglich sollte ein Abstand von etwa 200 Nukleotiden zum Start- und ca. 100 Nukleotiden zum Stop-Codon nicht unterschritten werden. Demnach liegen vor allem die vordere, möglicherweise auch die hintere K-Q siRNA in für dessen Effektivität kritischen Bereichen (Abbildung 4-5). Der Kontrast zu den mittig und damit, laut Meinung der zitierten Autoren, unkritisch gelegenen K-S siRNAs würde also eine Erklärung für die scheinbar niedrigere Effektivität des K-Q-*knockdowns* durch möglicherweise suboptimale Zielsequenzen liefern.

gcatggagagtagaaaactgatttctgctacagacattcagtactctggcagtctgctgaactccttgaatgagcaacgtggccatggactctt
ctgtgatgttaccgttattgtggaagaccgaaaattccgggctcacaagaatattctttcagcttctagtacctacttccatcagctcttctct
gttgctgggcaagttgttgaactgagctttataagagcagagatctttgcagaaattctcaattatatctatagttctaaaattgttcgtgtta
gatcagatttgcttgatgagttaattaaatcagggcagttattaggagtgaaatttatagcagagcttggtgtcccattgtcacaggttaaaag
catctcaggtacagcgcaggatggtaatactgagcctttacctcctgattctggtgacaagaaccttgtaatacagaaatcaaaagatgaagcc
caagataatggggctactataatgcctattataacagagtctttttcattatctgccgaagattatgaaatgaaaaagatcattgttaccgatt
ctgatgatgatgatgatgatgtcatttttttgctccgagattctgcccacaaaggagactttgccgagtaataacacagtggcacaggtccaatc
taacccaggccctgttgctatttcagatgttgcacctagtgctagcaataactcgccccctttaacaaatatcacacctactcagaaacttcct
actcctgtgaatcaggcaactttgagccaaacacaaggaagtgaaaaattgttggtatcttcagctccaacacatctgactcccaatattatttt
tgttaaatcagacaccactttctacaccaccaaatgtcagttcttcacttccaaatcatatgccctcttcaatcaatttacttgtgcagaatca
gcagacaccaaacagtgctattttaacaggaaacaaggccaatgaagaggaggaggaggaaataatagatgatgatgatgacactattagctcc
agtcctgactcggccgtcagtaatacatctttggtcccacaggctgatacctcccaaaataccagttttgatggatcattaatacagaagatgc
agattcctacacttcttcaagaaccactttccaattccttaaaaatttcagatataattactagaaatactaatgatccaggcgtaggatcaaa
acatctaatggagggtcagaagatcattactttagatacagctactgaaattgaaggcttatcgactggttgcaaggtttatgcaaatatcggt
gaagatacttatgatatagtgatccctgtcaaagatgaccctgatgaaggggaggccagacttgagaatgaaataccaaaaacgtctggcagcg
agatggcaaacaaacgtatgaaagtaaaacatgatgatcactatgagttaatagtagatggaagggtctattatatctgtattgtatgcaaaag
gtcatatgtctgtctgacaagcttgcggagacattttaacattcattcttgggagaagaagtatccgtgccgttactgtgagaaggtatttcct
cttgcagaatatcgcacaaagcatgaaattcatcacacaggggagcgaaggtatcagtgtttggcctgtggcaaatctttcatcaactatcagt
ttatgtcttcacatataaagtcagttcatagtcaagatccttctggggactcaaagctttatcgtttacatccatgcaggtctttacaaatcag
acaatatgcatatcttttccgatagatcaagcactattcctgcaatgaaggatgatggtattgggtataaggttgacactggaaaagaacctcca
gtagggaccactacatctactcagaacaagccaatgacctgggaagatatttttattcagcaggaaaatgattcaatttttaaacaaaatgtaa
cagatggcagtactgagtttgaatttataataccagagtcttactaa

Abbildung 4-5 Lage der siRNAs bei *Kaiso-knockdown*-Experimenten

Die Abbildung zeigt einen Abschnitt von Exon 3, der bei beiden bekannten *Kaiso*-Transkripten identisch ist. Der Abschnitt beginnt zwei Basen vor dem Start-Codon (grün) mit der ersten Base von Exon 3 und endet mit dem Stop-Codon (grau). Die Positionen der verwendeten siRNAs zur Herunterregulation der Transkripte sind jeweils rot markiert. Die bei *knockdown* K-Q genutzten siRNAs (weiße Buchstaben) liegen in Bereichen, die 120 Nukleotide vom Start-Codon bzw. 216 Nukleotide vom Stop-Codon entfernt sind. Die beiden bei *knockdown* K-S genutzten siRNAs (schwarze Buchstaben) liegen in einem Bereich dazwischen. (Sequenz: NM_001184742.1)

Grundsätzlich stellt sich die Frage, in welchem Abstand nach der Transfektion eine effiziente Herunterregulation von Zieltranskripten durch die siRNA-*knockdowns* zu erwarten ist und ob dementsprechend die Analysezeitpunkte bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit richtig gewählt sind. Sowohl bei den Einzel- als auch den Doppel-*knockdown*-Ansätzen finden sich, mit Ausnahme vom *Kaiso-knockdown* mit K-Q-siRNA, die niedrigsten Expressionswerte immer zu den beiden frühesten Zeitpunkten (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15, Abbildung 3-16). Die genannte Ausnahme beim Versuch mit K-Q kommt durch sehr geringe Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Zeitpunkte zustande und stellt damit kein zu den anderen zeitlichen Expressionsverläufen deutlich konträres Bild dar. Insgesamt kann also vermutet werden, dass frühere Zeitpunkte als 72 h nach der Transfektion mit jeweils noch stärkeren Expressionsreduktionen einhergehen könnten. Dagegen spricht jedoch der Vergleich mit publizierten *Kaiso-knockdown*-Daten, die unter sehr ähnlichen Bedingungen bezüglich der Zellkonfluenz zum Transfektions-Zeitpunkt, dem zeitlichen Ablauf und der Transfektions-Reagenz mit humanen Zellkulturen durchgeführt wurden

(Lopes *et al*., 2008). Dabei wurde die *Kaiso*-Expression nach 48 h auf etwa das 0,1- bis 0,4-fache reduziert und zeigt damit trotz früheren Zeitpunkts sehr ähnliche *knockdown*-Effizienzen wie bei den Experimenten dieser Arbeit. Ausschlaggebend für die Untersuchung von Effekten der CTCF- und Kaiso-Bindung an die ICR1 ist sowieso eine effiziente Reduktion der Faktoren auf Proteinebene. Die Zeitspanne, in der die Reduktion einer beliebigen Ziel-mRNA sich in ausreichendem Maße auf Proteinebene auswirkt (*turnover*-Periode), ist individuell unterschiedlich (Mocellin und Provenzano, 2004). Auf Proteinanalysen wurde bei den *knockdown*-Experimenten verzichtet, weil bereits zu frühen Zeitpunkten Effekte auf Gene in 11p15.5 detektiert wurden (3.7, 3.9) und damit ein Beleg für die nötige Umsetzung der RNA-Reduktion auf Proteinebene bestand. Für den Fall, dass Effekte auf verschiedene Gene zu unterschiedlichen Zeiten auftreten oder um den zeitlichen Verlauf von Auswirkungen der *knockdowns* zu berücksichtigen, wurden auch bei den Analysen der Effekte der Herunterregulation Ansätze aller Zeitpunkte durch qPCR analysiert, zu denen RNA gewonnen wurde.

Aus diesen Gründen kann von der Funktionalität der *knockdown*-Experimente und einer ausreichenden, sinnvoll gewählten Anzahl von Analysezeitpunkten bei den *knockdown*-Experimenten der vorliegenden Arbeit ausgegangen werden.

Die Herunterregulation von *CTCF* geht mit einem *IGF2*-Expressionsanstieg 168h nach der Transfektion einher (3.7.2). Darüber hinaus findet man beim *CTCF-knockdown* eine moderate Reduktion von *KCNQ1OT1* sowie mit gesteigerten und erniedrigten Werten bei zwei bzw. einem der drei *knockdowns* ein diskrepantes Ergebnis für *CDKN1C.* Von den untersuchten Genen, die nicht auf Chromosom 11 liegen, ergibt sich lediglich bei *MEST* ein Effekt durch den *CTCF-knockdown* in Form einer Expressionssteigerung zu allen drei Zeitpunkten (3.9.1). Der *Kaiso-knockdown* resultiert zu allen Zeitpunkten in starken Expressionsanstiegen von *IGF2* und *H19,* einer moderaten Steigerung von *CDKN1C* (3.7.3) und erhöhten Expressionswerten von *GRB10*, *PLAGL1* und *PEG3,* die jeweils exklusiv zum frühen Zeitpunkt auftreten (3.9.2). Dabei steht der besonders intensive Anstieg von *PEG3* im Kontrast zu den moderateren Veränderungen von *GRB10* und *PLAGL1*. Bei den Doppel-*knockdown*-Ansätzen liegen die Expressionswerte von 11p15.5-Genen immer zwischen denen der vergleichbaren Einzelansätze (3.7.4). Eine Ausnahme stellen diesbezüglich die *CDKN1C*-Werte dar, die wie beim *CTCF-knockdown* mit Expressionssteigerungen und -erniedrigungen bei unterschiedlichen Versuchen diskrepant sind. Im Vergleich zu den *CTCF*-Einzel-*knockdowns* liegen die Expressionswerte der Doppel-*knockdowns* in beiden Fällen etwas höher. Bezüglich der Gene, die nicht auf Chromosom 11 liegen, finden sich bei den Doppelansätzen erhöhte Expressionswerte für *MEST* und *PLAGL1,* die allerdings auch immer zwischen den relevanten Vergleichs-Werten der Einzel-*knockdown*-Ansätze liegen (3.9.3).

Die Expressionsdaten zu den 11p15.5-Genen basieren bei den Einzel-*knockdowns* je nach Zeitpunkt auf drei bis sechs Experimenten, während die Doppel-*knockdowns* je zwei Mal durchgeführt wurden. Eine Ausnahme besteht diesbezüglich für *KCNQ1OT1*, dessen Expressionsdaten sowohl bei den Einzel-*knockdowns* als auch beim Doppel-*knockdown* nur auf einer qPCR-Analyse basieren. Die Gene, die nicht auf Chromosom 11 liegen, wurden mit Ausnahme der einmaligen Analyse von *GNAS*

je drei Mal bei den Einzel-*knockdowns* und je zwei Mal bei den Doppelansätzen untersucht.

Alle Expressionswerte wurden auf zeitgleiche *scrambled locus*-Transfektionsansätze und die Haushaltsgenexpressionen abgeglichen.

Die diskrepanten *CDKN1C*-Werte ließen sich durch experimentspezifische Besonderheiten der RNA-Expression erklären. Die erniedrigte Expression zu allen drei Zeitpunkten könnte demnach durch eine generelle Transkriptionsreduktion infolge suboptimaler Kulturbedingungen begründet sein. Dies ist wegen der Expressionsabgleiche auf die Haushaltsgene *HPRT* und *PDH*, die Expressionsvarianzen ausgleichen sollten, allerdings sehr unwahrscheinlich. Darüber hinaus finden sich derartige Diskrepanzen zwischen verschiedenen *knockdown*-Experimenten exklusiv für *CDKN1C*. Die deutlich übereinstimmenden Werte der zwei Experimente mit früher Expressionssteigerung stärken jedoch die Verlässlichkeit der Werte, die als Effekt eines *CTCF-knockdowns* den Expressionsanstieg von *CDKN1C* zeigen.

Die Beurteilung von Auswirkungen der *knockdowns* auf die *KCNQ1OT1*-Expression ist durch die jeweils nur ein Mal durchgeführte qPCR-Analyse stark eingeschränkt. Deshalb ist die geringfügige Expressionsreduktion durch den *CTCF-knockdown* zum frühesten Zeitpunkt mit Vorsicht zu bewerten.

Der *CTCF-knockdown* geht mit gesteigerter *IGF2*- und *MEST*-Expression einher. Die Auswirkung des *knockdowns* auf *CDKN1C* ist aufgrund der diskrepanten Expressionswerte nicht zweifelsfrei zu bestimmen. Wegen der Reproduzierbarkeit der Expressionssteigerung des Gens zum 72 h-Zeitpunkt ist diese Konsequenz als wahrscheinlicher anzunehmen. Der *Kaiso-knockdown* führt zu Expressionssteigerungen von *IGF2*, *H19*, *CDKN1C*, *GRB10*, *PLAGL1* und *PEG3*.

Zusätzlich zu transfizierten upd(11p15)mat-Zellen wurde auch die Genexpression in jeweils unmodifizierten upd(11p15)mat-Zellen und Fibroblasten eines BWS-Patienten untersucht, bei dem eine väterliche upd des chromosomalen Bereichs 11p15 (upd(11p15)pat) diagnostiziert wurde.

Die Expression von Genen beider 11p15.5-*Imprinting*-Cluster weist jeweils Unterschiede zwischen den Disomien auf: *H19* und *CDKN1C* zeigen bei der maternalen upd eine stärkere Expression, *IGF2* und *KCNQ1OT1* weisen bei der paternalen upd höhere Werte auf (3.6). Diese Ergebnisse entsprechen dem gegensätzlichen *Imprinting*-Status der Gene die bei dem konträren upd-Status der Zelllinien entweder biallelisch oder gar nicht bzw. nur sehr geringfügig aktiv sind.

Von den fünf untersuchten Genen, die nicht auf Chromosom 11 liegen, besteht bei vier ein klarer Expressionsunterschied zwischen den upd-Zelllinien: Die Expression von *MEST* und *PLAGL1* ist bei der paternalen upd höher, während die Expression von *PEG3* und in geringem Maße von *GRB10* bei der maternalen upd einen höheren Wert aufweist (3.8).

Die Charakterisierung des Expressionsstatus wurde mit Ausnahme der einmaligen Analyse von *GRB10* jeweils wiederholt und zum Vergleich mit unterschiedlichen Kontrollzelllinien durchgeführt. Für die Zelllinien bestehen keine Daten zu eventuellen chromosomalen Veränderungen, es sind jedoch keine 11p15.5- oder wachstumsassoziierten Krankheitsbilder bei den Spendern bekannt. Daher kann von einem normal-allelischen Status der betreffenden Region ausgegangen werden. Um allgemeine

zellkulturspezifische Expressionsunterschiede zu berücksichtigen, wurde die Expression aller analysierten Gene wie auch bei den *knockdown*-Analysen auf die Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* abgeglichen.

Die Analyse der Kontrollzelllinien sollte die Einschätzung der Expression bei normal-allelischen Status ermöglichen. Diesbezüglich wären für die 11p15.5-Gene jeweils Werte zwischen denen der gegensätzlichen upd-Zelllinien zu erwarten, da alle vier geprägten Gene in Bereichen liegen, die von den uniparentalen Disomien betroffen sind. Die beiden verwendeten Kontrollen zeigen bezüglich ihrer Expressionsniveaus außer bei *CDKN1C* allerdings deutliche Unterschiede (Abbildung 3-12, Abbildung 3-13). Für *H19*, *IGF2* und *KCNQ1OT1* findet man daher jeweils nur bei einem der beiden Experimente, bei *CDKN1C* bei keinem der Experimente einen zwischen den upd-Zelllinien liegenden Kontrollzellwert. Die unerwartete Lage der Kontrollzellexpression über oder unter den Werten beider gegensätzlicher upd-Zelllinien ist nicht auf eine der beiden Kontrollzelllinien beschränkt.

Passend zu diesen Befunden findet man auch bei einem der vier zwischen den uniparentalen Disomien unterschiedlichen Gene, die nicht auf Chromosom 11 liegen (*PLAGL1*), einen Expressionswert für die Kontrollzelllinie, der nicht zwischen denen der gegensätzlichen upd-Zelllinien liegt (Abbildung 3-23). Obwohl alle verwendeten Zellkulturen inklusive der Kontrollen Fibroblasten sind, lässt sich durch ihre unterschiedliche Gewinnung durch Hautstanzen oder während eines chirurgischen Eingriffs auf geringere Unterschiede der Zellpopulationen schließen. Darüber hinaus muss davon ausgegangen werden, dass die Gewinnung der Zellen zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten erfolgte. Es ist bekannt, dass der *Imprinting*-Status von geprägten Genen gewebsspezifisch variieren kann (Horsthemke, 2010). Des Weiteren ist bei der Relevanz der analysierten Gene für Wachstum und Entwicklung (Gabory *et al*., 2010) zu erwarten, dass ihre Expression zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten Unterschiede aufweisen kann. Beide Aspekte bieten daher mögliche Erklärungsansätze für die Kontrollzellwerte, die nicht zwischen denen der gegensätzlichen upd-Zelllinien liegen. Ihrem jeweiligen *Imprinting*-Status entsprechende Expressionsunterschiede der vier untersuchten 11p15.5-Gene *H19*, *IGF2*, *KCNQ1OT1* und *CDKN1C* bei den gegensätzlichen upd-Zelllinien belegen, dass sich der upd-Status erwartungsgemäß auch auf Expressionsebene feststellen lässt. Der *knockdown* von *CTCF* geht mit Expressionssteigerungen von *IGF2* und *CDKN1C* einher. Beim *knockdown* von *Kaiso* findet man zusätzlich noch eine Expressionserhöhung von *H19*. Mit gesteigerten Expressionswerten von *GRB10*, *PLAGL1* und *PEG3* beim *Kaiso-knockdown* bzw. von *MEST* beim *CTCF-knockdown* findet man überraschenderweise bei vier von fünf in dieser Arbeit analysierten Genen aus Regionen anderer Chromosomen eine transkriptionelle Beeinflussung durch die Herunterregulation der beiden Zinkfingerproteine. Da sich bei diesen vier Genen auch Expressionsunterschiede zwischen den beiden Zelllinien mit gegensätzlichen 11p15-upds finden, lässt sich ein chromosomenübergreifender Effekt der 11p15.5-Region vermuten. In den folgenden Kapiteln wird diskutiert, welche Erkenntnisse zur regulatorischen Bedeutung der ICR1-Proteinbindung aus den Expressionsdaten und den zuvor erläuterten Befunden zur ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso gezogen werden können.

