

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

Untersuchung des Einflusses der *Inc RNA H19* auf die CTCF-vermittelte Bindung von Cohesin an die DNA

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

Vorgelegt von

Jana Marie Schellenberger
aus Hanau

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

25.07.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung & Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion	3
Epigenetik und Imprinting	3
Beckwith-Wiedemann-Syndrom und Silver-Russel-Syndrom	6
Der <i>H19-IGF2</i> -Lokus und das <i>imprinted gene network</i> (IGN)	8
Das Strukturprotein Cohesin	10
Das Zinkfingerprotein CTCF	11
CTCF- und Cohesin-vermittelte Architektur des Chromatins	12
3. Material und Methoden	15
Zellkulturtechniken	15
3.1.1. Zelllinien	15
3.1.2. Kryokonservierung der Zellen	16
3.1.3. Anziehen von kryokonservierten Zellen	16
3.1.4. Kultivieren und Passagieren von Zellen	17
RNA-Standardmethoden	18
3.1.5. Isolation von RNA mit dem peqGOLD Total RNA Kit	18
3.1.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren	18
3.1.7. cDNA-Synthese	19
DNA-Standardmethoden	20
3.1.8. Quantitative Amplifikation von Nukleinsäuren (qPCR)	20
3.1.9. DNA-Aufreinigung	25
Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	26

3.1.10.	Fixierung des Chromatins	26
3.1.11.	Nukleuspräparation.....	26
3.1.12.	Scheren des Chromatins.....	27
3.1.13.	Fragmentlängenkontrolle.....	27
3.1.14.	Immunpräzipitation.....	28
Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegel		30
3.1.15.	Fragmentlängenkontrolle nach dem Scheren.....	30
3.1.16.	Überprüfung eines PCR-Produktes.....	31
Verwendete Materialien		32
3.1.17.	Chemikalien und Reagenzien	32
3.1.18.	Puffer und Lösungen	32
3.1.19.	Oligonukleotide	33
3.1.20.	Antikörper	34
3.1.21.	Enzyme und Nukleotide	34
3.1.22.	Kits	35
3.1.23.	Verbrauchsmaterialien.....	36
3.1.24.	Geräte.....	36
3.1.25.	Datenbanken	37
4.	Ergebnisse	39
Bindungsanalyse mithilfe der Chromatin-Immunopräzipitation		39
4.1.1.	Fragmentlängenkontrolle.....	39
4.1.2.	Auswahl der zu untersuchenden Regionen.....	40
4.1.3.	Schmelzkurve des qPCR-Produktes	41
4.1.4.	Produktüberprüfung mittels Agarosegel.....	42
4.1.5.	Bestimmung des %-Inputs sowie Einschlusskriterien	44
4.1.6.	Die beiden Antikörper RAD21 und SMC1.....	45
4.1.7.	Negative Bindungskontrolle mittels unspezifischem IgG.....	46
4.1.8.	Kontrollregionen OSBP und H19 ICR	48
4.1.9.	Auf den Input normalisierte PCR-Daten	50

4.1.10.	Normalisierung auf die Normalisierungsregionen MYC, STAT3 und SYN3	51
4.1.11.	Zusammengefasste, zweifach normalisierte Daten	53
Expressionsanalyse		59
4.1.12.	Normalisierung auf die ‚Haushaltsgene‘	59
4.1.13.	Produktüberprüfung mittels Agarosegel.....	61
4.1.14.	Relative Konzentrationsberechnungen durch CP-Differenzen.....	62
4.1.15.	Aktivitätsanalyse der Expressionsdaten.....	62
4.1.16.	Vergleichende Analyse der Expressions- und Cohesinbindungsdaten.....	63
4.1.17.	H19- und IGF2-Status der Zellen	66
5.	Diskussion.....	69
Methodische Beurteilung der Chromatin-Immunopräzipitation und der Expressionsanalyse		69
5.1.1.	Spezifität der Antikörperbindung.....	69
5.1.2.	Beurteilung der CHIP-Effizienz.....	72
5.1.3.	Reproduzierbarkeit der Daten.....	74
5.1.4.	Beurteilung der Expressionsanalyse.....	75
5.1.5.	Vergleich zwischen quantitativer PCR und Sequenzierung der CHIP	75
Bedeutung der H19-Expression für die Cohesin- und CTCF-Bindung		78
5.1.6.	H19 – Expressionsstatus.....	78
5.1.7.	CTCF-Bindestellen (CTS) des H19/IGF2-Lokus	80
5.1.8.	CTCF-Bindestelle nahe ZDBF2	81
5.1.9.	CTCF-Bindestelle nahe IGF2R	82
Ausblick.....		84
6.	Zusammenfassung.....	85
Literaturverzeichnis		I
7.	Anhang.....	IX
Unnormalisierte Daten		IX
Normalisierte Daten, aufgeschlüsselt nach den drei Läufen		XI
Danksagung..... Fehler! Textmarke nicht definiert.		

Tabellarischer Lebenslauf **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Beckwith-Wiedemann-Syndrom und Silver-Russel-Syndrom.....	7
Tab. 2.2: Mutationsspektren des Beckwith-Wiedemann-Syndroms und des Silver-Russel-Syndroms	7
Tab. 3.1: Information zu den verwendeten Zelllinien	15
Tab. 3.2: Zelllinien und ihre Kulturbedingungen	16
Tab. 3.3: KulturgefäÙe für die Zellkultur	17
Tab. 3.4: Programmablauf der cDNA-Synthese im Thermo-Cycler	20
Tab. 3.5: Zusammensetzung des PCR-Mastermix	24
Tab. 3.6: LightCycler Programm.....	25
Tab. 3.7: Zusammensetzung der Puffer für die Nukleuspräparation	26
Tab. 3.8: Einstellungen des UltraschallgeräÙs.....	27
Tab. 3.9: Zusammensetzung der Waschpuffer der ChIP.....	29
Tab. 3.10: Primer für die quantitative PCR des ChIP-Pulldowns	33
Tab. 3.11: Primer zur Expressionsanalyse	33
Tab. 3.12: verwendete Antikörper bei der Chromatin-Immunopräzipitation	34
Tab. 4.1: Auswirkung der geringen Primer-Dimermengen auf die Konzentration	42
Tab. 4.2: Sauberkeit der PCR-Produkte	44
Tab. 4.3: Antikörpernutzung für Zellen und Durchläufe	45
Tab. 4.4: Nicht unerhebliche IgG-Pulldowns.....	48
Tab. 4.5: relative Konzentration der Expressionsanalyse der 'Haushaltsgene'.....	60
Tab. 4.6: Vergleich der Produktlängen der Expressionsprimer.....	62
Tab. 5.1 : Anzahl hoher IgG-Werte	70

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Genomisches Imprinting.....	4
Abb. 2.2: Vier molekulare Mechanismen, die zu Imprinting-Erkrankungen führen können.....	5
Abb. 2.3: CTCF-Bindestellen und räumliche Struktur des <i>H19/IGF2</i> -Locus	8
Abb. 2.4: Das IGN in der Maus.....	10
Abb. 2.5: Aufbau des menschlichen Cohesins	11
Abb. 2.6: Schematischer Aufbau von TADs	13
Abb. 2.7: Model zur Loop-Formung durch CTCF und Cohesin.....	14
Abb. 3.1: Typisches Nukleinsäurespektrum des Nanodrops	19
Abb. 3.2: Wirkungsweise des interkalierenden Farbstoffs <i>SYBR Green</i>	21
Abb. 3.3: Die drei Phasen der PCR.....	21
Abb. 3.4: Entstehung der Eichgeraden aus der Standardreihe.....	22
Abb. 3.5: Verschiedene Schmelzkurven.....	23
Abb. 3.6: Schematischer Aufbau des ChIP-Komplexes.....	28
Abb. 4.1: Fragmentlängenkontrolle bei BWS Δ H19/ICR1 im 3. Durchlauf.....	40
Abb. 4.2: Gelbild der ChIP-Produkte	43
Abb. 4.3: Berechnung des %-Inputs.....	44
Abb. 4.4: Die Antikörper im Vergleich; <i>SYN3</i> , <i>STAT3</i> und <i>MYC</i> , 1. Durchlauf	46
Abb. 4.5: IgG-Bindung am Beispiel von <i>ZDBF2</i>	47
Abb. 4.6: Verteilung des IgG-Anteils am Anti-Cohesin-Pulldown.....	48
Abb. 4.7: Negativkontrolle <i>OSBP</i> und Positivkontrolle <i>H19 ICR</i>	49
Abb. 4.8: Anti-Cohesin-Pulldown von <i>IGF2R CTS2</i>	50
Abb. 4.9: Normalisierungsgene <i>SYN3</i> , <i>STAT3</i> und <i>MYC</i>	52
Abb. 4.10: Normalisierungsgrundlage: Geometrisches Mittel von <i>SYN3</i> , <i>STAT3</i> und <i>MYC</i>	52
Abb. 4.11: Bindungsanalyse <i>CTCF AD</i>	53
Abb. 4.12: Bindungsanalyse <i>CCD</i>	54
Abb. 4.13: Bindungsanalyse <i>CCD1 KW</i>	54
Abb. 4.14: Bindungsanalyse <i>CTCF DS</i>	55
Abb. 4.15: Bindungsanalyse <i>H19 ICR</i>	55
Abb. 4.16: Bindungsanalyse <i>ZDBF2</i>	56
Abb. 4.17: Bindungsanalyse <i>IGF2R CTS1</i>	57
Abb. 4.18: Bindungsanalyse <i>IGF2R CTS2</i>	58

Abb. 4.19: relative Konzentration der Expressionsanalyse der 'Haushaltsgene'	60
Abb. 4.20: Gelbild der Produkte der Expressionsanalyse.....	61
Abb. 4.21: Formel zur Berechnung der HB2-unabhängigen Konzentration X.....	62
Abb. 4.22: Vergleichende Aktivitätsanalyse anhand der Expressionsdaten	63
Abb. 4.23: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von <i>IGF2R CTS2</i>	64
Abb. 4.24: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von <i>STAT3</i>	65
Abb. 4.25: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von <i>MYC</i>	65
Abb. 4.26: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von <i>OSBP</i>	66
Abb. 4.27: Expressionsstatus <i>H19</i>	67
Abb. 4.28: Expressionsstatus <i>IGF2</i>	67
Abb. 5.1: CTCF-Peaks der Kontrollregionen	73
Abb. 5.2: Deletion der BWS Δ H19/ICR1 Zellen	78

Abkürzungsverzeichnis

#	Chromosom
bp	Basenpaare
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CP	<i>Crossing Point</i>
CpG-Dinukleotid	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid
CTS	<i>CTCF binding site</i> , CTCF-Bindestelle
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMR	Differentiell methylierte Region
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	<i>double strand DNA</i> , doppelsträngige DNA
e.o.e.-Gerät	<i>end over end</i> -Gerät
eRNA	<i>enhancer RNA</i>
ICR	<i>imprinting control region</i> , Imprintingzentrum
kb	Kilobase (1.000bp)
lncRNA	Lange nicht kodierende RNA
Mat.	Maternal
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> , multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation
NaPy	Natrium-Pyruvat
Pat.	Paternal
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin und StreptoMYCin
qPCR	quantitative PCR
RPMI	am ‚Roswell Park Memorial Institute‘ entwickeltes Medium
SRS	Silver-Russel-Syndrom
TADs	<i>topologically associating domains</i> , räumlich assoziierte Domänen
TSSs	<i>transcription start sites</i>
UPD	Uniparentale Disomie

1. Einleitung & Ziel der Dissertation

Das Silver-Russel-Syndrom (SRS) und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) sind seltene, konnatale Imprinting-Erkrankungen. Man vermutet, dass sie auf eine Dysregulation von embryonalen Wachstumsfaktoren zurückzuführen sind, da ein Ungleichgewicht in der Gendosis von *H19* und *IGF2* beobachtet wurde. Diese beiden Gene liegen in einem von zwei mit den Syndromen assoziierten Imprinting-Clustern, auf Chromosom 11, p15.5. Die gemeinsame *imprinting control region* (ICR) ist eine differentiell methylierte Region (DMR), d.h. sie ist in diesem Fall auf dem väterlichen Allel methyliert, während das mütterliche Allel weitestgehend unmethyliert vorliegt. Die unmethylierte ICR kann als Bindestelle für das Zinkfingerprotein CTCF fungieren, welches neben anderen auch das Protein Cohesin binden kann. Die Cohesinmoleküle lagern sich zu Heterodimeren zusammen, wodurch sich die Chromatinarchitektur der Region so verändert, sodass nur *H19* abgelesen wird [Nativio *et al.* 2009].

SRS und BWS gelten jedoch als multifaktorielle Erkrankungen, da ein Netzwerk aus Genen (*imprinted gene network*, IGN) einen Einfluss auf die Expression von *H19* und *IGF2* hat. Doch auch *H19* und *IGF2* sind wiederum wichtige Akteure im IGN, sodass eine Depletion eines der beiden Gene die Expression mehrerer weiterer Gene beeinflusst [Patten *et al.* 2016]. Doch die Aufgaben und Wirkungsweise von *H19* sind erst in Ansätzen aufgeklärt. Bekannt ist, dass *H19* in verschiedenen Riboproteinkomplexen arbeitet und so z.B. durch Mitarbeit an der Histonmodifikation, die Expression beeinflussen kann [Koch 2016, Westeppe 2019, Gabory *et al.* 2010, Luo *et al.* 2013, Monnier *et al.* 2013].

Die Gruppe von Sartorelli hat 2018 gezeigt, dass die enhancer-RNA (eRNA) von Myogenin eine wichtige Rolle in der Positionierung von Cohesin spielt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu klären, ob die lncRNA *H19* ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung des Proteins Cohesin an bestimmte Abschnitte der DNA hat.

Dazu wurde die Bindung des Proteins mithilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und anschließender quantitativer PCR (qPCR) analysiert. Das gebundene Cohesin wird dabei an der DNA fixiert und diese dann zufällig fragmentiert. Anschließend wurden mithilfe von zwei Antikörpern gegen zwei unterschiedliche Untereinheiten des Cohesins, die Cohesin-gebundenen Fragmente herausgefiltert. Ausgewählte DNA-Abschnitte wurden anschließend mittels qPCR der aufgereinigten Fragmente quantifiziert.

Um den Einfluss von *H19* zu untersuchen, wurde die ChIP vergleichend an Zellen, die kein *H19* exprimieren, und an Zelllinien, die *H19* in unterschiedlichem Maß exprimieren, durchgeführt.

Außerdem sollte untersucht werden, ob die Bindungsstärke des Cohesins mit der Expression der benachbarten Gene korreliert. Dazu wurde RNA aus den entsprechenden Zellen isoliert, in doppelsträngige cDNA (*complementary DNA*) überschrieben und mit Hilfe transkriptspezifischer Oligonukleotide in einer qPCR quantifiziert. Die so festgestellten Expressionsmuster sollen zusammen mit der ermittelten Cohesin-Bindung helfen, Hinweise für einen Einfluss der lncRNA *H19* auf die Regulation anderer Gene zu geben.

2. Literaturdiskussion

Epigenetik und Imprinting

Die Epigenetik beschreibt die vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst abgebildet werden [Egger et al. 2004]. Dabei handelt es sich meist um Vorgänge, die die Erreichbarkeit von Gene beeinflussen können. Sie ist somit die Verbindung zwischen dem Genotyp - der in der DNA-Sequenz codiert ist - und dem Phänotyp - der Ausprägung der Gene. Die wohl bekanntesten Beispiele sind die DNA-Methylierung und die Histonmodifikation.

Bei der Histonmodifikation werden die Histone- die Proteine, auf denen die DNA aufgerollt ist- an Seitengruppen chemisch verändert. Bei einer Acetylierung beispielsweise wird die Chromatinstruktur aufgrund der gleichen negativen Ladung von Acetylgruppe und DNA aufgelockert und DNA-Bereiche für die Transkription zugänglich gemacht.

Die differenzielle DNA-Methylierung erfolgt meist an einer Cytosin-Base, auf die ein Guanin folgt; man nennt diese Folge auch CpG-Nukleotid (Cytosin-phosphatidyl-Guanin). Hypermethylierte Regionen sind schlechter zugänglich für Transkriptionsfaktoren, sodass geprägte Gene meist inaktiviert werden.

Das **genomische Imprinting**, auch genomische Prägung genannt, beruht auf der DNA-Methylierung. Hierbei ist das Methylierungsmuster abhängig von der elterlichen Herkunft des Chromosoms. Je eine Kopie trägt das väterlich, die andere das mütterliche Imprintingmuster, sodass bestimmte Gene physiologisch nur von einer Genkopie abgelesen werden (*parent of origin*-Effekt). Das Imprintingmuster entsteht während der Gametogenese, wobei zuerst das eigene Muster gelöscht und danach geschlechtsspezifisch neu geprägt wird. (siehe Abb. 2.1), welches dann an die Nachkommen weitergeben wird.

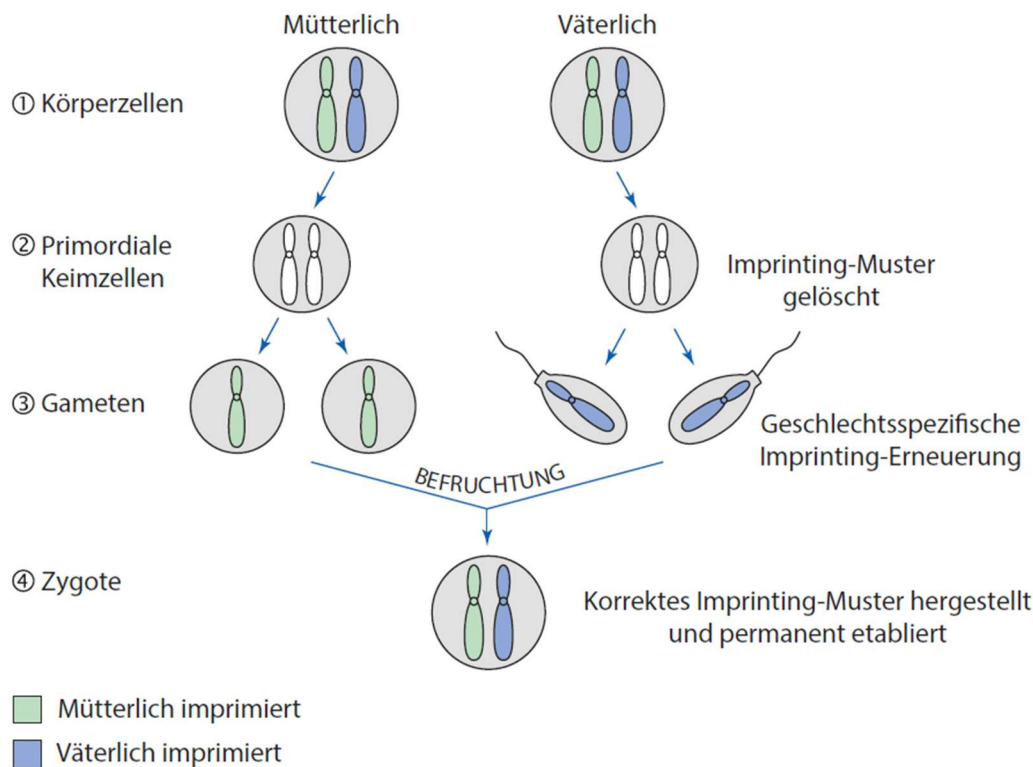


Abb. 2.1: Genomisches Imprinting

1.) Unsere Körperzellen enthalten alle einen diploiden Chromosomensatz, von dem jeweils ein Chromosom von der Mutter und eines vom Vater stammt. 2.) Während der Keimzellentwicklung wird das ursprüngliche Imprintingmuster gelöscht. 3.) Dieses wird dann in den Gameten geschlechtsentsprechend neu geprägt, sodass sich nach der Befruchtung in der Zygote wieder eine mütterlich und eine väterlich geprägte Kopie befinden.

[aus: Schaaf und Zschocke 2018]

Zum momentanen Zeitpunkt sind im Menschen mehr als 40 imprintete Genregionen beschrieben [Mackay und Temple 2017]. Die meisten davon sind in sogenannten *Imprinting-Clustern* organisiert, sodass ein Imprintingzentrum (*imprinting control region, ICR*) die Expression mehrerer Gene reguliert [Edwards und Ferguson-Smith 2007]. Die ICR ist auf den beiden elterlichen Kopien differentiell methyliert; das heißt, ist sie auf dem mütterlichen Allel unmethyliert, so ist sie auf dem väterlichen Allel geprägt und dadurch ausgeschaltet.

Für die **evolutionäre Entstehung** werden verschiedene Theorien diskutiert:

Die *kinship*-Theorie (auch Eltern-Konflikt Theorie), die erstmals 2000 von Haig postuliert wurde, deckt sich mit vielen Imprinting-Clustern, in denen mütterlich imprintete Gene das fetale Wachstum hemmen und väterliche es fördern [Patten *et al.* 2016]. Sie führt die Entwicklung des Imprintings auf den Interessenkonflikt zwischen Vater und Mutter zurück: Während die genetische Fitness des Vaters steigt, je größer und kräftiger seine Nachkommen sind, muss die Mutter mit ihren eigenen Ressourcen haushalten.

Da sich nicht alle Imprintingmuster über die *kinship*-Theorie erklären lassen, haben Wolf und Hager 2006 eine weitere Theorie aufgestellt: die Koadaptions-Theorie (engl.: *maternal-offspring coadaptation theory*). Diese geht davon aus, dass sich über die Evolution hinweg die Gene durchgesetzt haben, bei denen maternale und kindliche Phänotypen gut zusammenpassen, die sich also koadaptiert haben. Dies geschah bevorzugt bei den mütterlich imprinteten Genen [Wolf und Hager 2006].

Das Imprinting sorgt dafür, dass das für die normale, embryonale Entwicklung notwendige Gleichgewicht der Gendosen hergestellt wird [Patten *et al.* 2016]. Da nur jeweils eine Kopie des Gens aktiv ist, ist dieses Gleichgewicht aber auch sehr anfällig für Mutationen und andere genomische Fehler, weil diese nicht kompensiert werden können [Jirtle und Weidman 2007]. So können zum Beispiel durch eine uniparentale Disomie (UPD) oder eine Hypo- oder Hypermethylierung der betreffenden ICR Krankheiten, wie das Beckwith-Wiedemann-Syndrom oder das Silver-Russel-Syndrom entstehen.

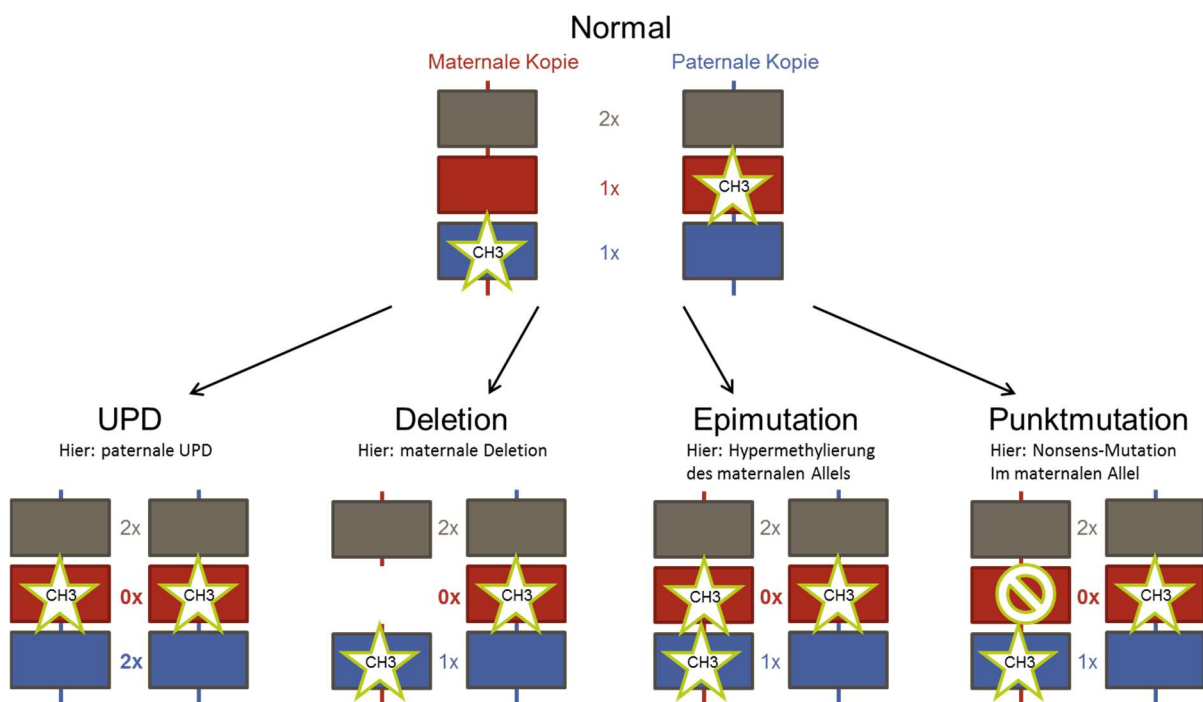


Abb. 2.2: Vier molekulare Mechanismen, die zu Imprinting-Erkrankungen führen können

Grau: nicht imprintetes Gen, rot: mütterlich exprimiertes Gen, blau: väterlich exprimiertes Gen, Stern (CH3): Methylierung

1) Kommt es während der Gametogenese zu Fehlverteilungen der Chromosomen auf die einzelnen Gameten, können sie keine oder zwei Kopien eines Chromosoms enthalten. Wird nach der Befruchtung bei drei Homologen das singuläre Chromosom im ‚*trisomy rescue*‘ (‚Trisomierettung‘) eliminiert, oder bei nur einem Homologen verdoppelt, entsteht eine Zygote mit zwei komplett identischen Chromosomen: eine Uniparentale Disomie (UPD). Befinden sich imprintete Gene auf diesem Chromosom, sind sie entweder auf beiden oder auf keinem Allel methyliert. 2) Kommt es im Bereich des unmethylierten, aktiven Allels zu einer Deletion, fehlt die Möglichkeit des Ausgleichs, da das

verbleibende Gen inaktiviert ist. 3) Wird das ursprünglich aktive Gen hypermethyliert, kann es somit ebenfalls komplett ausgeschaltet werden. 4) Auch eine Punktmutation im aktiven Gen führt zum Ausfall der Expression des betroffenen Gens.

Alle Veränderungen führen dazu, dass sich das Gleichgewicht der Genexpression verschiebt, wodurch sich die entsprechenden Krankheiten entwickeln.

[nach Eggermann *et al.* 2013]

Beckwith-Wiedemann-Syndrom und Silver-Russel-Syndrom

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und das Silver-Russel-Syndrom (SRS) sind konnatale Imprinting-Erkrankungen, die - mit einer Inzidenz von BWS:1:13.700 und SRS:>400 berichtete Fälle - zu den seltenen Syndromen zählen.

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) wurde erstmals 1963/64 von J. Bruce Beckwith und Hans-Rudolf Wiedemann beschrieben und geht klinisch klassischerweise mit spätfetalem und infantilem Großwuchs, einer vergrößerten Zunge (Makroglossie) und Bauchwanddefekten (z.B. Omphalozele) einher. Außerdem ist das Risiko für benigne und maligne Tumore, vor allem für Wilmstumore und Hepatoblastome, auf ca. 7,5% (Overall-Risiko: 4-21%) erhöht. Circa 30-50% der betroffenen Kinder leiden an Hypoglykämie aufgrund einer Inselzellhyperplasie oder eines Hyperinsulinismus [Weksberg *et al.* 2010]. In 80% der Fälle findet man Veränderungen in der Region 11p15.5, in der zwei Imprinting-Cluster vorliegen [Elbracht *et al.* 2018]. Die telomerisch liegende ICR1 reguliert die Expression des Wachstumsfaktors *IGF2* und der langen nicht kodierenden RNA (lncRNA) *H19*, während die ICR2 den Zellzyklusinhibitor *CDKN1C* und die lncRNA *KCNQ1OT1* reguliert.

Das Silver-Russel-Syndrom, welches erstmals 1953/54 von Alexander Silver und Henry Russel beschrieben wurde, bietet in vielen Gesichtspunkten ein spiegelartiges Bild zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom. Klinisch imponieren diese Kinder mit Wachstumsretardierungen, einem dreieckig wirkenden Kopf und einer Körperhälftenasymmetrie. Als molekulare Ursache stehen viele Chromosomen, vor allem aber Chromosom 11 und 7, im Verdacht, beteiligt zu sein, obwohl in circa 40% der Fälle die Ursache gänzlich ungeklärt ist [Ishida 2016]. Neben der Cluster auf Chromosom 11p15.5 ist besonders die Region 32.2 auf dem langen Arm des Chromosoms 7 mit dem Imprinting-Cluster für die Gene *MEST*, *COPG2* und *CPA4* von Bedeutung.

Tab. 2.1: Beckwith-Wiedemann-Syndrom und Silver-Russel-Syndrom[nach Eggermann *et al.* 2014, Weksberg 2010, Ishida 2016]

	Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS)	Silver-Russel-Syndrom
Inzidenz	1: 13.700 – 17.000	Nicht genau bekannt, >400 berichtete Fälle
Auftreten	Meist sporadisch, in einigen Fällen familiäre Häufung	Meist sporadisch
Klinischer Phänotyp	Gigantismus, Makroglossie, Bauchwanddefekte (Omphalozele), Viszeromegalie, Herz- und Nierenmalformationen, Tumorrisiko, Hypoglykämie, Hemihyperplasie, Nävus flameus	Intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung, relative Makrozephalie und Mikrognathie mit daraus resultierendem dreieckig erscheinendem Gesichtsschädel, Körperasymmetrien, Fingeranomalien

Tab. 2.2: Mutationsspektren des Beckwith-Wiedemann-Syndroms und des Silver-Russel-Syndroms

Sowohl BWS als auch SRS sind nicht ausschließlich auf eine spezifische Mutation zurückzuführen.

UPD= Uniparentale Disomie, Pat.=Paternal, Mat.=Maternal, #=Chromosom

[nach Eggermann *et al.* 2014, Eggermann *et al.* 2011, Merz 2015]

	Betroffene Region	Art der Mutation	Inzidenz
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	#11p15.5	Pat. UPD	20-25%
		Pat. Duplikation	1-2%
	#11, ICR1 (<i>H19/IGF2</i>)	Hypermethylierung	5-10%
		Mikrodeletionen	<1%
	#11, ICR2 (<i>KCNQ1</i>)	Hypomethylierung	50-60%
		Mikrodeletion	<1%
	CDKN1C	Punktmutation	1,3-5%
Silver-Russel-Syndrom	Chromosom 7q32.2	Mat. UPD	4-10%
	Chromosom 11p15.5	Mat. Duplikation	<1%
		Mat. UPD	<1%
	#11, ICR1 (<i>H19/IGF2</i>)	Hypomethylierung	40-50%
	Multilokale Imprinting-Anomalien		

Der *H19-IGF2*-Lokus und das *imprinted gene network* (IGN)

Ein Imprintingcluster, das für BWS und SRS von großer Bedeutung zu sein scheint, ist das *H19/IGF2*-Cluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15.5) [Nativio *et al.* 2011]. Hier werden die beiden Gene *H19* und *IGF2* über ein gemeinsames Imprintingzentrum (*imprinting control region*, ICR) in ihrer Expression reguliert. Dieses ist differenziell methyliert; das heißt, das väterliche Homolog trägt verstärkte Methylierungen im Bereich der ICR, während die mütterliche Kopie weitestgehend unmethyliert vorliegt. Die unmethylierte ICR kann als Bindestelle für einen Proteinkomplex aus dem Zinkfingerprotein CTCF und dem Strukturprotein Cohesin dienen, welche sich mit den anderen konstitutiv gebundenen CTCF-Cohesinkomplexen zusammenlagern und so die räumliche Chromatinstruktur beeinflussen (siehe Abb. 2.3) [Nativio *et al.* 2009].

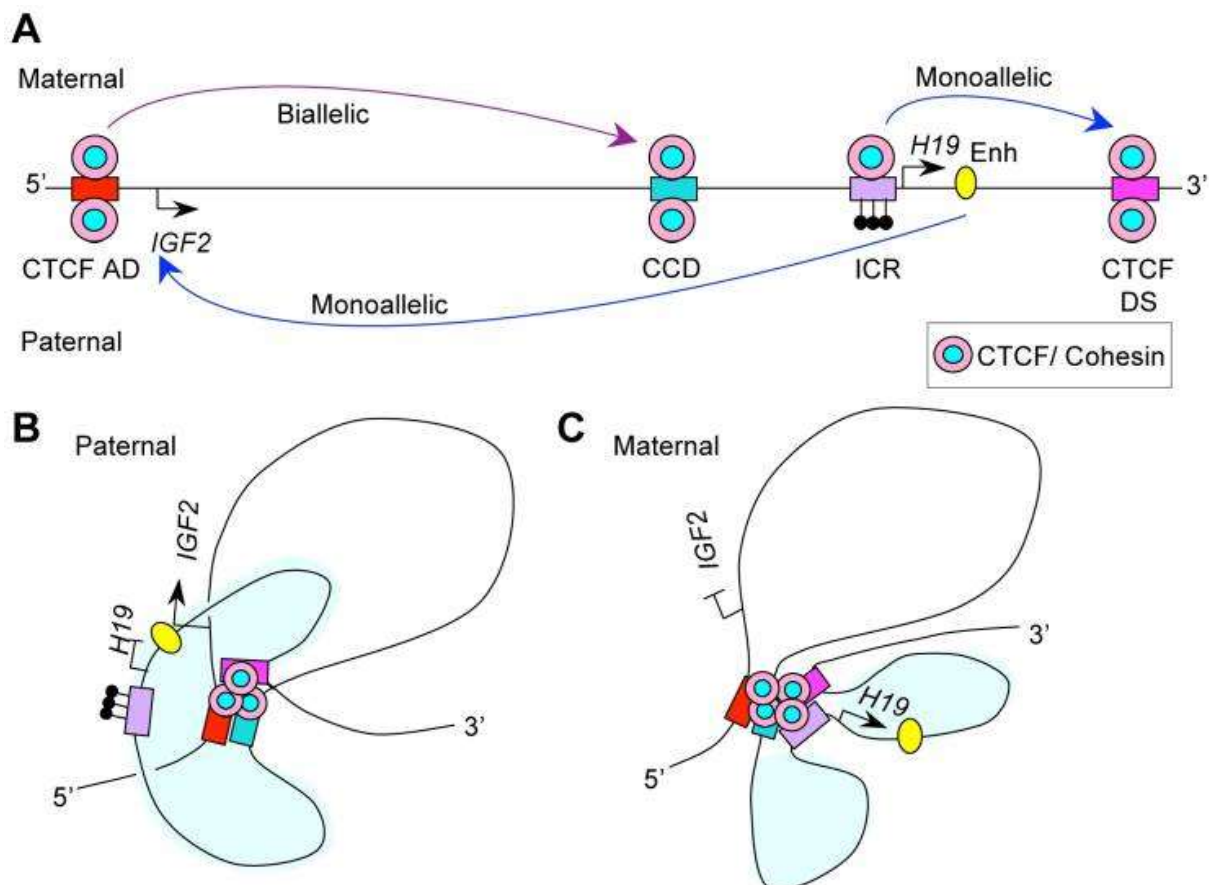


Abb. 2.3: CTCF-Bindestellen und räumliche Struktur des *H19/IGF2*-Locus

A) Im *H19/IGF2*-Locus befinden sich vier CTCF-Bindestellen. *CTCF AD*, *CCD* und *CTCF DS* sind konstitutiv gebunden, während die CTCF-Bindung im Bereich der ICR von deren Methylierungsstatus abhängig ist. An der methylierten, väterlichen ICR kann kein CTCF binden. B) Die Zusammenlagerung der drei anderen gebundenen CTCF-Cohesin-Moleküle bringt den *Enhancer* (Enh, gelb) in räumliche Nähe des *IGF2*-Promotors, sodass *IGF2* exprimiert werden kann. C) Ist die ICR unmethyliert, fungiert der dort gebundene CTCF-Cohesinkomplex als Isolator, sodass nur *H19* abgelesen wird. [aus Nativio *et al.* 2009]

H19 ist ein 2.660 bp-langes Gen, welches sich aus fünf Exons mit kurzen Introns zusammensetzt. Abgelesen wird es vor allem in meso und endodermal entstammenden Zellen und ausschließlich vom mütterlichen Allel, da dort die ICR unmethyliert vorliegt.

