

**Funktionelle Analyse von *cis*- bzw. *trans*-regulierenden
Elementen der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region**

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

vorgelegt von
Gilles Gasparoni

Saarbrücken, im September 2009

Datum des Kolloquiums: 09/12/2009

Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels

Vorsitzender: Prof. Dr. Manfred Schmitt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörn Walter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Stahl

Akad. Mitarbeiter: Dr. Gert-Wieland Kohring

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Jörn Walter bedanken. Nur durch sein Vertrauen in mich, seine freundlichen Hilfestellungen und die Früchte tragenden Diskussionen ist diese Arbeit möglich gewesen.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Stahl bedanken, der ohne zu zögern die Begutachtung der Arbeit zusagte.

Besonderer Dank geht an Frau PD Dr. Martina Paulsen. Ihrer vollen Unterstützung in Form von Ratschlägen, steter Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt hilfreichen Korrekturvorschlägen bei der Anfertigung der Arbeit war ich mir stets sicher.

Aufrichtiger Dank an Corry Schwierzy (Yeastbeast), die mit mir durch dick und dünn auf dem verschlungenen Pfad zur Promotion gegangen ist und eine gute Freundin wurde. Herzlicher Dank an die Doktoranden Julia Arand, Diana Santacruz (Dirty Diana) und Mark Wossidlo (Spotty) für die vielen Ratschläge und Ermunterungen wenn's mal nicht lief. Dr. Konstantin Lepikhov (Kostya) danke ich für die Hilfe im Embryolabor, die unbezahlbaren Tipps und Tricks (die nur er kennt) sowie die nette Gesellschaft während der Arbeitszeit am Wochenende.

Großen Dank richte ich auch an Beate Schmitt für ihre zahlreichen Hilfseinsätze im Labor und der Zellkultur. Auch danke ich Eva Dilly, Jasmin Gries, Nicole Jundel, Christina LoPorto und nicht zuletzt Dr. Sascha Tierling für ihre stets freundliche Art, Hilfestellungen und ihre zahlreichen Tipps bei technischen Problemen. Ferner danke ich den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Daniel Jans, Dr. Tarang khare, Julia Mehn (Höllens-Helga), Sabine Reither und Miriam Zipper, die während unserer gemeinsamen Zeit eine große Hilfe waren.

Weit über allem möchte ich Nina Pälmeke dafür danken, dass Sie Teil meines Lebens ist.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Besonders meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht und dafür, dass sie mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Gilles Gasparoni

Saarbrücken im September 2009

„Fiat Lux!“

(Gott, nach Genesis 1.3)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Epigenetik	- 1 -
1.1.1 Elterliche Prägung (Parentales Imprinting)	- 1 -
1.2 Genomisches Imprinting	- 2 -
1.2.1 Histon-Modifikationen.....	- 5 -
1.2.2 DNA-Methylierung.....	- 6 -
1.2.3 Imprinting Center (ICs/ICRs).....	- 7 -
1.3 Die Beckwith-Wiedeman-Syndrom Region (BWS)	- 8 -
1.3.1 Regulation der allelspezifischen Genexpression in der <i>Igf2/H19</i> Region.....	- 8 -
1.3.2 Die KvDMR1-Domäne.....	- 10 -
1.4 Repetitive Elemente in Imprinting-Regionen	- 11 -
1.5 Nichtkodierende RNAs (non-coding RNAs) in Imprinting-Regionen	- 13 -
1.6 Die <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region	- 14 -
1.6.1 Identifizierung der <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region	- 14 -
1.6.2 Gene und Aufbau der <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region.....	- 17 -
1.6.3 DMRs in der <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region	- 22 -
1.7 RNA-Interferenz (RNAi)	- 26 -
1.7.1 microRNAs (miRNAs): Transkription und Prozessierung.....	- 26 -
1.7.2 miRNA-Target-Erkennung und Bindung	- 29 -
1.8 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	- 31 -
2 Material und Methoden	- 32 -
2.1 Material	- 32 -
2.1.1 Chemikalien.....	- 32 -
2.1.2 Reaktionskits	- 34 -
2.1.3 Größenstandards für Agarosegele	- 34 -
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	- 35 -
2.1.5 Kulturmedien.....	- 37 -
2.1.6 Enzyme.....	- 38 -
2.1.7 Vektoren	- 39 -

2.1.8 Oligonukleotide.....	- 44 -
2.1.9 Eukaryotische Zelllinien.....	- 47 -
2.1.10 Bakterienstämme	- 49 -
2.1.11 Mäuse	- 49 -
2.1.12 Instrumente und Maschinen	- 49 -
2.2 Methoden.....	- 50 -
2.2.1 Isolation, Analyse und Modifikation von DNA.....	- 50 -
2.2.2 Isolation, Analyse und Modifikation von RNA	- 57 -
2.2.3 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	- 61 -
2.2.4 Zellbiologische Methoden.....	- 61 -
2.2.5 Bioinformatische Arbeiten	- 65 -
2.2.6 Berechnungen und Statistik.....	- 67 -
3 Ergebnisse	- 68 -
3.1 Funktionelle Analyse <i>cis</i>-agierender Elemente der <i>Dlk1/Gtl2</i> Region	- 68 -
3.1.1 <i>In silico</i> Charakterisierung der IG-DMR Tandem Repeats.....	- 68 -
3.1.2 Der nicht-konservierte IG-DMR Tandem Repeat 2.....	- 72 -
3.1.3 Der konservierte Tandem Repeat stromabwärts von <i>Gtl2/MEG3</i>	- 93 -
3.1.4 Der konservierte IG-DMR Tandem Repeat 1.....	- 96 -
3.1.5 Der nicht-konservierte Tandem Repeat stromaufwärts von <i>Gtl2</i>	- 100 -
3.2 Funktionelle Analyse <i>trans</i>-agierender Elemente der <i>Dlk1/Gtl2</i> Region....	- 102 -
3.2.1 Prinzip des DLAs zur Detektion von RNAi-Effekten.....	- 103 -
3.2.2 microRNA-Expressions-Plasmide	- 104 -
3.2.3 Northern-Blot Hybridisierung zur direkten miRNA-Detektion.....	- 105 -
3.2.4 <i>In silico</i> Vorhersage von miRNA Bindestellen.....	- 106 -
3.2.5 Konstruktion der RNAi-Reporter-Plasmide	- 107 -
3.2.6 Dual Luciferase-Assays zur Detektion von RNAi-Effekten	- 107 -
4 Diskussion	- 113 -
4.1 Promotor-Aktivität im Bereich der IG-DMR	- 114 -
4.2 Mögl. Funktionen der intergen. Transkription im Bereich der IG-DMR.....	- 117 -
4.3 Der IG-DMR Tandem Repeat 1 zeigt konservierte Insulator-Effekte.....	- 119 -
4.4 Der Tandem Repeat stromabwärts von <i>Gtl2</i> zeigt Silencer-Potenzial	- 120 -
4.5 Mögliche Insulator-Funktion der <i>Gtl2</i>-CTCF-Bindestellen	- 121 -
4.6 Runx1-Kotransfektion reprimiert Promotor- und Enhancer-Aktivität.....	- 122 -
4.7 Zusammenfassende Regulationsmodelle	- 124 -
4.8 RNAi-Assays.....	- 131 -
Zusammenfassung.....	- 134 -
Summary.....	- 135 -

5 Referenzen	- 136 -
6 Anhang	- 160 -
6.1 DNA-Sequenz-Analysen	- 160 -
6.2 microRNA-Sequenz-Analysen	- 166 -
6.3 Plasmid-Katalog (auf pGL3-Basierend)	- 168 -
6.4 RT-PCRs	- 172 -
6.5 Genotypisierung und SNUPE-Assays	- 175 -
6.6 Dual-Luciferase-Reporter-Assays (DLAs)	- 176 -
6.7 Northern Blot Hybridisierung	- 184 -
6.8 Gelelektrophoretische DNA-Auftrennung	- 185 -
7 Abkürzungsverzeichnis	VII
8 Abbildungsverzeichnis	IX
9 Tabellenverzeichnis	XII
10 Lebenslauf	XIII
Publikationsverzeichnis	XIV
Posterbeiträge	XIV
Vorträge	XV
Betreute Diplomarbeiten	XV
Eidesstattliche Erklärung	XVI

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Während die Genetik die Funktionen des Erbguts untersucht, welche sich als direkte Folge der DNA-Sequenz ableiten lassen, behandelt die **Epigenetik** jene Vorgänge, die der DNA-Sequenz aufgesetzt sind („epi-“ = auf) und die Realisierung der Erbinformationen regulieren (z.B. Genexpression). Genauer befasst sich die Epigenetik mit den Mechanismen, die eine Veränderung in der Regulation bzw. Expression von Genen bewirken, und der Frage, wie dieser Zustand von Zelle zu Zelle weitergegeben wird.

1.1.1 Elterliche Prägung (Parentales Imprinting)

Lange Zeit wurde von einem äquivalentem Beitrag der beiden elterlichen Genome zur Entwicklung des Nachwuchses entsprechend der Mendel'schen Vererbungslehre (1865) ausgegangen. Aufbauend auf Arbeiten von LJ Stadlers am R-Locus des Mais (1946) erbrachten die Studien von R. Alexander Brink im Jahre 1956 erste Anzeichen für Abweichungen von den Mendel'schen Gesetzen.

Im Jahre 1984 wurden zeitgleich zwei unabhängige Studien publiziert, welche die Generierung von gynogenetischen (durch Fusion zweier weiblicher Pronuclei) bzw. androgenetischen (Fusion zweier männlicher Pronuclei) Embryonen vorstellten (McGrath und Solter 1984; Surani et al. 1984). Die parthogenetischen Embryonen zeigten starke Missbildungen und waren nicht lebensfähig; dies deutet darauf hin, dass mütterliches und väterliches Genom unterschiedliche Beiträge zur Embryogenese liefern. Erste Erklärungsversuche für dieses Phänomen lieferten die Arbeiten von JL Swain im Jahre 1987 mit transgenen Mäusen, die eine autosomale Translokation des c-myc-Gens trugen (Swain et al. 1987). Wurde das Transgen vom Vater vererbt, beobachtete man beim Nachwuchs eine herzspezifische Expression des Gens, nicht jedoch bei Vererbung von mütterlicher Seite. Dabei korrelierte das Expressionsmuster des Gens exakt mit dem Status der DNA-Methylierung auf den parental Allelen. So zeigte sich bei Transmission durch die weibliche Keimbahn eine *de novo* Methylierung des Transgens, bei Transmission durch die männliche Keimbahn ging diese jedoch wieder verloren.

Bald darauf konnten in der Maus mit *Igf2* (Insulin-like growth factor 2) bzw. *Igf2r* (Insulin-like growth factor 2 receptor) auch die ersten endogenen Loci mit **allelspezifischer Genexpression** identifiziert werden (genomisches Imprinting) (Barlow et al. 1991; DeChiara et al. 1991). Seitdem hat sich die Zahl der imprinteten Gene als auch die der Säugetier-Arten, in welchen genomisches Imprinting bekannt ist, kontinuierlich erhöht.

In neueren Arbeiten gelang die Erzeugung sogenannter bimaternaler Mäuse. Dazu wurden eine ausgewachsene und eine wachsende Oozyte miteinander verschmolzen, allerdings entwickelten sich die generierten Embryos nur bis zum Tag 13.5 dpc (Kawahara et al. 2006). Grund hierfür ist wahrscheinlich die Repression der paternal exprimierten Gene *Dlk1* und *Igf2*, sowie die biallelische Expression des normalerweise nur maternal exprimierten *H19*-Gens. Die Gene scheinen eine synergistische Rolle bei der Plazentation, der Hämatopoese und der fötalen Leberentwicklung zu spielen (Wu et al. 2008; Kawahara et al. 2007). Durch Deletion der Imprinting-Kontroll-Bereiche der *Dlk1/Gtl2*- und der *Igf2/H19* Region konnten lebensfähige bimaternal Mäuse generiert werden. Damit scheinen die beiden Imprinting-Regionen *Igf2/H19* bzw. *Dlk1/Gtl2* die einzigen paternalen Barrieren in der Embryonal-Entwicklung darzustellen (Wu et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich genomisches Imprinting in Säugetieren findet und die allelspezifische Expression eines Gens in Abhängigkeit vom elterlichen Ursprung beschreibt. Reguliert wird dies durch differentielle epigenetische Markierungen auf den unterschiedlichen Allelen.

1.2 Genomisches Imprinting

Der Begriff des **genomischen Imprintings** bezeichnet die Fähigkeit von Zellen eine unterschiedliche epigenetische Signatur (**Epigenom**) auf den elterlichen Chromosomen aufrecht zu erhalten. Diese ist vererbbar und beinhaltet nicht-mutative, reversible Modifikationen von DNA-Nukleotiden bzw. Histon-Proteinen und wird als **epigenetisches Gedächtnis** bezeichnet. Diese unterschiedlichen Markierungen der Chromosomen beeinflussen die Genexpression der parental Allele (Solter 1988; Reik 1992). Gene die in Abhängigkeit der Herkunft des elterlichen Allels unterschiedlich exprimiert werden, bezeichnet man als **imprintete Gene**. In Maus bzw. Mensch sind bis heute ca. 100 Gene, die eine elterliche Prägung aufweisen, bekannt (Morison et al. 1998; Morison et al. 2005).

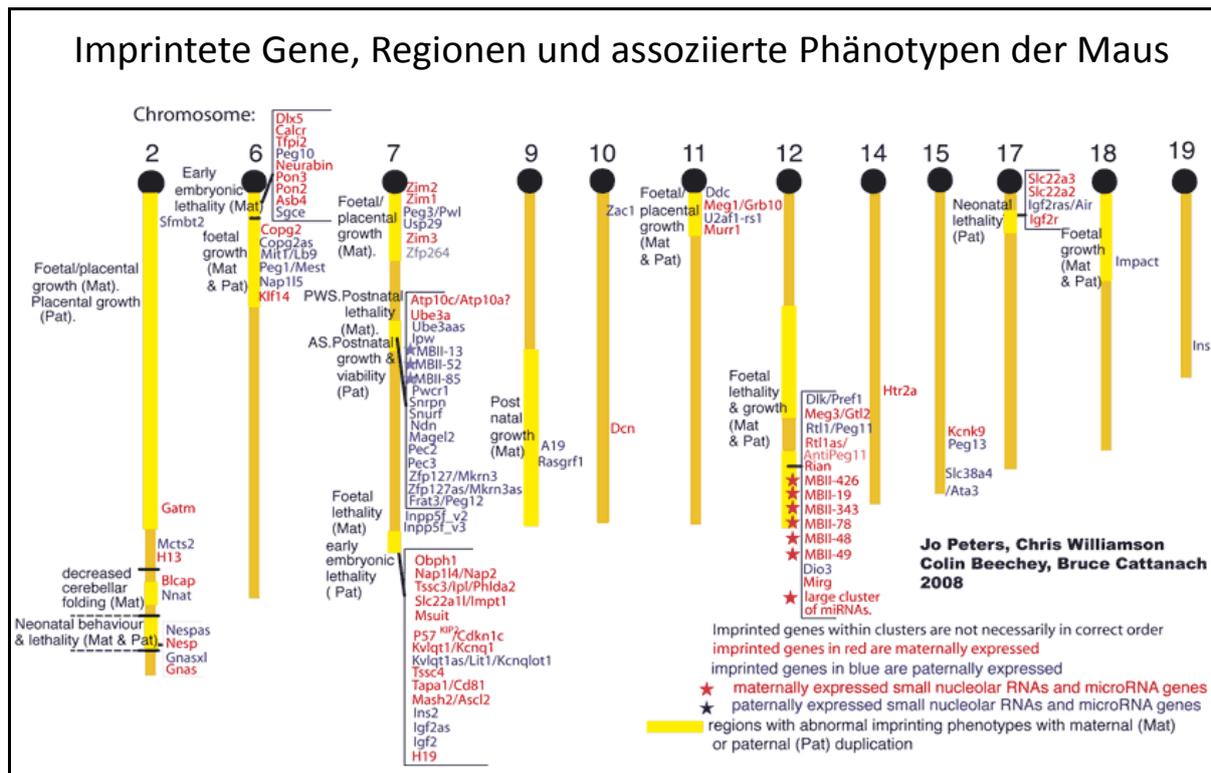


Abbildung 1.1: Alle bislang identifizierten imprinteten Gene der Maus. Zusätzliche Informationen sind auf den Internetseiten <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting> bzw. <http://igc.otago.ac.nz> zu finden.

Imprintete Gene sind nicht gleichmäßig über das Genom verteilt sondern treten in bestimmten Regionen konzentriert auf (sog. Imprinting-Cluster). Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die bislang in der Maus identifizierten imprinteten Gene und ihrer Positionen. Die Gesamtzahl der imprinteten Gene in Maus bzw. Mensch ist nicht bekannt, Schätzungen gehen jedoch davon aus, dass bis zu 600 Gene elterlich geprägt sind (Luedi et al. 2005). Durch moderne Hochdurchsatz-Methoden konnten erst kürzlich weitere imprintete Gene identifiziert werden (Babak et al. 2008; Ruf et al. 2006; Wang et al. 2008; Smith et al. 2003). Dass außer Mensch und Maus auch andere Spezies genomisches Imprinting aufweisen, konnte schon in vielen Studien gezeigt werden (Young et al. 2001; Feil et al. 1998; Cocket et al. 1996). So wurde genomisches Imprinting bereits in Plazenta-Tieren (*Eutheria*), Beuteltieren (*Metatheria*) und Blüten-Pflanzen (*Spermatophyta*) entdeckt (Scott et al. 1998; Killian et al. 2000; O'Neill et al. 2000), nicht jedoch in Kloakentieren/Ursäugetern (*Protheria*) oder anderen Vertebraten bzw. Invertebraten. Dabei ist die elterliche Prägung eines bestimmten Genes zwischen den verschiedenen Spezies konserviert. Dies konnte als erstes am *Igf2r*-Gen nachgewiesen werden, welches in den meisten Säugetieren Imprinting aufweist (Killian et al.

2000). Interessanterweise scheinen sich jedoch die elterliche Prägung eines Gens und die dazu genutzten Imprinting-Kontroll-Elemente in den unterschiedlichen Arten divergent zu entwickeln (Wutz et al. 1997; Weidman et al. 2006; O'Sullivan et al. 2007; Yotova et al. 2008). Die zur Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der Imprints genutzten Mechanismen sind aber stets ähnlich:

- Zum einen finden sich in den Imprinting-Clustern sogenannte **Imprinting Center** oder auch **Imprinting Control Regions** (ICs bzw. ICRs). Diese Imprinting Center sind CG-reiche Regionen, stellen häufig CpG-Inseln dar und weisen oft allelspezifische DNA-Methylierung auf (Edwards et al. 2007). Die Funktionalität des Imprinting-Centers unterscheidet sich auf den beiden elterlichen Chromosomen in direkter Abhängigkeit von den jeweiligen allelspezifischen epigenetischen Modifikationen.
- Für eine Reihe geprägter Gen-Regionen konnte gezeigt werden, dass allelspezifische **Histon-Modifikationen** der ICs bzw. anderer regulatorischer Bereiche (z.B. Promotoren) essentiell am Imprinting-Mechanismus beteiligt sind.
- In oder nahe dieser IC treten häufig sogenannte **Tandem Repeats** auf; dies sind zwei oder mehr fast exakte Kopien einer Nukleotidabfolge (Monchton et al. 1994; Paulsen et al. 2001; Hutter et al. 2006). Dabei scheint der repetitive Charakter dieser Sequenzwiederholungen zur Manifestierung der Imprints von großer Bedeutung zu sein (Smrzka et al. 1995; Sasaki et al. 1996; Reinhart et al. 2002; Yates et al. 1999; Reinhart et al. 2006).
- Nicht zuletzt wurden in Imprinting Centern bzw. ihrer Nachbarschaft **nicht-kodierende Transkripte** identifiziert, welche eine wichtige Funktion in der *cis*-Regulation der lokalen Genexpression inne haben können (Moore et al. 1997). Beispiele hierfür sind das *Air*-Transkript, welches eine Rolle bei der allelspezifischen Expression des *Igf2r*-Gens spielt (Wutz et al. 1997; Yotova et al. 2008), sowie das *Kcnq1ot1* (*Lit1*) Transkript, das in der Beckwith-Wiedeman-Syndrom Region das Imprinting kontrolliert (Redrup et al. 2009; Pandey et al. 2008; Mohammad et al. 2008; Mitsuya et al. 1999; Smilinich et al. 1999).

1.2.1 Histon-Modifikationen

Die DNA liegt nicht nackt im Zellkern vor, sondern ist an **Histon-Proteine** und Nicht-Histon-Proteine gebunden. Die Gesamtheit dieser komplexen Strukturen wird auch als **Chromatin** bezeichnet. Die kleinste Verpackungseinheit der DNA stellt dabei das **Nukleosom** dar, einem in seiner Struktur hochkonservierten DNA-Protein-Komplex (s. Abb. 1.2) (Olins und Olins 1974; Richmond et al. 1984; Schalch et al. 2005). Dieser besteht aus einem Histon-Oktamer mit je 2 Molekülen der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4. Nukleosomen sind durch „linker-DNA“ an welche das „linker-Histon“ H1 assoziiert ist, miteinander verbunden. Die DNA umwickelt dabei den sogenannten Nukleosomenkern, welcher aus je zwei H2A/H2B und zwei H3/H4-Dimeren besteht. Die N-Terminalen Enden der Histone können (an mehreren Positionen) via Methylierung (Mono-, Di-, Tri-), Phosphorylierung, Sumoylierung, Ubiquitinylierung bzw. Acetylierung modifiziert werden. Die Gesamtheit aller Histon-Modifikationen stellt den sogenannten **Histon-Code** dar. Durch die Modifikationen verändert sich die Bindungsstärke zwischen DNA und Histonen was zu einer mehr oder weniger offenen DNA-Konformation führt (**Euchromatin** bzw. **Heterochromatin**). Durch Kondensation/Dekondensation des Chromatins können ganze chromosomale Abschnitte aktiviert bzw. stillgelegt werden. Studien verschiedener Histon-Modifikationen zeigten, dass bestimmte regionale Kombinationen von Histon-Modifikationen mit bestimmten biologischen Funktionen assoziiert sind. Zum Beispiel wird H3 dimethyl-Lysine-4 (H3K4Me2) mit Heterochromatin assoziiert (Wen et al. 2009), während H3K36Me3 in transkribierten Regionen angereichert ist. H3K4Me3 wird in Promotorbereichen mit Aktivität, H3K27Me3 dagegen mit Stilllegung des entsprechenden Gens assoziiert (Bernstein et al. 2005; Ringrose et al. 2004; Schuettengruber et al. 2007). In embryonalen Stammzellen konnte inzwischen für Promotorbereiche wichtiger Entwicklungs-Gene ein bivalenter Chromatin-Zustand identifiziert werden, welcher vermutlich zur schnellen Aktivierung/Inaktivierung dieser Gene dient (Bernstein et al. 2006). Ob sich in imprinteten Regionen neben der differentiellen DNA-Methylierung auch Auffälligkeiten bzgl. der Histon-Modifikationen finden, wurde bereits in vielen Studien untersucht (Hark und Tilghman 1998; Khosla et al. 1999). So konnte man allelspezifische Histon-Modifikationen im Bereich von ICRs nachweisen (Delaval et al. 2007; Mikkelsen et al. 2007; Wen et al. 2008).

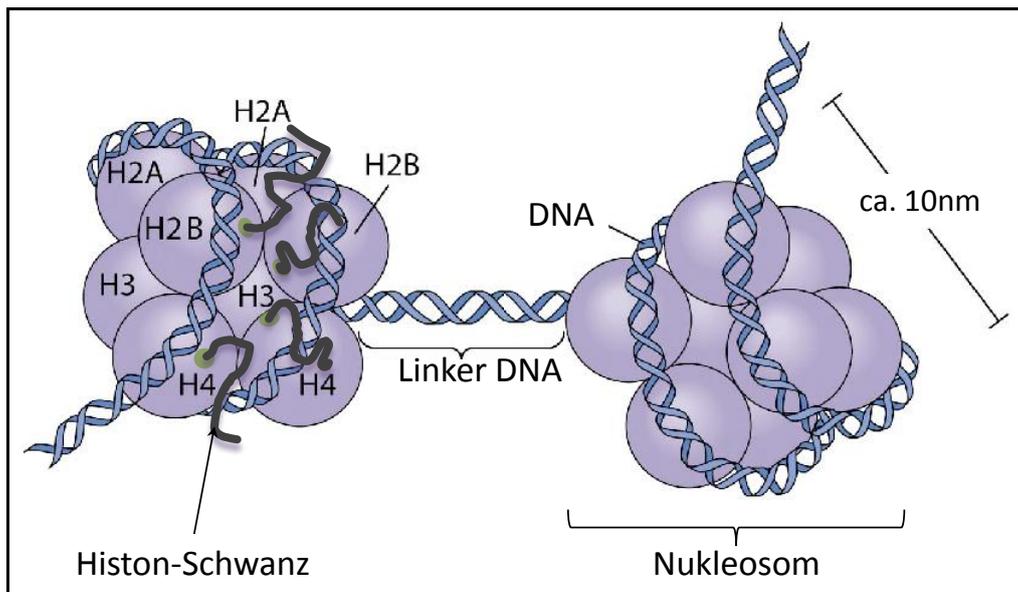


Abbildung 1.2: Schematische Anordnung der Histone zweier Nucleosomen. Die herausstehenden Histon-Schwänze sind Gegenstand mannigfaltiger Modifikationen (z.B. Methylierung, Acetylierung, etc.). Dies wirkt sich auf die DNA-Konformation und damit auf die Genexpression aus. (Bildquelle: <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/1820.jpg>; verändert)

1.2.2 DNA-Methylierung

Eine weitere Form epigenetischer Modifikationen ist die Methylierung genomischer DNA an den Nucleotiden Cytosin und Adenin (Pflanzen, Bakterien). Dabei wird eine Methylgruppe kovalent an die Base des Nucleotides gebunden. Die Cytosin-Methylierung im CpG-Kontext stellt die wichtigste DNA-Basenmodifikation bei Säugetieren dar. Bioinformatische Analysen zeigten, dass CpG-Dinucleotide nicht gleichmäßig über das Genom verteilt sind, sondern gehäuft innerhalb kurzer Sequenzabschnitte auftreten und sog. **CpG-Inseln** bilden (Gardiner-Garden und Frommer 1987). CpG-Inseln finden sich häufig im Promotorbereich von Genen und sind meist unmethyliert. Methylierung solcher CpG-Inseln kann Einfluss auf das Bindeverhalten von z.B. Transkriptionsfaktoren oder der Transkriptionsmaschinerie ausüben, ein Promotor mit einer CpG-reichen Region/CpG-Insel kann somit durch DNA-Methylierung epigenetisch stillgelegt werden. CpG-Inseln in Imprinting-Regionen können auf den beiden parental Allelen unterschiedlich methyliert sein und so zur allelspezifischen Genexpression beitragen (Reik et al. 1987). Von entscheidender Bedeutung für den Organismus ist dabei, dass die allelspezifischen Methylierungsmuster im Genom bei jeder Zellteilung korrekt auf die Tochterzellen übertragen, in der Keimbahn gelöscht und anschließend geschlechtsspezifisch wieder etabliert werden (Reik und Walter 2001).

Um all dies zu erreichen spielen verschiedene DNA-Methyltransferasen eine bedeutende Rolle. Die Familie der Methyltransferasen umfasst mit der *de novo* Methylierung und der Erhaltungsmethylierung zwei Typen enzymatischer Aktivität: Die Erhaltungsmethylierung ist notwendig, um das DNA-Methylierungsmuster einer Zelle bei der Zellteilung exakt auf die beiden Tochterzellen zu übertragen. Dies wird durch das Enzym **Dnmt1** gewährleistet (Leonhardt et al. 1992). Die Rolle des **Dnmt2**-Proteins bzgl. der DNA-Methylierung ist noch Gegenstand aktueller Forschung (Schaefer et al. 2008), jedoch wurde bereits seine Rolle in der tRNA *de novo* Methylierung untersucht (Goll et al. 2006). Die Dnmt3-Proteinfamilie stellt mit **Dnmt3a** und **Dnmt3b** die DNA *de novo* Methyltransferasen. Beide Proteine sind in der männlichen und weiblichen Keimbahn exprimiert und methylieren zuvor unmethylierte DNA-Abschnitte (Okano et al. 1999). Dnmt3b scheint vor allem zur Methylierung zentromerischer repetitiver Satelliten DNA sowie zur transkriptionellen Stilllegung retroviraler Elemente wichtig zu sein, während Dnmt3a eher zur Etablierung der allelspezifischen Methylierungsmuster in Imprinting-Regionen dient. Dabei interagiert es mit **Dnmt3l**, welches selbst keine katalytische Aktivität besitzt (Kaneda et al. 2004).

1.2.3 Imprinting Center (ICs/ICRs)

In allen bekannten Imprinting-Regionen konnten bisher ein oder mehrere Imprinting Center identifiziert werden. Sie dienen als **Haupt-Regulations-Elemente** der allelspezifischen Expression aller Gene der jeweiligen Imprinting-Region. Charakteristisch für ICs ist eine **differentielle epigenetische Modifikation** auf dem paternalen/maternalen Allel (DNA-Methylierung; Histon-Modifikationen), weshalb sie häufig auch als **DMR** (für differentiell methylierte Region) bezeichnet werden. Man unterscheidet **primäre DMRs** von **sekundären DMRs** in Abhängigkeit davon, ob die differentielle epigenetischen Markierungen keimbahngängig sind oder nicht. Einige Imprinting-Regionen und ihre DMRs sind schon intensiv untersucht worden und ihre Regulationsmechanismen sind gut verstanden. Stets fungieren sie als *cis*-aktive Regulations-Elemente wie Silencer, Insulator oder auch Promotor, wobei die differentiellen epigenetischen Markierungen auf den jeweiligen parental Allelen die Ursache für ihr unterschiedliches regulatorisches Verhalten (aktiv/inaktiv) sind.

Die vorliegende Arbeit befasst sich intensiv mit der IG-DMR, dem Imprinting Center der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region. Aus diesem Grunde soll diese später detailliert besprochen

werden (s. Abschnitt 1.6). Ein bereits gut verstandenes Beispiel für die Regulation von geprägten Genen ist die Kontrolle der *Igf2*- und *H19*-Gene durch die H19-DMR der Beckwith-Wiedeman-Syndrom-Region.

1.3 Die Beckwith-Wiedeman-Syndrom Region (BWS)

Die BWS Region umfasst mit der *Igf2*/*H19* Region bzw. der KvDMR1-Domäne zwei Cluster imprinteter Gene auf dem humanen Chromosom 11p15.5 bzw. der homologen Region in Maus auf dem distalen Chromosom 7 (Abb. 1.3). Diese werden durch zwei gut untersuchte Imprinting Center reguliert.

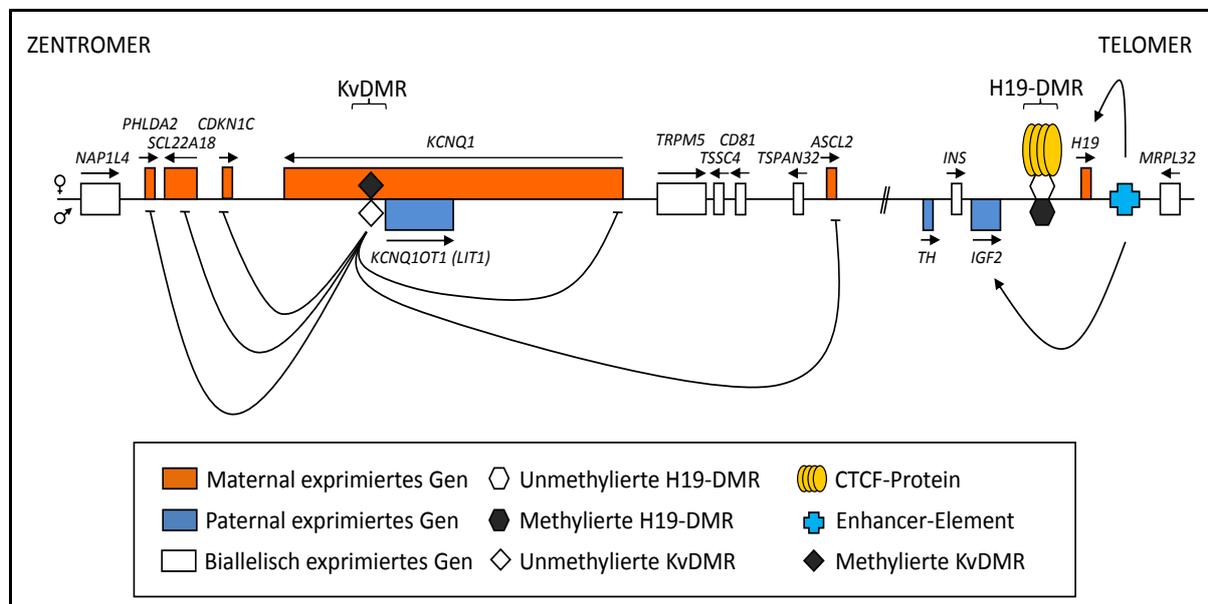


Abbildung 1.3: BWS Region auf Chromosom 11p15.5 des Menschen. Die BWS Region umfasst zwei Imprinting-Cluster, die in erster Linie von zwei ICs reguliert werden, der maternal methylierten KvDMR und der paternal methylierten H19-DMR. Die H19-DMR fungiert über methylierungssensitive Bindung des Zinkfinger-Proteins CTCF als Insulator-Element. CTCF-Anlagerung auf dem unmethylierten maternalen Allel verhindert Interaktion telomerisch gelegener endodermaler Enhancer-Elemente mit dem *Igf2*-Promotor. Die KvDMR fungiert sowohl als Promotor- als auch als bidirektionales Silencer-Element und inhibiert die Genexpression der benachbarten Gene in *cis*. Beide DMRs verlieren durch DNA-Methylierung ihr regulatorisches Potential.

1.3.1 Regulation der allelspezifischen Genexpression in der *Igf2*/*H19* Region

Die *Igf2*/*H19* Region in der Maus beherbergt mit *Igf2* und *H19* zwei gut charakterisierte imprintete Gene. Das *Igf2*-Gen (Insulin-like Growth Factor II) kodiert für einen Wachstumsfaktor. Seine Hauptfunktionen sind die Stimulation von Wachstum und Entwicklung, sowie die Beeinflussung der Wirkung von Wachstumshormonen. Das *H19*-Gen

kodiert ähnlich dem *Gtl2*-Gen (s. Abschnitt 1.6.2) für eine maternal exprimierte, nicht-kodierende RNA. Eine neuere Arbeit konnte zeigen, dass *H19* als Wirtstranskript für eine hochkonservierte microRNA (mir-675) dient (Cai und Cullen 2007). Ferner konnte kürzlich ein konserviertes ca. 120 kb großes Antisense-Transkript (*91H*-RNA) nachgewiesen werden. Vermutlich spielt dieses eine Rolle in der *Igf2*-Regulation (Berteaux et al. 2008).

Beide Gene, *Igf2* und *H19* sind während der Embryogenese in denselben Geweben exprimiert und werden kurz nach der Geburt herunter reguliert. Dabei sind sie reziprok imprintet, d.h. *Igf2* wird nur vom paternalen Chromosom und *H19* nur vom maternalen Chromosom transkribiert. Hauptsächlich werden beide Gene durch die DNA-Methylierung eines Chromatin-Abgrenzungs-Elements (Boundary Element) im 5' Bereich des *H19*-Gens reguliert, die sog. H19-DMR (Tremblay et al. 1997; Ishihara und Sasaki 2002).