4.3 Bedeutung der CTCF-ICR1-Bindung für geprägte Gene der chromosomalen Region 11p15.5

Für die reziproke Expression der geprägten Gene *H19* und *IGF2* ist eine CTCF-Bindung an die maternale Kontrollregion des distalen 11p15.5-Clusters (ICR1) essentiell. Laut dem auf murinen Daten basierenden *Enhancer blocking*-Modell fungiert die unmethylierte ICR1 mit dem gebundenen Protein als Chromatinbarriere und verhindert eine Interaktion von *Igf2*-Promotoren mit den *upstream* von *H19* gelegenen *Enhancern* (Hark *et al*., 2000; Bell und Felsenfeld, 2000). Der methylierte ICR1-Status auf dem paternalen Allel verhindert die CTCF-Bindung und führt durch uneingeschränkte *Enhancer*-Promotor-Interaktion zur *Igf2*-Expression. Aktuelleren, auch auf murinen Daten basierenden Modellen führen Interaktionen der ICR1 mit unterschiedlichen differentiell methylierten Regionen des *Imprinting*-Clusters zu allelspezifischen Chromatinschleifen (Kurukuti *et al*., 2006; Murrell *et al*., 2004). Dabei geht man von für die maternale ICR1 von CTCF-basierten Verbindungen aus, die einerseits zur Lokalisierung des *Igf2*-Gens in einer inaktivierenden Chromatindomäne führen und andererseits die Bildung eines aktivierenden Chromatinknotenpunktes (*active chromatin hub*, ACH) bewirken, in dem *H19* im notwendigen Kontakt zu relevanten *Enhancer*-Strukturen steht. Yoon und Kollegen zeigten darauf folgend, dass auch direkte Interaktionen der maternalen ICR1 mit den *Igf2*-Promotoren bestehen, bei denen eine wichtige Rolle von CTCF vermutet werden kann (Yoon *et al*., 2007).

Die strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen Maus und Mensch mit ähnlichen Positionen der beiden Gene, der ICR1 und der relevanten *Enhancer* sowie der Existenz verschiedener differentiell methylierter Regionen, erlauben eine Übertragbarkeit der auf murinen Daten basierenden Erkenntnisse und Modelle auf die Situation beim Menschen. Dementsprechend ist die erhöhte *IGF2*-Expression nach der Herunterregulation von CTCF in den maternalen upd-Zellen durch den Verlust der Chromatinbarriere zwischen *Enhancern* und den relevanten Promotoren bzw. durch die veränderte Chromatinarchitektur mit der *IGF2*-Lokalisierung außerhalb der maternal-spezifischen inaktivierenden Domäne gut zu erklären. Die nahezu unveränderte *H19*-Expression nach den CTCF-*knockdowns* ist den erläuterten Daten entsprechend zu erwarten. Dahingegen lassen sich mit den Daten dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Bedeutung von CTCF als die *H19*-Transkription begünstigender Faktor erkennen, wie es von Engel und Kollegen vorgeschlagen wurde (Engel *et al*., 2008).

Neben der für die Expression von Genen des IC1 wichtigen Nutzung von CTS in der ICR1 konnte eine Bindung von CTCF auch in Maus und Mensch an zwei Stellen einer als Kontrollregion des proximalen 11p15.5-Clusters bekannten Region (ICR2) bestätigt werden (Fitzpatrick *et al*., 2007; Du *et al*., 2003). Das regulatorisch wichtige Element liegt im zehnten Intron des *KCNQ1*-Gens, ist auf dem maternalen Allel differentiell methyliert und fungiert als Promoter für das *KCNQ1OT1*-Gen. Deletions-Versuche in der Maus belegen die regulatorisch wichtige Funktion des Lokus und demonstrieren dessen inhibitorische Wirkung auf mehrere umliegende geprägte Gene des paternalen Allels (Fitzpatrick *et al*., 2002). Durch Maus-Versuche mit trunkiertem *Kcnq1ot1*-RNAs konnte gezeigt werden, dass das

Transkript direkt für die inhibitorische Wirkung auf die geprägten Gene des IC2 verantwortlich ist, auch wenn diesbezüglich der genaue Mechanismus noch unbekannt ist (Shin *et al*., 2007; Mancini-Dinardo *et al*., 2006). Für den negativen Effekte auf *Cdkn1c* wurde auch ein zusätzlicher, von *Kcnq1ot1*-unabhängiger Mechanismus belegt, der wie von Shin und Kollegen vermutet durch eine CTCF-mediierte Reprimierung zustande kommen könnte (Shin *et al*., 2007). Durch die Verwendung der maternalen upd-Zelllinie bei den *knockdown*-Experimenten in dieser Arbeit sollte die lediglich paternal stattfindende CTCF-Bindung an die ICR2 keine Bedeutung für die Genexpression besitzen. Demnach ist kein lokal, im IC2 wirkender Effekt des *CTCF-knockdowns* zu erwarten.

Eine erniedrigte *CDKN1C*-Expression, wie sie bei einem der drei *CTCF-knockdown*-Experimente zu allen drei Zeitpunkten ermittelt wurde, ließe sich aufgrund einer möglichen Interaktionen der beiden 11p15.5-*Imprinting*-Cluster erklären, wie sie in Vergangenheit in Verbindung mit der Ätiologie des Fehlwachstum-assoziierten Beckwith-Wiedemann-Syndroms vorgeschlagen wurde: In einem Mausmodell mit *Cdkn1c*-Null-Mutation, das einen Großteil der BWS-Charaktersitika zeigte, fanden Caspary und Kollegen einen Verlust des Imprints von *Igf2* und vermuteten als Konsequenz eine antagonistische Weise der beiden Gene (Caspary *et al*., 1999). Diese Annahme wird von Versuchen gestützt, bei denen *in vitro* mit menschlichen Zellen der Einfluss von *IGF2* untersucht wurde und sich zeigen ließ, dass erhöhte IGF2-Serum-Konzentrationen zu einer deutlichen Inhibition der *CDKN1C*-Expression führen (Grandjean *et al*., 2000). Grandjean und Kollegen belegten diese Wirkweise ebenfalls für den lebenden Organismus, indem gezeigt werden konnte, dass bei Mäusen mit hohen Igf2-Serum-Leveln eine Herunterregulation der *Cdkn1c*-Expression zu bemerken war. Diesen Erkenntnissen entsprechend ließe sich die erniedrigte *CDKN1C*-Expression bei einem der drei diesbezüglich analysierten Experimente durch die erhöhte *IGF2*-Expression erklären.

Die Gruppe um Higgins untersuchte Mechanismen, die für den negativen Effekt auf *CDKN1C* zuständig sind, mit Zelllinien verschiedener BWS-Patientengruppen mit normaler und erniedrigter ICR2-Methylierung und konnte dabei keine Argumente für eine Verbindung zwischen *IGF2*-Überexpression und verminderter *CDKN1C*-Expression finden (Diaz-Meyer *et al*., 2005). Ebenfalls durch Versuche mit BWS-Zelllinien ließen sich in eigenen, dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten keine Hinweise auf die gegenseitige Beeinflussung der beiden Gene finden, die als Erklärung für die veränderten *CDKN1C*-Expressionswerte in der vorliegenden Arbeit dienen würden (Langer, 2008).

Eine andere Möglichkeit, die vor allem eine Erklärung für die gesteigerte *CDKN1C*-Expression, aber auch für Veränderungen anderer Gene bei den Experimenten in dieser Arbeit liefern würde, befasst sich mit einem Modell zur koordinierten Regulation verschiedener geprägter Gene, dem *Imprinted Gene Network* (IGN), das für die Maus beschrieben wurde. Ob möglicherweise Zusammenhänge von in dieser Arbeit gefundenen Expressionsveränderungen mit einem ähnlichen Netzwerk geprägter Gene beim Menschen bestehen, wird im letzten Unterkapitel (4.5) diskutiert.

4.4 Bedeutung von Kaiso-ICR1-Bindung und Kaiso-CTCF-Interaktionen für geprägte Gene in 11p15.5

Kaiso bindet in der unmethylierten ICR1 an alle vollständigen B-*Repeats* mit KBS-Sequenzen. Der *knockdown* von *Kaiso* führt zu gesteigerten Expressionswerten von *H19*, *IGF2* und *CDKN1C.* In der gesteigerten *IGF2*- und *CDKN1C*-Expression sowie *KCNQ1OT1*-Expressionswerten auf *scrambled locus*-Niveau ähneln sich die Ergebnisse der *CTCF*- und *Kaiso-knockdowns*. Es stellt sich die Frage, ob die Gemeinsamkeiten ihrer *knockdown*-Effekte einen Hinweis auf mögliche funktionelle Zusammenhänge der beiden Zinkfingerproteine darstellen.

Trotz der bezüglich ihrer Sequenz als optimal beschriebenen KBS (Daniel *et al*., 2002) findet keine Kaiso-Bindung an das B4-*Repeat* statt (3.3.2, 3.5.2). Nach der *Repeat*-charakteristischen Untersuchung von Kaiso muss von einer Bindung aller sonstigen vollständigen *Repeats* mit KBS-Sequenzen ausgegangen werden (4.1.3). Dieses Ergebnis ließe sich durch eine Abhängigkeit der Kaiso- von der CTCF-Bindung erklären, die an alle Kaiso-gebundenen B-*Repeats* und jeweils in ähnlicher Häufigkeit erfolgt (3.4.3, 3.5.3). In der murinen ICR1 konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass CTCF in somatischen Zellen eine protektive Wirkung für den unmethylierten Status besitzt (Schoenherr *et al*., 2003; Pant *et al*., 2003). Möglicherweise erfüllt CTCF diese schützende Aufgabe in Kooperation mit CHD8 (*chromodomain helicase DNA-binding protein* 8), dessen gemeinsame Bindung und Interaktion unter anderen Insulator-Regionen auch in der ICR1 festgestellt werden konnte (Ishihara *et al*., 2006). Mit *knockdowns* von CHD8 konnte in den Insulator-Regionen von *BRCA1* und *c-myc* gezeigt werden, dass das Protein Einfluss auf den epigenetischen Status der Regionen besitzt, da seine Herunterregulation entweder Hypermethylierung der DNA oder Hypoacetylierung von Histon-Seitenketten zur Folge hatte. Dazu passend wurde von der Gruppe um Ohlsson kürzlich vorgeschlagen, dass CTCF eine mögliche indirekte Bedeutung für die Bindung anderer methylierungssensitiv bindender Faktoren besitzt (Guibert *et al*., 2012). Für den Transkriptionsfaktor OCT1/4 kann von einer funktionellen Relevanz für die Regulation von 11p15.5-Genen ausgegangen werden, da Mutationen der OCT-Bindestellen beim Menschen mit dem Auftreten der Fehlwachstumssyndrome BWS und SRS assoziiert sind (Poole *et al*., 2011; Demars *et al*., 2010). Guibert und Kollegen schlugen OCT1/4 als einen möglichen Faktor vor, dessen methylierungssensitive Bindung von der protektiv wirkenden CTCF-Bindung abhängt (Guibert *et al*., 2012).

Analog zur OCT-Abhängigkeit von der CTCF-Bindung in der Studie von Guibert und Kollegen ließe sich das Ausbleiben der Kaiso-Bindung an die B4-KBS mit der nicht vorhandenen Bindungsmöglichkeit für CTCF im umgebenden Sequenzbereich und daraus resultierender Methylierung erklären. Möglicherweise spielt bei diesem CTCF-Effekt eine Interaktion mit CHD8 eine Rolle, die, wie für andere Insulator-Regionen beschrieben wurde, Auswirkungen auf DNA-Methylierung und Acetylierung von Histonen besitzt (Ishihara *et al*., 2006). Da bis dato keine Erkenntnisse zum Methylierungsstatus von B4 bestehen, lässt sich die Annahme, dass dieses *Repeat*

als einziges in der ICR1 keine differentielle Methylierung aufweist, zumindest nicht widerlegen. Mit der geringen Sequenzhomologie von B4 im Vergleich zu den anderen *Repeats* (ca. 30 %; Frevel *et al*., 1999) findet sich darüber hinaus ein weiterer möglicher Grund, der das Ausbleiben der Kaiso-Bindung erklären könnte, da zusätzlich zur KBS auch flankierende Bereiche für die Bindung wichtig sein könnten.

Unabhängig von der möglichen Bedeutung der CTCF-ICR1-Bindung für Kaiso stellt sich die Frage, ob direkte Interaktionen der beiden Proteine bestehen, die eine Erklärung für die ähnlichen Effekte liefern können.

CTCF geht mit enorm vielen Stellen im Genom Bindungen ein und besitzt als ubiquitärer Faktor zahlreiche unterschiedliche Funktionen (zusammenfassend: Phillips und Corces, 2009). Diese Diversität lässt sich generell gut durch kontextabhängige Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinpartnern erklären, die durch die Nutzung von unterschiedlichen Zinkfinger-Kombinationen oder durch diverse post-translationale Modifikationen der Proteine zustande kommen könnten (zusammenfassend: Zlatanova und Caiafa, 2009).

Auch Kaiso ist ein bekannter CTCF-bindender Faktor, eine Interaktion findet zwischen der C-terminalen Region von CTCF und der BTB-Domäne von Kaiso statt (Klenova *et al*., 2002; Loukinov *et al*., 2002). Im humanen 5´-beta-Globin-Insulator liegen eine KBS- und CTS-Sequenz in unmittelbarer Nähe. Die Präsenz der KBS wirkt sich negativ auf die *Enhancer blocking*-Aktivität von CTCF aus und lässt darauf schließen, dass die Interaktion der beiden Proteine die CTCF-Insulatoraktivität negativ reguliert (Defossez *et al*., 2005). Zum Teil trifft dies auch auf die gemeinsame ICR1-Bindung der beiden Proteine zu, da die *knockdown*-Ergebnisse eine inhibierende Wirkung von Kaiso auf die Transkription von *H19* belegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern mit den übereinstimmend negativen Effekten von CTCF und Kaiso auf die *IGF2*-Expression aber auch Hinweise auf eine mögliche synergistische Auswirkung der beiden Proteine. Wie für die Regulation der IC1-Gene bekannt ist, spielen intrachromosomale Schleifenbildungen auch im beta-Globin-Insulator beim Huhn eine wichtige Rolle (Yusufzai *et al*., 2004 a und b). Für die Chromatinschleifen des IC1 ist von einer stabilisierenden Wirkung von CTCF-Interaktionen mit Cohesin auszugehen (Nativio *et al*., 2009). Passend dazu beschrieben Yusufzai und Kollegen für den beta-Globin-Insulator, dass die Wechselwirkung von CTCF mit Nucleophosmin die Schleifenbildung beeinflusst (Yusufzai *et al*., 2004 a und b). Genauso finden sich mit den *knockdown*-Experimenten dieser Arbeit Hinweise auf funktionelle Synergismen von CTCF und Kaiso, für die eine Wirkung auf die Chromatinarchitektur vermutet werden kann.

Um diesem Aspekt nachzugehen, wurden neben den Ansätzen, bei denen entweder *CTCF* oder *Kaiso* herunterreguliert wurde, auch Experimente durchgeführt, bei denen siRNAs gegen beide Proteine transfiziert wurden. Die gleichzeitige Herunterregulation von *CTCF* und *Kaiso* zeigte bei von den *scrambled locus*-Ansätzen abweichender Expression der vier analysierten 11p15.5-Gene fast immer Werte, die zwischen denen der Einzelansätze liegen oder in geringem Maße davon abweichen.

Es ist bekannt, dass mit der Menge der transfizierten siRNAs das Risiko von *off-target*-Effekten auf die

Genexpression zunimmt. Dies kann beispielsweise durch unspezifische Interaktion der siRNAs mit 3´-UTR-Bereichen zustande kommen (Caffrey *et al*., 2011). Deshalb und weil in einem ein Mal alternativ durchgeführten Experiment bei *Kaiso-knockdowns* demonstriert werden konnte, dass auch geringere siRNA-Dosen zu einer effizienten Herunterregulation führen (Daten nicht gezeigt), wurden bei den Doppel- und Einzelansätzen insgesamt jeweils die gleichen siRNA-Mengen transfiziert (2.7). Die Ergebnisse der Doppelansätze lassen sich daher auch als der niedrigeren Dosis entsprechende, im Vergleich zu den Einzelansätzen abgeschwächte Effekte erklären. Es ist deswegen nicht vollkommen auszuschließen, dass die gemeinsame Transfektion von jeweils den Einzelansätzen äquivalenten Mengen der siRNAs gegen beide Transkripte zu einem anderen Ergebnis der Doppel-*knockdown*-Effekte führen würde. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Doppel-*knockdown*-Experimenten lassen sich keine Aussagen zur Existenz funktioneller Synergismen von CTCF und Kaiso machen.

Im Gegensatz zu Effekten, die jeweils nach der Herunterregulation beider Proteine auftreten, findet man mit der deutlichen *H19*-Expressionssteigerung auch einen exklusiv beim *Kaiso-knockdown* auftretenden Effekt, der möglicherweise eine eigenständige Bedeutung des Kaiso-Proteins bei der ICR1-Regulation andeutet.

Nicht zuletzt aufgrund seiner Fähigkeit, sowohl methylierte CGCG-Sequenzen als auch unmethylierte KBS-Sequenzen binden zu können, wurden viele bereits vielfältige Funktionen von Kaiso bei der Modulation cytoplasmatischer und transkriptioneller Prozesse beschrieben. Lopes und Kollegen belegten, dass die Kaiso-Bindung an methylierte CGCG-Sequenzen zur epigenetischen Stilllegung von Tumorsuppressorgenen bei Darmkrebszelllinien führt (Lopes *et al*., 2008). Dabei wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von Kaiso keine Auswirkung auf den Methylierungsstatus expressionsrelevanter Regionen besitzt. Neben der DNA-Methylierung ist die Deacetylierung des Chromatins durch Histon-Deacetylasen (HDACs) ein wesentlicher Faktor bei der Stilllegung von Genen, da sie mit geschlossenen Chromatinkonformationen einhergeht. HDACs agieren im Komplex mit co-Repressoren wie NCOR1 und SIN3A. Es konnte gezeigt werden, dass die transkriptionell reprimierende Wirkung von Kaiso in Abhängigkeit von HDACs stattfindet (Daniel *et al*., 2007) und Kaiso eine Funktion bei der Rekrutierung der genannten co-Repressoren besitzt (van Roy und McCrea, 2005; Yoon *et al*., 2003). Dementsprechend kann man sich vorstellen, dass Kaiso in Assoziation mit co-Repressoren und HDACs an regulative Bereiche von Genen bindet, die entweder CGCG-Sequenzen oder KBS-Sequenzen aufweisen und negativ auf deren Expression wirkt. Damit wäre auch die eigenständige reprimierende Funktion von Kaiso auf *H19* zu erklären.

Eine weitere eigenständige Funktion von Kaiso bei seiner Bindung an die unmethylierte ICR1, die auch eine Bedeutung für Gene außerhalb von Chromosom 11 berücksichtigt, wird in Kapitel 4.5 diskutiert.