Es prozessiert die 2,3 kb lange nicht-kodierende RNA *H19* (lncRNA *H19*), welche vor allem zytosolisch vorliegen soll und eine microRNA, die *miRNA-675*, die dem ersten Exon der *H19*-RNA entspricht. Erstere wird während der Embryogenese stark exprimiert und nachgeburtlich auf ein Minimum herunterreguliert. [Gabory *et al.* 2010, Yoshimura *et al.* 2018].

Obwohl *H19* eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung zu spielen scheint, sind Individuen ohne *H19* – sowohl BWS-Patienten als auch *Knockout*-Mäuse – voll lebensfähig. Jedoch weisen beide unter anderem ein erhöhtes Risiko für embryonale Tumore auf. Daher wird eine tumorsuppressive Rolle von *H19*, vor allem bei der Initialisierung, diskutiert [Rump *et al.* 2005, Gabory *et al.* 2010]. Auf molekularer Ebene werden beim *Knockout* mindestens sechs weitere Gene in ihrer Expression beeinflusst. Diese Gene sind durch ein Netzwerk aus Genen mit *H19* und auch *IGF2* verbunden [Patten *et al.* 2016].

Dieses Netzwerk, das *imprinted gene network* (IGN), besteht aus circa 60 imprinteten und weiteren nicht imprinteten Genen, meist aus der Proteinfamilie für die Extrazellulärmatrix, die sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen können [Varrault *et al.* 2017, Patten *et al.* 2016]. Gemeinsam haben sie einen Einfluss auf die embryonale Entwicklung durch Herstellung des oben erwähnten Gendosisgleichgewichts. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch ungeklärt, jedoch wird vermutet, dass sich die Gene des Netzwerks regulatorische Elemente teilen. Eine weitere Interaktionsmöglichkeit zeigt das Zinkfingerprotein PLAGL1, welches direkt an die ICR im *H19/IGF2*-Locus bindet und so die Expression dieser beiden Gene beeinflussen kann [Varrault *et al.* 2017]. Außerdem sollen vor allem *lncRNA* in *cis* und in *trans* die Expression regulieren [Patten *et al.* 2016].

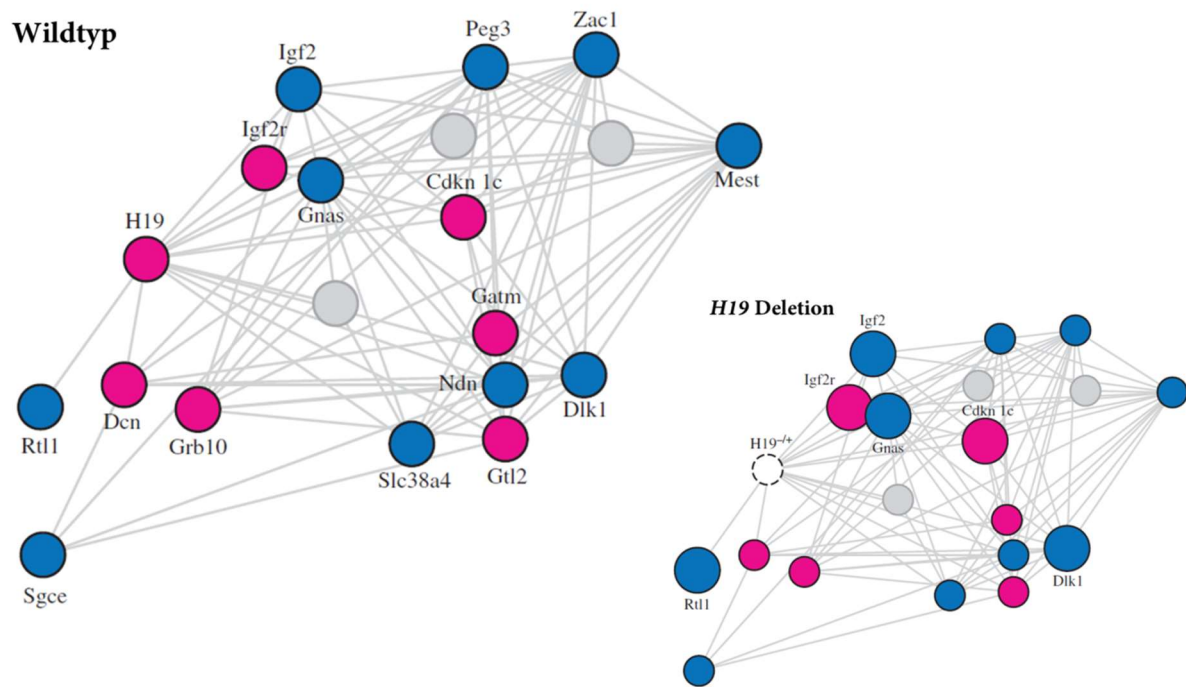


Abb. 2.4: Das IGN in der Maus

Das IGN ist ein Netzwerk von sowohl exklusiv mütterlich (rot) als auch exklusiv väterlich (blau) exprimierten Genen. Mittlerweile werden auch nicht-imprintete Gene mit hinzugezählt (exemplarisch, grau). Bei einer *H19* Deletion (rechts) wird die Expression verschiedener Gene des Netzwerks hochreguliert (größer).

[aus Patten *et al.* 2016]

Doch die Frage, welchen Mechanismen sich *H19* bedient, bleibt weiter offen. Eine Idee ist, dass die lncRNA *H19* durch Bindung an das *IGF2 mRNA binding protein 1* (IMP1) die post-transkriptionelle Interaktion zum Beispiel der *IGF2*-mRNA behindert [Hansen *et al.* 2004]. Außerdem gibt es Hinweise, dass *H19* durch Einflussnahme auf die Histonmodifikation auch epigenetisch wirksam ist. Hierbei arbeitet sie in einem Riboproteinkomplex, beispielsweise mit dem *Methyl-CpG-binding domain protein 1* (MBD1) und einer H3K9-Methyltransferase zusammen [Westeppe 2019, Koch 2016, Gabory *et al.* 2010, Luo *et al.* 2013, Monnier *et al.* 2013].

Das Strukturprotein Cohesin

Cohesin ist ein ringförmiger Proteinkomplex, der aus drei Kern-Untereinheiten und drei weiteren regulatorischen Einheiten besteht (siehe Abb. 2.5). Schon lange ist bekannt, dass Cohesin eine wichtige Rolle bei der Kohäsion der Schwesterchromatide zwischen S-Phase und Meta- bis Anaphase der Zellteilung aufweisen. Doch es spielt auch in der DNA-Reparatur und der Genregulation eine entscheidende Rolle [Litwin und Wysocki 2018].

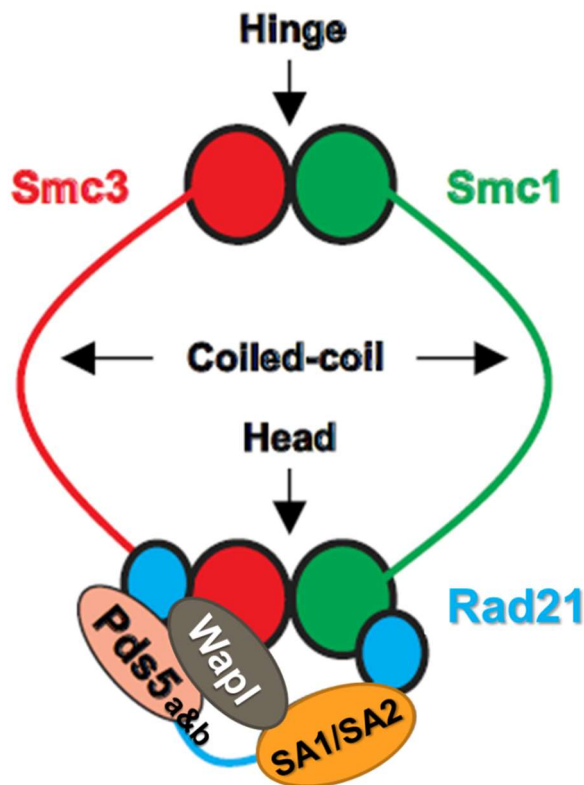


Abb. 2.5: Aufbau des menschlichen Cohesins

Der ringförmige Proteinkomplex Cohesin besteht aus 3 Kern-Untereinheiten: SMC3 (rot), SMC1 (grün und RAD21 (blau). Sie bilden mit zwei doppelverdrillten Kettenelementen (*coiled-coil*) einen Ring, indem sie an einer globulären Angeldomäne (*hinge*) und einer Kopfdomäne (*head*) verbunden sind. An der Kopfgruppe sind drei weitere regulatorische Untereinheiten verschieden fest gebunden: Wapl (grau), Pds5a&b (altrosa) und SA1/SA2 (orange).
[nach Litwin und Wysocki 2018]

Eine Theorie aus Knockout-Versuchen besagt, dass Cohesin vom Proteinkomplex *NIBPL* an die DNA gebunden wird, während CTCF für die spezifische Rekrutierung an die CTCF-Bindestellen von Nöten ist [Busslinger *et al.* 2017]. An CTCF gebunden, ist es wichtig für die Isolatorfunktion des CTCF, indem es beispielsweise die *Enhancer*-Promotor-Interaktion blockiert [Wendt und Peters 2009].

Das Zinkfingerprotein CTCF

Der *CCCTC binding factor* (CTCF) enthält als Protein der Zinkfingerfamilie 11 Zinkfingerdomänen, die durch unterschiedliche Kombinationen nicht palindromische Sequenzen binden können [Bonev und Cavalli 2016, Wendt und Peters 2009]. Es sind mittlerweile zwischen 55.000 und 65.000 CTCF-Bindestellen genomweit bekannt [Chen *et al.* 2012], welche meist wenige Kilobasen *up*- oder *downstream* von Genen angesiedelt sind. CTCF vermittelt weitreichende Chromatininteraktionen, da es die Anreicherung von Strukturproteinen, zum Beispiel von Cohesin, an seinen Bindestellen fördert. Dadurch kommt es zu Loop-Bildung, die die räumliche Architektur

des Chromatins beeinflusst [Wendt und Peters 2009]. Es wird vermutet, dass die Bindung des CTCFs an seine Bindestellen von deren Methylierungsstatus abhängig ist, da eine Hypermethylierung die Bindung zu verhindern scheint [Bonev und Cavalli 2016, Nativio *et al.* 2009]

Bei CTCF-Depletion ist die spezifische Cohesin-Rekrutierung an die CTCF-Bindestellen gestört, sodass das Cohesin an *transcription start sites* (TSSs) von transkriptionell aktiven Genen akkumuliert (*cohesin islands*). Daher nimmt man an, dass die Gentranskription die Positionierung von Cohesin ebenfalls beeinflusst [Busslinger *et al.* 2017].

CTCF- und Cohesin-vermittelte Architektur des Chromatins

Unser Genom ist auf eine Vielzahl von Strukturebenen angewiesen, um Transkription und Replikation möglichst fehlerfrei zu ermöglichen. Auf kleinster Ebene ist die DNA doppelt um Histonoktamere gewickelt, welche durch Histon- und Nicht-Histonproteine weiter kondensiert wird. Die Histon-DNA-Perlenkette bildet im Kilo- bis Megabasen-Bereich Chromatinloops, die Interaktionen zwischen nicht unmittelbar benachbarten Sequenzen ermöglichen. Diese Loops werden beispielsweise von CTCF und Cohesin gebildet und stabilisiert [Bonev und Cavalli 2016, Nativio *et al.* 2009].

Auf der nächsthöheren Organisationsebene ist das Chromatin in *topologically associating domains* (TADs) unterteilt, die sich durch verstärkte intradomäre Interaktionen von ihren Nachbar-TADs abgrenzen. Außerdem ist das Genom auf dieser Ebene in aktive und inaktive Bereiche unterteilt, sogenannte *A* und *B compartments*, welche nicht so lokal wie die TADs sind und auch interchromosomale Interaktionen erlauben (siehe Abb. 2.6) [Hansen *et al.* 2018].

Bei Cohesindepletion wird beobachtet, dass die lokalen Interaktionen abnehmen, während die TADs weitestgehend bestehen bleiben. CTCF-Depletion verringert ebenfalls die intradomären Interaktionen, während die interdomären Interaktionen zunehmen [Zuin *et al.* 2014].

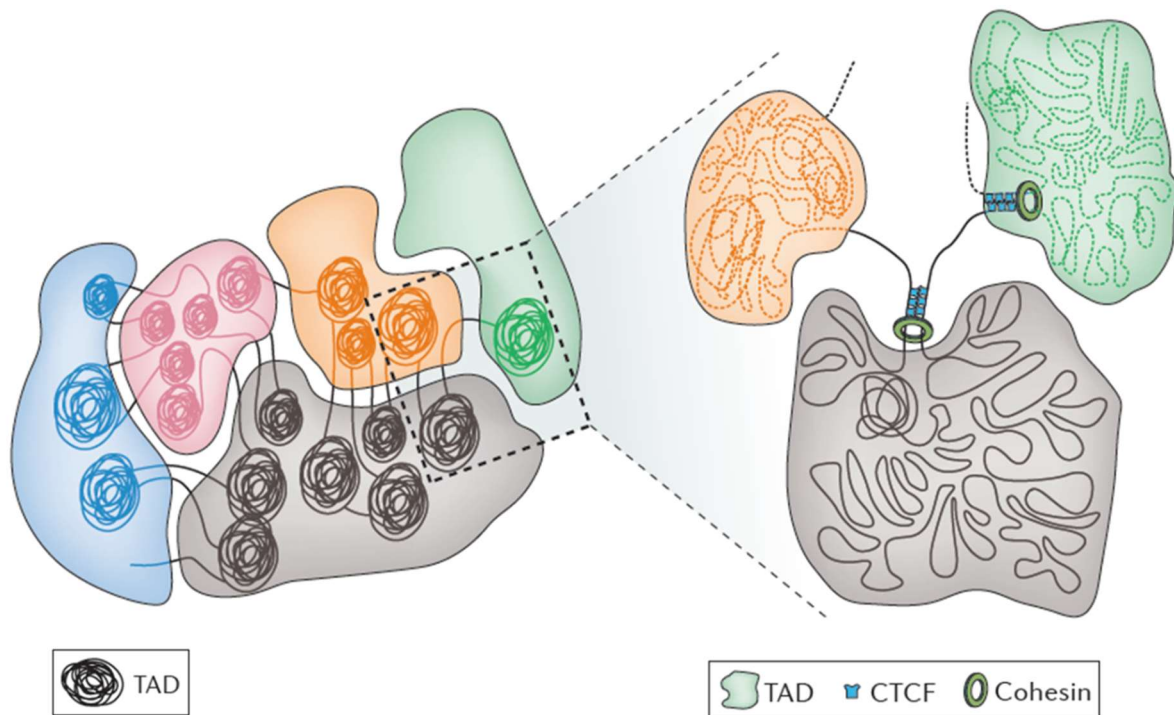


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau von TADs

Die Theorie der TADs (*topologically associating domains*) besagt, dass sich das Genom in Domänen im Submegabasenbereich einteilt, die öfter miteinander als mit anderen Regionen im Genom interagieren. An ihren Grenzen sind meist CTCF und Cohesin angereichert, sodass diesen eine erhaltende Funktion zugeschrieben wird. Die einzelnen TADs befinden sich oft gemeinsam in aktiven oder inaktiven Bereichen (farblich hinterlegt).

[aus Bonev und Cavalli 2016]

Die Grenzen der TADs sind wahrscheinlich nicht steif und sowohl zell- als auch individuen-spezifisch, sodass die exakte Definition etwas schwierig ist [Bonev und Cavalli 2016]. Jedoch werden in den meisten Fällen CTCF- und Cohesin-Anreicherungen an den TAD-Grenzen gefunden [Hansen *et al.* 2018]. Die CTCF-Bindestellen am Rande der Loops weisen die gleiche Orientierung auf, wodurch Interaktionsrichtung und –partner vorgegeben zu sein scheinen. Ebenfalls scheint die Richtung der benachbarten Transkripte eine Rolle bei der Multimerisierung des CTCFs zu spielen. Momentan vermutet man, dass der Cohesinring eine DNA-Schleife bindet und sich dann in beide Richtungen verschiebt, solange, bis er auf je ein gebundenes CTCF-Molekül trifft. So kommen Letztere in räumliche Nähe und können dimerisieren (siehe Abb. 2.7) [Bonev und Cavalli 2016]. Diese Architektur ermöglicht die hohe Flexibilität der TADs, die nur eine mittlere Lebensdauer von ein paar Minuten bis zu einer Stunde haben [Hansen *et al.* 2018].

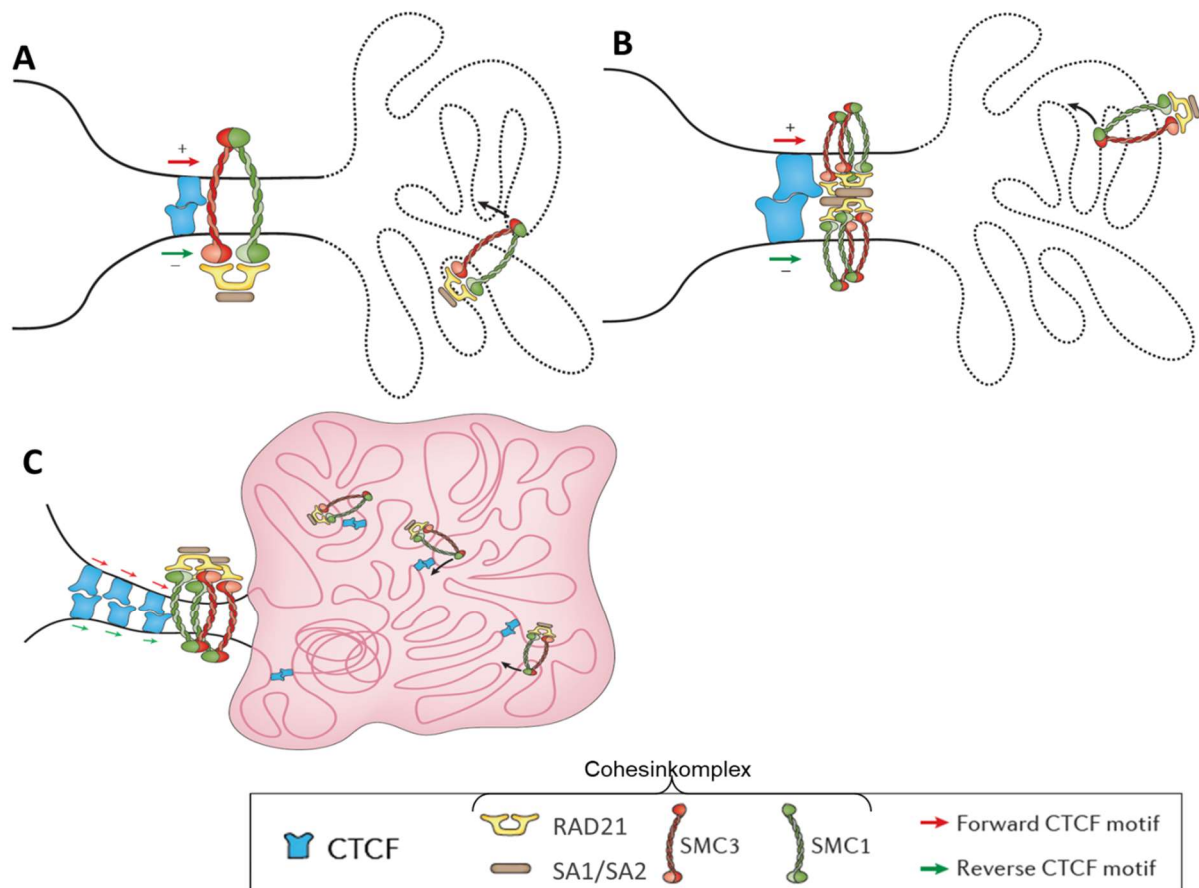


Abb. 2.7: Model zur Loop-Formung durch CTCF und Cohesin

Der Cohesinkomplex wandert in beide Richtungen, bis er auf beiden Seiten auf ein gebundenes CTCF-Molekül trifft. So kommen zwei CTCFs in räumliche Nähe; ob dabei ein (A) oder mehrere (B) Cohesinmoleküle beteiligt sind, bleibt unklar. In C wandern innerhalb einer TAD (rosa hinterlegt) mehrere Cohesinringe, während sie sich an der Grenze der TAD sowohl CTCF als auch Cohesin anreichern.

[nach Bonev und Cavalli 2016]

2018 zeigten Tsai und Mitarbeitende, dass eine RNA die Cohesinpositionierung in *trans* im *Myogenin*-Gen beeinflussen kann. Die *enhancer* RNA (eRNA) sammelt sich im *Myogenin*-Lokus und ist dort entscheidend für die Bindung und Aufrechterhaltung der Cohesinbindung, wodurch das Gen räumlich für die Transkription zugänglich gemacht wird.

Es ist ebenfalls von anderen ncRNAs beschrieben, dass sie direkt an eine RNA-Bindestelle des CTCF binden und wichtig für die Multimerisation der CTCF-Moleküle sind. Welche Rolle lncRNAs spielen ist weiter nicht vollständig geklärt [Bonev und Cavalli 2016].

3. Material und Methoden

Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Reinraumwerkbank durchgeführt, die täglich mittels UV-Licht desinfiziert wurde. Es wurde ausschließlich mit zuvor desinfizierten oder autoklavierten Materialien und Gerätschaften gearbeitet.

3.1.1. Zelllinien

Es wurden 5 Zelllinien zur Kultivierung ausgewählt. Die verwendeten Zelllinien befanden sich bereits in Besitz der Arbeitsgruppe. Die primären Fibroblasten wurden nur bis zu einer Passagenzahl von 20 kultiviert und höchstens bis Passagenzahl 18 für Versuche verwendet.

Tab. 3.1: Information zu den verwendeten Zelllinien

Name	Zellart	Phänotyp	H19-Status
BWS ΔH19/ICR1	Primäre Fibroblasten	BWS	-
SRS UPD7 1	Primäre Fibroblasten	SRS	+
SRS UPD7 2	Primäre Fibroblasten	SRS	+
HB2	Immortelle Tumorzelle	Fibroider Brusttumor	+++
WCCS1	Immortelle Tumorzelle	Wilmstumor	++

Tab. 3.2: Zelllinien und ihre Kulturbedingungen

Name	Medium	Zusätze
BWS $\Delta H19/ICR1$	RPMI	+ 10% FCS + 1% Pen/Strep
SRS UPD7 1	DMEM	+ 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% NaPy
SRS UPD7 2	DMEM	+ 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% NaPy
HB2	DMEM	+ 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% NaPy + 1% Glutamat + 10mg/ml Stock Insulin + 10mg/ml Stock Hydrocortison
WCCS1	RPMI	+ 20% FCS + 1% Pen/Strep

3.1.2. Kryokonservierung der Zellen

Um die Zellen zu konservieren, wurden diese in einem Tank in flüssigem Stickstoff gelagert.

Dazu wurden die adhärennten Zellen mit 2 ml Trypsin inkubiert, um sie in Lösung zu bringen. Die Reaktion wurde mit 6ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon überführt. Dieses wurde für 10min bei 4°C und 1.200rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2ml Einfriermedium gelöst, das sich aus 90% Kulturmedium und 10% DMSO zusammensetzte, und auf 2 Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden für mindestens 1 Woche und höchstens 2 Wochen im Freezing Container in den -80°C-Tiefkühlschrank gestellt, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

3.1.3. Anziehen von kryokonservierten Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen schnellstmöglich in der Hand aufgewärmt. Die Zellsuspension mit dem DMSO wurde in ein Falcon mit 5ml Kulturmedium überführt und für 5 min bei 4°C und 1.000rpm zentrifugiert. Das Medium

mit DMSO wurde abgesagt und das Pellet in 10ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Flasche wurde mit 15ml Kulturmedium auf 25ml aufgefüllt.

3.1.4. Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen kultiviert. Diese wurden in einem sterilen Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% aufbewahrt.

Bei einer Konfluenz von 80% oder mehr wurden die Zellen passagiert.

Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, um die Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Lösung gebracht, indem sie mit 2ml Trypsin behandelt wurden, welches 5-10 min bei 37°C inkubiert wurde. Diese enzymatische Verdauung der Zelloberfläche wurde mit der Zugabe von Medium abgestoppt, sobald sich alle Zellen vom Boden der Flasche abgelöst hatten. Um die Zellen zu vereinzeln wurde die Zellsuspension mehrfach schnell aufgezogen und wieder abgegeben. Danach wurden sie im Verhältnis 1:2 bis 1:15 aufgeteilt und alle Flaschen oder Schalen mit der entsprechenden Menge Medium aufgefüllt.

Tab. 3.3: Kulturgefäße für die Zellkultur

	Menge des Mediums
T175-Flasche	25 ml
15cm-Schale	25 ml
10cm-Schale	15 ml

RNA-Standardmethoden

3.1.5. *Isolation von RNA mit dem peqGOLD Total RNA Kit*

Die Isolation der RNA wurde nach dem „peqGOLD Total RNA Isolierungsprotokoll“ für Monolayer-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen auf einer 10cm-Kulturschale bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Zunächst wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt und die Oberfläche mit 800µl RNA Lysis Buffer benetzt. Daraufhin wurden die Zellen mithilfe eines Kunststoffschabers mechanisch vom Boden der Schale gelöst. Das Lysat wurde in eine DNA Removing Column überführt, um die noch vorhandene DNA zu binden und durch eine einminütige Zentrifugation bei 12.000×g aus der Probe zu entfernen. Der Säulendurchfluss wurde mit 800µl 70%-igem Ethanol vermischt. Anschließend wurde die Probe auf eine PerfectBind RNA Column geladen und für eine Minute bei 10.000×g zentrifugiert. Es folgte eine Waschung mit 500µl RNA Wash Buffer I mit anschließender 15-sekündiger Zentrifugation bei 10.00×g.

Um die verbleibenden Reste DNA zu entfernen, wurde ein enzymatischer DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurde pro RNA Column der Reaktionsmix aus 73,5µl DNase I Digestions Buffer und 1,5µl RNase-freie DNase I angesetzt. Dieser wurde direkt auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur 15min inkubiert. Anschließend wurde nochmals 5min mit 400µl RNA Wash Buffer I inkubiert und dann bei 10.00×g 5min zentrifugiert.

Es folgten zwei Waschung mit 600µl Wash Buffer II mit anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 10.000×g. Daran schloss sich eine Trocknung durch zweiminütige Zentrifugation wieder bei 10.000×g an.

Zum Abschluss wurde die RNA mithilfe von 55µl sterilem RNase-freiem Wasser eluiert. Um die RNA weiterhin zu schützen, wurden dem Eluat 2µl RNase-Inhibitoren zugegeben.

3.1.6. *Quantifizierung von Nukleinsäuren*

Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde mittels des Spektralphotometers „NanoDrop™ One“ ermittelt. Die Nachweisgrenzen des Geräts liegen bei 1,6ng/µl und 22.000ng/µl.

Das Gerät verwendet das Lambert-Beer'sche Gesetz zur Errechnung der Konzentration mittels der gemessenen Extinktion. Die Extinktion der Nukleinsäuren wird bei 260nm gemessen. Um die Reinheit der Probe zu bestimmen, wird die

Extinktion für 260nm jeweils mit der für 230nm und 280nm ins Verhältnis gesetzt. Dabei gelten Werte von circa 2 für E260/E280 und 1,8-2,2 für E260/E230 als rein. Zur Nullwertbestimmung diente RNase- freies Wasser, da die RNA ebenfalls darin eluiert wurde. Es wurde jeweils 1µl von Leerwert und Probe für die Messung verwendet.

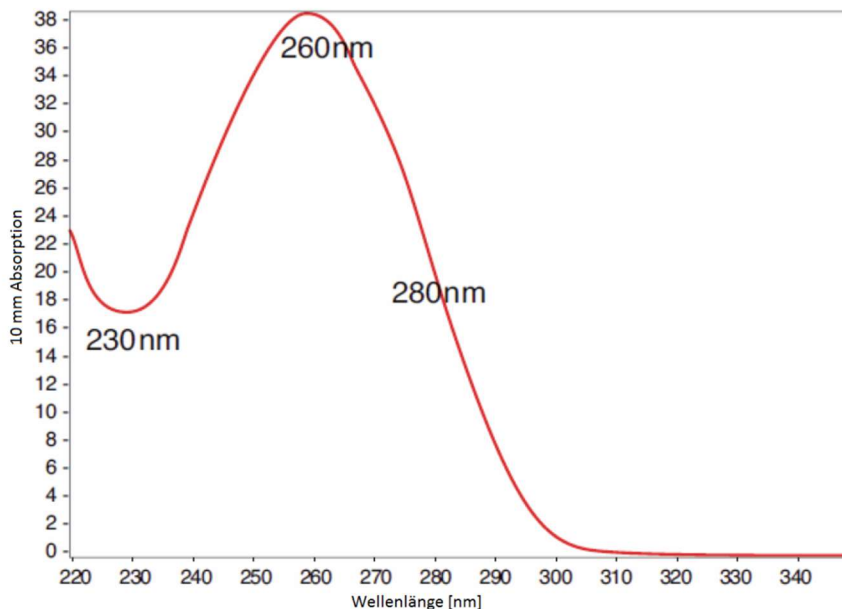


Abb. 3.1: Typisches Nukleinsäurespektrum des Nanodrops

Die höchste Absorption weisen Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260nm, weswegen diese genutzt wird, um die Konzentration über das Lambert-Beer'sche Gesetz zu errechnen. Bei 230nm und 280nm ist die Absorption ähnlich gering, sodass diese Werte zur Beurteilung der Reinheit verwendet werden.

[Modifiziert nach: Thermo Scientific 2016]

3.1.7. cDNA-Synthese

Um die einzelsträngige RNA mittels qPCR analysieren zu können, muss diese zuvor in doppelsträngige cDNA (*engl.: complementary DNA*) umgewandelt werden. Eine reverse Transkriptase synthetisiert einen komplementären Strang zur vorhandenen RNA. Als Primer werden hier Oligo-dT-Nukleotide verwendet, die komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind, sodass ausschließlich diese umgeschrieben wird. Danach wird der RNA-Strang abgebaut und durch eine DNA-Polymerase der komplementäre DNA-Strang synthetisiert.

Zur cDNA-Synthese wurden nach Möglichkeit 3µg RNA pro Probe eingesetzt. Die RNA-Lösung wurde mit 2µl Oligo-dTs und 4µl dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) gemischt und mit Wasser nach Bedarf auf 16µl aufgefüllt. Um die 3D-Struktur der RNA aufzubrechen, wurde die Probe für 5min bei 80°C in den

Thermocycler gestellt. Anschließend wurden 1µl Reverse Transkriptase, 1µl RiboLock und 2µl Reverse Transkriptase Buffer hinzugefügt und das Thermocycler-Programm (siehe Tab. 3.4) gestartet.

Tab. 3.4: Programmablauf der cDNA-Synthese im Thermo-Cycler

Temperatur	Zeit
42°C	60 min
90°C	10 min
4°C	∞

Die erhaltene cDNA wurde nachfolgend bei -20°C gelagert.

DNA-Standardmethoden

3.1.8. Quantitative Amplifikation von Nukleinsäuren (qPCR)

Die qPCR (*engl.: quantitative polymerase chain reaction*), die auch *real time PCR* genannt wird, ist eine Methode zur Vervielfältigung und gleichzeitigen Quantifizierung von DNA.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wird dem Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff (hier: *SYBR Green*) zugesetzt, der in den DNA-Doppelstrang interkaliert. Die Stärke der Fluoreszenz ist dabei proportional zur vorhandenen Menge an DNA und wird mithilfe einer speziellen Kamera detektiert. Gemessen wird immer am Ende der Elongationsphase, da zu diesem Zeitpunkt die meiste doppelsträngige DNA (dsDNA) und damit das stärkste Signal vorliegt (siehe Abb. 3.2).

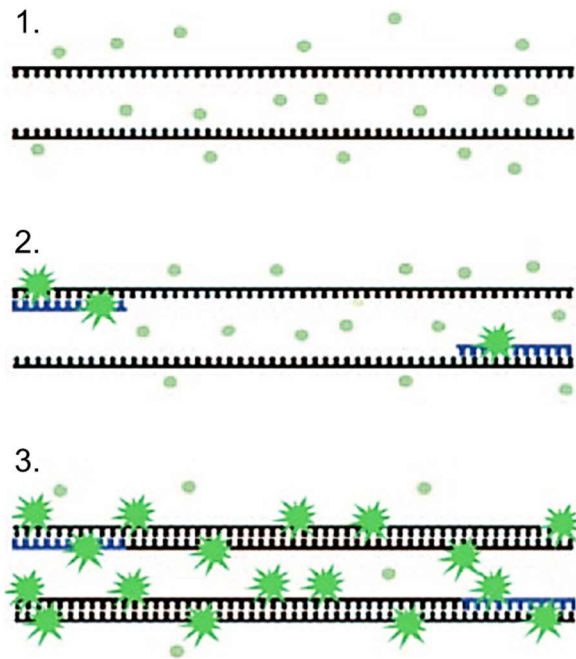


Abb. 3.2: Wirkungsweise des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green

SYBR Green interkaliert in die dsDNA. Bei Bindung steigt durch eine Konformationsänderung die Fluoreszenz auf das 100fache an [Koch 2016]. 1.) Wird das Produkt zu Beginn des nächsten Zyklus aufgeschmolzen, kann SYBR Green nicht mehr binden. Die Fluoreszenz nimmt ab. 2.) Während des Annealings lagert sich der Farbstoff in die entstehende dsDNA ein: das Fluoreszenzsignal steigt. 3.) Am Ende der Elongationsphase ist die maximale Menge an SYBR Green gebunden; das Fluoreszenzsignal ist für diesen Zyklus jetzt am stärksten. Deswegen wird zu diesem Zeitpunkt die Messung des Signals bei 530nm Wellenlänge durchgeführt.

[aus: Fraga et al. 2008]

Übersteigt diese Fluoreszenzstärke die Nachweisgrenze, stellt sie sich als exponentieller Anstieg dar (siehe Abb. 3.3).

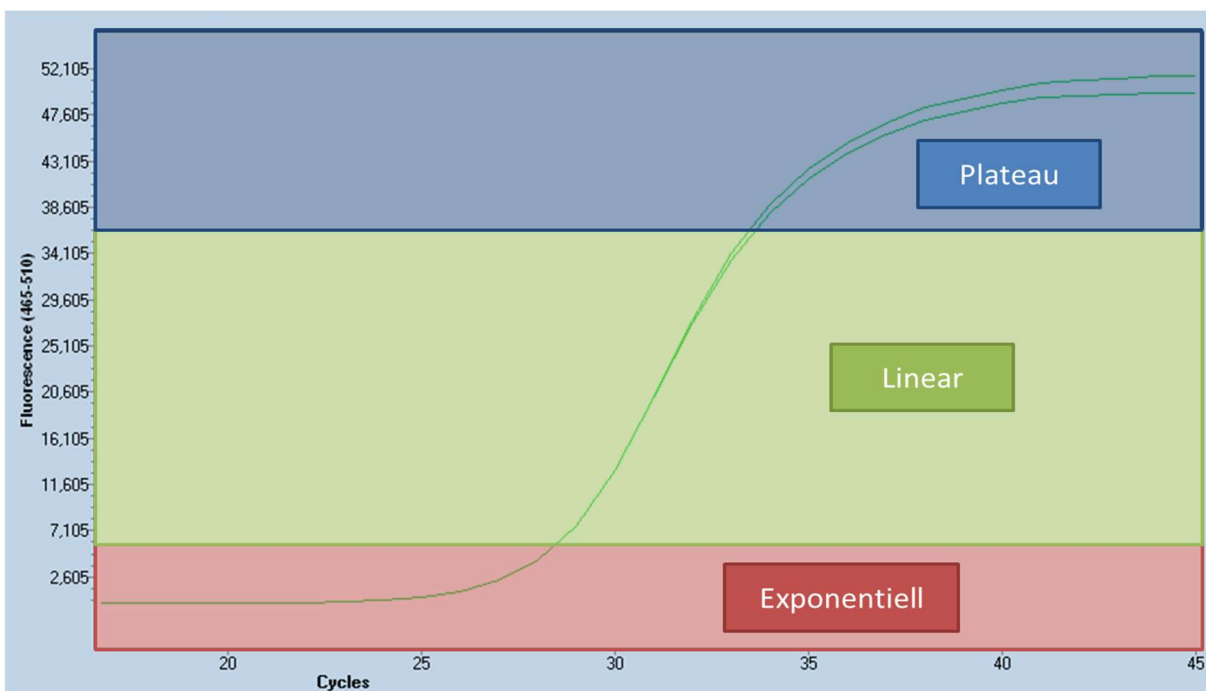


Abb. 3.3: Die drei Phasen der PCR

Erreicht die Fluoreszenz den Schwellenwert, wird der exponentielle Anstieg des Signals sichtbar. Dieser geht in eine Phase des linearen Anstiegs über, in der das Produkt pro Zyklus jeweils verdoppelt wird. Sind die Reaktionsbestandteile verbraucht oder ausgelastet, erreicht die Kurve ein Plateau.