Wie die IG-DMR der *Dlk1/Gtl2* Region (s. Abschnitt 1.6.3) ist die H19-DMR auf dem paternalen Allel hyper- und auf dem maternalen Allel hypomethyliert. Mehrere endo- und mesodermale Enhancer-Elemente wurden im Bereich stromabwärts des *H19*-Gens identifiziert, welche mit dem *Igf2*- bzw. *H19*-Promotor interagieren und die gewebespezifische Expression der Transkripte ermöglichen (Leighton et al. 1995; Ishihara et al. 2000). Neben der H19-DMR finden sich mit der DMR0, DMR1 und DMR2 weitere Bereiche, die ebenfalls eine Rolle in der H19-DMR vermittelten allelspezifischen Genexpression spielen (s. Abb. 1.4). Dabei ist die DMR0 ähnlich der *Dlk1*-DMR0 (s. Abschnitt 1.6.3) nur in der Plazenta differentiell methyliert (Moore et al. 1997; Lopes et al. 2003; Murrell et al. 2004; Monk et al. 2006).

Das Zink-Finger-Protein CTCF bindet die H19-DMR auf dem unmethylierten, maternalen Allel, wodurch der Bereich als Insulator-Element agiert (Hark et al. 2000). Dies geschieht durch Interaktion des H19-DMR-CTCF-Komplexes mit der DMR1 im Bereich des *Igf2*-Gens, wodurch dieses für stromabwärts gelegene Enhancer-Elemente nicht zugänglich ist. Die Enhancer interagieren nun mit dem *H19*-Promotor wodurch die *H19*-Transkription verstärkt wird (s. Abb. 1.4 **B**). Im Gegensatz dazu ist die H19-DMR auf dem paternalen Allel methyliert was eine Anlagerung von CTCF unterbindet. Die Enhancer-Elemente können hier mit dem *Igf2*-Promotor agieren und *Igf2* wird vom väterlichen Allel transkribiert.

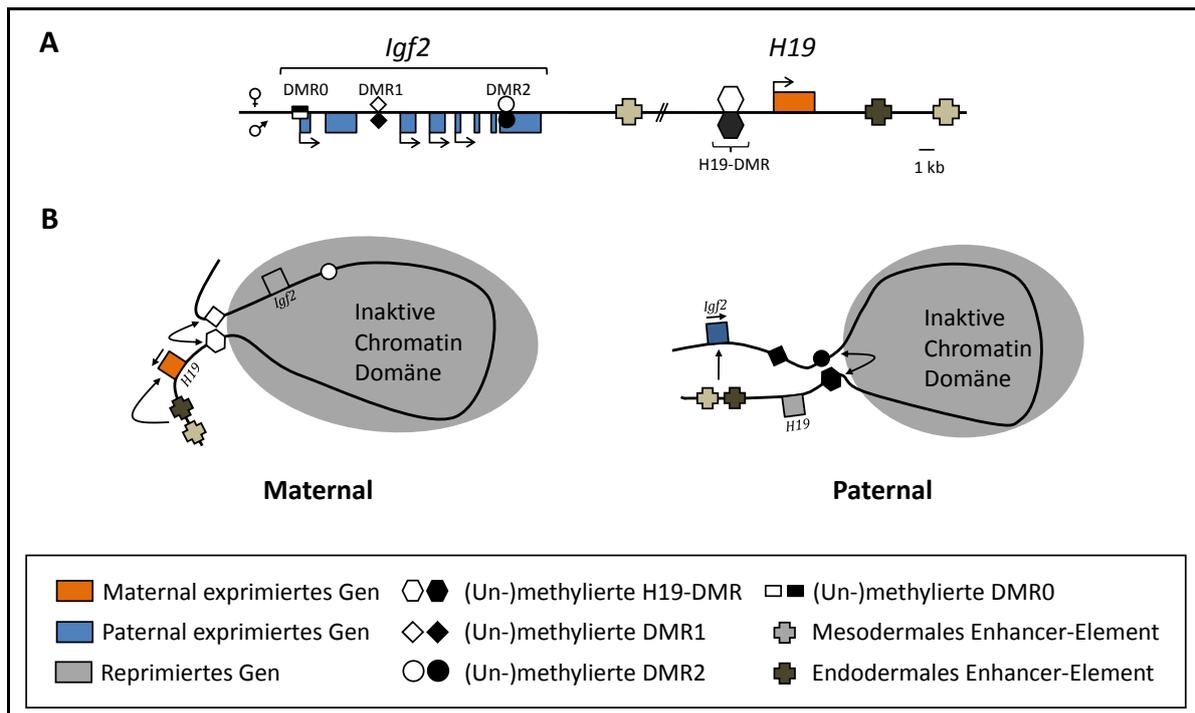


Abbildung 1.4: Differenziell methylierte Regionen der *Igf2/H19* Region und deren unterschiedliche Interaktionen auf den elterlichen Allelen führen zu paternaler *Igf2*- und maternaler *H19*-Expression. (A) *Igf2* besitzt mehrere Gewebs- bzw. Entwicklungsspezifische Promotoren, deren Aktivität über DMRs reguliert wird. (B) Differentielle Interaktion der *Igf2*-DMRs mit der *H19*-DMR auf den elterlichen Chromosomen führt zur Ausbildung unterschiedlicher repressiver Chromatin-Domänen. Nur auf dem väterlichen Chromosom liegt *Igf2* außerhalb der repressiven Domäne und die mesodermalen und endodermalen Enhancer-Elemente können mit ihm interagieren ((B) nach Murrell et al. 2004, verändert).

Nach dem Enhancer-Tracking-Model suchen Enhancer-Elemente die DNA sukzessive nach Elementen ab, mit denen sie interagieren können. Durch Bindung von CTCF auf dem maternalen Allel wird das Enhancer-Tracking im Bereich der *H19*-DMR unterbunden und die Enhancer können nur mit dem *H19*-Promotor interagieren; auf dem paternalen Allel ist dies nicht der Fall und die Enhancer können den *Igf2*-Promotor erreichen (Engel et al. 2008).

1.3.2 Die KvDMR1-Domäne

Die KvDMR1 (auch Imprinting Center 2, s. Abb. 1.3) liegt in Intron 10 des maternal exprimierten *Kcnq1*-Gens und ist reziprok zur *H19*-DMR methyliert, d.h. auf dem mütterlichen Allel hypermethyliert und auf dem väterlichen Allel hypomethyliert. Die paternale KvDMR agiert als Promotor für ein nicht-kodierendes Antisense-Transkript, welches eine wichtige Rolle bei der *cis*-Regulation des Imprintings in der Region inne hat

(*Kcnq1ot1* oder *Lit1*). Aufbau und Funktion des *Lit1*-Transkriptes sind in Abschnitt 1.5 detailliert erläutert.

Neben seiner Promotor-Aktivität zeigt die KvDMR auch Silencer-Potential auf dem unmethylierten Allel (Fitzpatrick et al. 2002). Analysen deuten ferner darauf hin, dass zur Silencer-Aktivität der KvDMR das *Lit1*-Transkript (bzw. der Transkriptionsvorgang) erforderlich ist (Mancini-DiNardo et al. 2003; Mancini-DiNardo et al. 2006).

Schließlich wurde für die KvDMR - ähnlich der H19-DMR - ein mögliches Insulator-Potential via allelspezifischer CTCF-Bindung zunächst diskutiert (Kanduri et al. 2002; Kanduri und Lobanekov 2002) und in jüngeren Arbeiten schließlich nachgewiesen (Fitzpatrick et al. 2007; Shin et al. 2008).

1.4 Repetitive Elemente in Imprinting-Regionen

Bioinformatische Analysen haben gezeigt, dass sich Imprinting-Regionen von nicht imprinteten Regionen bzgl. ihres Gehaltes an repetitiven Elementen bzw. der relativen Anteile der einzelnen Repeat-Klassen unterscheiden lassen (Ke et al. 2002). Dies deutet auf einen (funktionellen) Zusammenhang von repetitiven Elementen und epigenetischer Regulation hin. So wurde z.B. die Hypothese formuliert, dass retrovirale (unmethylierte) LINE1-Elemente eine Funktion in der epigenetischen Stilllegung des X-Chromosoms (X-Inaktivierung) inne haben (Lyon et al. 1999; Hansen 2003). In der Tat zeigt das X-Chromosom des Menschen bzw. der Maus im Vergleich zu den autosomalen Chromosomen einen erhöhten Anteil an LINE1-Elementen, während SINEs reduziert sind (Cardazzo et al. 2003; Bailey et al. 2000). Analysen in Imprinting-Regionen auf Autosomen zeigten einen vergleichbaren Trend zur Akkumulation von LINE1- und Reduktion im Gehalt an SINE-Elementen (Suzuki et al. 2007; Grealley et al 2002; Ke und Collins 2003; Allen et al 2003).

Neben der Anhäufung repetitiver retroviraler LINE1-Elemente enthüllten bioinformatische Analysen auch eine auffällige Präsenz sogenannter Tandem Repeats in Imprinting-Regionen (Paulsen et al. 2001; Walter et al. 2006; Hutter et al. 2006). Tandem Repeats sind einzigartige, fast perfekte Wiederholungen einer bestimmten Nukleotid-Sequenz. Eine Funktion dieser repetitiven Elemente in der Imprinting-Regulation wurde bereits in der DMR des *Rasgrf1*-Gens, des *Igf2r*-Gens (DMD2), der DMR des *Peg3*-Locus, der KvDMR und im Bereich des *Snurf/Snrpn*-Locus erkannt (Shibata et al. 1998; Pearsall et al. 1999; Yoon et al.

2002; Kim et al. 2003, Reinhart et al. 2006). Im *Peg3*-Locus fungieren die Tandem Repeats beispielsweise als Bindestellen für den *Gli*-Typ-Transkriptionsfaktor YY1. Aufgrund allelspezifischer Methylierung auf dem maternalen Allel kann YY1 nur auf dem unmethylierten paternalen Allel binden und vermittelt dort Insulator-Effekte, wodurch die allelspezifische Expression der benachbarten Gene reguliert wird (Kim et al. 2006; Kim und Kim 2008). Auch für das CTCF-Insulator-Protein sind Bindestellen in Gestalt von Tandem Repeats in differentiell methylierten Regionen identifiziert worden. So konnten in der H19-DMR mehrere konservierte, repetitive CTCF-Bindestellen nachgewiesen werden (Hark et al. 2000; Szabo et al. 2000). Durch Anlagerung von CTCF auf dem unmethylierten maternalen Chromosom wird die Interaktion des stromabwärts gelegenen *Igf2*-Promotors mit distalen Enhancern verhindert, was zur Inaktivierung von *Igf2* führt (Bell und Felsenfeld 2000; Kanduri et al. 2000). Auch im Promotorbereich des *Meg1/Grb10*-Gens bindet CTCF auf dem unmethylierten paternalen Chromosom im Bereich eines mausspezifischen, differentiell methylierten Tandem Repeat, was in allelspezifischer, maternaler Genexpression resultiert (Hikichi et al. 2003).

Ferner sind in Pflanzen Fälle bekannt, in denen Tandem Repeats wichtige Funktionen in der Imprinting-Regulation inne haben, wie z.B. im *FWA*-Locus von *Arabidopsis thaliana* (Lippman et al. 2004).

Weitere Studien zeigten, dass der Dnmt3a/Dnmt3l-Komplex DNA vorzugsweise mit einer Periodizität von 8-10 Basenpaaren methyliert (Jia et al. 2007; Jurkowska et al. 2008). Dies könnte das gehäufte Auftreten von Tandem Repeats in DMRs erklären. Ob eine 8-10 bp CpG-Periodizität exklusiv in DMRs auftritt, bedarf weiterer Untersuchungen (Ferguson-Smith und Grealley 2007). Eine weitere Erklärung für die Präsenz von Tandem Repeats in DMRs könnte sein, dass sie zur Ausbildung sekundärer DNA-Strukturen beitragen, welche bevorzugt von der DNA-Methylierungs-Maschinerie gebunden werden (Neumann und Barlow 1996).

Allerdings haben nicht alle Tandem Repeats in Imprinting-Regionen eine regulatorische Funktion. So konnten Knock-out-Experimente zeigen, dass die Deletion eines konservierten Tandem Repeats in der H19-DMR keinen Einfluss auf die allelspezifische Expression in der Imprinting-Domäne zur Folge hat (Lewis et al. 2004). Auch am Locus des *Impact*-Gens, welches nur in Nagern Imprinting aufweist, scheinen die in der Region identifizierten Tandem Repeats keinen Einfluss auf das Imprinting auszuüben (Okamura et al. 2008).

1.5 Nichtkodierende RNAs (non-coding RNAs) in Imprinting-Regionen

Einige Imprinting Center fungieren als Promotoren für große nicht-kodierende RNAs, welche regulatorische Funktionen in der jeweiligen Imprinting-Region inne haben. Die KvDMR im Intron 10 des *Kcnq1*-Gens kontrolliert beispielsweise die Expression der 91 kb-großen, nicht-kodierenden und ungespleißten Antisense RNA *Lit* (Long QT intronic transcript; *Kcnq1ot1*, s. Abb. 1.3). *Lit1* wird ausschließlich vom väterlichen Chromosom transkribiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Stilllegung benachbarter Gene *in cis* (Smilinich et al. 1999; Mitsuya et al. 1999; Engemann et al. 2000; Mancini-DiNardo et al. 2003; Thakur et al. 2004; Mancini-DiNardo et al. 2006; Kanduri et al. 2006). Neuere Arbeiten erbrachten ferner Hinweise, dass *Lit1* durch Rekrutierung der Histon-Methyltransferasen G9a und Ezh2 die Etablierung reprimierender Histon-Modifikationen möglich macht (Pandey et al. 2008; Mohammad et al. 2008; Redrup et al. 2009).

Ein weiteres Beispiel einer nicht-kodierenden RNA in einer Imprinting-Region ist das *Air*-Transkript. *Air* (Antisense *Igf2r* RNA) ist ungefähr 107 kb groß und hat seinen Transkriptionsstart in einer differentiell methylierten CpG-Insel im zweiten Intron des maternal exprimierten *Igf2r*-Gens der Maus (Lyle et al. 2000; Sleutels et al. 2002). Aufgrund differentieller DNA-Methylierung bzw. Histon-Modifikationen wird *Air* ausschließlich vom väterlichen Chromosom in Antisense-Orientierung zum *Igf2r*-Gen exprimiert (Vu et al. 2004; Yang et al. 2003). Das *Air*-Transkript trägt *in cis* zur epigenetischen Stilllegung der benachbarten Gene *Slc22a2* und *Slc22a3* bei (Zwart et al. 2001; Sleutels et al. 2003). Vor kurzem publizierte Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die *Air*-vermittelte Genregulation durch Rekrutierung der Histon-Methyltransferase G9a erfolgt, wodurch eine lokale heterochromatische Domäne aufgebaut wird (Nagano et al. 2008).

Interessanterweise zeigt der *Igf2r*-Locus auch in Opossum und Hund genomisches Imprinting, ohne dass (bisher) das *Air*-Transkript in diesen Spezies identifiziert werden konnte (Yamasaki et al. 2005; Weidmann et al. 2006; O'Sullivan et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde für den Menschen kürzlich das zur Maus homologe *AIR*-Transkript beschrieben (Yotova et al. 2008). Während also der Imprinting-Status des *Igf2r*-Gens evolutionär konserviert ist, scheinen die zur Regulation des Imprints genutzten Mechanismen zu divergieren.

Auch in der murinen *Igf2/H19* Region im Bereich der H19-DMR (sowie in einem transgenen H19-DMR *Drosophila*-Modell) konnten intergenische nicht-kodierende Transkripte identifiziert werden (Schoenfelder et al. 2007; Chotalia et al. 2009). RNAi vermittelter Knock-down dieser Transkripte führte zum Verlust der Silencer-Funktion der H19-DMR. Ähnliches wurde in der KvDMR beobachtet: Die aktive Transkription von *Lit1* scheint auch für die Silencer-Funktion der KvDMR selbst notwendig zu sein (Mancini-DiNardo et al. 2003; Mancini-DiNardo et al. 2006). Neuere Mutations-Experimente deuten jedoch darauf hin, dass die funktionelle Silencer-Aktivität der KvDMR nicht in allen Geweben von *Lit1* abhängt (Shin et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits in vielen Imprinting-Regionen nicht-kodierende RNAs identifiziert wurden, welche an der Regulation der allelspezifischen Genexpression *in cis* substanziell beteiligt sind.

1.6 Die *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region

1.6.1 Identifizierung der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region

Abnorme Phänotypen in Individuen mit uniparentalen Isodisomien (UPD; zwei Kopien eines Chromosoms/Chromosomenteils von einem Elternteil vererbt) waren die ersten Hinweise auf die Präsenz imprinteter Gene auf verschiedenen Chromosomen (Ledbetter und Engel 1995; Beechey et al. 1999). Darunter sind verschiedene klinische Anomalien im Zusammenhang mit maternaler bzw. paternaler Uni-Iso-Disomie auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 14 (14q24.3-14q32) (Cotter et al. 1997). Maternale UPDs für Chromosom 14 (mUPD) werden begleitet von niedrigem Geburtsgewicht, Zwergwüchsigkeit, kleinen Händen und Füßen, verlangsamter Motorik, Muskel- bzw. Skelettanomalien und vorzeitiger Pubertät. Paternale UPD14-Fälle treten hingegen seltener auf (da meist letal), werden aber mit schwerer Skelett/Muskel-Anomalie und mentaler Retardierung assoziiert (Walter et al. 1996; Georgiades et al. 1998; Kurosawa et al. 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden mittels Robertson'scher bzw. reziproker Translokationen matUPD12 und patUPD12-Mäuse generiert (Georgiades et al. 2000). Beide UPD-Typen waren nicht lebensfähig und zeigten unterschiedliche Anomalien (s. Abb. 1.5): mUPD12-Mäuse starben kurz nach Geburt und wiesen gehemmtes Wachstum und diverse Muskel- und Skelett-

Defekte auf, während pUPD12-Mäuse schon in der Mitte der Gestation starben und sich Plazenta-Megalomie, sowie Skelett- und Muskeldefekte beobachten ließen.

Weitere Anzeichen für ein oder mehrere imprintete Gene in dieser Region lieferten auch Analysen an Schafen mit einem auffälligen Muskelhypertrophie-Phänotyp, genannt Callipyge (CLPG; gr.: „schönes Hinterteil“; s. Abb. 1.6 B) (Cockett et al. 1996; Freking et al. 1998; Lien et al. 1999). Eine für den CLPG-Phänotyp verantwortliche Punktmutation konnte auf Schafchromosom 18, der homologen Region zum Mauschromosom 12F1 bzw. Mensch 14q32, lokalisiert werden (Freking et al. 2002). CLPG-Phänotypen zeigten besondere Auffälligkeiten bzgl. ihrer Vererbung: Während CLPG/+ Tiere (CLPG-Mutation von der Mutter geerbt) normal waren, wiesen +/CLPG (CLPG-Mutation vom Vater geerbt) eine muskuläre Hyperplasie in den Hinterbeinen auf. Überraschenderweise waren homozygote CLPG/CLPG-Tiere normal (Cockett et al. 1994; Georges et al. 2003; Smit et al. 2003). Diese Art der Vererbung wurde als polare Überdominanz bezeichnet. Erklären lässt sich das Callipyge-Phänomen durch einen kombinatorischen Effekt der Punktmutation auf *cis*-aktive und *trans*-aktive Elemente (Charlier et al. 2001; Davis et al. 2004).

Die Suche nach imprinteten Genen auf dem Mauschromosom 12 war schließlich durch eine Reihe sog. „gene-trap“-Mutagenese-Programme mit *LacZ*-transgenen Mauslinien erfolgreich. Bei einer transgenen Linie (Gene-Trap Line 2, Gtl2), in der der Nachwuchs bei paternaler Transmission des *LacZ*-Transgens von Zwergwüchsigkeit betroffen war, nicht jedoch bei maternaler Transmission, konnte die Insertion auf dem distalen Mauschromosom 12 lokalisiert werden (s. Abb. 1.8 A; Schuster-Gossler et al. 1996).

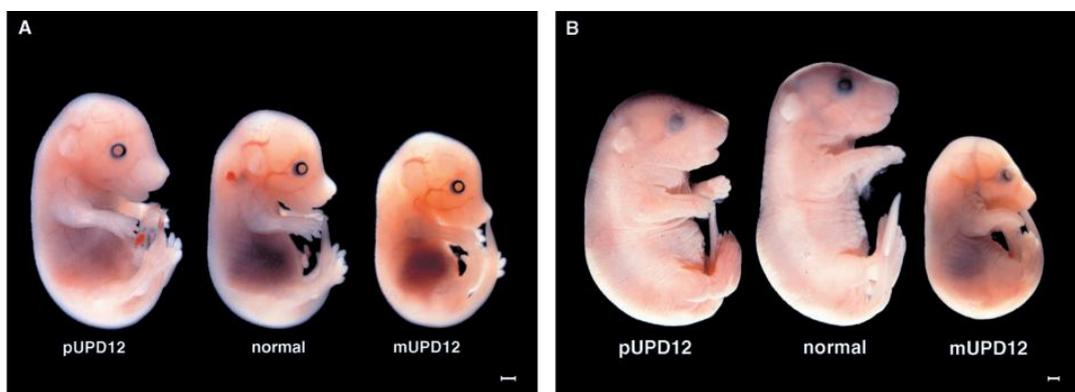


Abbildung 1.5: Normale und UPD12-Mäuse zum Zeitpunkt 15.5 dpc (A) und 18.5 dpc (B). (Abb. entnommen von Georgiades et al. 2000)

Der Phänotyp wurde durch Insertion der LacZ-Neomycin-Kassette 2,3 Kilobasen stromaufwärts (AJ320506 nt 91681-91870) einer nicht-kodierenden RNA (genannt *Gtl2*) ausgelöst (Schuster-Gossler et al. 1998). Da *Gtl2* maternal exprimiert wird und der Phänotyp der *Gtl2LacZ*-Mäuse nur bei paternaler Transmission auftritt, scheint die *LacZ*-Integration in einem regulatorischen Bereich der Imprinting-Region erfolgt zu sein. Dies legt auch die Tatsache nahe, dass in $+/\textit{Gtl2LacZ}$ -Mäusen *Gtl2* normal exprimiert wird und nicht - wie zu erwarten wäre - ein *LacZ-Gtl2*-Fusions-Transkript existiert. Southern Blot-Analysen konnten schließlich zeigen, dass das *LacZ*-Gen in Antisense-Orientierung zum *Gtl2*-Transkript integrierte. Experimente mit transgenen Mäusen wiesen inzwischen nach, dass durch Insertion von Genkassetten im 5' Bereich des *Gtl2*-Gens sowohl bei paternaler als auch bei maternaler Transmission die lokale Genexpression beeinflusst (Sekita et al. 2006; Steshina et al. 2006). Kurz nach Entdeckung von *Gtl2* konnte das paternal exprimierte Gen *Dlk1* (**Delta-like homolog 1**) in ca. 100 Kb Entfernung identifiziert werden (Takada et al. 2000; Miyoshi et al. 2000; Kobayashi et al. 2000).

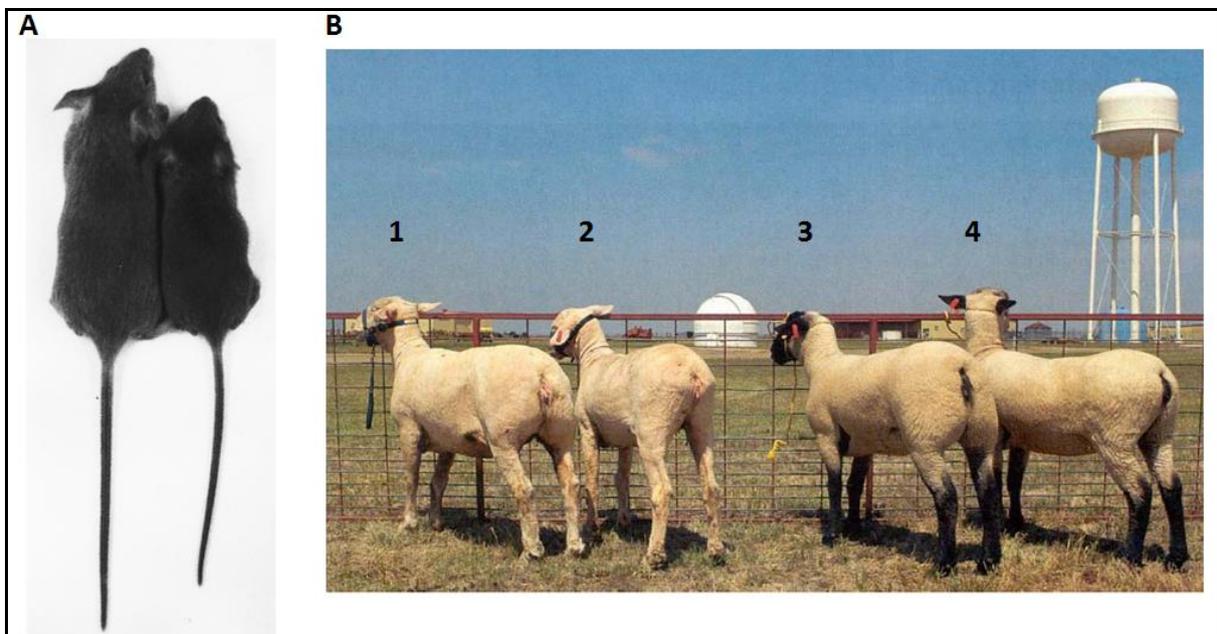


Abbildung 1.6: (A) Normale (links) und $+/\textit{Gtl2LacZ}$ -Maus zum Zeitpunkt des Abstillens (ca. 3 Wochen). (B) Callipyge (1,3) und normale (2,4) Schafe. (Abb. (A) entnommen von Schuster-Gossler et al. 1996; Abb. (B) aus Gibbs W.W.; Spektrum der Wissenschaft; März 2004; verändert)

1.6.2 Gene und Aufbau der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region

Die *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region ist zwischen Maus und Mensch hochkonserviert und umfasst ca. 1 Megabase. In der Imprinting-Domäne finden sich präferentiell paternal exprimierte Gene, die für Proteine kodieren bzw. präferentiell maternal exprimierte Gene, die für nicht-kodierende Transkripte, sog. ncRNAs kodieren (s. Abb. 1.7).

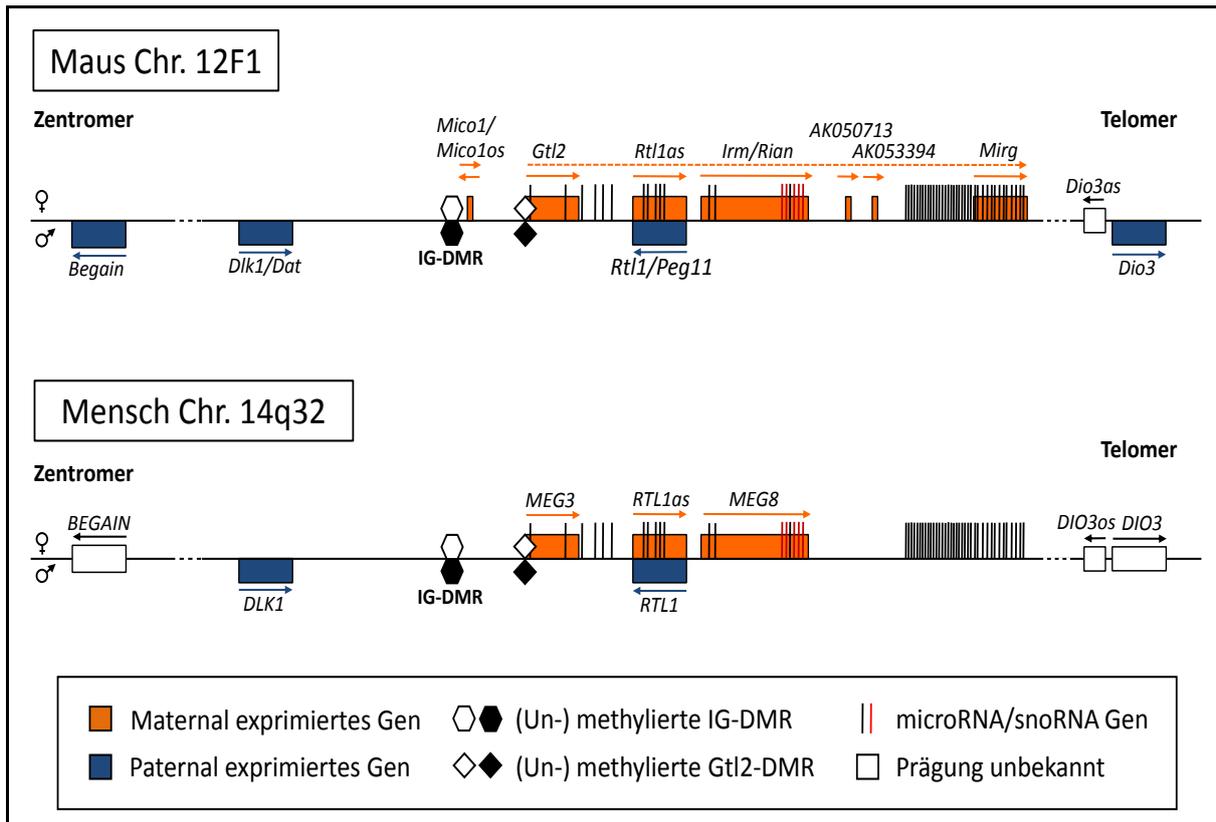


Abbildung 1.7: *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region in Maus und Mensch. Während die väterlich exprimierte Gene für Proteine kodieren, sind die maternalen Transkripte nicht-kodierende RNAs (ncRNA) wie microRNAs und snoRNAs. Die auf dem paternalen Chromosom methylierte IG-DMR dient als Haupt-Regulations-Element der Imprinting-Region. Die Gtl2-DMR stellt eine sekundäre DMR dar, die in der Keimbahn keine differenzielle epigenetische Signatur aufweist.

Dlk1 (*Delta-like homolog 1*, oder: *Pref-1*) wird paternal exprimiert und gehört zur Notch-bindenden, epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Proteinfamilie („Epidermal Growth Factor“ EGF-like). Da dem *Dlk1*-Protein im Gegensatz zu anderen Notch-Bindeproteinen die Delta:Serrat:Lin-12-Domäne (DSL) fehlt, welche die Interaktion mit dem Notch-Rezeptor möglich macht, wird *Dlk1* eher als Notch-Antagonist angesehen (Laborda et al. 1993; Baladron et al. 2005; Nueda et al. 2007). Es wurde als Transmembran-Protein identifiziert,

welches jedoch durch TACE-Prozessierung (TNF-Alpha Converting Enzyme) in eine biologisch-aktive lösliche Form übergehen kann (Jensen et al. 1994). *Dlk1* kontrolliert über Regulation von *Sox9* die mesenchymale Zelldifferenzierung (Wang und Sul 2009). Gezeigt wurde dies bereits für verschiedene Zelltypen wie bei der Differenzierung von Fettzellen (Smas und Sul 1993), „Small-Cell-Lung-Cancer“-Zelllinien (Laborda et al. 1993), Stammzellen (Abdallah et al. 2004), B-Zellen (Van Limpt et al. 2003) und der Häma- und Hepatopoese (Komor et al. 2005; Sakajiri et al. 2005; Wu et al. 2008). *Dlk1* Knock-out (KO) Mäuse zeigen neben einer pränatalen Letalität von 50% eine verzögerte Embryonalentwicklung, Knochendefekte und postnatale Adipositas (Moon et al. 2002). Eine neuere Arbeit konnte einen starken phänotypischen Effekt bei veränderter *Dlk1*-Gendosis beobachten. Dies unterstreicht die Notwendigkeit des genomischen Imprintings in der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region zur Kontrolle der Gendosis (da Rocha et al. 2009). Expressionsanalysen legen darüber hinaus die Vermutung nahe, dass *Dlk1* für den CLPG-Phänotyp zumindest mitverantwortlich sein könnte (Davis et al. 2004; Murphy et al. 2005; Murphy et al. 2006; Takeda et al. 2006). Eine kürzlich erschienene Studie konnte schließlich herausarbeiten, dass *Dlk1* auch eine Kontrollfunktion für die fötale Muskeldifferenzierung inne hat (White et al. 2008).

Das ***Dat***-Transkript (***Dlk1*-Associated Transcript**) entsteht durch Überlesen des normalen *Dlk1*-Polyadenylierungs-Signals und wurde bereits in Maus (Embryo, Plazenta bzw. im adulten Gehirn), Mensch und Schaf identifiziert (Paulsen et al. 2001; Charlier et al. 2001; Hagan et al. 2009). Seine Funktion ist Gegenstand aktueller Forschung.

Rtl1 (***Retrotransposon like 1***, bzw. *Meg8*) ist ein Retrotransposon-ähnliches Gen, welches die Fähigkeit zur autonomen Retrotransposition verloren hat und Ähnlichkeiten zu der *Ty3/gypsy*-Retrotransposon-Familie aufweist. *Rtl1* ist hauptsächlich in embryonalen Geweben und der Plazenta exprimiert. *Rtl1*-Deletion führt in Mäusen zu prä- bzw. neonataler Letalität und zeigt, dass *Rtl1*-Expression essentiell für die normale Entwicklung der Plazenta ist (Sekita et al. 2008).

Dio3 liegt am distalen Ende der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region ca. 800 kb stromabwärts von *Dlk1* (Hernandez et al. 1998). Es kodiert für eine Typ 3 Iodothyronin Deiodinase (D3), ein Enzym, welches Thyroid Hormone (TH, Wachstums fördernde und Stoffwechsel steigernde Hormone) zu inaktiven Metaboliten degradiert (Galton et al. 1999). Die hohe D3-Aktivität in Plazenta und Uterus dient wahrscheinlich dem Schutz der Gewebe vor überhöhten TH-

Mengen (Kester et al. 2004). Eine kürzlich publizierte Arbeit konnte zeigen, dass im Muskelgewebe zahlreiche Transkripte durch TH reguliert werden (Visser et al. 2009). *Dio3* Knock-out in Mäusen führt in einigen Fällen zu postnataler Letalität bzw. zu verzögerter Entwicklung. Das Imprinting von *Dio3* ist in der Maus nicht vollständig (84% paternale Expression im Embryo bzw. 50-67% in der Plazenta) (Tsai et al. 2002; Yevtodyenko et al. 2002). Es wurden bereits Antisense-Transkripte in der Nachbarschaft von *Dio3* beschrieben, diese scheinen jedoch keine elterliche Prägung aufzuweisen (Hernandez et al. 2002; Tierling et al. 2006).

Das ***Begain***-Gen („Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated“) liegt an der zentromerischen Flanke der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region. In Schafen konnten biallelisch exprimierte und rein paternal exprimierte Transkript-Varianten identifiziert werden (Smit et al. 2005). Vor kurzem wurde dies auch in Mäusen gezeigt (Tierling, Gasparoni et al. 2009). *Begain* ist während der Embryogenese und im neonatalen bzw. adulten Gehirn exprimiert. Das *Begain*-Genprodukt interagiert in Synapsen mit dem PSD-95/SAP-90-Protein, welches ein wichtiger Bestandteil der PSD-Struktur („Post Synaptic Density“) ist (Deguchi et al. 1998; Hata und Takai 1999). Dies ist ein Komplex mehrerer zytoplasmatischer bzw. membranintegrityaler Proteine und spielt eine zentrale Rolle bei der Organisation der Synapsen-Architektur (Okabe 2007).