4.5 Bedeutung der ICR1-Bindung von CTCF und Kaiso für die Expression geprägter Gene auf anderen Chromosomen

Fehlerhafte Regulation von 11p15.5-Genen führt in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft genetischer oder epigenetischer Defekte zu gegensätzlichen klinischen Phänotypen: Die kausale Verbindung der Region mit dem Überwuchs-assoziierten Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) ist lange bekannt und wurde bereits vielfach beschrieben (zusammenfassend: Demars und Gicquel, 2012; Weksberg *et al*., 2010). Mehrere Autoren zeigten zudem die Verbindung von 11p15.5-Defekten mit dem unter anderem durch prä- und postnatalen Minderwuchs charakterisierten Silver-Russell-Syndrom (SRS) (zusammenfassend: Demars und Gicquel, 2012; Spengler *et al*., 2010). Bei etwa 85 % der BWS- und 40 % der SRS-Fälle finden sich 11p15.5-Charakteristika in Form von Methylierungsveränderungen, uniparentalen Disomien und anderen genomisch nachweisbaren Defekten wie Deletionen, Duplikationen und Translokationen (zusammenfassend: Spengler *et al*., 2010; Prawitt *et al*., 2010).

Die Prozentzahlen belegen den besonderen Stellenwert der Chromosom 11-Region beim Krankheitsgeschehen, weisen aber auch darauf hin, dass eine Bedeutung anderer genomischer Loci bei den Syndromen sehr wahrscheinlich ist. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich diesbezüglich neue Erkenntnisse gewinnen. Die Expressionsanalysen bei gegensätzlichen, unmodifizierten upd-Zelllinien und maternalen upd-Zellkulturen mit *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* zeigen, dass 11p15.5-betreffende Veränderungen scheinbar Auswirkungen auf Gene in anderen chromosomalen Regionen besitzen. Vier von fünf in dieser Arbeit analysierten Genen, die nicht auf Chromosom 11 zu finden sind, zeigen beim Vergleich der Expressionsniveaus der gegensätzlichen upd-Zelllinien Unterschiede und werden auch durch die Herunterregulation von *CTCF* oder *Kaiso* beeinflusst (3.8, 3.9). Das einzige nicht von Veränderungen betroffene Gen *GNAS* besitzt verschiedene sowohl proteinkodierende als auch untranslatierte Transkripte (zusammenfassend: Kelsey, 2010) Zusätzlich kann es durch alternatives *Splicing* zu verschiedenen Isoformen kommen (www.ensembl.org: ENSG00000087460, ENSG00000235590). Mit den für die qPCR-Analysen verwendeten *GNAS*-Primern lassen sich durch die Lage in den Exons vier und sieben alle Transkripte außer dem *antisense*-Transkript *NESPAS* gemeinsam untersuchen. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass Effekte der *knockdowns* und uniparentalen Disomien auf einzelne der vier Transkripte in den qPCR-Analysen nicht registriert wurden und für eine eindeutige Aussage zur Beeinflussung des Gens transkriptspezifische Primer nötig wären.

Die durch die upds und *knockdowns* beeinflussten Gene sind *PLAGL1* (Chromosom 6), *PEG3* (Chromosom 19) *MEST* und *GRB10* (beide Chromosom 7). Für drei dieser vier Gene, *PLAGL1*, *MEST* und *GRB10* wurde in Vergangenheit bereits eine Rolle bei der Entstehung von syndromalem Fehlwuchs vermutet: Arima und Kollegen konnten eine methylierungssensitive Bindung des durch *PLAGL1* kodierten Zinkfingerproteins an die Promoterregion von *KCNQ1OT1* nachweisen, die dessen Transkription induziert (Arima *et al*., 2005). Bei etwa der Hälfte aller BWS-Patienten lassen sich

Hypomethylierungen der als ICR des proximalen Clusters bekannten Promoterregion nachweisen (Weksberg *et al*., 2010). Da die *KCNQ1OT1*-RNA negativ regulierend auf die Transkription von *CDKN1C* wirkt und dessen Funktionsverlust kausal mit der BWS-Entstehung verbunden ist, vermuteten die Autoren, dass *PLAGL1*-Mutationen ursächlich bei der Ätiologie des BWS sein könnten. Die Gene *MEST* und *GRB10* befinden sich in Bereichen auf Chromosom 7, die bei etwa 10 % der SRS-Fälle durch verschiedene strukturelle chromosomale Veränderungen und maternale uniparentale Disomien mit unterschiedlichem Ausmaß betroffen sind und daher bereits mehrfach als Kandidatenregionen beschrieben wurden (zusammenfassend: Spengler *et al*., 2010).

Studien, in denen beim BWS und SRS das Auftreten von Multi-Lokus-Hypomethylierungen (MLH) beschrieben wurde, sprechen ebenfalls für eine krankheitsrelevante Bedeutung der in dieser Arbeit auffälligen Gene, da sie in Regionen liegen, die häufig von Hypomethylierungen betroffen sind: Rossignol und Kollegen untersuchten bei BWS-Patienten mit hypomethylierter ICR2 die DNA-Methylierung anderer geprägter Genregionen. Bei einem Viertel der vierzig untersuchten Individuen fanden sie mit dem Verlust der Methylierung (LOM, *loss of methylation*) unter anderem des *MEST*-Lokus zusätzliche Veränderungen außerhalb von 11p15.5 (Rossignol *et al*., 2006). Bliek und Kollegen zeigten bei 149 BWS-Individuen, dass solche mit ICR2-Hypomethylierung auch LOM in den Loci von *PLAGL1*, *MEST* und *GRB10* aufweisen. Sowohl bei Kontrollen ohne aberrante Methylierung als auch bei solchen mit isolierter hypermethylierter ICR1 oder Methylierungsveränderungen in beiden ICRs wurden dahingegen keine sonstigen Veränderungen gefunden (Bliek *et al*., 2009). Lim und Kollegen bestätigten, dass sich bei einem Anteil von BWS-Patienten mit ICR2-LOM auch Hypomethylierungen anderer Loci finden lassen (Lim *et al*., 2009). Eine aktuelle Studie belegt, dass zusätzlich zum BWS das MLH-Phänomen auch beim SRS zu finden ist: Bei etwa 10 % der untersuchten SRS-Patienten konnte zusätzlich zur Hypomethylierung der ICR1 unter anderem LOM der *PLAGL1*-DMR oder des *MEST*-Lokus nachgewiesen werden. Veränderungen dieser Art wurden auch bei 24 % der gleichzeitig untersuchten BWS-Patienten mit hypomethylierter ICR2 gefunden (Azzi *et al*., 2009).

Die Befunde, dass bei den Methylierungsstudien immer wieder ähnliche Kombinationen von Regionen gefunden werden, in denen Methylierungsdefekte auftreten, lässt auf Verbindungen zwischen den einzelnen Loci der Chromosomen 11, 6, 7 und 19 schließen. Da mit der ICR1 oder ICR2 bei den Fehlwuchssyndromen mit MLH jeweils ein Lokus besonders häufig von Aberrationen betroffen ist, kann übereinstimmend mit den Erkenntnissen dieser Arbeit vermutet werden, dass die beiden Kontrollregionen chromosomenübergreifend Einfluss auf andere Loci mit geprägten Genen besitzen.

In der bereits erläuterten Studie von Azzi und Kollegen wurde bei vier der untersuchten Patienten eine Kombination des LOM von ICR1 und ICR2 gefunden. Dieser Epigenotyp ging in drei Fällen mit dem SRS- und ein Mal mit dem BWS-Phänotyp einher (Azzi *et al*., 2009). Ein weiteres Beispiel dafür, dass scheinbar ähnliche Epigenotypen in unterschiedlichen Phänotypen resultieren, ergibt sich aus dem Vergleich der Daten zu BWS-Fällen mit MLH und einer Studie von Mackay *et al*. zum transienten neonatalen Diabetes Mellitus (TNDM). Zusätzlich zum als krankheitsursächlich beschriebenen LOM des *PLAGL1*-Lokus auf 6q24 wurden bei etwa 50 % der Patienten zusätzliche hypomethylierte Loci,

darunter auch die ICR2, gefunden (Mackay *et al*., 2006). Dementsprechend finden sich sowohl bei BWS als auch bei TNDM kombinierte Hypomethylierungen des *PLAGL1*-Lokus und der ICR2.

Es stellt sich die Frage, warum gleiche MLH-Kombinationen mit unterschiedlichen Phänotypen einhergehen und was den scheinbar vorherrschenden Effekt eines Lokus ausmacht. Azzi und Kollegen vermuteten diesbezüglich einen „epi"-dominanten Effekt einer Region, der sich in ihrer Studie mit dem unterschiedlichen Ausmaß geringer Rest-Methylierungen der verschiedenen hypomethylierten ICRs erklären ließe. Dieser Theorie entsprechend könnte ein vollständiger LOM des *PLAGL1*-Lokus mit lediglich partieller ICR2-Hypomethylierung bei der Studie von Mackay und Kollegen für den TNDM-Phänotyp verantwortlich sein. Umgekehrt würde eine stärkere Demethylierung der ICR2 zum Auftreten des BWS führen. Analog dazu ließen sich die ICR1-Auswirkungen auf Gene anderer Chromosomen in dieser Arbeit durch ihren „epi"-dominanten Effekt erklären, der durch die massiven Veränderungen des ICR1-Proteinbindungsstatus bei *knockdowns* und paternaler upd hervorgerufen wird.

Für den chromosomenübergreifenden Effekt der IC1-Kontrollregion lassen sich verschiedene Erklärungsansätze finden. Im letzten Teil dieses Unterkapitels wird diskutiert, inwiefern Wechselwirkungen zwischen verschiedenen geprägten Genen, wie sie beim *Imprinted Gene Network* der Maus beschrieben wurden, auch beim Menschen eine Bedeutung besitzen. Alternativ dazu lassen sich die Chromosom 11-übergreifenden ICR1-Effekte auch durch proteinbasierte Chromatin-Interaktionen erklären.

In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde bei SRS-Patienten genomweit nach Loci mit aberranter DNA-Methylierung gesucht, die zusätzlich zur Hypomethylierung der ICR1 auftritt (Kannenberg *et al*., 2012). Im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv aus Kindern, die bezüglich der Normalverteilung zu klein oder untergewichtig geboren wurden (SGA, *small for gestational age*), fanden sich bei den SRS-Individuen mit hypomethylierter ICR1 auf statistisch signifikante Weise häufiger Methylierungsveränderungen anderer geprägter Loci, unter anderem von *PLAGL1*, *PEG3* und *KCNQ1*. Kannenberg und Kollegen bestätigten damit, dass Veränderungen in einem Lokus dominierend auftreten, und vermuteten für die ICR1 einen Regulationsmechanismus, bei dem strukturelle Besonderheiten der Kontrollregion ausschlaggebend sind.

Auch die Expressionsveränderungen nach der Herunterregulation von *CTCF* oder *Kaiso* bzw. die Expressionsunterschiede zwischen den gegensätzlichen uniparentalen Disomien stützen die Vermutung, dass Strukturveränderungen der ICR1 auch Chromosom 11-übergreifend eine Bedeutung besitzen könnten, indem von ihr ausgehende proteinbasierte Chromatin-Interaktionen beeinflusst werden.

Dass CTCF eine wichtige Rolle bei der Ausbildung intrachromosomaler Schleifen spielt und damit Bedeutung für die Regulation der geprägten Gene in 11p15.5 besitzt, wurde bereits mehrfach beschrieben (Engel *et al*., 2008; Kurukuti *et al*., 2006; Murrell *et al*., 2004) und mit Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit in Unterkapitel 4.3 diskutiert.

Ling und Kollegen konnten für die Maus zeigen, dass das Zinkfingerprotein zusätzlich zu seiner

Bedeutung *in cis* auch eine Rolle bei Interaktionen der ICR1 mit Regionen auf anderen Chromosomen spielt (Ling *et al*., 2006): Interaktionen der ICR1 auf Maus-Chromosom 7 wurden mit einer Region ohne bekannte Gene auf Chromosom 6 und mit einer Region, die zwischen den Genen *Wsb1* und *Nf1* (WD-*Repeat* und Socs-Box enthaltendes Protein, Neurofibromin) auf Chromosom 11 liegt, identifiziert. Dabei konnte mit ChIP-Experimenten belegt werden, dass es sowohl in der ICR1 als auch in der *Wsb1*/*Nf1*-Region zu einer CTCF-Bindung kommt, die dort ausschließlich auf dem paternalen Allel detektiert wurde. Bei Versuchen mit deletierter ICR1 wurde gezeigt, dass die Interaktion ausschließlich mit der maternalen, also CTCF-gebundenen *Igf2*/*H19*-Kontrollregion stattfindet. Eine maternale ICR1-Deletion führt genauso wie der *knockdown* von *CTCF* zu Expressionsveränderungen von Genen der beiden interagierenden Loci. Damit konnten Ling und Kollegen die funktionelle Relevanz der CTCF-basierten Interaktion eindeutig belegen. Durch *circular chromosome conformation capture* (4C) fanden Zhao und Kollegen bei einer genomweiten Suche mehr als 100 Interaktionen der ICR1 in murinen Zellen (Zhao *et al*., 2006). Dabei wurden teilweise Regionen von vier unterschiedlichen Chromosomen gleichzeitig in räumlicher Nähe vorgefunden.

Beim Vergleich der gegensätzlichen upd-Zelllinien in dieser Arbeit findet man bei der paternalen Disomie eine stärkere *MEST*-Expression (3.8). In Kombination mit den gesteigerten *MEST*-Expressionswerten bei *CTCF-knockdowns* in dieser Arbeit lassen die Befunde die Vermutung zu, dass auch beim Menschen ICR1-basierte inter-chromosomale Schleifen vorliegen, wie sie von Zhao et al. und Ling et al. für die Maus bereits beschrieben wurden.

Im Zellkern geht man von einer hochgradig organisierten, dreidimensionalen Architektur aus, die zu unterschiedlichen Kompartimenten mit reprimierendem oder aktivierendem Charakter führt (Osborne *et al*., 2004; Cremer und Cremer, 2001). Demnach kann man sich vorstellen, dass transkribierte Gene in Chromatinschleifen liegen, die in aktivierenden Kompartimenten lokalisiert sind, und stillgelegte Gene durch andere Schleifen in reprimierenden Kompartimenten positioniert sind. Die Auswirkung der Lokalisierung in unterschiedlichen Territorien ist damit zu erklären, dass für die Transkription wichtige Faktoren wie Enzyme und DNA-bindende Faktoren nur in aktivierenden Bereichen zur Verfügung stehen. Möglicherweise spielt auch die Interaktion von CTCF mit der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II (LS Pol II) eine Rolle. Das Zinkfingerprotein kann LS Pol II-vermittelt für die Lokalisation transkriptionsrelevanter Proteine an bestimmten DNA-Regionen sorgen und besitzt dementsprechend eine Tata-Box-*binding*-Protein-äquivalente Funktion (Chernukhin *et al*., 2007). Chernukhin und Kollegen zeigten aber auch, dass nur in 10 % der CTCF-gebundenen humanen Loci eine Pol II-Bindung festgestellt werden konnte. Dazu passend wurden in einer früheren Studie Hinweise gefunden, dass CTCF als Bestandteil seiner Insulatorfunktion in der Lokus-Kontrollregion des ß-Globin-Insulators den Pol II-Zugang zu Promotoren verhindert (Zhao und Dean, 2004).

Demnach könnte man für das *MEST*-Gen von einer CTCF-basierten Positionierung in einem reprimierenden oder außerhalb eines aktivierenden Kompartiments ausgehen, in dem kein Zugang zu transkriptionsrelevanten Faktoren besteht. Durch den Verlust von CTCF beim *knockdown* oder der verhinderten ICR1-Bindemöglichkeit des Proteins bei der paternalen upd wird dieser Zustand

verändert und könnte daher die *MEST*-Expressionsanstiege erklären (Abbildung 4-6).

Es ist gut vorstellbar, dass auch Kaiso eine Bedeutung für die nukleäre Architektur besitzt. Die Daten von Ling und Kollegen, die bei den beiden *in trans* mit der ICR1 interagierenden Regionen nur im *Wsb1*/*Nf1*-Lokus eine CTCF-Bindung nachweisen konnten, lassen generell auf die Bedeutung weiterer Faktoren schließen (Ling *et al*., 2006). Für Bestandteile des Cohesin-Proteinkomplexes konnte in humanen Zellen gezeigt werden, dass er eine Funktion bei der Aufrechterhaltung von CTCF-mediierten inter-chromosomalen Verbindungen besitzt (Nativio *et al*., 2009). Eine solche essentielle CTCF-unterstützende Rolle scheint Kaiso nicht zu erfüllen. Die im Vergleich bei der paternalen upd-Zelllinie höhere und durch den *knockdown* von *Kaiso* gesteigerte *PLAGL1*-Expression lässt viel eher auf eine CTCF-unabhängige Funktion schließen, indem Kaiso, analog zur CTCF-Bedeutung für die *MEST*-Expression, zu einer Schleifenbildung führt, die für die Lokalisierung von *PLAGL1* in einem reprimierenden oder außerhalb eines aktivierenden Kompartiments zuständig ist (Abbildung 4-6). In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde mit 4C-Experimenten gezeigt, dass eine Bindung von CTCF nicht nur zum Zustandekommen spezifischer Schleifen führt, sondern auch destruktive Konsequenzen für die Chromatinarchitektur haben kann, indem durch die Proteinbindung auch Schleifenbildung verhindert wird (Guibert *et al*., 2012). Die Expressionsdaten von *MEST* und *PLAGL1* lassen sich demnach alternativ auch durch die Entstehung von Chromatinschleifen mit expressionsaktivierender Wirkung erklären, die im Normalzustand der Zellen durch die ICR1-Bindung der Zinkfingerproteine verhindert werden (Abbildung 4-6).