Um die Kurven auf einen Wert zu reduzieren, um sie untereinander vergleichbar zu machen, wurde der *crossing point* (CP) als 2. Ableitung der Fluoreszenzstärke über die Zeit festgelegt. Dies entspricht dem Punkt, an dem die Fluoreszenzstärke am schnellsten zunimmt (siehe Abb. 3.4).

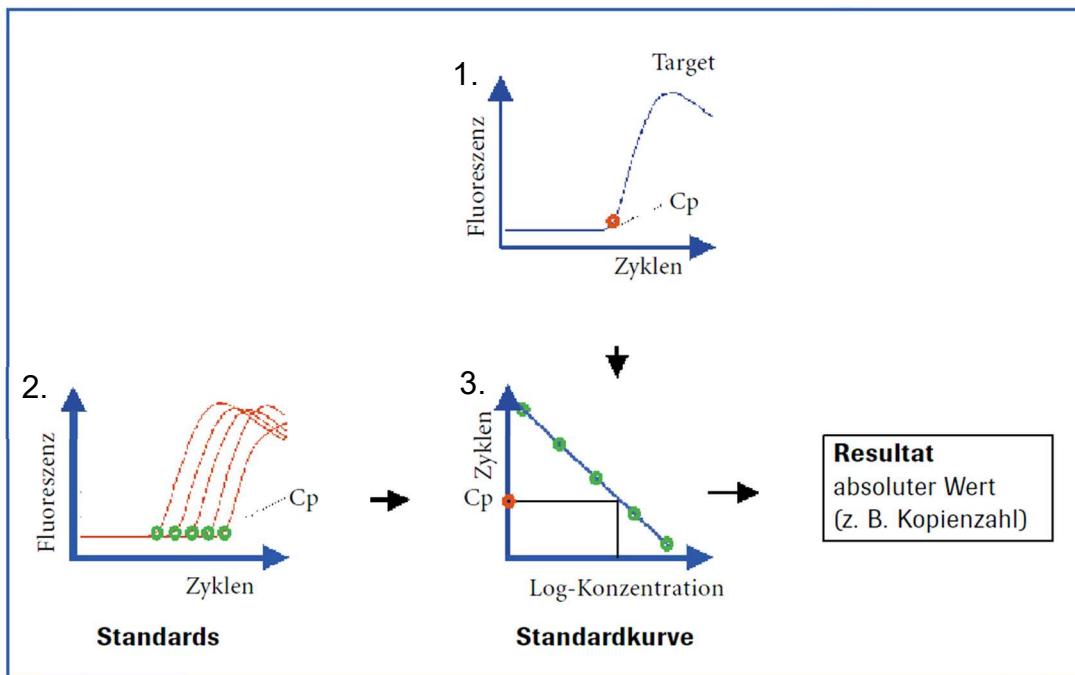


Abb. 3.4: Entstehung der Eichgeraden aus der Standardreihe

1.) Der Crossing-Point entspricht dem Maximum der zweiten Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit. 2.) Bei sukzessiv verdünnten Standardreihen ist der CP der jeweils doppelt so starken Verdünnung im Optimalfall genau einen Zyklus später. 3.) Aus der logarithmischen Auftragung der Konzentration über die Zyklen hinweg, entsteht die Eichgerade.

[Roche, Handbuch LightCycler®]

Für jeden Primer wurde eine Standardverdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 hergestellt. Für die cDNA-Auswertung bildete die cDNA des HB2-Zelllinie das Template der Standardreihe, für die CHIP-Analysen eine genomische DNA-Probe einer Kontrollperson.

Erstes Ziel des Vergleichs der Daten mit der Standardreihe ist es, die Effizienz der PCR bewerten. Im Optimalfall ergibt sich für die Effizienz (E) = 2, was bedeutet, dass sich pro Zyklus die Menge der DNA genau verdoppelt. Des Weiteren kann man anhand der CPs der Standardreihe eine Eichgerade erstellen, indem man ihnen feste Konzentrationen zuweist. Anhand dieser können nun die Ergebnisse der einzelnen Ziellinien und ebenfalls der Gene untereinander verglichen werden.

Da die Interkalierung des Farbstoffs unspezifisch erfolgt, schließt sich der Synthese eine Aufschmelzung der Produkte an. Am Schmelzpunkt eines Produkts lösen sich die beiden Stränge voneinander, sodass *SYBR-Green* nicht mehr interkalieren kann; es kommt zum Abfall des Fluoreszenzsignals. Die Schmelztemperatur eines jeden Produkts ist abhängig von seiner Länge und seinem Gehalt an CG-Nukleotidpaarungen. So lässt sich das gewünschte Produkt von Nebenprodukten wie beispielsweise Primer-Dimeren unterscheiden, da diese meist kürzer sind und damit eine geringe Schmelztemperatur aufweisen (siehe Abb. 3.5). Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der Schmelzkurve nochmals gelelektrophoretisch bestätigt.

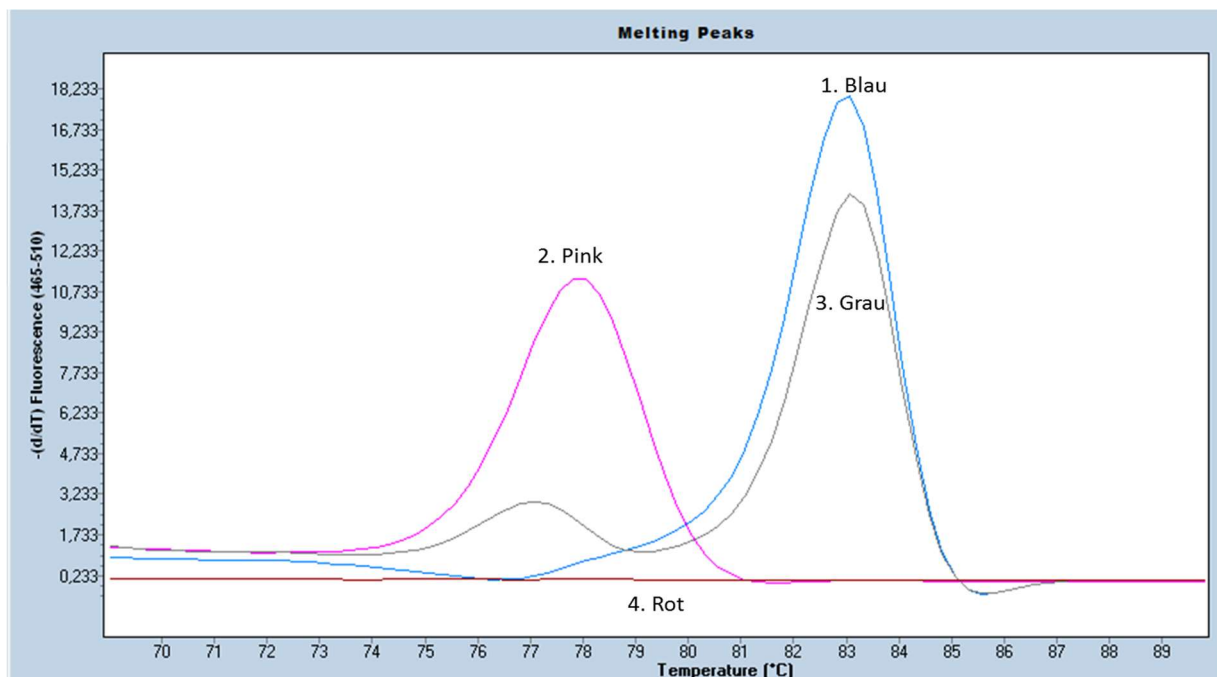


Abb. 3.5: Verschiedene Schmelzkurven

1.) Die blaue Kurve zeigt die typische Schmelzkurve eines gewünschten Produktes. 2.) Die pinke Kurve stellt den typischen Verlauf einer Kurve von Primer-Dimeren dar. 3.) Die graue Kurve zeigt ein gemischtes Produkt an, in dem sowohl das richtige Produkt als auch Primer-Dimere vorhanden sind. 4.) Die rote Linie entstammt einem leeren Well ohne jegliches Produkt.

Die Versuche wurden mit dem LightCycler 480 II von Roche durchgeführt und dem zugehörigen Programm (Version 1.5) ausgewertet.

Die Primer sind mithilfe des *Primer-BLAST* aufgrund von DNA-Sequenzen aus dem *UCSC Genome Browser* ausgewählt worden. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer möglichst dieselbe Länge, ideal 20bp, und damit verbunden ähnliche Annealingtemperaturen, um 60°C, aufwiesen. Außerdem sollte die Selbst-Komplementarität, besonders am 3'-Ende möglichst gering sein, um Primerdimeren vorzubeugen und die Effizienz nicht zu verschlechtern. Es wurden nur Primer

ausgewählt, die keine weitere als die beabsichtigte Sequenz amplifizieren können. Für die ChIP-Quantifizierung wurden sechs Primersequenzen aus einer Kooperation mit Dr. K. Wendt aus dem *Dept. of Cell Biology, Erasmus MC* in Rotterdam übernommen.

Der PCR-Mastermix (PCR-MM) setze sich wie folgt zusammen:

Tab. 3.5: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

Gab es in den Testläufen zu viele Primer-Dimere, die nicht über die Temperaturoptimierung verschwanden, wurde die Menge an eingesetzten Primern verringert. Dies war bei der ChIP-Auswertung für *IGF2R CTS1*, *CCD* und *SYN3site* nötig.

Inhalt	Volumen	Volumen bei Primer-Dimeren
H ₂ O	3µl	3,1µl
<i>Forward Primer</i> (1:10 verdünnt)	0,5µl	0,45µl
<i>Reverse Primer</i> (1.10 verdünnt)	0,5µl	0,45µl
Mastermix	5µl	5µl

In jedes Well der 96-Well-Platte wurden 9µl PCR-Mastermix vorgelegt und mit 1µl Template ergänzt. Jede Probe wurde zweimal aufgetragen (Duplikat), um später mit den Mittelwerten der Proben zu arbeiten und damit die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Zwei Ansätze ohne zugefügtes Template dienen als Negativkontrolle (Wasserkontrolle). Die cDNA-Proben wurden 1:10 mit H₂O verdünnt, während die ChIP-Proben nur 1:1 verdünnt wurden. Die Platten wurden mit durchsichtiger Folie luftdicht verschlossen und kurz runterzentrifugiert. Danach wurde das folgende Programm mit der optimierten Annealing-Temperatur gestartet. Die optimale Annealing-Temperatur der einzelnen Primer ist in Tab. 3.10 und Tab. 3.11 zu finden.

Tab. 3.6: LightCycler Programm

Programmpunkt	Zyklen	Temperatur	Dauer	Vorgang
Initiale Denaturierung	1	95°C	3 min	Denaturierung, Aktivierung des Enzyms
Amplifikation	45	95°C	5 sec	Denaturierung
		58-66°C	5sec	Annealing
		72°C	1sec	Elongation
Schmelzkurve	1	65-95°C	Sukzessiv steigend	Schmelzung
Abkühlung	1	50°C	∞	Abkühlung

Um die Menge der in die cDNA-Synthese eingesetzten mRNA auszugleichen, wurde auf sogenannte ‚Haushaltsgene‘ normalisiert. ‚Haushaltsgene‘ werden unabhängig von Zellstadium und Zelltyp ohne nennenswerte Regulation exprimiert. Damit lässt sich mit ihrer Hilfe das Verhältnis der Mengen der eingesetzten mRNA vergleichen.

3.1.9. DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen aufgereinigt. Dazu wurden zu einem Teil Probe jeweils vier Teile PB-Puffer (DNA Binding Buffer) gegeben und vermischt. Die Lösung wurde auf eine DNA Purification Spin Column überführt und bei 14.000rpm eine Minute durchzentrifugiert. Der Überfluss wurde verworfen und die Säule dreimal mit 700µl PE-Puffer (DNA Wash Buffer) gewaschen und wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule bei gleichen Bedingungen nochmals trocken zentrifugiert. Zur Elution der gereinigten DNA wurden 30µl EB-Puffer (Elution Buffer) direkt auf die Membran gegeben und eine Minute inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels genannter Zentrifugation eluiert. So aufgereinigt Proben können bei -20°C gelagert werden.

Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Bei der Chromatin-Immunopräzipitation wird die Bindung eines Proteins an eine spezifische Sequenz der DNA nachweisen. Dazu werden aus fragmentiertem Chromatin mithilfe von Antikörpern diejenigen DNA-Fragmente herausisoliert, die an das zu untersuchende Protein gebunden sind. Anschließend können diese DNA-Abschnitte, zum Beispiel mittels qPCR quantifiziert werden.

3.1.10. Fixierung des Chromatins

Für die ChIP wurden circa 1 Millionen Zellen pro Probe eingesetzt. Dazu wurden jeweils zwei Platten (circa 80% konfluent, abhängig von der Zelllinie) vereinigt.

Zuerst wurde das Medium unter der sterilen Reinraumbank bis auf 10ml abgezogen. Daran schloss sich die 5-minütige Inkubation auf einer Schüttelplattform mit 690µl 16-%igem Formaldehyd zur Fixierung der Protein-DNA-Verbindung an. Anschließend wurde die Fixierung mit der Zugabe von 505µl 2M Glycin abgestoppt, das ebenfalls 5 Minuten auf der Schüttelplattform inkubierte. Die Flüssigkeit wurde abgekippt und die Zellen in 5ml 125mM Glycin/PBS-Lösung mechanisch abgeschabt. Danach wurde jede Schale nochmals mit 5ml dieser Lösung gespült, um die restlichen Zellen ebenfalls abzulösen und alles in ein Falcon überführt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 200×g (1000rpm) bei 4°C. Anschließend wurde das Pellet zweimal in PBS resuspendiert und bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellpellets wurden nach Abkippen des PBS auf Eis gelegt und direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C für höchstens einen Monat gefroren gelagert. Um die Pellets einzufrieren, wurden sie vorher kurz in flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

3.1.11. Nukleuspräparation

Die Nukleuspräparation wurde mithilfe des Shearing-Kits von Covaris nach dem Low Cell Protokoll durchgeführt. Dazu mussten die vorhandenen Puffer wie folgt verdünnt werden (siehe Tab. 3.7)

Tab. 3.7: Zusammensetzung der Puffer für die Nukleuspräparation

Alle Mengen sind pro Probe angegeben.

Puffer	Menge des Puffers[µl]	Menge H ₂ O	Menge Buffer F
Lyse-Puffer	60µl 5x <i>Lysis Buffer B</i>	237µl	3µl
Wasch-Puffer	30µl 10x <i>Wash Buffer C</i>	267µl	3µl
Scher-Puffer	73µl 10x <i>Shearing Buffer D₃</i>	650µl	7,3µl

Die Zellpellets wurden jeweils in 300µl Lyse-Puffer vorsichtig resuspendiert, indem die Probe viermal aspiriert und wieder abgegeben wurde. Die Emulsionen wurden für 10min bei 4°C zur Inkubation in ein e.o.e.-Gerät gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1700×g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300µl Wasch-Puffer resuspendiert und abermals 10 Minuten bei 4°C im e.o.e.-Gerät inkubiert. Ziel der Waschung war es, das Salz des Lyse-Puffers zu verdünnen. Es folgte wieder eine 5-minütige Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und der Rand des Gefäßes zweimal mit Scher-Puffer gespült, ohne das Pellet zu verletzen und anschließend zentrifugiert.

3.1.12. Scheren des Chromatins

Zum Scheren des Chromatins wurden Ultraschallwellen mit kleiner Wellenlänge ($\lambda \sim 3\text{mm}$) und hoher Frequenz ($f > 400\text{kHz}$) benutzt. Durchgeführt wurde die Scherung mit dem *M220 Focused-ultrasonicator* der Firma Covaris, den zugehörigen *micro AFA tubes* und dem *SonoLab*-Programm.

Jedes Pellet wurde in 110µl – 130µl Scher-Puffer resuspendiert, in das *AFA tube* überführt und in das Gerät eingesetzt. Die fragmentierten Proben wurden maximal 3 Tage bei 4°C gelagert.

Das Programm hatte folgende Einstellungen:

Tab. 3.8: Einstellungen des Ultraschallgeräts

Parameter	
Beschallungszeit	3 min
Peak power	75, 0 Watt
Duty factor	10,0 %
Cycles/Burst	200
Wassertemperatur	7,0°C (5,0-9,0°C)

3.1.13. Fragmentlängenkontrolle

Für das Gelingen der darauffolgenden Immunpräzipitation ist es wichtig, dass die DNA stark genug fragmentiert wurde. Deshalb wurde für jede Probe eine Fragmentlängenkontrolle durchgeführt, bevor die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte.

Dazu wurde mit einem kleinen Anteil der Probe ein *reverse crosslink* durchgeführt, bei dem die Bindung zwischen DNA und Protein wieder gelöst wurde und die DNA aufgereinigt werden konnte.

Dazu wurde jeweils 20µl der jeweiligen Probe abgenommen und mit 55µl Nuklease-freiem Wasser, 3µl 5M NaCl und 1µl RNase A vermischt und bei 37°C für eine Stunde im Thermomixer inkubiert. Dann wurde 1µl Proteinase K zugegeben und weitere 3,5 Stunden bei 65°C inkubiert.

Danach wurde die DNA wie in 3.1.9 beschrieben aufgereinigt und zur Längenkontrolle auf das Agarosegel aufgetragen (siehe 0). Alle ausreichend fragmentierten Proben wurden vereinigt. Anschließend wurde pro Immunpräzipitations-Ansatz (IP-Ansatz) jeweils 55µl fragmentierte DNA und 45µl IP-Spezial-Puffer (Zusammensetzung siehe 3.1.18) und für den Input jeweils 5,5µl Chromatin und 4,5µl Spezial-IP-Puffer gemischt.

3.1.14. Immunpräzipitation

Bei der eigentlichen Präzipitation wird der an die *magnetic beads* gekoppelte Komplex aus DNA, Cohesin und Antikörper gewaschen, um so die gebundenen DNA-Fragmente von den ungebundenen zu trennen.

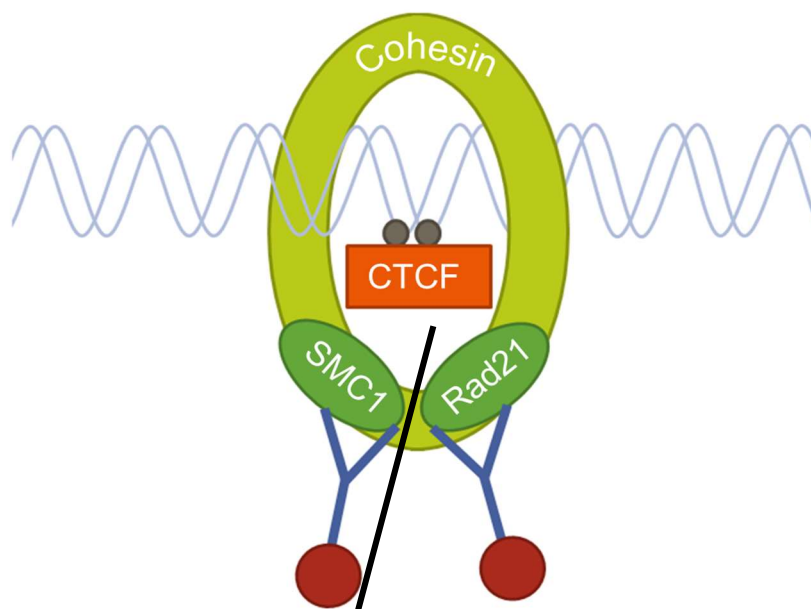


Abb. 3.6: Schematischer Aufbau des ChIP-Komplexes

In hellblau ist die gebundene DNA mit ihren CTCF-Bindestellen (grau) dargestellt, an welche das Zinkfingerprotein CTCF (orange) bindet. Das in hellgrün dargestellte Cohesin-Molekül legt sich wie ein Ring um die DNA. Die Antikörper (dunkelblau) waren gegen zwei der drei Hauptuntereinheiten des Cohesins gerichtet: gegen SMC1 oder RAD21 (dunkelgrün). Die Antikörper sind mit ihrem f_c -Teil an die *magnetic beads* (dunkelrot) gekoppelt.

Material und Methoden

Dazu wurden die 100µl IP-Ansatz über Nacht im e.o.e.-Gerät bei 4°C mit den Antikörpern inkubiert. Die eingesetzte Menge war dabei abhängig vom Antikörper (siehe Tab. 3.12). Pro Zelllinie wurde in jedem Durchlauf ein IgG-Ansatz als Negativkontrolle verwendet. Dabei handelte es sich um einen unkonjugierten, polyklonalen Hasen-Antikörper, der zur unspezifischen Kontrolle genutzt wird.

Nach der Antikörperinkubation folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000×g. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und das unsichtbare Pellet, in dem sich die nicht gebundenen Antikörper befanden, verworfen. Es wurden 30µl gelöste *magnetic beads* hinzugegeben, die sich bei der Inkubation bei 4°C für zwei Stunden im e.o.e.-Gerät an den f_c-Teil der Antikörper anlagerten. Die Proben wurden für eine Minute in ein magnetisches Rack gestellt und der Überstand verworfen. Das Gefäß wurde mit 200µl IP-Puffer gespült und die gelösten *beads* in ein Neues überführt. Der Rand des alten Gefäßes wurde abermals mit 200µl IP-Puffer gespült.

Tab. 3.9: Zusammensetzung der Waschpuffer der ChIP

Die Mengenangaben belaufen sich pro ChIP-Ansatz. Für jeden Input muss zusätzlich ein Ansatz Elutionspuffer hergestellt werden.

	Kit-Puffer	H ₂ O	Weitere Zusätze
IP-Puffer (1.400µl)	140µl 10x ChIP Buffer	1.253 µl	7µl Protease Inhibitor Cocktail
Low Salt-Puffer (2.000µl)	200µl 10x ChIP Buffer	1.800µl	-
High Salt-Puffer (3.000µl)	300µl 10x ChIP Buffer	2.490µl	210µl 5M NaCl
Elutionspuffer (150µl)	75µl 2x Elution Buffer	75µl	-

In den folgenden Waschschröten wurde jeweils die vorgegebene Menge Waschpuffer zugegeben und die *beads* resuspendiert. Es folgte eine vierminütige Inkubation bei 4°C im e.o.e.-Gerät. Anschließend wurden die Proben jeweils eine Minute ins magnetische Rack gestellt und der Überstand verworfen. So wurde zuerst das Gefäß mit 200ml IP-Puffer gespült und in ein neues überführt. Der Rand des alten Gefäßes wurde abermals mit 200µl IP-Puffer nachgespült und die Lösung in das Neue überführt, sodass insgesamt mit 400µl IP-Puffer gewaschen wurde. Es folgte oben beschriebene Inkubation und Verwurf des Überstandes. Die Proben wurden danach zweimal mit 500µl IP-Puffer gewaschen. Es folgten zwei Waschungen mit 1ml *Low Salt-Puffer* und drei Waschungen mit 1ml *High Salt-Puffer*. Nach Verwerfen des Überstands wurde jede Probe mit 150µl Elutionspuffer resuspendiert; auch dem Input

wurden 150µl Elutionspuffer zugegeben und letztere bei Raumtemperatur beiseitegestellt. Die Proben wurden bei 65°C und 1.200rpm 30 Minuten lang im Eppendorfschüttler von den *beads* eluiert.

Es schloss sich der *reverse crosslink* an, um die Protein-DNA-Fixierung zu lösen und die Proteine zu verdauen. Dafür wurden jeder Probe und dem Input jeweils 6µl 5M NaCl und 2µl Proteinase K zugegeben und bei 65°C für 3,5 Stunden inkubiert. Die DNA wurde wie in 3.1.9 beschrieben aufgereinigt.

Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegel

Aufgrund der negativen Ladung der DNA lässt sich diese auf einem Agarosegel in einem Spannungsfeld der Länge nach Auftrennen. Kleine Fragmente werden im Gel weniger stark zurückgehalten und legen deshalb in gleicher Zeit eine größere Strecke zurück. Die Dichte des Agarosegels ist abhängig von der Konzentration der Agarose beim Gießen des Gels.

Dazu wurde die errechnete Menge Agarose in der passenden Menge TBE-Puffer (Zusammensetzung siehe 3.1.18) in der Mikrowelle aufgekocht. Die Lösung wurde nach dem Kochen mit destilliertem Wasser wieder auf die ursprüngliche Menge aufgefüllt, um den verdunsteten Teil zu ersetzen. Vor dem Beladen der Proben auf das ausgehärtete Gel wurden diese jeweils mit 5µl Orange-Dye gemischt. Für den Längenvergleich wurde pro 3 bis 5 Proben eine 100bp-*ladder* à 3µl parallel aufgetragen. In den ersten fünf Minuten wurden die Proben bei einer Spannung von 90V in das Gel einlaufen gelassen und danach bei 120V, bis die orangene Markierung im unteren Bereich der Kammer angelangt war. Das Gel wurde in einem Wasserbad mit Ethidiumbromid 10 Minuten schwenkend inkubiert, damit sich dieses in die DNA einlagert. Danach wurde das Gel 10 Minuten in einem Wasserbad entfärbt, um das überschüssige Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurden das interkalierte Ethidiumbromid und dadurch die aufgetrennte DNA in der UV-Fotokammer durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.15. Fragmentlängenkontrolle nach dem Scheren

Die Scherung sollte DNA-Fragmente im Bereich zwischen 200bp und 900 bp erzeugen. Um diese optimal auftrennen zu können, wurde ein 1,2%iges Gel gewählt. Es wurde jeweils 15µl der Probe aufgetragen.

3.1.16. Überprüfung eines PCR-Produktes

Die Länge der PCR-Produkte ist abhängig von der Wahl der Primer und anhand der Bestellunterlagen bekannt (siehe Tab. 3.10, Tab. 3.11). Sie liegen im Bereich von 60bp bis 250bp Länge. Um diese optimal auftrennen zu können, wurde ein 2%iges Gel gewählt. Es wurde jeweils 5 µl der Probe aufgetragen. Die aufgetragenen Proben wurden anhand der Schmelzkurven ausgewählt, sodass jeder unterschiedliche Verlauf einer Schmelzkurve auf ein Gel aufgetragen wurde, um auszuschließen, dass ein Anderes als das gewünschte Produkt amplifiziert wurde.

Verwendete Materialien

3.1.17. Chemikalien und Reagenzien

Agarose	USB Corporation
Aqua Clean	WAK-Chemie Medical GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco
EDTA-Trypsin-Solution	Sigma
Ethidiumbromid, 1%ig, 10mg/ml	Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
Formaldehyd, 16%ig, methanolfrei	Thermo Scientific
Hydrocortison, 10mg/ml	
Insuline bovine, 10mg/ml	
L-Glutamine, 200mM	Gibco
Natrumpyruvat (NaPy)	Sigma
Orange-Dye	
Penicillin-StreptoMYCin, 10.000 U/ml Pen. , 10µg/ml Strep.	Gibco
RPMI 1640 Medium	Gibco
Terralin liquid disinfection	Schülke
Wasser (H ₂ O)	Braun

3.1.18. Puffer und Lösungen

IP-Spezialpuffer	6,6 ml 5M NaCl 10,1ml 1M Tris-HCl (pH 7,5) 2,02ml 0,5M EDTA 0,1% SDS 2,2ml 100x Triton 79,08ml H ₂ O
TBE-Puffer (1x), pH 8,3	90mM Tris (10,8g) 90mM Borsäure (5,5g) 1,25mM Na ₂ -EDTA (0,93g)

3.1.19. Oligonukleotide**Tab. 3.10: Primer für die quantitative PCR des ChIP-Pulldowns**

Die Primer wurden nach Kontrolle durch den *Primer-BLAST* von NCBI bei Metabion bestellt. Die unteren sechs Primersequenzen wurden uns freundlicherweise von Dr. K. Wendt zur Verfügung gestellt.

Name	Primersequenz (5' zu 3')	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
ZDBF2	F: AGCATCTTTGGATAGGGGGTC R: TGGGGTCAGAAACTGCACGA	86bp	60°C
IGF2R CTS1	F: AGGCCAATGAGAGAGGTGGT R: GTGTAGAGGGCCACAATCGG	142bp	60°C
IGF2R CTS2	F: AGCCAGATCCTTTTCTGTGGC R: GGTGGACAGACCTTTCGAGT	109bp	60°C
CTCF AD	F: GGCCGCTTAACAAACCTTGG R: TGGCCTTCCAGTACCTCGAT	116bp	60°C
CCD	F: GCCTCTCTCCACCAAGTGAC R: AGCCATTGTCCCCGATTCC	202bp	60°C
CTCF DS	F: CCCTTAGCAAAGTGTGCCCTTC R: GGAGGGGCCTGACTTGTTTTAC	215bp	62°C
H19 ICR	F: TGTGGATAATGCCCGACCTGAAGATCTG R: ACGGAATTGGTTGTAGTTGTGGAATCGGAAGT	209bp	64°C
SYN3 site	F: GGCTCAGGACAGAAGTGACC R: AGGTCCGGCAGAGGCTCC	187bp	64°C
CCD1 KW	F: TTCAGCCGGTTCAAGGGACG R: CTAGGGAGGAGGACAGAGGCAAGAG	187bp	60°C
STAT3 site	F: CCTCCCTTACCGCTGATGTC R: CTAAGCCTCCAGGCACCTTC	100bp	60°C
MYC site	F: CCCACCGGCCCTTTATAATG R: CTGCCTCTCGCTGGAATTAC	233bp	60°C
OSBP	F: GCTGCTGTTTCCGCCATTCATTT R: GCTGATACCAACCACCAATCCATGAG	115bp	60°C

Tab. 3.11: Primer zur Expressionsanalyse

Die Primer wurden nach Kontrolle durch den *Primer-BLAST* von NCBI bei Metabion bestellt. Bei den oberen Drei handelt es sich um die ‚Haushaltsgen‘-Primer, die bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden waren.

Name	Primersequenz (5' zu 3')	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
HPRT	F: ATTGACACTGGCAAACAATGC R: TCCAACACTTCGTGGGGTCC	110bp	61°C
ATP5J	F: CTCGGGACTGAGTGCAAGAA R: CCTCCGCAAATGGACTGAGA	94bp	62°C
ACTB	F: GGCATCCTCACCCCTGAAGTA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	132bp	60°C
IGF2	F: CCGTGCTTCCGGACAAC R: CTGCTTCCAGGTGTCATATTGG	69bp	62°C
H19	F: GGCCTTCCTGAACACCTTAG R: TGAGCTGGGTAGCACCATTT	142bp	61°C
IGF2R	F: TTGAGTGGCGAACGCAGTAT	130bp	60°C

	R: CCAGTGATGGCTTCCCAGTT		
MYC	F: TCTCCGTCCTCGGATTCTCT R: GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT	231bp	62°C
STAT3	F: AAGACCCAGATCCAGTCCGT R: GGTCTTCAGGTATGGGGCAG	231bp	60°C
OSBP	F: AACGAACGAGCCCACTCTT R: CAGAACCCACATTGCCAGGA	241bp	62°C

3.1.20. Antikörper

Tab. 3.12: verwendete Antikörper bei der Chromatin-Immunoprecipitation

Antikörper	Menge pro IP	Wirtstier	Eigenschaften	Firma
IgG	2,5µl	Hase	Polyklonal, Unkonjugiert	Cell Signaling
Anti-RAD21	3,5µl Niedrig: 2,5µl Hoch: 5µl	Hase	Polyklonal	Abcam
Anti-SMC1	7µl Niedrig: 5µl Hoch: 10µl	Hase	Polyklonal	Bethyl

3.1.21. Enzyme und Nukleotide

KAPA SYBR FAST qPCR 2x Master Mix	KAPA Biosystems
KAPA SYBR FAST DNA Polymerase	
Reaction Buffer	
SYBR Green 1 dye	
MgCl ₂	
Molekulargewichtstandard 100bp-ladder	Invitrogen
Proteinase K, 10mg/ml	Roche
RNase A, 10mg/ml	Cell Signaling

3.1.22. Kits

cDNA Kit

M-MuLV Reverse Transkriptase BioLabs

m-MuLV Reverse Transkriptase Buffer BioLabs
(10x)

RiboLock RNase Inhibitor, 40U/ μ l Thermo Scientific

Oligo dTs Metabion

PCR Grade Nucleotide Mix Roche

Peq Gold total RNA Kit PeqLab

PerfectBind RNA Columns

DNA Removing Columns

Collection Tubes, 2,0ml

RNA Lysis Buffer

RNA Wash Buffer I

RNA Wash Buffer II

RNase-free Water

QIAquick PCR Purification Kit Qiagen

PB Buffer, Binding Buffer

PE Buffer, Wash Buffer

EB Buffer, Elution Buffer

QIAquick Spin Columns

pH Indikator I

SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit Cell Signaling

Glycin Solution, 1M

ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads

ChIP Buffer (10x)

NaCl, 5M

ChIP Elution Buffer (2x)

Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (200x)

truChIP Chromatin Shearing Reagent Kit Covaris

Lysis Buffer B (5x)

Wash Buffer C (10x)

Shearing Buffer D₃ (10x)

Protease Inhibitor Solution F (100x)

3.1.23. Verbrauchsmaterialien

Gefäße, 15ml und 50ml	Greiner
Handschuhe	
'Peha-soft powderfree	Hartmann
Nitrile	Semper Care
Kryokonservierungsgefäße (1,2ml)	Nalgene
LightCycler 96 Well Platten 'Sapphire	Greiner bio-one
Microplatte für RT-PCR'	
Matrix-Spitzen, 250µl	Thermo Scientific
microAFA-Tubes	Covaris
Pipettenspitzen, gestopft, 10µl, 200µl, 1.000µl	StarLab
,TipOne'	
Pipettenspitzen, ungestopft 5ml ,Finntip'	Thermo
Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym Scientific
Reaktionsgefäße, 0,5ml, 1,5ml, 2 ml, 5ml	Sarstedt
Serologische Pipetten ,Cellstar', 5ml,10ml,25ml	Greine
Zellkulturflaschen, 'TC-Flasche T175', 175 cm ²	ThermoScientific
Zellkulturschalen ,TC-Schale', Ø15cm	Sartedt
Zellkulturschalen 100, Ø10cm	TPP Techno Plastic Products AG
Zellschaber 'Cell Lifter'	Corning

3.1.24. Geräte

Eismaschine	Ziegra
Elektronische Pipette ,Matrix'	Thermo Scientific
End over end Gerät ,Rotator SB3'	Stuart
Gelelektrophoresekammer	PeqLab
	Owl Scientific
Gelelektrophoresespannungsgerät	Pharmacia Biotech
,Elektrophoresis Power Supply EPS 300'	
Lichtmikroskop ,ID 03'	Zeiss
PCR Gerät ,Professional Thermocylcer'	Biometra
Pipetboy 'Pipetus'	Hirschmann
Plattenzentrifuge ,Perfect Spin'	PeqLab
q-PCR Gerät ,Light Cycler 480 II	Roche

Material und Methoden

Reinraumwerkbank 'Microflow biological safety cabinet'	MDH Contamination Control
Spektrometer 'Nanodrop One'	Thermo Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifugen 'Fresco 21 Centrifuge'	Heraeus
Ultraschallgerät 'Focused.Ultrasonicator Unit Type M220'	Covaris
UV Fotokammer 'E-Box Vilber'	PeqLab
Vakuumpumpe (Zellkultur) 'Mini-Vac Power'	PeqLab
Vortex Mixer 'REAX 2000'	StarLab Heidolph
Waagen	Santorius laboratory
Wasserbad 'Certomat WR'	B.Braun Biotech International
Wippschüttler 'see-saw rocker SSL4'	Stuart
Zellkulturinkubationsschrank 'HERA cell'	Heraeus
Zentrifuge 'Sorvall RT6000D'	Thermo Scientific

3.1.25. Datenbanken

USCS Genome Browser, GRCh37/hg19	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr21%3A33031597-33041570&hgside=716198851_mkEAAkbJHNAT5ZO3Gfha hplfeol9 CTCF-Binderstellen: ENCODE Transkription Factor Bindung tracks, CTCF Binding Sites by ChIP-seq from ENCODE/University of Washington [Euskirchen et al. 2007]
NCBI Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
NCBI PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich in zwei große Methodengebiete unterteilen: Mithilfe der Chromatin-Immunopräzipitation wurde die Bindung des Proteins Cohesin an die DNA untersucht, während in der Expressionsanalyse die Expression der untersuchten Gene quantitativ analysiert wurde.