Der *Dlk1/Gtl2*-Locus ist durch zahlreiche **maternal exprimierte, nicht kodierende RNAs** gekennzeichnet. Sie sind alle in derselben Richtung wie das *Gtl2*-Transkript orientiert. Es ist möglich, dass in einigen Geweben alle nicht-kodierenden RNAs eine große, polycistronische vom *Gtl2*-Promotor startende Transkriptionseinheit darstellen, aus welcher die einzelnen Transkripte prozessiert werden (Tierling et al. 2006). Die Tatsache, dass sich keine typischen Promotor-Sequenzen in der Region identifizieren lassen und alle nicht-kodierenden Transkripte ein sehr ähnliches Expressionsmuster zeigen, unterstützt diese Hypothese (Takada et al. 2000).

***Gtl2* (Gene-Trap Locus 2)**, ein nicht-kodierendes poly-adenyliertes Transkript mit mehreren Spleißvarianten und unbekannter Funktion ist das erste in der *Dlk1/Gtl2*-Region identifizierte Gen (Schuster-Gossler et al. 1996; Schuster-Gossler et al. 1998; Miyoshi et al. 2000; Takada et al. 2000; Croteau et al. 2003). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das *Gtl2*-Gen (im

Menschen als **MEG3**, für „**Maternally Expressed Gene 3**“ bezeichnet) ähnlich dem *H19*-Gen als Wirtstranskript für miRNAs dient (Zhang et al. 2008).

Im Jahr 2001 konnte in Schaf ein zum *Rtl1*-Gen in Antisense-Orientierung verlaufendes Transkript (***Rtl1-as***) identifiziert werden (Charlier et al. 2001). Es stellte sich heraus, dass *Rtl1as* für mehrere miRNAs kodiert, welche die Expression des paternal exprimierten *Rtl1*-Gens mittels RNA-Interferenz *in trans* auf post-transkriptioneller Ebene regulieren (Davis et al. 2005). Dies ist der erste bekannte Fall einer miRNA-vermittelten Genregulation *in trans* innerhalb einer Imprinting-Region.

Auch innerhalb des ***Mirg***-Gens („**MicoRNA containing gene**“ bzw. *Meg9*) konnten zahlreiche miRNAs identifiziert werden. Bislang konnte für *Mirg* kein offener Leserahmen (ORF) gefunden werden. Deshalb geht man davon aus, dass es ausschließlich als Wirtstranskript für die miRNAs dient (Seitz et al. 2003; Tierling et al. 2006). Neben der putativen durchgehenden Transkriptionseinheit von *Gtl2* bis zum *Mirg*-Gen gibt es auch Hinweise auf weitere unabhängige Promotoren, die die Expression einer oder mehrerer miRNAs kontrollieren. So konnte z.B. in Neuronen gezeigt werden, dass die *Mirg*-assoziierten miRNAs (**mir-379-410-Cluster**) teilweise von einem stromaufwärts gelegenen Regulations-Element über den Transkriptionsfaktor Mef2 reguliert werden (Fiore et al. 2009). Auch wenn die genauen Funktionen der miRNAs bzw. alle miRNA Ziel-Transkripte (miRNA-Targets) noch unbekannt sind und nur *in silico* Vorhersagen existieren (Kircher et al. 2008), wurden für einige der miRNAs bereits Targets identifiziert.

Aus den verifizierten miRNA-Targets für die **mir-134** zum Beispiel lässt sich eine Rolle für den mir-379-410-Cluster in der Dendrit- bzw. Synaptogenese sowie der Stammzell-Differenzierung ableiten. So reguliert die mir-134 in Neuronen *Limk1* und *Pumilio2* (Schratt et al. 2006; Fiore et al. 2009) bzw. in embryonalen Stammzellen *Nanog*, *Lrh1*, *Oct4* und *Sox2* (Tay et al. 2008a; Tay et al. 2008b).

Auch im Bereich des *Rtl1as*-Transkriptes konnten für die miRNAs mir-433 bzw. mir-127 eigenständige Promotoren identifiziert werden (Song und Wang 2008a; Song und Wang 2008b). Für Letztere konnte zuvor eine post-transkriptionelle Regulation des Proto-Oncogens *BCL-6* nachgewiesen werden (Saito et al. 2006). Des Weiteren wird für die microRNA mir-377 des *Dlk1/Gtl2*-Locus eine Rolle im Krankheitsverlauf der Diabetes diskutiert (Wang et al. 2008).

Im Bereich des **Rian**-Gens konnte eine Reihe C/D Box snoRNAs identifiziert werden (Cavaillé et al. 2001). Im Menschen finden sich zwei sub-Cluster mit 31 bzw. 9 snoRNAs. Die snoRNAs sind relativ schwach konserviert und scheinen sehr schnell zu evolvieren (Cavaillé et al. 2002). Mit dieser Theorie einhergehend ist die Tatsache, dass die snoRNA RBII-36 ausschließlich in der Ratte durch Duplikationsereignisse in mehrfacher Kopie vorliegt. Die C/D-Box snoRNAs werden mit der 2'-O-Methylierung von rRNAs bzw. spleißosomaler RNAs (snRNAs) im Nukleolus in Verbindung gebracht (Bachelier et al. 2002). Die genaue Funktion der snoRNAs der *Dlk1/Gtl2* Region ist noch unklar, doch Studien an embryonalen Fibroblasten (Ratte) zeigten, dass diese in stabilen nukleären Foci lokalisiert sind (Royo et al. 2007). Im Gegensatz zu den meisten snoRNAs sind die der *Dlk1/Gtl2* Region fast ausschließlich im Gehirn exprimiert. Interessanterweise trifft dies auch auf snoRNAs in der Prader-Willi Syndrom/Angelman Syndrom (PWS/AS) Imprinting-Region zu. Diese werden vom paternalen Allel als polycistronisches Transkript exprimiert (Runte et al. 2001). Eine Rolle dieser snoRNAs im PWS-Krankheitsbild wurde zunächst angenommen und konnte in einer neuen Studie auch verifiziert werden (Gallagher et al. 2002; Doe et al. 2009).

Das kürzlich entdeckte **Irm**-Transkript (Imprinted RNA near **Meg3**), überlappt mit dem 3'-Bereich des *Rian*-Gens. Systematische Analysen zeigten, dass lediglich 5% der lokalen Transkription dem Gen *Rian* zuzuordnen sind, der Großteil aber dem kürzeren *Irm* entspricht (Hagan et al. 2009). In derselben Studie wurden zwei weitere maternale nicht-kodierende Transkripte (*AK050712* bzw. *AK053394*) mit unbekannter Funktion identifiziert.

Auch im intergenischen Bereich zwischen *Dlk1* und *Gtl2* wurden zwei nicht-kodierende, maternal exprimierte Transkripte beschrieben. **Mico1** (Maternal intergenic circadian oscillating 1) wird in derselben Richtung wie *Gtl2* transkribiert, während **Mico1os** (Maternal Intergenic Circadian Oscillating 1 Opposite Strand) genau anti-parallel zu *Mico1* verläuft. Für beide Transkripte konnte eine circadische Oszillation nachgewiesen werden, ihre genaue Funktion ist jedoch ungeklärt (Labielle et al. 2008). Mit *Mico1* und *Mico1os* reicht die rein maternale Expression in der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region bis an den 3'-Bereich der IG-DMR heran.

1.6.3 DMRs in der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region

Das humane Chromosom 14q32 bzw. die homologe Region auf dem Mausechromosom 12F1 beherbergen eine Region imprinteter Gene. Die allelspezifische Expression des Locus wird hauptsächlich über ein Imprinting Center, die sog. **IG-DMR** (Intergenic DMR) kontrolliert. Von allen bisher in der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region identifizierten ICRs ist sie die einzige primäre, also keimbahngängige DMR (s. Abb. 1.8). Durch epigenetische Untersuchungen von Patienten mit Mutationen/Epimutationen in der *Dlk1/Gtl2* Region konnte im Menschen die Lage der IG-DMR bestimmt werden (Kagami et al. 2008).

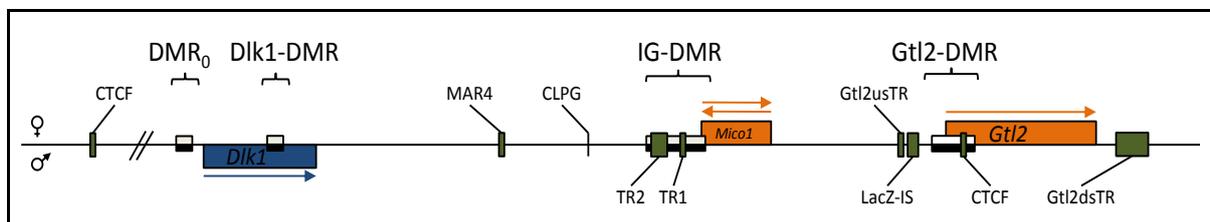


Abbildung 1.8: DMRs und andere regulatorische Elemente in der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region der Maus. Das Imprinting in der *Dlk1/Gtl2* Region wird hauptsächlich über die IG-DMR reguliert. Die IG-DMR liegt im intergenischen Bereich zwischen den Genen *Dlk1* und *Gtl2*; sie ist auf dem paternalen Allel hypermethyliert und auf dem maternalen Allel hypomethyliert und enthält zwei große Tandem Repeats mit unbekannter Funktion (TR1, TR2). Im Bereich stromaufwärts der IG-DMR konnten mit der *Dlk1*-DMR und der plazentaspezifischen *Dlk1*-DMR₀ zwei weitere, die *Dlk1*-Expression regulierende DMRs identifiziert werden. Ferner wurde im Promotor-Bereich des *Gtl2*-Gens die *Gtl2*-DMR identifiziert, in welcher sich auch CTCF-Bindestellen nachweisen ließen, sowie ein großer, hochkonservierter Tandem Repeat stromabwärts des *Gtl2*-Gens. Orangene Boxen stellen maternale, blaue Boxen paternale Transkripte dar. Schwarze bzw. weiße Balken stehen für methylierte bzw. unmethylierte Regionen. (MAR4: Matrix Attachment Region Element 4; CLPG: Callipyge-Punkt-Mutation; *Gtl2*_{us}TR: Tandem Repeat stromaufwärts von *Gtl2*; *Gtl2*_{ds}TR: Tandem Repeat stromabwärts von *Gtl2*; LacZ-IS: LacZ-Gen Integrations-Stelle (Schuster-Gossler et al. 1996))

Zuerst wurde die IG-DMR allerdings durch Knock-out Studien in der Maus definiert und konnte auf einen Bereich von ca. 4 kb eingegrenzt werden (Koordinaten der murinen IG-DMR im BAC Klon AJ320506: nt 79883-84038) (Lin et al. 2003). Interessanterweise zeigten sich in den IG-DMR Knock-out Mäusen nur bei maternaler Transmission der Deletion phänotypische Effekte (prä- bzw. perinatale Letalität, sowie Muskel- und Knochendefekte) und Einfluss auf das Imprinting bzw. die Genexpression in der gesamten Region. Tiere mit paternaler Transmission des Knock-outs sind hingegen normal (s. Abb. 1.9). Dies macht deutlich, dass die IG-DMR ein wichtiges Regulations-Element darstellt, das auf beiden elterlichen Chromosomen unterschiedlich aktiv ist. Die genauen Mechanismen, über welche

die IG-DMR die allelspezifische Genexpression kontrolliert, sind aber noch unbekannt. Da sich kein Phänotyp in der Plazenta von Δ IG-DMR/+ Mäusen zeigen, geht man davon aus, dass in diesem Gewebe die Imprints anders reguliert werden (Lin et al. 2007).

Die IG-DMR wird nur in der paternalen Keimbahn methyliert (Lin et al. 2003; Hiura et al. 2007). Neben differentieller DNA-Methylierung konnten in einer Reihe von Studien auch differentielle Histon-Modifikationen identifiziert werden. Dabei wurden repressive Histon-Modifikationen vornehmlich auf dem paternalen Chromosom und aktivierende Histon-Modifikationen in erster Linie auf dem maternalen Chromosom angereichert gefunden (Carr et al. 2007; Delaval et al. 2007; Verona et al. 2008).

Neben der IG-DMR sind mit der *Gtl2*-DMR, *Dlk1*-DMR und der *Dlk1*-DMR₀ noch weitere differentiell methylierte Regionen bekannt. Die ca. 4 kb große, auf dem paternalen Chromosom methylierte **Gtl2-DMR** (AJ320506, nt 92261-96183; s. Abb. 1.8) liegt im Promotor-Bereich des *Gtl2*-Gens und reicht bis ins erste Intron des Gens hinein (Takada et al. 2002). Studien zeigten, dass die *Gtl2*-DMR eine sekundäre DMR darstellt, d.h. sie weist keine differentielle epigenetische Markierung in den Keimbahnen auf (Takada et al. 2002; Hammond et al. 2009). Ein kürzlich publizierter Knock-out, der die Maus-*Gtl2*-DMR und die ersten fünf *Gtl2*-Exons umfasst, zeigte deutliche Auswirkungen auf das Imprinting und die Genexpression der gesamten *Dlk1/Gtl2* Region (s. Abb. 1.9) (Takahashi et al. 2009). Maternale Transmission der *Gtl2*-Deletion führte stets zu postnataler Letalität, wahrscheinlich aufgrund von Hypoxie (Erstickungstod) und Leberinsuffizienz. Der matKO zeigte neben fehlender *Gtl2*-Expression eine deutliche Reduktion der stromabwärts gelegenen, maternalen Transkripte (miRNAs, snoRNAs, *Rtl1as*, *Rian*, *Mirg*). Die in diesen Mutanten observierte *Rtl1*-Deregulation ist wahrscheinlich durch die verringerte *Rtl1as*-Expression begründet. Bei paternaler Transmission des KOs war eine kreuzungsabhängige, perinatale Letalität zu beobachten, begleitet von schweren Wachstumsstörungen. Die patKO-Tiere wiesen reduzierte Expression der paternalen Transkripte *Rtl1*, *Dlk1* und *Dio3* auf. Während die Ursache für die verringerte *Rtl1*-Expression nicht eindeutig zu klären ist (negativer Effekt auf *Rtl1* bzw. positiver Effekt auf *Rtl1as*, einem Transkript, das für miRNAs kodiert, die *Rtl1* negativ regulieren), scheinen die Gene *Dlk1* und *Dio3* durch einen negativen *cis*-Effekt inhibiert zu werden.

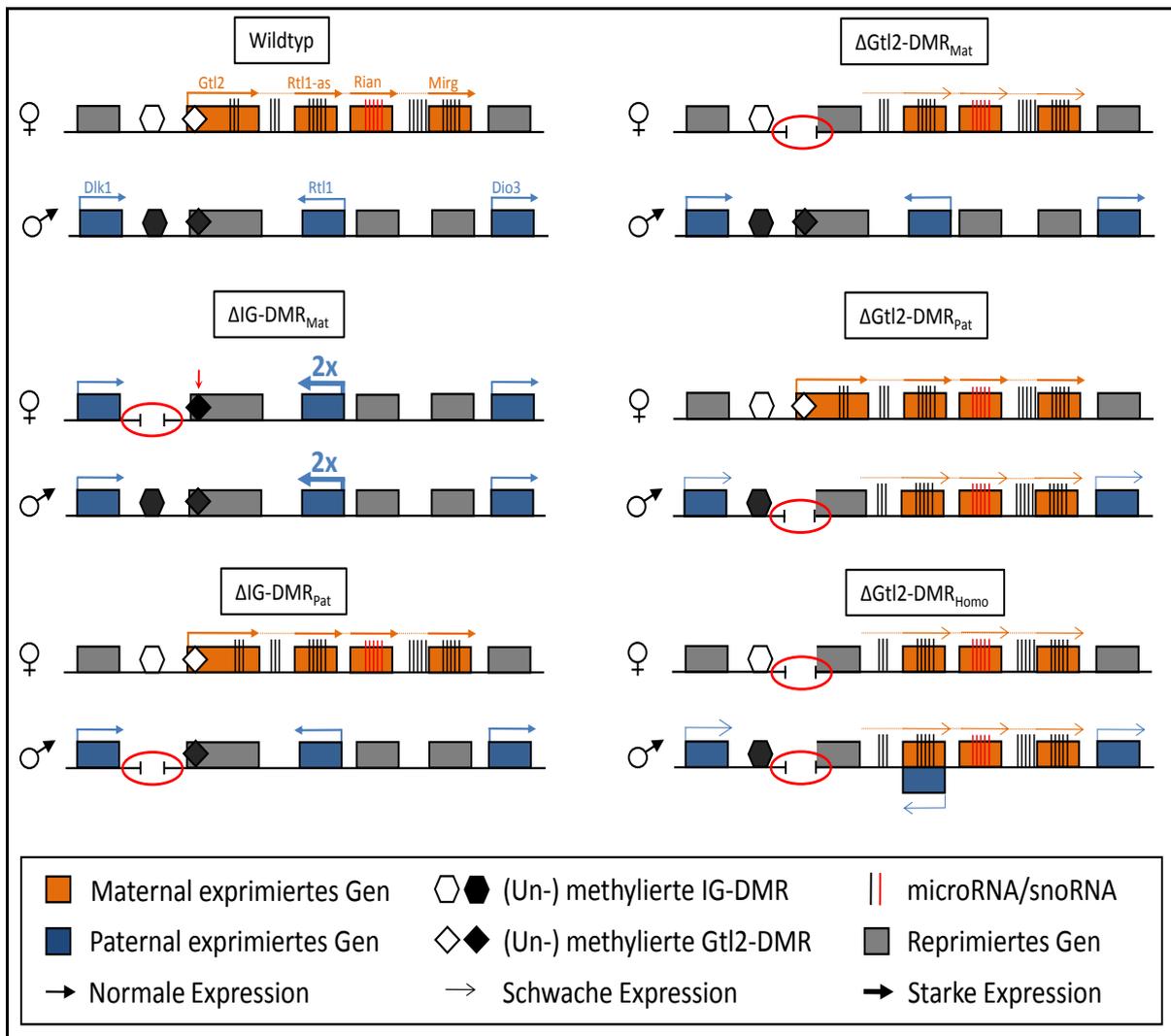


Abbildung 1.9: Etablierte IG-DMR-KO und Gtl2-DMR-KO-Modelle und ihre Auswirkungen auf die allelspezifische Genexpression der *Dlk1/Gtl2* Region. Maternale Deletion der IG-DMR führt zur „Paternalisierung“ des mütterlichen Chromosoms. Auch die differentielle Methylierung der Gtl2-DMR im Δ IG-DMR/+ Tiermodell wird beeinflusst (roter Pfeil). Entfernung der IG-DMR auf dem paternalen Allel hat keine Auswirkungen auf die lokale Genexpression. Maternale Deletion der *Gtl2*-DMR führt neben dem Verlust der *Gtl2*-Expression zu verringerter Transkription der maternalen nicht-kodierenden RNAs. Ist die *Gtl2*-DMR auf dem paternalen Allel entfernt, resultiert dies in reduzierter Expression der paternalen für Proteine kodierenden Gene bzw. Verlust der *Rtl1*-Expression. Interessanterweise werden auch die normalerweise maternal exprimierten nicht-kodierenden RNAs aktiviert (womöglich durch Einfluss der zur Deletion verwendeten Neo-Kassette).

Interessanterweise konnte im Vergleich zu den heterozygoten KO-Tieren in homozygoten KO-Mutanten ein milderer phänotypischer Effekt beobachtet werden. Diese Tiere kamen gesund zur Welt und entwickelten sich zu normalen adulten Mäusen. Expressionsanalysen weisen darauf hin, dass die miRNAs und snoRNAs damit in Zusammenhang stehen. Im Gegensatz zu den patKO-Mäusen ist in den homozygoten KOs das *Rtl1*-Gen exprimiert. Dies könnte der Grund für die weniger stark ausgeprägten Entwicklungsstörungen sein. Ein ähnlicher Vererbungseffekt ist bei der bereits beschriebenen Callipyge-Mutation zu beobachten.

Ähnlich zur H19-DMR in der *Igf2/H19*-Region wurden im Bereich der Gtl2-DMR sechs Bindestellen für das CTCF-Insulator-Protein zunächst *in silico* vorhergesagt und später sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Wylie et al. 2000; Paulsen et al. 2001; Rosa et al. 2005; Kang et al. 2009). Der Bereich der **CTCF-Bindestellen** ist auf den beiden elterlichen Allelen differentiell methyliert; eine allelspezifische Bindung des Proteins ist deshalb wahrscheinlich, allerdings wurde dies noch nicht detailliert analysiert. Da in den oben beschriebenen KO-Mäusen alle 6 CTCF-Bindestellen deletiert wurden, besteht die Möglichkeit, dass dies zur Deregulation der lokalen Genexpression beiträgt.

Auch etwa 70 Kilobasen stromaufwärts des *Dlk1*-Gens konnte eine konservierte CTCF-Bindestelle *in vivo* nachgewiesen werden (Kang et al. 2009). Diese liegt jedoch nicht in einem differentiell methylierten Bereich und die Bindung des Insulator-Proteins erfolgt auf beiden Allelen. Womöglich dient in diesem Fall das CTCF-Protein als sog. **Boundary Element** (Abgrenzungselement) dazu, die Imprinting-Domäne von den benachbarten, biallelisch exprimierten Regionen abzugrenzen.

Neben der IG-DMR und der Gtl2-DMR konnte im siebten Intron des *Dlk1*-Gens eine differentiell methylierte Region, die sog. ***Dlk1*-DMR** identifiziert werden (Takada et al. 2000). Die *Dlk1*-DMR zeigt auf dem *Dlk1* exprimierenden, paternalen Allel eine Hypermethylierung und auf dem maternalen Allel eine Hypomethylierung. Lage und Methylierungsmuster der *Dlk1*-DMR ähneln der *Igf2*-DMR2 im 3' Bereich des *Igf2*-Gens (Feil et al. 1994).

Einige Untersuchungen weisen daraufhin, dass genomisches Imprinting in extraembryonalen Geweben anders reguliert wird als im Embryo selbst (Chapman et al. 1984; Wagschal und Feil. 2006; Coan et al. 2005). In den Δ IG-DMR/+ Embryos (s.o.) zeigte die Plazenta im Gegensatz zum Embryo keinen auffälligen Phänotyp. Mit der ***Dlk1*-DMR₀** wurde vor kurzem

eine plazentaspezifische DMR stromaufwärts des *Dlk1*-Gens identifiziert (Lin et al. 2007). Während sich in der Plazenta eine paternale Hyper- bzw. maternale Hypomethylierung beobachten ließ, war im Embryo der Bereich auf beiden Allelen unmethyliert. Die Funktion des Elementes ist unbekannt, die differentielle epigenetische Markierung deutet jedoch auf eine plazentaspezifische Funktion hin.

1.7 RNA-Interferenz (RNAi)

Die **RNA-Interferenz** beschreibt einen hochkonservierten Mechanismus eukaryotischer Zellen zur spezifischen Genregulation. Bedeutendes Merkmal ist hierbei, dass die Spezifität der RNA-Interferenz durch kleine 20-23 nt lange, nicht-kodierende RNAs durch Bindung an Zielsequenzen (Targets) erreicht wird. RNA-Interferenz kann sowohl auf Chromatin-, transkriptioneller, als auch post-transkriptioneller Ebene stattfinden. RNAi führt zur Spaltung bzw. Translationsblockade von Ziel-mRNAs oder zur Stilllegung des Gens auf DNA/Chromatin-Ebene via DNA-Methylierung (Pflanzen) bzw. Histon-Modifikationen. Die für den RNAi-Mechanismus essentiellen kleinen RNAs werden in drei Klassen, **miRNA** (microRNA), **siRNA** (small interfering RNA) und **piRNA** (PIWI-interacting RNA) eingeteilt. Hauptunterscheidungsmerkmale sind die Herkunft der RNA-Moleküle (endogene oder exogene RNAs, wie z.B. Viren) und die Zusammensetzung der Proteinkomplexe mit denen sie interagieren (miRNA und siRNA interagieren mit den Ago-Proteinen der Argonaute-Proteinfamilie, piRNAs dagegen mit den Piwi-Proteinen).

Der RNA-Interferenz-Mechanismus wurde 1998 von Andrew Fire und Craig Mello entdeckt (Fire et al. 1998), wofür beide im Jahr 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt wurden.

1.7.1 microRNAs (miRNAs): Transkription und Prozessierung

miRNAs sind 20-23 nt lange, endogene, einzel-strängige RNA-Moleküle (ssRNAs), die spezifisch die Genregulation beeinflussen (Bartel et al. 2004). Mit den Argonaute-Proteinen (AGO) formen sie den sog. **RISC-Komplex** (RNA-induced silencing complex). Dieser Ribonuklein-Komplex ist für das post-transkriptionelle Stilllegen von Genen verantwortlich (PTGS, **post-transcriptional gene-silencing**) (Hutvagner et al. 2002; Liu et al. 2002; Meister et al. 2004; Pillai et al. 2004). Durch komplementäre Basenbindung der miRNA an Ziel-mRNAs

wird der RISC-Komplex rekrutiert, was in Degradierung, Destabilisierung oder Translationshemmung der gebundenen mRNA resultiert (Filipowicz et al. 2008). Proteom-Studien zeigten kürzlich, dass eine einzelne miRNA hunderte Ziel-mRNAs post-transkriptionell beeinflussen kann (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008). Dadurch werden viele zelluläre Vorgänge durch miRNAs ko-reguliert wie z.B. Entwicklungs- und onkogene Prozesse (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Kanellopoulou et al. 2005; Wienholds et al. 2005; Johnson et al. 2005; Lu et al. 2005; He et al. 2005; O'Donnell et al. 2005; Calin et al. 2006; He et al. 2007; Mayr et al. 2007). So erhöht sich durch Defekte in der miRNA-Prozessierungs-Maschinerie die Tumorigenese-Rate (Kumar et al. 2007). *In vitro* Expression der microRNA-302 Familie führte sogar zur Reprogrammierung von Hautkrebszellen zu Zellen ähnlich embryonaler Stammzellen (Lin et al. 2008)

Seit Entdeckung der ersten miRNAs *lyn-4* und *let-7* in *C. elegans* (Lee et al. 1993) konnten bis heute in vielen weiteren Eukaryonten wie *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Drosophila melanogaster* zahlreiche weitere miRNAs identifiziert werden (9539 Einträge in der mirbase-Datenbank, Release 13.0, März 2009; <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>). MicroRNAs finden sich sowohl in intergenischen Bereichen als auch in Introns, wobei sie als singuläre Transkripte bzw. als Cluster organisiert sein können.

Obwohl die regulatorische Funktion von miRNAs inzwischen erkannt wurde, ist noch relativ wenig über die Regulation der miRNA-Expression bekannt. Neuere Arbeiten zeigten Hinweise auf eine Regulierung der miRNA-Aktivität auf post-transkriptioneller Ebene (Obernosterer et al. 2006; Suh et al. 2004; Thomson et al. 2006; Wulczyn et al. 2007; Lee et al. 2008). Während ursprünglich ein linearer Prozessierungsweg gültig für die Biogenese aller miRNAs angenommen wurde, führten diverse Entdeckungen zu miRNA-spezifischen Unterschieden, die eine Fülle von Optionen bieten, eine miRNA individuell zu exprimieren und prozessieren (s. Abb. 1.10).

Die Prozessierung von miRNAs ist bereits intensiv untersucht worden und weitgehend gut verstanden. In einem ersten Schritt wird bei der Biogenese von singulären miRNAs ein monocistronisches, von miRNAs in Clustern ein polycistronisches Primärtranskript (pri-miRNA) hergestellt (Yi et al. 2003). Die Transkription kann dabei durch die RNA-Polymerase II oder RNA-Polymerase III erfolgen. Die synthetisierte pri-miRNA weist durch Bildung einer imperfekten Haarnadelschleife (Hairpin) von ca. 80 nt Größe eine charakteristische

Sekundär-Struktur auf. Der zweite Schritt der Prozessierung wird durch den sog. **Microprozessor-Komplex** katalysiert, der aus dem RNase III Enzym **Drosha** sowie **DGCR8** (**DiGeorge Critical Region 8/Pasha**) besteht (Wu et al. 2000; Zeng und Cullen 2003). Die Aktivität des Microprozessor-Komplexes erfolgt ko-transkriptionell. Inzwischen ist bekannt, dass dieser Schritt auf mannigfaltige Art katalysiert werden kann. So sind für einige individuelle miRNAs spezifische Kofaktoren notwendig (s. Abb. 1.10a-e) (Kim und Kim 2007; Morlando et al. 2008).

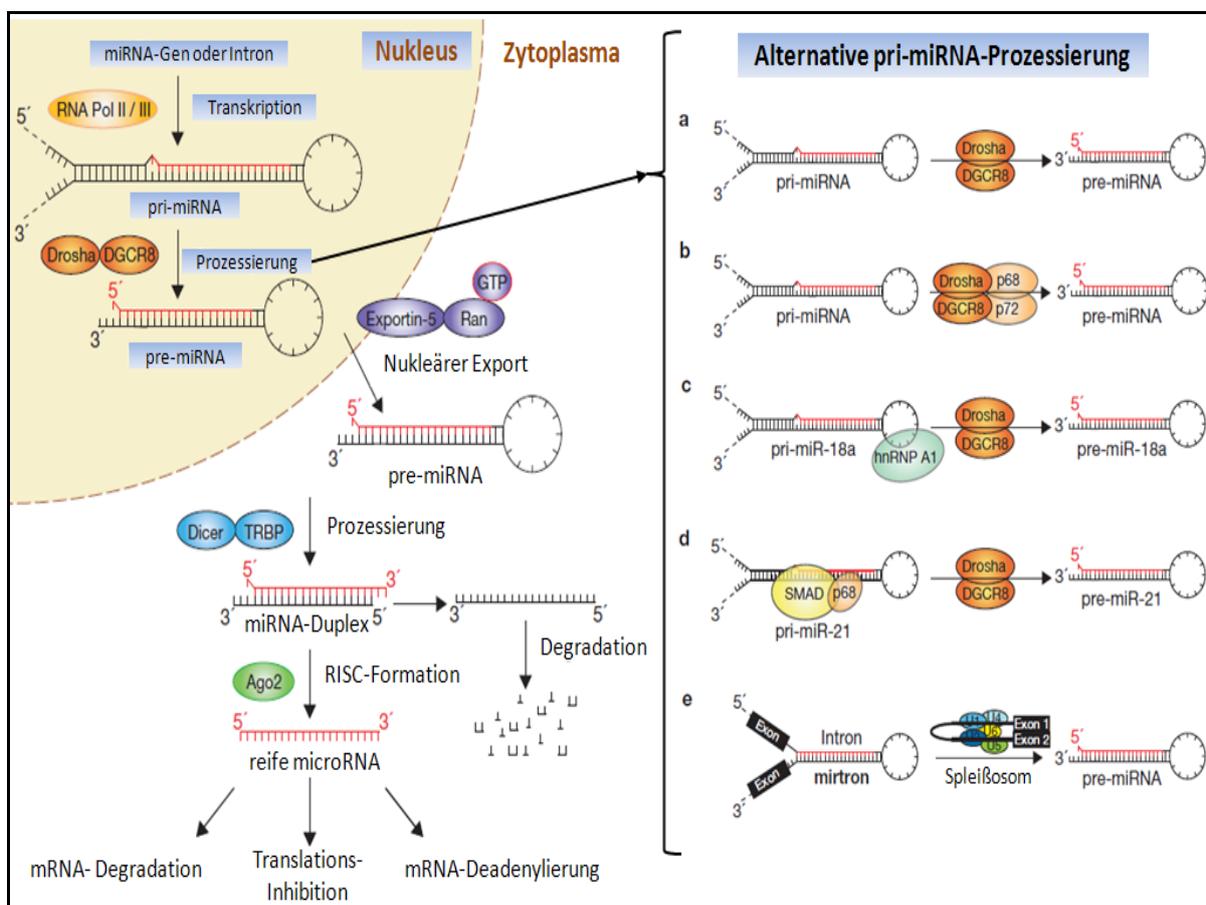


Abbildung 1.10: Wichtige Schritte der miRNA-Prozessierung. Nach dem klassischen, linearen Prozessierungsmodell (links) wird im Zellkern das primäre miRNA Transkript (pri-miRNA) von RNA-Polymerase II oder III transkribiert und durch den Mikroprozessor-Komplex Drosha-DGCR8 (Pasha) zum miRNA-Vorläufer (Precursor) prozessiert, der auch als pre-miRNA bezeichnet wird. Neuere Arbeiten zeigten, dass dieser Prozessierungsschritt auf mehrere Arten erfolgen und zur individuellen Regulation von miRNAs dienen kann (a-e). Die pre-miRNA wird schließlich durch Exportin-5-Ran-GTP aus dem Nukleus ins Zytoplasma exportiert. Dort wird sie durch einen Komplex des RNase Proteins Dicer und dem dsRNA-Bindeprotein TRBP auf die Länge einer reifen miRNA prozessiert. Funktionelle miRNA-Stränge werden anschließend mit Argonaute-Proteinen (Ago2) in den RISC-Komplex inkorporiert. Inkorporierte miRNAs rekrutieren den RISC-Komplex zu Ziel-mRNAs, welche durch Degradation, Translations-Inhibition oder Deadenylierung stillgelegt werden. Nicht in RISC eingebaute miRNA-Stränge werden im Zytoplasma degradiert. (Abb. nach Winter et al. 2009, verändert)

Der generierte **pre-miRNA** Precursor wird anschließend via Exportin-5 vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Reed und Hurt 2002). Dort wird nun durch die RNase Dicer und TRBP (Tar-RNA Binding Protein) der doppelsträngige miRNA-Duplex gebildet, für den je 2 Nukleotide Überhang an beiden 3' Enden charakteristisch sind (Bernstein et al. 2001; Hutvagner et al. 2001).

Prinzipiell könnten aus dem miRNA-Duplex stets zwei reife miRNAs hervorgehen. In vielen Fällen wird jedoch nur einer der beiden Duplex-Stränge in RISC eingebaut, während der andere Strang degradiert. Diese funktionelle Asymmetrie hängt von der thermodynamischen Stabilität der beiden Duplex-Enden ab; der miRNA-Strang mit einer weniger stabilen Basenpaarung am 5' Ende wird in RISC eingebaut (Schwarz et al. 2003; Khvorova et al. 2003).

1.7.2 miRNA-Target-Erkennung und Bindung

Nach der Inkorporation der miRNA ist der RISC-Komplex sequenzspezifisch und bindet an eine homologe Ziel-mRNA. Bei (fast) perfekter Bindung zwischen miRNA und mRNA wird nun durch die sog. Slicer-Aktivität des Ago2-Proteins die mRNA geschnitten und degradiert. Weniger perfekte Homologie zwischen miRNA und mRNA bewirkt eine Inhibition der Translation bzw. eine Destabilisierung der mRNA.

Gegenwärtig sind erst einige wenige der vielen hundert miRNAs funktionell charakterisiert. *In silico* Target-Vorhersagen für einzelne miRNAs erweisen sich aus mehreren Gründen als schwierig: So ist bei der Bindung zwischen miRNA und Ziel-mRNA keine komplette Homologie notwendig, es sind also Fehlpaarungen erlaubt (Brennecke et al. 2005). Besonders wichtig bei der miRNA-mRNA Interaktion scheint der Bereich der Nukleotide 2-8 am 5' Ende der microRNA (der sog. Seed-Bereich). Andererseits können Fehlpaarungen in der Seed-Region durch erhöhte Kompatibilität im 3' Bereich kompensiert werden.