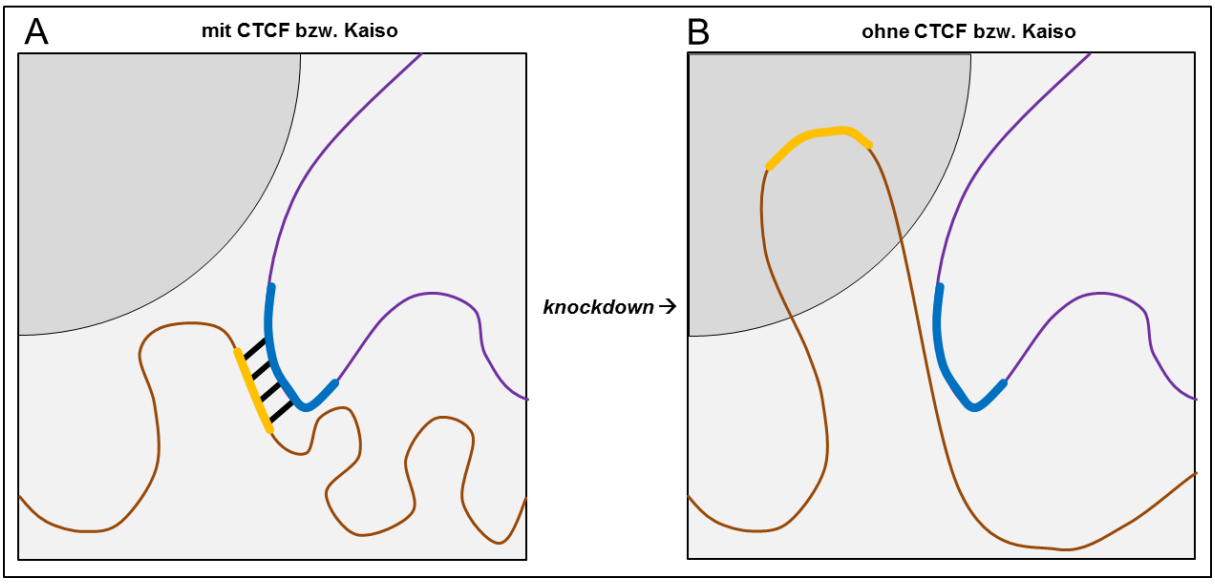


Abbildung 4-6 Chromatin-Schleifenmodell zu proteinbasierten *trans*-ICR1-Effekten

Das Modell veranschaulicht, wie proteinbasierte Interaktionen von Regionen verschiedener Chromosomen transkriptionell beeinflussend wirken können. **A**: Bindung von CTCF oder Kaiso und möglicherweise weiteren Proteinfaktoren führt zur Interaktion der ICR1 (blau) und genomischen Loci auf anderen Chromosomen (gelb). Dadurch entsteht eine Chromatinarchitektur, die den *MEST*- bzw. *PLAGL1*-Lokus (gelb) außerhalb von aktivierend wirkenden Nukleus-Kompartimenten (dunkelgrau) lokalisiert, in denen Zugang zur Transkriptions-Maschinerie besteht. **B**: Der *knockdown* von *CTCF* bzw. *Kaiso* führt zum Wegfall von ICR1-Interaktionen und damit zu anderen Chromatinschleifen, die eine Lokalisierung der Gen-Loci im aktivierenden Kompartiment (dunkelgrau) zur Folge haben und damit die Genexpression ermöglichen.

Im Kontrast zu den *MEST*- und *PLAGL1*-Ergebnissen lassen sich die Daten der Expressionsanalysen von *PEG3* und *GRB10* nicht durch Schleifenbildungen erklären, die auf Proteinbindung an die unmethylierte ICR1 basieren, da im Vergleich jeweils die maternalen upd-Zellen eine höhere Expression zeigen, die durch den *Kaiso-knockdown* in diesen Zellen nochmals stimuliert wird. Eine Erklärung für diese Befunde bietet der am Ende dieses Unterkapitels diskutierte Ansatz zur Existenz eines möglichen Netzwerks geprägter Gene.

Mit dem vorgeschlagenen Chromatin-Schleifenmodell lassen sich auch kausale Zusammenhänge des SRS mit den beschriebenen Kandidatenregionen auf Chromosom 7 finden, obwohl bis dato keine Punktmutationen oder isolierten Methylierungsdefekte der dort liegenden Kandidatengene *MEST* und *GRB10* gefunden wurden (zusammenfassend: Abu-Amero *et al*., 2008). Demnach bedarf es keiner Veränderungen, die die beiden Gene direkt betreffen, ausschlaggebend könnten auch Aberrationen im umgebenden Bereich der Gene sein, die eine expressionsrelevante Chromatinarchitektur genauso wie Veränderungen auf Chromosom 11 beeinflussen.

Bei einer der beiden von Ling und Kollegen in der Maus gezeigten Chromatin-Interaktionen findet man sowohl eine direkte CTCF-Bindung an die ICR1 als auch an die interagierende Region (Ling *et al*., 2006). Für verschiedene humane Zelltypen konnten durch ChIPseq-Analysen CTCF-Bindungen in verschiedenen Regionen des *MEST*-Gens nachgewiesen werden (www.ensembl.org, ENSG00000106484). Murphy und Kollegen untersuchten differentiell methylierte Regionen verschiedener Loci (Murphy *et al*., 2012). In der von ihnen als *MEST*-DMR definierten Region sprechen gesammelte ChiPseq- und ChIPchip-Daten jedoch nicht für eine CTCF-Bindung (www.genome.ucsc.edu, UCSC Genome Browser: GRCh37/hg19 und NCBI36/hg18, Genlokus: MEST). Daher ist anzunehmen, dass wie im Fall der zweiten von Ling und Kollegen beschriebenen Interaktion neben CTCF noch weitere Proteine beteiligt sind. Gleichzeitig sind auch mögliche *cis*-regulatorische Effekte einer CTCF-Bindung im *MEST*-Lokus als unwahrscheinlich anzunehmen.

Im Gegensatz dazu findet sich in dem von Murphy und Kollegen als *PLAGL1*-DMR definierten Bereich (Murphy *et al*., 2012) eine KBS-Sequenz (TNGCAG), die das Zustandekommen von Interaktionen zwischen ICR1 und dem *PLAGL1*-Lokus auf Chromosom 6 durch die Bindungen von Kaiso an beide Regionen erklären würde oder einen *cis*-regulatorischen Kaiso-Effekt als Grund für die *PLAGL1*-Expressionsveränderungen bei den *knockdowns* theoretisch vorstellbar macht. Da bei *PLAGL1* die Expressionsveränderungen aber sowohl durch die Herunterregulation eines Proteins (*knockdown*) als auch durch die uniparentale Bindungssituationen der ICR1 (gegensätzliche uniparentale Disomien) beeinflusst werden, ist ein *cis*-regulatorischer Effekt von Kaiso auf *PLAGL1* jedoch äußerst fraglich. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Expressionsveränderung um Auswirkungen des veränderten Proteinbindungsstatus in 11p15.5 handelt.

Shiura und Kollegen definierten die *GRB10*-DMR aufgrund ihrer großen Sequenzhomologie zur differentiell methylierten Region bei der Maus (Shiura *et al*., 2009). In der als h-MSR bezeichneten Region lassen sich keine KBS-Sequenzen finden, die Voraussetzung für eine mögliche *cis*-regulatorische Funktion des Proteins wären. Für *PEG3* lassen sich keine Aussagen über putative

Kaiso-Bindungen an differentiell methylierte Regionen machen, da lediglich für die Maus verlässliche Sequenzdaten bestehen.

Als Alternative oder ergänzend zu der Theorie, die die Expressionsergebnisse durch Veränderungen chromosomaler Kontakte beschreibt, lassen sich die Daten auch durch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen geprägten Genen erklären, die in der Maus beschrieben wurden. Dabei geht man von einem transkriptionellen Netzwerk aus, dessen Bestandteil unter anderem die murinen Orthologe der in dieser Arbeit untersuchten Gene sind. Der Erklärungsansatz berücksichtigt mit den gegenwärtigen Erkenntnissen die Expressionsveränderungen von allen vier in dieser Arbeit auffälligen Genen und lässt eine besondere Rolle von *PLAGL1* und *H19* vermuten.

Das *H19*-Gen produziert verschiedene nicht für Proteine kodierende RNAs (ncRNAs), zu dessen genauen Funktionen immer noch wenig Details sicher bekannt sind (Gabory *et al*., 2010). *PLAGL1* kodiert für ein Zinkfingerprotein, das eine Bedeutung bei der Ätiologie von transienten neonatalen Diabetes mellitus (TNDM) und retadiertem Wachstum besitzt (Mackay *et al*., 2002). Darüber hinaus ist seine Tumorsuppressorfunktion mit apoptotischer, anti-proliferativer und Zellzyklus-inhibierender Wirkung bekannt (Varrault *et al*., 1998). In aktuellen Publikationen werden sowohl für *H19* als auch für *PLAGL1* übergeordnete regulatorische Funktionen für das murine Netzwerk geprägter Gene (*Imprinted Gene Network*, IGN) vermutet (zusammenfassend: Gabory *et al*., 2010). Das IGN wurde ursprünglich im Rahmen einer Studie beschrieben, bei der durch meta-Analysen zahlreicher *micro arrays Plagl1*-co-exprimierte Gene identifiziert wurden (Varrault *et al*., 2006). Die gemeinsamen Expressionsanstiege von *PLAGL1*, *PEG3*, *GRB10*, *CDKN1C*, *H19* und *IGF2* nach dem *knockdown* von *Kaiso* in dieser Arbeit lassen ebenfalls auf deren co-Regulation schließen. Varrault und Kollegen zeigten mit Deletionen von *Plagl1* dessen direkte Auswirkung auf die Expression verschiedener Gene des IGN (Varrault *et al*., 2006). Die Transfektion von *Plagl1*-cDNA bei den ansonsten *Plagl1*-defizienten Zelllinien induzierte scheinbar genauso wie *PLAGL1*-Expressionsanstiege nach dem *Kaiso-knockdown* in der vorliegenden Arbeit die Transkription von *IGF2*, *H19* und *CDKN1C*.

Bezüglich *IGF2* und *H19* lässt sich dieser Aspekt möglicherweise durch die Bindungen von PLAGL1 an *Enhancer*- und Promoter-Sequenzen im IC1 erklären, die bei der Maus nachgewiesen wurden und dort aktivierend auf die beiden Gene wirkt (Varrault *et al*., 2006). Trotz geringer struktureller Unterschiede des Proteins zwischen Maus und Mensch kann diesbezüglich für *PLAGL1* von identischen Effekten ausgegangen werden (Varrault *et al*., 1998) und auch beim Menschen auf eine Funktion des PLAGL1-Proteins als Modulator der IC1-Chromatinarchitektur bzw. als dort wirkender transkriptioneller Aktivator oder co-Aktivator geschlossen werden.

Experimente mit *H19*-Deletionen in transgenen Mäusen zeigen, dass auch *H19* eine regulative Bedeutung für mehrere Gene besitzt, die zum IGN gezählt werden (Gabory *et al*., 2009). Der Verlust der *H19*-Transkription führte dabei zu Expressionssteigerungen von mehreren geprägten Genen des Netzwerks, unter anderem von *Igf2* und *Cdkn1c*. Dieser scheinbar inhibierende Effekt von *H19* steht dabei im Kontrast zu den korrelierenden Expressionswerten dieser Gene in der vorliegenden Arbeit.

In älteren Studien wurden bereits Wechselwirkungen zwischen *H19* und *IGF2* beschrieben, ohne auf

ein mögliches IGN einzugehen. Wilkin und Kollegen zeigten mit humanen Leberkarzinom-Zellen, dass lediglich ein *antisense*-Transkript von *H19* eine positive Auswirkung auf die Aktivität des *IGF2*-Promoters P3 besitzt und dass sowohl RNA- als auch Peptid-Level von *IGF2* positiv mit der Menge des *H19-antisense*-Transkripts korrelieren. Dahingegen konnten in dieser Studie keine Konsequenzen des *sense*-Transkripts auf *IGF2* festgestellt werden (Wilkin *et al*., 2000). Forné und Kollegen führten Methylierungsanalysen bei Mauslinien mit maternaler *H19*-Deletion durch. Im Gegensatz zum bereits beschriebenen Effekt des *antisense*-Transkripts wurde dabei eine negative Wirkung auf *IGF2* ersichtlich, indem die Deletionen mit *Igf2*-begünstigenden Methylierungsveränderungen einhergingen (Forné *et al*., 1997). Passend dazu zeigte die Gruppe um Rolf Ohlsson, dass die *H19*-Expression in Wilms´ Tumorzellen negativ mit der *IGF2*-Expression korreliert (Li *et al*., 1998). Die Autoren vermuteten für *H19* eine Funktion, die korrigierend auf Steigerungen der *IGF2*-Expression wirkt, wie sie häufig bei entarteten Zellen zu finden sind. Dementsprechend könnte die Korrektur von *IGF2*-Expressionssteigerungen durch *H19* einen Mechanismus darstellen, der vor allem bei sehr starken Anstiegen wichtig ist, bei denen andere negative Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel Sequestrierung durch IGFBPs, nicht mehr ausreichend sind. Durch diese Theorie lassen sich auch die scheinbar gegensätzlichen Bilder der Expressionsstatus von *H19* und *IGF2* in dieser Arbeit auf der einen Seite und bei den Studien von Gabory *et al.* und Li *et al*. auf der anderen Seite erklären: Da die *knockdown*-Versuche mit Fibroblasten durchgeführt wurden, die eine maternale upd der Region aufweisen, kann von einem vollständigen Verlust der *IGF2*-Expression ausgegangen werden, der infolge des Verlusts von CTCF oder Kaiso bei den *knockdown*-Versuchen zwar wieder reaktiviert wird, aber auf einem Niveau bleibt, bei dem der Korrekturmechanismus durch *H19* noch nicht aktiv ist. Im scharfen Kontrast dazu steht die Situation in den Wilms´ Tumorzellen (Li *et al*., 1998) und den Mauslinien (Gabory *et al*., 2009), bei denen ein höherer *IGF2*-Level den Korrektur-Mechanismus durch *H19* initiieren würde. Zusätzliche Belege für die Funktionalität eines solchen Mechanismus liefern die Daten von Gabory und Kollegen, die zeigten, dass die Expression eines *H19*-Transgens in *H19*-defizienten Zellen zur Erniedrigung der erhöhten *Igf2*-Expression führte. Den Daten entsprechend sind sowohl die *H19*- als auch die *IGF2*-Expressionsveränderungen in dieser Arbeit wahrscheinlich auf *cis*-regulatorische Effekte durch die ICR1-Proteinbindungen zurückzuführen.

Obwohl der diskutierten Theorie entsprechend die *H19*-Veränderungen nach dem *Kaiso-knockdown* scheinbar keine Auswirkung auf *IGF2* besitzen, können sie im Kontext des *Imprinted Gene Network* dennoch die veränderte Expression anderer IGN-Gene erklären. Analysen, die nur bei einer von zwei Deletions-Mauslinien in den Versuchen von Gabory und Kollegen durchgeführt wurden, zeigten dass der *H19*-Verlust auch Konsequenzen für die *Peg3*-Expression besitzt (Gabory *et al*., 2009). Diesbezüglich wurden keine genaueren Angaben zur Art der *H19*-vermittelten Veränderungen beschrieben. Experimente von Lui und Kollegen, die zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten in unterschiedlichen murinen Geweben die Expression von *PEG3*, *GRB10*, *CDKN1C* und *H19* analysierten und dabei stark korrelierende Werte fanden, lassen sich jedoch als Indiz für einen den Daten dieser Arbeit entsprechenden *H19*-Effekt auf die Gene werten (Lui *et al*., 2008).

Beim murinen IGN geht man von einer genau koordinierten Regulation einer großen Gruppe von geprägten Genen aus. Der Theorie entsprechend führt die Beeinträchtigung eines Gens zu vielfältigen, innerhalb des Netzwerks abgestimmten Expressionsveränderungen, die insgesamt in einem Gleichgewichtszustand resultieren, der stabiles Wachstum und Entwicklung im Organismus garantiert. Bezüglich der übergeordneten, regulativen Bedeutung von *H19* und *Plagl1* für das Netzwerk wurde die *Plagl1*-Funktion bei der Maus hierarchisch über dem Effekt von *H19* vermutet, da bei den *H19*-Deletionsstudien von Gabory und Kollegen keine Auswirkung auf *Plagl1* gefunden wurden (Gabory *et al*., 2009). Diese Annahme ist mit den Daten der vorliegenden Arbeit weder eindeutig zu bestätigen noch zu widerlegen. Der in der Maus bekannten Plagl1-Bindung an IC1-Regionen entsprechend (Varrault *et al*., 2006) wäre eine Beeinflussung von *H19* durch das PLAGL1-Protein denkbar. Andererseits ist zu vermuten, dass die durch den *Kaiso-knockdown* hervorgerufene starke *H19*-Expressionssteigerung für die Veränderungen der Gene außerhalb des IC1 inklusive *PLAGL1* zuständig ist.

Im Gegensatz zum *CTCF-knockdown* betreffen die Expressionsveränderungen nach dem *Kaiso-knockdown* auch die wahrscheinlich regulatorisch wirkenden Faktoren *H19* und *PLAGL1*. Für *Kaiso* kann deshalb eine besondere Funktion bei der Regulation eines möglichen humanen IGN vermutet werden. Die Bindung von Kaiso an KBS-Sequenzen konnte bis dato nur in Säugetieren nachgewiesen werden, lediglich die Bindung von methylierten CGCG-Sequenzen findet man auch in Fröschen, Fischen und Hühnern evolutionär konserviert (Ruzov *et al*., 2009). Das Phänomen des genomischen *Imprintings* gibt es, abgesehen von Insekten und Pflanzen, vor allem bei Säugetieren. Die scheinbar evolutionäre Kopplung von genomischen *Imprinting* und unmethylierter Kaiso-Bindung unterstützt die Annahme einer besonderen Rolle des Proteins bei der Regulation von geprägten Genen und im Speziellen bei Regulationsprozessen eines Netzwerks geprägter Gene.

Die zeitgleichen Veränderungen von verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Genen auf unterschiedlichen Chromosomen bei den *knockdown*- und upd-Analysen in dieser Arbeit und die Indizien, die für eine Bedeutung von *PLAGL1* und *H19* bei deren Regulation sprechen, lassen auch beim Menschen die Existenz eines Netzwerks geprägter Gene möglich erscheinen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zu *cis*-regulatorischen Auswirkungen der beiden Proteine im IC1 (4.3, 4.4), ihrer wahrscheinlichen Bedeutung bei interchromosomalen Interaktionen und der Bedeutung von Kaiso bei der Regulation eines möglichen Netzwerks geprägter Gene führen gemeinsam mit den verschiedenen diskutierten Aspekten aus Maus und Mensch zu einem Modell, in dem die ICR1 ein zentrales Element für die chromosomenübergreifende Regulation geprägter Gene darstellt (Abbildung 4-7).