Ziel der Untersuchungen war es, einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der *lncRNA H19* und der Cohesinbindung zu zeigen. In den ChIP-Experimenten wurden dafür ausgewählte Regionen in Fibroblastenkulturen mit einer hohen und einer niedrigen *H19*-Aktivität verglichen. Die Expressionsanalyse sollte zeigen, ob diese Bindungsunterschiede auch funktionell relevant sind, indem sie die Expressionsstärke der sich in der untersuchten Region befindlichen Gene vergleicht.

Bindungsanalyse mithilfe der Chromatin-Immunopräzipitation

Es sollte die Rolle der *lncRNA H19* bei der CTCF- und Cohesin-Positionierung untersucht werden. Tsai und Mitarbeitende zeigten 2018, dass *Myogenin* als *lncRNA* in der Lage ist, diese Positionierung zu beeinflussen.

Mithilfe der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) kann mit Antikörpern die Bindung eines Proteins an die DNA untersucht werden. Um die Bindung von Cohesin an die CTCF-Bindestellen zu untersuchen, wurden zwei Antikörper getestet (Anti-SMC1 und Anti-RAD21), die jeweils gegen eine Kernuntereinheit des Cohesins (siehe Seite 10) gerichtet sind. Der Pulldown wurde mittels qPCR auf ausgesuchte CTCF-Bindestellen untersucht.

Um die Unterschiede in der Bindung in Abhängigkeit von *H19* zu untersuchen, wurden drei primäre Fibroblastenkulturen und zwei Tumorzelllinien verwendet; Von diesen Zelllinien kann eine kein *H19* exprimieren (BWS Δ H19/ICR1) während in den anderen vier das *H19*-Transkript in unterschiedlichen Maßen vorhanden ist.

4.1.1. Fragmentlängenkontrolle

Die DNA und die assoziierten Proteine wurden mit Formaldehyd aneinander fixiert und anschließend vor der eigentlichen Präzipitation mittels Ultraschallwellen zufällig fragmentiert, um dann die gebundenen Stücke von den ungebundenen trennen zu können. Dabei spielte die Größe der Fragmente eine entscheidende Rolle. Zu große Fragmente behindern die Effizienz der ChIP, während zu kleine Fragmente potentiell

die zu amplifizierenden Bereiche zertrennen, sodass sie später nicht mehr nachgewiesen werden können. Deshalb sollten sich die meisten Fragmente in einer Länge zwischen 200 und 800bp bewegen.

Die Länge der Fragmente wurde jeweils vor der Präzipitation überprüft und solche Proben einer Zelllinie vereinigt, die dem Größenkriterium entsprachen. Bei zu vielen großen Fragmenten wurde die Probe verworfen.

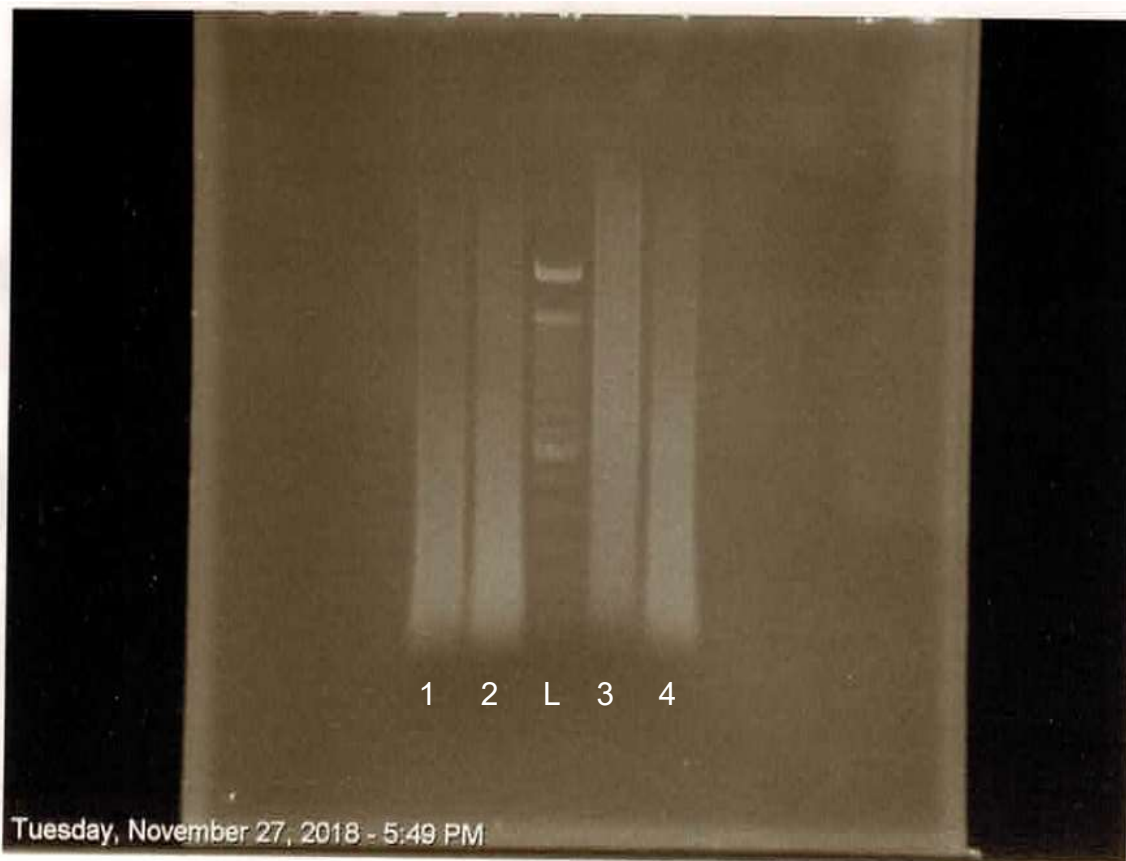


Abb. 4.1: Fragmentlängenkontrolle bei BWS Δ H19/ICR1 im 3. Durchlauf

Auf das 1,2%ige Agarosegel wurde mittig eine 100bp-ladder(L) zum Vergleich aufgetragen. In diesem Fall wurden die Proben 1, 2 und 4 vereinigt und daraus der ChIP-Ansatz hergestellt, während Probe 3 aufgrund der unzureichenden Fragmentierung verworfen wurde.

4.1.2. Auswahl der zu untersuchenden Regionen

Die in der qPCR untersuchten Regionen sind allesamt bekannte CTCF-Bindestellen, die im *UCSC-Genome Browser* im Genom GRCh37/hg19 (ENCODE Transkription Factor Bindung tracks, CTCF Binding Sites by ChIP-seq from ENCODE/University of Washington) ausfindig gemacht wurden.

Für die CTCF-Bindestellen im *H19-IGF2-Locus* (**CTCF AD**, **CCD**, **CTCF DS**) wurden Positionen und Namen auf Grundlage der Daten aus Nativio *et al.* 2009 gewählt. Es

wurde angenommen, dass *H19* hier seine eigene Expression beeinflussen könnte, da diese Stellen maßgeblich an der Chromatinstruktur des Locus beteiligt sind.

Ein Partner aus dem IGN ist der *IGF2*-Rezeptor (***IGF2R***), welcher *IGF2* bindet und dessen Wirksamkeit abschwächt. Das *IGF2R*-Gen liegt auf Chromosom 6 (6q25.3) und ist genau wie *H19* paternal imprintet, sodass es nur auf dem maternalen Allel aktiv ist. Bei einer *H19*-Depletion reagiert es mit Expressionssteigerung, sodass eine Koregulation vermutet wird [Patten *et al.* 2016].

ZDBF2 (*Zinc Finger DBF-Type Containing 2*) ist genau wie CTCF ein Protein der Zinkfingerfamilie, dessen Gen auf Chromosom 2 (2q33.3) teilweise nur paternal aktiv ist. Die DMR des Gens ist bekannt und es wurde in einer vorherigen Arbeit der Arbeitsgruppe [Koch 2016] als in seiner Expression von *H19* abhängig gefunden.

4.1.3. Schmelzkurve des qPCR-Produktes

Am Ende der qPCR wird das entstandene Produkt durch konstante Temperaturerhöhung aufgeschmolzen und der Abfall der Fluoreszenz aufgezeichnet. Am spezifischen Schmelzpunkt eines Produktes fällt die Fluoreszenz besonders stark ab, sodass sich in der 1. Ableitung ein Peak zeigt. Dieser spezifische Schmelzpunkt ist von der Länge und dem CpG-Gehalt des Produktes abhängig und gibt demnach eine Einschätzung, ob das Produkt rein ist oder sich aus mehreren Produkten zusammensetzt.

Anhand der Schmelzkurve kann man auch erkennen, inwiefern das Produkt von Primer-Dimeren verunreinigt ist. Dabei wurden nur solche Werte mit in die Berechnungen übernommen, bei denen Primer-Dimere weniger als 1/5 des gesamten Produkts ausmachten (siehe Tab. 4.1). Proben mit höheren Werten für Primer-Dimere in der Schmelzkurve wurden aus den Berechnungen ausgeschlossen, da nicht bestimmt werden kann, welchen Einfluss die Primer-Dimere auf die Konzentration haben. Proben, deren Schmelzkurven ausschließlich einen Peak auf Höhe der Primer-Dimere aufwiesen und demnach kein Produkt enthalten, wurden als 0 gerechnet.

Tab. 4.1: Auswirkung der geringen Primer-Dimermengen auf die Konzentration

Hier sind vier Beispiele aufgeführt, um zu zeigen, dass eine geringe Primer-Dimer-Verunreinigung die Konzentration des Produktes nur unwesentlich beeinflusst. In der oberen Spalte sieht man jeweils das Duplikat ohne Primer-Dimer und unten das Duplikat, welches mit geringen Mengen Primer-Dimeren verunreinigt ist. CP=crossing point, T1= Temperatur des ersten Peaks der Schmelzkurve (Primer-Dimere), T2= Temperatur des 2. Peaks (gesuchtes Produkt)

	CP	Konzentration	T1 [°C]	Höhe 1	T2 [°C]	Höhe 2
WCCS1, III. Lauf, RAD21, CTCF AD	29,6	6,70E-02			82,19	14,95
„	29,67	6,38E-02	78,2	2,89	82,14	15,38
WCCS1, II.Lauf, RAD21, IGF2R CTS2	32,75	1,12E-02			83,77	13,77
„	32,83	1,06E-02	74,64	1,08	83,62	11,66
M8282, I. Lauf, RAD21, ZDBF2	30,8	4,96E-02			83,12	10,67
„	30,93	4,55E-02	74,8	1,19	83,15	10,12
M8282, I. Lauf, SMC1, OSBP	34,52	5,50E-03			82,98	13,85
„	34,86	4,31E-03	77,56	1,25	83,01	13,42

4.1.4. Produktüberprüfung mittels Agarosegel

Um das Produkt der qPCR sicher als erwartetes Produkt identifizieren zu können, wurde jeder Schmelzkurvenverlauf (siehe 3.1.8) mittels Agarosegel nochmals auf Reinheit überprüft. Aufgetragen wurde jeweils ein Produkt, dessen Schmelzkurve frei von Nebenpeaks war, dann ein Produkt, dessen zweigipflige Schmelzkurve auf eine Verunreinigung mit Primer-Dimeren hinwies und eine Probe, dessen Schmelzkurve sein Maximum bei einer niedrigeren Temperatur hatte und somit auf Primer-Dimere schließen ließ (siehe Abb. 3.5).

Bei allen Primern sind die Primer-Dimere aufgrund der Größendifferenz eindeutig von den Produkten zu unterscheiden. Die Proben mit ausschließlich Primer-Dimeren ergeben für diese Produkte eine Größe von circa 50 bis 100bp.

Bei den Produkten von *ZDBF2*, *IGF2R CTS2*, *CTCF AD*, *H19 ICR*, *SYN3site*, *STAT3site* und *OSBP* waren in der Probe mit nur einem Peak in der Schmelzkurve keine Nebenprodukte nachzuweisen. Produkte mit einer solchen Schmelzkurve wurden als rein angesehen.

Allerdings ist bei *IGF2R CTS1*, *CCD*, *CTCF DS*, *CCD1KW* und *MYCsite* in der laut Schmelzkurve sauberen Probe ein zweites Produkt in der Größe der Primer-Dimere zu erkennen. Vergleicht man die relativen Konzentrationen der Proben mit ausschließlich Primer-Dimeren und die des gewünschten Produkts aus der qPCR-

Ergebnisse

Analyse, so fällt auf, dass die Primer-Dimere im schlechtesten Falle 1/7 des Produktwerts ausmachen könnten. Demnach werden sie auch als sauber betrachtet.

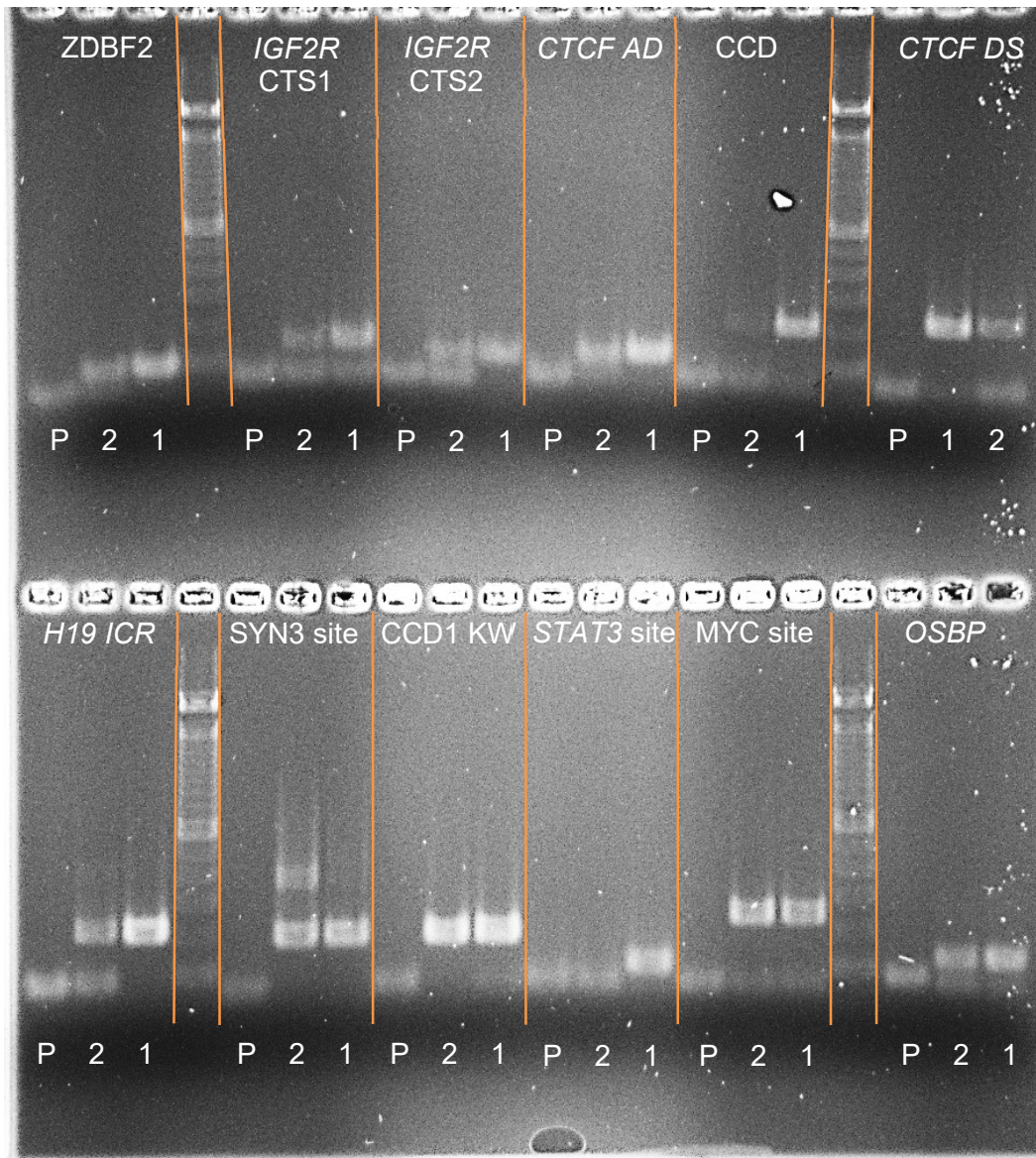


Abb. 4.2: Gelbild der ChIP-Produkte

Das 2%ige Agarosegel wurde mit einer 100bp-*ladder* zum Größenvergleich der Produkte beladen. Es beinhaltet von jedem Primer je ein Produkt, in dem nur Primer-Dimer vermutet werden (P), ein Produkt, dass zwei Gipfel in der Schmelzkurve besaß (2) und ein laut Schmelzkurve ‚reines Produkt‘ mit nur einem Peak in der Schmelzkurve (1).

Tab. 4.2: Sauberkeit der PCR-Produkte

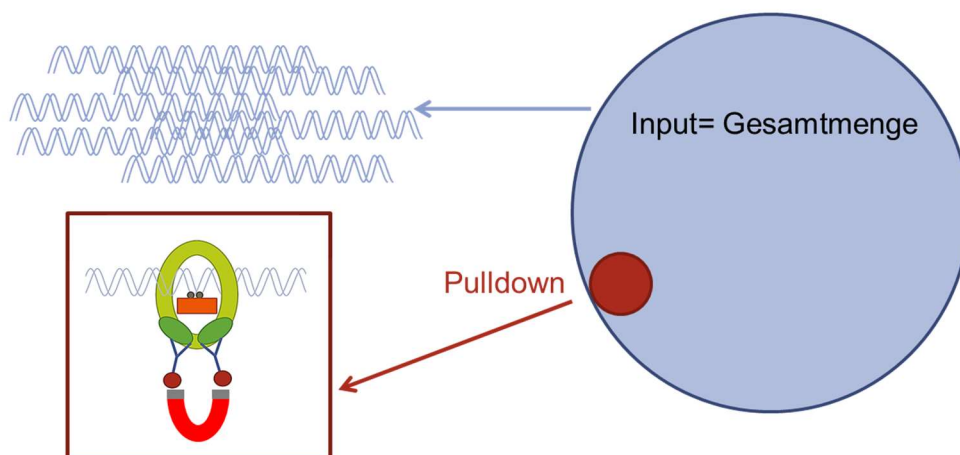
Die Gene, deren Gelbanden zweifelhaft auf ein zweites Produkt hinwiesen, wurden nochmals anhand der *crossing points* (CP) mit den Primer-Dimer-Proben verglichen. Die Zyklusdifferenzen (Zyklusdiff.) wurden als Exponent zur Basis 2 verrechnet, um den Faktor zu bestimmen, um den die Konzentration der Probe größer als die der Primer-Dimere ist.

	CP Produkt	CP Primer-Dimer	Zyklendiff.	Faktor, um den das Produkt größer ist
IGF2R CTS1	30,77	33,59	2,83	7,1
CCD	27,09	35,36	8,27	308,7
CTCF DS	29,57	34,81	5,24	37,8
CCD1 KW	27,94	40,00	12,06	4.269,9
MYC site	32,55	36,23	3,68	12,8

4.1.5. Bestimmung des %-Inputs sowie Einschlusskriterien

Die Daten wurden als relative Konzentrationen aus der qPCR entnommen. Für jede Probe wurden eine IgG-Negativkontrolle und ein Input mitanalysiert. Der Input entspricht dem gesamten, fragmentierten Chromatin, an dem keine Präzipitation durchgeführt wurde. So sollen Unterschiede in der Chromatinmenge und bei der generellen Zugänglichkeit der DNA-Abschnitte ausgeglichen werden. Das bedeutet, alle Daten sind bereits auf ihren Input normalisiert und in Prozentanteilen bezogen auf den Input angegeben.

$$\% \text{ Input} = \frac{\text{Pulldown}}{\text{Input}}$$

**Abb. 4.3: Berechnung des %-Inputs**

Der %Input berechnet sich, indem man die Konzentration des Pulldowns durch die Konzentration des Inputs dividiert. Die Werte werden in Prozent [%] angegeben.

Ergebnisse

In die Berechnungen sind nur solche Daten eingeflossen, die weitestgehend frei von Primer-Dimeren waren. Es wurden nur Werte berücksichtigt, deren Peak für das spezifische Produkt in der Schmerzkurve mehr als fünfmal so hoch war, wie die der vermeintlichen Primer-Dimere. Proben, die ausschließlich Primer-Dimere oder gar kein Produkt enthielten, wurden, solange das zweite Duplikat ein sauberes Produkt aufwies, aus der Wertung ausgeschlossen.

4.1.6. Die beiden Antikörper RAD21 und SMC1

Für die Experimente wurden zu Anfang zwei verschiedene Antikörper parallel verwendet; der Anti-RAD21-Antikörper von *Abcam* und der Anti-SMC1-Antikörper von *Bethyl*. Da beide Antikörper gegen Kernuntereinheiten des Cohesins gerichtet sind, welche im Cohesin im Verhältnis 1:1 vorliegen (siehe Seite 10), sind die Ergebnisse als gleichwertig anzusehen. Demnach wurde, falls notwendig, der Mittelwert der beiden Pulldown-Ergebnisse als Cohesinbindung betrachtet.

Tab. 4.3: Antikörpernutzung für Zellen und Durchläufe

In den jeweiligen Durchläufen wurden pro Zelllinie entweder beide Antikörper (2) oder nur der Anti-RAD21-Antikörper (1) verwendet. Bei der Zelllinie HB2 wurden kein dritter Lauf durchgeführt (-).

	1. Lauf	2. Lauf	3.Lauf
BWS ΔH19/ICR1	2	2	2
SRS UPD7 1	2	1	1
SRS UPD7 2	2	2	2
HB2	2	2	-
WCCS1	1	1	1

Die Evaluation der beiden Antikörper ergab einen leichten Vorteil des Anti-RAD21-Antikörpers, sodass in den darauffolgenden Experimenten nur noch dieser Antikörper verwendet wurde (siehe Tab. 4.3: Antikörpernutzung für Zellen und Durchläufe). Bei SYN3 zum Beispiel lieferte der Anti-RAD21-Antikörper in allen Zelllinien höhere Pulldownwerte als der Anti-SMC1-Antikörper, jedoch nicht bei allen wesentlich. Bei STAT3 und MYC zum Beispiel sind die Unterschiede meist geringer zwischen den beiden Antikörpern (siehe Abb. 4.4).

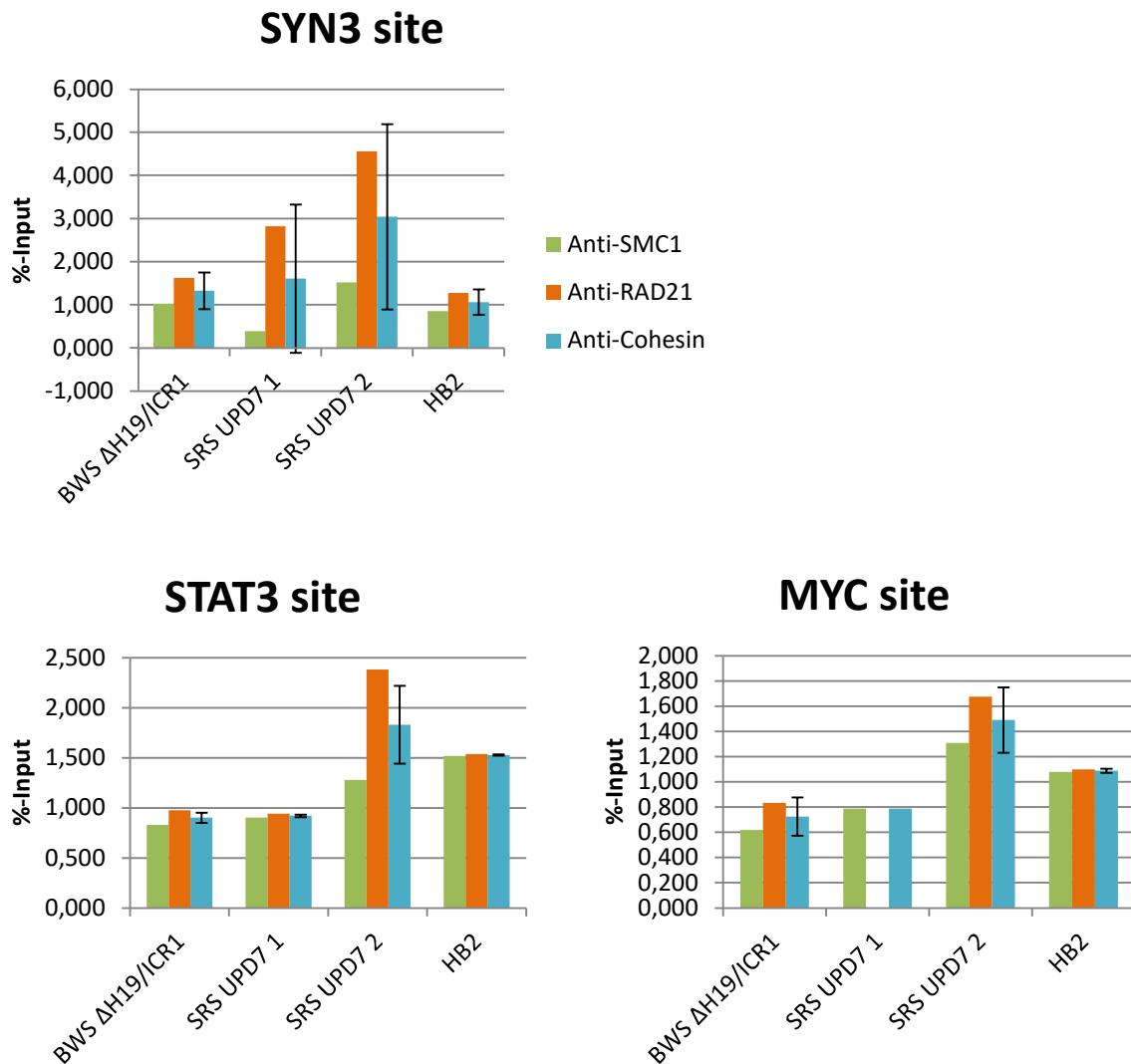


Abb. 4.4: Die Antikörper im Vergleich; SYN3, STAT3 und MYC, 1. Durchlauf

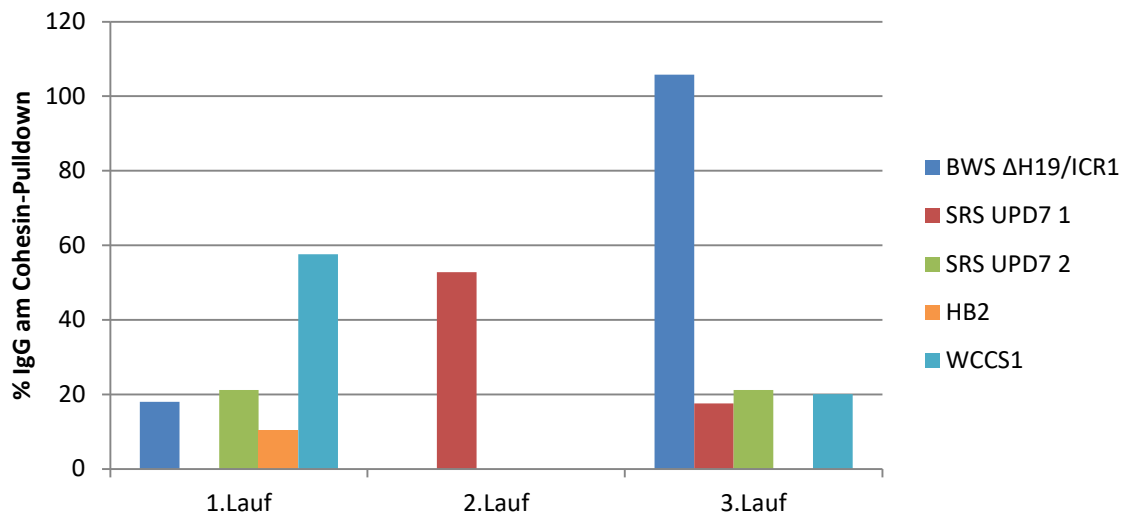
Hier sind sich exemplarisch die Pulldowns des ersten Durchlaufs der beiden Antikörper Anti-SMC1 (grün) und Anti-RAD21 (orange) gegenübergestellt. In türkis ist der Mittelwert der beiden Antikörper mit Standardabweichung aufgetragen. Alle Werte sind in %-Input angegeben.

4.1.7. Negative Bindungskontrolle mittels unspezifischem IgG

Das ungerichtete IgG-Gemisch aus einer unkonjugierten Maus dient als Bestimmung des Hintergrundniveaus der Bindung. In den meisten Fällen ist per qPCR gar kein Pulldown für die IgG-Probe nachzuweisen oder nur zu einem geringen Prozentsatz (bis 20%) des Cohesin-Pulldowns. In einigen Fällen scheint der IgG-Pulldown anteilig sehr groß zu sein, jedoch sind diese Werte stark mit Primer-Dimeren verunreinigt, sodass sie als Cohesin-Pulldownwerte nicht betrachtet werden wären. Allerdings können die Werte nicht ignoriert werden, da sie auch deutlich Anteile des wahren Produkts enthalten. Das bedeutet, der wahre Wert für die IgG-Pulldowns kann nicht bestimmt werden, liegt aber unterhalb des angegebenen Werts (siehe Abb. 4.5).

A

IgG bei ZDBF2



B

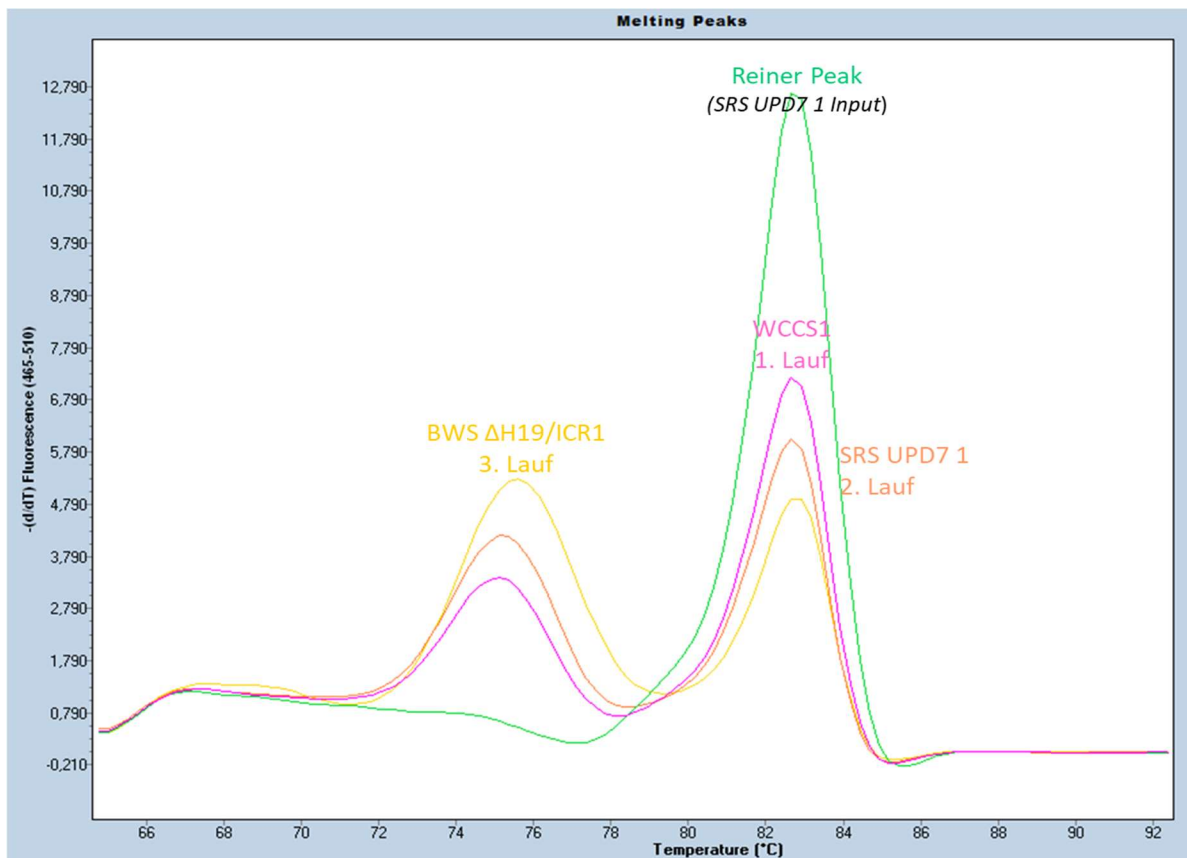


Abb. 4.5: IgG-Bindung am Beispiel von ZDBF2

A) Aufgetragen ist der anteilige Prozentsatz [%] des IgG-Pulldowns am Anti-Cohesin-Pulldown. Für die meisten gibt es keinen IgG-Pulldown (-) oder der Anteil liegt um oder unter 20% des Anti-Cohesin-Pulldowns. Für die Ausnahmen, bei denen der IgG-Anteil deutlich größer als 20% zu sein scheint, sind in **B)** die Schmelzkurven dargestellt. **B)** Aufgetragen ist die Ableitung der Fluoreszenz-Abnahme gegen die steigende Temperatur. Es werden die Schmelzkurven der drei Ausnahmen mit der sauberen Schmelzkurve von SRS UPD7 1, 3.Lauf, Input verglichen. Die drei sind stark mit Primer-Dimeren verunreinigt, sodass die Konzentration des wahren Produkts und somit der wahre Pulldown nicht zu ermitteln sind, jedoch unterhalb des angegebenen Werts liegen.

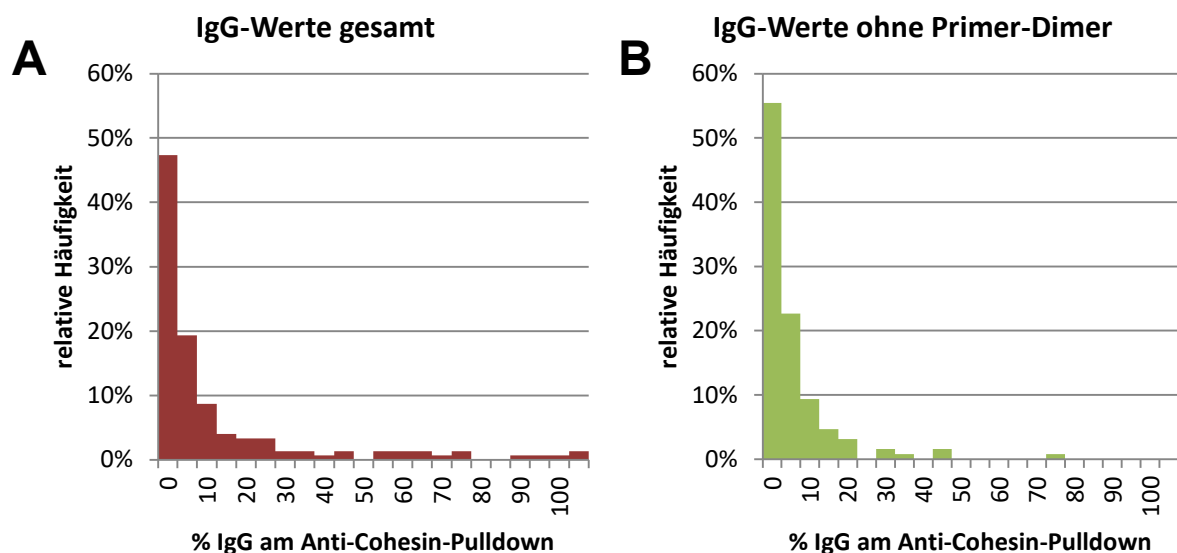


Abb. 4.6: Verteilung des IgG-Anteils am Anti-Cohesin-Pulldown

Verteilung der relativen Häufigkeit des Anteils, den IgG am Anti-Cohesin-Pulldown hat. Aufgetragen ist die relative Häufigkeit (Bei A): n=150, bei B): n=128) gegen die Obergrenzen des Prozentsatzes von IgG. Bei A) sind alle Werte aufgetragen, bei B) nur solche, deren Schmelzkurve auf ein reines Produkt schließen lässt. Die 6 Ausreißer, die größer als 20% sind in Tab. 4.4 aufgelistet.