Da die Gesetzmäßigkeiten nach denen eine miRNA-mRNA-Interaktion zustande kommt nach wie vor nicht vollständig geklärt sind, besteht bei vielen *in silico*-Target Vorhersagen die Gefahr einer hohen Zahl an falsch positiven Targets (Baek et al. 2008). Außerdem beziehen viele Suchprogramme nicht die dreidimensionale Faltung von mRNAs in die Berechnung mit ein. Andere Programme wie z.B. Miranda (John et al. 2004; <http://www.microrna.org/microrna/home.do>) gewichten eine Konservierung der miRNA-Bindestelle sehr stark, wodurch speziesspezifische miRNA-Targets nur wenig Beachtung

finden. Neben rein bioinformatischen Methoden zur miRNA-Target-Identifikation wurden in der Zwischenzeit auch *in vitro* Methoden entwickelt wie z.B. die miRNA-Deregulation in Zelllinien. Auch wurde mit Hilfe der SILAC-Methode (**S**table isotope **l**abeling by **a**mino acids in **c**ell culture) ein Weg zur Identifikation von miRNA-Targets auf Protein-Ebene gefunden. Beide experimentellen Ansätze stellen sehr gezielte Methoden dar, sind jedoch technisch anspruchsvoll und mit hohen Kosten verbunden (Selbach et al. 2008; Baek et al. 2008).

Ferner wurde für einige miRNAs (u.a. der *Dlk1/Gtl2* Region) gezeigt, dass sie durch RNA-editing via ADAR1 und ADAR2 in ihrer Sequenz verändert werden und dadurch ihr Repertoire an Ziel-Sequenzen moduliert wird (Kawahara et al. 2007; Kawahara et al. 2008). Das miRNA-Editing ist dabei gewebespezifisch und in den einzelnen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt. Durch die Entdeckung des post-transkriptionellen miRNA-Editing wurde die Komplexität der RNA-Interferenz um eine zusätzliche Ebene erweitert.

Eine weitere überraschende Entdeckung war, dass unter bestimmten physiologischen Bedingungen miRNAs auch aktivierenden Einfluss auf die Translation von Proteinen ausüben können, so u. a. auch die mir-369 der *Dlk1/Gtl2* Region (Vasudevan et al. 2007).

1.8 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Die *Dlk1/Gtl2* Imprinting Region besitzt im intergenischen Bereich zwischen den Genen *Dlk1* und *Gtl2* eine differentiell methylierte Region (IG-DMR). Es ist bereits bekannt, dass dieser chromosomale Abschnitt eine sogenannte primäre DMR darstellt und als Regulations-Element die allelspezifische Genexpression der Region *in cis* kontrolliert (Lin et al. 2003). Durch Deletions-Experimente (Knock-outs) in der Maus sowie Untersuchungen an Patienten mit Epimutationen im Bereich der humanen *DLK1/MEG3* Region konnte der Umfang der IG-DMR auf eine Größe von ca. 4 Kilobasen eingegrenzt werden (Lin et al. 2003; Kagami et al. 2008). Die genauen Mechanismen durch welche die IG-DMR die allelspezifische Genexpression der Region kontrolliert sind jedoch nicht bekannt. Detaillierte *in silico* Studien im Bereich der IG-DMR sowie anderer Regionen des *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Clusters führten bereits zur Identifizierung von teils konservierten Tandem Repeats (Paulsen et al. 2001; Tierling et al. 2006). Da bereits für andere Imprinting-Regionen eine Rolle von Tandem Repeats in der Regulation des Imprintings gezeigt werden konnte, ist es möglich, dass auch die Repeats der *Dlk1/Gtl2* Region von funktioneller Relevanz sind.

Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit u.a. die mögliche Funktion dieser Tandem Repeats näher untersucht werden. Unter Verwendung von Reporter-Assays, mit dessen Hilfe DNA-Elemente auf ihr *cis*-regulatorisches Potential hin getestet werden können, sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, die regulatorischen Eigenschaften der IG-DMR sowie anderer Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region besser zu verstehen. Dadurch könnte ein Modell entwickelt werden, dass die Regulation der allelspezifischen Genexpression der Region durch Kooperation der verschiedenen Elemente erklärt.

Für einige miRNAs der *Dlk1/Gtl2* Region konnte eine Rolle in der post-transkriptionellen Regulation des *Rtl1*-Gens *in trans* gezeigt werden. Durch Modifikation des Reporter-Assays könnte auch eine Detektion von miRNA induzierten RNA-Interferenz-Effekten ermöglicht werden. Exemplarisch für die Region sollen für einige miRNAs mehrere putative, durch *in silico* Vorhersagen ermittelte miRNA-Bindestellen systematisch auf RNAi-Effekte getestet werden. Dies könnte als Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen dienen und zur Identifikation von Zielgenen der *Dlk1/Gtl2*-miRNAs führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Fluka, Buchs, Schweiz
Acrylamid Stock (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose (Seakem LE® Agarose)	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua bidest. (Milli-Q-H ₂ O)	hauseigene Anlage (Millipore)
ATP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Betain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Blocking Reagent	Roche, Mannheim, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA	Roche, Mannheim, Deutschland
Calciumchlorid	Merk, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
(α - ³² P)-CTP	Perkin-Elmer, Rodgau-JH, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Fluka, Buchs, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dinatrium-EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDC (commercial grade)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid)	
EDTA (Ethylen-diamin-tetra-essigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entwicklerlösung (für Röntgenfilm)	Tetenal, Norderstedt
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixierlösung (für Röntgenfilm)	Tetenal, Norderstedt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Guanidin-Thiocyanat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H arnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hybond-NX Membran (neutral nylon)	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
IPTG (Isopropyl-beta-D-thio-galacto-pyranosid)	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
K aliumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L ithiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lysozym	Fluka, Buchs, Deutschland
M agnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Manganchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1- Methylimidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure)	Serva, Heidelberg, Deutschland
N atriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Lauroyl-sarcosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PEG 8000 (Polyethylenglykol)	Fluka, Buchs, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol, sauer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PLB (passive lysis buffer)	Promega, Madison, USA
Polyvinylpyrrolidon K30	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
R ibonucleosidtriphosphat (NTPs)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Röntgenfilm	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
S accharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silicamilch	laboreigene Herstellung (Pulver von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
TEMED	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomics, Cheshire, Großbritannien

Tri-Natriumcitrat-dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin / EDTA	PAA, Cölbe, Deutschland
Trypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Wasserstoffperoxid	VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich
Whatmann-Papier	Whatman, Kent, Großbritannien
X-Gal	Eppendorf, Köln, Deutschland
Xylen-Cyanol	Chroma, Stuttgart, Deutschland

2.1.2 Reaktionskits

Dual Luciferase® Reporter-Assay System	Promega, Madison, USA
Qiaex II Extraktionskit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SureClean™	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nanofectamin	PAA, Cölbe, Deutschland
pGEM T System I Ligationskit	Promega, Madison, USA
Qiagen Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
GenElute™ Plasmid MiniPrep-Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EndoFree RT-Kit	Ambion, Austin, USA
M-MLV-Reverse Transcription Kit	Promega, Madison, USA
CEQ™ DCTS Quick Start Mix	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland

2.1.3 Größenstandards für Agarosegele

Als Größenstandard bei der elektrophoretischen Auftrennung von DNA (RNA) wurden folgende Marker der Firma MBI Fermentas (New England Biolabs) eingesetzt; mit angegeben sind die jeweils enthaltenen Fragmentgrößen in Basenpaaren:

<u>GeneRuler™ 1kb-DNA-ladder:</u>	250 / 500 / 750 / 1000 / 1500 / 2000 2500 / 3000 / 3500 / 4000 / 5000 / 6000 8000 / 10000
<u>pUC19 DNA/MspI Marker:</u>	34 / 67 / 110 / 111 / 147 / 190 / 242 / 331 404 / 489 / 501
<u>Low Range ssRNA ladder :</u>	50 / 80 / 150 / 300 / 500 / 1000

2.1.4 Lösungen und Puffer

Agarosegel-Färbelösung	5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE-Puffer	
Crosslink-Lösung (für Northern Blots)	EDC 1-Methylimidazol pH 8	0,16 M 0,13 M
Denhardt's solution	Albumin fraction V Polyvinylpyrrolidon K30 Ficoll 400	1% 1% 1%
Blocking-Puffer (für DAPI-Färbung)	1% BSA 0,1% Triton X 100 in 1x PBS lösen	
Hybridisierungslösung (für Northern Blots)	SSC (20x) Na ₂ HPO ₄ (1M, pH 7,2) SDS (10%) Denhardt's solution (50x) Blocking Reagent Filtrieren	25% 2% 70% 2% Spatelspitze
Northern-Blot-Waschlösung I	SSC SDS	5x 1%
Northern-Blot-Waschlösung II	SSC SDS	1x 1%
DEPC-behandeltes H ₂ O	1 ml DEPC-Lösung (0,05%) zu 1 l Aqua bidest. 12 h Inkubation bei RT, anschließend autoklavieren	
Lösung A (gDNA-Präparation)	25 mM EDTA 75 mM NaCl	
Lösung B (gDNA-Präparation)	10 mM EDTA 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1% SDS	
Lösung D (RNA-Extraktion)	4 M Guanidin-Thiocyanat 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 0,5% N-Lauroylsarcosin 0,1 M 2-Mercaptoethanol angesetzt mit DEPC-H ₂ O	

2 Material und Methoden

PCR-Puffer (10x)	75 mM Tris-HCl (pH 8,8) 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mM MgSO_4 0,1% Tween 20
Puffer 1 (chemokompetente Zellen)	Kaliumacetat 30 mM Rubidiumchlorid 100 mM Calciumchlorid 10 mM Manganchlorid 50 mM Glycerin 15% pH 5,8 (mit Acetat); steril filtrieren
Puffer 2 (chemokompetente Zellen)	MOPS 10 mM Calciumchlorid 75 mM Glycerin 15% pH 6,5 (mit KOH); steril filtrieren
Puffer A (HPLC)	Triethylammoniumacetat (TEAA) 0,1 M
Puffer B (HPLC)	0,1 M TEAA 25% Acetonitril
Puffer C (HPLC)	75% Acetonitril
MOPS-RNA- Elektrophorese-Puffer (10x)	0,2 M MOPS (pH 7,0) 20 mM Natriumacetat (1 M) 10 mM EDTA (pH 8,0) angesetzt mit DEPC- H_2O
Mounting-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS-Puffer (Ca^{2+} -frei; Mg^{2+} -frei)	
- Stammlösung 1 (10x)	29 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 2 g KH_2PO_4 ad 1 l Aqua bidest.
- Stammlösung 2 (10x)	80 g NaCl 13,3 g KCl ad 1 l Aqua bidest.
- Gebrauchslösung (1x)	je 100 ml Stammlösung 1 und 2 ad 1 l Aqua bidest.

Probenpuffer (für Agarosegele)	0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylen-Cyanol 40% Saccharose
RNA-Probenpuffer (2x)	2x RNA loading dye MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
20x SSC	NaCl 3 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat 300 mM in DEPC-Wasser pH 7,0
TBE-Elektrophorese-Puffer	40 mM Tris-Base 50 mM Borsäure 1 mM EDTA
TE-Puffer (10x)	100mM Tris-Cl (pH 8,0) 100mM EDTA (pH 8,0) Lösung autoklavieren

2.1.5 Kulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Gibco™ Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

LB-Medium (1 l; pH 7,5)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
-------------------------	--

Anschließend wird die Lösung autoklaviert. Um LB-Agar-Platten herzustellen, wird vor dem Autoklavieren noch 1,5% Agar zugegeben. Zur Selektion werden verschiedene Antibiotika sowie X-Gal und IPTG eingesetzt (s. Tab. 2.1).

SOC-Medium (1 l; pH 7,0)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml KCl (250 mM)
--------------------------	---

Die Lösung wird autoklaviert, anschließend werden 5 ml MgCl₂ (2 M) und 20 ml Glukose (1 M) zugegeben.

Tabelle 2.1: Die zur Selektion eingesetzten Stoffe und deren Konzentrationen

Chemikalie	Eingesetzte Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Tetracyclin	50 µg/ml
IPTG (0,1 M)	40 µl pro LB-Agarplatte
X-Gal (2%)	40 µl pro LB-Agarplatte

2.1.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme (RE) wurden mit Ausnahme von *NsiI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen:

Acc65I, BamHI, BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, MluI, MspI, NcoI, NheI, NotI, PstI, Sall, Scal, XbaI, XhoI

Andere Enzyme

Calf Intestine Phosphatase (CIP)	Promega, Madison, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNase I, RNase free	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
RNAasin TM RNase Inhibitor	Promega, Madison, USA
RNAasin TM Plus RNase Inhibitor	Promega, Madison, USA
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Taq</i> -Polymerase	laboreigene Herstellung
<i>Pfu</i> -Polymerase	laboreigene Herstellung
Thermo-Sequenase	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Klenow-Fragment (3' - 5' exo-)	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, USA
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T7-RNA-Polymerase (enzyme-mix)	Promega, Madison, USA
Trypsin (5 ng/µl)	Promega, Madison, USA

2.1.7 Vektoren

pSG5

Der pSG5 Vektor ist ein eukaryotischer Expressionsvektor und zählt zu den high-copy-number Plasmiden (s. Abb. 2.1). Er wurde von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bezogen und verfügt über einen SV40-Promotor und ein SV40-Polyadenylierungssignal sowie über das Beta-Globin-Intron II. Stromabwärts vom Promotor befinden sich einmalige *EcoRI*, *BamHI* und *BglII*-Schnittstellen. Vom pSG5-Plasmid ausgehend, wurden sowohl miRNA-Expressionsvektoren als auch die miRNA-Ziel-Vektoren konstruiert. Weitere Informationen unter <http://www.stratagene.com/manuals/216201.pdf>.

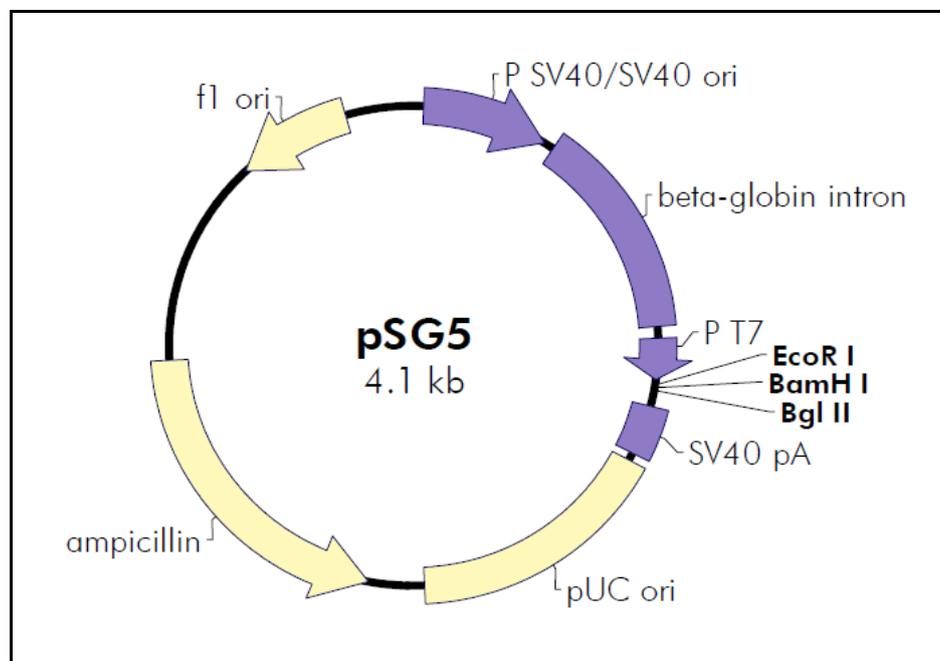


Abbildung 2.1: Vektorkarte von pSG5.

miRNA-Expressions-Plasmide

pSG5-mir-154

In den pSG5-Vektor der Firma Stratagene wurde der 66 nt große Vorläufer (Precursor) der mir-154 mit je 20 nt stromauf- bzw. stromabwärts eingefügt. Zur Klonierung dienten die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* bzw. *BglII*. Das Plasmid wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit „RNA-Interferenz-Effekte durch Transfektion des mir-154-Precursors in Säugetier-Zellen“ (2005) angefertigt (s.u.).

pSG5-mir-134, mir-323, mir-409 und mir-411

Entsprechend dem pSG5-mir-154-Plasmid wurden miRNA-Expressions-Plasmide für die mir-134, 323, 409 und 411 hergestellt. Die eingefügten Fragmente wurden nach erfolgreicher Klonierung durch Sequenzierung auf Identität, Orientierung und Sequenzfehler hin überprüft. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 2.2 **A** die Klonierungsstrategie und die jeweils genutzten Restriktions-Schnittstellen.

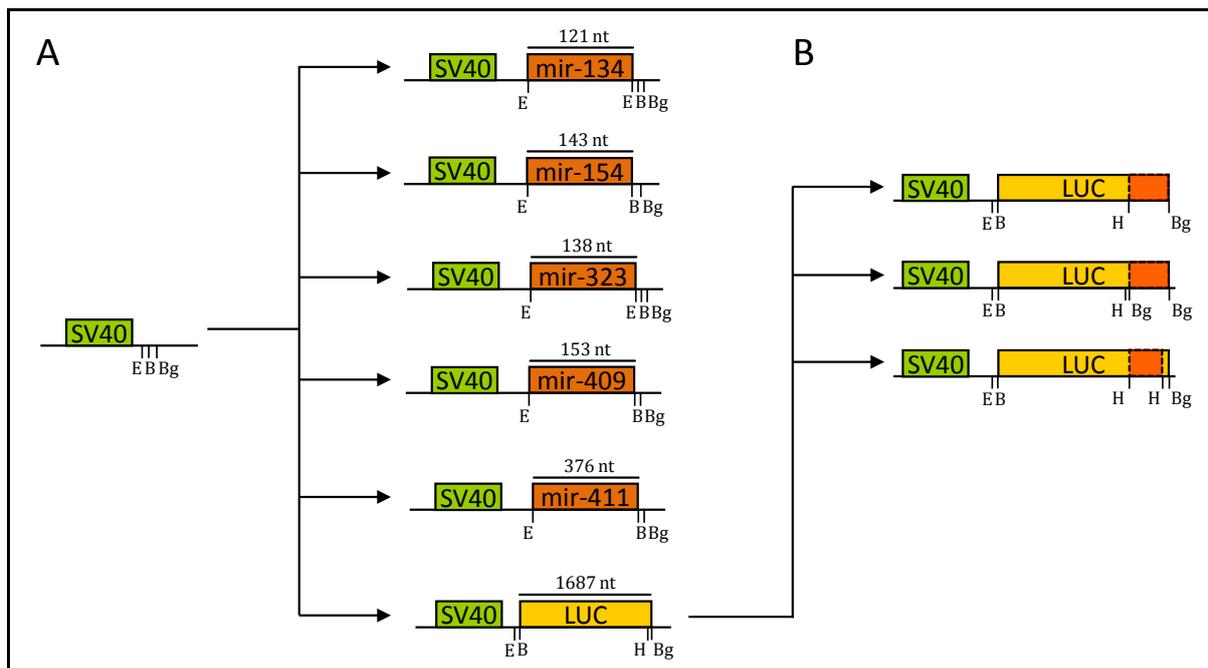


Abbildung 2.2. Schematischer Aufbau der RNAi-Konstrukte. (A) miRNA-Expressions-Plasmide wurden durch Insertion entsprechender DNA-Fragmente in pSG5 stromabwärts vom SV40-Promotor unter Verwendung der *EcoRI*- bzw. *BamHI*-Schnittstellen hergestellt. **(B) miRNA-Target-Konstrukte:** Stromabwärts des SV40-Promotors wurde zunächst das *Photinus pyralis*-Luciferase-Gen (gelb) in pSG5 eingefügt. Anschließend wurden diverse putative miRNA-Zielsequenzen im 3' Bereich des Reporter-Gens eingebracht (orange). (E: *EcoRI*; B: *BamHI*; Bg: *BglIII*; H: *HindIII*)

miRNA-Ziel-Vektoren (Target-Konstrukte)

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit benutzten miRNA-Ziel-Vektoren sind auf der Basis des pSG5-Plasmids der Firma Stratagene konstruiert worden. Zunächst wurde das als Reporter fungierende Luciferase-Gen (aus *Photinus pyralis*) mit Hilfe der *BamHI* bzw. *BglIII*-Schnittstellen in das Plasmid eingebracht. Der 3' Primer enthielt zusätzlich noch eine *HindIII*-Schnittstelle, sodass durch die Klonierung eine neue *HindIII*-Schnittstelle am 3' Ende des Luciferase-Gens eingefügt wurde. Daraufhin wurden in den 3' untranslatierten Bereich des

Luciferase-Gens (3'UTR) die verschiedenen zu testeten Sequenzen an *HindIII* und/oder *BglII*-Position eingefügt. Als Positivkontrolle für RNAi-Effekte dienten Reporter-Plasmide mit perfekten Bindestellen für die jeweiligen miRNAs im 3'UTR-Bereich des Luciferase-Gens. Diese werden im Folgenden auch als perfekte Target-Konstrukte bezeichnet. Perfekte bzw. zu testende Zielsequenzen für die einzelnen miRNAs wurden durch Insertion prä-hybridisierter Oligonukleotide im 3'UTR des Luciferase-Gens eingebracht. Die dazu benutzten Primer sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Zur Insertion ganzer 3'UTR-Bereiche putativer miRNA-Target-Gene wurde der entsprechende Bereich per PCR amplifiziert und anschließend in den pGEM-T-Vektor über TA-Klonierung eingefügt. Die benutzten Primer trugen zusätzlich Restriktionsschnittstellen, die eine gerichtete Klonierung der Fragmente erlauben. Die Klonierungsstrategie zur Herstellung von miRNA-Zielvektoren ist schematisch in Abbildung 2.2 B visualisiert. Letztlich wurden die generierten miRNA-Ziel-Vektoren durch Sequenzierung überprüft.

pRL-CMV

Das pRL-CMV-Plasmid der Firma Promega beinhaltet das Renilla-Luciferasegen (*Renilla reniformis*) und dient zur Normalisierung der gemessenen (*Photinus pyralis*) Luciferase-Aktivitäten in den Dual Luciferase-Experimenten. Die Luciferase-Expression wird über eine „immediate-early enhancer/promotor region“ des Cytomegalovirus (CMV) kontrolliert. Näheres unter <http://www.promega.com/tbs/tb237/tb237.pdf>.

pGEM-T-Vektor

Der pGEM-T-Vektor ist im pGEM-T-Ligationskit der Firma Promega (Madison, USA) enthalten und wurde zur Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten benutzt. Weitere Informationen unter <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

pcDNA3.1-Runx1

Zur Expression des murinen Runx1-Proteins in Säugerzellen diente der pcDNA3.1-Runx1-Vektor, bezogen von der Firma Addgene (Cambridge, USA). Weitere Informationen unter <http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&identifier=14585&atqx=runx1&cmd=findpl>.

In Kontroll-Transfektionen wurde das pcDNA3.1 der Firma Invitrogen eingesetzt.

pGL3-Basic, pGL3-Promoter, pGL3-Control

Die pGL3-Vektorserie der Firma Promega wurde verwendet, um DNA-Fragmente auf ihr potentielles *cis*-regulatorisches Potential hin zu untersuchen. Das pGL3-Basic-Plasmid (s. Abb. 2.3 A) besitzt ein Luciferase-Reporter-Gen (von *Photinus pyralis*) mit einer multiplen Klonierungsstelle stromaufwärts (= **Multiple Cloning Site, MCS**).

Im Vektor pGL3-Promoter (s. Abb. 2.3 B) wird die Expression des Luciferase-Gens über einen SV40-Promotor kontrolliert. Zum Test von Sequenzen auf putative Enhancer/Silencer-Aktivität kann die MCS stromaufwärts des SV40-Promotors, sowie die MCS stromabwärts des Luciferase-Gens genutzt werden. Der pGL3-Control (s. Abb. 2.3 C) enthält einen SV40-Promotor stromaufwärts und einen SV40-Enhancer stromabwärts des Luciferase-Gens was eine starke Expression des Reporter-Gens in vielen Zelllinien erlaubt. Dieser Vektor dient als Positivkontrolle zum Abgleich der Aktivität von rekombinanten pGL3-Plasmiden.

Alle mit pGL3-Reportern getesteten DNA-Elemente sind unter Tabelle 2.2 zusammengefasst. Ferner sind im Anhang alle generierten pGL3-Plasmide schematisch dargestellt (s. Abb. 6.10).

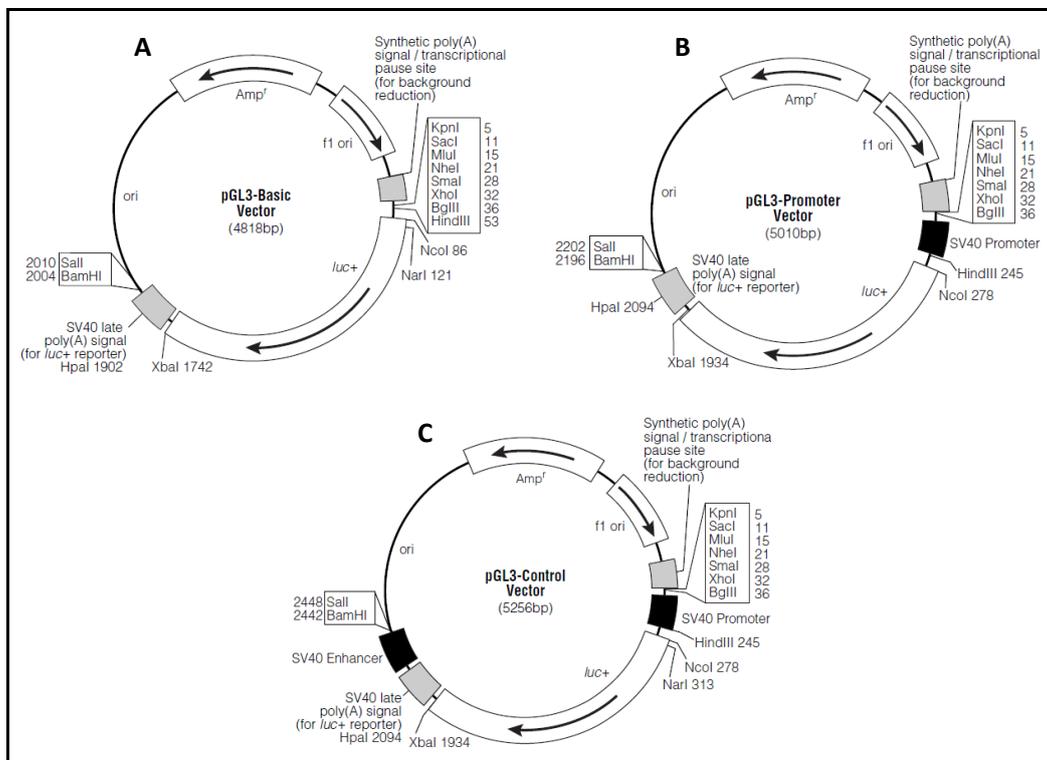


Abbildung 2.3: Vektorkarten der benutzen pGL3-Plasmide der Firma Promega. Benutzt wurden pGL3-Basic (A), pGL3-Promoter (B) sowie pGL3-Control (C). Luc+ steht für die cDNA des Luciferase-Genes. Amp^R weist auf die Möglichkeit zur Antibiotika-Selektion durch Ampicillin in *Escherichia coli* hin. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Weitere Informationen unter <http://www.promega.com/tbs/tm033/tm033.pdf>

Tabelle 2.2: Auflistung der in Maus (A) bzw. Mensch (B) untersuchten DNA-Elemente und die zu ihrer Amplifikation benutzten Oligonukleotide. In Spalte zwei gibt die Klonierungs-Position im pGL3-Vektor an, Spalte fünf die Größe des PCR-Produktes bei Amplifikation mit den angegebenen Oligonukleotiden (Spalten drei und vier). Sequenzen der Oligonukleotide sind in der Primer-Liste angegeben (s. Tab. 2.3).

A Durch pGL3-Reporter getestete DNA-Elemente (Maus)

DNA-Element	Position auf pGL3-Plasmid	5'-Primer (5'-3')	3'-Primer (5'-3')	Tm	PCR-Produkt
IG-DMR-TR 1G	Promotor-Position	mus_IGDMRTR1XhoF	mus_IGDMRTR1XhoR	57° C	346 nt
IG-DMR-TR 1G	Enh./Sil. Pos.	mus_IGDMRTR1BamF	mus_IGDMRTR1BamR	57° C	346 nt
IG-DMR-TR 1G	Ins. Pos. 1 (BamHI)	mus_IGDMRTR1BamF	mus_IGDMRTR1BamR	57° C	346 nt
IG-DMR-TR 1G	Ins. Pos. 2 (EcoRI)	mus_IGDMRTR1EcoRIF	mus_IGDMRTR1EcoRIR	57° C	346 nt
IG-DMR-TR 2	Promotor-Position	mus_IGDMRTR2XhoF	mus_IGDMRTR2XhoR	58° C	789 nt
IG-DMR-TR 2	Enh./Sil. Pos.	mus_IGDMRTR2BamF	mus_IGDMRTR2BamR	58° C	789 nt
Gtl2dsTR	Promotor-Position	mus-Gtl2-tan-rep-XhoI-FII	mus-Gtl2-tan-rep-XhoI-RII	58° C	1389 nt
Gtl2dsTR	Enh./Sil. Pos.	Sall_Gtl2dsTR_F	Gtl2dsTR_EcoRI_SallI	58° C	1290 nt
Gtl2usTR	Promotor-Position	Gtl2usTR_NheI_F	Gtl2usTR_NheI_R	56° C	586 nt
Gtl2usTR	Enh./Sil. Pos.	Gtl2usTR_BamHI_F	Gtl2usTR_BamHI_R	56° C	586 nt
MAR4	Pro./Enh./Sil.-Pos.	MAR4-NheI_F	MAR4-NheI_R	56° C	150 nt
<i>Dlk1</i> -Promotor	Promotor-Position	<i>Dlk1</i> _Pro_XhoF	<i>Dlk1</i> _Pro_R	65° C	1037 nt
<i>Gtl2</i> -Promotor	Promotor-Position	<i>Gtl2</i> -Pro_NheI_For	<i>Gtl2</i> -Pro_NheI_Rev	63° C	1091 nt
<i>Mirg</i> -Promotor	Promotor-Position	<i>Mirg</i> -promoter-F	<i>Mirg</i> -promoter-R	56° C	1031 nt
<i>Rtl1</i> -Promotor	Promotor-Position	<i>Rtl1</i> _Pro_XhoF	<i>Rtl1</i> _Pro1_XhoR	59° C	1055 nt
<i>Rtl1as</i> -Promotor	Promotor-Position	<i>Rtl1as</i> _Pro1_XhoF	<i>Rtl1as</i> _Pro1_XhoR	60° C	1085 nt
<i>BegainE1B</i> -Promotor	Promotor-Position	<i>Begain_E1B</i> _Pro_XhoI_F	<i>Begain_E1B</i> _Pro_XhoI_R	63° C	683 nt
CTCF-Element (<i>Gtl2</i>)	Enh./Sil. Pos.	musCTCF_Gtl2_BamHI_F	mus_CTCF_Gtl2_BamHI_R	54° C	586 nt
CTCF-Element (<i>Gtl2</i>)	Ins. Pos. 1 (BamHI)	musCTCF_Gtl2_BamHI_F	mus_CTCF_Gtl2_BamHI_R	54° C	586 nt
CTCF-Element (<i>Gtl2</i>)	Ins. Pos. 2 (EcoRI)	musCTCF_Gtl2_EcoRI_F	mus_CTCF_Gtl2_EcoRI_R	54° C	586 nt

B Durch pGL3-Reporter getestete DNA-Elemente (Mensch)

DNA-Element	Beschreibung	5'-Primer (5'-3')	3'-Primer (5'-3')	Tm	PCR-Produkt
MEG3dsTR	Promotor-Position	MEG3-tan-rep-Xho-F-II	MEG3-tan-rep-Xho-R-II	58° C	1552 nt
MEG3dsTR	Enh./Sil. Pos.	MEG3-tan-rep-Bam-F-II	MEG3-tan-rep-Bam-R-II	58° C	1552 nt
IG-DMR-TR1	Promotor-Position	hsaTR1_NheI_F	hsaTR1_NheI_R	57° C	375 nt
IG-DMR-TR1	Enh./Sil. Pos.	hsaTR1_BamHI_F	hsaTR1_BamHI_R	57° C	375 nt
IG-DMR-TR1	Ins. Pos. 1 (BamHI)	hsaTR1_BamHI_F	hsaTR1_BamHI_R	57° C	375 nt
IG-DMR-TR1	Ins. Pos. 2 (EcoRI)	hsaTR1_EcoRI_F	hsaTR1_EcoRI_R	57° C	375 nt
IG-DMR-TR1b	Promotor-Position	hsaTR1b_NheI_F	hsaTR1b_NheI_R	57° C	576 nt
IG-DMR-TR1b	Enh./Sil. Pos.	hsaTR1b_BamHI_F	hsaTR1b_BamHI_R	57° C	576 nt
IG-DMR-Fragment II, III, IV	Promotor-Position	hsaTR1b_NheI_F	hsaIG_DMR_PP_R_XhoI	60° C	3040 nt
IG-DMR-Fragment V	Promotor-Position	hs_put_Pro_NheI_F	hs_put_Pro_NheI_R	56° C	680nt
IG-DMR-Fragment I	Promotor-Position	hsa-ALU_XhoI_F	hsa-ALU_XhoI_R	58° C	711 nt

2.1.8 Oligonukleotide

Alle im Folgenden aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Zur besseren Übersicht sind die Primer nach Verwendungszweck geordnet.

Tabelle 2.3 (A-H): Auflistung aller in der vorliegenden Arbeit benutzten Oligonukleotide (Primerliste). Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. TM gibt die in PCRs oder anderen Reaktionen eingesetzte Temperatur ein.