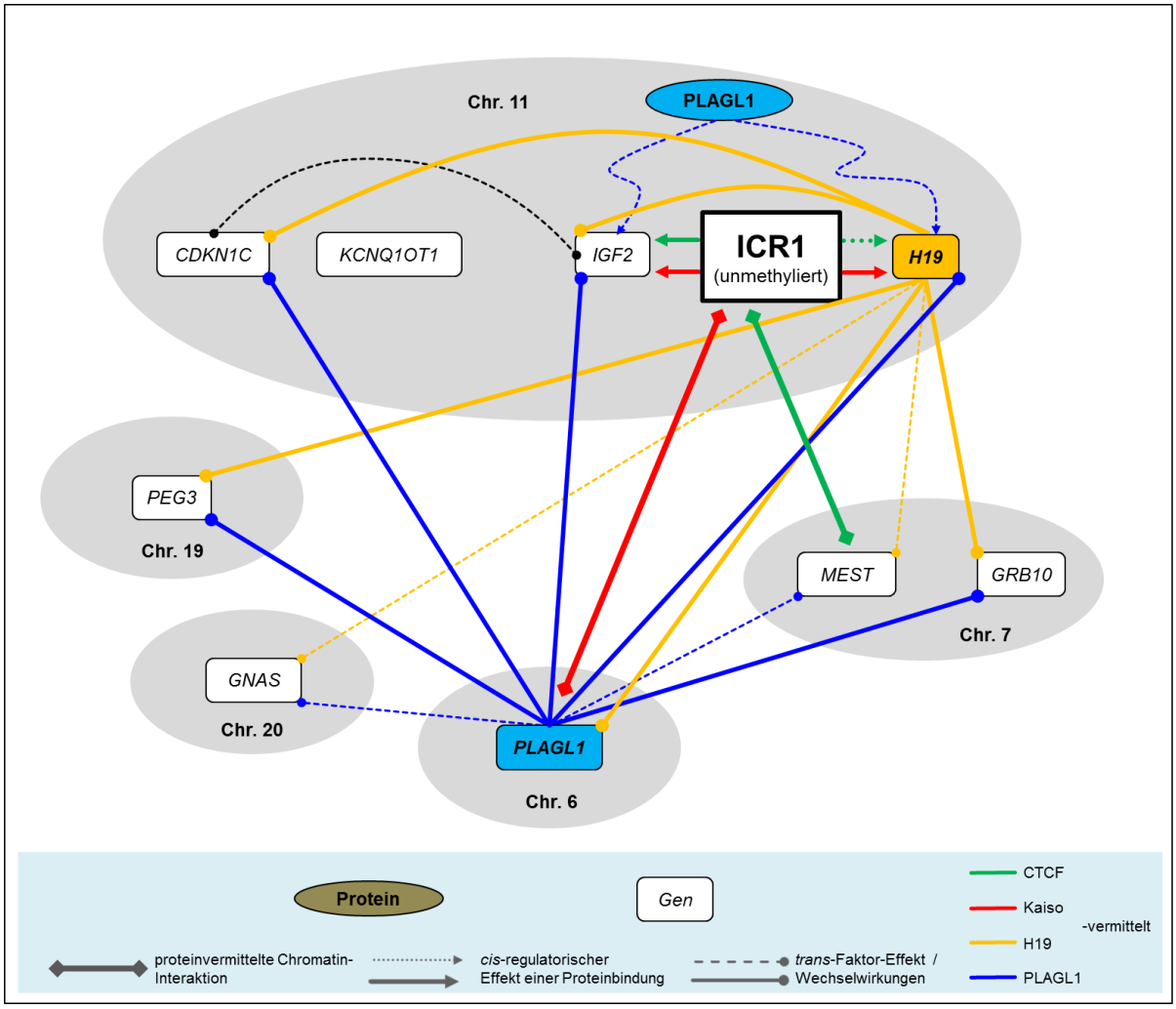


Abbildung 4-7 Chromosomenübergreifende Effekte der CTCF- und Kaiso-Bindung an die unmethylierte ICR1 und Wechselwirkungen zwischen geprägten Genen auf transkriptioneller Ebene

Die Abbildung stellt ein Modell dar, dass auf den diskutierten humanen und murinen Daten basiert und eine zentrale Rolle der Proteinbindungen an die unmethylierte ICR1 bei der chromosomenübergreifenden Regulation geprägter Gene beschreibt. Erkenntnisse, die nur auf Daten dieser Arbeit basieren oder mit aktuellen Publikationen übereinstimmen, sind mit durchgezogenen Linien dargestellt, Verbindungen, die exklusiv durch Literaturbefunde bestehen, sind gestrichelt.

Zusätzlich zur bereits bekannten inhibierenden Funktion der CTCF-ICR1-Bindung für *IGF2* kann von der negativen Auswirkung der hier erstmals beschriebenen Kaiso-ICR1-Bindung auf *IGF2* und *H19* ausgegangen werden. Dahingegen ließen sich keine Hinweise auf einen die *H19*-Transkription begünstigenden Effekt der CTCF-ICR1-Bindung finden. Die *cis*-regulatorische Bedeutung von CTCF im IC2 der chromosomalen Region 11p15.5 lässt sich mit den Daten dieser Arbeit aufgrund der Verwendung der upd(11p15)mat-Zelllinie mit methylierter ICR2 weder bestätigen noch widerlegen. Eine antagonistische Wirkweise von *IGF2* und *H19*, wie sie in Vergangenheit vermutet wurde, erklärt einen Teil der Expressionsdaten nach der Herunterregulation von *CTCF*. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass verschiedene in dieser Arbeit ermittelte Expressionsveränderungen geprägter Gene durch Wechselwirkungen auf transkriptioneller Ebene zustande kommen. Außer *KCNQ1OT1* sind alle analysierten Gene ortholog zu in der Maus beschriebenen Genen des *Imprinted Gene Network* (IGN). Außer *MEST* lassen sich ihre Expressionsveränderungen durch Effekte von *H19* und *PLAGL1* erklären, für die im murinen IGN eine übergeordnete *trans*-regulatorische Funktion beschrieben wurde. Damit liefert diese Arbeit erste Hinweise darauf, dass auch beim Menschen ein Netzwerk geprägter Gene bestehen könnte und Kaiso bei seiner Bindung an die unmethylierte ICR1 bei dessen Regulation *H19*-vermittelt eine Schlüsselrolle besitzt. Zu der Theorie eines humanen IGNs passt das das PLAGL1-Protein durch seine Bindung im *Imprinting*-Cluster 1 auch eine *cis*-regulatorische Auswirkung auf die untersuchten 11p15.5-Gene besitzen könnte. Alternativ oder ergänzend zur Annahme eines Netzwerks geprägter Gene sprechen die Expressionsergebnisse von *MEST* und *PLAGL1* für das Zustandekommen von Chromatin-Interaktionen mit transkriptionsrelevanter Bedeutung, die auf der ICR1-Bindung von CTCF bzw. Kaiso basieren.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten liefern gemeinsam mit verschiedenen publizierten Aspekten erstmals Hinweise darauf, dass die Regulation geprägter Gene koordiniert in einer Art Netzwerk stattfindet und die unmethylierte ICR1 sowie dort stattfindende Proteinbindungen dabei eine wesentliche Rolle spielen.

Bei der Mehrzahl der Fälle der beiden Fehlwuchs-Syndome BWS und SRS findet man entweder im IC1 oder im weiter zentromerwärts gelegenen IC2 Aberrationen, die für die Ätiologie der Syndrome kausal sind. Die Erkenntnisse dieser Arbeit bieten daher nicht nur die Möglichkeit zum allgemein besseren Verständnis der Regulation geprägter Gene, sondern können auch helfen, Mechanismen zu identifizieren, die grundlegend für BWS und SRS sind. Außer zwei Kandidatenregionen auf Chromosom 7, für die auch Wechselwirkungen mit der ICR1 in dieser Arbeit festgestellt wurden, bestehen keine Kenntnisse zu weiteren Loci, die Auswirkungen auf das Krankheitsgeschehen besitzen. Die Belege aus dieser Arbeit, dass ICR1-betreffende Veränderungen modulierend auf andere Regionen wirken, eröffnen auch die Möglichkeit, dass direkt dort stattfindende Aberrationen eine Bedeutung für die Entstehung der Syndrome besitzen. Bereits die in dieser Arbeit dargestellten Daten liefern daher klare Hinweise auf bislang unbekannte Regionen, die relevant sein könnten und damit auch diagnostische und therapeutische Bedeutung bei BWS und SRS besitzen würden. Darüber hinaus lassen sich vielleicht auch neue Hinweise gewinnen zum Verständnis anderer mit *Imprinting*-Defekten in den betroffenen Regionen assoziierten Erkrankungen, wie dem transienten neonatalen Diabetes mellitus (TNDM) oder nicht-syndromalen retardiertem Wachstum (*short for gestational age*, SGA). Diese Gründe belegen die Notwendigkeit der auf den Daten dieser Arbeit aufbauenden genaueren Charakterisierung von regulatorisch wichtigen Faktoren, funktionellen Mechanismen und Genen, die Bestandteil eines möglichen humanen Netzwerks geprägter Gene sein könnten.

Beim murinen IGN kann von einer *trans*-regulatorischen Funktion für *H19* ausgegangen werden (Gabory *et al.*, 2009). Die Expressionsdaten dieser Arbeit lassen vermuten, dass das Gen auch beim Menschen eine solche Bedeutung besitzt. Zur Verifikation, dass der Effekt tatsächlich direkt und eigenständig durch *H19* vermittelt wird, können *knockdowns* mit siRNA durchgeführt werden und in Folge die entsprechenden Gene durch quantitative PCR analysiert werden. Analog zu der Situation beim *Kaiso-knockdown* kann als sinnvolle Ergänzung zur *H19*-Defizienz auch dessen Überexpression durch Transfektion von entsprechenden Expressionsplasmiden untersucht werden.

Mit Deletions- und Transfektions-Experimenten wurde für *Plagl1* beim murinen IGN eine Funktion als Master-Regulator demonstriert und eine Bindung an *Enhancer*- und Promoter-Strukturen im IC1 belegt (Varrault *et al*., 2006). Die Daten dieser Arbeit schließen eine ähnliche Funktion von *PLAGL1* nicht aus, zudem konnte die Bindung des Zinkfingerproteins an die ICR2 des zentromerwärts gelegenen *Imprinting*-Clusters bereits gezeigt werden (Arima *et al*., 2005). Zum besseren Verständnis der Mechanismen eines möglichen Netzwerks kann auch die *PLAGL1*-Funktion durch Transfektionen

von siRNAs und Expressionsplasmiden in Kombination mit quantitativer PCR relevanter Gene untersucht werden. Bei offensichtlichen Auswirkungen von *PLAGL1* empfiehlt es sich, zudem dessen Bindung an verschiedene IC1-Regionen durch ChIP genauer zu untersuchen.

Der Einsatz von spezifischen siRNAs führt zur effizienten und vor allem schnellen Herunterregulation von Ziel-RNAs. Für *CTCF* und *Kaiso* ließen sich dadurch in der vorliegenden Arbeit innerhalb des analysierten Zeitraums zuverlässige Daten generieren. Die Transfektion der verwendeten Zellen mit spezifischen shRNA-Plasmiden oder deren Transduktion mit lentiviralen shRNA-Partikeln würde es in Kombination mit anschließender Antibiotika-Selektion darüber hinaus ermöglichen, Zellkulturen mit stabil unterdrückter Genexpression herzustellen und die Expressionsveränderungen über längere Zeiträume und mehrere Zellkulturpassagen zu untersuchen. Damit ließe sich unter anderem ergründen, ob mit länger anhaltendem Status der Herunterregulation von *CTCF*, *Kaiso* oder weiteren Faktoren Kompensationsmechanismen auftreten und ob Wechselwirkungen zwischen bestimmten Faktoren des vermuteten Netzwerks deutlicher werden.

Die Expressionsveränderungen von *MEST* und *PLAGL1,* die gleichermaßen nach *knockdowns* von *CTCF* bzw. *Kaiso* und bei Zelllinien mit maternaler uniparentaler 11p15.5-Disomie auftreten, lassen sich durch von der ICR1-ausgehende, proteinbasierte Interaktionen bestimmter chromosomaler Regionen erklären. Der Beweis, dass tatsächlich Interaktionen mit den Chromosomen 7 und 6 bestehen, muss noch erbracht werden, darüber hinaus kann vermutet werden, dass weitere chromosomale Regionen proteinvermittelt in räumlicher Nähe mit der ICR1 liegen. Eine geeignete Methode, chromosomale Interaktionen gezielt zu untersuchen, ist die sogenannte 4C (*circularized chromosome conformation capture*). Nachdem Chromatin in sich teilenden Zellen durch ein geeignetes Agens fixiert wurde, folgt ein Restriktionsverdau, der die Abtrennung von nicht interagierenden DNA-Bereichen bewirkt. Die intramolekulare Ligation von DNA-Fragmenten, die durch entsprechende Proteinvernetzungen in räumlicher Nähe vorliegen, führt dazu, dass sie auch nach dem Aufheben der Fixierung durch hohe Temperaturen als fest verbundenes DNA-Stück bestehen bleiben. Im letzten Schritt findet eine inverse PCR mit Primern statt, die komplementär zu den äußeren Bereichen der ICR1 sind. Aufgrund der zirkulären DNA-Struktur resultiert die PCR in der Amplifikation des unbekannten anligierten DNA-Bereichs, der mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung (*next generation sequencing*) oder Hybridisierungs-*arrays* analysiert wird. Nach bioinformatischer Auswertung kann es gelingen, mit der ICR1 interagierende DNA-Bereiche in *cis* und *trans* zu identifizieren. Die 4C-Untersuchungen würden mit vielfältigen neuen Optionen zur vollständigen Charakterisierung der Mechanismen eines möglichen Netzwerks einhergehen. Durch ChIP-Experimente mit CTCF- und Kaiso-Antikörpern lässt sich die Beteiligung der Proteine an gefundenen Interaktionen testen. Dabei könnte es auch sinnvoll sein, weitere Proteine auf deren Funktion bei den Wechselwirkungen durch ChIP zu analysieren. Diesbezüglich wären vor allem Bestandteile des Cohesin-Komplexes interessant, dessen Kooperation mit CTCF bei chromosomaler Schleifenbildung bereits gezeigt werden konnte (Monahan *et al*., 2012; Nativio *et al*., 2009). Als Bestandteile des murinen IGN kommen auch die beiden Zinkfingerproteine PLAGL1 und PEG3 bezüglich einer

möglichen Rolle bei den Interaktionen in Frage.

Die bei den ChIP-Experimenten verwandten fixierenden Agenzien besitzen reaktive Enden, die zu spezifischen funktionellen Gruppen von Proteinen oder anderen Molekülen passen. Verschiedene Agenzien unterscheiden sich durch ihre *Spacer*-Distanz, die das Ausmaß ihrer vernetzenden Wirkung bestimmen. Das üblicherweise verwandte Formaldehyd taugt mit seinen etwa 2 Å lediglich zur Untersuchung von direkt an die DNA gebundenen Proteinen. Man kann vermuten, dass an den ICR1-Interaktionen mehrere Proteine beteiligt sind und nicht alle direkt an die ICR1 und interagierende Regionen binden. Durch geeignete Wahl zusätzlicher fixierender Agenzien mit längeren *Spacer*-Distanzen können in ChIP-Versuchen auch indirekt bindende Proteine analysiert werden. Weiterhin könnten nach der 4C durch Sequenzanalysen der interagierenden Regionen weitere beteiligte Proteinfaktoren über bekannte Bindungssequenzen identifiziert werden und infolgedessen genauere Untersuchung rechtfertigen.

In Ergänzung zur Charakterisierung von übergeordneten Regulatoren, wie *H19* und *PLAGL1,* sowie der Identifikation relevanter chromosomaler Interaktionen und daran beteiligten Proteinen muss bei folgenden Arbeiten ein Fokus auf der Bestimmung von weiteren Genen liegen, die zu einem möglichen humanen IGN gehören könnten. Dafür müssen Analysen bei den vorhandenen *knockdowns* von *CTCF* und *Kaiso* und bei zukünftigen *H19*- und *PLAGL1-knockdowns* durch quantitative PCR durchgeführt werden. Bei der Auswahl der zu untersuchenden Gene sollten humane Orthologe des Maus-IGNs und Gene aus den mittels 4C identifizierten interagierenden Regionen berücksichtigt werden. Zur Priorisierung von in Frage kommenden Genen könnte es hilfreich sein, zunächst wachstums- und entwicklungsrelevante Kandidaten auszuwählen.

Die phänotypische Ausprägung bei BWS und SRS verläuft sehr heterogen, teilweise sind Korrelationen zwischen bestimmten phänotypischen Varianten und (epi)genetischen Defekten bekannt. Beispielsweise sind BWS-Fälle mit paternaler uniparentaler Disomie von 11p15.5 und mit Hypermethylierungen der ICR1 und des *H19*-Promotors mit dem höchsten Tumorrisiko assoziiert. Patienten mit *CDKN1C*-Mutationen weisen hingegen sehr selten Tumore auf und zeigen viel häufiger Bauchwand-Defekte (Prawitt *et al*., 2010). Beim SRS unterscheiden sich verschiedene Kohorten mit maternaler uniparentaler Disomie von Chromosom 7, Chromosom 11-Epimutationen und idiopathische Fälle auch im Erfolg der symptomatischen Therapie des retardierten Wachstums mit Hormonen (Binder *et al*., 2008; Netchine *et al*., 2007). Diese beiden Beispiele verdeutlichen, wie wichtig eine differenzierte Diagnostik hinsichtlich Risikoeinschätzung und Therapie ist. Die genaueren Erkenntnisse zu einem möglichen humanen IGN und seiner Bedeutung für die Ätiologie der Syndrome könnten diesbezüglich hilfreich sein. Durch das erweiterte Spektrum an kausalen molekularen Befunden könnte eine genauere Unterscheidung von Phänotyp-Genotyp-Korrelationen möglich werden, die zur differenzierteren Diagnostik und damit auch zu präziseren therapeutischen Maßnahmen führen würde.