Die wenigen Ausnahmen, bei denen IgG einen nicht zu vernachlässigenden Anteil einnimmt (> 20%) und das Produkt nicht von Primer-Dimeren verunreinigt ist, sind in Tab. 4.4 zu finden.

Tab. 4.4: Nicht unerhebliche IgG-Pulldowns

Grau geschriebene Fälle wurden in der endgültigen Betrachtung nicht berücksichtigt. Die Daten des *IGF2R CTS1*-Lokus lassen sich allgemein nicht gut auswerten (siehe 4.1.11.2) Die Daten des 2. Laufes von SRS UPD 2 wurden aufgrund eines sehr hohen *OSBP*-Pulldowns ausgeschlossen (siehe 4.1.8).

	Pulldown IgG	Pulldown Cohesin	Prozentsatz
<i>IGF2R CTS1</i> , HB2, 1. Lauf	0,195	0,264	73,9%
<i>IGF2R CTS2</i> , BWS Δ H19/ICR1, 3. Lauf	0,008	0,030	27,9%
<i>IGF2R CTS2</i> , WCCS1, 3. Lauf	0,028	0,064	43,0%
<i>CCD</i> , SRS UPD7 1, 2. Lauf	0,054	0,130	41,7%
<i>CCD</i> , SRS UPD7 2, 2. Lauf	0,113	0,394	28,8%
<i>CTCF DS</i> , BWS Δ H19/ICR1, 1. Lauf	0,163	0,484	33,7%

4.1.8. Kontrollregionen *OSBP* und *H19 ICR*

Mit *OSBP* als Negativkontrollregion und *H19 ICR* als Positivkontrollregion sollte die CHIP als Ganzes bewertet werden.

Ergebnisse

An der Stelle, an der die *OSBP*-Primer binden befindet sich, nach dem *UCSC genome browser* keine CTCF-Bindestelle, sodass dort keine Detektion einer Cohesinbindung zu erwarten ist.

Es ist aus molekulargenetischen Analysen der Zelllinien bekannt, dass in den BWS Δ H19/ICR1- Zellen die *H19 ICR* auf dem physiologisch aktiven mütterlichen Allel deletiert ist [Bachmann *et al.* 2016]. Da die väterliche ICR imprintet ist, steht keine intakte CTCF-Bindestelle zur Verfügung. In den restlichen Zelllinien ist eine Bindung an der, teilweise doppelt vorhandenen mütterlichen unmethylierten ICR zu erwarten.

Vergleicht man die Daten für *OSBP* in ihrer Stärke mit denen der *H19 ICR*, fällt auf, dass *OSBP* sich mit einer Ausnahme im Hintergrundbereich bewegt. Der Pulldown der Zelllinie SRS UPD7 2 ist im zweiten Durchlauf sogar höher als der gleiche Pulldown bei der *H19 ICR*. Da man so nicht zweifelsfrei ausschließen kann, dass die Daten dieses Laufes sich nicht alle im Hintergrundbereich aufhalten, wurde dieser zweite Lauf in der Gesamtbewertung der SRS UPD7 2-Zelllinie nicht berücksichtigt (siehe Abb. 4.7).

Im Bereich der *H19 ICR* wird deutlich, dass sich der Prozent-Input der depletierten BWS Δ H19/ICR1- Zellen noch unter dem Hintergrundniveau befindet, während die anderen Zelllinien mit intakter ICR einen deutlichen Pulldown von bis zu 0,9% Input aufweisen (siehe Abb. 4.7).

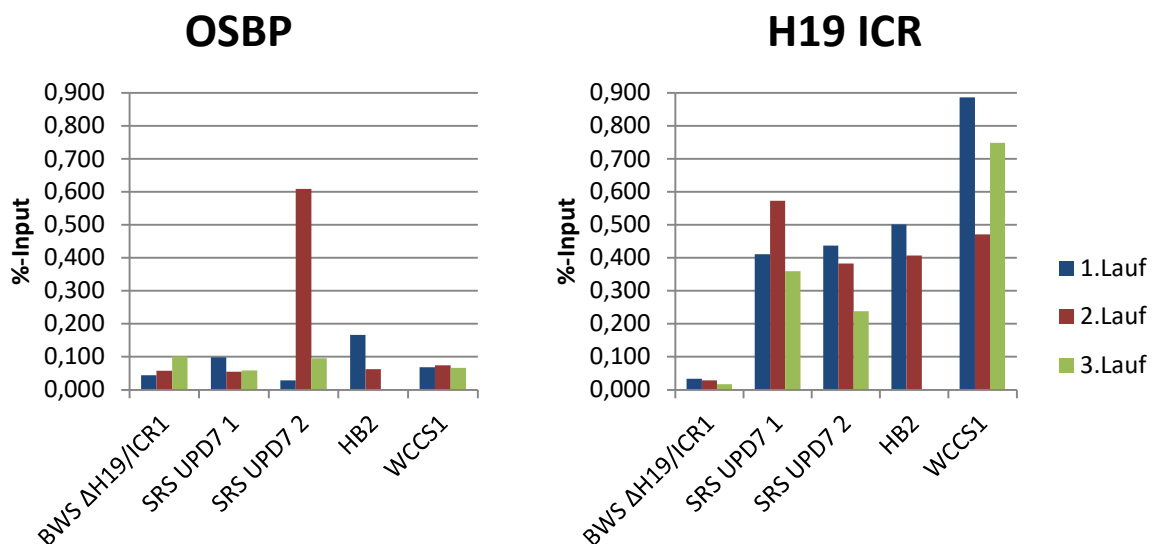


Abb. 4.7: Negativkontrolle *OSBP* und Positivkontrolle *H19 ICR*

Es wurde der %-Input gegen die einzelnen Zelllinien aufgetragen, nach den drei Durchläufen gestaffelt. Die Werte der Zelllinie SRS UPD7 2 aus dem 2. Durchlauf wurden aufgrund des hohen Pulldowns der Negativkontrolle *OSBP* nicht in der Gesamtbewertung verrechnet.

4.1.9. Auf den Input normalisierte PCR-Daten

Wie bereits unter 4.1.5 beschrieben, wurden die Rohdaten der Pulldowns zuerst auf den Input normalisiert (siehe Abb. 4.3). Dadurch ergeben sich für jede der fünf Zelllinien zwei oder drei Werte für den Anti-Cohesin-Pulldown. Bei HB2 und SRS UPD7 2 wurden jeweils nur zwei Läufe vereinigt. Bei HB2 wurden initial nur zwei Durchläufe durchgeführt und bei SRS UPD7 2 wurde der zweite Lauf aufgrund des hohen *OSBP*-Pulldowns aus der Wertung ausgeschlossen (siehe 4.1.8).

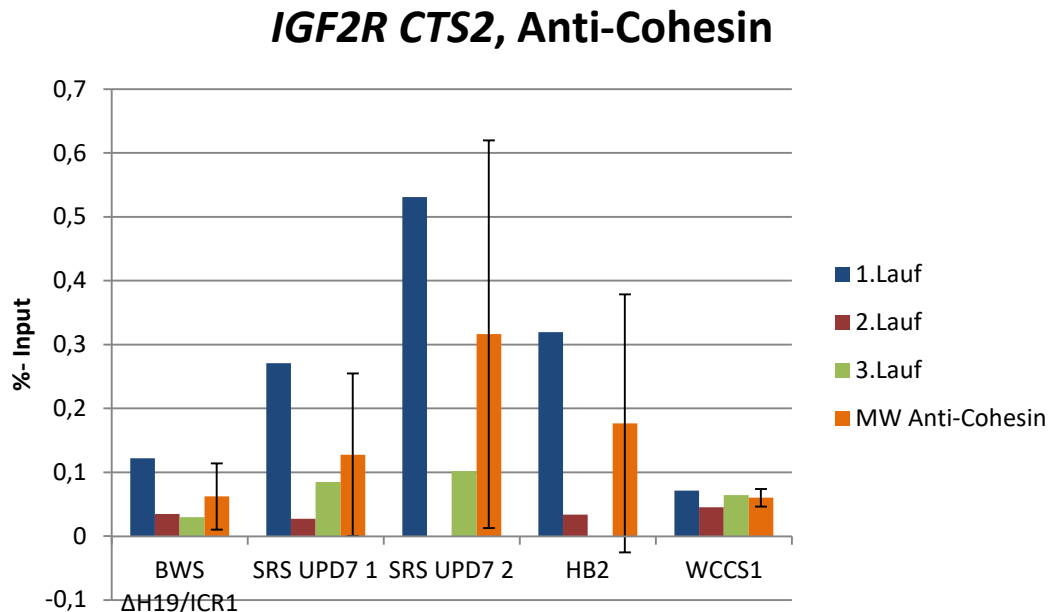


Abb. 4.8: Anti-Cohesin-Pulldown von *IGF2R CTS2*

Beispielhaft aufgetragen ist der %-Input des Anti-Cohesin-Pulldowns für die fünf Zelllinien, aufgelöst nach den drei Durchläufen. In orange ist das arithmetische Mittel der drei, bzw. zwei Läufe und die Standardabweichung als Fehlerindikatoren gezeigt.

Wie man in Abb. 4.8 erkennen kann sind die Werte trotz Normalisierung auf den Input in ihrem Niveau sehr unterschiedlich, während die Tendenz der einzelnen Läufe sehr ähnlich zu sein scheint. Deshalb wurden die Daten der zu untersuchenden Lozi nochmals auf Normalisierungsregionen normalisiert. Die nur einfach auf den Input normalisierten Daten der anderen Gene befinden sich im Anhang (7).

4.1.10. Normalisierung auf die Normalisierungsregionen MYC, STAT3 und SYN3

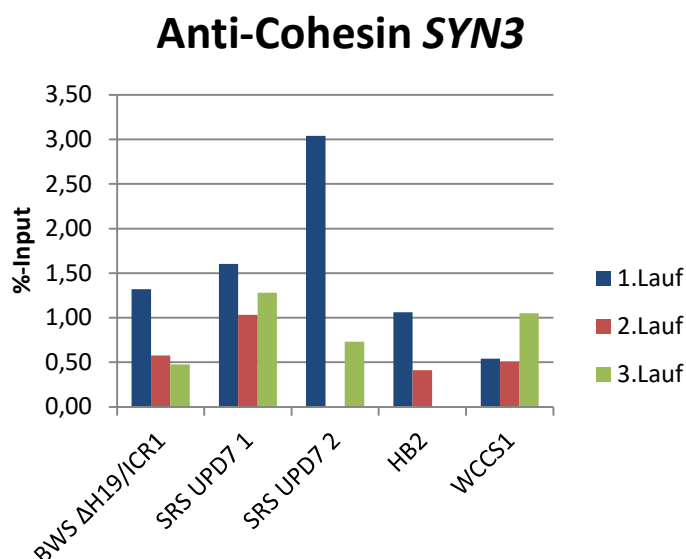
Ziel war es, die Datensätze der drei Durchläufe auf ein vergleichbares Niveau zu bringen, um sie anschließend zusammenführen zu können. Für eine zweite Normalisierung dienen die Pulldowns der Normalisierungsregionen MYC, STAT3 und SYN3 als Grundlage, welche in allen Zelllinien gleich stark exprimiert werden sollten. Ihre Werte wurden mithilfe des geometrischen Mittels zusammengefasst und die Daten dann den Läufen entsprechend auf diesen Mittelwert der drei Gene normalisiert.

MYC ist ein Protoonkogen, welches als *helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktor die Genexpression anderer Gene verstärkt.

STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der in der JAK-Kaskade durch Stimulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch die Janus-Kinase phosphoryliert wird.

SYN3 (Synapsin-3) ist ein Phosphoprotein, welches an der Verschmelzung von Neurotransmitter-Vesikeln mit der Zellmembran der Neurone beteiligt ist.

Die drei Gene zeigen meist ein ähnliches Verhältnis in den einzelnen Durchläufen. Der erste Lauf ist zum Beispiel in den meisten Zelllinien am stärksten, während bei WCCS1 eher der dritte Lauf am stärksten ist. Sie zeigen, dass besonders SRS UPD7 2 einen sehr starken Pulldown im 1. Lauf aufweist (siehe Abb. 4.9).



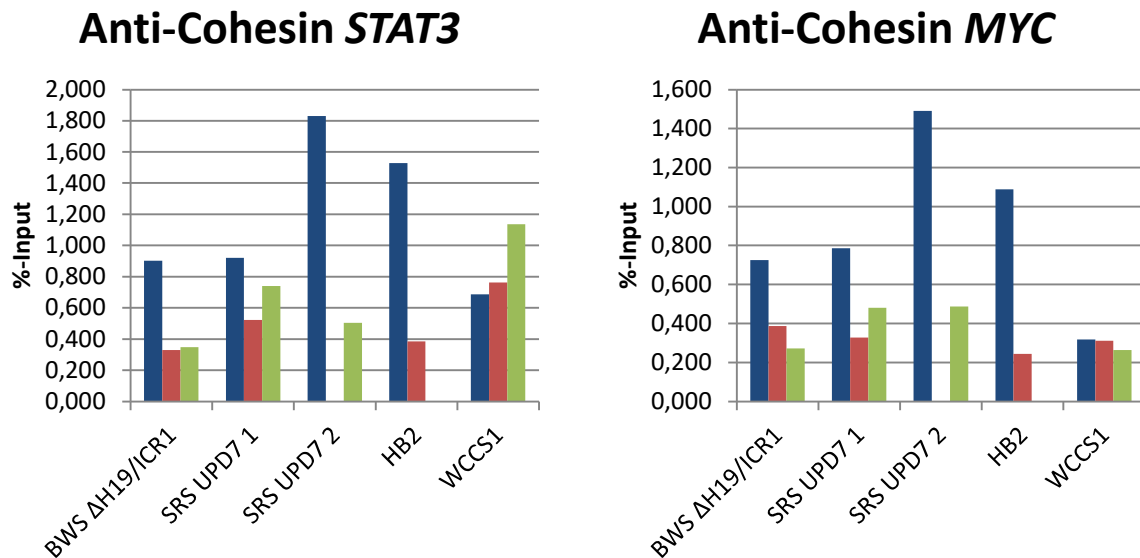


Abb. 4.9: Normalisierungsgene *SYN3*, *STAT3* und *MYC*

Aufgetragen ist der %-Input des Anti-Cohesin-Pulldowns für die fünf Zelllinien, aufgeschlüsselt nach den drei Läufen. Aus diesen Werten wurde jeweils pro Zelllinie und Durchlauf das geometrische Mittel gebildet und zur Normalisierung genutzt.

Normalisiert wurde der %-Input des betreffenden Gens auf das geometrische Mittel des %-Inputs der drei Gene *SYN3*, *STAT3* und *MYC* (siehe Abb. 4.10: Normalisierungsgrundlage: Geometrisches Mittel von *SYN3*, *STAT3* und *MYC* Abb. 4.10)

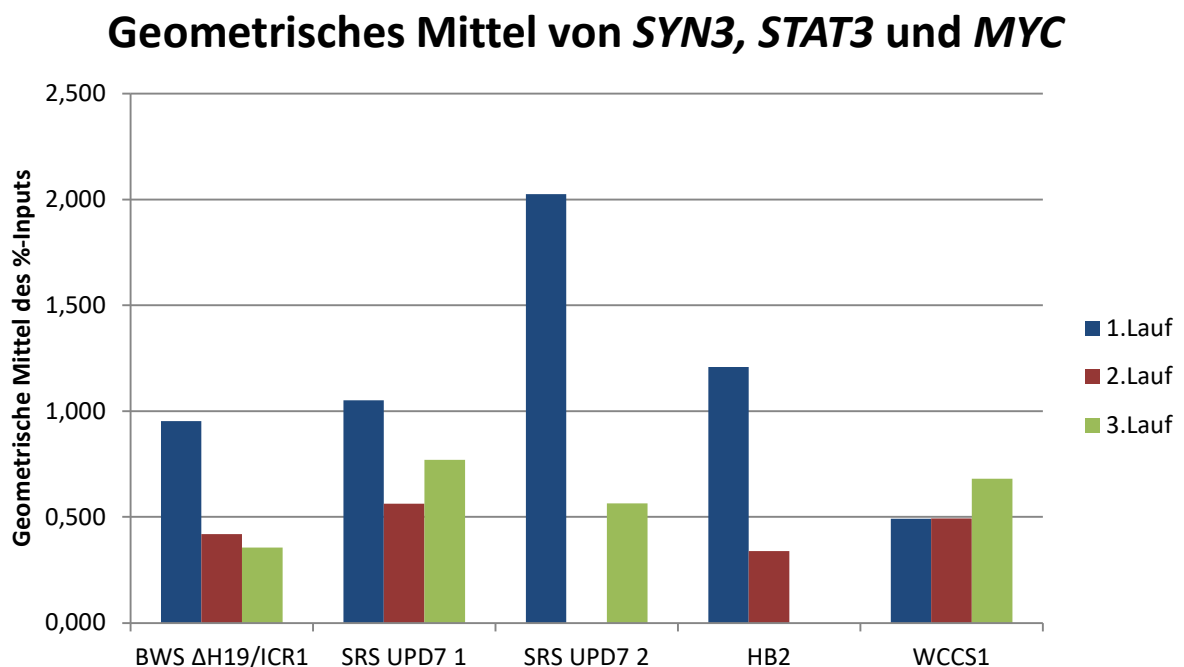


Abb. 4.10: Normalisierungsgrundlage: Geometrisches Mittel von *SYN3*, *STAT3* und *MYC*

Aufgetragen ist das geometrische Mittel des % Input der drei Normalisierungsgene *SYN3*, *STAT3* und *MYC* für die fünf Zelllinien, aufgelöst nach den drei Läufen. Aus den Werten aus Abb. 4.9 wurde jeweils pro Zelllinie und Durchlauf das geometrische Mittel gebildet und zur Normalisierung genutzt.

4.1.11. Zusammengefasste, zweifach normalisierte Daten

4.1.11.1. H19/IGF2-Lokus

Im *H19/IGF2*-Lokus sind vier CTCF-Bindestellen bekannt, welche essenziell für die räumliche Chromatinarchitektur des Lokus und damit auch für die Expression der Gene *H19* und *IGF2* sind. Die CTCF-Bindestellen *CTCF AD*, *CCD* und *CTCF DS* sind konstitutiv von Cohesin gebunden, während die ICR nur abhängig von ihrem Methylierungsstatus gebunden werden kann (siehe Seite 8).

Vergleichend wird der normalisierte %-Input der BWS Δ H19/ICR1-Zellen ohne *H19*-Expression (im Folgenden orange dargestellt) mit dem normalisierten %-Input der anderen vier Zelllinien mit *H19*-Expression (im Folgenden in grün und blau dargestellt) analysiert.

Die Pulldown-Werte für **CTCF AD** sind in ihrer Gesamtheit niedriger als die der anderen CTCF-Bindestellen im *H19/IGF2*-Lokus. Die größte Unterschiedlichkeit zwischen den Zelllinien zeigt sich im ersten Durchlauf, jedoch ist diese allgemein gering. Die Bindung scheint in Zellen mit und ohne *H19* ähnlich stark zu sein.

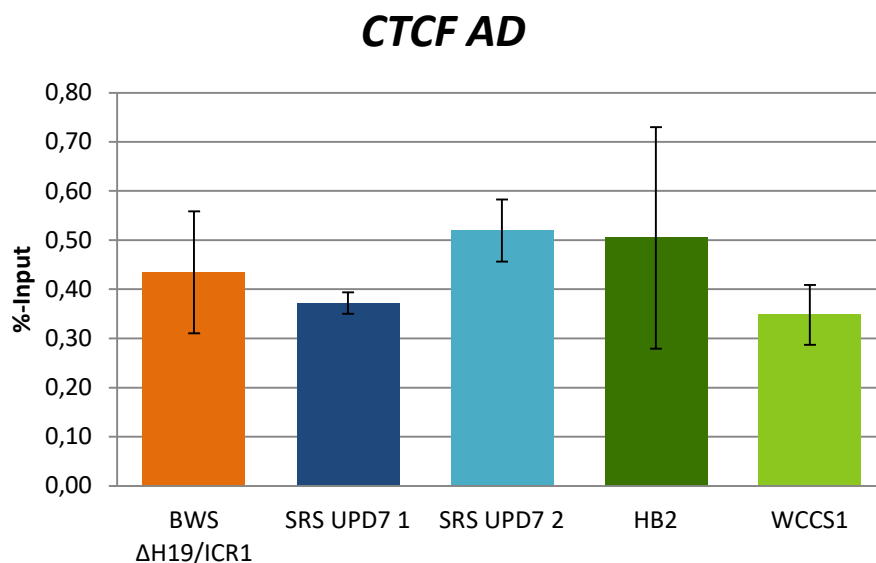


Abb. 4.11: Bindungsanalyse CTCF AD

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator.

Für die CTCF-Bindestelle **CCD** wurden zwei verschiedene Primer verwendet, die jedoch am gleichen CTCF-Peak binden, sodass ihre Ergebnisse äquivalent sein sollten. Der erste Primer (*CCD*) zeigt leicht niedrigere Werte für SRS UPD7 1 und WCCS1, dieser Unterschied ist beim zweiten Primer (*CCD1KW*) nicht so deutlich

erkennbar. Insgesamt ist der Pulldown für den *CCD1KW*-Primer etwas stärker, sie weisen mit um die 1,2% die höchsten Werte des *H19/IGF2*-Lokus auf.

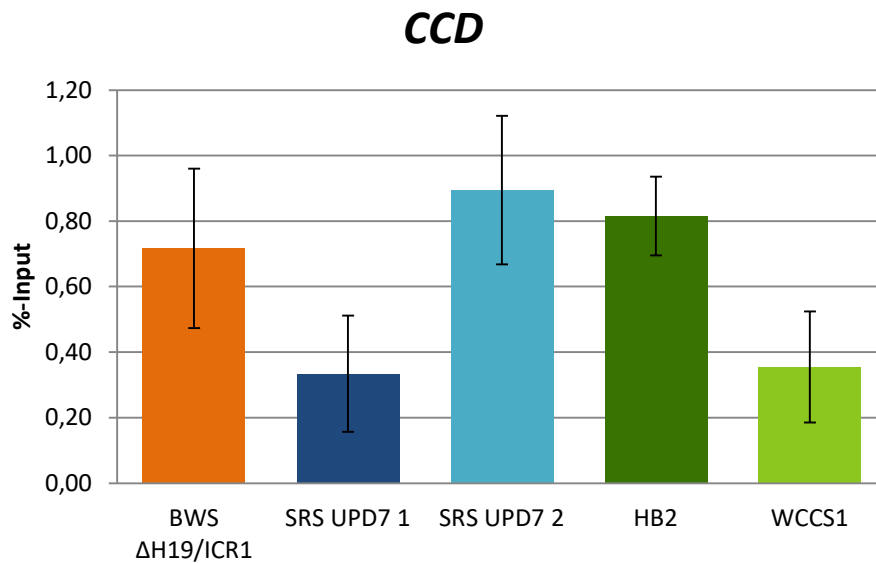


Abb. 4.12: Bindungsanalyse CCD

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator.

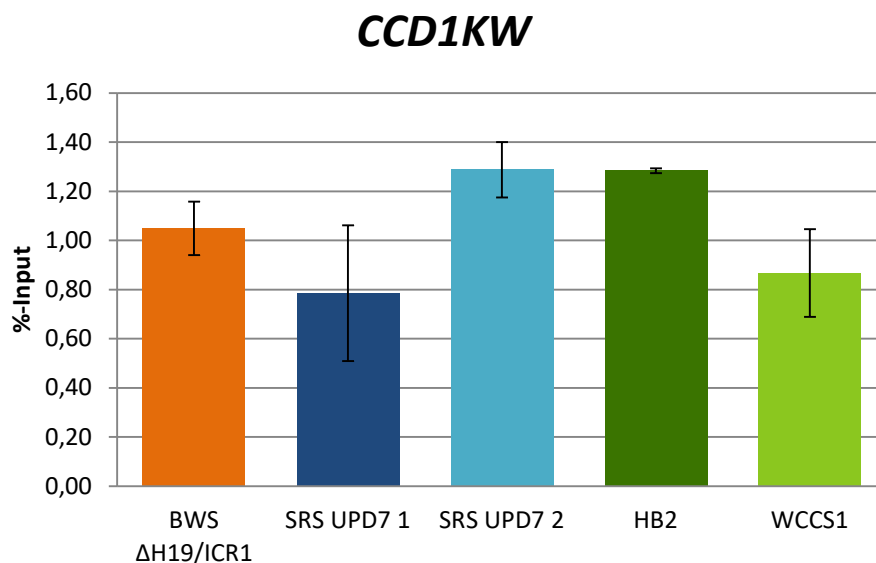
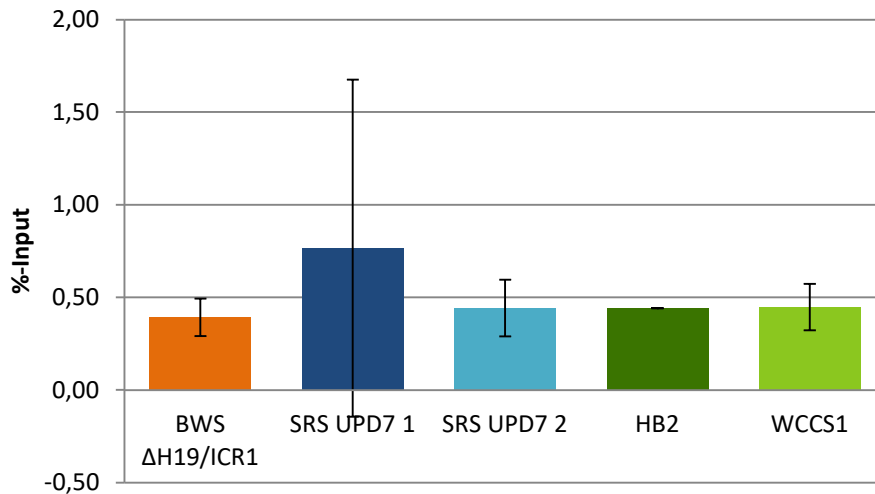


Abb. 4.13: Bindungsanalyse CCD1 KW

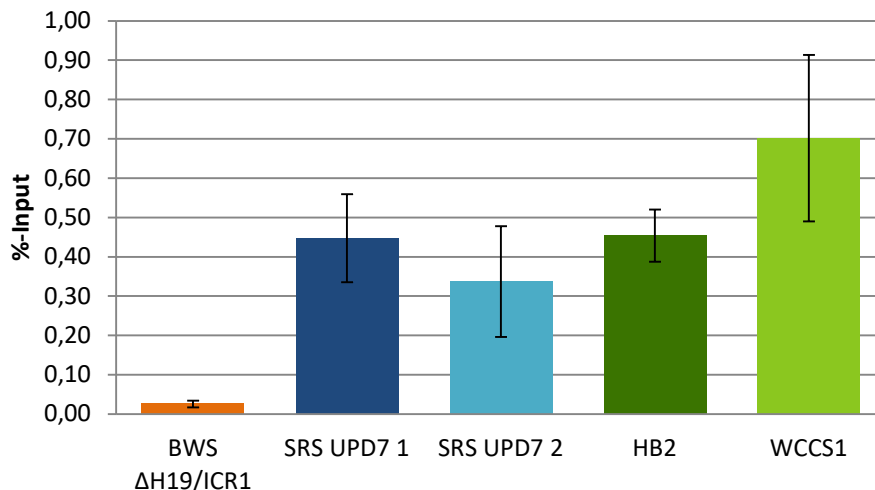
Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator. *CCD1 KW* beschreibt ebenfalls die Bindung am *CCD*-Peak, jedoch wurde die Analyse mithilfe eines anderen Primers durchgeführt.

Der Pulldown an der Stelle **CTCFDS** ist im Allgemeinen sehr niedrig (um 0,5%), jedoch ist im ersten Durchlauf der Zelllinie SRS UPD7 1 der Wert von 1,8% circa 7,5-mal so groß, wie die anderen beiden Werte der SRS UPD7 1-Zelllinie. Die restlichen Werte unterscheiden sich nur minimal.

CTCS DS**Abb. 4.14: Bindungsanalyse CTCF DS**

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator.

Betrachtet man die **H19 ICR**, fällt auf, dass in der BWS Δ H19/ICR1-Zelllinie die ICR nicht zugänglich ist, da kein Pulldown detektiert werden konnte. Ansonsten ist die Bindung der anderen Zelllinien mit um die 0,5% eher schwach. WCCS1 weist eine leicht erhöhte Bindung im Gegensatz zu den anderen drei Zelllinien SRS UPD7 1 und 2 und HB2 auf.

H19 ICR**Abb. 4.15: Bindungsanalyse H19 ICR**

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Bindungsstärke von Cohesin in an den CTCF-Bindestellen *CTCF AD*, *CCD* und *CTCF DS* zwischen den fünf Zelllinien kaum variiert. Es ist demnach keine Abhängigkeit von der Anwesenheit von *H19* zu erkennen. In der ICR lässt sich ein deutlicher Unterschied bemerken, der auf die depletierte ICR in der BWS $\Delta H19/ICR1$ -Zelllinie zurückzuführen ist.

4.1.11.2. Andere Lozi

Auf anderen Lozi wurden eine CTCF-Bindestelle in der Nähe der DMR von *ZDBF2* und zwei verschiedene CTCF-Bindestellen im Bereich des Gens *IGF2R* untersucht. Es zeigten sich hier mit 0,1 bis 0,4% relativ schwache Bindungen von Cohesin.

Bei *ZDBF2* ist der Pulldown des ersten Durchlaufs bei BWS $\Delta H19/ICR1$, SRS UPD7 1 und HB2 sehr viel höher als bei den restlichen Läufen. In der Gesamtbetrachtung erkennt man, dass die beiden Fibroblasten SRS UPD7 1 und 2 im Vergleich zu BWS $\Delta H19/ICR1$ einen leicht erhöhten Pulldown aufweisen. In der Zelllinie WCCS1 lässt sich in allen Läufen ein geringerer Pulldown als bei den anderen Zelllinien verbuchen.

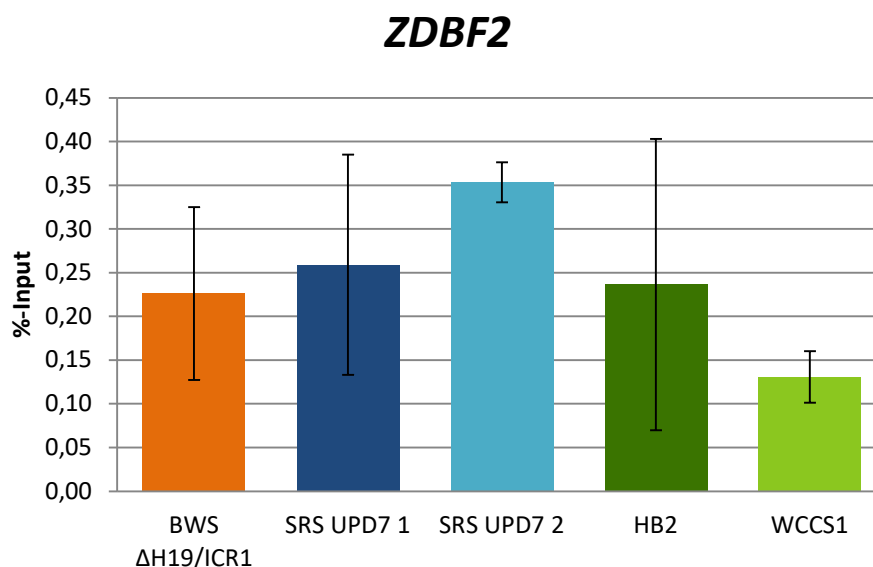


Abb. 4.16: Bindungsanalyse ZDBF2

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator.

Die Primer für *IGF2R CTS1* und *IGF2R CTS2* binden an zwei unterschiedliche CTCF-Bindestellen, sodass die Ergebnisse unabhängig voneinander betrachtet werden sollten.

Ergebnisse

Bei der *CTS1* (engl.: *CTCF binding site*, CTCF-Bindestelle) war der Pulldown schwer zu analysieren. Besonders bei der Zelllinie SRS UPD7 1 waren die Ergebnisse so durch Primer-Dimere verunreinigt, dass sie nicht ausgewertet werden können. Dafür weist SRS UPD7 2 einen erhöhten Pulldown auf.

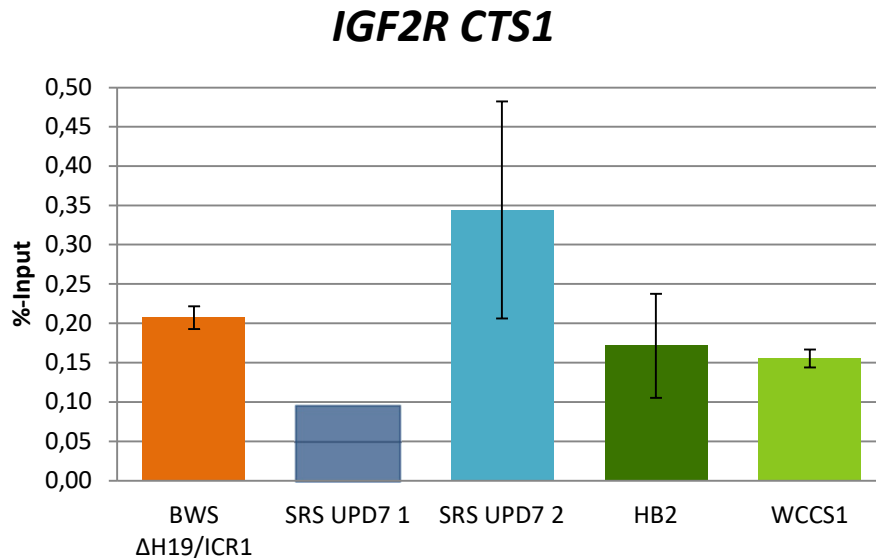
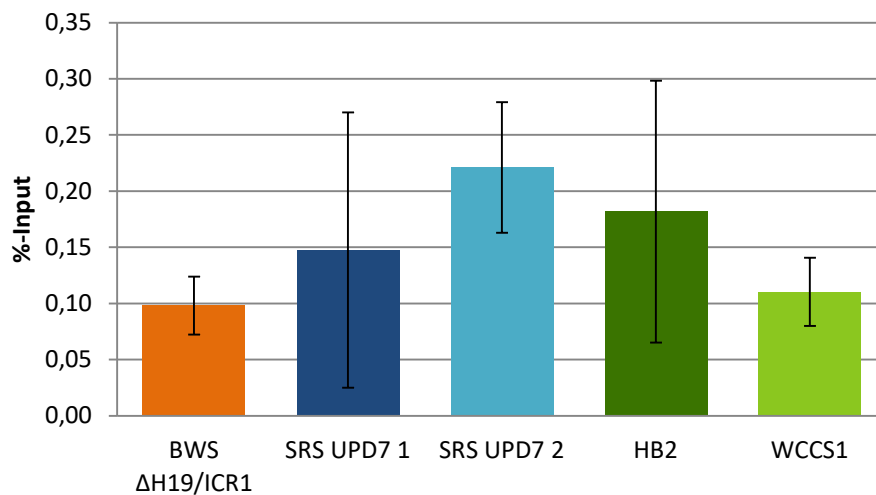


Abb. 4.17: Bindungsanalyse *IGF2R CTS1*

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikator. Bei SRS UPD7 1 ist nur ein Wert in die Auswertung eingeflossen.

An der *CTS2* bemerkt man zuerst, dass bei allen Zelllinien der erste Durchlauf den höchsten Pulldown zeigt. Während BWS Δ H19/ICR1 und WCCS1 relativ stabile Werte aufweisen, schwanken SRS UPD7 1, 2 und HB2 stark. Trotzdem zeigt sich, dass sowohl in SRS UPD7 1 als auch in SRS UPD7 2 in allen Läufen (Ausnahme SRS UPD7 1, 2. Lauf) und auch im Mittelwert höhere Bindungswerte als in der BWS Δ H19/ICR1-Zelllinie detektiert werden können.

IGF2R CTS2**Abb. 4.18: Bindungsanalyse IGF2R CTS2**

Aufgetragen ist der zweifach normalisierte %-Input der Anti-Cohesin-Bindung für die fünf Zelllinien. Es handelt sich hierbei um das arithmetische Mittel der einzelnen Lauf-Werte, zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerindikatoren.

Zusammenfassend zeigen sich bei *ZDBF2* fragliche und bei der *CTS2* deutlichere Unterschiede zwischen den SRS UPD7 Zelllinien und der BWS Δ H19/ICR1-Zelllinie. Die Daten der *CTS1* sind leider aufgrund der Primer-Dimere nicht belastbar.