A Oligonukleotide zur Herstellung der pGL3-Reporter-Konstrukte (Maus)

Primer	Sequenz (5'-3')	Primer	Sequenz (5'-3')
mus_IGDMRTR1XhoF	<u>CCGCTCGAGCGG</u> CTA GTA CAC AGG CTG ACC ATG	Dlk1_Pro_XhoF	<u>CCGCTCGAG</u> GAC ACT GGC AGA ATC AAT ACC CAC
mus_IGDMRTR1XhoR	<u>CCGCTCGAGCGG</u> TCC CTC ACT CCA GGA GTT AAG	Dlk1_Pro_R	CC GCC TTT TCG TAC TGT CGT C
mus_IGDMRTR1BamF	<u>CGGGATCCCG</u> CTA GTA CAC AGG CTG ACC ATG	Gtl2-Pro_NheI_For	<u>GCTAGC</u> GCA TTC TGA CCT TTT CGA GAG G
mus_IGDMRTR1BamR	<u>CGGGATCCCG</u> TCC CTC ACT CCA GGA GTT AAG	Gtl2-Pro_NheI_Rev	<u>GCTAGC</u> GGG TTT CTG GAA GAG CTG CA
mus_IGDMRTR1EcoRIF	<u>GGAATTC</u> CTA GTA CAC AGG CTG ACC ATG	Begain_E1B_Pro_XhoI_F	CCGGC TCG AGG AGG CCA AGA CTG
mus_IGDMRTR1EcoRIR	<u>GGAATTC</u> TCC CTC ACT CCA GGA GTT AAG	Begain_E1B_Pro_XhoI_R	<u>CCGCTCGAG</u> CGG ACC CTC ACG CCG GGC
mus_IGDMRTR2XhoF	<u>CCGCTCGAGCGG</u> CCT TCA CTA GGG AAC AGG ATG	mus_CTCF_Gtl2_Bam_F	<u>GGATCC</u> GGAGTAGAATTGTGGTCTGG
mus_IGDMRTR2XhoR	<u>CCGCTCGAGCGG</u> CCT TGA ATT TGT GCC TCA AAG C	mus_CTCF_Gtl2_Bam_R	<u>GGATCC</u> AAGAGGGAGAGGAGAAATGG
mus_IGDMRTR2BamF	<u>CGGGATCCCG</u> CCT TCA CTA GGG AAC AGG ATG	mus_CTCF_Gtl2_Eco_F	<u>GAATTC</u> GGAGTAGAATTGTGGTCTGG
mus_IGDMRTR2BamR	<u>CGGGATCCCG</u> CCT TGA ATT TGT GCC TCA AAG C	mus_CTCF_Gtl2_Eco_R	<u>GAATTC</u> AAGAGGGAGAGGAGAAATGG
mus-Gtl2-tan-rep-XhoI-FII	<u>CTCGAG</u> CTC TGG CTC CAT TCT TGA GTG AT	Gtl2dsTR_EcoRI_SallI	<u>GTCGACGAATTC</u> CTCTCTTGACGAACCTATCTGA
mus-Gtl2-tan-rep-XhoI-RII	<u>CTCGAG</u> CTC TCT TGA CGA ACC TAT CTG AG	Gtl2usTR_NheI_F	<u>GCTAGC</u> TCCAACCTCCAAAGAAACCC
Sall_Gtl2dsTR_F	<u>GTCGAC</u> ATTC CAGAACTAGG ACCCTCC	Gtl2usTR_NheI_R	<u>GCTAGC</u> ATCCTCAGATTAGCTAGGG
MAR4-NheI_F	<u>GCTAGC</u> GTG CAA GGG CAG ACG CTG	Gtl2usTR_BamHI_F	<u>GGATCC</u> TCCAACCTCCAAAGAAACCC
MAR4-NheI_R	<u>GCTAGC</u> CGT TTG TGC CTC GTC TTA GC	Gtl2usTR_BamHI_R	<u>GGATCC</u> ATCCTCAGATTAGCTAGGG
Mirg-promoter-F	<u>CTCGAGGGA</u> TGT TTG GCC ACG GAC AG	Mirg-promoter-R	<u>CTCGAGGAG</u> GAG AGC CGT GTA TGA CTC
Rtl1as_Pro1_XhoF	<u>CCGCTCGAG</u> GCTGGGGTTG GGAAAGCATG	Rtl1as_Pro1_XhoR	<u>CCGCTCGAG</u> CCC AAG GTG CTG GGA TCG GAA TG
Rtl1_Pro_XhoF	<u>CCGCTCGAG</u> TGC TCG GTT GGA AAG GAG TGT GCT	Rtl1_Pro1_XhoR	<u>CCGCTCGAG</u> CAT GAG CAG AAT TGA GGC CAG ATG

B Oligonukleotide zur Herstellung der pGL3-Reporter-Konstrukte (Mensch)

Primer	Sequenz (5'-3')	Primer	Sequenz (5'-3')
MEG3-tan-rep-Xho-F-II	<u>CTCGAG</u> GCC ACC CAA CTT TTG ACG TCC	hs_put_Pro_NheI_F	<u>GCTAGC</u> AATTGCGAGTGGTTCGCCAG
MEG3-tan-rep-Xho-R-II	<u>CTCGAG</u> AAG CTT CAT CGA AGG CAT CCC AT	hs_put_Pro_NheI_R	<u>GCTAGC</u> CTCCAGACAAAAGTGTGCAT
MEG3-tan-rep-Bam-F-II	<u>GGATCC</u> GCC ACC CAA CTT TTG ACG TCC	hsa-ALU_XhoI_F	<u>CCGCTCGAGCGG</u> TCTGAGGAGCGGCTCCTGGCT
MEG3-tan-rep-Bam-R-II	<u>GGATCC</u> AAG CTT CAT CGA AGG CAT CCC AT	hsa-ALU_XhoI_R	<u>CCGCTCGAGCGG</u> CTC TGC CTC CTG GGT TCA AGT G
hsaTR1_NheI_F	<u>GCTAGC</u> CTGTGAGAAATGACTTCGC	hsa_IG_DMR_PP_F_XhoI	<u>CCGCTCGAGCGG</u> GAC AAG AGA GCA CAT AGT CCT ACC
hsaTR1_NheI_R	<u>GCTAGC</u> TGCTGAGAACTGCATTGG	hsa_IG_DMR_PP_R_XhoI	<u>CCGCTCGAGCGG</u> CAC TGC TGA GAA CTG CAT TTG GGC A
hsaTR1_BamHI_F	<u>GGATCC</u> CTGTGAGAAATGACTTCGC	hsaTR1b_NheI_F	<u>GCTAGC</u> CACAAATAGCTCTGTACGC
hsaTR1_BamHI_R	<u>GGATCC</u> TGCTGAGAACTGCATTGG	hsaTR1b_NheI_R	<u>GCTAGC</u> CACAGAAGGATCCATTGAGG
hsaTR1_EcoRI_F	<u>GGAATTC</u> CTGTGAGAAATGACTTCGC	hsaTR1b_BamHI_F	<u>GGATCC</u> CACAAATAGCTCTGTACGC
hsaTR1_EcoRI_R	<u>GGAATTC</u> TGCTGAGAACTGCATTGG	hsaTR1b_BamHI_R	<u>GGATCC</u> CACAGAAGGATCCATTGAGG

C Oligonukleotide zur Herstellung der miRNA-Expressions-Plasmide

Primer	Sequenz (5'-3')	T _M	PCR-Produkt	Beschreibung
134-hp-II_EcoRI_F	<u>CGGAATTC</u> GGT GGT GCC AGC ACC AT	53° C	121 nt	Amplifikation des murinen mir-134 Precursors
134-hp-II_EcoRI_R	<u>CGGAATTC</u> CTT TGA GTG GAA TTG ATG C	52° C		
323-hp-II_EcoRI_F	<u>CGGAATTC</u> GGT CTT CCT ACT GCT GCT	54° C	138 nt	Amplifikation des murinen mir-323 Precursors
323-hp-II_EcoRI_R	<u>CGGAATTC</u> AGG AAA GCT CGC AAG GC	53° C		
mir-409-EcoRI-for	<u>GAATTC</u> CGTTCTGAGCATCCGAGCC	61° C	153 nt	Amplifikation des murinen mir-409 Precursors
mir-409-BamHI-rev	<u>GGATCC</u> AGCGAGATGAGTCCATGGT	61° C		
mir-411-EcoRI-for	<u>GAA TTC</u> CCTGACATGAAGATGAGACTCTTGCT	60° C	376 nt	Amplifikation des murinen mir-411 Precursors
mir-411-BamHI-rev	<u>GGA TCC</u> GGA GAT TAT GTC ATT TCC CAT CAT GCA	57° C		

D Oligonukleotide zur Herstellung der miRNA-Target-Plasmide-I

Primer	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
134-ptgt-BglII_F	<u>GATCT</u> CCCCCTGGTCAACCAGTCACAA	Primerpaar hybridisiert zur Insertion einer perfekten mir-134-Bindestelle im Luciferase-Gen
134-ptgt-BglII_R	<u>GATCT</u> TGTGACTGGTTGACCAGAGGGGA	
mir323-3p-tgt-F	<u>AGCT</u> AGAGGTCGACCGTGAATGTGA	Primerpaar hybridisiert zur Insertion einer perfekten mir-323-3p-Bindestelle im Luciferase-Gen
mir323-3p-tgt-R	<u>GATCT</u> CACATTACACGGTCGACCTCT	
323-5p-ptgt_F	<u>AGCT</u> GCGAACGCGCCACGGACCACTA	Insertion einer perfekten mir-323-5p-Bindestelle im Luciferase-Gen
323-5p-ptgt_R	<u>GATCT</u> AGGTGGTCCGTGGCGCTTCGCA	
mir409-p-tgt-F	<u>AGCT</u> AAGGGGTTCAACCAGCAACATTCA	Primerpaar hybridisiert zur Insertion einer perfekten mir-409-Bindestelle im Luciferase-Gen
mir409-p-tgt-R	<u>GATCT</u> GAATGTTGCTCGGTGAACCCCTT	
mir411-p-tgt-F	<u>AGCT</u> IACTGAGGGTTAGTGGACCGTGT A	Primerpaar hybridisiert zur Insertion einer perfekten mir-411-Bindestelle im Luciferase-Gen
mir411-p-tgt-R	<u>GATCT</u> AACACGGTCCACTAACCCCTCAGT A	
col1a1-ex50-Hind-F	<u>AGC TTG</u> C GAA GGC AAC AGT CGC TTC ACC TAC A	Primerpaar hybridisiert zur Insertion der put. mir-154-Binde-stelle des <i>Col1a1</i> -Gens ins Luc-Gen
col1a1-ex50-Bgl-R	<u>GAT CTG</u> TAG GTG AAG CGA CTG TTG CCT TCG CA	
col1a2-ex51-Hind-F	<u>AGC TT</u> GAG GGC AAC AGC AGG TTC ACC TAC TA	Primerpaar hybridisiert zur Insertion der put. mir-154-Binde-stelle des <i>Col1a2</i> -Gens ins Luc-Gen
col1a2-ex51-Bgl-R	<u>GAT CTAG</u> TAG GTG AAC CTG CTG TTG CCC TC A	
p68-tgt-Hind-F	<u>AGC TTC</u> A ATA AAT GAA GGC AAT GCA TGG CCT CC	Primerpaar hybridisiert zur Insertion der put. mir-154-Binde-stelle des <i>P68</i> -Gens ins Luc-Gen
p68-tgt-Bgl-R	<u>GAT CTGG</u> AGG CCA TGC ATT GCC TTC ATT TAT TG	
Calm3-tgt-Hind-F	<u>AGCT</u> ITGGGGATGGTCGCTGTGTAATGTGCCGGTG	Primerpaar hybridisiert zur Insertion der put. mir-323-Binde-stelle des <i>Calm3</i> -Gens ins Luc-Gen
Calm3-tgt-Bgl-R	<u>GATCT</u> CACCGCACATTACACAGCACCATCCCCCA	
Actb-tgt-Hind-F	<u>AGCT</u> ITGAGGGGTTGAGGTGTTGAGGCAGCCAGGGCTGGCTGA	Primerpaar hybridisiert zur Insertion der put. mir-154-Binde-stelle des <i>Actb</i> -Gens ins Luc-Gen
Actb-tgt-Bgl-R	<u>GATCT</u> CAGGCCAGCCCTGGCTGCCTCAACACCTAACCCCTCC A	

E Oligonukleotide zur Herstellung der miRNA-Target-Plasmide II

Primer	Sequenz (5'-3')	T _M	PCR-Produkt	Beschreibung
mus-Scn5a-Bgl-F	<u>AGATCT</u> GTG TCG GCC ACG GTC ATC CA	58° C	391 nt	Amplifikation der <i>Scn5a</i> -3'UTR
mus-Scn5a-R	CAG GAT ACA ACA GGG CAC GTC	56° C		
mus-pcdh1_F	TG TCT TAC CCG CCA TGA TCG A	54° C	519 nt	Amplifikation der murinen <i>Pcdh1</i> -3'UTR
mus-pcdh1_Bgl_R	<u>AGATCT</u> AGG CCA CAT GAA TAG GGC TG	55° C		
5031439G07Rik-Bgl-F	<u>AGATCT</u> AGG CTC ATT ACC CCC CAA	54° C	666 nt	Amplifikation der murinen 5031439G07Rik-3'UTR
5031439G07Rik-Bgl-R	<u>AGAGATCT</u> GGT TTG GAG GTG CGT GTC AGT A	57° C		
mus-Sos2-Bgl-F	<u>AGATCT</u> AAC CCT CTG ACC GTC TTC TAG	54° C	731 nt	Amplifikation der <i>Sos2</i> -3'UTR
mus-Sos2-Bgl-R	<u>AGATCT</u> GGC CAC AGA CCA GTA GAT AAA C	55° C		
Ube3a_3'UTR-Hind-F	<u>AAGCIT</u> TGTGTCCTGTATCTGTAG GACTAG	56° C	970 nt	Amplifikation der <i>Ube3a</i> -3'UTR
Ube3a_3'UTR-Hind-R	<u>AAGCIT</u> AAC TTT ATT TGT AAC AGC CCC ACT GTC	57° C		
P2rx7-Bgl-F	<u>AGATCT</u> TTGGGGTCTC GCCTCGGGAT	61° C	547 nt	Amplifikation der murinen P2rx7-3'UTR
P2rx7-BglR	<u>AGATCT</u> TTAATCCCAGCACTCGGGAG	61° C		
Arhgap27-Bgl-F	<u>AGATCT</u> TCC.TGA GAA CTT TTC CGA TGC	52° C	724 nt	Amplifikation der murinen Arhgap27-3'UTR
Arhgap27-Bgl-R	<u>AGATCT</u> AAG CTC CAG AAC GCA TGC GTA	52° C		
Limk1-3'UTR-Hind-F	<u>AGATCT</u> GCT CAG CGG GCC CCA CCA TCT GTA T	64° C	1114 nt	Amplifikation der murinen Limk1-3'UTR
Limk1-3'UTR-Bgl-R	<u>AGATCT</u> CCT GTC ATG ATC ACT GGG CCG AGG C	64° C		
Dlk1-3'UTR-Bgl-F	<u>AGA TCT</u> ACA TGA CCA CTT TCA ACA AGG AG	53° C	352 nt	Amplifikation der murinen Dlk1-3'UTR
Dlk1-3'UTR-Bgl-R	<u>AGATCT</u> GAT ACT TGA TAA GAG TTT AGA ATA ACA TAC	53° C		
Ddx5-3'UTR-FII (P68)	<u>AGATCT</u> CAT GGG AAA TGC AGA AAT GAC TGC AGT	60° C	1384 nt	Amplifikation der murinen P68-3'UTR
Ddx5-3'UTR-R-II (P68)	<u>AGATCT</u> GAC AAC CAC AGG CTG GAC ACA ACA CA	60° C		
Calm3-3UTR-Bgl-F	<u>AGATCT</u> CTT CAA CAC TCC CCT GCG TAC CCG GT	64° C	1354 nt	Amplifikation der murinen Calm3-3'UTR
Calm3-3UTR-Bgl-R	<u>AGATCT</u> CAC AGC CTC ACG CCT ACC TGC CCT T	64° C		
Aytl2-3'UTR-Bgl-FII	<u>AGATCT</u> AATGGAA GGTTCCGGAG GGATGAGGC	63° C	1854 nt	Amplifikation der murinen Aytl2-3'UTR
Aytl2-3'UTR-Bgl-RII	<u>AGATCT</u> CCA CTG AAA ACC TGA AGC CCG CAC C	63° C		

F RT-PCR-Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5'-3')	T _M	Primer	Sequenz (5'-3')	T _M
b-actin for	GCT GTG CTA TGT TGC TCT AGA CTT C	60° C	IG_DMR_RT_F1	GAC CTG GTG TCT CAT GGC AC	59° C
b-actin rev	CTC AGT AAC AGT CCG CCT AGA AGC	60° C	IG_DMR_RT_R1	CAG CCT GGG TCC ACA GCA	59° C
Dlk1_RT_For	C CTTGGCTGTG TCAATGGAGT C	59° C	mus_IGDMR_RT_F2	AGTTGT GCTGAGGTGG TTCCC	54° C
Dlk1_RT_Rev	GCAGGAGCATTCTACTGGCCT	57° C	mus_IGDMR_RT_R2	GCC GTG AAG CAC CAG GTC AA	55° C
Gtl2_RT_For	TCTCGCAGAC TCCTGCAGCC	56° C	IGDMR-RT3_F	TGCATGCACCTACAACACCG	54° C
Gtl2_RT_Rev	AACTGGGAGA GCCCGACTC	56° C	IGDMR-RT3_R	AGGATCCAGAGTTTCTCG	54° C
Mirg_RT_F	CTG CGG TCA ACA CTG GGT ACT T	60° C	IG-DMR-T4_F	ATCACCAATGCACAAGGGC	53° C
Mirg_RT_R	CTT CAG GTC AGG GCT CAG GAC T	60° C	IG-DMR-RT4_R	CTCAATGAATGCCCTCTGG	55° C
IGDMRTR1_F	CTA GTA CAC AGG CTG ACC ATG	59° C	IG-DMR-RT5_F	TCTTCTGCATAAAGCTCGGG	54° C
IGDMRTR1_R	TCC CTC ACT CCA GGA GTT AAG	60° C	IG-DMR-RT5_R	AGACAAGGAGGGTCTTTAGG	53° C
IGDMRTR2_F	CCT TCA CTA GGG AAC AGG ATG	60° C	IG-DMR-RT6_F	TACTGATGCTCTAGTGGC	55° C
IGDMRTR2_R	CCT TGA ATT TGT GCC TCA AAG C	58° C	IG-DMR-RT6_R	AAGCTAAGAGGCTTCTCC	53° C
mico1_RT1_F	CCT GTT TAG GCA GAC CTG AG	54° C	mmuRunX2_201_RT-F	ACT ATG GCG TCA AAC AGC CTC T	62° C
mico1_RT1_R	GGC TTA GGA TGA CAT GGG AC	55° C	mmuRunX2_201_RT-R	AGG GCC CAG TTC TGA AGC AC	63° C
mmuRunX1-RT-F	CACCGCTTTACAAATCCGC	58° C	mmuRunX2_205_RT-F	CCA CAT GAT TCT GTC TCT CCA G	62° C
mmuRunX1-RT-R	AGTCGACTGGAAAGTTCTGC	58° C	mmuRunX2_205_RT-R	GGA ACT GAT AGG ATG CTG ACG	61° C
hsa-RUNX1-RT-F	GCGTATTGCAATTTGGGTGG	58° C	mmuRunX3_001_RT_F	CAA CAG CAT CTT TGA CTC CTT C	60° C
hsa-RUNX1-RT-R	TTCTGATCCTTGGAGTGACC	58° C	mmuRunX3_002_RT_F	CTG CAA CAA GAC GCT GCC G	62° C
hsaRunX2_003_RT_F	GTA GCC CTC GGA GAG GTA C	62° C	mmuRunX3_RT_R	GGG TTC AGG TCT GAG GAG C	60° C
hsaRunX2_003_RT_R	G GTA ATC TGA CTC TGT CCT TGT G	60° C	hsaRunX3_002_RT_for	ATG GCA TCG AAC AGC ATC TTC G	62° C
			hsaRunX3_002_RT_rev	TCC GTC CAC GGT CAC CTT G	62° C

G Plasmidspezifische Primer (Kolonie-PCR/Sequenzierung)

Primer	Sequenz (5'-3')	T _M	Beschreibung
pGEM-T-for	GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG	65° C	Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung vom pGEM-T-Plasmid (Pro-Pos.)
pGEM-T-rev	CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CG	65° C	
pGL3-For	TACTA ACATACGCTC TCCATCAAAA C	58° C	Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung von pGL3-Plasmiden (Pro-Pos.)
pGL3-Rev	AGAGC AACTGCATAA GGCTATGA	57° C	
pGL3-Sall For	GCGGAAAGAT CGCCGTGTA TTCT	60° C	Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung von pGL3-Plasmiden (Enh.-Pos.)
pGL3-Sall Rev	GACTATCGTC GCCGCACTTA TGA	59° C	
pSG5-seq-for	CCTACAGCTCTGGGCAACGTG	57° C	Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung vom pSG5-Plasmiden
pSG5-seq-rev	GCGGAAGAGTCTAGAGTCACCA	59° C	
pSG5-Luc-seq1-for	TCCCGCCCGCTGTTGTTTGGT	58° C	Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung des 3'Bereiches des Luciferase-Gens
3'-BgIII-HindIII-Luc	GGA AGA TCT AAG CTT TTA CAA TTT GGA CTT TCC G	62° C	
pcDNA3.1(-)for	GAA CCC ACT GCT TAC TGG CTT ATC G	58° C	Kolonie-PCR bzw. Sequenzierung vom pcDNA3.1-Plasmid
pcDNA3.1(-)rev	TGG GAG TGG CAC CTT CCA GGG T	60° C	

H Sonstige Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	T _M	Beschreibung
IG_DMR_SNuPE3b	G CTA CAA GTC AA	50° C	Für die allelspez. SIRPH-Analysen
IG_DMR_up_strand_R1	CTA GTC GAT CGT GAA CTG	50° C	Strang-spezifische Reverse Transkription
IG_DMR_low_strand_R1	CAAGG TATACTCTGG TATA	50° C	
IG_DMR_InterR_F	CAA TAT AAA CTA GTG CTT TGA GGC	56° C	Genotypisierung der IG-DMR in B6, PWK und MoINC12-Mäusen
IG_DMR_InterR_R	CAT GGT CAG CCT GTG TAC TAG	55° C	
Mycoplasma-F	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG	56° C	Test eukaryotischer Zelllinien auf Mycoplasmen-Kontamination
Mycoplasma-R	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G	56° C	

2.1.9 Eukaryotische Zelllinien

HEK-293T

Bei den adhärent wachsenden HEK-293T-Zellen (**H**uman **E**mbrionic **K**idney) handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie. Durch Einbringen des großen T-Antigens aus dem Simian virus 40 (SV40) in HEK-293 Zellen konnte stabileres Zellwachstum sowie erhöhte Adhärenz erreicht werden. Die HEK-293T-Linie lässt sich mit hoher Effizienz Transfizieren und eignet sich damit gut für Reporter-Assays. Sie wurde von der Abteilung Virologie, AG Müller-Lantzsch der Universitätsklinik Homburg zur Verfügung gestellt.

P19

Die ursprünglichen Zellen der P19-Zelllinie wurden aus einem Teratokarzinom eines C3H/He-Mausembryos isoliert. Die adhärent wachsenden P19-Zellen können durch Zugabe von Retinsäure zu Neuronalen- und Glia- Zellen und bei Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) zu Herz- und Skelett- Muskelzellen differenziert werden. Die P19-Linie wurde von der Abteilung

Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, AG Thiel der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

C2C12

Die C2C12-Zelllinie ist eine embryonale Myoblastenzelllinie der Maus. Die Zellen sind durch Serumschock zu kontraktile Muskelzellen differenzierbar. Die C2C12-Zellen wurden vom Max Delbrück Zentrum für molekulare Medizin, Abteilung Molekular- und Zellbiologie des (Epi)Genoms, Arbeitsgruppe Christina Cardoso, Berlin-Buch zur Verfügung gestellt.

3T3-NIH

Die 3T3-NIH-Zelllinie ist eine embryonale Fibroblastenzelllinie generiert aus NIH/Swiss Mäusen. Sie wurde von der Abteilung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, AG Thiel der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

3T3-L1

Die 3T3-L1- Zelllinie ist eine murine prä-Adipoblastenlinie. Zellen dieser Linie sind effizient zu Fettzellen differenzierbar. Die benutzte Stammkultur wurde von der Abteilung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, AG Stahl der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

Die zur Kultivierung, Transfektion bzw. zum Einfrieren der Zelllinien benutzten Medien sowie deren Zusammensetzung sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Zur Kultivierung, Transfektion bzw. zum Einfrieren eukaryotischer Zelllinien verwendete Medien.

Zelllinie	HEK-293T 3T3-NIH 3T3-L1	C2C12	P19
Kultivierungs- medium	DMEM 89% FCS 10% Pen/Strep 1%	DMEM 79% FCS 20% Pen/Strep 1%	Alpha-MEM 89% FCS 10% Pen/Strep 1%
Transfektions- medium	DMEM 90% FCS 10%	DMEM 80% FCS 20%	Alpha-MEM 90% FCS 10%
Gefrier- medium	DMEM 80% FCS 10% DMSO 10%	DMEM 70% FCS 20% DMSO 10%	Alpha-MEM 80% FCS 10% DMSO 10%

2.1.10 Bakterienstämme

Zur Herstellung chemokompetenter Zellen wurden Tetracyclin-Resistente *Escherichia coli* Top10F'-Zellen benutzt (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland). Sie besitzen folgenden Genotyp:

F' {*lacI*^q, TN10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

2.1.11 Mäuse

Versuche an Mäusen wurden mit dem Inzuchtstamm der Hausmaus (*Mus musculus domesticus*; C57BL/6 (B6)) aus der Zuchtanstalt Elevage Janvier, LeGenest St. Isle durchgeführt.

Alternativ kam der in der eigenen Arbeitsgruppe generierte Stamm MoINC12 zum Einsatz. Die MoINC12 Mäuse wurden durch Rückkreuzung von *M.m. domesticus* x *M.m. molossinus* mit *M.m. domesticus* über 6 Generationen hinweg generiert. Durch Genotypisierung jeder Generation mit den Gen-Markern D12Mit259 und D12Mit8 behielt die Region zwischen diesen Genmarkern den reinen *M.m. molossinus* SNP-Charakter bei, während genomweit ein gemischter C57BL/6, NMRI und *M. m. molossinus* Hintergrund vorliegt.

allelspezifische Expressionsanalysen wurden mir F1-Kreuzungen der beiden Stämme durchgeführt (B6xMoINC12 bzw. MoINC12xB6). Es wurden verschiedene Gewebe der Entwicklungsstadien 9.5 dpc, 10.5 dpc, 12.5 dpc, 16.5 dpc, neonatal (Tag 1) und adult präpariert. Präparation von 2-Zell-Embryos erfolgte durch Dr. Konstantin Lepikhov.

2.1.12 Instrumente und Maschinen

Zentrifugen	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland Sorvall (RC5B), Langenselbold, Deutschland Eppendorf MiniSpin, Eppendorf, Deutschland
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Gel-Dokumentations-System	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Photometer	BioMate, Thermo Scientific, Waltham, USA
Luminometer	Lumat LB 9507, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland

CO ₂ -Inkubator	MCO-20AIC, Sanyo, Bensenville, USA
Zellkultur-Sterilbank	Antair BSK, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	TS 100, Nikon, Irland
Waagen	Sartoris, Bradford, USA
PCR-Maschinen	Eppendorf Master Gradient, Eppendorf, Deutschland PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Sequenzierer	CEQ™ 8000, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Semidry-Elektroblotter	Trans-Blot®SD, Bio-Rad, Hercules, USA
UV-Crosslinker	UV-Stratalink, Stratagene, La Jolla, USA
Rotationshybridisierungsöfen	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation, Analyse und Modifikation von DNA

2.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA von Geweben bzw. Zellkulturmaterial wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI) isoliert. Zellmaterial wird in gleichen Teilen Lösung A und Lösung B resuspendiert, 20 µg/ml Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz bei 55° C im Heizblock geschüttelt, bis alle Zellen aufgelöst sind (mindestens drei Stunden). Anschließend wird je ein halbes Ansatzvolumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazu pipettiert. Nach 15 Minuten Durchmischen auf einem Überkopffrotator und 15 minütiger Zentrifugation bei RT und 13.000 rpm wird die oberste Phase in ein neues Gefäß überführt. Dies wurde erneut mit den gleichen Mengen Phenol bzw. Chloroform - Isoamylalkohol (24:1) versetzt, durchmischt, zentrifugiert und die oberste Phase wieder in ein frisches Gefäß pipettiert. Nun wird ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben, wiederum durchmischt, zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß gefüllt. Der wässrigen Phase werden 2,5 Volumen Ethanol absolut (eiskalt) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) zur Fällung der DNA zugegeben. Die Probe wird über Nacht bei -20° C inkubiert. Am nächsten Tag wird der ausgefallene DNA-Faden mit einem sterilen Glashaken „geangelt“, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das getrocknete DNA-Pellet wird in 0,5x TE gelöst.

2.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen

Plasmidpräparationen wurden entweder mit dem Qiagen Plasmid Midi-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder dem GenElute-Miniprep-Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gemäß den Hersteller-Protokollen durchgeführt.

2.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmungen

Der DNA-Gehalt einer Probe wurde stets photometrisch ermittelt. Unter Verwendung eines Biomate 3 Spektrometers der Firma Thermo Scientific werden die Extinktion der Proben bei 260 nm und 280 nm gemessen. Da eine OD von 1 bei dieser Wellenlänge einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entsprechen, lässt sich über den ermittelten Wert der DNA-Gehalt der Probe errechnen. Da Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen werden, gibt der Quotient OD 260 nm / OD 280 nm den Reinheitsgrad der DNA an. Die Werte reiner DNA liegen zwischen 1,8 und 2,0. Alle Messungen wurden in Quarzküvetten der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Plasmid-Präparationen zum Zwecke der Transfektion in Zelllinien wurden nur bei einem OD 260 nm / OD 280 nm Ratio $\geq 1,7$ verwendet.

2.2.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Größen-Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Dabei wandert die negativ geladene DNA nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Als Trägermatrix dienen Agarosegele, wobei die Agarosekonzentration die Porengröße des Gels bestimmt. Es wurden 1,2%ige Agarosegele (in 0,5x TBE) verwendet und die mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzte DNA darin elektrophoretisch (80 V) aufgetrennt. Das Anfärben der DNA erfolgte in einem Bad mit Ethidiumbromid-Lösung, anschließend wurde ein Foto unter UV-Licht angefertigt.

2.2.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Qiaex II-Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde das Herstellerprotokoll befolgt.

2.2.1.6 Enzymatische DNA-Spaltung

DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen unter Standardbedingungen (37° C) geschnitten. Die Reaktion wurde im vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Im Folgenden ist ein Restriktionsansatz exemplarisch aufgelistet:

Restriktionsansatz:	0,2 – 1 µg	DNA
	5 U	Restriktionsenzym
	2 µl	Restriktionspuffer (10x)
	ad 20 µl	Aqua bidest.

2.2.1.7 Phosphorylierung von DNA

In vitro Phosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Inkubation des Materials mit T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe von 0,5 mM ATP und adäquater Menge an 10x Reaktionspuffer geschaffen; auf das finale Volumen von 20 µl wurde mit Aqua bidest. aufgefüllt. Nach 45 minütiger Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Erhitzung auf 70° C für 15 min abgestoppt.

2.2.1.8 *In vitro* Methylierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung der CpG-Methyltransferase M. SssI methyliert (New England Biolabs, Ipswich, USA); Reaktionen setzten sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz (50 µl):	4 µg	Plasmid-DNA
	8 U	M. SssI (2 U/µl; NEB)
	5 µl	10x Reaktionspuffer; NEB-Puffer 2
	160 µM	SAM (S -Adenosyl- M ethionin; NEB)
	ad 50 µl	Aqua bidest.

Methylierungsreaktionen wurden für 5 Stunden bei 37° C inkubiert, nach 3 Stunden wurden weitere 160 µM SAM zugegeben. Anschließend wurde die methylierte Plasmid-DNA via QiaexII™ oder Sureclean™ aufgereinigt

2.2.1.9 Hybridisierung von DNA-Oligomeren

Um Oligonukleotide zu Hybridisieren wurden sie zu gleichen Teilen gemischt (jeweils 9 µl einer 10 µmolaren Lösung) und 2 µl 10x Restriktionspuffer der Firma MBI Fermentas

hinzugefügt. Dann wurde für 10 Minuten auf 96° C erhitzt und anschließend durch ausschalten des Heizblockes langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.1.10 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Erhöhung der Ligationseffizienz wurde Vektor-DNA dephosphoryliert. Pro Mikrogramm Plasmid-DNA wurden fünf Units Calf-Intestine-Phosphatase (CIP) der Firma Boehringer oder alternativ 1 Unit Shrimp-Alcaline-Phosphatase (SAP) eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl CIP- bzw. SAP-Puffer (10x) und Auffüllen des Ansatzes auf 20 µl mit Aqua bidest. wurde bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Letztlich wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 65° C (10 min) abgestoppt.

2.2.1.11 Auffüllen von DNA-Einzelstrang-Überhängen (Klenow-Behandlung)

Um an DNA-Fragmenten glatte Enden zu erzeugen, wurde eine Auffüll-Reaktion mit Klenow-Fragment DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) durchgeführt:

Reaktionsansatz (20 µl):	10 µl	DNA
	7 µl	dNTPs (2,5 mM jeweils)
	2 µl	10x NEB-Reaktionspuffer 3
	1 µl	Klenow Fragment (1 Unit/µl)

Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch 15 minütige Erhitzung auf 70° C abgestoppt.

2.2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligations-Ansätze wurden zwei Stunden bei 21° C inkubiert, eine Reaktion setzte sich folgender Maßen zusammen:

Reaktionsansatz (10 µl):	50 ng	Vektor DNA
	50 ng	Insert
	5 µl	2x Ligationspuffer (Promega)
	1 µl	T4-DNA-Ligase (3 U/µl, Promega)
	ad 10 µl	Aqua bidest.

2.2.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“) handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren, mit dem eine bestimmte Nukleotid-Sequenz definierter Länge und Sequenz vervielfältigt („amplifiziert“) werden kann.

PCRs zur Amplifizierung von gDNA zur Klonierung der Reporter-Plasmide

Um den Einbau falscher Basen während der Amplifikation von genomischer DNA zu minimieren, wurde stets ein Enzym mit Fehlerkorrektur verwendet (*Pfu*-DNA-Polymerase). Die **T_m**-Angabe im PCR-Programm bezieht sich auf die individuelle Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide, welche Tab. 2.3 zu entnehmen sind. Die Länge **X** des Elongationsschrittes wurde entsprechend der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes gewählt; dabei wurde eine Prozessivität der DNA-Polymerase von min. 1 kb/min veranschlagt. Die Zyklen-Zahl **Y** bei diversen RT-PCRs ist in Tab. 2.7 angegeben.

Tabelle 2.5: Standard-Parameter der PCRs zur Amplifizierung von gDNA:

PCR-Reaktionsansatz (30µl)		PCR-Programm		
Zutat	Volumen	Zeit	Temperatur	
10x PCR-Puffer (20 mM MgCl ₂)	3 µl	Deckeltemp.	105° C	
d’NTPs (2,5 mM jeweils)	3 µl	5 min	95° C	
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,3 µl	1 min	95° C	35 Zyklen
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,3 µl	1 min	T _m	
Betain (5 M)	6 µl	X min	72° C	
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,4 µl	10 min	72° C	
gDNA (50 ng/µl)	0,5 µl	∞	4° C	
Aqua bidest.	ad 30 µl			

Tabelle 2.6: Parameter der durchgeführten RT-PCRs zur Amplifizierung von cDNA:

RT-PCR-Reaktionsansatz (25µl)		PCR-Programm		
Zutat	Volumen	Zeit	Temperatur	
10x PCR-Puffer (20 mM MgCl ₂)	2,5 µl	Deckeltemp.	105° C	
d’NTPs (2,5 mM jeweils)	2,5 µl	5 min	95° C	
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,25 µl	30 sec	95° C	Y Zyklen
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,25 µl	30 sec	T _m	
Betain (5 M)	5 µl	X min	72° C	
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	5 min	72° C	
RT-Ansatz	2 µl	∞	4° C	
Aqua bidest.	ad 25 µl			

Tabelle 2.7: Zyklenzahl Y in den verschiedenen RT-PCRs.