5 Zusammenfassung

Geprägte Gene besitzen die Besonderheit, dass sie jeweils nur von einem Allel exprimiert werden und in der Regel in *Imprinting* Clustern (ICs) im Genom vorliegen. Bei der Regulation in solchen ICs spielen differentiell methylierte *Imprinting* Kontrollregionen (ICRs) und dort stattfindende Proteinbindungen eine wichtige Rolle. Die essentielle Bedeutung der CTCF-Bindung an die ICR1 in 11p15.5 für die Expressionsregulation der geprägten Gene *H19* und *IGF2* ist bereits bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung von Kaiso an die unmethylierte ICR1 bei humanen Zellen mit maternaler uniparentaler Disomie von 11p15 (upd(11p15)mat) nachgewiesen und die genaue Bindungsverteilung von Kaiso und CTCF in den B-*Repeats* der Kontrollregion bestimmt werden. *Cis*-regulatorische und chromosomenübergreifende transkriptionelle Effekte der ICR1-Proteinbindungen sollten dann durch qPCR-Analysen geprägter Gene bei Zellen mit maternaler und paternaler upd(11p15) und nach siRNA-basierter Herunterregulation der beiden Proteine in Zellen mit upd(11p15)mat analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Kaiso an die unmethylierte ICR1 bindet. Dabei kann zumindest von einer Bindestellennutzung in der distalen ICR1-Hälfte ausgegangen werden. Für CTCF hingegen wurde eine Nutzung aller analysierten *Repeats* in beiden ICR1-Hälften gefunden. In der maternalen bzw. paternalen upd(11p15) entspricht die Expression der 11p15.5-Gene *IGF2*, *H19*, *CDKN1C* und *KCNQ1OT1* dem jeweiligen Disomie-Status. Von den nicht auf Chromosom 11 gelegenen geprägten Genen zeigen *MEST* und *PLAGL1* bei Zellen mit upd(11p15)pat sowie *PEG3* und *GRB10* bei der upd(11p15)mat eine stärkere Expression. Ein *CTCF-knockdown* in Zellen mit upd(11p15)mat führt zur *IGF2*-Expressionssteigerung. Dies tritt in noch stärkerem Maße beim *knockdown* von *Kaiso* auf, wobei hier zusätzlich eine gesteigerte Expression von *H19* vorliegt. Des Weiteren findet man beim *CTCF-knockdown* einen *MEST*-Expressionsanstieg und beim *Kaiso-knockdown* gesteigerte Expressionen der Gene *PEG3*, *GRB10* und *PLAGL1*. Damit lassen sich sowohl eigenständige *cis*-regulatorische Effekte der ICR1-Bindung beider Proteine auf geprägte Gene des IC1 als auch chromosomenübergreifende Effekte erkennen. Vor allem die starken *H19*-Expressionsanstiege beim *Kaiso-knockdown* treten korrelierend mit Veränderungen von geprägten Genen anderer Chromosomen auf. Damit unterstützen die Daten die Theorie, dass die Expressionsregulation geprägter Gene koordiniert in einer Art Netzwerk stattfinden könnte und dabei bestimmte Faktoren wie *H19* und *PLAGL1* eine übergeordnete Regulatorfunktion besitzen, wie es in Vergangenheit in der Maus beschrieben wurde. Die Expressionsanalysen von *PLAGL1* und *MEST* deuten darüber hinaus durch ihre tendenziell übereinstimmenden Werte bei der paternalen upd mit hypermethylierter ICR1 und den *knockdowns* auf die Existenz von Chromatin-Interaktionen zwischen der ICR1 und Abschnitten auf den Chromosomen 6 und 7 hin, ggf. mit einem entsprechenden lokalen Effekt der Proteine in diesen Loci. Proteinbindungen an die maternale ICR1 scheinen damit sowohl *cis*-regulatorisch die Transkription der geprägten Gene *IGF2* und *H19* zu beeinflussen als auch durch die *H19*-Expression ein funktionelles Netzwerk geprägter Gene als *trans*-Faktor zu regulieren und für Interaktionen zwischen verschiedenen Chromosomen mit transkriptionsregulierender Wirkung verantwortlich zu sein.

6 Literaturverzeichnis

A

Abdollahi, A. (2007). LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. J Cell Physiol. 210(1):16-25.

Abu-Amero S., Monk D., Frost J., Preece M., Stanier P., Moore G.E. (2008). The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. J Med Genet. 45(4):193-9.

Ahrens W, Hiort O, Staedt P, Kirschner T, Marschke C, Kruse K. (2001). Analysis of the GNAS1 gene in Albright's hereditary osteodystrophy. J Clin Endocrinol Metab. 86(10):4630-4.

Arima T, Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N. (2005). ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. Nucleic Acids Res. 11;33(8):2650-60.

Azzi S, Rossignol S, Steunou V, Sas T, Thibaud N, Danton F, Le Jule M, Heinrichs C, Cabrol S, Gicquel C, Le Bouc Y, Netchine I. (2009). Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. Hum Mol Genet.18(24):4724-33.

B

Bardwell VJ, Treisman R. (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. Genes Dev. 8(14):1664-77.

Bell,A.C., West,A.G., and Felsenfeld,G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. Cell 98, 387-396.

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

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. (2007). The mammalian epigenome. Cell. 128(4):669-81.

Berteaux N, Aptel N, Cathala G, Genton C, Coll J, Daccache A, Spruyt N, Hondermarck H, Dugimont T, Curgy JJ, Forné T, Adriaenssens E. (2008). A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. Mol Cell Biol. (22):6731-45.

Binder G, Seidel AK, Martin DD, Schweizer R, Schwarze CP, Wollmann HA, Eggermann T, Ranke MB. (2008). The endocrine phenotype in silver-russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. J Clin Endocrinol Metab. (4):1402-7.

Binder G, Begemann M, Eggermann T, Kannenberg K. (2011). Silver-Russell syndrome. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. (1):153-60.

Bird,A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 16, 6-21.

Blagitko N, Mergenthaler S, Schulz U, Wollmann HA, Craigen W, Eggermann T, Ropers HH, Kalscheuer VM. (2000). Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion. Hum Mol Genet. (11):1587-95.

Bliek J, Verde G, Callaway J, Maas SM, De Crescenzo A, Sparago A, Cerrato F, Russo S, Ferraiuolo S, Rinaldi MM, Fischetto R, Lalatta F, Giordano L, Ferrari P, Cubellis MV, Larizza L, Temple IK, Mannens MM, Mackay DJ, Riccio A. (2009). Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. Eur J Hum Genet. (5):611-9.

Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. Science 317:1760-1764.

Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. Mol Cell Biol. (1):28-36.

Buck-Koehntop BA, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. (2012). Kaiso uses all three zinc fingers and adjacent sequence motifs for high affinity binding to sequence-specific and methyl-CpG DNA targets. FEBS Lett. 586(6):734-9.

Burke,L.J., Zhang,R., Bartkuhn,M., Tiwari,V.K., Tavoosidana,G., Kurukuti,S., Weth,C., Leers,J., Galjart,N., Ohlsson,R., and Renkawitz,R. (2005). CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin. EMBO J. 24, 3291-3300.

C

Caballero M, Hansen J, Leaford D, Pollard S, Hendrich BD. (2009). The methyl-CpG binding proteins Mecp2, Mbd2 and Kaiso are dispensable for mouse embryogenesis, but play a redundant function in neural differentiation. PLoS One. 4(1):e4315.

Caffrey DR, Zhao J, Song Z, Schaffer ME, Haney SA, et al. (2011). siRNA Off-Target Effects Can Be Reduced at Concentrations That Match Their IndividualPotency. PLoS ONE 6(7): e21503.

Cai,X. and Cullen,B.R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. RNA. 13, 313-316.

Caspary,T., Cleary,M.A., Perlman,E.J., Zhang,P., Elledge,S.J., and Tilghman,S.M. (1999). Oppositely imprinted genes p57(Kip2) and igf2 interact in a mouse model for Beckwith-Wiedemann syndrome. Genes Dev. 13 , 3115-3124.

Cedar H, Bergman Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet. 10(5):295-304.

Chao W, D'Amore PA. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. Cytokine Growth Factor Rev. 19(2):111-20.

Chernukhin,I., Shamsuddin,S., Kang,S.Y., Bergstrom,R., Kwon,Y.W., Yu,W., Whitehead,J., Mukhopadhyay,R., Docquier,F., Farrar,D., Morrison,I., Vigneron,M., Wu,S.Y., Chiang,C.M., Loukinov,D., Lobanenkov,V., Ohlsson,R., and Klenova,E. (2007). CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. Mol. Cell Biol. 27, 1631-1648.

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

Choi JD, Underkoffler LA, Wood AJ, Collins JN, Williams PT, Golden JA, Schuster EF Jr, Loomes KM, Oakey RJ. (2005). A novel variant of Inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island. Mol Cell Biol. 25(13):5514-22.

Collas P. The current state of chromatin immunoprecipitation. (2010). Mol Biotechnol. 45(1):87-100.

Cosgrove MS. (2007). Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility. Expert Rev Proteomics 4:465–478.

Coverley D, Marr J, Ainscough J. (2005). Ciz1 promotes mammalian DNA replication. J Cell Sci. 118(Pt 1):101-12.

Cremer T, Cremer C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nat Rev Genet. 2(4):292-301.

Cui,H., Niemitz,E.L., Ravenel,J.D., Onyango,P., Brandenburg,S.A., Lobanenkov,V.V., and Feinberg,A.P. (2001). Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms' tumor commonly involves altered methylation but not mutations of CTCF or its binding site. Cancer Res. 61, 4947-4950.

Cui,H., Onyango,P., Brandenburg,S., Wu,Y., Hsieh,C.L., and Feinberg,A.P. (2002). Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. Cancer Res. 62, 6442-6446.

D

Dai SD, Wang Y, Zhang JY, Zhang D, Zhang PX, Jiang GY, Han Y, Zhang S, Cui QZ, Wang EH. (2011). Upregulation of δ-catenin is associated with poor prognosis and enhances transcriptional activity through Kaiso in non-small-cell lung cancer. Cancer Sci. 102(1):95-103.

Dai SD, Wang Y, Miao Y, Zhao Y, Zhang Y, Jiang GY, Zhang PX, Yang ZQ, Wang EH. (2009). Cytoplasmic Kaiso is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 9:178.

Daniel JM. (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. Biochim Biophys Acta. 1773(1):59-68.

Daniel,J.M., Spring,C.M., Crawford,H.C., Reynolds,A.B., and Baig,A. (2002). The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. Nucleic Acids Res. 30, 2911-2919.

Daniel JM, Ireton RC, Reynolds AB. (2001). Monoclonal antibodies to Kaiso: a novel transcription factor and p120ctn-binding protein. Hybridoma. 20(3):159-66.

Daniel,J.M. and Reynolds,A.B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. Mol. Cell Biol. 19, 3614-3623.

Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. (2004). Chromatin immunoprecipitation assay. Biotechniques. 37(6):961-9.

De Crescenzo A, Coppola F, Falco P, Bernardo I, Ausanio G, Cerrato F, Falco L, Riccio A. (2011). A novel microdeletion in the IGF2/H19 imprinting centre region defines a recurrent mutation mechanism in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. Eur J Med Genet. 54(4):e451-4.

Defossez,P.A., Kelly,K.F., Filion,G.J., Perez-Torrado,R., Magdinier,F., Menoni,H., Nordgaard,C.L., Daniel,J.M., and Gilson,E. (2005). The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. J. Biol. Chem. 280, 43017-43023.

Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. (2002). Capturing chromosome conformation. Science 295(5558):1306-11.

De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arano H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F. (2007). Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. Cancer Res. 67(6):2577-85.

Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. (2009). Epigenetic control. J Cell Physiol. 219(2):243-50.

Del Valle-Pérez B, Casagolda D, Lugilde E, Valls G, Codina M, Dave N, de Herreros AG, Duñach M. (2011). Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1ε-dependent phosphorylation of p120-catenin. J Cell Sci. 124(Pt 13):2298-309.

Demars J, Gicquel C. (2012). Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes. Clin Genet. 81(4):350-61.

Demars J, Shmela ME, Rossignol S, Okabe J, Netchine I, Azzi S, Cabrol S, Le Caignec C, David A, Le Bouc Y, El-Osta A, Gicquel C. (2010). Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. Hum Mol Genet. 19(5):803-14.

Diaz-Meyer,N., Yang,Y., Sait,S.N., Maher,E.R., and Higgins,M.J. (2005). Alternative mechanisms associated with silencing of CDKN1C in Beckwith-Wiedemann syndrome. J. Med. Genet. 42, 648-655.

Dolinoy DC, Jirtle RL. (2008). Environmental epigenomics in human health and disease. Environ Mol Mutagen. 49(1):4-8.

Dong KB, Maksakova IA, Mohn F, Leung D, Appanah R, Lee S, Yang HW, Lam LL, Mager DL, Schübeler D, Tachibana M, Shinkai Y, Lorincz MC. (2008). DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. EMBO J. 27(20):2691-701.

Donohoe ME, Zhang LF, Xu N, Shi Y, Lee JT. (2007). Identification of a Ctcf cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. Mol Cell. 25(1):43-56.

Du,M., Beatty,L.G., Zhou,W., Lew,J., Schoenherr,C., Weksberg,R., and Sadowski,P.D. (2003). Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. Hum. Mol. Genet. 12, 1927-1939.

Dupont,J.M., Tost,J., Jammes,H., and Gut,I.G. (2004). De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. Anal. Biochem. 333, 119-127.

E

Edwards,C.A. and Ferguson-Smith,A.C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. Curr. Opin. Cell Biol. 19, 281-289.

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

Eggermann T, Meyer E, Obermann C, Heil I, Schuler H, Ranke MB, Eggermann K, Wollmann HA. (2005). Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome? J Med Genet 42:e26

ENCODE Project Consortium. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. Nature Vol 447

Engel N, Raval AK, Thorvaldsen JL, Bartolomei SM. (2008). Three-dimensional conformation at the H19/Igf2 locus supports a model of enhancer tracking. Hum Mol Genet. 17(19):3021-9.

Enklaar,T., Zabel,B.U., and Prawitt,D. (2006). Beckwith-Wiedemann syndrome: multiple molecular mechanisms. Expert. Rev. Mol. Med. 8, 1-19.

F

Fan S, Zhang MQ, Zhang X. (2008). Histone methylation marks play important roles in predicting the methylation status of CpG islands. Biochem Biophys Res Commun. 374(3):559-64.

Fatemi M, Pao MM, Jeong S, Gal-Yam EN, Egger G, Weisenberger DJ, Jones PA. (2005). Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. Nucleic Acids Res. 33(20):e176.

Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. Science. 303(5655):238-40.

Feil R, Walter J, Allen ND, Reik W. (1994). Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes. Development. 120(10):2933-43.

Ferguson-Smith AC, Cattanach BM, Barton SC, Beechey CV, Surani MA. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. Nature. 351(6328):667-70.

Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. Mol Cell Biol. 26(1):169-81.

Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenkov VV. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. Mol Cell Biol. 16(6):2802-13.

Fitzpatrick GV, Pugacheva EM, Shin JY, Abdullaev Z, Yang Y, Khatod K, Lobanenkov VV, Higgins MJ (2007). Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1. Mol Cell Biol. 27(7):2636-47.

Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins MJ. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. Nat Genet. 32(3):426-31.

Forné T, Oswald J, Dean W, Saam JR, Bailleul B, Dandolo L, Tilghman SM, Walter J, Reik W. (1997). Loss of the maternal H19 gene induces changes in Igf2 methylation in both cis and trans. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(19):10243-8.

Frevel,M.A., Sowerby,S.J., Petersen,G.B., and Reeve,A.E. (1999). Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms tumor. J. Biol. Chem. 274, 29331-29340.

G

Gabory A, Jammes H, Dandolo L. (2010). The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. Bioessays. 32(6):473-80.

Gabory A, Ripoche MA, Le Digarcher A, Watrin F, Ziyyat A, Forné T, Jammes H, Ainscough JF, Surani MA, Journot L, Dandolo L. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. Development. 136(20):3413-21.

Gardiner-Garden M, Frommer M. (1987). CpG Islands in Vertebrate Genomes. J. Mol. Biol. 196, 261-282

Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. Trends Mol Med.;12(12):580-7.

Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA, Smith RJ. (2003). Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. J Biol Chem. 278(34):31564-73.

Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand AM, Netchine I, Le Bouc Y. (2005). Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. Nat Genet. 37(9):1003-7.

Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. (2006). Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science. 311(5759):395-8.

Grandjean,V., Smith,J., Schofield,P.N., and Ferguson-Smith,A.C. (2000). Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 5279-5284.

Grönlund A, Dahlgren J, Aring E, Kraemer M, Hellström A. (2011). Ophthalmological findings in children and adolescents with Silver-Russell syndrome. Br J Ophthalmol. 95(5):637-41.

Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. Cell. 128(4):721-33.

Guibert S, Zhao Z, Sjölinder M, Göndör A, Fernandez A, Pant V, Ohlsson R. (2012). CTCF-binding sites within the H19 ICR differentially regulate local chromatin structures and cis-acting functions. Epigenetics. 7(4):361-9.

H

Hadjur S, Williams LM, Ryan NK, Cobb BS, Sexton T, Fraser P, Fisher AG, Merkenschlager M. (2009). Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. Nature. 460(7253):410-3.

Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B. (1993). Tumour-suppressor activity of H19 RNA. Nature. 365(6448):764-7.

Hark,A.T., Schoenherr,C.J., Katz,D.J., Ingram,R.S., Levorse,J.M., and Tilghman,S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. Nature 405, 486-489.

Heath H, Ribeiro de Almeida C, Sleutels F, Dingjan G, van de Nobelen S, Jonkers I, Ling KW, Gribnau J, Renkawitz R, Grosveld F, Hendriks RW, Galjart N (2008). CTCF regulates cell cycle progression of alphabeta T cells in the thymus. EMBO J. 27(21):2839-50.

Hellman LM, Fried MG. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. Nat Protoc. 2(8):1849-61.

Hendrich B, Bird A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol. Cell Biol. 18, 6538-6547.

Herold M, Bartkuhn M, Renkawitz R. (2012). CTCF: insights into insulator function during development. Development. 139(6):1045-57.

Hirano T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. Nat Rev Mol Cell Biol. 7(5):311-22.

Holden NS, Tacon CE. (2011). Principles and problems of the electrophoretic mobility shift assay. J Pharmacol Toxicol Methods. 63(1):7-14.

Holliday R, Pugh JE. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science. 1975 Jan 24;187(4173):226-32.

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

Hori,N., Nakano,H., Takeuchi,T., Kato,H., Hamaguchi,S., Oshimura,M., and Sato,K. (2002). A dyad oct-binding sequence functions as a maintenance sequence for the unmethylated state within the H19/Igf2-imprinted control region. J. Biol. Chem. 277, 27960-27967.

Horike S, Ferreira JC, Meguro-Horike M, Choufani S, Smith AC, Shuman C, Meschino W, Chitayat D, Zackai E, Scherer SW, Weksberg R. (2009). Screening of DNA methylation at the H19 promoter or the distal region of its ICR1 ensures efficient detection of chromosome 11p15 epimutations in Russell-Silver syndrome. Am J Med Genet A. 149A(11):2415-23.

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

Horsthemke, B. (2010). Genomisches Imprinting und Imprintingfehler. medgen 22:385–391

Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A. (2008). CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(51):20398-403.

Huang JM, Kim J. (2009). DNA methylation analysis of the mammalian PEG3 imprinted domain. Gene. 442(1-2):18-25.

I

Ishihara K, Oshimura M, Nakao M. (2006). CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. Mol Cell. 23(5):733-42.

J

Jenuwein T, Allis CD. (2001). Translating the histone code. Science. 293(5532):1074-80.

Jirtle R.L. and Weidman J.R. (2007). Imprinted and more equal. American Scientist 95, 143-149.