Expressionsanalyse

Die Chromatinarchitektur spielt eine große Rolle bei der Regulation der Genexpression. CTCF und Cohesin können durch ihre Bindung an CTCF-Bindestellen (CTS) auf der DNA diese Architektur beeinflussen. Zum Beispiel ist es für das Ablesen von *H19* oder *IGF2* relevant, ob die zugehörige ICR unmethyliert ist und dadurch von CTCF und Cohesin gebunden werden kann [Bonev und Cavalli 2016, Wendt und Peters 2009, Nativio *et al.* 2009].

Untersucht werden sollte, ob es an den ausgewählten CTCF-Bindestellen einen Zusammenhang zwischen der Bindungsstärke des Cohesins und der Expression der unmittelbar benachbarten Gene gibt.

Dazu wurde die RNA der Zelle isoliert und spezifisch die mRNA in cDNA überschrieben. Die relative Konzentration dieser nun doppelsträngigen DNA wurde mithilfe einer qPCR bestimmt (siehe 3.1.7 und 3.1.8). Für die qPCR diente eine Verdünnungsreihe aus der cDNA der HB2-Zelllinie als Standardreihe. Somit sind die Ergebnisse von vorherein auf HB2 normalisiert, da bei der relativen Konzentrationsbestimmung die Werte für HB2 auf 1 festgesetzt wurden. Um diesen Fehler herauszurechnen, wurde anschließend eine relative Konzentrationsbestimmung anhand der *crossing points* berechnet.

4.1.12. Normalisierung auf die ‚Haushaltsgene‘

Um die Menge der vorhandenen mRNA in der Zelle abschätzen zu können, wurden die Expressionsergebnisse auf die cDNA-Menge sogenannter ‚Haushaltsgene‘ normalisiert. Als ‚Haushaltsgene‘ bezeichnet man Gene, die unabhängig von Zelltyp und Individuum auf einem stabilen Niveau exprimiert werden.

HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) ist ein Enzym des Purinstoffwechsels. Es katalysiert im *Salvage-Pathway* die Rephosphorylierung der Purinbasen zu Nukleotiden.

ATP5J (*ATP synthase-coupling factor 6*, mitochondrial) ist ein Protonenkanal in der inneren Mitochondrienmembran, der an der Synthese von ATP beteiligt ist.

ACT B (Beta-Aktin) ist eine der sechs Aktin-Isoformen, die im Menschen bekannt sind und ist essenziell für den kontraktile Apparat der Zelle.

Die vergleichende Analyse der relativen Konzentrationen der ‚Haushaltsgene‘ zeigt, dass *ATP5J* und *ACTB* in ihrer Aussage ähnlicher sind als mit *HPRT*. Für die Zelllinien HB2 und WCCS1 sind die Werte der drei ‚Haushaltsgene‘ weitestgehend identisch.

Die Werte für die beiden SRS UPD7-Zelllinien stimmen für *ATP5J* und *ACTB* eher überein, als wenn *HPRT* mitberücksichtigt würde. Die Abweichung der Werte für BWS Δ H19/ICR1 ist für alle gleich groß (siehe Abb. 4.19).

Demnach wurde entschieden, nur *ATP5J* und *ACTB* als Normalisierungsgrundlage zu benutzen.

Tab. 4.5: relative Konzentration der Expressionsanalyse der 'Haushaltsgene'

Die relativen Konzentrationen aus der qPCR der cDNA der drei 'Haushaltsgene'. Unter 'Alle' befindet sich das arithmetische Mittel der drei Konzentrationen, unter 'ATP5J+ACTB' sind nur diese beiden Gene durch das arithmetische Mittel vereinigt. Auf diese letzte Spalte wurden die Expressionsanalysen normalisiert. Die Daten sind in Abb. 4.19 visualisiert.

	HPRT	ATP5J	ACT B	Alle	ATP5J+ACTB
BWS ΔH19/ICR1	0,43	0,89	1,36	0,804	1,100
SRS UPD7 1	0,43	0,89	1,12	0,754	0,998
SRS UPD7 2	0,71	1,42	1,55	1,160	1,484
HB2	1,27	1,24	1,31	1,273	1,275
WCCS1	1,4	1,38	1,39	1,390	1,385

Normalisierungsgrundlage

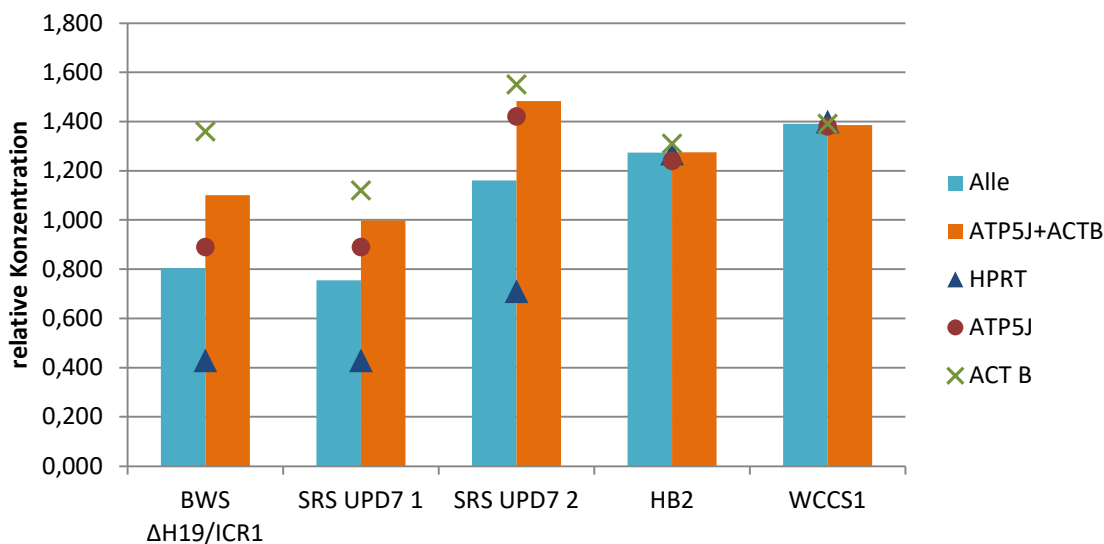


Abb. 4.19: relative Konzentration der Expressionsanalyse der 'Haushaltsgene'

Aufgetragen ist die relative Konzentration der drei 'Haushaltsgene', aufgeschlüsselt auf die fünf Zelllinien. Der türkise Balken bildet das arithmetische Mittel der drei Konzentrationen ab (Alle) und unter 'ATP5J+ACTB' wird im orangenen Balken das arithmetische Mittel nur dieser beiden Gene gezeigt. Die Daten wurden aus Tab. 4.5 entnommen.

4.1.13. Produktüberprüfung mittels Agarosegel

Um das Produkt der qPCR sicher als erwartetes Produkt identifizieren zu können, wurde jeder Schmelzkurvenverlauf mittels Agarosegel nochmals auf Reinheit überprüft. Aufgetragen wurde jeweils ein Produkt, dessen Schmelzkurve frei von Nebenpeaks war, gegebenenfalls abweichende Schmelzkurvenverläufe und eine Wasser-Probe.

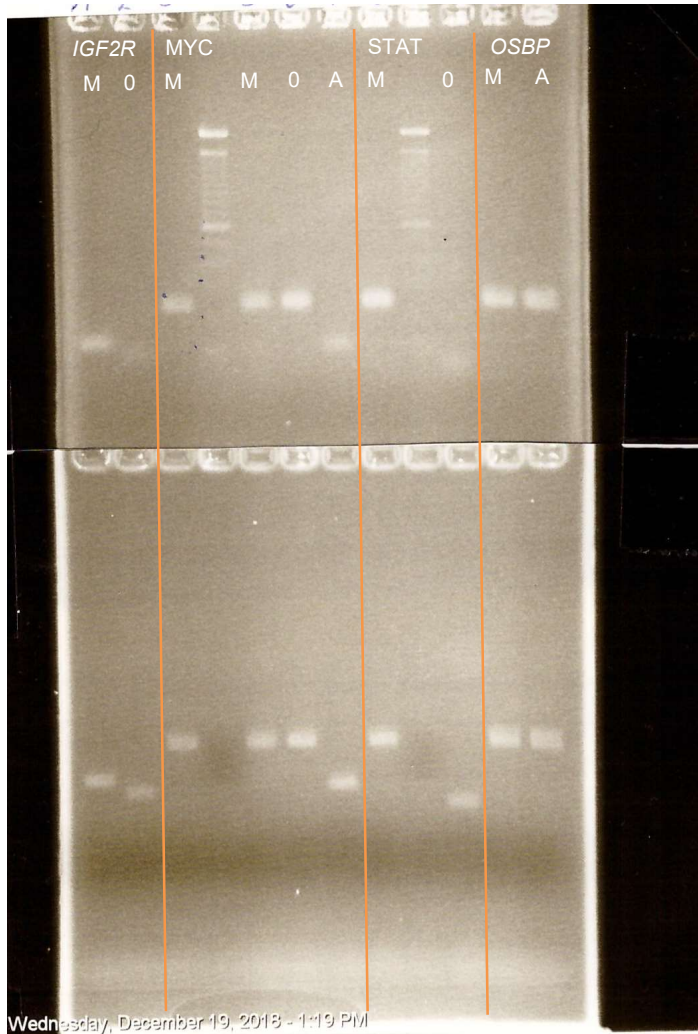


Abb. 4.20: Gelbild der Produkte der Expressionsanalyse

Das 2%ige Agarosegel wurde mit einer 100bp-ladder zum Größenvergleich der Produkte beladen. Es beinhaltet von jedem Primer je ein Produkt, welches der Mehrzahl der Produkte entspricht (M), wenn nötig Produkte, deren Schmelzkurve abwich (A) und eine Wasserprobe (0). Das obere Bild wurde nach der Nachfärbung der ladder aufgenommen, es handelt sich um das gleiche Gel.

Wie in Abb. 4.20 zu sehen ist, sind alle von der Schmelzkurve als rein eingestuft Produkte auch auf dem Gel als saubere Bande zu erkennen. Auch die Produkte mit abweichenden Schmelzkurven sind laut Gel als rein zu betrachten. Vergleicht man die zu erwartende Produktlänge mit der Produktlänge des Gels, stimmen die Ergebnisse überein (siehe Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Vergleich der Produktlängen der Expressionsprimer

Aufgetragen sind die laut NCBI Primer-BLAST errechneten Produktlängen, verglichen mit der vom Agarosegel abgelesenen Produktlänge, aufgeschlüsselt nach den vier untersuchten Regionen.

	Produktlänge NCBI	Produktlänge Gel
IGF2R	130bp	~120bp
MYC	231bp	~240bp
STAT	231bp	~240bp
OSBP	241bp	~250bp

4.1.14. Relative Konzentrationsberechnungen durch CP-Differenzen

Um die Expressionsdaten der einzelnen Gene in ihrem Niveau vergleichen zu können, musste die Normalisierung auf die HB2-Standardreihe herausgenommen werden. Dazu wurden die Konzentrationen durch die Differenzen ihrer *crossing points* (CPs) unabhängig von HB2 bestimmt.

Der niedrigste *crossing point*, der der Zelllinie SRS UPD7 1 des Gens *MYC* (CP: 26,23), wurde auf den relativen Konzentrationswert 1 festgelegt. Da die CPs unabhängig von der Standardreihe sind und sich die Konzentration pro Zyklus im Idealfall genau verdoppelt, konnten mit der folgenden Formel die HB2-unabhängigen Konzentrationen berechnet werden.

$$\begin{aligned}
 X &= \text{CP}(X) \times \text{PCR-Effizienz}^{\text{CP}(\text{Gen SRS UPD7 1}) - \text{CP}(\text{MYC SRS UPD7 1})} \\
 &= \text{CP}(\text{Wert}) \times 2^{\text{CP}(\text{Gen SRS UPD7 1}) - 26,23}
 \end{aligned}$$

Abb. 4.21: Formel zur Berechnung der HB2-unabhängigen Konzentration X

CP(X) steht für den *crossing point* des Wertes X, der berechnet werden soll. Die PCR-Effizienz errechnet sich aus der Standardreihe und sollte nahe 2 liegen. Mit CP (Gen SRS UPD7 1) ist der *crossing point* bezeichnet, den die Probe der Zelllinie SRS UPD7 1 bei dem entsprechenden Gen hat.

4.1.15. Aktivitätsanalyse der Expressionsdaten

Zuerst wurden die Daten der Expressionsanalyse untereinander in ihrem Niveau verglichen. Ziel war es, zu bestimmen, ob das Gen tendenziell eher aktiv oder inaktiv ist. Die Expression der Gene *H19* und *IGF2* befinden sich auf einem anderen basalen Level, welches hundert- bis tausendfach unter dem der anderen Gene liegt.

Die Konzentrationen von *IGF2R* und *MYC* sind im Vergleich zu *STAT* niedrig, sodass hier von einem inaktiveren Zustand ausgegangen werden sollte. Die Werte des Gens *OSBP* sind ebenfalls niedrig im Vergleich zu *MYC*, mit der Ausnahme der Zelllinie WCCS1; *OSBP* scheint somit auch eher inaktiv zu sein. Die hohen Konzentrationen

von STAT weisen, genau wie der Wert der WCCS1-Zelllinie bei *OSBP*, auf die erhöhte Expression eines aktiven Gens hin.

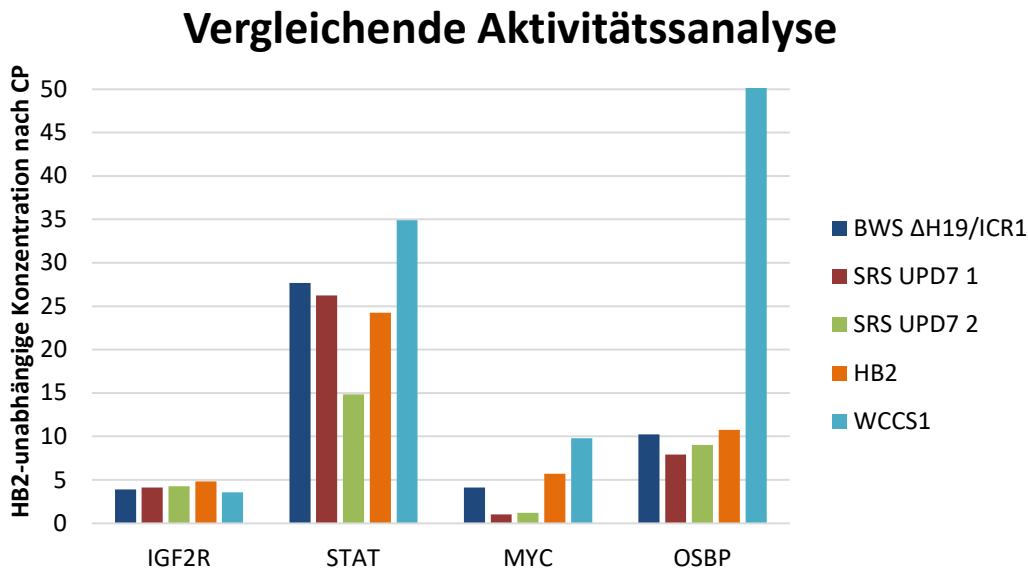


Abb. 4.22: Vergleichende Aktivitätsanalyse anhand der Expressionsdaten

Aufgetragen ist die relative Konzentration, die nach den *crossing points* HB2-unabhängig berechnet wurde, für die Gene *IGF2R*, *STAT*, *MYC* und *OSBP*. Die Daten der Gene *H19* und *IGF2* wurden nicht mit abgebildet, da ihre Expression um ein hundertfaches niedriger ist und deshalb nicht zu sehen wäre.

4.1.16. Vergleichende Analyse der Expressions- und Cohesinbindungsdaten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Expressionsanalyse mit den Ergebnissen aus den ChIP-Experimenten verglichen (4.1.11). Als ‚Expressionswert‘ ist die relative Konzentration der synthetisierten cDNA-Werte mithilfe der HB2-Standardreihe berechnet worden. Diese Konzentration ist ein indirektes Maß für die Expression da die Menge der cDNA proportional zur Menge der mRNA einer Zelllinie ist. Normalisiert wurden die Werte auf die cDNA-Konzentrationen der beiden ‚Haushaltsgene‘ *ATP5J* und *ACTB*.

Es sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Bindung von Cohesin an die benachbarte CTCF-Bindestelle und der Expression des betroffenen Gens zu erkennen ist.

IGF2R zeigt für alle Zellreihen sehr ähnliche Konzentration der Expressionswerte. Sie schwanken zwischen 0,7 und 1, während HB2 den höchsten und WCCS1 den niedrigsten Wert aufweisen. Ein markanter Unterschied zwischen den *H19*⁺-Zellen und der BWS ΔH19/ICR1-Zelllinie als *H19*-Zelle ist nicht zu erkennen. Die in der Cohesinbindung erkennbaren Unterschiede zwischen der Zelllinie BWS ΔH19/ICR1

und den SRS UPD7-Zelllinien kann nicht mit der Expression korreliert werden (siehe Abb. 4.23).

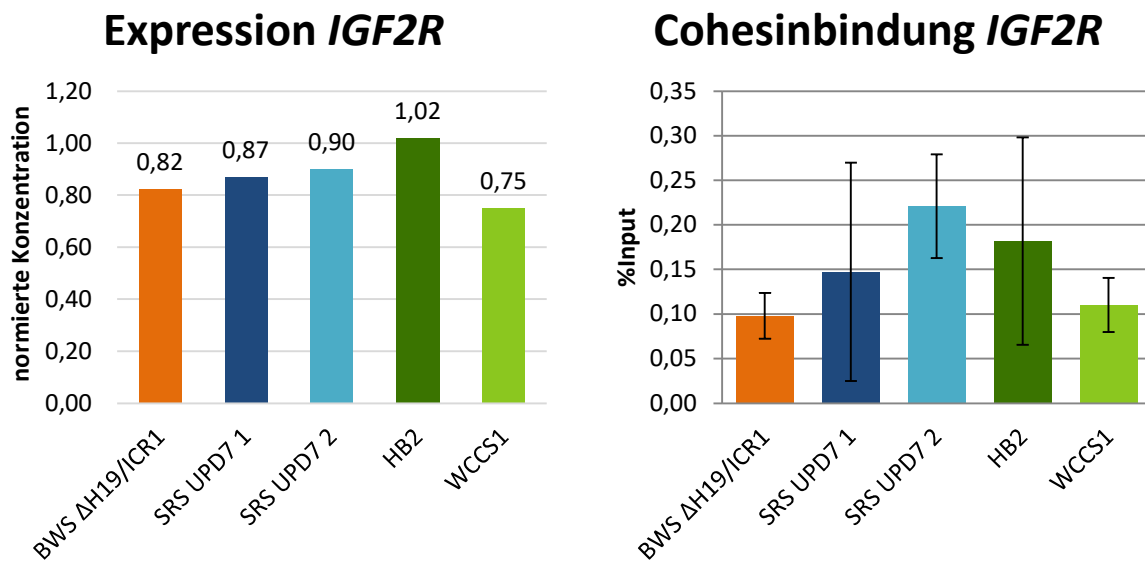


Abb. 4.23: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von IGF2R CTS2

Links ist die relative Konzentration der cDNA für die fünf Zelllinien abgebildet, welche auf die relative Konzentration der ‚Haushaltsgene‘ normalisiert wurde (siehe 4.1.12). Rechts ist die Cohesinbindung mit Standardabweichung aus der CHIP-Analyse in %-Input aufgetragen für die fünf Zelllinien.

Betrachtet man die Werte von **STAT3** fällt auf, dass SRS UPD7 2 mit 0,7 den niedrigsten Wert aufweist und WCCS1 mit 1,7 einen mehr als doppelt so großen Wert. Diesen starken Unterschied kann man bei der Bindungsanalyse nicht bemerken. Die Standardabweichungen sind sehr groß, da die Normalisierungsgene *STAT3* und *MYC* nicht sinnvoll normalisiert werden können, sodass die Niveaus der einzelnen Läufe sehr unterschiedlich sind. Abgesehen davon, dass sowohl in der Bindung als auch in der Expressionsanalyse WCCS1 den höchsten Wert aufweist, ist keine Korrelation zu erkennen.

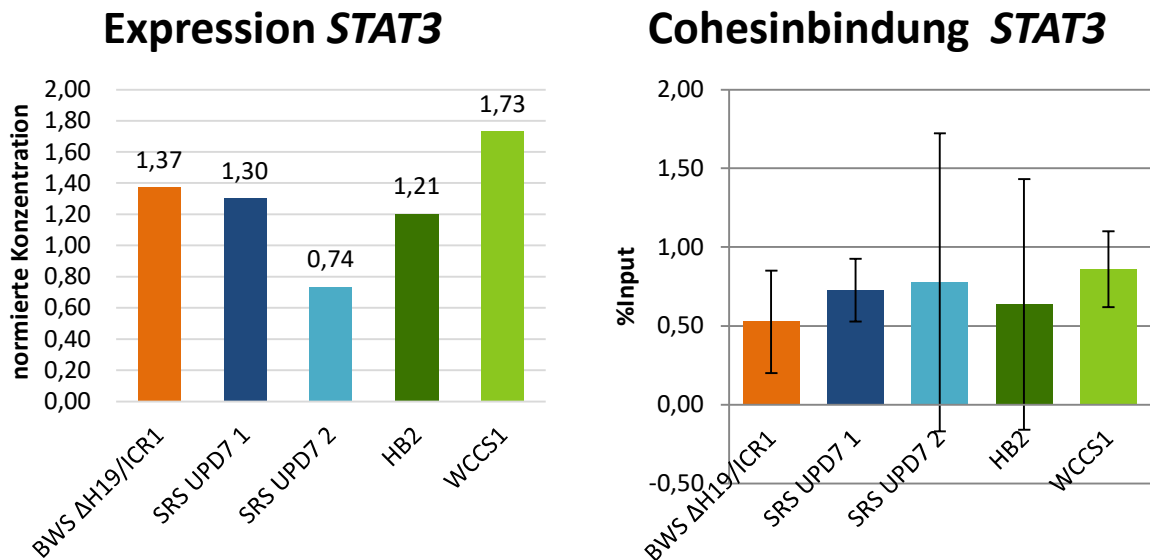


Abb. 4.24: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von STAT3

Links ist die relative Konzentration der cDNA für die fünf Zelllinien abgebildet, welche auf die relative Konzentration der ‚Haushaltsgene‘ normalisiert wurde (siehe 4.1.12). Rechts ist die Cohesinbindung mit Standardabweichung aus der CHIP-Analyse in %Input aufgetragen für die fünf Zelllinien.

Auch die Expression des Genes **MYC** variiert stark zwischen den Zelllinien. Die beiden SRS UPD7-Zellreihen weisen mit 0,15 und 0,17 sehr niedrige Werte auf, während der Wert für WCCS1 mit 1,4 sehr hoch ist. Die Werte für BWS ΔH19/ICR1 (0,6) und HB2 (0,8) liegen im mittleren Bereich. Bei Betrachtung der Cohesinbindung weist SRS UPD7 2 die stärkste Bindung auf und WCCS1 die schwächste. Auch die anderen Werte weisen auf eine schwache negative Korrelation zwischen Cohesinbindung und Expression im MYC-Gen hin.

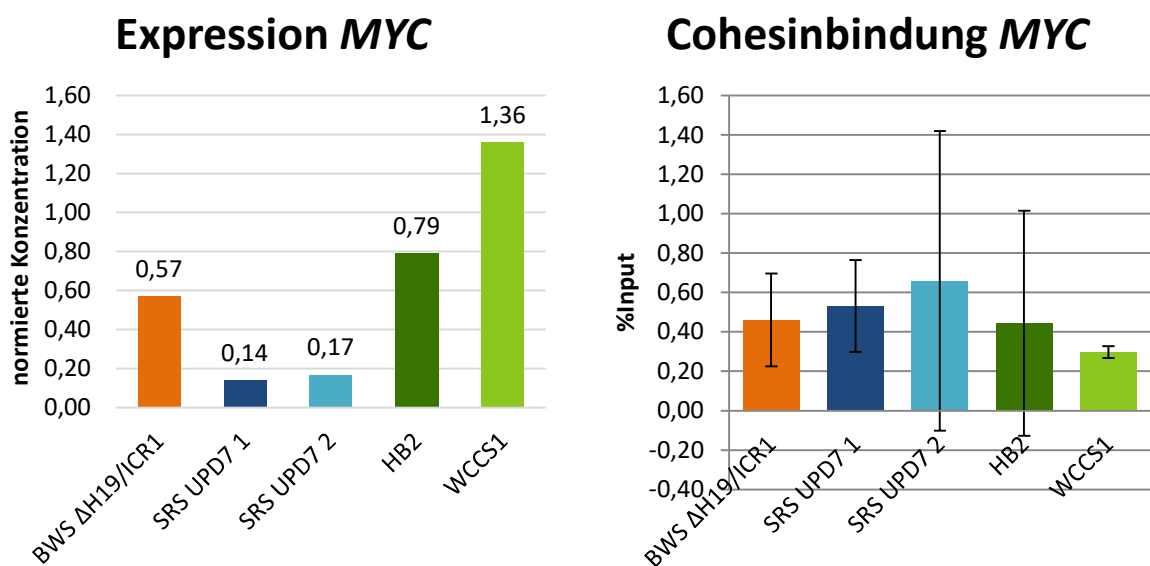


Abb. 4.25: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von MYC

Links ist die relative Konzentration der cDNA für die fünf Zelllinien abgebildet, welche auf die relative Konzentration der ‚Haushaltsgene‘ normalisiert wurde (siehe 4.1.12). Rechts ist die Cohesinbindung mit Standardabweichung aus der CHIP-Analyse in %-Input aufgetragen für die fünf Zelllinien.

Am Locus nahe von **OSBP** weist WCCS1 mit 5,6 eine vielfach höhere Expression als die anderen Zelllinien auf, deren Werte sich zwischen 0,8 und 1,2 bewegen. Bei der Bindungsanalyse bewegen sich die meisten Werte ebenfalls in einem Niveau, während hier die HB2-Zelllinie einen fast doppelt so hohen Wert zeigt. Deshalb ist auch hier keine Korrelation zwischen der Bindungsstärke und der Expression erkennbar.

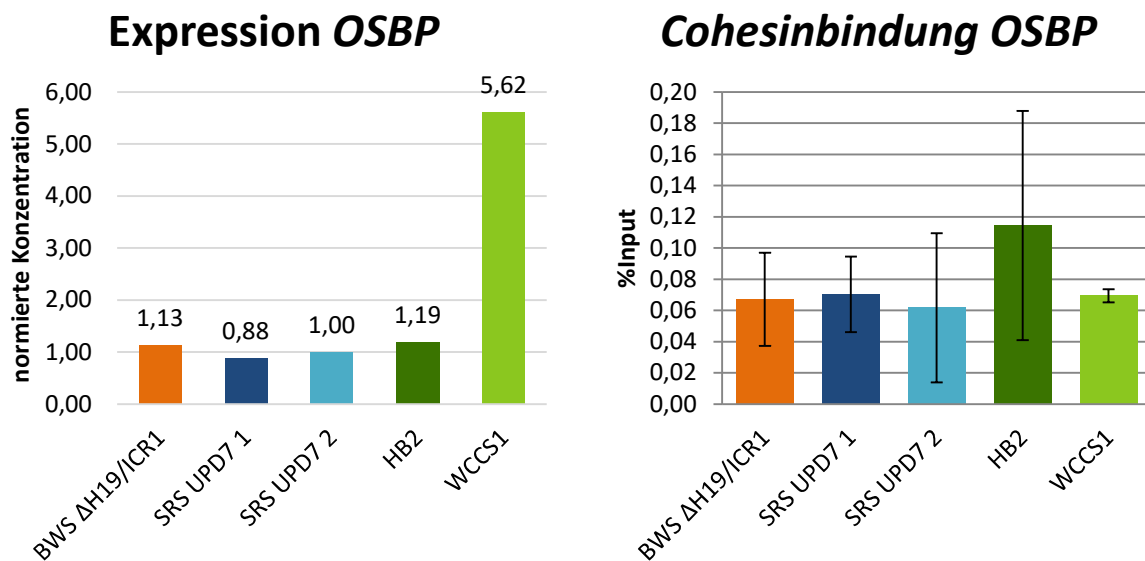


Abb. 4.26: Vergleich der Expression und der Cohesinbindung von OSBP

Links ist die relative Konzentration der cDNA für die fünf Zelllinien abgebildet, welche auf die relative Konzentration der ‚Haushaltsgene‘ normalisiert wurde (siehe 4.1.12). Rechts ist die Cohesinbindung mit Standardabweichung aus der CHIP-Analyse in %-Input aufgetragen für die fünf Zelllinien.

4.1.17. H19- und IGF2-Status der Zellen

Ziel ist es, den Status der beiden geprägten Gene auf dem *H19/IGF2*-Locus zu charakterisieren.

Die Experimente basieren darauf, dass die BWS Δ H19/ICR1-Zelllinie als *H19*⁻-Zelle fungiert, was sich in den mRNA-Analysen bestätigt hat. Bei den vier *H19*⁺-Zellen gibt es große Unterschiede in der Stärke der *H19*-Expression. HB2 hat mit einer relativen Konzentration von 0,95 eine fast zehnmal so hohe Expression wie WCCS1. Die anderen beiden Fibroblasten exprimieren *H19* in sehr geringem Maß von 0,012 für SRS UPD7 1 und 0,003 für SRS UPD7 2 (siehe Abb. 4.27)

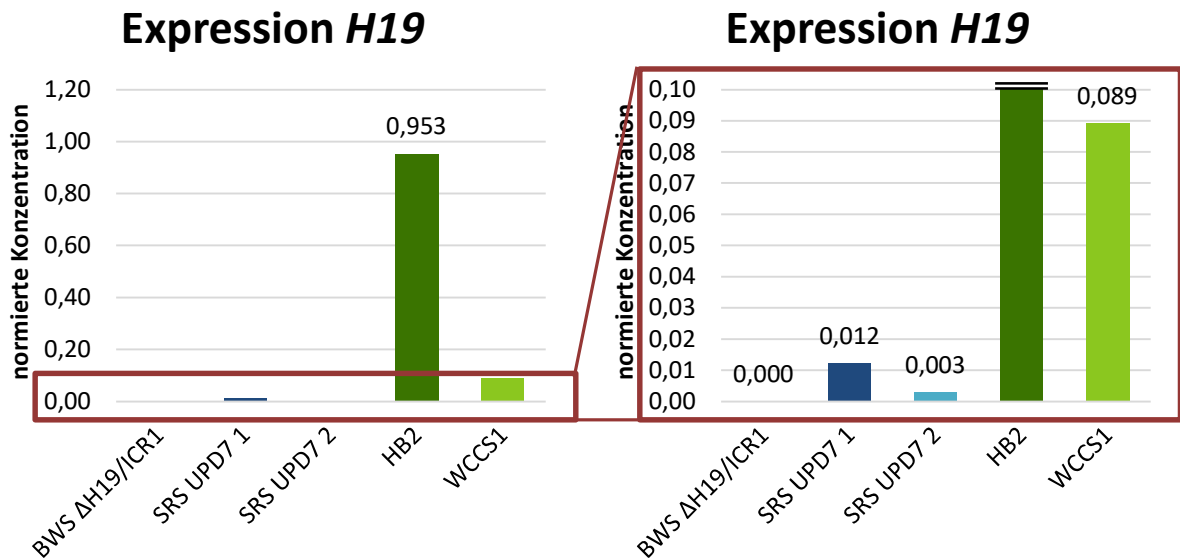


Abb. 4.27: Expressionsstatus H19

Es ist die relative Konzentration der cDNA für die fünf Zelllinien abgebildet, welche auf die relative Konzentration der ‚Haushaltsgene‘ normalisiert wurde (siehe 4.1.12). Da die Werte für die beiden SRS UPD7-Zelllinien und WCCS1 sehr klein sind, wurde der links rot umrahmte Bereich rechts vergrößert dargestellt.

Die Expression von *IGF2* scheint genau entgegengesetzt zu *H19* zu sein. Hier weist die BWS ΔH19/ICR1-Zelllinie eine starke Expression mit 0,5 auf, während bei den anderen Zelllinien keine oder nur eine vernachlässigbar geringe Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.28).

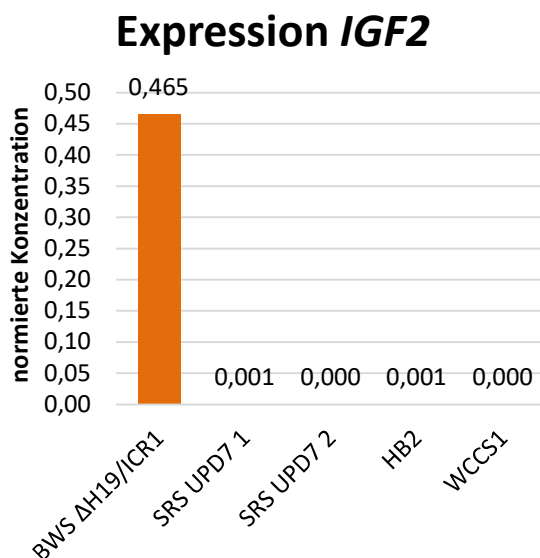


Abb. 4.28: Expressionsstatus IGF2

Es ist die relative Konzentration der cDNA für die fünf Zelllinien abgebildet, welche auf die relative Konzentration der ‚Haushaltsgene‘ normalisiert wurde (siehe 4.1.12).

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit soll Einblicke in die Aufgabe der lnc-RNA *H19* geben, welche bei der Entstehung des Silver-Russel-Syndrom und des Beckwith-Wiedemann-Syndrom eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [Nativio *et al.* 2011].

Es wurde untersucht, ob die lncRNA *H19* einen Einfluss auf die CTCF-vermittelte Bindung des Proteins Cohesin an ausgewählte Abschnitte der DNA hat. Dazu wurde die Bindung des Proteins mithilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und anschließender quantitativer PCR (qPCR) analysiert.

Um den Einfluss von *H19* zu untersuchen, wurde die ChIP vergleichend an einer Zelllinie, die kein *H19* exprimiert, und an Zelllinien, die *H19* in unterschiedlichen Maßen exprimieren, durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob die Bindungsstärke des Cohesins mit der Expression der benachbarten Gene korreliert.

In den untersuchten Regionen zeigten sich vor allem nahe *IGF2R* und *ZDBF2* Hinweise auf einen Einfluss von *H19* auf die Cohesinbindungsstärke, die jedoch keinen Einfluss auf die Expression zu haben schienen.

Methodische Beurteilung der Chromatin-Immunopräzipitation und der Expressionsanalyse

Um die Ergebnisse korrekt bewerten zu können, müssen zuvor mögliche Fehlerquellen analysiert werden. Besonders die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ist durch ihre Komplexität an mehreren Stellen anfällig für Fehler. Mit mehrfachen Kontrollen an unterschiedlichen Stellen soll ihre Effizienz diskutiert werden.

Bei der ChIP wurden die aus Zellen isolierten und fixierten Protein-DNA-Komplexe mittels Antikörper gegen zwei Untereinheiten des Cohesins heruntergezogen. Die gebundenen DNA-Fragmente wurden aufgereinigt und mittels qPCR quantifiziert.

5.1.1. Spezifität der Antikörperbindung

Bei der ChIP wurde nach der Bindung der Antikörper, die über Nacht erfolgte, mehrfach mit verschiedenen salzhaltigen Puffern gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Je nach Stringenz der Puffer ist es dabei auch denkbar, dass leichtere Bindungen ebenfalls getrennt werden und später nicht mehr nachgewiesen

werden können. Für die Arbeiten zu dieser Promotion wurde auf das bereits durch A. Koch [2016] ausgearbeitete ChIP-Protokoll zurückgegriffen. Durch den Vergleich verschiedener Konzentrationen der Puffer, wurde dort die optimale Zusammensetzung ermittelt, um ein Gleichgewicht zwischen dem Erhalt der spezifischen Bindungen und der nötigen Säuberung der Proben zu erreichen.