Amplifizierter Bereich	Zykluszahl Y	Amplifizierter Bereich	Zykluszahl Y
<i>β-Actin</i>	30	<i>Mirg</i>	35
<i>Dlk1</i>	35	IG-DMR-RT1-6	35
<i>Gtl2</i>	35	<i>mico1</i>	35
IG-DMR-TR1, IG-DMR-TR2	35	<i>Runx1, Runx2, Runx3</i>	30

Kolonie-PCRs

Der PCR-Ansatz wird mittels eines sterilen Zahnstochers mit Einzelkoloniematerial inokuliert.

Zusammensetzung einer Reaktion (30 µl):

Tabelle 2.8: Parameter der durchgeführten Kolonie-PCRs:

PCR-Reaktionsansatz (30µl)		PCR-Programm		
Zutat	Volumen	Zeit	Temperatur	
10x PCR-Puffer (20 mM MgCl ₂)	3 µl	Deckeltemp.	105° C	
d’NTPs (2,5 mM jeweils)	3 µl	5 min	95° C	
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,3 µl	30 sec	95° C	30 Zyklen
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,3 µl	30 sec	T _m	
<i>Pfu-/Taq</i> -Polymerase-Mix (1:10)	0,4 µl	X min	72° C	
Aqua bidest.	ad 30 µl	5 min	72° C	
		∞	4° C	

2.2.1.14 SNUPE-Analysen (Single Nucleotide Primer Extension)

SNUPE-Assays (Hoogendoorn et al. 1999) wurden zur Detektion allelspezifischer Genexpression genutzt. Die SNUPE-Reaktionen (20 µl) wurden folgendermaßen pipettiert:

Tabelle 2.9: Parameter der SNUPE-Ansätze:

SNUPE-Reaktionsansatz (20µl)		SNUPE-Programm		
Zutat	Volumen	Zeit	Temperatur	
10x Puffer (Thermo-Sequenase; Amersham)	2 µl	Deckeltemp.	105° C	
PCR-Produkt (aufgereinigt)	3 µl	2 min	96° C	
IG_DMR_SNUPE3b-Primer (20 µM)	2,4 µl	30 sec	96° C	50 Zyklen
ddCTP (50 µM)	1 µl	30 sec	50° C	
ddGTP (50 µM)	1 µl	2 min	60° C	
Thermo-Sequenase (= 0,15 U; Amersham)	0,5 µl	5 min	60° C	
Aqua bidest	ad 20 µl	∞	4° C	

Die SNUPE-Produkte wurden anschließend auf die HPLC-Säule geladen und bei einer Flussrate von 0,9 ml/min mit folgendem Acetonitril-Gradienten (=0,1 M TEAA + 25% Acetonitril) und einer Ofentemperatur von 50° C eluiert:

Tabelle 2.10: SNUPE-Gradienten zur Auftrennung des C/G-Polymorphismus mit dem SNUPE-IG-DMR-3b-Primer. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit der WAVEMAKER Vers. 4.1 Software.

Ablauf	Zeit	Puffer A	Puffer B	Puffer C
Start des Gradienten	0.1 min	84%	16%	0%
Stopp des Gradienten	10.1 min	75%	25%	0%
Start der Säulenreinigung	10.2 min	0%	100%	0%
Stopp der Säulenreinigung	11.2 min	0%	100%	0%
Start der Equilibrierung	11.3 min	86%	14%	0%
Stopp der Equilibrierung	12.3 min	86%	14%	0%

2.2.1.15 PEG-Präzipitation von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte auszufällen, wurde die Polyethylenglykol-(PEG)-Fällung angewandt. Die PEG-Lösung besteht aus einem 1:1 Gemisch von PEG 8000 (Fluka, Buchs, Deutschland) und Natriumchlorid (5 M). Einem PCR-Ansatz von 25 µl werden 25 µl PEG-Lösung zugegeben und das Gemisch für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Daran an schließt sich eine zwei Stunden Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation (13.000 rpm für 30 min bei 4° C) wurde das entstandene Pellet mit 150 µl Ethanol (70%) gewaschen und nochmals für zehn Minuten bei gleicher Frequenz zentrifugiert. Nach Wiederholung der Wasch- und Zentrifugationsschritte wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl Aqua bidest. gelöst.

2.2.1.16 DNA-Sequenzierung

Sequenzier-Reaktionen mit Plasmid-DNA wurden nach Tab. 2.11 angesetzt. Nach der Sequenzier-Reaktion wurde zu jeder Probe 5 µl Fällungsmix pipettiert und anschließend 60 µl eiskaltes Ethanol (100%) hinzugegeben. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 4° C und 11000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 175 µl Ethanol (70%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 4° C und 11000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet lichtgeschützt luftgetrocknet. Das Laden des Kapillar-Sequenzers CEQ™ 8000 (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) erfolgte durch Christina LoPorto.

Tabelle 2.11: Parameter der Sequenzier-Reaktion und der darauf folgenden Fällung.

DNA-Sequenzierungs-Ansatz (20µl)		Sequenzier-Programm			Fällungsmix (Sequenzier-Reaktion)	
Zutat	Volumen	Zeit	Temperatur		Zutat	Volumen
Plasmid-DNA	x µl (1µg)	Deckeltemp.	105° C		Na-Acetat (3 M; pH 5,2)	2 µl
Sequenzier-Primer (10µM)	0,5 µl	2 min	95° C		EDTA (0,5 M)	0,4 µl
DCTS-Quickstart-Mix (Beckam-Coulter)	3 µl	30 sec	94° C	50 Zyklen	Glycogen	1 µl
Aqua bidest	ad 20 µl	30 sec	Tm		Aqua bidest.	1,6 µl
		2 min	60° C			
		∞	4° C			

2.2.2 Isolation, Analyse und Modifikation von RNA

Alle beim Arbeiten mit RNA benutzten Lösungen wurden, soweit möglich, mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. angesetzt. Alle Glaswaren wurden vor Nutzung 12 Stunden bei 200° C gebacken. Generell wurden nur puderfreie Handschuhe getragen und Pipettenspitzen mit Filter benutzt.

2.2.2.1 RNA-Isolation

Isolation von Gesamt-RNA wurde nach dem Standardprotokoll von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt:

Pelletierte Zellen werden in 250 µl Lösung D, 25 µl Natriumacetat (2 M; pH 4), 250 µl saures Phenol und 50 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) resuspendiert. Nach 10 Sekunden vortexen wird der Ansatz 20 Minuten zentrifugiert (5000 rpm bei 4° C). Die wässrige Phase wird abgenommen und 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zu ihr hinzugegeben. Dies wird erneut gevortext, zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und zu dieser nun 5 µl Lithiumchlorid (4 M) und 125 µl Ethanol gegeben, um die RNA zu präzipitieren (Inkubation über Nacht bei -20° C). Am nächsten Tag wird bei 4° C mit 12.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert, danach der Überstand entfernt und die RNA mit 35 µl Ethanol (75%) gewaschen. Nachdem erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt worden ist, wird das Pellet luftgetrocknet und in 15 µl H₂O-DEPC gelöst.

Präparationen von Gesamt-RNA zur anschließenden Detektion von miRNAs durch Northern-Blot Hybridisierung wurden mit Trizol™ unter Anwendung des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsmessung

Der RNA-Gehalt einer Probe wurde wie bei DNA-Proben photometrisch bestimmt. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.2.2.3 Northern-Blot Hybridisierung

Die Northern-Blot Hybridisierung zur Detektion von miRNAs wurde als Teil der von mir betreuten Diplomarbeit „Detektion und RNA-Interferenz-Effekte dreier microRNAs der *Dlk1/Gtl2* Imprinting Region nach Transfektion in Säugerzellen“ (2008) von Dipl. Biol. Daniel Jans durchgeführt.

Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte durch ein 15%iges Polyacrylamidgel, das sich wie folgt zusammensetzt:

18,75 ml	40% Acrylamid (RotiphoreseGel 30)
2,5 ml	10x MOPS/NaOH (pH 7)
12,5 ml	H ₂ O-DEPC
21 g	Harnstoff
lösen	
400 µl	10% APS
40 µl	TEMED
kurz rühren, dann Gel sofort gießen	

Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel in die Gelkammer gesetzt und Laufpuffer (1x MOPS/NaOH (pH 7)) zugegeben. Nach Spülen der Taschen und 30 minütiger Vorlaufzeit (10 W; Volt + Amp: max) wurden die RNA-Proben geladen, welche zuvor mit Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 70° C inkubiert wurden. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 30 W für 2,5 h durchgeführt und das Gel in Ethidiumbromidlösung angefärbt.

Blotten von RNA-Gelen

Nach der Färbung des Gels wurde die darin enthaltene RNA mit Hilfe Semidry-Elektroblotters (Trans-BlotTMSD von Bio-Rad, Hercules, USA) auf eine Hybond NX-Membran (Amersham) übertragen (450 mA, 300 V, max. Watt, 1 h).

Nach Blotten der RNA wurde sie per chemischen Crosslinken auf der Membran fixiert (Pall und Hamilton 2008). Dabei wird ein Blatt Whatman Papier mit Crosslinklösung getränkt und die Membran mit RNA-Seite oben aufgelegt. Dies wurde in Frischhaltefolie eingeschweißt und für 2h bei 55° C im Heizofen inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit DEPC-Aqua bidest. gespült, dann luftgetrocknet und letztlich eingeschweißt.

Detektion von miRNAs durch Northern-Blot Hybridisierung

Sonden-Herstellung:

4 µl	5x Transkriptions-Puffer für RNA Polymerase
1 µl	3 NTP Mix (10 mM jeweils)
2,4 µl	100 µM CTP
1,85 Mbq (50 µCi)	[α-32P]-CTP (3000 Ci/mmol, 10 Ci/ml, 250 µCi)
5 µg	linearisierte template DNA
0,5 µl (20 U)	<i>RNase</i> Inhibitor (RNasin)
2 µl (20 U)	T7 RNA-Polymerase
ad 20 µl	H ₂ O-DEPC

Obiger Ansatz wurde bei 37° C für 2 h inkubiert und anschließend 0,3 µl *DNase*I (1 U/µl) zugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Erhitzung für 15 Minuten auf 95° C abgestoppt und anschließend mit 500 µl DEPC-aqua bidest versetzt.

Blocken und Hybridisieren

Die Blottingmembran wurde zunächst mit ca. 60 ml Hybridisierungslösung bei 50° C inkubiert. Die Lösung wurde nach 2 Stunden durch frische ausgetauscht wobei auch die Sonde zugegeben wurde. Der Gesamtansatz wurde über Nacht bei 50° C im Rotator inkubiert.

Waschen

Zunächst wurde die Hybridisierungslösung entfernt, durch 100 ml 50° C warme Waschlösung I ersetzt und für 15 Minuten im Rotator gewaschen. Dies wurde wiederholt und anschließend mit Waschlösung II ebenfalls zweimal für 15 Minuten gewaschen. Nun wurde der Blot in Frischhaltefolie eingewickelt, ein SuperRX X-ray Film (Fuji) aufgelegt und dieser in einer Fotokassette bei -80° C für 72 Stunden exponiert.

Strippen

Um den Blot zu strippen wurde er im Rotator für eine Stunde mit 1%iger SDS-Lösung bei 60° C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Film aufgelegt.

2.2.2.4 DNaseI-Behandlung

Um mögliche Kontamination durch genomische DNA in RNA-Präparationen zu entfernen, wurde eine DNaseI-Behandlung mit folgender Reaktionsansatz (20 µl) durchgeführt:

1-20 µg	Gesamt-RNA
2 µl	10x Reaktionspuffer (MBI Fermentas)
0,5 µl	DNaseI (MBI Fermentas)
ad 20 µl	Aqua bidest

Die Reaktionsansätze wurden 30 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert und das Enzym anschließend durch Erhitzung auf 96° C (15 min) inaktiviert. Schließlich wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion wie oben beschrieben durchgeführt und je nach eingesetzter RNA-Menge zuletzt in einem adäquatem Volumen DEPC-Aqua bidest gelöst.

2.2.2.5 Reverse Transkription (RT)

Um RNA in cDNA umzuschreiben, wurden Reverse Transkriptionen durchgeführt. Unter Verwendung von Reagenzien der Firma Promega (20 µl) wurden sie wie folgt angesetzt:

2 µg	Gesamt-RNA
4 µl	5x Reaktionspuffer
0,2 µl	Random Primer (500 ng/µl)
0,4 µl	RNAsin™ oder RNAsin plus™
6 µl	dNTPs (1,25 mM jeweils)
0,75 µl	M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)
ad 20 µl	Aqua bidest

Vor Zugabe der RNA wurde diese für 10 min bei 70° C inkubiert. Die RT-Reaktion inkubierte für zwei Stunden bei 37° C im Wasserbad und wurde anschließend durch 15 minütiges Erhitzen auf 75° C abgestoppt. Als Kontrolle dienten jeweils ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-Kontrolle, RTC) sowie ein Ansatz aller eingesetzten Reagenzien ohne RNA (Wasserkontrolle, NTC).

Strangspezifische Reverse Transkriptionen wurden mit dem EndoFree RT-Kit der Firma Ambion nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei diesen RT-Ansätzen wurde auf Random-Primer verzichtet und stattdessen der β-Actin-Rev-Primer zusammen mit dem „IG_DMR_up_strand_R1“- bzw. dem „IG_DMR_low_strand_R1“-Primer zugegeben. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Primer pipettiert.

2.2.3 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

2.2.3.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

Chemokompetente Zellen (Top10F', Invitrogen) wurden unter Verwendung des laboreigenen Standardprotokolls nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt:

Eine Vorkultur von Top10-Zellen wurde mit 10 ml Tetracyclin-haltigem LB-Medium angesetzt und über Nacht im 37° C-Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden daraus 2 ml in eine 200 ml Hauptkultur gegeben und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 im Photometer weiter geschüttelt. Nun wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (6000 rpm, 5 min, 4° C) und das Pellet nach Entfernen des Überstandes in 80 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, 4° C) wurde das vom Überstand befreite Pellet in 8 ml eiskaltem Puffer 2 gelöst. Diese Suspension wurde nun in 200 µl Einheiten aliquotiert und bei -80° C oder im flüssigen Stickstoff bis zur Verwendung gelagert.

2.2.3.2 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Zunächst wurden 50-100 µl chemokompetenter Zellen mit 5-10 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 60 Sekunden langer Hitzeschock bei 42° C im Wasserbad und danach ein erneuter Kälteschock, indem direkt 200 µl eiskaltes SOC-Medium auf die Zellen gegeben wurden. Nach einer Stunde Inkubation bei 37° C wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Trockenschrank inkubiert.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle in der vorliegenden Arbeit benutzten Zelllinien wurden in ihrem entsprechenden Kultivierungsmedium (s. Tab. 2.4) unter Standardbedingungen (37° C, 5% CO₂) in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) im CO₂-Inkubator (SANYO) kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 passagiert. Adhärente Zelllinien wurden entweder durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA oder durch vorsichtiges Abschaben vom Flaschenboden gelöst.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) benutzt. Zehn Mikroliter trypsinierter Zellsuspension wurden in die Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen in allen vier Großquadraten der Neubauer-Kammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die Zellzahl konnte nun nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = (n/4) \times 10^4 / \text{ml} \quad (n = \text{Gezählte Zellen})$$

2.2.4.3 Transfektion eukaryotischer Zelllinien

Reporter-Plasmide wurden per transienter Transfektion in Zelllinien eingebracht. Als Transfektionsreagenz diente bei allen Linien Nanofectamin™ (PAA), wobei das Herstellerprotokoll befolgt wurde. Ausnahme war die C2C12-Linie, welche sich mit Nanofectamin™ nur sehr ineffizient transfizieren ließ; hier kam Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) zum Einsatz. Zur Übersicht sind die in den verschiedenen Transfektions-Experimenten eingesetzten Parameter wie transfizierte DNA-Menge, Inkubationsdauer usw. in Tabelle 2.12 (A-D) aufgeführt. Generell wurde bei allen Transfektions-Experimenten nach folgendem Ablauf vorgegangen:

- Tag 0: Ausplattieren der Zellen
- Tag 1: Transfektion der Zellen
- Tag 2-x: Inkubation (Dauer variabel) und Ernten der Zellen

Tabelle 2.12 (A-D): Auflistung der durchgeführten Transfektionen und dabei benutzter Reaktionsvolumina.

A Transfektionen zum Test auf RNAi-Effekte						
Zelllinie	Zellen ausplattiert	Transfektions- Reagenz (TR)	TR-Diluent	DNA- Menge	DNA-Diluent	Inkubations- dauer
HEK-293T	2,5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 290,5 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	72 Stunden

Probe	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3
Kontroll- Transfektion	40 ng RNAi-Reporter- Plasmid	250 ng pSG5	0,5 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)
mir-154- Kotransfektion	40 ng RNAi-Reporter- Plasmid	250 ng mir-154 Expressions-Plasmid	0,5 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)
mir-323- Kotransfektion	40 ng RNAi-Reporter- Plasmid	250 ng mir-323- Expressions-Plasmid	0,5 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)

B Transfektion von miRNA-Expressions-Plasmid zur Northern Blot Hybridisierung

Zelllinie	Zellen ausplattiert	Transfektions- Reagenz (TR)	TR-Diluent	DNA- Menge	DNA-Diluent	Inkubations- dauer
HEK-293T	2x10 ⁶ Zellen pro 10 cm Kulturschale	Lipofectamine 2000™ (50 µl/Transfektion)	Opti-MEM™ (1,5 ml/Transfektion)	24 µg	Opti-MEM™ (1,5 ml/Transfektion)	48 Stunden

Probe	Plasmid
Untransfiziert	-
Kontroll-Transfektion	24 µg pSG5
mir-154-Transfektion	24 µg mir-154 Expressions-Plasmid
mir-323-Transfektion	24 µg mir-323-Expressions-Plasmid

C Transfektionen zum Test auf putative *cis*-Aktivität

Zelllinie	Zellen ausplattiert	Transfektions- Reagenz (TR)	TR-Diluent	DNA- Menge	DNA-Diluent	Inkubations- dauer
HEK-293T	5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 100,5 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	24 Stunden
P19	2,5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 210 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	24 Stunden
C2C12	2,5x10 ⁴ pro 24-well	Lipofectamine 2000™ (1,2 µl/well)	Opti-MEM™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 210 ng	Opti-MEM™ (50 µl/well)	24 Stunden
3T3-NIH	5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 210 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	24 Stunden
3T3-L1	5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 210 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	24 Stunden

Zelllinie	Plasmid 1	Plasmid 2
HEK-293T	100 ng pGL3- Reporter-Plasmid	0,5 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)
P19, C2C12, 3T3-NIH, 3T3-L1	200 ng pGL3- Reporter-Plasmid	10 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)

D Kotransfektion von pGL3-Reportern und Runx1

Zelllinie	Zellen ausplattiert	Transfektions- Reagenz (TR)	TR-Diluent	DNA- Menge	DNA-Diluent	Inkubations- dauer
HEK-293T	5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 300,5 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	48 Stunden
P19	2,5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 410 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	48 Stunden
3T3-NIH	5x10 ⁴ pro 24-well	Nanofectamin™ (1,5 µl/well)	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	Gesamtmenge 410 ng	Nanofectamin- Diluent™ (50 µl/well)	48 Stunden

Zelllinie	Probe	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3
HEK-293T	Kontroll- Transfektion	100 ng pGL3- Reporter-Plasmid	200 ng pcDNA 3.1	0,5 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)
HEK-293T	Runx1- Kotransfektion	100 ng pGL3- Reporter-Plasmid	200 ng Runx1- Expressions-Plasmid	0,5 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)
P19 3T3-NIH	Kontroll- Transfektion	200 ng pGL3- Reporter-Plasmid	200 ng pcDNA 3.1	10 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)
P19 3T3-NIH	Runx1- Kotransfektion	200 ng pGL3- Reporter-Plasmid	200 ng Runx1- Expressions-Plasmid	10 ng pRL-CMV (interne Kontrolle)

2.2.4.4 Dual Luciferase-Assays (DLA)

Herzstück des Assays ist ein eukaryotisches Expressionsplasmid, welches die cDNA des Luciferase-Gens des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) enthält. Nach Transfektion in Säugerzellen wird das Luciferase-Protein in den Zellen gebildet, welches durch Zelllysis und nicht denaturierender Protein-Aufreinigung in seiner aktiven Form gewonnen werden kann. Anschließend kann mit Hilfe des Dual-Luciferase-Assay-Kits (DLA, Promega) die Menge an vorliegendem Protein indirekt bestimmt werden. Dabei wird den Zelllysaten das Substrat (Luciferin) des Luciferase-Proteins im Überschuss zugegeben. Bei der anschließenden Umsetzung des Substrates wird Licht frei, dessen Intensität mit Hilfe eines Luminometers bestimmt werden kann. Die gemessene Lichtintensität ist direkt abhängig von der im Lysat vorhandenen Enzymkonzentration und lässt dadurch Rückschlüsse auf die Aktivität des Expressionsplasmides zu. Wird dem Luciferase-Gen z.B. ein starker Promotor vorgeschaltet, resultiert dies in einer erhöhten Produktion des Luciferase-Proteins in den transfizierten Zellen und somit einer höheren Lichtmessung im Dual-Luciferase-Assay. Auch der Einfluss potentieller *cis*-aktiver Elemente auf die Aktivität eines bekannten Promotors kann durch Integration stromaufwärts des Promotors analysiert werden. Um Transfektionen in verschiedenen Ansätzen miteinander vergleichen zu können ist eine Normalisierung der Transfektionseffizienz unerlässlich. Dazu wird in allen Versuchsproben ein weiteres Expressionsplasmid (pRL-CMV, Promega) in gleicher Menge transfiziert. Dieser Vektor kodiert für ein weiteres Luciferase-Protein (*Renilla*-Luciferase, aus *Renilla reniformis*), welches unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht. Da das *Renilla*-Plasmid in allen Ansätzen identisch ist, kann die gemessene Aktivität der *Renilla*-Luciferase zur internen Normalisierung aller Proben eines Experimentes genutzt werden. Da beide Enzyme unterschiedliche Substrate besitzen, sowie die Tatsache, dass sich die Umsetzungs-Reaktion der *Photinus*-Luciferase in sehr kurzer Zeit chemisch abstoppen lässt, machen den DLA zu einem für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit geeigneten Testsystem.

Durch Bildung des Quotienten aus der gemessenen Aktivitäten der *Photinus*-Luciferase (Experiment-Reporter) und der *Renilla*-Luciferase (Kontroll-Reporter), erhält man die relative Aktivität der *Photinus* Luciferase. In der vorliegenden Arbeit wird dies vereinfacht als relative Luciferase-Aktivität bezeichnet.

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Transfektions-Ansätze zum Zwecke eines DLAs in Triplikaten durchgeführt und 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert (s. Tab. 2.12). Der Dual-Luciferase-Assay wurde stets mit dem „Dual Luciferase Reporter-Assay System“ der Firma Promega durchgeführt. Dazu wurden die transfizierten Zellen zum Erntezeitpunkt mit 100 µl 1x PBS gewaschen und dann mit 100 µl des im Kit enthaltenen „Passive Lysis Buffer“ (PLB) lysiert. Die Lysate wurden 45 Minuten bei RT auf dem Schütteltisch inkubiert und anschließend bei -20° C eingefroren oder direkt dem Dual-Luciferase-Assay zugeführt.

Zum DL-Assay wurden für jeden Transfektions-Ansatz 50 µl LARII („Luciferase-Assay Reagent II“, Promega) in PE-Röhrchen (Sarstedt) vorgelegt, zehn Mikroliter des Zelllysats hinzugegeben und die Messung der *Photinus*-Luciferase-Aktivität im Luminometer gestartet (Zeit: 10 sec, Lumat LB 9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland). Anschließend wurden 50 µl „Stop & Glow“ (Promega) hinzugegeben, durch vortexen gemischt und die *Renilla*-Luciferase-Aktivität bestimmt (Zeit: 10 sec). Das Verhältnis der beiden gemessenen Aktivitäten (*Photinus*-Luciferase / *Renilla*-Luciferase) gibt die relative Aktivität der *Photinus*-Luciferase an. Anschließend wurden die drei gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten der Triplikate gemittelt.

2.2.5 Bioinformatische Arbeiten

Bioinformatische Arbeiten wurden unter Verwendung folgender Datenbanken, Internetprogrammen bzw. Software durchgeführt:

- **NCBI**, National Center for Bioinformatical Information; Gen-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- **UCSC** Genome Browser; Gen-Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/>)
- **Ensembl** Genome Browser; Gen-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>)
- **NCBI BLAST** (Basic local alignment search tool); Sequenzabgleiche/Datenbanksuche (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- **ClustalW** multiple sequence alignment (EMBL-EBI); Sequenzabgleiche (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)
- **MultAlin**; Abgleich von Sequenzen (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>)
- **(Multi-)Pipmaker**; Abgleich von Sequenzen (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>)

- **Fuzznuc**; Identifizierung von Sequenzmustern
(<http://anabench.bcm.umontreal.ca/anabench/Anabench-Jsp/Applications/fuzznuc.jsp?APPLICATIONID=81&APPLICATIONNAME=fuzznuc>)
- **Repeatmasker**; Identifizierung repetitiver Elemente
(<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>)
- **Tandem Repeats Finder**; Identifizierung von Tandem Repeats
Gewählte Alignment-Parameter: (Match, Mismatch, Indels: 2,3,5)
Nur Tandem Repeats mit einem Alignment-Score > 100 wurden in der Analyse berücksichtigt (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.advanced.submit.html>)
- **CpGPlot**; Identifizierung CG-reicher Regionen und von CpG-Inseln
Gewählte Parameter: Window: 100; Step: 1; Obs/Exp: 0,6; MinPC: 50; Length: 100
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>)
- **READSEQ** Sequence Conversion; Umwandlung von Sequenzformaten
(<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>)
- **DNA Sequence Reverse And Complement**; (Revers-) Komplementierung von DNA-Sequenzen
(http://www.cellbiol.com/scripts/complement/reverse_complement_sequence.html)
- **Oligonucleotide Properties Calculator**; Überprüfung von Oligonukleotiden
(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)
- **NEBCutter V2.0**; Ermittlung von Restriktionsschnittstellen
(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)
- **TF-Search**; Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen
Parameter: Threshold Score: 100 (max.); Matrize: Vertebraten
(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)
- **miRBase::Sequences** (Sanger Institute); miRNA-Sequenzen
(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>)
- **miRanda** -Human miRNA Targets-Search & View, April 2005 Version
(<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>)
- **microInspector**; *in silico* Vorhersage von miRNA-Ziel-Sequenzen
(<http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/>)
- **mFold**; *in silico* Faltung von RNA-Molekülen
(<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>)
- **RNAfold**; *in silico* Faltung von RNA-Molekülen
(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)
- **RNAhybrid**; *in silico* Vorhersage von miRNA-Bindestellen
(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)
- **Chromas**; Auswertung eigener Sequenzierungen und Sequenz-Chromatogrammen
(<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)
- **Genesnap V.4**, Biostep, Jahnsdorf, Deutschland; UV-Fotografien von Agarosegelen
- **Microsoft® Office 2002**, **Microsoft® Office 2007**

2.2.6 Berechnungen und Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit Hilfe von Windows Excel™ durchgeführt. Arithmetische Mittel wurden nach folgender Formel ermittelt:

$$(x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n$$

x = Messwert, n = Probenanzahl

Die verschiedenen Proben der DLAs wurden mit den normalisierten Luciferase-Aktivitäten von Kontroll-Transfektionen verglichen (z.B. pGL3Basic, pGL3-SV40-Promotor). Die normalisierten Luciferase-Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt und die Werte experimenteller Proben dazu in Relation gesetzt.

Die Berechnung der Standardabweichungen in den durchgeführten DLAs erfolgte nach folgender Formel:

$$\sqrt{[(n\sum x^2 - (\sum x)^2) / n(n-1)]}$$

x = Messwert, n = Probenanzahl

Um die relative Standardabweichung (Varianzkoeffizient) zu erhalten, wurde die errechnete Standardabweichung mit der relativen *Photinus*-Luciferase-Aktivität der Probe multipliziert.

Zum Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Datensätzen wurde ein unabhängiger ungepaarter t-Test nach Student mit Hilfe der Excel™-Software nach folgenden Parametern durchgeführt:

Matrix 1: (Datenreihe 1); Matrix 2: (Datenreihe 2); Seiten: 1 (Einseitiger Test); Typ: 3 (Zwei Stichproben, ungleiche Varianz)

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Analyse *cis*-agierender Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region

Durch Expressions-, Deletions-, Methylierungs- und *in silico*-Studien sowie CHIP- und 3C-Experimente konnte bereits für eine Reihe von Elementen in der *Dlk1/Gtl2* Region eine Rolle in der Imprinting-Regulation beschrieben werden (s. Einleitung). So resultiert z.B. eine Deletion der IG-DMR oder der Gtl2-DMR in einer Deregulation der Imprints aller Gene der Region. Dabei zeigen sich unterschiedliche Effekte nach maternaler bzw. paternaler Transmission des Knock-outs. Ein weiteres Beispiel ist die polare Überdominanz der Callipyge Mutation in Schafen, die nur einen Phänotyp zeigt, wenn sie auf dem väterlichen Chromosom vorliegt, während das mütterliche Chromosom die Wildtyp-Sequenz aufweist. Nach gegenwärtigem Erkenntnisstand scheint in diesem Fall die Punkt-Mutation eine rudimentäre Bindestelle in ein voll funktionsfähiges Enhancer-Element zu verwandeln (Charlier et al. 2001; Murphy et al. 2006). Dies macht deutlich, dass neben den bereits bekannten Elementen, wie die IG-DMR und Gtl2-DMR, weitere Elemente mit potentiellm Regulations-Potenzial existieren, die mit der IG-DMR oder verschiedenen Promotoren interagieren. Eine Möglichkeit mehr über das regulatorische Potential dieser Elemente zu erfahren, ist eine funktionelle Analyse mittels Reporter-Assays. In der vorliegenden Arbeit wurden daher strukturell auffällige Elemente der IG-DMR sowie anderer Bereiche des *Dlk1/Gtl2*-Clusters in Reporter-Assays auf ihr regulatorisches Potential hin untersucht.

3.1.1 *In silico* Charakterisierung der IG-DMR Tandem Repeats

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war unter anderem eine detaillierte Untersuchung der IG-DMR Tandem Repeats und ihrer putativen Funktionen. Durch bioinformatische Analysen konnte bereits die Existenz zweier großer Tandem Repeats in der murinen IG-DMR nachgewiesen werden (Paulsen et al. 2001). Die vorhandenen *in silico* Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit durch Integration zusätzlicher Sequenzdaten vertieft.

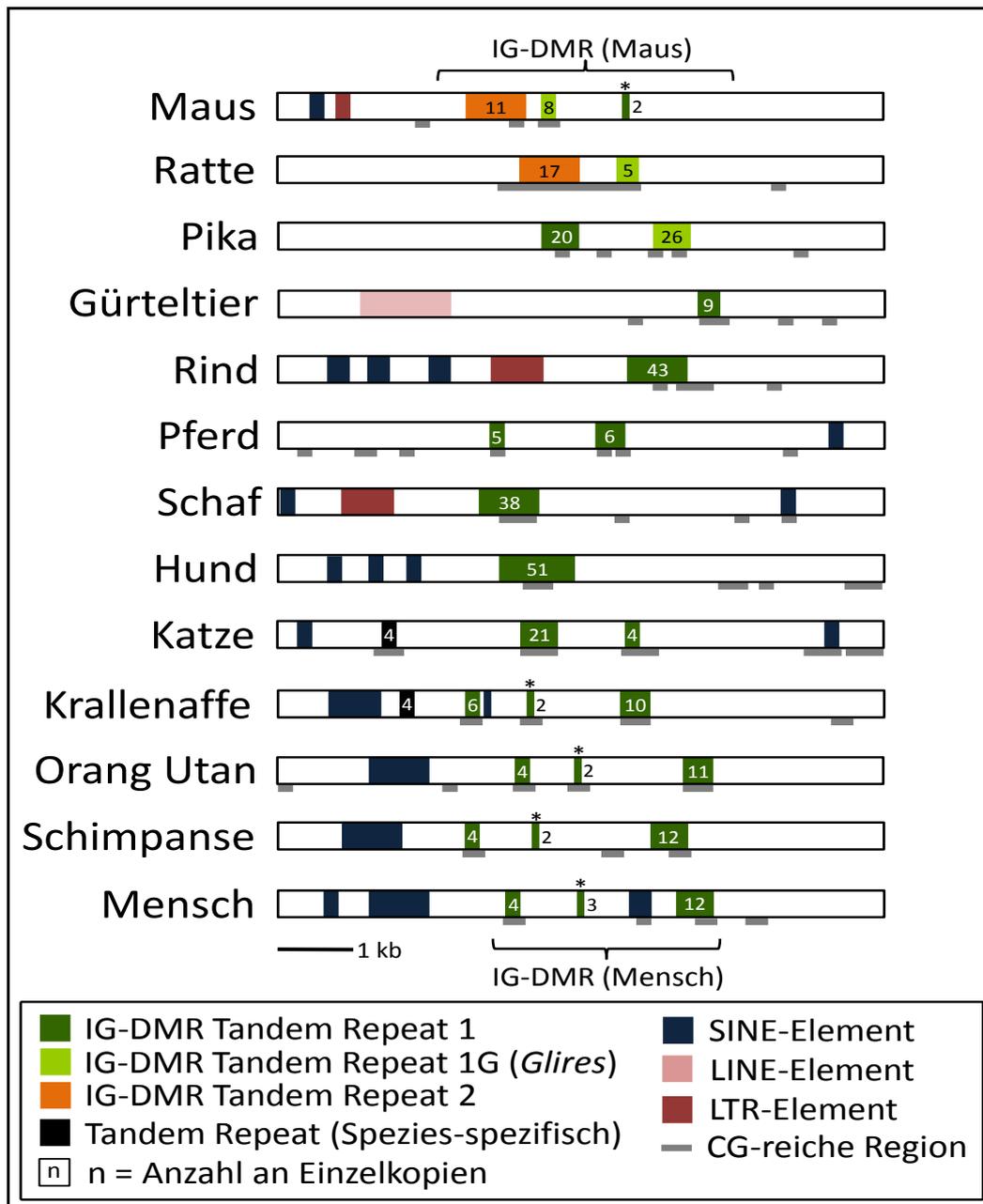


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung repetitiver Elemente im Bereich der IG-DMR verschiedener Säugetier-Spezies. Die verschiedenen repetitiven Elemente sind als Boxen, CG-reiche Regionen als graue Striche dargestellt. SINEs, LINEs und LTR-Elemente wurden durch die Repeatmasker-Software, Tandem Repeats (TR) mit Hilfe des Programms Tandem Repeats Finder (TRF) identifiziert. Nur TRs mit einem TRF-Alignment-Score > 100 sind dargestellt (Ausnahme sind die mit * versehenen Elemente). Zahlen in den Boxen geben die Anzahl an Einzelkopien im TR an. CG-reiche Regionen (grau) wurden durch das Programm „CpG-Plot“ identifiziert. Die Sequenzkoordinaten der analysierten Bereiche sind im Anhang in Tabelle 6.1 aufgelistet.

Dazu wurden 13 verschiedene Säugetier-Spezies im Bereich der (putativen) IG-DMR auf Anwesenheit repetitiver Elemente hin untersucht. Abbildung 3.1 gibt die relative Lage der identifizierten Repeats schematisch wieder (Sequenz-Koordinaten s. Anhang Tab. 6.1).