Jones PA, Baylin SB. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. Jun;3(6):415-28.

Joseph B, Wallén-Mackenzie A, Benoit G, Murata T, Joodmardi E, Okret S, Perlmann T. (2003). p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(26):15619-24.

Jovanovic M, Hengartner MO. (2006). miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. Oncogene. 25(46):6176-87.

K

Kanduri C. (2011). Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA. Semin Cell Dev Biol. 22(4):343-50.

Kanduri,C., Pant,V., Loukinov,D., Pugacheva,E., Qi,C.F., Wolffe,A., Ohlsson,R., and Lobanenkov,V.V. (2000). Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. Curr. Biol. 10, 853-856.

Kannenberg K, Urban C, Binder G. (2012). Increased incidence of aberrant DNA methylation within diverse imprinted gene loci outside of IGF2/H19 in Silver-Russell syndrome. Clin Genet. 81(4):366-77.

Karpf,A.R. and Matsui,S. (2005). Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. Cancer Res. 65, 8635-8639.

Kavanagh E, Joseph B. (2011). The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. Biochim Biophys Acta. 1816(1):50-6.

Kelsey G. (2010). Imprinting on chromosome 20: tissue-specific imprinting and imprinting mutations in the GNAS locus. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 154C(3):377-86.

Kim J, Ekram MB, Kim H, Faisal M, Frey WD, Huang JM, Tran K, Kim MM, Yu S. (2012). Imprinting control region (ICR) of the Peg3 domain. Hum Mol Genet. 21(12):2677-87.

Kim JD, Kang K, Kim J. (2009). YY1's role in DNA methylation of Peg3 and Xist. Nucleic Acids Res. 37(17):5656-64.

Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanenkov VV, Ren B. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. Cell. 128(6):1231-45.

Kim JD, Hinz AK, Bergmann A, Huang JM, Ovcharenko I, Stubbs L, Kim J. (2006). Identification of clustered YY1 binding sites in imprinting control regions. Genome Res. 16(7):901-11.

Kim J, Kollhoff A, Bergmann A, Stubbs L. (2003). Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. Hum Mol Genet. 12(3):233-45.

Klenova EM, Morse HC 3rd, Ohlsson R, Lobanenkov VV. (2002). The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. Semin Cancer Biol. 12(5):399-414.

Klenova EM, Nicolas RH, U S, Carne AF, Lee RE, Lobanenkov VV, Goodwin GH. (1997). Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. Nucleic Acids Res. 25(3):466-74.

Koch CM, Andrews RM, Flicek P, Dillon SC, Karaöz U, Clelland GK, Wilcox S, Beare DM, Fowler JC, Couttet P, James KD, Lefebvre GC, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Dhami P, Langford CF, Weng Z, Birney E, Carter NP, Vetrie D, Dunham I. (2007). The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. Genome Res. 17(6):691-707.

Kondo Y. (2009). Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. Yonsei Med J. 50(4):455-63.

Kotzot,D., Schmitt,S., Bernasconi,F., Robinson,W.P., Lurie,I.W., Ilyina,H., Mehes,K., Hamel,B.C., Otten,B.J., Hergersberg,M., and . (1995). Uniparental disomy 7 in Silver-Russelll syndrome and primordial growth retardation. Hum. Mol. Genet. 4, 583-587.

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

Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, Xia X, Jesneck J, Bracken AP, Silverman LB, Kutok JL, Kung AL, Armstrong SA. (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. Cancer Cell. 14(5):355-68.

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

L

Langer, D. (2008). Untersuchungen zur IGF2-Genregulation bei Störungen des genomischen Imprintings mittels quantitativer cDNA- und ChIP-Analyse. Diplomarbeit

Lee,M.P., DeBaun,M.R., Mitsuya,K., Galonek,H.L., Brandenburg,S., Oshimura,M., and Feinberg,A.P. (1999). Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 5203-5208.

Li M, Squire J, Shuman C, Fei YL, Atkin J, Pauli R, Smith A, Nishikawa J, Chitayat D, Weksberg R. (2001). Imprinting status of 11p15 genes in Beckwith-Wiedemann syndrome patients with CDKN1C mutations. Genomics. 74(3):370-6.

Li YM, Franklin G, Cui HM, Svensson K, He XB, Adam G, Ohlsson R, Pfeifer S. (1998). The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. J Biol Chem. 273(43):28247-52.

Li E, Bestor T, Jaenisch R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell 69:915-926.

Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, Lam W, Oley C, Cole T, Brueton LA, Reik W, Macdonald F, Maher ER. (2009). Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. Hum Reprod. 24(3):741-7.

Ling JQ, Li T, Hu JF, Vu TH, Chen HL, Qiu XW, Cherry AM, Hoffman AR. (2006). CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. Science. 312(5771):269-72.

Liu F, Roth RA. (1995). Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(22):10287-91.

Lobanenkov VV, Nicolas RH, Adler VV, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja AV, Goodwin GH. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. Oncogene 5(12):1743-53.

Lopes EC, Valls E, Figueroa ME, Mazur A, Meng FG, Chiosis G, Laird PW, Schreiber-Agus N, Greally JM, Prokhortchouk E, Melnick A. (2008). Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. Cancer Res. 68(18):7258-63.

Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M. (2006). A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. Cancer Res. 66(17):8342-6.

Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC 3rd, Lobanenkov VV. (2002). BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(10):6806-11.

Lui JC, Finkielstain GP, Barnes KM, Baron J. (2008). An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 295(1):R189-96.

M

Mackay DJ, Hahnemann JM, Boonen SE, Poerksen S, Bunyan DJ, White HE, Durston VJ, Thomas NS, Robinson DO, Shield JP, Clayton-Smith J, Temple IK. (2006). Epimutation of the TNDM locus and the Beckwith-Wiedemann syndrome centromeric locus in individuals with transient neonatal diabetes mellitus. Hum Genet. 119(1-2):179-84.

Mackay DJ, Coupe AM, Shield JP, Storr JN, Temple IK, Robinson DO. (2002). Relaxation of imprinted expression of ZAC and HYMAI in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. Hum Genet. 110(2):139-44.

Majumder P, Boss JM. (2010). CTCF controls expression and chromatin architecture of the human major histocompatibility complex class II locus. Mol Cell Biol. 30(17):4211-23.

Majumder P, Gomez JA, Chadwick BP, Boss JM. (2008). The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions. J Exp Med. 205(4):785-98.

Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. (2006). Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. Genes Dev. 20(10):1268-82.

McGrath J, und Solter D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes Cell 37 (1): 179-183

Mitsuya K, Meguro M, Lee MP, Katoh M, Schulz TC, Kugoh H, Yoshida MA, Niikawa N, Feinberg AP, Oshimura M. (1999). LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. Hum Mol Genet. 8(7):1209-17.

Miyoshi N, Kuroiwa Y, Kohda T, Shitara H, Yonekawa H, Kawabe T, Hasegawa H, Barton SC, Surani MA, Kaneko-Ishino T, Ishino F. (1998). Identification of the Meg1/Grb10 imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(3):1102-7.

Mocellin S, Provenzano M. (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. J Transl Med. 2(1):39.

Mohammad F, Pandey RR, Nagano T, Chakalova L, Mondal T, Fraser P, Kanduri C. (2008). Kcnq1ot1/Lit1 noncoding RNA mediates transcriptional silencing by targeting to the perinucleolar region. Mol Cell Biol. 28(11):3713-28.

Monahan K, Rudnick ND, Kehayova PD, Pauli F, Newberry KM, Myers RM, Maniatis T. (2012). Role of CCCTC binding factor (CTCF) and cohesin in the generation of single-cell diversity of protocadherin-α gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(23):9125-30.

Monk,D., Sanches,R., Arnaud,P., Apostolidou,S., Hills,F.A., Abu-Amero,S., Murrell,A., Friess,H., Reik,W., Stanier,P., Constancia,M., and Moore,G.E. (2006). Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. Hum. Mol. Genet. 15(8):1259-69.

Moore T, Constancia M, Zubair M, Bailleul B, Feil R, Sasaki H, Reik W. (1997). Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse Igf2. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(23):12509-14.

Moore,T. and Haig,D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. Trends Genet. 7, 45-49.

Murphy SK, Huang Z, Hoyo C. (2012). Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues. PLoS One. 7(7):e40924.

Murrell,A., Heeson,S., and Reik,W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. Nat. Genet. 36, 889-893.

N

Nakayashiki N, Kanetake J, Aoki Y. (2004). A parent-of-origin detectable polymorphism in the hypermethylated region upstream of the human H19 gene. Int J Legal Med. 118(3):158-62.

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

Nelson,J.D., Denisenko,O., Sova,P., and Bomsztyk,K. (2006). Fast chromatin immunoprecipitation assay. Nucleic Acids Res. 34, e2.

Netchine I, Rossignol S, Dufourg M, Azzi S, Rousseau A, Perin L, Houang M, Steunou V, Esteva B, Thibaud N, Demay MC, Danton F, Petriczko E, Bertrand A, Heinrichs C, Carel J, Loeuille GA, Pinto G, Jacquemont ML, Gicquel C, Cabrol S, Le Bouc Y. (2007). 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. J Clin Endocrinol Metab. 92(8):3148-54.

Nielsen FC, Christiansen J. (1995). Posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor II mRNA.Scand J Clin Lab Invest Suppl. 220:37-46.

Nielsen FC, Christiansen J. (1992). Endonucleolysis in the turnover of insulin-like growth factor II mRNA. J Biol Chem. 267(27):19404-11.

Niemitz,E.L., DeBaun,M.R., Fallon,J., Murakami,K., Kugoh,H., Oshimura,M., and Feinberg,A.P. (2004). Microdeletion of LIT1 in Familial Beckwith-Wiedemann Syndrome. Am. J. Hum. Genet. 75, 844-849.

Nishita Y, Yoshida I, Sado T, Takagi N. (1996). Genomic imprinting and chromosomal localization of the human MEST gene. Genomics. 36(3):539-42.

O

Ogden SR, Wroblewski LE, Weydig C, Romero-Gallo J, O'Brien DP, Israel DA, Krishna US, Fingleton B, Reynolds AB, Wessler S, Peek RM Jr. (2008). p120 and Kaiso regulate Helicobacter pylori-induced expression of matrix metalloproteinase-7. Mol Biol Cell. 19(10):4110-21.

Ohlsson R, Bartkuhn M, Renkawitz R. (2010). CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. Chromosoma. 119(4):351-60.

Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. Trends Genet. 17(9):520-7.

Okano M, Xie S, Li E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet. 19(3):219-20.

Okitsu CY, Hsieh CL. (2007). DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. Mol Cell Biol. 27(7):2746-57.

Onyango P, Feinberg AP. (2011). A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(40):16759-64.

Ooi S, Bestor T. (2008). Cytosine methylation: remaining faithful. Curr Biol 18:R174-176.

Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. Nature. 448(7154):714-7.

Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P. (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription.Nat Genet. 36(10):1065-71.

P

Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D, Kanduri C. (2008). Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. Mol Cell. 32(2):232-46.

Pant V, Mariano P, Kanduri C, Mattsson A, Lobanenkov V, Heuchel R, Ohlsson R. (2003). The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. Genes Dev. 17(5):586-90.

Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merkenschlager M (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. Cell. 132(3):422-33.

Phillips JE, Corces VG. (1991). CTCF: master weaver of the genome. Cell. 137(7):1194-211.

Poirier F, Chan CT, Timmons PM, Robertson EJ, Evans MJ, Rigby PW. (1991). The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. Development. 113(4):1105-14.

Poole RL, Leith DJ, Docherty LE, Shmela ME, Gicquel C, Splitt M, Temple IK, Mackay DJ. (2012). Beckwith-Wiedemann syndrome caused by maternally inherited mutation of an OCT-binding motif in the IGF2/H19-imprinting control region, ICR1. Eur J Hum Genet. 20(2):240-3.

Prawitt D, Enklaar T, Zabel B. (2010). Beckwith-Wiedemann-Syndrom. medgen 22:399–404

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

Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, Caballero IM, Salozhin S, Aithozhina D, Cerchietti L, Meng FG, Augenlicht LH, Mariadason JM, Hendrich B, Melnick A, Prokhortchouk E, Clarke A, Bird A. (2006). Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. Mol Cell Biol. 26(1):199-208.

Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. Genes Dev. 15(13):1613-8.

R

Rachmilewitz,J., Elkin,M., Rosensaft,J., Gelman-Kohan,Z., Ariel,I., Lustig,O., Schneider,T., Goshen,R., Biran,H., de Groot,N., and . (1995). H19 expression and tumorigenicity of choriocarcinoma derived cell lines. Oncogene 11, 863-870.

Reik,W. and Walter,J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat. Rev. Genet. 2, 21-32.

Richardson CJ, Bröenstrup M, Fingar DC, Jülich K, Ballif BA, Gygi S, Blenis J. (2004). SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. Curr Biol. 14(17):1540-9.

Riesewijk AM, Hu L, Schulz U, Tariverdian G, Höglund P, Kere J, Ropers HH, Kalscheuer VM. (1997). Monoallelic expression of human PEG1/MEST is paralleled by parent-specific methylation in fetuses. Genomics. 42(2):236-44.

Rodova M, Kelly KF, VanSaun M, Daniel JM, Werle MJ. (2004). Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. Mol Cell Biol. 24(16):7188-96.

Roepke TK, King EC, Reyna-Neyra A, Paroder M, Purtell K, Koba W, Fine E, Lerner DJ, Carrasco N, Abbott GW. (2009). Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. Nat Med. 15(10):1186-94.

Rossignol S, Steunou V, Chalas C, Kerjean A, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Jouannet P, Le Bouc Y, Gicquel C. (2006). The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. J Med Genet. 43(12):902-7.

Routh A, Sandin S, Rhodes D. (2008). Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(26):8872-7.

Rubio ED, Reiss DJ, Welcsh PL, Disteche CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(24):8309-14.

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(12):983-94.

Ruzov A, Savitskaya E, Hackett JA, Reddington JP, Prokhortchouk A, Madej MJ, Chekanov N, Li M, Dunican DS, Prokhortchouk E, Pennings S, Meehan RR. (2009). The non-methylated DNA-binding function of Kaiso is not required in early Xenopus laevis development. Development. 136(5):729-38.

S

Schaefer M, Lyko F. (2010). Solving the Dnmt2 enigma. Chromosoma. 119(1):35-40.

Schoenherr,C.J., Levorse,J.M., and Tilghman,S.M. (2003). CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. Nat. Genet. 33, 66-69.

Schönherr N., Meyer E., Roos A., Schmidt A., Wollmann H.A., Eggermann T. (2007). The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russelll syndrome. J Med Genet 44, 59-63.

Shin JY, Fitzpatrick GV, Higgins MJ. (2008). Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region. EMBO J. 27(1):168-78.

Shiura H, Nakamura K, Hikichi T, Hino T, Oda K, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Kaneko-ishino T, Ishino F. (2009). Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation. Hum Mol Genet. 18(8):1424-38.

Smilinich,N.J., Day,C.D., Fitzpatrick,G.V., Caldwell,G.M., Lossie,A.C., Cooper,P.R., Smallwood,A.C., Joyce,J.A., Schofield,P.N., Reik,W., Nicholls,R.D., Weksberg,R., Driscoll,D.J., Maher,E.R., Shows,T.B., and Higgins,M.J. (1999). A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 8064-8069.

Smith AC, Choufani S, Ferreira JC, Weksberg R. (2007). Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. Pediatr Res. 61(5 Pt 2):43R-47R.

Smith RJ, Dean W, Konfortova G, Kelsey G. (2003). Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. Genome Res. 13(4):558-69.

Smits G, Mungall AJ, Griffiths-Jones S, Smith P, Beury D, Matthews L, Rogers J, Pask AJ, Shaw G, VandeBerg JL, McCarrey JR; SAVOIR Consortium, Renfree MB, Reik W, Dunham I. (2008). Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians.Nat Genet. 40(8):971-6.

Sparago A., Russo S., Cerrato F., Ferraiuolo S., Castorina P., Selicorni A., Schwienbacher C., Negrini M., Ferrero G.B., Silengo M.C., Anichini C., Larizza L. and Riccio A. (2007). Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms´ tumour. Hum Mol Genet Vol16 No3, 254-264.

Sparago,A., Cerrato,F., Vernucci,M., Ferrero,G.B., Silengo,M.C., and Riccio,A. (2004). Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. Nat. Genet. 36(9):958-60.

Spengler S, Begemann M, Binder G, Eggermann T. (2010). Genetik und Epigenetik des Silver-Russell-Syndroms medgen 22:405–410

Spengler D, Villalba M, Hoffmann A, Pantaloni C, Houssami S, Bockaert J, Journot L. (1997). Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. EMBO J. 16, 2814–2825.

Splinter E, Heath H, Kooren J, Palstra RJ, Klous P, Grosveld F, Galjart N, de Laat W. (2006). CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. Genes Dev. 20(17):2349-54.

Spring,C.M., Kelly,K.F., O'Kelly,I., Graham,M., Crawford,H.C., and Daniel,J.M. (2005). The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. Exp. Cell Res. 305, 253-265.

Struhl, K. (2007). Interpreting Chromatin Immunoprecipitation Experiments. In Evaluating Techniques in Biochemical Research, D. Zuk,ed. (Cambridge, MA: Cell Press), http://www.cellpress.com/misc/page?page=ETBR.

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

Sussenbach JS, Rodenburg RJ, Scheper W, Holthuizen P. (1993). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the human IGF-II gene expression. Adv Exp Med Biol. 343:63-71.

T

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. EMBO J. 27(20):2681-90.

Takai,D., Gonzales,F.A., Tsai,Y.C., Thayer,M.J., and Jones,P.A. (2001). Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 Promotor and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. Hum. Mol. Genet. 10, 2619-2626.

Tamaru H, Selker EU. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa. Nature. 414(6861):277-83.

Tilghman,S.M., Bartolomei,M.S., Webber,A.L., Brunkow,M.E., Saam,J., Leighton,P.A., Pfeifer,K., and Zemel,S. (1993). Parental imprinting of the H19 and Igf2 genes in the mouse. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 58, 287-295.

Torrano V, Navascués J, Docquier F, Zhang R, Burke LJ, Chernukhin I, Farrar D, León J, Berciano MT, Renkawitz R, Klenova E, Lafarga M, Delgado MD. (2006). Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. J Cell Sci. 119(Pt 9):1746-59.

Torrano V, Chernukhin I, Docquier F, D'Arcy V, León J, Klenova E, Delgado MD. (2005). CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. J Biol Chem. 280(30):28152-61.

Tsang WP, Ng EK, Ng SS, Jin H, Yu J, Sung JJ, Kwok TT. (2010). Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. Carcinogenesis. 31(3):350-8.