Die Spezifität der Bindung der zwei Anti-Cohesin-Antikörper wurde mithilfe einer unspezifischen IgG-Kontrolle verglichen. Das ungerichtete IgG-Gemisch aus einer unkonjugierten Maus wird als Hintergrundniveau der Bindungen betrachtet. Wie in Abb. 4.6 zu sehen weisen lediglich 8% der reinen Pulldowns IgG-Werte über 20% des spezifischen Pulldowns auf. Bei den Amplifikationen mit Primer-Dimer-Verunreinigung beträgt der unspezifische IgG-Anteil bei 18% mehr als 20% des spezifischen Pulldowns, da es nicht möglich ist, zu ermitteln, welcher Anteil des Produkts durch die Primer-Dimere entsteht. Trotzdem sind in Einzelfällen höhere Werte aufgetreten, die sich aber größtenteils nicht bei bestimmten Genen oder Zellen häuften. Einzig HB2 wies sehr selten hohe IgG-Werte auf, während WCCS1 etwas häufiger erhöhte Werte zeigte. Das Verhältnis spezifischer zu unspezifischer Bindung ist bei der Amplifikation des *OSBP*-Lokus am geringsten, da es dort keine CTCF-Bindungsstelle gibt, wodurch eine spezifische Bindung nicht möglich ist.

Tab. 5.1 : Anzahl hoher IgG-Werte

Aufgetrennt nach Zellen, ist die Anzahl der Werte angegeben, bei denen der IgG-Wert mehr als 20% des Anti-Cohesin-Werts betragen. In Klammern ist die Anzahl der Fälle angegeben, in denen der IgG-Pulldown nicht durch Primer-Dimere verunreinigt ist. Grau geschriebene Fälle wurden in der endgültigen Betrachtung nicht berücksichtigt

Zellen	Anzahl der unspezifischen Ergebnisse (davon ohne Primer-Dimere)
BWS ΔH19/ICR1	6 (2)
SRS UPD7 1	4 (1)
SRS UPD7 2	7 (1)
HB2	1 (1)
WCCS1	9 (1)

Zusammenfassend ließ sich in den meisten Fällen keine IgG-Bindung detektieren, wodurch hier von einer hohen Spezifität der Antikörperbindung ausgegangen werden kann. Bei Amplifikationen, bei denen prozentual höhere unspezifische IgG-Bindung detektiert wurde, waren diese meist stark mit Primer-Dimeren verunreinigt, sodass davon auszugehen ist, dass es sich größtenteils nicht um das gesuchte Produkt

handelt und keine entscheidende Anhebung des Hintergrunds stattgefunden hat. In den anderen sechs Fällen, welche in Tab. 4.4 aufgelistet sind, wurden nur vier in die endgültige Betrachtung eingeschlossen. Diese wurden in der Wertung berücksichtigt, da ein Ausschluss in drei von vier Fällen zu einer Überinterpretation der Cohesin-Bindung geführt hätte. Es ist aber im Gegensatz dazu davon auszugehen, dass die Bindung, wenn man bei hohem IgG-Pulldown davon ausgeht, dass auch ein Teil des spezifischen Pulldowns unspezifisch war, eher schwächer ist, als die Daten zeigen. Zieht man den Anteil des IgG-Pulldowns vom spezifischen Pulldown ab, würde dies im schlechtesten Fall zu einer 14%-igen Reduktion des Gesamtpulldowns über alle drei Läufe führen. Dadurch würde in keinem der angegebenen Fälle die Aussage der Daten verändert werden.

Für die Experimente wurden zwei Antikörper gegen unterschiedliche Untereinheiten des Cohesins getestet: Anti-RAD21 und Anti-SMC1. RAD21 und SMC1 bilden mit SMC3 zusammen die drei Kernuntereinheiten des Cohesins, welche durch die regulatorischen Elemente Wapl, Pds5a&b und SA1/SA2 zu einem Proteinkomplex vervollständigt werden [Litwin und Wysocki 2018].

RAD21 ist ein DNA-Reparaturprotein für Doppelstrangbrüche, welches besonders bei der DNA-Reparatur nach der chromosomalen Segregation beteiligt ist, bei der der gesamte Cohesinkomplex essenziell ist. Außerdem wird RAD21 mit dem Apoptoseweg in Zusammenhang gebracht [Cheng *et al.* 2020]. Bei proteolytischer Entfernung von RAD21 kommt es zur Reduktion von Chromatininteraktionen. Vor allem die Interaktion von weit voneinander entfernten DNA-Abschnitten scheint betroffen zu sein [Zuin *et al.* 2014].

SMC1 (*structural maintenance of chromosomes protein 1*) ist als Heterodimer mit SMC3 im Cohesinkomplex ebenfalls koordinativ an der Rekombination der Schwesterchromatide beteiligt. Außerdem wird auch für SMC1 eine Rolle in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen diskutiert [Schär *et al.* 2004].

Die Evaluation der beiden Antikörper ergab einen leichten Vorteil des Anti-RAD21-Antikörpers, sodass in den darauffolgenden Experimenten nur noch dieser Antikörper verwendet wurde (siehe Kapitel 4.1.6). Der Vorteil zeigte sich vor allem in höheren oder gleich großen Pulldownwerten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der ChIP-Sequenzierung von Chorzempa aus dem Jahr 2020. Dort fanden sich deutlich mehr Pulldowns mit RAD21-Antikörpern. Diese waren, im

Vergleich zu den Pulldowns mit den SMC1-Antikörpern, auch häufiger an als spezifisch befundenen Stellen angereichert.

Andere Experimente zeigen jedoch, dass SMC1 im Cohesinkomplex eine höhere Zerfallkonstante als RAD21 hat, also festere Bindungen zur DNA einzugehen scheint. Außerdem wird vermutete, dass SMC1 länger gebunden bleibt, je weiter der Zellzyklus fortschreitet [McNairn und Gerton 2009]. So ist es denkbar, dass die SMC1-Bindung in der hier hauptsächlich untersuchten S-Phase noch nicht ihre vollständige Kraft entwickelt hat.

Da die hier verwendeten Antikörper von zwei unterschiedlichen Herstellern produziert wurden, lässt sich außerdem nicht ausschließen, dass der unterschiedlich hohe Pulldown auf Qualitätsunterschiede zurückzuführen ist.

5.1.2. Beurteilung der ChIP-Effizienz

Um die Effizienz der ChIP-Analyse mit den Anti-Cohesin-Antikörpern zu beurteilen, wurden als Positivkontrolle die Gene *MYC*, *STAT3* und *SYN3* verwendet, welche im UCSC-Genome Browser starke CTCF-Peaks aufwiesen (siehe Abb. 5.1). Die Primer wurden aufgrund zuverlässiger Pulldowns in vorherigen Arbeiten ausgewählt [personal communication KS Wendt]. In der ChIP-Analyse zeigten alle drei Gene ein stark über dem Hintergrundniveau liegenden Pulldown. Jedoch ist das Niveau der drei Läufe in ihrer Gesamtheit sehr unterschiedlich, sodass die Positivkontrollen als Normalisierungen für die zu untersuchenden Regionen genutzt wurden (siehe 4.1.10). Die Kontrollregion *OSBP* wurde als Negativkontrolle verwendet. In dem von den ausgesuchten Primern replizierten Bereich (siehe Tab. 3.10) befindet sich laut USCS Genome Browser keine CTCF-Bindestelle. Der Primer wurde ebenfalls von Kerstin Wendt empfohlen und in vorherigen Arbeiten ihrer Arbeitsgruppe getestet [personal communication KS Wendt]. Die Daten zeigten das zu erwartete Ergebnis (Siehe Abb. 4.7): Der Anti-Cohesin-Pulldown bei *OSBP* befand sich im Hintergrundbereich. Ausschließlich die Amplifikation des 2. Laufes für die Zelllinie SRS UPD7 2 lag im Lokus von *OSBP* deutlich über dem Hintergrundniveau, sodass dieser Lauf aus der Gesamtwertung ausgeschlossen wurde. Die restlichen Daten weisen deutlich darauf hin, dass die Bindung der ausgewählten Anti-Cohesin-Antikörper über Cohesin und CTCF an die CTCF-Bindestellen spezifisch ist.

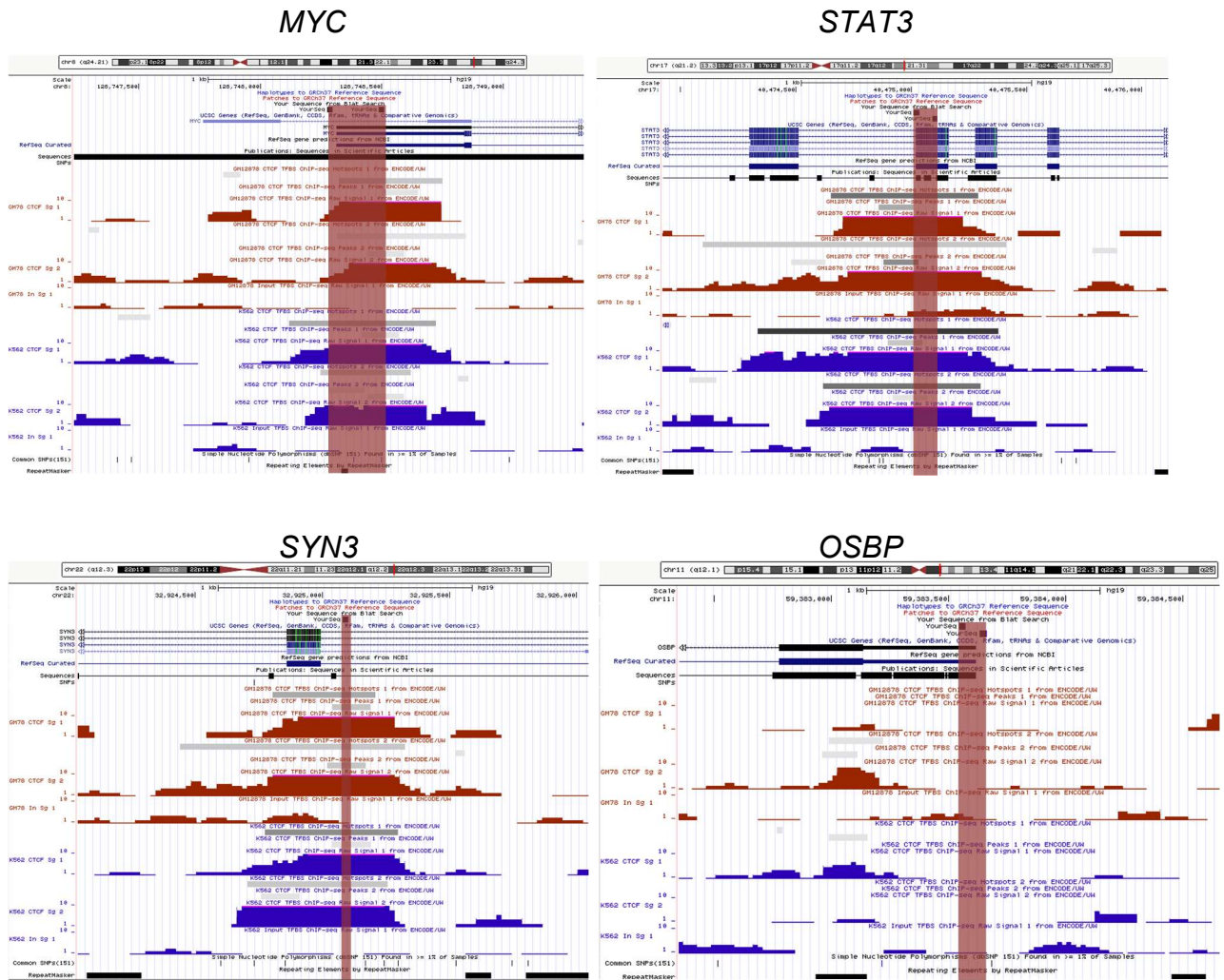


Abb. 5.1: CTCF-Peaks der Kontrollregionen

Abgebildet sind die CTCF-Peaks der Kontrollregionen *MYC*, *STAT3*, *SYN3* und *OSBP* aus dem UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19, ENCODE Transkription Faktor Bindung tracks, CTCF Binding Sites by ChIP-seq from ENCODE/University of Washington [Euskirchen et al. 2007]), in dunkelblau und schwarz die Gene, in braun die GM78- und in blau die K562-CTCF-Bindestellen, in rot markiert die Primersequenzen.

Die ChIP-Daten der Normalisierungsgene wurden auf eine *H19*-Abhängigkeit überprüft, wobei bei keinem der drei Gene ein Unterschied zwischen den Zellreihen mit und ohne *H19* gefunden wurde (siehe Abb. 4.9). Die drei Lozi weisen ebenfalls ähnliche Tendenzen im Vergleich der unterschiedlichen Durchläufe auf, was eine wichtige Voraussetzung zur Normalisierung darstellte. Dabei ist bei kleineren Unterschieden kein Locus besonders abweichend. In der vergleichenden Expressions- und ChIP-Analyse in Kapitel 4.1.16 konnte kein Hinweis auf eine *H19*-abhängige oder Cohesin vermittelte Expressionsänderung gefunden werden.

Somit eignen sich die drei Gene gut als Normalisierungsgrundlage und die Daten aller drei Gene wurden dafür berücksichtigt. Die Unabhängigkeit der Cohesinbindung von *H19* stellt sicher, dass potenzielle Effekte von *H19* nicht herausgerechnet werden.

Die Stärke der Cohesinbindung an der differentiell methylierte Region *H19 ICR* fällt in den untersuchten Zelllinien sehr unterschiedlich aus.

In der Zellreihe BWS Δ H19/ICR1 ist diese ICR auf dem sonst unmethylierten, mütterlichen Allel, an die der Primer binden sollte, depletiert. Da die ICR auf dem paternalen Allel hypermethyliert und nicht zugänglich ist [Nativio *et al.* 2009], liegt der Pulldown dieser Zelllinie für *H19 ICR* erwartungsgemäß nahe null.

Bei den anderen Zelllinien liegt der Pulldown deutlich über dem Hintergrund-Niveau. In den beiden SRS UPD7-Zelllinien ist durch die UPD7 gegenüber Wildtyp-Fibroblasten eine vermehrte *H19*-Expression zu erwarten. Eine genaue Analyse der genomischen Voraussetzungen in den beiden Tumorzelllinien HB2 und WCCS1 liegen zum momentanen Zeitpunkt nicht vor. Die Expressionsanalysen legen jedoch nahe, dass die Bindung von CTCF und Cohesin, die zum Ablesen des Gens *H19* notwendig sind, verstärkt sind (siehe Abb. 4.27).

Aufgrund dieser Daten lässt sich die Effizienz der ChIP als zuverlässig bewerten. An den zu erwartenden Stellen wurde eine deutliche CTCF- und Cohesin-Bindung nachgewiesen, während an Stellen ohne CTCF-Bindestelle wie *OSBP*, kein Pulldown über Hintergrundniveau lag.

5.1.3. Reproduzierbarkeit der Daten

Für jeden Locus wurden entweder zwei (bei HB2 und SRS UPD7 2) oder drei Durchläufe durchgeführt. Wie in 4.1.9 gezeigt wird, weichen die Pulldown-Werte der drei Durchläufe in ihrer Höhe stark voneinander ab, während die Tendenzen ähnlich sind. Trotz ausgiebiger Fehleranalyse konnte kein erklärender Faktor für diese relevanten Abweichungen ausfindig gemacht werden. Um eine Verzerrung der Daten durch die Vereinigung in diesem Zustand zu verhindern, wurden die untersuchten Regionen nochmals mit Normalisierungsregionen verrechnet (siehe 4.1.10). Hierdurch ist die Anreicherung über den CTCF/Cohesin-Bindestellen nun abhängig von der Bindungsstärke der drei Normalisierungsregionen *MYC*, *STAT3* und *SYN3*.

Um den Unterschied der Pulldowns in Zellen mit und ohne *H19*-Expression zu bewerten, wäre eine Signifikanzberechnung wünschenswert. Durch die geringe Zahl an Durchläufen ($n=2$ oder $n=3$) kann allerdings nicht von einer normalverteilten Datenreihe ausgegangen werden. Dies ist jedoch Voraussetzung, um den t-Test zur Signifikanzberechnung anwenden zu können. Somit ist die Berechnung der Signifikanz nicht möglich und es können nur klare Unterschiede als solche bezeichnet werden, ansonsten werden sie als Tendenzen beschrieben.

5.1.4. Beurteilung der Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse wurde mit bereits in der Arbeitsgruppe langjährig bewährten Primern (*H19* und *IGF2*) und von Dr. K. Wendt empfohlenen Primern (*IGF2R*, *MYC*, *STAT* und *OSBP*) durchgeführt. Wie im Kapitel 4.1.13 untersucht, generieren die Primer saubere Produkte. Um die durch die HB2-Standardreihe erzeugte Normalisierung zu annullieren, wurde mithilfe der Formel aus Abb. 4.21 eine auf den *crossing points* basierende relative Konzentration berechnet. Die Daten wurden auf die beiden ‚Haushaltsgene‘ *ATP5J* und *ACTB* normalisiert, um eventuell unterschiedliche Einsatzmengen herauszurechnen. Die dadurch entstehende Abhängigkeit von diesen beiden ‚Haushaltsgenen‘ stellt eine Gefahr der Verfälschung der Werte dar, wie Huggett und Kollegen 2005 warnen: Normalisierung auf nur ein Gen, selbst bei etablierten ‚Haushaltsgenen‘ könne in bestimmten Zellen oder Experimenten zu Verfälschungen führen, wie beispielsweise 2018 von Panina und Kollegen in der Varianz von *ACTB* in pluripotenten Stammzellen gezeigt wurde. In Lugenfibroblasten sowie embryonalen Nierenepithelzellen zeigt es sich jedoch als das stabilste Haushaltsgen [da Conceição Braga *et al.* 2022].

Wie in 4.1.12 gezeigt, wurde hier deshalb nach Testung von drei ‚Haushaltsgenen‘ die zwei ausgewählt, die sich über alle getesteten Zelllinien am konstantesten verhalten haben.

5.1.5. Vergleich zwischen quantitativer PCR und Sequenzierung der ChIP

Um die Daten der quantitativen PCR der hier vorliegenden Arbeit besser einordnen zu können, wurden diese mit Daten einer ChIP-Sequenzierung durch Heather Chorzempa aus dem Jahr 2020 verglichen. In Letzterer wurden zwei Zelllinien parallel untersucht, die sich in ihrer *H19*-Expression unterscheiden: Die auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten BWS $\Delta H19/ICR1$, die keine *H19*-

Expression aufweisen und die Fibroblastenzelllinie FibG, welche in einem hohen Maße *H19* exprimiert [Chorzempa 2020].

Bei den **Kontrollregionen *SYN3*, *STAT*, *MYC* und *OSBP*** lassen die Daten aus Chorzempas Arbeit, genau wie die hier vorliegenden Daten keine Hinweise auf eine *H19*-Abhängigkeit der Bindungen zu. Sowohl in den hier vorliegenden ChIP-PCR-Daten als auch in der ChIP-Sequenzierung wurden starke, stabile Cohesinbindungen an den CTCF-Bindestellen des *SNY3*-Lokus gefunden. In den Regionen *STAT* und *MYC* sind die in den hier vorliegenden Daten gefundenen Bindungen weniger stark und in der Intensität schwankend. In der Arbeit von Frau Chorzempa findet sich hierfür eine mögliche Erklärung: An den durch die ausgewählten Primer amplifizierten Regionen befindet sich der stärkste Peak etwas weiter up- oder downstream. So ist es vorstellbar, dass durch die zufällige Fragmentierung die primerkomplementäre Region nicht zuverlässig per ChIP isoliert werden konnte. Die Negativkontrolle in der Region *OSBP* zeigt auch in der ChIP-Sequenzierungsanalyse keine relevante Cohesin-Bindung. Zusammenfassend bestätigt die ChIP-Seq die Kontrollregionen als verlässlich, auch wenn die Primer im *STAT3*- und *MYC*-Lokus die CTCF-Bindestelle möglicherweise nicht ideal amplifiziert haben.

Betrachtet man die **CTCF-Bindestellen der *H19/IGF2*-Region** weichen die hier verglichenen Daten stärker voneinander ab. An der *CTCF AD* wurden in der ChIP mit PCR-Quantifizierung niedrige, aber stabile Pulldownwerte erzielt. In der Sequenzierung fanden sich hier, besonders mit den RAD21-Antikörpern und bei der BWS $\Delta H19/ICR1$ Zelllinie sehr starke Peaks. An der Stelle *CCD*, welche in beiden Experimenten mit zwei Primern untersucht wurde (*CCD* und *CCD1KW*), wurde in der ChIP-Sequenzierung nur ein Peak - mit dem RAD21-Antikörper in der Zelllinie BWS $\Delta H19/ICR1$ – gefunden, während die Pulldowns der hier vorliegenden Arbeit bei *CCD* im *H19/IGF2*-Lokus am stärksten waren. An der *CTCF DS* ließ sich nur in der qPCR eine schwache Bindung detektieren, bei den Sequenzierungsergebnissen sind in diesem Bereich keine Peaks nachweisbar. Der von Nativio und Kollegen 2009 postulierte Aufbau des *H19/IGF2*-Lokus geht davon aus, dass die Stellen *CTCF AD*, *CCD* und *CTCF DS* konstitutiv von CTCF und Cohesin gebunden sind. Somit würde man erwarten, dass die Pulldowns dieser drei Bindestellen auf ähnlichem Niveau sowie zuverlässig in allen Zellen zu detektieren sind, welches sich in den hier gezeigten qPCR-Daten mit geringen Schwankungen bestätigen lässt.

In der FibG Zelllinie (*H19*⁺) findet sich an der differentiell methylierten ICR des Lokus in der Sequenzierung nur eine leichte Erhebung ohne gecallten Peak, während in der

qPCR-Analyse ein deutlich über dem Hintergrundniveau liegender Pulldown in den *H19*⁺-Zellen nachzuweisen ist. Die Abweichungen könnten zum einen auf individuelle Unterschiede der unterschiedlichen Fibroblastenkulturen zurückzuführen sein, da in den Experimenten unterschiedliche *H19*⁺-Zelllinien untersucht wurden. Des Weiteren könnte die sehr viel stärkere *H19*- und auch *IGF2*-Expression der FibG-Zellen im Gegensatz zu den beiden hier untersuchten SRS UPD7-Zelllinien die Unterschiede erklären.

In den BWS Δ H19/ICR1-Zellen werden wie erwartet in keinem der Experimente Pulldowns detektiert, da die ICR auf dem mütterlichen, sonst aktiven Allel depletiert ist, sodass nur das väterliche, methylierte Allel vorliegt. Die Methylierung verhindert die Bindung von CTCF und Cohesin [Nativio *et al.* 2009].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im *H19/IGF2*-Lokus die Daten der qPCR und der Sequenzierungsanalyse sich an den meisten Stellen nicht stützen, da die Sequenzierungen nur wenige CTCF-Bindungen in diesem Lokus detektieren konnte. Der von Nativio und Kollegen 2009 publizierte Aufbau stützt jedoch eher die hier vorliegende Ergebnisse als die Sequenzierungsergebnisse.

Bei den hier weiterhin betrachteten Stellen ***ZDBF2*** und ***IGF2R*** decken sich die Sequenzierungsergebnisse weitestgehend mit denen der qPCR. Das im Vergleich niedrige Bindungsniveau bei *ZDBF2* aus der qPCR spiegelt sich in flachen Peaks mit nur einem „gecallten Peak“ in der Sequenzierung wider. Bei der *CTS1* bei *IGF2R* sind sowohl in der qPCR als auch bei der Sequenzierung keine relevanten Peaks über dem Hintergrundniveau zu erkennen. An der *CTS2* sind sowohl für BWS Δ H19/ICR1 als auch für FibG feste Bindungen detektierbar, ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien mit ihrer gegensätzlichen *H19*-Expression kann in der Sequenzierung aber nicht eindeutig bestimmt werden. Der hier postulierte Unterschied in der Bindungsstärke lässt sich nicht aus den ChIP-Seq-Daten reproduzieren. So spricht diese Sequenzierung gegen den Hinweis auf eine Abhängigkeit der Bindungsstärke bei *IGF2R CTS2* von *H19*.

Bedeutung der *H19*-Expression für die Cohesin- und CTCF-Bindung

5.1.6. *H19* – Expressionsstatus

Die untersuchten Zelllinien wiesen einen stark unterschiedlichen Expressionsstatus des Gens *H19* auf, wodurch eine Aussage über die Auswirkungen des Vorhandenseins von *H19* getroffen werden sollte. Im gesunden Individuum wird *H19* nur auf dem mütterlichen Allel exprimiert, da auf dem väterlichen Allel die ICR durch Hypermethylierungen unzugänglich ist und somit die Transkription von *H19* blockiert wird [Nativo et al. 2009]. Außerdem wird es in der postnatalen Phase stark herunter reguliert [Yoshimura et al. 2018, Lui et al. 2008].

Die Zellen **BWS Δ H19/ICR1** stammen aus der Hautbiopsie einer weiblichen Patientin, die das klinische Bild eines Beckwith-Wiedemann-Syndroms (BWS) aufweist (siehe S. 6). Bei molekulargenetischen Analysen zeigte sich auf dem mütterlichen Allel eine circa 30kb große Deletion im Bereich der *H19*-ICR (ICR1, *imprinting control region*), des gesamten Gens *H19* und von Teilen des benachbarten Enhancers (siehe Abb. 5.2: Deletion der BWS Δ H19/ICR1 Zellen [Bachmann et al. 2016]. Diese Deletion erklärt, warum keine Expression von *H19* nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 4.27). Der Patientin bleibt keine aktive Kopie des Gens vorhanden, da die väterlich Version physiologischerweise imprintet und damit inaktiviert ist. Dass in diesen Zellen kein *H19* nachgewiesen wurde bestätigt, dass diese Methylierung und Inaktivierung auch bei Deletion des mütterlichen Allels bestehen bleibt.

Des Weiteren deckt sich die Beobachtung, dass die *IGF2*-Expression in dieser Zelllinie sehr hoch ist, mit den Ergebnissen von Bachmann und Kollegen aus dem Jahr 2016 (siehe Abb. 4.28). Dies könnte das Auftreten des BWS und der embryonalen Tumore erklären [Bachmann et al. 2016].

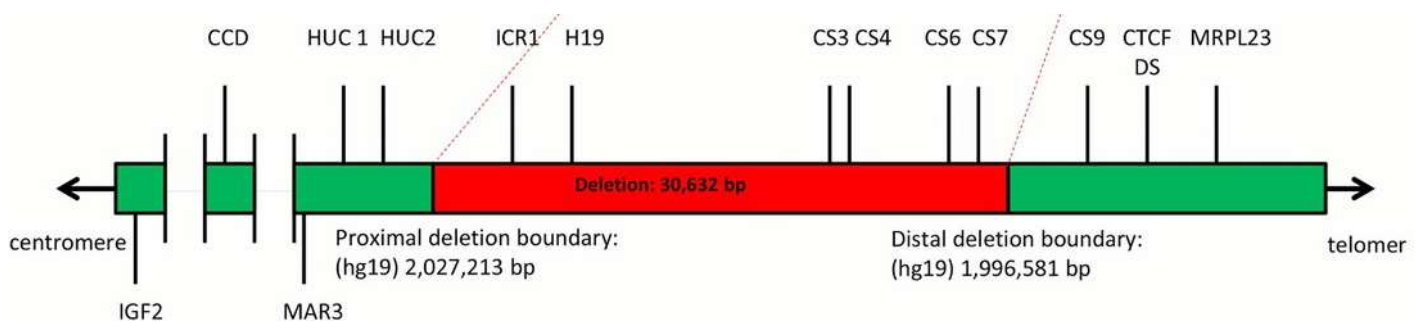


Abb. 5.2: Deletion der BWS Δ H19/ICR1 Zellen
[modifiziert nach Bachmann et al. 2016]

Für die beiden **Zelllinien SRS UPD7 1 und 2** wurden mittels MLPA (engl.: *multiplex ligation-dependent probe amplification*, multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation) diagnostiziert, dass in beiden Zelllinien eine partielle uniparentale Disomie des Chromosoms 7 vorliegt. Das in dem betreffenden Abschnitt liegende Gen *MEST* (*mesoderm specific transcript*, #7q31–34) ist ein maternal imprintetes, ausschließlich paternal exprimiertes Gen, welches für ein Protein der α/β -Hydrolase-Falt-Familie codiert. Schon 1997 postulierten Kochshi und Kollegen einen Zusammenhang der UPD7, wie in den hier verwendeten SRS UDP7 1 und 2 Zelllinien und resultierendem Funktionsverlust des *MEST*-Gens mit dem Auftreten des Silver-Russel-Syndrom sowie anderen intrauteriner und postnataler Wachstumsretardierungen. *MEST* ist wie *H19* Teil des IGN, welches entscheidend für das embryonale und postnatale Wachstum ist [Lui *et al.* 2008]. Die genauen Mechanismen der gegenseitigen Beeinflussung sind jedoch noch unklar. Aktuell gibt es nach meinem Wissen keine Studie zur Expressionsanalyse im IGN bei *MEST*-Depletion. Da jedoch Nativio und Kollegen 2009 zeigten, dass bei *H19*-Depletion die *MEST*-Expression zunimmt und da es bei einer *MEST*-Depletion durch eine UPD7 zu einem klinisch sichtbaren Silver-Russel-Syndrom kommt, war es vorstellbar, dass bei einer *MEST*-Depletion *H19* hochreguliert wird. Deshalb wurden diese Fibroblasten aus einer Hautstanze von Patienten mit einem phänotypischen Silver-Russel-Syndrom kultiviert, da in Gesunden nachgeburtlich die *H19*-Expression sehr gering ist [Yoshimura *et al.* 2018].

Die beiden SRS-Fibroblasten-Zelllinien exprimieren *H19* in nachweisbaren Maß, jedoch in einem sehr geringen Maß, verglichen mit den Tumorzelllinien (siehe Abb. 4.27). Grund hierfür könnte die physiologische Herunterregulation des IGNs nach den ersten postnatalen Wochen sein [Lui *et al.* 2008]. Was der vierfachen *H19*-Expressionsstärke bei SRS UPD7 1 im Vergleich zu SRS UPD7 2 zugrunde liegt, ist nicht bekannt und könnte auf diesem Niveau eine Variabilität bei mangelnder Nutzung des Lokus darstellen.

Betrachtet man hingegen die Expression von *H19* in den beiden **Tumorzelllinien HB2 und WCCS1**, so ist hier eine zehnfache bis hundertfache Expressionsstärke im Vergleich zu den Fibroblasten zu verzeichnen. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass *H19* zu den onkofetalen Genen zählt. Die Theorie von Ariel und Mitarbeitenden besagt, dass ein Vorhandensein dieser RNA, die für Zelldifferenzierung in der Embryogenese wichtig ist, in Tumoren als Zeichen der Undifferenziertheit angesehen werden könnte. Man geht davon aus, dass bei der Tumorgenese ähnliche Regulationsmechanismen

aktiviert werden, die sonst nur in der embryonalen Entwicklung vorhanden sind [Ariel *et al.* 1997]. In Brustkrebsstammzellen konnte gezeigt werden, dass *H19* den Tumorsuppressor miRNA let-7 speichert und somit gleichzeitig seine Bioverfügbarkeit reduziert, sowie den Kern-Pluripotenz-Faktor LIN28 hochreguliert. Dies führt wiederum zu einer Expressionssteigerung von *H19* sowie zur Aufrechterhaltung der Brustkrebsstammzellen [Peng *et al.* 2017]. Eine starke Expression von *H19* in den hier untersuchten Zellen ist daher nicht verwunderlich.

5.1.7. CTCF-Bindestellen (CTS) des *H19/IGF2*-Lokus

Im *H19/IGF2*-Cluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 befinden sich die vier von Nativio und Mitarbeitenden 2011 beschriebenen CTCF-Bindestellen. Die Stellen *CTCF AD*, *CCD* und *CTCF DS* sind jeweils konstitutiv gebunden, während die ICR differentiell methyliert ist. Auf dem paternalen Allel verhindert die Methylierung die Bindung von Cohesin und CTCF, während auf dem maternalen Allel die unmethylierte ICR diese Bindung erlaubt. Durch die Multimerisierung der gebundenen Komplexe kann auf dem paternalen Allel *IGF2* und auf dem maternalen *H19* durch die räumliche Nähe des Enhancers zum Genpromotor abgelesen werden.

Oft spielen Genprodukte eine entscheidende Rolle in der eigenen Regulierung. Beispielsweise ist für *Kcnq1ot1* sowie *Air*, zwei antisense lncRNAs, beschrieben, dass sie die Expression der im gleichen Locus befindlichen, imprinteten Gene, wie beispielsweise *Kcnq1* oder *IGF2R*, beeinflussen [Pandey *et al.* 2008].

Die Annahme, dass *H19* hier ebenfalls einen lokalen Einfluss auf die Expression und Regulation hat, lässt sich anhand dieser Arbeit nicht bestätigen. Sowohl die konstitutiven Bindungen als auch die differenziell methylierte ICR zeigen keinen nachweisbaren Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne *H19* (siehe 4.1.11.1). Somit liegen die Vermutungen nahe, dass die CTCF-Bindung an diesem Locus *H19*-unabhängig geschieht und durch andere Mechanismen reguliert wird. 2016 konnte Koch zeigen, dass Histonmodifikationen zur lokalen Regulation beitragen. Eine weitere Möglichkeit stellt die überregionale Regulierung über das IGN dar: Lui und Kollegen zeigten 2008 für Mäuse, dass *Plagl1* als Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der Regulation des IGN spielt.

5.1.8. CTCF-Bindestelle nahe ZDBF2

In der Arbeit von A. Koch [2016] zeigte sich bei *ZDBF2* eine nicht signifikante, aber sichtbare Abhängigkeit der Histonmodifikation H3K27me3 von der Anwesenheit von *H19*. Die Zelllinie mit erhöhter *H19*-Expression zeigte einen höheren Anteil an methylierten Histonen als die Zelllinie ohne *H19*. Da dort die Arbeit von *H19* als Teil eines Ribonukleinkomplex mit EZH2 schon gezeigt wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob *H19* an dieser Stelle auch die CTCF-Cohesin-Bindung beeinflusst.

ZDBF2 ist ein auf dem Chromosom 2 liegendes Gen, welches für das *DBF4-type zinc finger-containing protein 2* codiert. Es ist in allen Körperzellen an der DMR des mütterlichen Allels methyliert und nur paternal exprimiert, außer in den männlichen Keimzellen und in Plazentazellen, in welchen es von beiden Allelen exprimiert wird [Kobayashi *et al.* 2009]. Die lncRNA *GPR1AS*, welche im Bereich der DMR von *ZDBF2* liegt, ist die humane Entsprechung der lncRNA *ZDBF2linc* in Mäusen [Kobayashi *et al.* 2013]. Duffié und Mitarbeitende vermuteten 2014, dass Letztere in Mäusen sowohl für das Protein codiert, als auch als regulatorische RNA *in cis* fungiert. Somit scheint der *ZDBF2*-Lokus mit einem ausschließlich paternal exprimierten Gen, einer regulatorischen lncRNA und Beeinflussung durch Histonmodifikationen eine häufig zu findende Struktur eines imprinteten Lokus aufzuweisen.

Anhand der hier erhobenen Daten könnte diese leichte Abhängigkeit, wie sie für die Methylierung des Histons H3K27 am *ZDBF2*-Lokus gefunden wurde, auch für die Bindung von Cohesin und CTCF gelten. Die beiden *H19*⁺-Fibroblasten weisen in den einzelnen Läufen jeweils einen höheren Pulldown auf, als die BWS Δ H19/ICR1-Zelllinie.

CTCF sowie Histonmodifikationen sind als Isolationsproteine zur Begrenzung von TADs beschrieben [Bonev und Cavalli 2016]. So könnte *H19* sowohl durch die Anreicherung von CTCF als auch durch Histonmodifikationen die Stabilität der Chromatinschleife erhöhen, ohne zwingend für deren Ausbildung erforderlich zu sein. Diese Beobachtungen decken sich mit der Vermutung von Chorzempa [2020] und Merz [2015], dass *H19* eher eine modulierende Rolle im IGN innehat, als für bestimmte Bindungen essenziell zu sein. Auch Al Adami und Mitarbeitende postulieren 2015, dass die Gene des IGN allgemein vor allem für eine Balance zwischen Proliferation, Stilllegung und Differenzierung sorgen.

Nach Bonev und Cavalli bestimmt die Stabilität der TADS die Expressionswahrscheinlichkeit der enthaltenden Gene [Bonev und Cavalli 2016]. Ob

dies zu einer Steigerung der Expression von *ZDBF2* führt, wäre interessant zu untersuchen.

Die Tumorzelllinien weisen jedoch einen noch niedrigeren Pulldown als die *H19*-Zellen auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *H19* nicht allein für die Regulation verantwortlich ist, sondern die Expression multifaktoriell reguliert wird; zum Beispiel lokal und überregional über das IGN.