Anschließend wurden die Konsensus-Sequenzen der verschiedenen identifizierten Tandem Repeats untereinander bzw. zwischen den verschiedenen Spezies verglichen, um den Grad der Konservierung festzustellen (s. Abb. 3.2). Dies wird in den nächsten beiden Abschnitten wieder aufgegriffen.

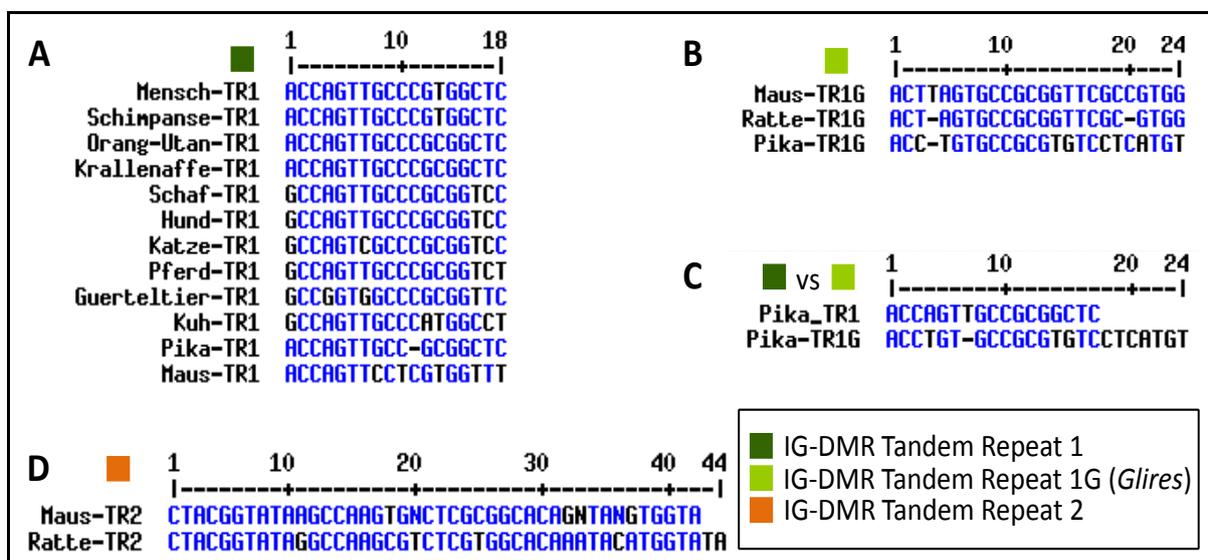


Abbildung 3.2: Abgleiche der IG-DMR TR-Konsensus-Sequenzen. Sequenzabgleiche der IG-DMR-Elemente TR1, TR1G (A-C) bzw. TR2 (D) der untersuchten Spezies mit Hilfe des Programms MultAlin. Übereinstimmende Nucleotide sind blau, Unterschiede schwarz dargestellt.

3.1.1.1 Der IG-DMR Tandem Repeat 2 in Nagetieren

In der Maus besteht der IG-DMR TR2 aus 11 Kopien einer sich tandemartig wiederholenden Konsensus-Sequenz von 42 Nucleotiden. In der Ratte, einem phylogenetisch nahe Verwandten der Maus konnte der TR2 ebenfalls identifiziert werden; Sequenzabgleiche aller Einzelkopien von Maus bzw. Ratte wurden mit Hilfe des Programmes MultAlin erstellt und sind im Anhang in Figur 6.1 abgebildet. Der Vergleich der Konsensus-Sequenzen von Maus und Ratte zeigt deutlich die Ähnlichkeiten der beiden Repeats zueinander (s. Abb. 3.2 D). Die zu Maus und Ratte am nächsten verwandte Spezies, deren Genomsequenz zur Zeit in Internet-Datenbanken verfügbar ist, ist der Pfeifhase (Pika), eine Familie aus der Ordnung der Hasenartigen (*Ochotonidae*). In der Gruppe der Nager (*Glires*) sind die beiden

Ordnungen der Nagetiere (*Rodentia*) und der Hasenartigen (*Lagomorpha*) zusammengefasst. Interessanterweise ergab die *in silico* Analyse, dass der TR2 in dieser Spezies nicht vorhanden ist. Auch in allen anderen untersuchten Spezies konnte der IG-DMR TR2 nicht detektiert werden, er scheint somit ein auf die *Rodentia* beschränktes Element darzustellen.

3.1.1.2 *In silico*-Analyse des IG-DMR Tandem Repeat 1 bzw. 1G

In allen untersuchten Säugetier-Arten konnte der TR1 durch das UCSC-BLAT-Suchprogramm identifiziert werden. Ein Multi-Pipmaker-Abgleich zeigt deutlich, dass die IG-DMR in ihrer Sequenz nicht konserviert ist. Der TR1-Bereich lässt sich noch am besten mit allen Spezies abgleichen, die Konservierung in der IG-DMR ist hier also am höchsten (s. Anhang Abb. 6.2). Als nächstes wurde für jede Spezies individuell eine Konsensus-Sequenz für den TR1 ermittelt, wozu das MultAlin-Programm benutzt wurde. Diese Konsensus-Sequenzen wurden anschließend miteinander verglichen und zeigten hohe Ähnlichkeit zueinander (s. Abb. 3.2 A). Bei allen analysierten Säugetieren (außer Nagetiere) beträgt der Konsensus mit 18 Nukleotiden die gleiche Länge. In den getesteten Primaten ist maximal 1 Nukleotid Unterschied vorhanden, bei ungefähr gleicher Kopien-Anzahl. Auch alle anderen analysierten Säugetiere (ohne Nager) zeigen einen ähnlichen Konsensus, allerdings mit erheblichen Unterschieden in der Repeat-Kopienzahl. Beispielsweise besitzt der TR1 im Pferd nur 5,6 Kopien, im Hund jedoch mehr als 50 (s. Abb. 3.1). In allen Primaten sowie in Katze und Pferd wird der TR durch nicht-repetitive Sequenz-Einschübe unterbrochen.

Die Nager grenzen sich von den anderen Säugern hinsichtlich der Gestalt des TR1 deutlich ab. Auffällig ist zunächst eine verlängerte Konsensus-Sequenz, die bei der Maus 24, bei Ratte 22 und Pika (Pfeifhase) 23 Nukleotide lang ist und sich von der der anderen Säuger stark unterscheidet (s. Abb. 3.2 B). Deshalb wird die nagerspezifische Variante des TR1 im Folgenden als **TR1G** bezeichnet (**G** für *Glires* = Nagetiere). Auch die Anzahl an Einzelkopien schwankt zwischen 4,5 (Ratte) und 26,2 (Pika). Interessanterweise konnte in Pika auch eine den anderen Säugern (nicht-Nager) entsprechende TR1-Variante entdeckt werden. Die nahe Verwandtschaft der beiden TR1-Varianten zeigt ein Sequenzabgleich der Pika TR1 und TR1G-Konsensus-Sequenzen (s. Abb. 3.2 C). Auch in der Maus konnte stromabwärts des TR1G ein kleines TR1-Element identifiziert werden, welches jedoch aus lediglich 2 Einzelkopien besteht. Während also in Pika der TR2 fehlt (in Maus und Ratte präsent), ist in Nagetieren

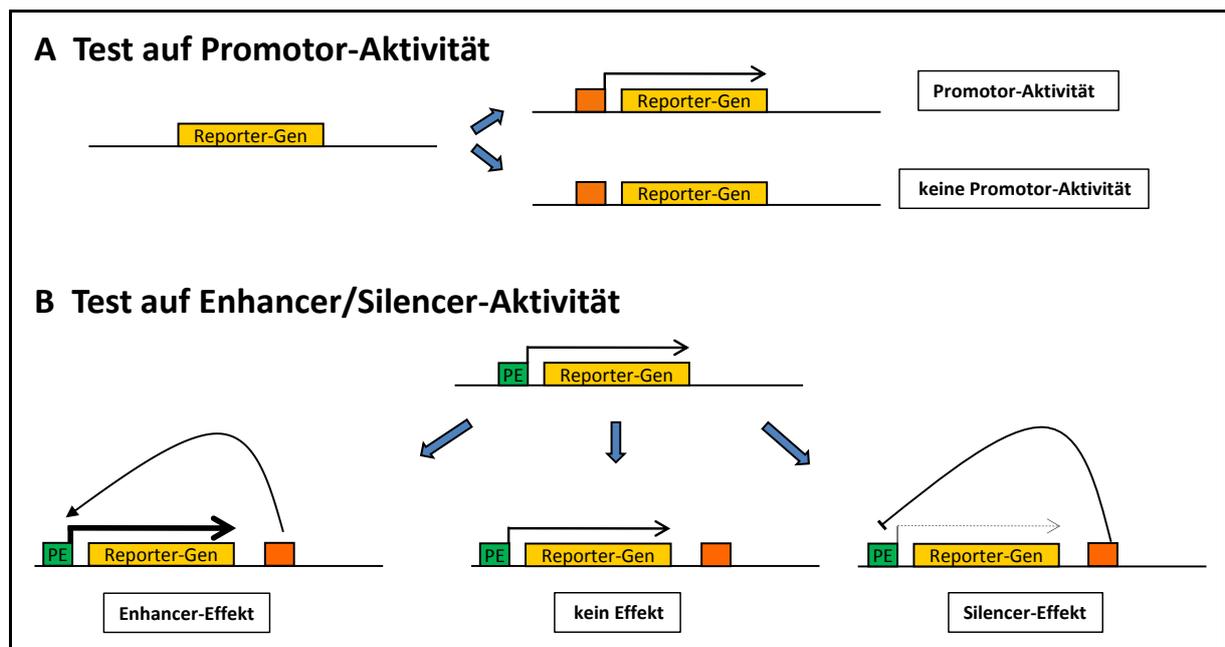
sowohl TR1G als auch die TR1-Variante der anderen Säugetiere vorhanden. Die Situation in Pika spiegelt also möglicherweise ein Zwischenstadium in der Evolution der IG-DMR in Nagetieren hinsichtlich ihres repetitiven Charakters wider.

Die *in silico* Identifizierung und Charakterisierung der beiden Tandem Repeats erlaubt allerdings nur begrenzte Vermutungen bzgl. ihrer möglichen Funktionen. Ihre ungewöhnliche Struktur legt eine *cis*-regulatorische Funktion nahe. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es u.a. dies näher zu untersuchen.

3.1.2 Der nicht-konservierte IG-DMR Tandem Repeat 2

3.1.2.1 Reporter-Assays zur Analyse regulatorischen Potentials von DNA-Elementen

Zur funktionellen Analyse von DNA-Elementen wurde ein Dual Luciferase Reporter-Assay etabliert, mit dem sich das regulatorische Potenzial eines Elementes einschätzen lässt. Dabei wird das betreffende Element je nach Fragestellung an verschiedene Positionen eines eukaryotischen Expressions-Plasmides kloniert. Auf diesem Plasmid befindet sich ein Luciferase-Reporter-Gen, dessen Expression sich leicht detektieren und quantifizieren lässt. Je nach regulatorischem Potential des eingefügtem Elementes, verändert sich die Expression des Reporters (s. Abb. 3.3).



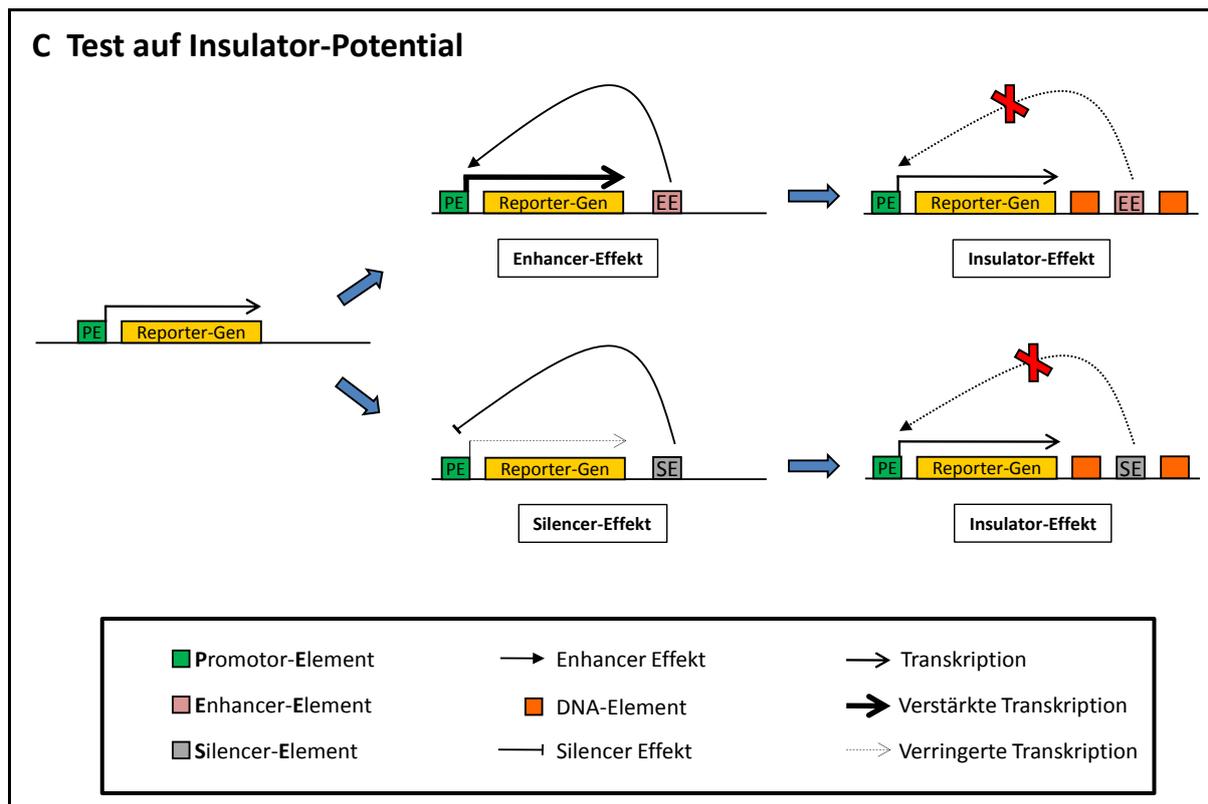


Abbildung 3.3: Strategien zur Analyse von *cis*-Effekten durch Reporter-Assays. (A) Zur Detektion von Promotor-Aktivität werden DNA-Elemente von Interesse in den Promotor-Bereich des Reporter-Plasmids eingefügt. (B) Enhancer/Silencer-Potential von DNA-Fragmenten lässt sich durch Insertion stromabwärts des Reportergens untersuchen. (C) Zum Test auf Insulator-Potential wird das Fragment zu beiden Flanken eines Enhancer/Silencer-Elementes eingebracht, da es sich um ein zirkuläres Molekül handelt.

3.1.2.2 Der murine IG-DMR Tandem Repeat 2 zeigt Promotor-Aktivität in Reporter-Assays

Um den IG-DMR TR2 auf eine mögliche Promotor-Aktivität hin zu untersuchen, wurde er durch PCR von genomischer Maus-DNA amplifiziert und im eukaryotischen Expressionsplasmid pGL3-Basic (Promega) stromaufwärts des Luciferase-Gens (*XhoI*-Position) ungerichtet eingefügt. Anschließend wurden die erhaltenen Reporter-Plasmide durch Transfektion in verschiedene Säugerzelllinien (HEK-293T, C2C12, 3T3-NIH, 3T3-L1, P19) eingebracht (vgl. 2.2.4.3). Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und ein Dual-Luciferase-Assay durchgeführt. Die normalisierten Ergebnisse der DLAs sind in Abb. 3.4 dargestellt.

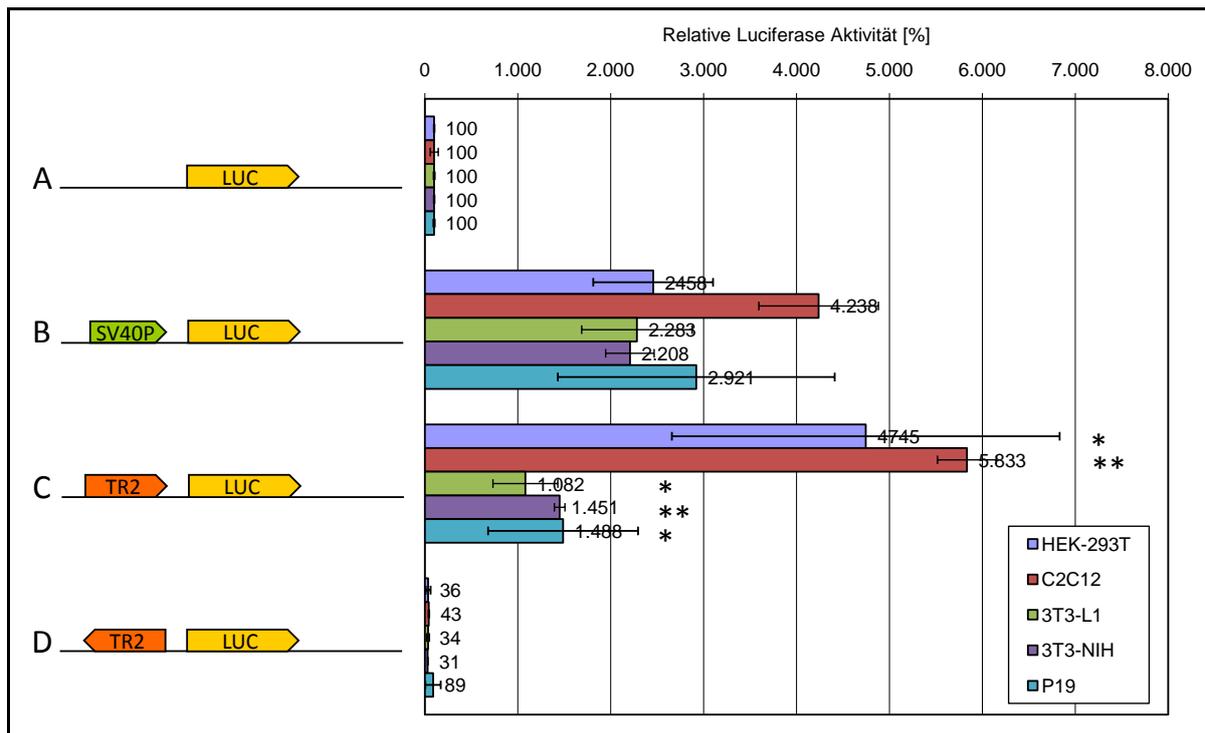


Abbildung 3.4: Der IG-DMR TR2 zeigt Promotor-Aktivität in allen getesteten Zelllinien. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, normalisiert wurde gegen das pGL3-Basic-Plasmid ohne Promotor (=100%). (SV40P: SV40-Promotor; TR2: IG-DMR Tandem Repeat 2; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Alle Proben wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied zwischen den Datensets **A** und **C** durch einen ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

Einbringen des IG-DMR TR2 in Sense-Orientierung in den pGL3-Basic-Vektor resultierte in signifikant erhöhter Luciferase-Aktivität, eine Insertion in Antisense-Orientierung zeigte jedoch keinen Effekt. Interessanterweise gab es in den verschiedenen transfizierten Zelllinien quantitative Unterschiede: so zeigten sich in HEK-293T- und C2C12-Zellen die höchsten relativen Luciferase-Aktivitäten, während in den Linien 3T3-NIH, 3T3-L1 sowie P19 eine deutlich niedrigere Aktivität zu beobachten war.

3.1.2.3 Nur der 3' Bereich des IG-DMR TR2 zeigt Promotor-Aktivität

In den Experimenten des vorigen Abschnitts zeigten Reporter-Plasmide mit dem IG-DMR Tandem Repeat 2 eine Promotor-Aktivität. Eine Frage war nun, in wie weit der repetitive Charakter des Elements für dieses Verhalten von Bedeutung ist. Um dieser Frage nachzugehen wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen und anschließender Re-Ligation ein

Teil des Repeats aus dem Reporter-Plasmid entfernt. Die Deletions-Strategie ist in Abb. 3.5 schematisch dargestellt. Der Erfolg der Deletionen wurde anschließend durch Kontrollrestriktionen und Sequenzierung überprüft, woraufhin eine Transfektion in HEK-293T-Zellen erfolgte (Abb. 3.5). Im Vergleich mit dem Plasmid, welches den kompletten IG-DMR TR2 enthält (ca. 750 nt), zeigte das TR2 Δ Nsi/Bgl-Deletions-Konstrukt keine signifikante Promotor-Aktivität, obwohl es noch ca. sieben Einzelkopien des Tandem Repeats beinhaltet (ca. 500nt). Das Δ Nsi/Mlu-Deletions-Konstrukt zeigte dagegen Werte ähnlich dem Reporter mit dem kompletten Repeat bei nur fünf Einzelkopien vom Gesamt-Repeat (ca. 250 nt). Die Promotor-Aktivität des Elementes hängt daher zumindest nicht ausschließlich von der Anzahl der repetitiven Einheiten ab, sondern ist auf den 3' Bereich des Repeats beschränkt. Als nächstes wurde das repetitive Element einer *in silico* Analyse unterzogen, und zwar in Hinblick auf Eigenschaften, die mit seiner Promotor-Aktivität in Verbindung gebracht werden können. Zuerst wurde der TR2 mit Hilfe des Programmes CpG-Plot auf potentielle CpG-Inseln hin analysiert. CpG-Inseln sind bioinformatisch definierte Regionen mit statistisch signifikant

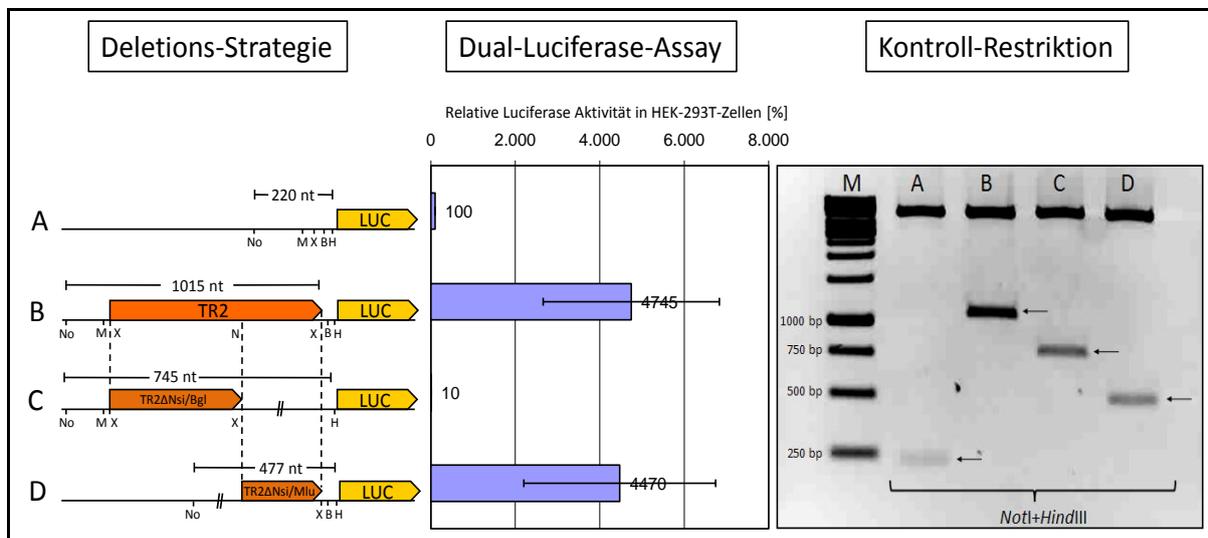


Abbildung 3.5: TR2-Deletions-Strategie und Test der Deletions-Konstrukte im Reporter-Assay. Eine einzigartige *NsiI*-Restriktionsschnittstelle wurde zur Deletion genutzt. In Kombination mit den Restriktionsendonukleasen *MluI* (3') bzw. *BglII* (5') konnten Teile des Repeats aus dem Reporter-Plasmid entfernt werden. Die zur Deletion genutzten Schnittstellen sowie jeweils eine der beiden zur Insertion des Repeats genutzten *XhoI* Schnittstellen gingen dabei verloren. Erfolg der Deletion wurde durch Sequenzierung und Kontroll-Restriktion überprüft. Test der Deletions-Plasmide im Reporter-Assay zeigte, dass nur der TR2 Δ Nsi/Mlu-Reporter (D) eine Promotor-Aktivität aufweist. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. (B: *BglII*; H: *HindIII*; M: *MluI*; No: *NotI*; N: *NsiI*; X: *XhoI*)

erhöhter Dichte an CpG-Dinukleotiden (Gardiner-Garden und Frommer 1987). CpG-Inseln finden sich im Genom gehäuft im 5' Bereich von Genen und werden mit Promotor-Aktivität assoziiert. Die Analyse ergab, dass der 3' Bereich, der in den Reporter-Assays Promotor-Aktivität zeigte, eine CG-reiche Region darstellt. Als nächstes wurde mit dem Programm Fuzznuc nach sog. CAAT- bzw. TATAA-Boxen gesucht, welche gehäuft in Promotor-Regionen auftreten. Des Weiteren wurde mit Hilfe des Programmes TF-Search nach möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (TFBS) innerhalb des IG-DMR TR2 gesucht (Threshold-Score: 100 = max.), wodurch sich drei putative TFBS identifizieren ließen. Die erste Bindestelle wurde für den Transkriptionsfaktor CDxA angegeben, einem nur im Huhn detailliert analysierten Transkriptionsfaktor. Die zwei anderen TFBS waren beide für den hämatopoetischen Transkriptionsfaktor Runx1 (Aml1a). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3.6 zusammengestellt. Vertiefende Analysen bzgl. des Runx1-Transkriptionsfaktors sind in den Abschnitten 3.1.2.8, 3.1.2.11 und 3.1.4.3 aufgeführt.

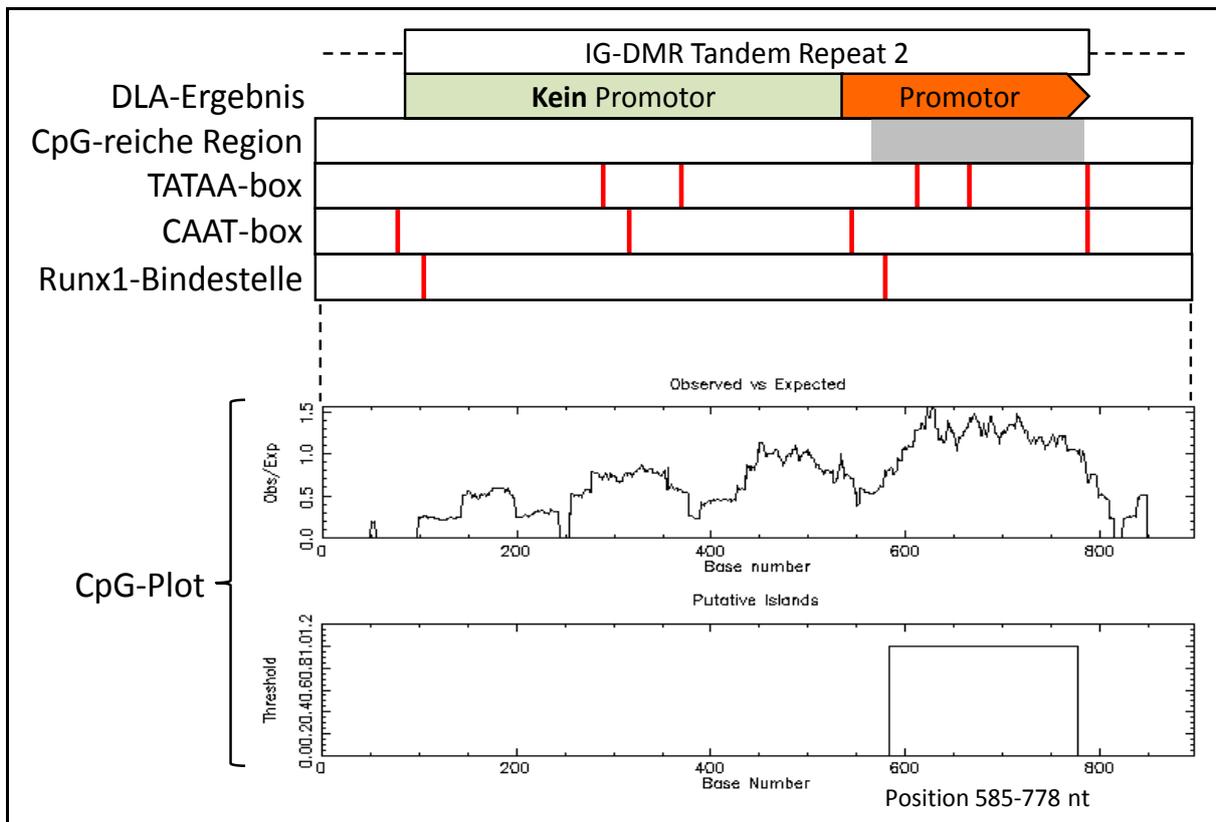


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des IG-DMR TR2 und seiner Eigenschaften. Im 3' Bereich des TR2 konnte mit Hilfe des CpG-Plot Programmes eine CG-reiche Region (grau) identifiziert werden. Der orangene Pfeil kennzeichnet die Region, die im DLA Promotor-Aktivität zeigte. Identifizierte TATA-, CAAT- Boxen bzw. Konsensus-Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Runx1 sind durch rote Striche hervorgehoben.

3.1.2.4 Die humane IG-DMR zeigt Promotor-Aktivität

Der murine TR2 konnte in Nagern, nicht aber in anderen Säugern identifiziert werden. Deshalb stellt sich die Frage, ob dieses Element funktionell von einem anderen ersetzt wurde, oder ob die identifizierte Promotor-Aktivität für die Funktion der IG-DMR im Menschen evtl. nicht notwendig ist. Da ein Test der in der humanen IG-DMR identifizierten Tandem Repeats kein Promotor-Potential offen legte (vgl. Abb. 3.21), wurde die gesamte humane IG-DMR systematisch auf Promotor-Potential hin getestet. Aus technischen Gründen wurde sie in fünf *NheI*-Fragmente unterteilt, welche in Reporter-Plasmide eingebracht und in DLAs auf Promotor-Aktivität untersucht wurden (s. Abb. 3.7).

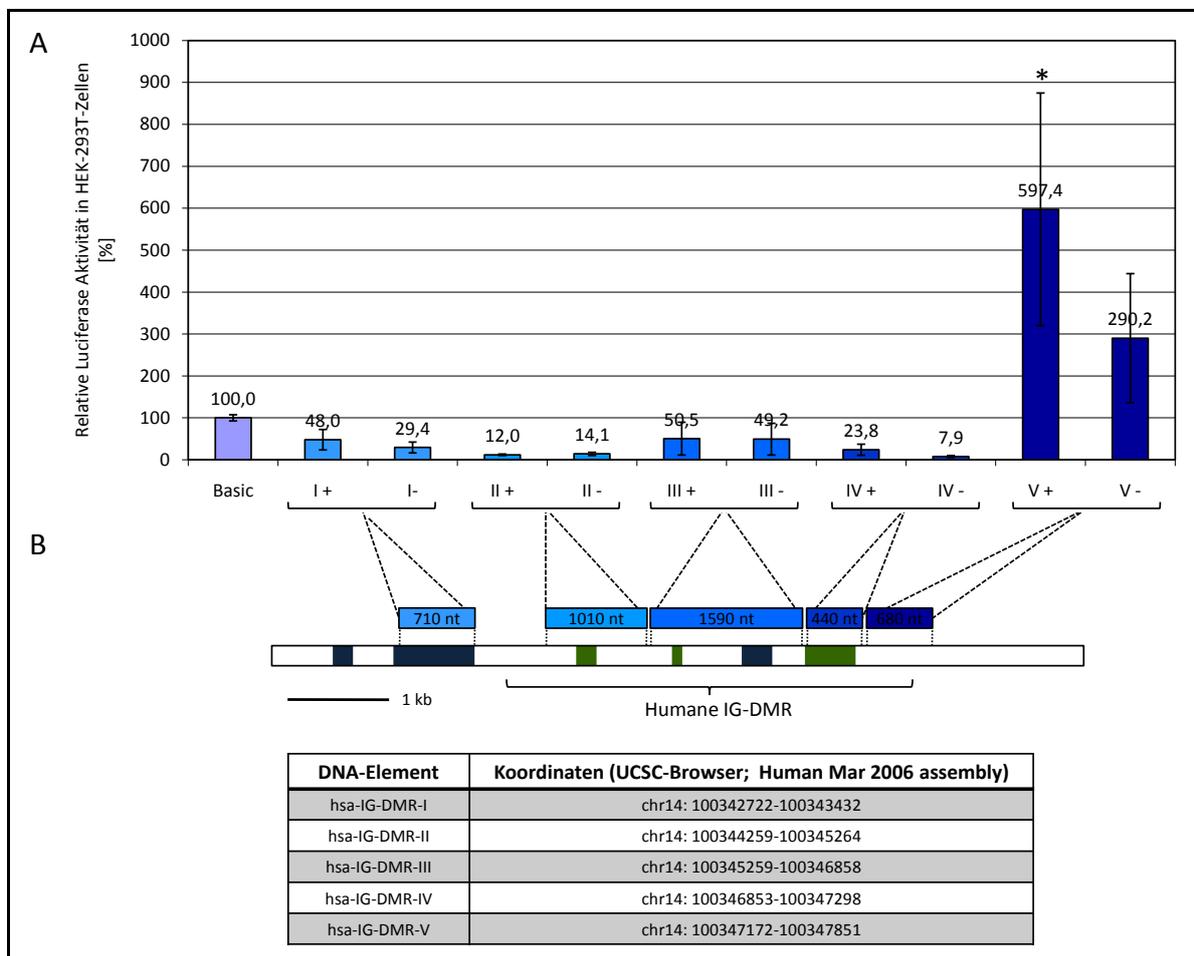


Abbildung 3.7: Test der humanen IG-DMR auf Promotor-Aktivität. Durch Einbringen von Teilbereichen der humanen IG-DMR (B) in Reporter-Plasmide in Sense- (+) bzw. Antisense-Orientierung (-) wurden selbige auf Promotor-Potential getestet. Lediglich **Fragment V** zeigte signifikante Promotor-Aktivität in HEK-293T-Zellen (A). Die Lage der TR1-Elemente ist durch grüne Boxen angedeutet. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied durch einen ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*).

Dabei konnte für einen ca. 500 nt großen Bereich der IG-DMR signifikantes Promotor-Potential beobachtet werden (Fragment V). Eine Literatur-Recherche ergab, dass bereits in einer 2003 veröffentlichten Arbeit Hinweise auf eine Promotor-Aktivität der humanen IG-DMR gefunden wurden (Khambata-Ford et al. 2003; Klon-IDs: AY270819 AY270210). Somit wurde sowohl in Maus als auch in Mensch in der IG-DMR ein Bereich mit Promotor-Potential (in Reporter-Assays) identifiziert, die relative Position innerhalb der IG-DMR ist allerdings unterschiedlich. Bei beiden Spezies ist die beobachtete Promotor-Aktivität von der IG-DMR in Richtung des *Gtl2*-Gens orientiert. In wie weit das hier identifizierte Promotor-Potential zur regulatorischen Funktion der DMR beiträgt, ist zum derzeitigen Zeitpunkt noch unklar.