U

Ulaner GA, Yang Y, Hu JF, Li T, Vu TH, Hoffman AR. (2003). CTCF binding at the insulin-like growth factor-II (IGF2)/H19 imprinting control region is insufficient to regulate IGF2/H19 expression in human tissues. Endocrinology. 144(10):4420-6.

Uribe-Lewis S, Woodfine K, Stojic L, Murrell A. (2011). Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. Expert Rev Mol Med. 13:e2.

V

van Roy FM, McCrea PD. (2005). A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? Nat Rev Cancer. 5(12):956-64.

Varrault A, Gueydan C, Delalbre A, Bellmann A, Houssami S, Aknin C, Severac D, Chotard L, Kahli M, Le Digarcher A, Pavlidis P, Journot L. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. Dev Cell. 11(5):711-22.

Varrault A, Ciani E, Apiou F, Bilanges B, Hoffmann A, Pantaloni C, Bockaert J, Spengler D, Journot L. (1998). hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(15):8835-40.

Vostrov AA, Quitschke WW. (1997). The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. J Biol Chem. 272(52):33353-9.

W

Waddington C. H. (1957). The strategy of genes. London: Allen & Unwin

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. Nat Genet. 12(1):17-23.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat Genet. Apr;39(4):457-66.

Weber R. (2006). Enhancer-Blocking durch Chromatinloop-Bildung? Diplomarbeit

Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. (2010). Beckwith-Wiedemann syndrome. Eur J Hum Genet. 18(1):8-14.

Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. Nature. 451(7180):796-801.

West,A.G., Gaszner,M., and Felsenfeld,G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. Genes Dev. 16, 271-288.

Widschwendter,M., Jiang,G., Woods,C., Muller,H.M., Fiegl,H., Goebel,G., Marth,C., Muller-Holzner,E., Zeimet,A.G., Laird,P.W., and Ehrlich,M. (2004). DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. Cancer Res. 64, 4472-4480.

Wilkin F, Paquette J, Ledru E, Hamelin C, Pollak M, Deal CL. (2000). H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels. Eur J Biochem. 267(13):4020-7.

Wilkins J.F, Haig D. (2003). What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. Nat. Rev. Genet. 4, 359–368

Wollmann HA, Kirchner T, Enders H, Preece MA, Ranke MB. (1995). Growth and symptoms in Silver-Russell syndrome: review on the basis of 386 patients. Eur J Pediatr. 154(12):958-68.

Wood,A.J. and Oakey,R.J. (2006). Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. PLoS Genet. 2, e147.

Y

Yan Y, Frisén J, Lee MH, Massagué J, Barbacid M. (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. Genes Dev. 11(8):973-83.

Yoon YS, Jeong S, Rong Q, Park KY, Chung JH, Pfeifer K. (2007). Analysis of the H19ICR insulator. Mol Cell Biol. 27(9):3499-510.

Yoon,H.G., Chan,D.W., Reynolds,A.B., Qin,J., and Wong,J. (2003). N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. Mol. Cell 12, 723-734.

Yoshihashi H, Maeyama K, Kosaki R, Ogata T, Tsukahara M, Goto Y, Hata J, Matsuo N, Smith RJ, Kosaki K. (2000). Imprinting of human GRB10 and its mutations in two patients with Russell-Silver syndrome. Am J Hum Genet. 67(2):476-82.

Yusufzai TM, Felsenfeld G. (2004a). The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(23):8620-4.

Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. (2004b). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. Mol Cell. 13(2):291-8.

Z

Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R. (1992). Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. Mol Cell Biol. 12(9):4230-41.

Zeng PY, Vakoc CR, Chen ZC, Blobel GA, Berger SL. (2006). In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation. Biotechniques. 41(6):694, 696, 698.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 302(1):1-12.

Zhang,P., Liegeois,N.J., Wong,C., Finegold,M., Hou,H., Thompson,J.C., Silverman,A., Harper,J.W., DePinho,R.A., and Elledge,S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. Nature 387, 151-158.

Zhang,Y., Shields,T., Crenshaw,T., Hao,Y., Moulton,T., and Tycko,B. (1993). Imprinting of human H19: allele-specific CpG methylation, loss of the active allele in Wilms tumor, and potential for somatic allele switching. Am. J. Hum. Genet. 53, 113-124.

Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölinder M, Göndör A, Mariano P, Wang S, Kanduri C, Lezcano M, Sandhu KS, Singh U, Pant V, Tiwari V, Kurukuti S, Ohlsson R. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. Nat Genet. 38(11):1341-7.

Zhao H, Dean A. (2004). An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. Nucleic Acids Res. 32(16):4903-19.

Zlatanova J, Caiafa P. (2009). CTCF and its protein partners: divide and rule? J Cell Sci. 122(Pt 9):1275-84.

7 Anhang

7.1 Datenanhang

Datenanhangsverzeichnis

Anhang 7-1 Expressionsanalyse von *MEST* bei uniparentalen Disomie-Fällen…… 144

Anhang 7-2 Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die Genexpression von *PLAGL1, GNAS*, *GRB10* und *PEG3* ……..……..... 144

Anhang 7-3 Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die Genexpression von *MEST* und *GNAS* ……. 145

Anhang 7-4 Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die Genexpression von *GNAS*, *GRB10* und *PEG3* …… 146

Anhang 7-1

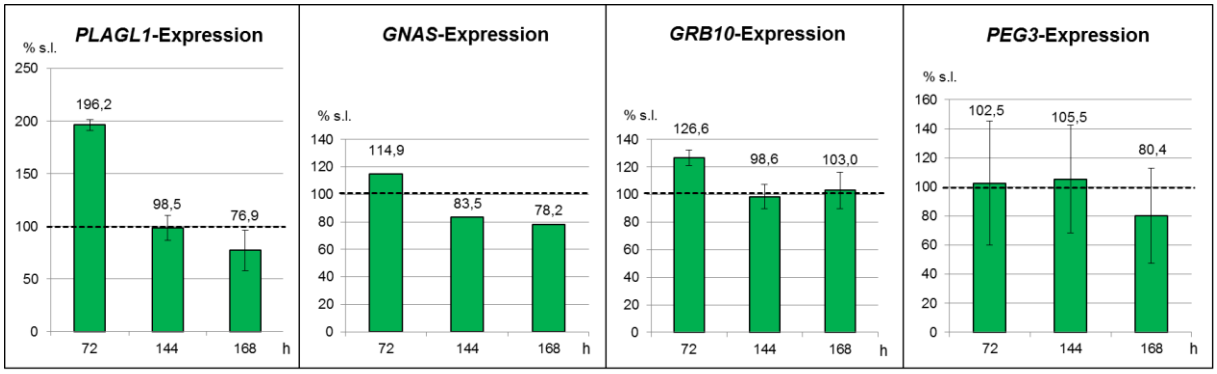
Expressionsanalyse von *MEST* bei uniparentalen Disomie-Fällen

Die Tabelle stellt die *MEST*-Expression bei gegensätzlichen uniparentalen Disomien von 11p15 dar. Die Werte stammen aus der zweiten von zwei Analysen der beiden Zelllinien. Bei dieser Analyse wurde keine Kontrollzelllinie untersucht, darüber hinaus unterscheidet sie sich von der ersten Analyse (**Abbildung 3-23** A) durch die Größe des Verhältniswerts zwischen den gegensätzlichen upds. Die Abweichung zwischen den Einzelwerten der quantitativen PCR ist als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

MEST-Expression

	Expression	SEM
upd-mat	7,24E-08	6E-08
upd-pat	1,13	0,014
x-fach	upd-pat **1,6E+07 fach** upd-mat	

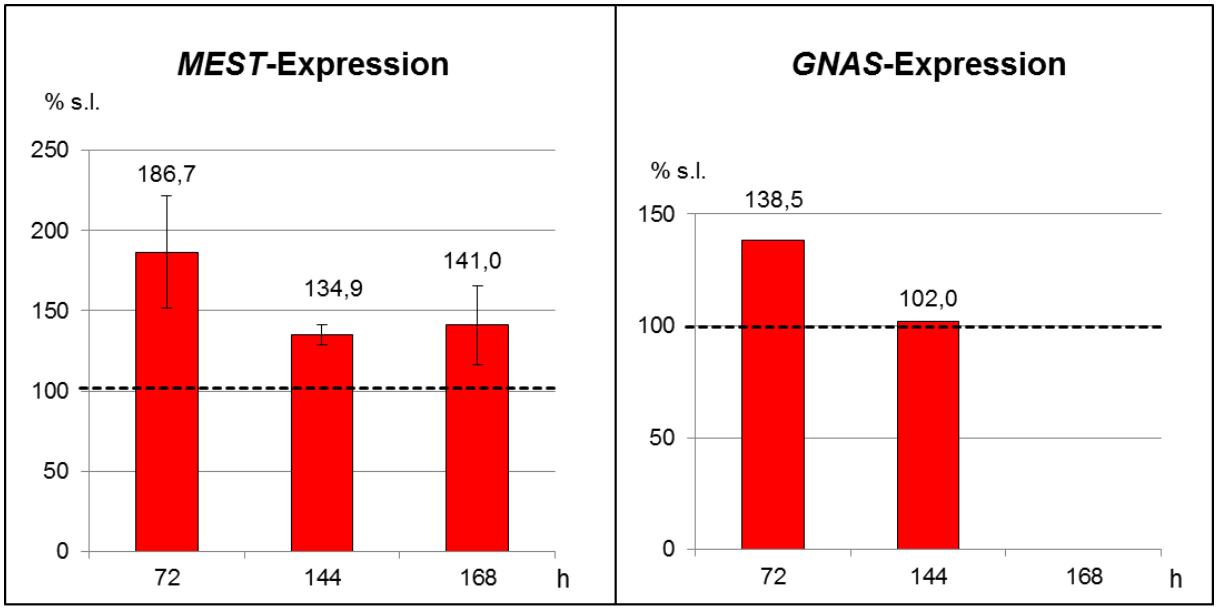
Anhang 7-2



Effekte des *CTCF-knockdowns* auf die Genexpression von *PLAGL1, GNAS*, *GRB10* und *PEG3*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* normalisierte RNA-Expression von *PLAGL1, GNAS, GRB10* und *PEG3* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Die Expression aller vier Gene unterscheidet sich nur unwesentlich (< zweifach und > 0,75-fach) von den relevanten *scrambled locus*-Werten. Die Daten basieren immer auf drei Einzelexperimenten mit Ausnahme von *GNAS,* das nur ein Mal analysiert wurde. Die Fehlerindikatoren stellen bei den mehrfach untersuchten Genen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

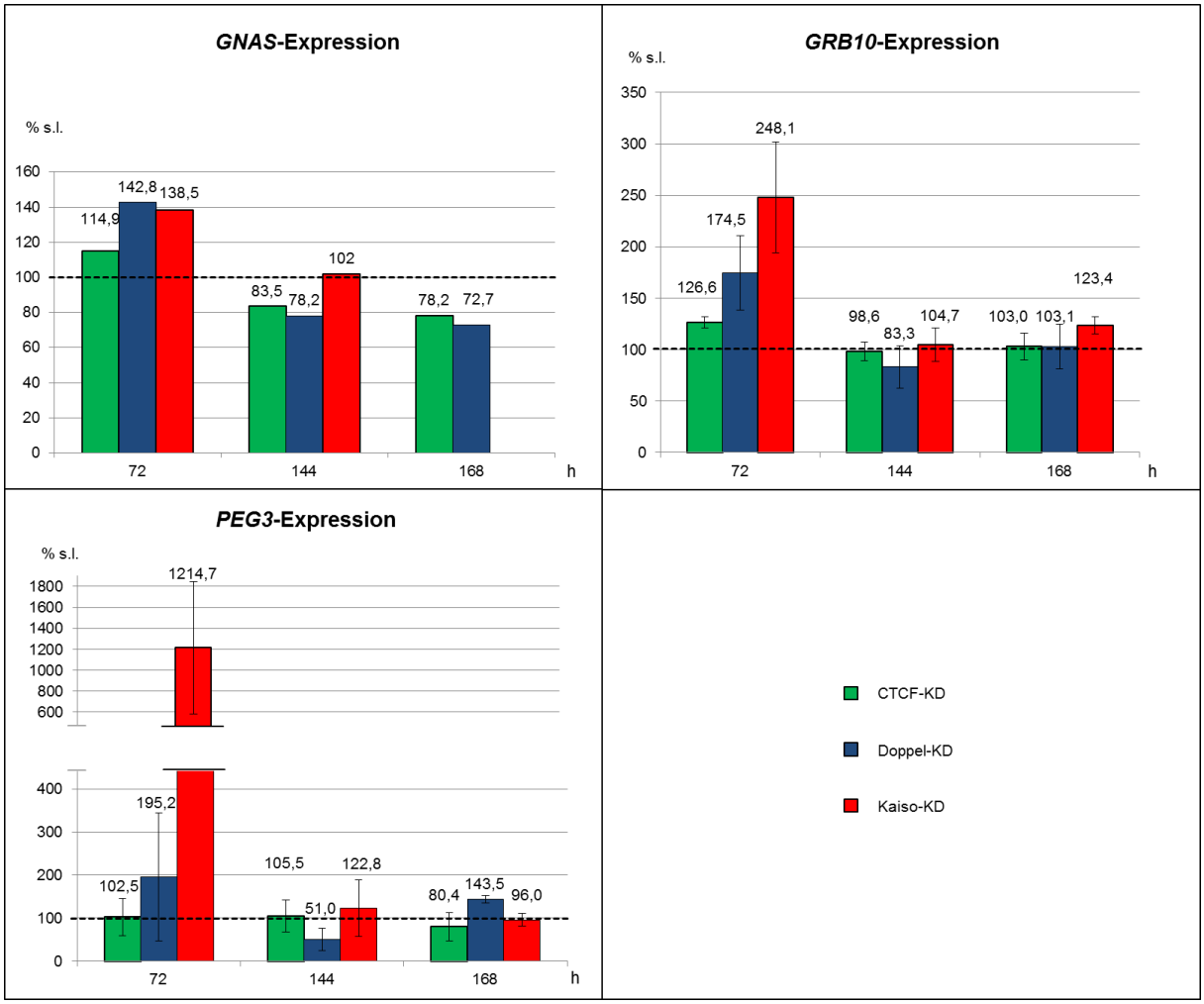
Anhang 7-3



Effekte des *Kaiso-knockdowns* auf die Genexpression von *MEST* und *GNAS*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* normalisierte RNA-Expression von *MEST* und *GNAS* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion als prozentualen Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.). Bei beiden Genen unterscheidet sich die Expression nur unwesentlich (max. < 1,9-fach) von den relevanten *scrambled locus*-Werten. Die beiden *GNAS*-Werte wurden ein Mal analysiert. Die *MEST*-Daten basieren auf vier Einzelexperimenten. Die Fehlerindikatoren stellen dabei den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Anhang 7-4



Effekte des Doppel-*knockdowns* auf die Genexpression von *GNAS*, *GRB10* und *PEG3*

Die Abbildung zeigt die auf Haushaltsgene *HPRT* und *PDH* normalisierte mRNA-Expression von *GNAS, GRB10* und *PEG3* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion mit *CTCF*- (grün) und *Kaiso*-siRNAs (rot) sowie für Ansätze, bei denen beide siRNAs gleichzeitig transfiziert wurden (blau). Die Expression ist als prozentualer Anteil von *scrambled locus*-Kontrollen (% s.l.) dargestellt. Die Expression aller drei Gene unterscheidet sich nur unwesentlich (< zweifach und > 0,5-fach) von den relevanten *scrambled locus*-Werten. Die *GNAS*-Expression wurde zu allen Zeitpunkten bei allen drei *knockdowns* ein Mal analysiert. Die Daten zu *GRB10* und *PEG3* basieren auf drei (Einzel-*knockdowns*) bzw. zwei (Doppel-*knockdowns*) Einzelexperimenten. Die Fehlerindikatoren stellen bei den mehrfach untersuchten Genen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

7.2 Publikationen

David Langer, Ursula Martiné, Claudia Simone Eider, Bernhard Zabel, Thorsten Enklaar and Dirk Prawitt - "Kaiso binding to the maternal H19/IGF2-ICR regulates imprinted gene expression in cis and trans"

Artikel - manuscript submitted

David Langer, Florian Bohne, Ursula Martiné, Konrad Oexle, Bernhard Zabel, Thorsten Enklaar, Dirk Prawitt - „Evidence for a functional human Network of Imprinted Genes"

Vortrag - Arbeitstagung Pädiatrische Forschung 2012, Hamburg

Daniel Siuda, Ulrich Zechner, Nady El Hajj, Dirk Prawitt, **David Langer**, Ning Xia, Sven Horke, Andrea Pautz, Hartmut Kleinert, Ulrich Förstermann, Huige Li - „Transcriptional regulation of Nox4 by histone deacetylases in human endothelial cells"

Artikel - Basic Res Cardiol (2012) 107:283

Martiné U., Rudloff C., **Langer D.**, Bohne F., Jessen W., Eider C., Bachmann N. , Bergmann C., Eggermann T., Zabel B., Enklaar T., Prawitt D. - "Detailed analysis of IGF2-isoforms in patients with imprinting defects"

Posterpräsentation - Gemeinsame Jahrestagung der European Society of Human Genetics und der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2012, Nürnberg

Langer D., Weber R., Martiné U., Zabel B.U., Enklaar T., Prawitt D. - „Structural aspects of CTCF-mediated imprinting regulation"

Posterpräsentation - ICC on Genomic Imprinting and beyond 2011, Barcelona

T. Enklaar, **D. Langer**, U. Martiné, B. Zabel, D. Prawitt - „Analysing allelespecific chromatin interactions"

Vortrag - FRIAS-Konferenz 2011, Freiburg

Langer D., Eider, C.S., Martiné U., Rudloff C., Pelletier, J., Enklaar T., Prawitt D. - „Analyzing driving forces for BWS and Wilms´ tumors"

Posterpräsentation - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011, Regensburg
Artikel - P-CancG-228 Medizinische Genetik 2011/1

Langer D., Weber R., Martiné U., Zabel B.U., Prawitt D., Enklaar T. - „CTS – Targets for imprinting control involved in BWS and SRS"

Posterpräsentation - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2010, Hamburg

Artikel - P-MoleG-201 Medizinische Genetik 2010/1

Langer, D., Ingenbrandt, C., Wildhardt, G., Zabel, B., Enklaar, T., Prawitt, D. - "Epigenetic influences on the origin of intrauterine growth defects"

Posterpräsentation - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2009, Aachen

Artikel - P240 Medizinische Genetik 2009/1

Langer. D. - „Untersuchungen zur IGF2-Genregulation bei Störungen des genomischen Imprintings mittels quantitativer cDNA- und ChIP-Analyse"

Diplomarbeit 2008