5.1.9. *CTCF-Bindestelle nahe IGF2R*

Im Lokus von *IGF2R* konnte Koch in ihrer Arbeit 2016 eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Vorhandensein von *H19* und der Histonmodifikation H3K27me3 zeigen. Auch hier stellte sich die Frage, ob *H19* in diesem Lokus als Teil eines Ribonukleinkomplexes auch mit CTCF und Cohesin interagieren könnte. Dazu wurde der Einfluss auf die Cohesin-Bindung an zwei CTCF-Bindestellen nahe des Genlokus von *IGF2R* (6q25.3) untersucht.

IGF2R (*Insulin-like growth factor 2 receptor*, auch *cation-independent mannose-6-phosphate receptor* (CI-MPR)) ist ein Transmembranrezeptor, der extrazelluläres *IGF2* bindet, internalisiert und somit für dessen Abbau sorgt, sowie saure Hydrolase aus dem Golgi-Apparat ins Lysosom transportiert [Hughes *et al.* 2019]. *IGF2R* ist Teil des murinen IGNs und gut erforscht: Es ist nur auf dem mütterlichen Allel ablesbar, die väterliche Kopie ist durch Methylierungen stillgelegt [Patten *et al.* 2016]. Der Imprintingstatus im Menschen wird jedoch noch diskutiert, es scheint als würde *IGF2R* in den meisten menschlichen Gewebearten biallelisch exprimiert werden [Buckberry *et al.* 2012, Moore *et al.* 2015].

Ein Knockdown von *IGF2R* in der Maus führt durch Erhöhung der *IGF2*-Konzentration aufgrund mangelnden Abbaus zu Plazentahypertrophie und disproportionalen Herzwachstum, woraus eine perinatale Letalität von über 90% resultiert [Hughes *et al.* 2019]. In gesunden, menschlichen Plazenten ist eine hohe Expression von *IGF2R* in frühen Schwangerschaftsstadien mit höherem Geburtsgewicht und größerer Schädel-Steißbein-Länge assoziiert [Moore *et al.* 2015].

Zusätzlich zur lokalen Regulation über die lncRNA *Airn* (*antisense of IGF2R non-protein coding RNA*) wird *IGF2R*, genau wie *H19* und *IGF2*, über das IGN reguliert. Bei einem Knockout von *H19* in Mäusen wird *IGF2R* laut Patten und Mitarbeitern [2016] verstärkt exprimiert. Der in dieser Arbeit gefundene Hinweis der Abhängigkeit

der Cohesin- und CTCF-Bindung in Bereichen nahe dem *IGF2R*-Lokus könnte einen Mechanismus der Beeinflussung innerhalb des menschlichen IGNs darstellen.

Ou und Kollegen zeigten 2014, dass ein Knockdown von *IGF2R* in Hämangiomzellen zur Hemmung der Tumorzellproliferation und zur Induktion von Apoptose durch Expressionsminderung von Zellzyklusregulatoren und Proliferationsmarkern sowie durch Steigerung der Expression von proapoptotischen Faktoren führt. Dies stützt die Vermutung, dass *IGF2R* auch im menschlichen IGN eine wichtige Rolle spielt.

Da jedoch ein Knockout von *IGF2R* in Mäusen durch den *IGF2*-Überschuss zu einer hohen Sterblichkeit führt, in gesunden Plazenten aber die *IGF2R*-Expression, genau wie die *IGF2*-Expression mit fetalem Wachstum assoziiert ist, wäre es ebenfalls denkbar, dass die *IGF2R*-Expression vor allem durch die Menge an *IGF2* bestimmt wird. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die hohe *IGF2*-Expression in der BWS $\Delta H19/ICR1$ -Zelllinie verantwortlich für die weniger stabile Bindung von Cohesin an dieser Stelle ist. Dies würde jedoch nicht erklären, warum die Expression von *IGF2R* durch die unterschiedliche Cohesinbindungsstabilität nicht beeinflusst wird.

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erste Hinweise auf einen Zusammenhang des Vorhandenseins von *H19* und der Cohesin-Bindung an CTCF-Bindestellen. Die vorhandenen Daten lassen die Vermutung einer Korrelation an den CTCF-Bindestellen nahe der Gene *IGF2R* und *ZDBF2* zu. Diese Hinweise sind statistisch nicht signifikant, da die drei Testdurchläufe in ihrem Niveau sehr unterschiedlich ausfallen und dadurch nur schwer miteinander vergleichbar waren. Es wäre von Nutzen, die n-Zahl der Experimente zu erhöhen, um somit eine verlässlichere Aussage treffen zu können, sowie Signifikanzberechnungen zu ermöglichen. Des Weiteren sollte ein Knockdown von CTCF und von *H19* durchgeführt werden und die Experimente wiederholt werden, um diese Hinweise verfestigen oder widerlegen zu können. Hierbei wären die Differenzen allein auf die An- oder Abwesenheit von *H19* oder CTCF zurückzuführen. Da im Bereich von *ZDBF2* eine mögliche *H19*-Abhängigkeit gefunden wurde wäre es interessant diese mit den Expressionsdaten von *ZDBF2* in An- und Abwesenheit von *H19* zu vergleichen.

Ein Nachweis von *H19* im Ribonukleinkomplex mit CTCF und Cohesin mittels RIP könnte die Assoziation ebenfalls bestätigen. Dabei wird statt der Bindung der Proteine an die DNA, die Bindung der ersteren an RNA-Segmente nachgewiesen. Anschließend könnten die gebunden RNA-Segmente wiederum mittels qPCR, Hybridisierung oder Sequenzierung analysiert werden.

Da hier mittels qPCR nur einzelne CTCF-Bindestellen auf Cohesinbindung hin untersucht wurden, blieben viele Stellen, an denen *H19* eine Rolle spielen könnte, unentdeckt. Deswegen wurde 2020 an die hier vorliegenden Experimente eine ChIP-Sequenzierung von Frau Chorzempa angeschlossen, welche bereits veröffentlicht wurde. Hier zeigte sich vor allem, dass *H19* eher die Spezifität der Cohesinbindung erhöht, als diese vollständig zu verhindern oder zu ermöglichen. Ähnlich scheint es sich mit der Expression zu verhalten, bei der *H19* eher eine regulierende Rolle hat, als Gene vollständig zu aktivieren oder zu deaktivieren [Chorzempa 2020].

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsarbeit untersuchte die Abhängigkeit der Cohesin-Bindung an ausgewählten CTCF-Bindestellen von dem Vorhandensein der lncRNA *H19*.

H19 wird zusammen mit *IGF2* über eine gemeinsame differenziell methylierte Kontrollregion reguliert und ist im Regelfall nur auf dem mütterlichen Allel aktiv [Nativio *et al.* 2009]. Es ist, wie viele imprintete Gene, Teil des *imprinted gene network* (IGN), einem Netzwerk aus sich gegenseitig regional und überregional regulierenden Genen [Patten *et al.* 2016]. Es ist bekannt, dass *H19* in verschiedenen Ribonukleinkomplexen arbeitet [Koch 2016, Westeppe 2019, Gabory *et al.* 2010, Luo *et al.* 2013, Monnier *et al.* 2013] und die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob *H19* an der Bindung und Positionierung von Cohesin und somit an der lokalen Genregulation beteiligt sein könnte.

Hierzu wurden fünf Zelllinien mit unterschiedlichen *H19*-Expressionsstatus untersucht: Die Fibroblastenlinie BWS Δ H19/ICR1, welche aufgrund einer Deletion im Bereich der ICR1 kein *H19* exprimiert, wurde mit den zwei Fibroblastenlinien SRS UPD7 1 und 2, welche durch eine maternale UPD auf beiden Allelen *H19* exprimieren können und den beiden Tumorzelllinien HB2 als fibroider Brusttumor und WCCS1 als Wilmstumor verglichen. Nach Fixierung der DNA-Protein-Bindung und Fragmentierung der DNA wurde mithilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen die Cohesin-Untereinheiten SMC1 und RAD21 die von Cohesin über CTCF gebundenen Fragmente isoliert und mittels PCR quantifiziert. Außerdem wurde die Expression der benachbarten Gene der ausgesuchten CTCF-Bindestellen analysiert.

In zwei der untersuchten Regionen, die sich in der Nähe der Gene *ZDBF2* (2q 33.3) und *IGF2R* (6q25.3) befinden, zeigte sich der α -Cohesin-Pulldown der BWS Δ H19/ICR1-Zellen erniedrigt im Vergleich zu dem der beiden *H19*⁺-Fibroblasten. Der Unterschied im Pulldown der untersuchten Fibroblasten deutet darauf hin, dass *H19* an der Cohesin-CTCF-Bindung in diesen beiden genomischen Regionen beteiligt ist. Eine Korrelation der Cohesin- und CTCF-Bindung mit der Expressionsstärke der benachbarten Gene konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dass die Cohesinbindungsstärke nur eine schwache Abhängigkeit von *H19* zeigt und die Expression dadurch nicht maßgeblich beeinflusst wird, stärkt die Annahme, dass *H19* vor allem eine regulierende Funktion zur Balance der Genexpression innerhalb des IGN hat.

Die Bindungen der bekannten CTCF-Stellen im *IGF2-H19*-Lokus zeigten sich hier wie erwartet unabhängig vom Vorhandensein von *H19*.

So ist noch weitere Forschung nötig, um die genauen Mechanismen zu verstehen, wie die lncRNA *H19* als überregionaler Mediator innerhalb des IGN agiert.

Literaturverzeichnis

Al Adhami H, Evano B, Le Digarcher A, Gueydan C, Dubois E, Parrinello H, Dantec C, Bouschet T, Varrault A, Journot L (2015): A systems-level approach to parental genomic imprinting: the imprinted gene network includes extracellular matrix genes and regulates cell cycle exit and differentiation. *Genome Res.* 2015 Mar;25(3):353-67. doi: 10.1101/gr.175919.114. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25614607; PMCID: PMC4352888.

Ariel I, Ayesch S, Perlman E J, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann V A, Podeh D, Komitowski D, Quasem A S, de Groot N, Hochberg A (1997): The product of the imprinted *H19* gene is an oncofetal RNA. *Mol Pathol*, 1997 Feb;50(1):34-44.

Bachmann N, Crazzolara R, Bohne F, Kotzot D, Maurer K, Enklaar T, Prawitt D, Bergmann C (2016): Novel deletion in 11p15.5 imprinting center region 1 in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome provides insight into distal enhancer regulation and tumorigenesis. *Pediatr Blood Cancer.* 2017 Mar;64(3)

Bonev B, Cavalli G (2016): Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet.* 2016 Dec;17(12):772

Buckberry S, Bianco-Miotto T, Hiendleder S, Roberts CT (2012): Quantitative allele-specific expression and DNA methylation analysis of *H19*, *IGF2* and *IGF2R* in the human placenta across gestation reveals *H19* imprinting plasticity. *PLoS One.* 2012;7(12):e51210. doi: 10.1371/journal.pone.0051210. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23227253; PMCID: PMC3515552.

Busslinger GA, Stocsits RR, van der Lelij P, Axelsson E, Tedeschi A, Galjart N, Peters JM (2017): Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature.* 2017 Apr 27;544(7651):503-507

Chen H, Tian Y, Shu W, Bo X, Wang S (2012): Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLoS One*. 2012;7(7):e41374. doi: 10.1371/journal.pone.0041374. Epub 2012 Jul 19. PMID: 22829947; PMCID: PMC3400636.

Cheng H, Zhang N, Pati D (2020): Cohesin subunit RAD21: From biology to disease. *Gene*. 2020 Oct 20;758:144966. doi: 10.1016/j.gene.2020.144966. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32687945; PMCID: PMC7949736.

Chorzempa H (2020): Interaction Partners and Targets of the lncRNA *H19* [Masterarbeit]. Würzburg: Fachbereich Biologie der Julius Maximilians Universität

da Conceição Braga L, Gonçalves BÔP, Coelho PL, da Silva Filho AL, Silva LM (2022): Identification of best housekeeping genes for the normalization of RT-qPCR in human cell lines. *Acta Histochem*. 2022 Jan;124(1):151821. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151821. Epub 2021 Nov 30. PMID: 34861601.

Duffié R, Ajjan S, Greenberg M V, Zamudio N, Escamilla del Arenal M, Iranzo J, Okamoto I, Barbaux S, Fauque P, Bourc'his D (2014): The *Gpr1/ZDBF2* locus provides new paradigms for transient and dynamic genomic imprinting in mammals. *Genes & development*, 28(5), 463–478. <https://doi.org/10.1101/gad.232058.113>

Edwards C und Ferguson-Smith A (2007): Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Jun;19(3):281-9

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):457-63.

Eggermann T, Buiting K, Temple IK (2011): Clinical utility gene card for: Silver-Russell syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2011 Mar;19(3)

Eggermann T, Soellner L, Bens S, Spengler S, Siebert R, Buiting K, Horsthemke B, Begemann M (2013): Methylierungsveränderungen: Molekulargenetische Diagnostik von Imprinting-Erkrankungen

Eggermann T, Algar E, Lapunzina P, Mackay D, Maher ER, Mannens M, Netchine I, Prawitt D, Riccio A, Temple IK, Weksberg R (2014): Clinical utility gene card for: Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014 Mar;22(3)

Elbracht M, Prawitt D, Nemetschek R, Kratz C, Eggermann T (2018): Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS): Aktueller Stand der Diagnostik und des klinischen Managements. *Klin Padiatr* 2018; 230(03): 151-159

Euskirchen GM, Rozowsky JS, Wei CL, Lee WH, Zhang ZD, Hartman S, Emanuelsson O, Stolc V, Weissman S, Gerstein MB, Ruan Y, Snyder M (2007): Mapping of transcription factor binding regions in mammalian cells by ChIP: comparison of array- and sequencing-based technologies. *Genome Res.* 2007 Jun;17(6):898-909. doi: 10.1101/gr.5583007. PMID: 17568005; PMCID: PMC1891348.

Fraga D, Meulia T, Fenster S (2008): Real-Time PCR. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.* John Wiley & Sons Inc. 10.3.11

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

Haig D (2000): The kinship theory of genomic imprinting. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 9–32

Hansen TV, Hammer NA, Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC.(2004): Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Molecular Cell Biology* 24: 4448–64

Hansen AS, Cattoglio C, Darzacq X, Tjian R (2018): Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures. *Nucleus.* 2018 Jan 1;9(1):20-32

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005 Jun;6(4):279-84. doi: 10.1038/sj.gene.6364190. PMID: 15815687.

Hughes J, Surakhy M, Can S, Ducker M, Davies N, Szele F, Bühnemann C, Carter E, Trikin R, Crump MP, Frago S, Hassan AB (2019): Maternal transmission of an *IGF2R* domain 11: *IGF2* binding mutant allele (*IGF2R* I1565A) results in partial lethality, overgrowth and intestinal adenoma progression. *Sci Rep.* 2019 Aug 6;9(1)

Ishida M (2016): New developments in Silver-Russell syndrome and implications for clinical practice. *Epigenomics.* 2016 Apr;8(4):563-80

Jirtle R, Weidman J (2007): Imprinted and more equal: Why silence perfectly good copies of important genes? The answer may lie in a battle between mother and father staged in the genome of their offspring. *American Scientist.* 2007 March–April 143-149

Kobayashi S, Kohda T, Miyoshi N, Kuroiwa Y, Aisaka K, Tsutsumi O, Kaneko-Ishino T, Ishino F (1997): Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7. *Hum Mol Genet.* 1997 May;6(5):781-6. doi: 10.1093/hmg/6.5.781. PMID: 9158153.

Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T (2009): Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *ZDBF2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics.* 2009;93(5):461-472.

Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T (2013): Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse *ZDBF2*linc. *Epigenetics.* 2013;8(6):635-645.

Koch A (2016): Untersuchung der Rolle der lncRNA *H19* bei der epigenetischen Genaktivierung durch die Histonmodifikation H3K27me3 [Masterarbeit]. Mainz: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität

Litwin I und Wysocki R (2018): New insights into cohesin loading. *Curr Genet.* 2018 Feb;64(1):53-61

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*. 2008 Jul;295(1):R189-96. doi: 10.1152/ajpregu.00182.2008. Epub 2008 Apr 30. PMID: 18448610; PMCID: PMC2494817.

Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J (2013): Long non-coding RNA *H19* increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett*. 2013 Jun 10;333(2):213-21

Mackay DJG, Temple IK (2017): Human imprinting disorders: Principles, practice, problems and progress. *Eur J Med Genet*. 2017 Nov;60(11):618-626. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.08.014. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28818477.

McNairn AJ, Gerton JL (2009): Intersection of ChIP and FLIP, genomic methods to study the dynamics of the cohesin proteins. *Chromosome Res*. 2009;17(2):155-63. doi: 10.1007/s10577-008-9007-9. PMID: 19308698.

Merz M (2015): Die Rolle von *H19* in einem erweiterten Netzwerk geprägter Gene [Masterarbeit]. Mainz: Fachbereich Sozialwissenschaften, Medien und Sport der Johannes Gutenberg-Universität

Monnier P, Martinet C, Pontis J, Stancheva I, Ait-Si-Ali S, Dandolo L (2013): *H19* lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 17;110(51):20693-8

Moore GE, Ishida M, Demetriou C, Al-Olabi L, Leon LJ, Thomas AC, Abu-Amro S, Frost JM, Stafford JL, Chaoqun Y, Duncan AJ, Baigel R, Brimiouille M, Iglesias-Platas I, Apostolidou S, Aggarwal R, Whittaker JC, Syngelaki A, Nicolaides KH, Regan L, Monk D, Stanier P (2015): The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Mar 5;370(1663):20140074. doi: 10.1098/rstb.2014.0074. PMID: 25602077; PMCID: PMC4305174.

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.* 2009 Nov;5(11):e1000739

Nativio R, Sparago A, Ito Y, Weksberg R, Riccio A, Murrell A (2011): Disruption of genomic neighbourhood at the imprinted *IGF2-H19* locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Hum Mol Genet.* 2011 Apr 1; 20(7):1363-74

Ou JM, Lian WS, Qiu MK, Dai YX, Dong Q, Shen J, Dong P, Wang XF, Liu YB, Quan ZW, Fei ZW (2014): Knockdown of *IGF2R* suppresses proliferation and induces apoptosis in hemangioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2014 Sep;45(3):1241-9. doi: 10.3892/ijo.2014.2512. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24968760.

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.* 2008 Oct 24;32(2):232-46. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.022. PMID: 18951091.

Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM (2018): Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for qPCR Gene Expression Analysis During iPS Reprogramming Process. *Sci Rep.* 2018 Jun 7;8(1):8716. doi: 10.1038/s41598-018-26707-8. PMID: 29880849; PMCID: PMC5992140.

Patten M, Cowley M, Oakey R, Feil R (2016): Regulatory links between imprinted genes: evolutionary predictions and consequences. *Proc. R. Soc. B* 283: 20152760.

Peng F, Li TT, Wang KL, Xiao GQ, Wang JH, Zhao HD, Kang ZJ, Fan WJ, Zhu LL, Li M, Cui B, Zheng FM, Wang HJ, Lam EW, Wang B, Xu J, Liu Q (2017): *H19/let-7/LIN28* reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death Dis.* 2017 Jan 19;8(1):e2569. doi: 10.1038/cddis.2016.438. PMID: 28102845; PMCID: PMC5386357

Rump P, Zeegers MP, van Essen AJ (2005): Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2005 Jul 1;136(1):95-104.

Sartorelli V, Puri PL (2018): Shaping Gene Expression by Landscaping Chromatin Architecture: Lessons from a Master. *Mol Cell*. 2018 Aug 2;71(3):375-388. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.025. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29887393; PMCID: PMC6076330.

Schaaf C, Zschocke J (2018): Basiswissen Humangenetik. 3.Auflage. Berlin: Springer-Verlag. 76

Schär P, Fäsi M, Jessberger R (2004): SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 27;32(13):3921-9. doi: 10.1093/nar/gkh716. PMID: 15280507; PMCID: PMC506803.

Thermo Fisher Scientific (2016): NanoDrop One Bedienungsanleitung. Revision B. Madison WI: Thermo Fisher Scientific Inc. 17

Tsai PF, Dell'Orso S, Rodriguez J, Vivanco KO, Ko KD, Jiang K, Juan AH, Sarshad AA, Vian L, Tran M, Wangsa D, Wang AH, Perovanovic J, Anastasakis D, Ralston E, Ried T, Sun HW, Hafner M, Larson DR, Sartorelli V (2018): A Muscle-Specific Enhancer RNA Mediates Cohesin Recruitment and Regulates Transcription In trans. *Mol Cell*. 2018 Jul 5;71(1):129-141.e8

Varrault A, Dantec C, Le Digarcher A, Chotard L, Bilanges B, Parrinello H, Dubois E, Rialle S, Severac D, Bouschet T, Journot L (2017): Identification of Plagl1/Zac1 binding sites and target genes establishes its role in the regulation of extracellular matrix genes and the imprinted gene network. *Nucleic Acids Res*. 2017 Oct 13;45(18):10466-10480

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

Wendt KS, Peters JM (2009): How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res.* 2009;17(2):201-14

Westeppe S (2019): MBD1: Analyse der H3K9me3 in ausgewählten DMRs unter Einfluss der *H19*lncRNA [Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin]. Mainz: Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität

Wolf JB, Hager R (2006): A maternal-offspring coadaptation theory for the evolution of genomic imprinting. *PLoS Biol.* 2006 Nov;4(12):e380

Yoshimura H, Matsuda Y, Yamamoto M, Kamiya S, Ishiwata T (2018): Expression and role of long non-coding RNA *H19* in carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018 Jan 1;23:614-625

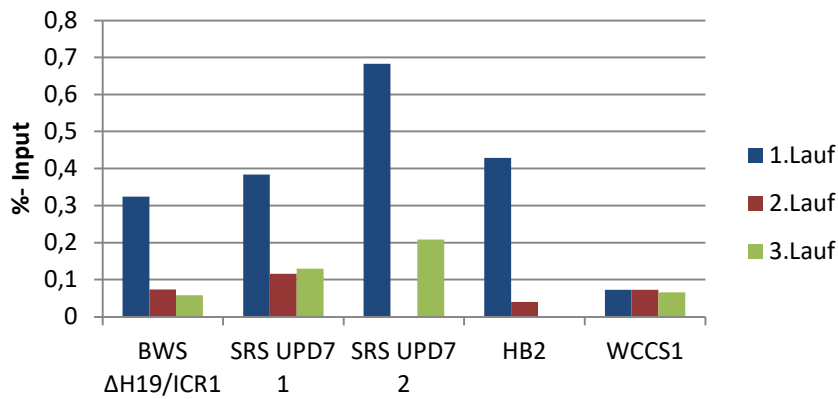
Zuin J, Dixon JR, van der Reijden MI, Ye Z, Kolovos P, Brouwer RW, van de Corput MP, van de Werken HJ, Knoch TA, van IJcken WF, Grosveld FG, Ren B, Wendt KS (2014): Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 21;111(3):996-1001

7. Anhang

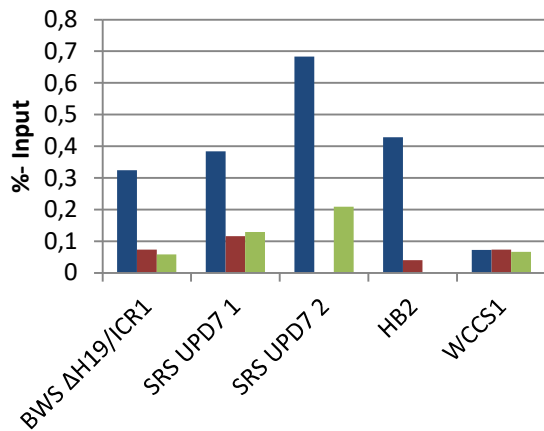
Unnormalisierte Daten

Diese Daten sind ausschließlich auf den Input normalisiert.

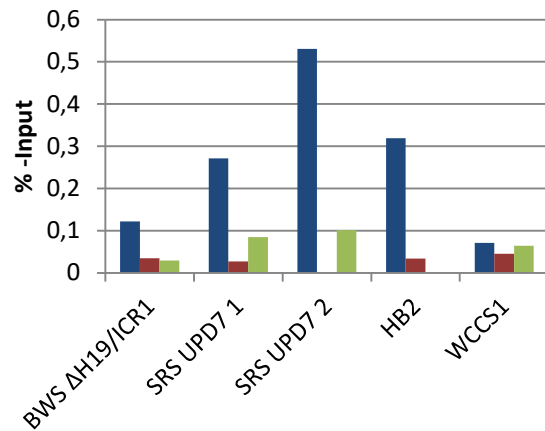
Anti-Cohesin *ZDBF2*

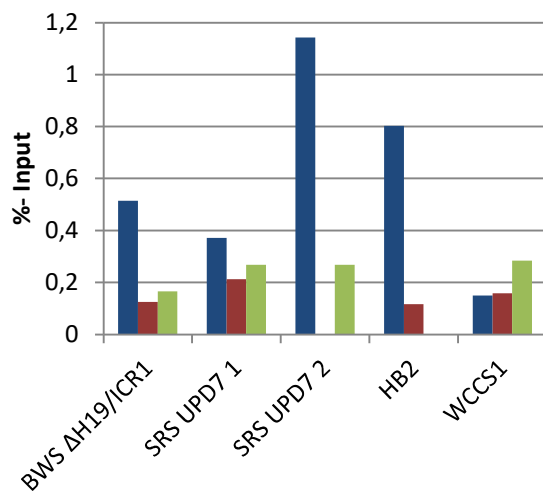
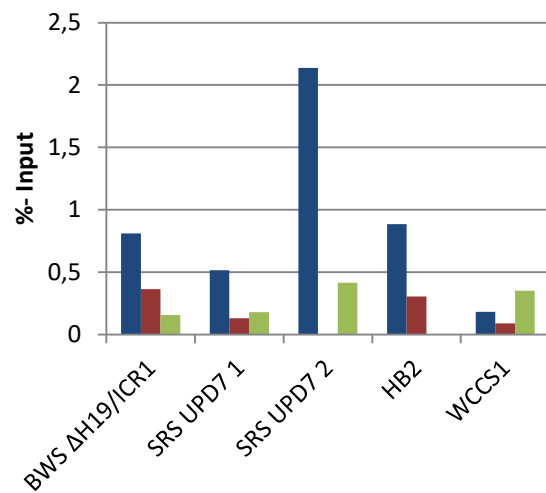
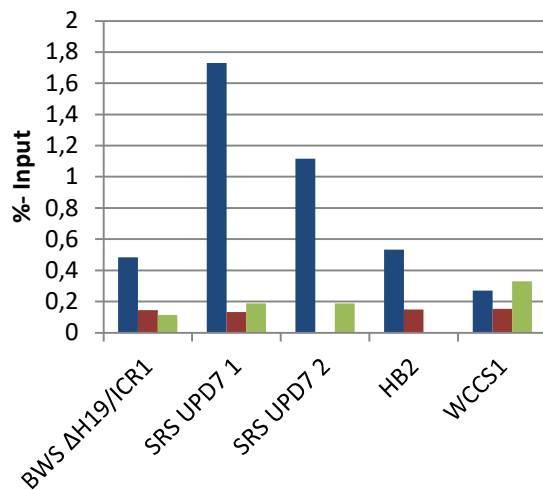
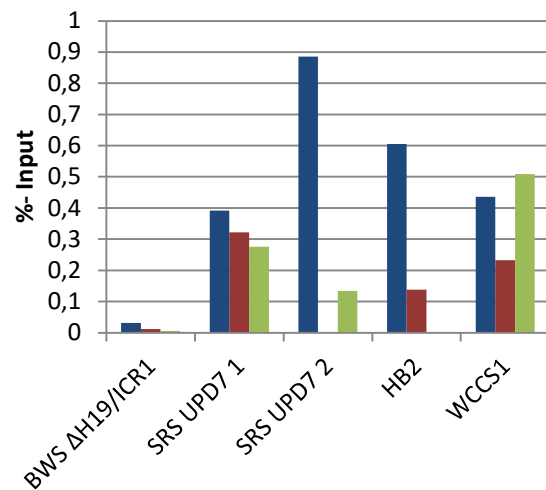
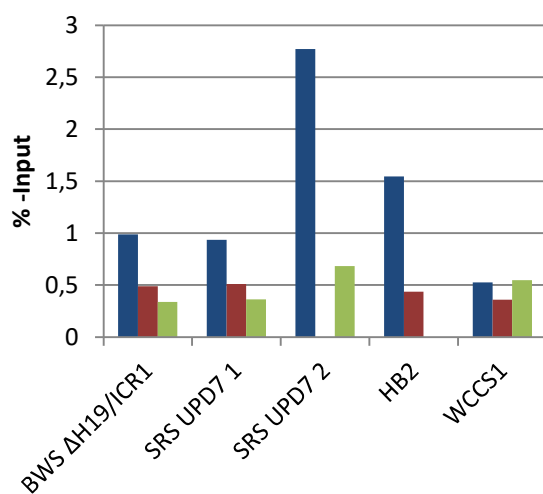
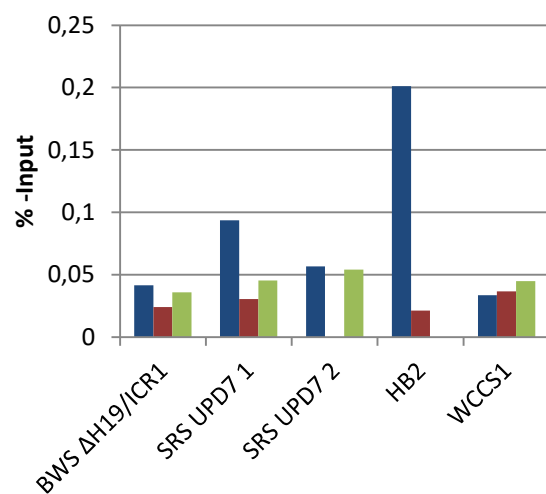


Anti-Cohesin *IGF2R* *CTS1*



Anti-Cohesin *IGF2R* *CTS2*

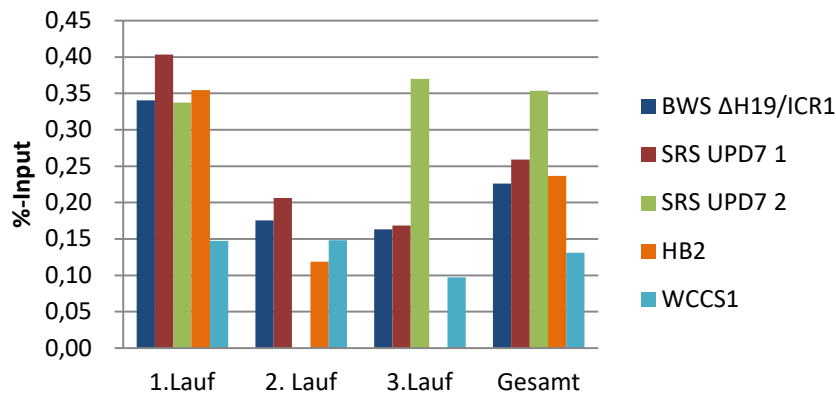


Anti-Cohesin *CTCF AD***Anti-Cohesin *CCD*****Anti-Cohesin *CTCF DS*****Anti-Cohesin *H19 ICR*****Anti-Cohesin *CCD1 KW*****Anti-Cohesin *OSBP***

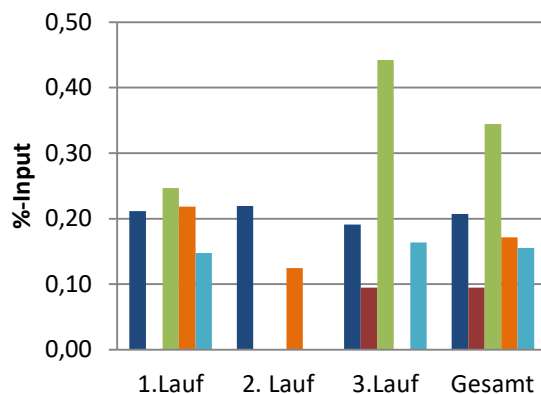
Normalisierte Daten, aufgeschlüsselt nach den drei Läufen

Diese Daten wurden nochmal auf die drei Normalisierungsregionen *MYC*, *STAT3* und *SYN3* normalisiert. Die Aufschlüsselung nach den drei Läufen wurde der Übersicht halber in der Arbeit nicht verwendet.

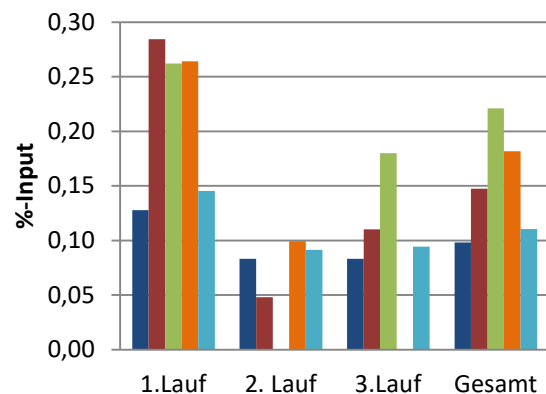
ZDBF2



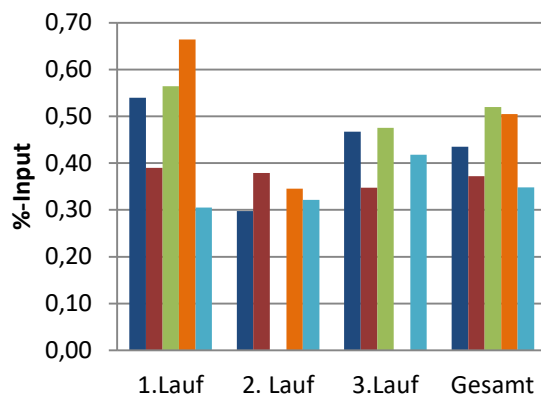
IGF2R CTS1



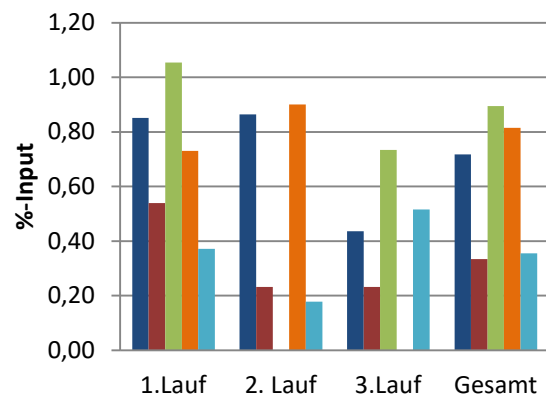
IGF2R CTS2



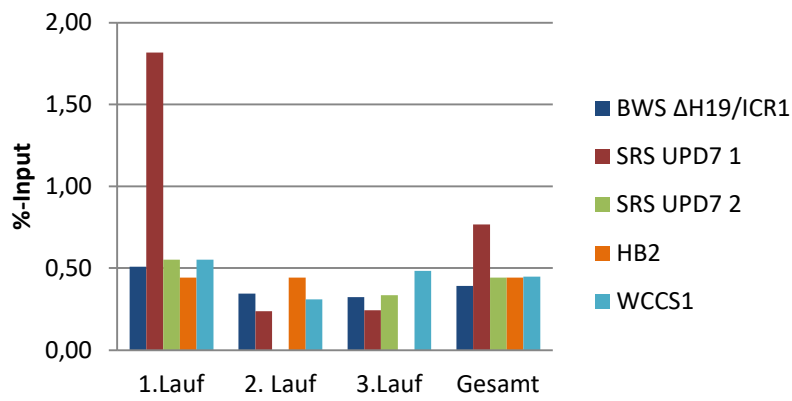
CTCF AD



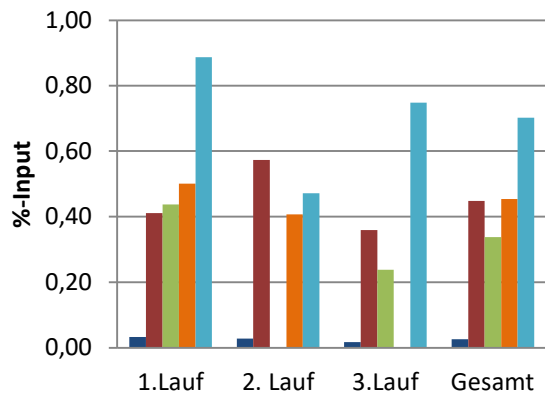
CCD



CTCS DS



H19 ICR



CCD1KW