3.1.2.5 Intergenische Transkription in der IG-DMR während der frühen Embryogenese

In den Reporter-Assays zeigte der IG-DMR Tandem Repeat 2 eine unidirektionale Promotor-Aktivität. Das heißt, dass vom Promotor-Element ausgehende putative Transkripte in Richtung des *Gtl2*-Gens verlaufen. Die Reporter-Assays warfen somit die Frage nach einer möglichen intergenischen Transkription innerhalb bzw. stromabwärts der IG-DMR auf.

Eine BLAST-Suche nach ESTs (Expressed Sequence Tags) verlief allerdings ohne positives Ergebnis. Aus diesem Grunde wurden RT-PCRs im Bereich stromabwärts des IG-DMR TR2 mit verschiedenen Geweben einer neugeborenen Maus sowie der Embryonalstadien Tag 16.5 dpc, 12.5 dpc, 10.5 dpc, 9.5 dpc sowie in 2-Zell-Embryos durchgeführt (s. Abb. 3.8, 3.9, 6.11 u. 6.12). In allen Embryo-Proben jünger als Tag 16.5 dpc konnte intergenische Transkription im Bereich stromabwärts des TR2 nachgewiesen werden, nicht jedoch stromaufwärts. Um zu testen, wie weit in 3' Richtung diese intergenische Transkription reicht, wurden systematisch vom TR2 bis hin zum *Gtl2*-Gen RT-PCRs mit Tag 12.5 dpc Proben durchgeführt (s. Abb. 3.8). Dabei konnte nicht mit allen verwendeten Primerpaaren ein RT-PCR-Produkt generiert werden. Amplikons wurden lediglich für die Bereiche unmittelbar stromabwärts des TR2 Elements bzw. unmittelbar stromaufwärts des *Gtl2*-Gens erhalten. Dies deutet an, dass zu diesem Entwicklungsstadium wahrscheinlich keine oder nur sehr schwache durchgehende intergenische Transkription im Bereich zwischen der IG-DMR und *Gtl2* existiert.

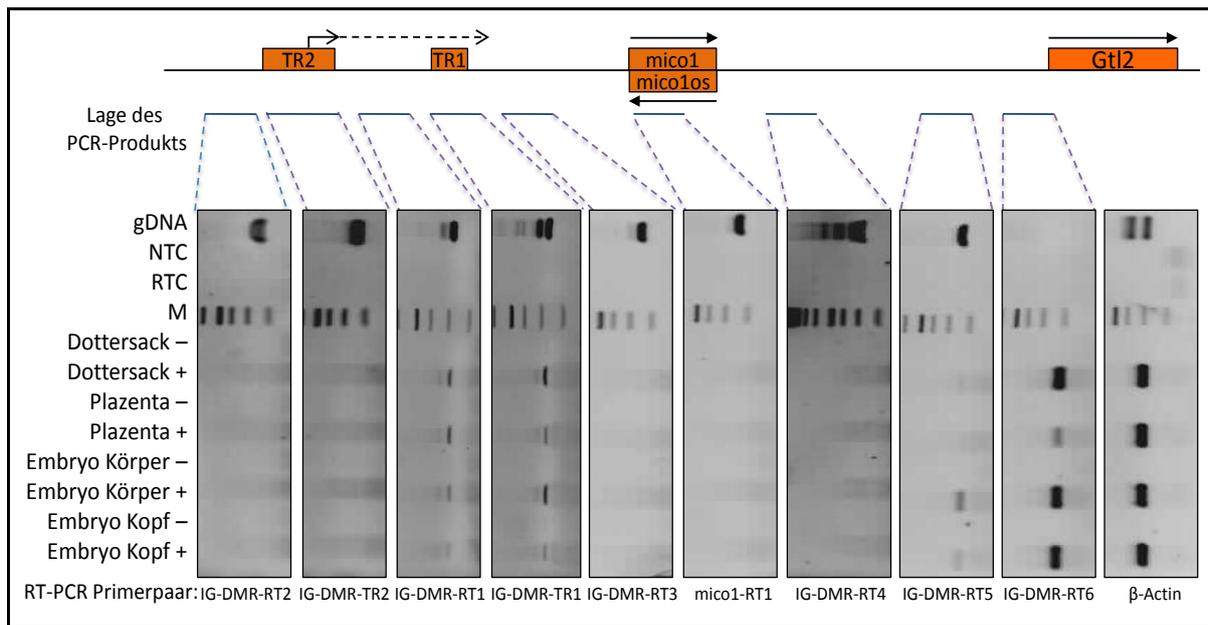


Abbildung 3.8: RT-PCRs in der intergenischen Region zwischen IG-DMR und *Gtl2*. Gesamt-RNA embryonaler Gewebe (Embryo Körper; Embryo Kopf; Plazenta; Dottersack) einer Tag 12.5 dpc Maus wurde präpariert, mit DNaseI behandelt und durch Reverse Transkription mit Random Primern in cDNA umgeschrieben. (+) bzw. (-) bezeichnen RT-Reaktionen mit bzw. ohne Reverse Transkriptase. Anschließend wurden RT-PCRs mit verschiedenen Primerpaaren in der intergenischen Region zwischen der IG-DMR und dem *Gtl2*-Gen durchgeführt (35 Zyklen); die Position der verschiedenen PCR-Produkte ist im Schema angedeutet (blaue Linien). Eine β -Actin-Kontroll-PCR (30 Zyklen) zeigte, dass die eingesetzte cDNA intakt war. (M: 1 kb-DNA-Leiter; NTC: Wasserkontrolle der PCR; RTC: Wasserkontrolle der RT; gDNA: genomische DNA)

Abschließend wurde durch strangspezifische RT-PCRs (ssRT) die Orientierung der detektierten Transkripte bestimmt. Denn theoretisch bestünde die Möglichkeit, dass Antisense-Transkription vom *Gtl2*-Gen ausgehend identifiziert wurde. Bei ssRTs wird für den oberen bzw. unteren DNA-Strang eine eigene Reaktion mit spezifischem Primer angesetzt. Nur für den Strang, von dem transkribiert wird, kann letztendlich eine cDNA und somit auch ein PCR-Produkt generiert werden. Entsprechende ssRTs wurden angesetzt, als Material diente hierbei Gesamt-RNA der P19 Zelllinie, welche die Gene der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region exprimiert. So konnte ein PCR-Produkt im Falle einer ssRT mit Primer 1 generiert werden, nicht jedoch mit Primer 2 (s. Abb. 3.10). Dies spricht für eine unidirektionale Transkription, ausgehend vom IG-DMR TR2 und in Richtung des *Gtl2*-Gens verlaufend.

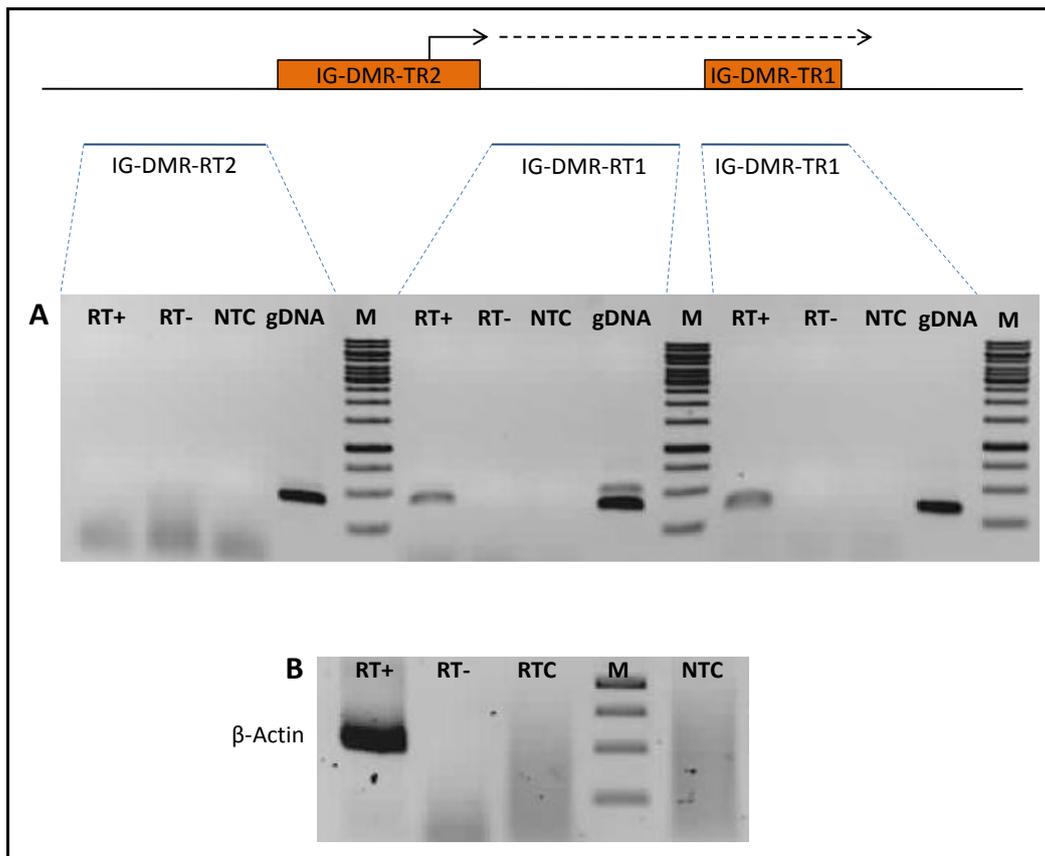


Abbildung 3.9: RT-PCRs mit 2-Zell Embryos. Gesamt RNA von sieben 2-Zell-Embryos wurde mit Random Primern Revers transkribiert. Die Lage der Amplikons ist durch blaue Linien gekennzeichnet. **(A)** Nur in RT-PCRs stromabwärts des TR2 konnte ein PCR-Produkt generiert werden (40 Zyklen) **(B)** β -Actin-Kontroll-PCR (40 Zyklen). Präparation der 2-Zell-Embryos erfolgte durch Dr. Konstantin Lepikhov. (NTC: Wasserkontrolle der PCR; RTC: Wasserkontrolle der RT)

Zusammenfassend zu den hier durchgeführten Experimenten lässt sich sagen, dass sich nur in frühen bis mittleren Embryonalstadien (2-Zell-Embryo, Embryogewebe 9.5-12.5 dpc) und in der pluripotenten P19-Linie im Bereich der IG-DMR intergenische Transkription nachweisen ließ. Die detektierte Transkription ist dabei auf den Bereich stromabwärts des IG-DMR TR2 Elements beschränkt und verläuft in Richtung des *Gtl2*-Gens. Die Vermutung, dass es sich dabei um eine durchgehende intergenische Transkription von der IG-DMR zum *Gtl2*-Gen hin handelt, konnte nicht bestätigt werden. Dies kann zum derzeitigen Moment jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da es Hinweise auf eine circadische Oszillation von Transkripten im Bereich zwischen der IG-DMR und *Gtl2* gibt (Labialle et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die intergenischen Transkripte gespleißt werden und sich deshalb von einigen Bereichen keine oder nur sehr schwache PCR-Produkte generieren lassen.

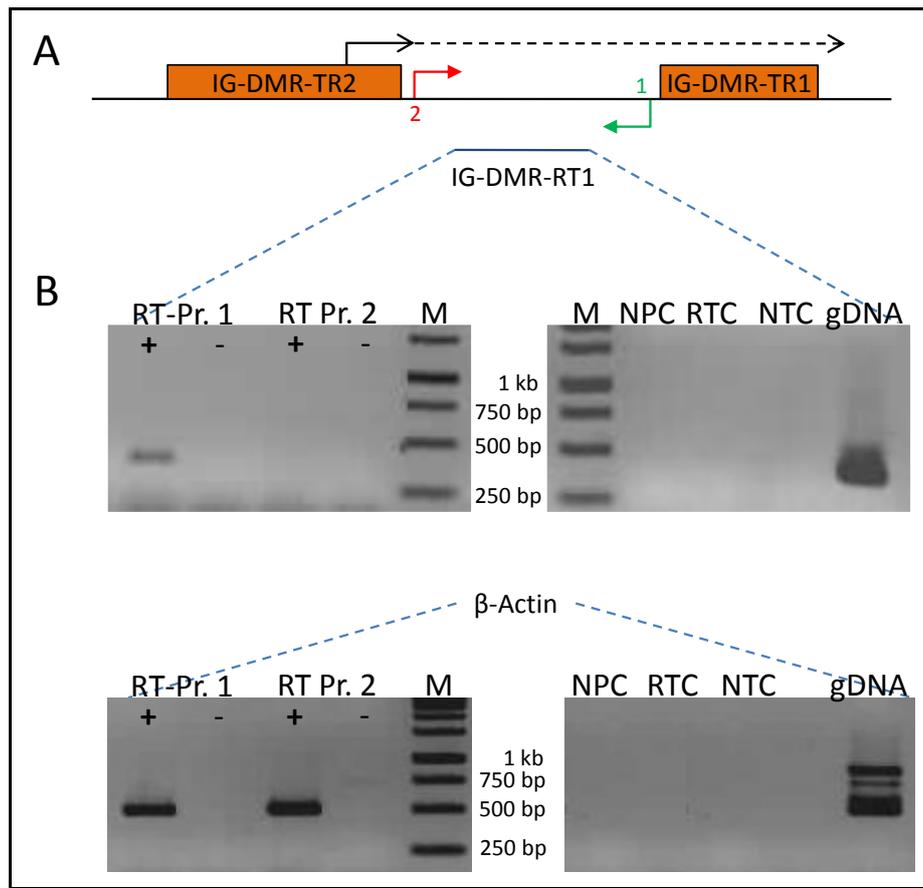


Abbildung 3.10: Strangspezifische RT-PCRs mit P19-Gesamt-RNA. (A) Der rote bzw. grüne Pfeil zeigt die Lage der für die ssRT benutzten Primer. Der blaue Strich gibt die Lage des PCR-Produktes an. Der schwarze Pfeil deutet die entdeckte Promotor-Aktivität des TR2. (B) Gesamt-RNA von P19-Zellen wurde präpariert, mit DNaseI behandelt und durch Reverse Transkription mit dem spezifischen Primer 1 (IG-DMR-up-strand-R1) bzw. 2 (IG-DMR-low-strand-R1) in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde jeweils der β -Actin-Rev Primer in die RT-Reaktionen hinzugegeben. (+) bzw. (-) bezeichnen RT-Reaktionen mit bzw. ohne Reverse Transkriptase. Anschließend wurde eine RT-PCR mit dem IG-DMR-RT1-Primerpaar durchgeführt (35 Zyklen). Eine β -Actin-Kontroll-PCR (30 Zyklen) zeigte, dass die produzierte cDNA intakt war. (M: 1 kb-DNA-Leiter; NPC: RT ohne Primer; NTC: Wasserkontrolle der PCR; RTC: Wasserkontrolle der RT; gDNA: genomische DNA)

3.1.2.6 Maternale Transkription stromabwärts des IG-DMR TR2

Da sich das identifizierte Promotor-Element in einer differentiell methylierten Region befindet, wurde als nächstes untersucht, ob das Element eine allelspezifische Aktivität aufweist. Um dies zu klären, wurde die bereits detektierte Transkription unmittelbar stromabwärts des IG-DMR TR2 auf seine allelische Herkunft hin analysiert. Um die beiden elterlichen Allele unterscheiden zu können, wurde zunächst nach einem Einzelbasen-Polymorphismus zwischen zwei Mausstämmen gesucht (SNP, **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism). Eine Sequenzierung dieser Region in mehreren Mausstämmen lieferte einen informativen **C/G**-SNP zwischen den Stämmen B6 (C-Allel) und MoINC12 (G-Allel) 203

3 Ergebnisse

Basenpaare stromabwärts des IG-DMR TR2 (AJ 320506, nt 80963; s. Anhang Abb. 6.14). Für die qualitativen Untersuchungen der IG-DMR Transkripte auf potentielle Allel-Spezifität wurde eine allelspezifische Primerextensions-Reaktion durchgeführt (SNUPE, Single Nucleotide Primer Extension). Ein Primer wird so gewählt, dass er direkt im 3' Bereich an den SNP angrenzt. In einer Extensionsreaktion wird dieses Oligonukleotid durch Einsatz von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) um genau eine Base verlängert (die SNP-Position). Während der Reaktion werden beide möglichen Didesoxynukleotide angeboten und quantitativ eingebaut, was einen direkten Vergleich der beiden Allele ermöglicht. Die erhaltenen SNUPE-Produkte können anschließend aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität mit Hilfe einer speziellen Säule liquid-chromatographisch aufgetrennt werden (HPLC). Dabei macht man sich die unterschiedlichen Retentionzeiten der verlängerten SNUPE-Produkte auf der Säule zu Nutze.

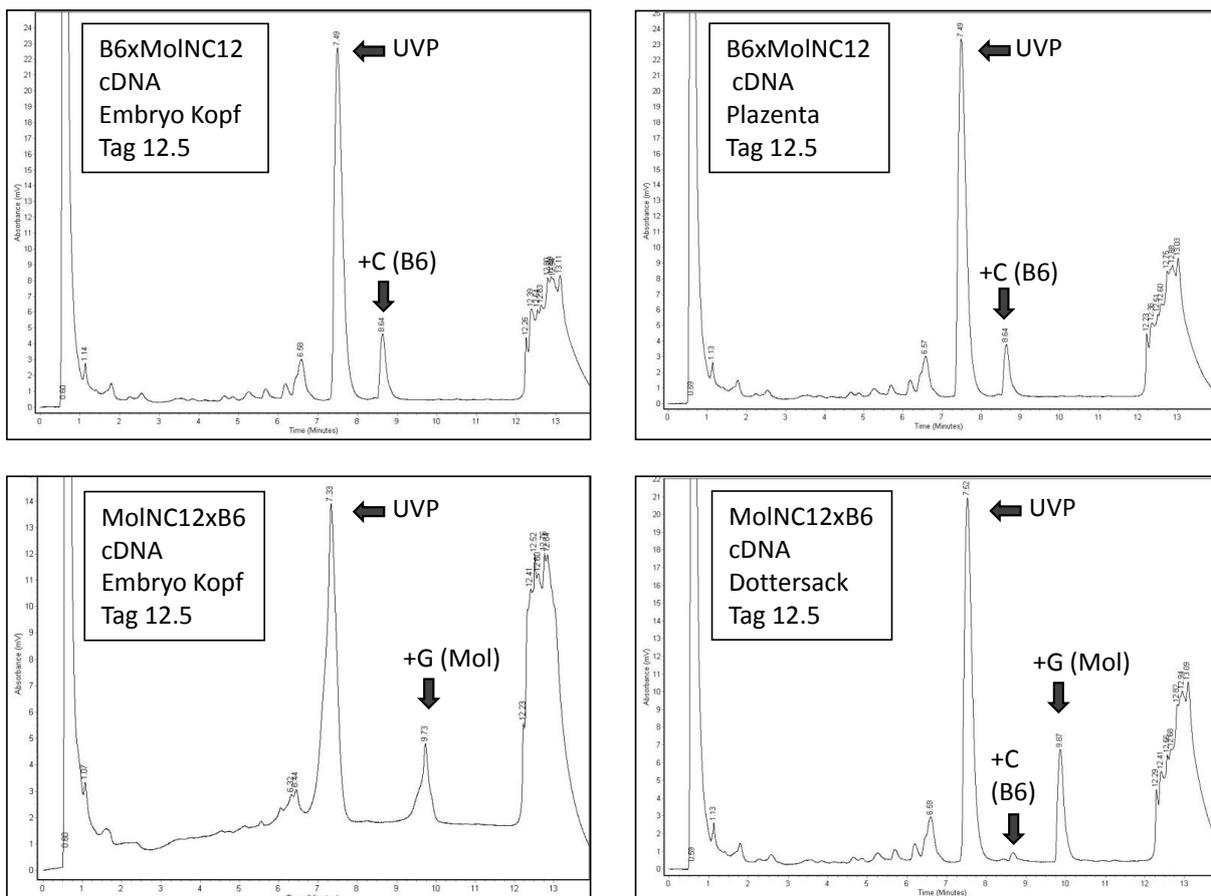


Abbildung 3.11: SNUPE-Analyse mit RT-PCR-Produkten stromabwärts des IG-DMR TR2 von heterozygoten B6xMoINC12 bzw. MoINC12xB6-Mäusen. HPLC-Auftrennung der SNUPE-Produkte zeigt, dass die Transkription stromabwärts des IG-DMR TR2 stets auf dem mütterlichen Allel erfolgt. (UVP: Unverlängerter Primer)

Zunächst wurde auf genomischer DNA-Ebene sicher gestellt, dass sich der Polymorphismus durch den SNUPE-Assay analysieren, d.h. auftrennen lässt (s. Anhang Abb. 6.15). Der unverlängerte Primer (UVP) wurde bei der B6-DNA lediglich um das ddCTP, bei der MoINC12-DNA nur um das ddGTP verlängert. Bei SNUPE mit genomischer DNA einer B6xMoINC12-Maus erfolgte Einbau beider ddNTPs. Von F1-Tieren von B6xMoINC12 bzw. MoINC12xB6 Kreuzungen wurde Gesamt-RNA embryonaler Gewebe (12.5 dpc) präpariert und RT-PCRs angesetzt. In allen Fällen mit Ausnahme einer Plazenta-Probe konnte ein SNUPE-Assay mit den PCR-Produkten durchgeführt werden. Die Ergebnisse vierer Proben sind exemplarisch in Abb. 3.11 dargestellt. Die quantitative Auswertung aller SNUPE-Ergebnisse folgt in Abb. 3.12. Bei den embryonalen Geweben der B6xMoINC12 Mäuse wurde vornehmlich das Signal des mütterlichen C-Allels (B6) detektiert, während im Falle der MoINC12xB6-Kreuzungen vor allem der Einbau des G-Allels (MoINC12) stattfand. In allen analysierten Proben wurde in den SNUPE-Assays zu 87%-100% das dem maternalen Allel entsprechende ddNTP inkorporiert. Diese Ergebnisse sprechen für eine allelspezifische Transkription fast ausschließlich auf dem maternalen Allel. Durch die Verwendung beider Kreuzungsrichtungen können stammspezifische Effekte ausgeschlossen werden, allerdings wurde nur ein Tier jeder Kreuzungsrichtung analysiert, was statistische bzw. allgemeine Schlussfolgerungen nicht zulässt.

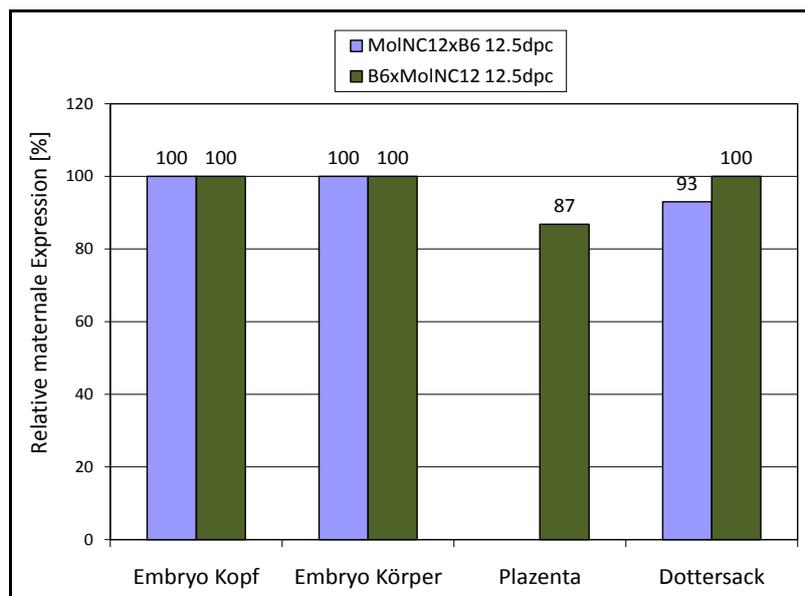


Abbildung 3.12: Auswertung aller SNUPE-Assays. Bei allen SNUPE-Reaktionen wurde der relative maternale Anteil des Signals berechnet; die Ergebnisse sind für alle untersuchten embryonalen Gewebe gezeigt.

3.1.2.7 Das TR2 Promotor-Element ist wahrscheinlich methylierungssensitiv

Der vorangehende Versuch zeigte, dass die Transkripte im 5' Bereich des TR2 maternalen Ursprungs sind. Das repetitive Promotor-Element scheint daher nur auf dem maternalen, unmethylierten Chromosom aktiv zu sein, während das methylierte paternale Chromosom stillgelegt ist. Um zu testen, ob das TR2 Promotor-Element Methylierungssensitivität zeigt, wurden die entsprechenden Reporter (kompletter TR2 bzw. das Δ Nsi/Mlu-Deletions-Konstrukt) durch Inkubation mit *SssI* *in vitro* methyliert.

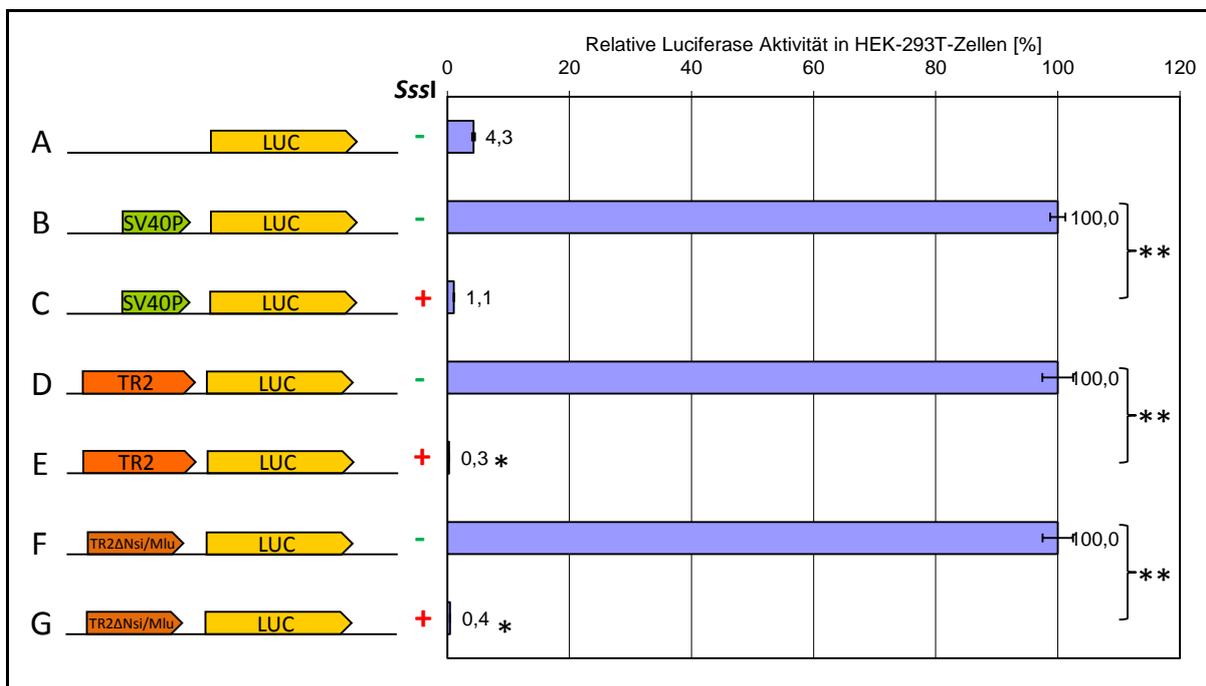


Abbildung 3.13: CpG-Methylierung inhibiert die Promotor-Aktivität der TR2-Reporter-Plasmide. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. Durch (+) bzw. (-) ist angezeigt, ob eine *in vitro* Methylierung mit *SssI* stattfand. Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, normalisiert wurde jeweils gegen das unmethylierte Promoter-Konstrukt. Alle Proben wurden in zwei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Signifikanter Unterschied mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ (**) zwischen den durch Klammern markierten Datensets wurde durch einen ungepaarten t-Test errechnet.

Die Vollständigkeit der Methylierungs-Reaktion wurde mit *MspI* bzw. *HpaII*-Restriktionen überprüft (s. Anhang Abb. 6.26). Mit den methylierten Proben wurden wie zuvor Transfektionen angesetzt und im DLA mit den unmethylierten Proben verglichen (s. Abb. 3.13). In allen drei getesteten Proben war nach *in vitro* Methylierung keine signifikante Promotor-Aktivität mehr zu messen. Dem zu Folge wird die Promotor-Aktivität der Reporter-

Plasmide durch Methylierung der CpG-Positionen inhibiert. Da in dem vorliegenden Versuch jedoch alle Positionen der Plasmide methyliert wurden, ist seine Aussagekraft bzgl. der Methylierungssensitivität des TR2 nur begrenzt. Hierzu wäre die Methylierung nur des TR2-Bereiches auf dem Vektor notwendig. Dies ist allerdings nur mit erhöhtem technischen Aufwand zu bewerkstelligen. Das Experiment liefert somit nur einen Hinweis auf eine mögliche Methylierungssensitivität des IG-DMR TR2.

3.1.2.8 Einfluss von Runx1 auf Promotor-Aktivität des IG-DMR TR2

Eine Existenz von *trans*-wirkenden Faktoren, welche die IG-DMR vermittelte Regulation des Imprintings in der *Dlk1/Gtl2* Region beeinflussen, wurde schon intensiv untersucht, allerdings ohne konkrete Ergebnisse (Carr et al. 2007; Croteau et al. 2005).

Wie in Abschnitt 3.1.2.3 gezeigt, konnten *in silico* zwei perfekte Bindestellen für die Runx-Transkriptionsfaktor-Familie im unmittelbaren Bereich des IG-DMR TR2 identifiziert werden. Die Familie der Runx-Proteine besteht aus den drei Transkriptionsfaktoren Runx1 (Runt-related transcription factor 1; alias: Aml1), Runx2 (Aml3) und Runx3 (Aml2), welche über die namensgebende Runt-DNA-Bindedomäne verfügen. In *C. elegans*, aber auch in *Drosophila* und Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass sie Schlüsselrollen in der Embryogenese und der Zelldifferenzierung inne haben (Lutterbach und Hiebert 2000; Crosier et al. 2002; Nam et al. 2002). **Runx1** Knock-out Studien führten zur pränatalen Letalität (10.5 dpc) und zeigten, dass Runx1 ein bedeutender Faktor der Hämatopoese ist (Okuda et al. 1996; Wang et al. 1996; North et al. 1999). Darüber hinaus ist in vielen Leukämie-Fällen eine genetische Aberration des Runx1-Gens zu beobachten (Downing et al. 1993; Miyoshi et al. 1993). Obwohl der weitaus größte Teil an wissenschaftlichen Publikationen sich mit dem Zusammenhang von Runx1 und akuter myelischer Leukämie (AML) befasst, konnte auch inzwischen eine Rolle in der neuronalen und skelettalen Entwicklung festgestellt werden (Inoue et al. 2008; Lian et al. 2003; Wang et al. 2005). **Runx2** ist ein essentieller Regulator der Osteoblasten-Differenzierung (Banerjee et al. 1997; Ducy et al. 1997). Die Rolle von Runx2 in der Osteogenese zeigen Untersuchungen an Runx2 Knock-out Mäusen, denen ein mineralisiertes Skelett völlig fehlt (Komori et al. 1997; Mundlos et al. 1997; Otto et al. 1997; Choi et al. 2001). Ferner konnten Veränderungen in der Adipogenese in *Runx2*^{-/-} Chondrozyten durch Deregulation von *Dlk1* beobachtet werden (Enomoto et al. 2003). **Runx3** ist ein weniger gut

untersuchtes Protein, es konnte jedoch inzwischen mit der Entwicklung des Nervensystems in Verbindung gebracht werden (Levanon et al. 2002; Inoue et al. 2008).

Auffallend ist, dass die Runx-Proteinfamilie gerade in den Geweben eine wichtige Rolle spielt, die in Knock-out Modellen der *Dlk1/Gtl2* Region einen auffälligen Phänotyp aufweisen. Alle 3 Runx-Proteine verfügen über die Runx-DNA-Bindedomäne, die den Konsensus **YGYGGY(Y)**, mit starker Präferenz für die Nukleotidabfolge **TGTGGT** bindet (Nagata und Werner 2001; Tahirov et al. 2001).

Tabelle 3.1: Putative Runx1 Bindestellen innerhalb der murinen IG-DMR. Runx-Proteine binden die Konsensus-Sequenz YGYGGY(Y) mit Präferenz für TGTGGT (dunkelgrau, Vorhersage des TF-Search-Programms). Position 1 entspricht der Nukleotid-Position 79883 im BAC-Klon AJ320506.

Position	Strang	Sequenz	Repeat	Position	Strang	Sequenz	Repeat
87 - 92	+	CGTGGC		1583 - 1588	-	CGCGGC	TR1G
174 - 180	+	TGTGGTC		1606 - 1611	-	CGCGGC	TR1G
386 - 391	+	CGCGGC	TR2	1608 - 1614	+	CGCGGTT	TR1G
474 - 479	+	TGTGGC	TR2	1974 - 1980	-	TGTGGCT	
522 - 527	-	TGTGGC	TR2	2365 - 2371	+	TGTGGTT	
580 - 585	+	CGCGGT	TR2	2574 - 2580	+	CGTGGTT	TR1
685 - 690	+	CGTGGC	TR2	2646 - 2651	+	CGTGGT	
698 - 703	+	TGTGGT	TR2	2671 - 2677	-	TGTGGTC	
729 - 734	+	CGTGGT	TR2	2842 - 2847	+	TGTGGT	
742 - 747	+	CGTGGT	TR2	3287 - 3293	+	TGTGGTC	
773 - 778	+	TGCGGC	TR2	3554 - 3560	+	CGTGGTC	
786 - 791	+	CGTGGT	TR2	3608 - 3613	-	TGCGGC	
817 - 823	+	CGCGGCC	TR2	3623 - 3628	+	CGTGGT	
1371 - 1377	+	TGTGGTT	TR1G	3638 - 3644	-	TGTGGCT	
1463 - 1468	-	TGCGGC	TR1G	3721 - 3726	-	TGTGGT	
1509 - 1514	-	CGCGGC	TR1G	3798 - 3804	+	TGTGGTC	

Aufgrund der Ergebnisse des TF-Search-Programmes wurde die komplette IG-DMR von Maus und Mensch mit dem Programm Fuzznuc auf putative Runx-Bindestellen überprüft (s. Tab. 3.1 bzw. Anhang Tab. 6.2 - 6.4). Neben den putativen Bindestellen im IG-DMR TR2-Element konnten auch im Bereich des IG-DMR TR1/TR1G mögliche Bindestellen identifiziert werden; darauf soll später noch genauer eingegangen werden.

Um einen möglichen Einfluss von Runx-Transkriptionsfaktoren auf die Promotor-Aktivität des IG-DMR TR2 zu testen wurden Kotransfektions-Experimente durchgeführt. Ein eukaryotisches Expressionsplasmid, welches die cDNA des murinen Runx1 (pcDNA 3.1-Runx1; Addgene) enthält bzw. ein Kontroll-Plasmid (pcDNA 3.1), wurde mit dem Tandem Repeat 2 Reporter-Konstrukt in HEK-293T- bzw. P19-Zellen kotransfiziert (s. Abb. 3.14). Die

Funktionalität des benutzten Runx1-Expressionsplasmides wurde bereits in einem anderen Labor überprüft (Jiang et al. 2005).

Im Falle des IG-DMR TR2-Reporters konnte ein signifikanter Rückgang der relativen Luciferase-Aktivität nach Runx1 Kotransfektion verzeichnet werden. Auch das bereits beschriebene TR2 Δ Nsi/Mlu-Deletions-Konstrukt wurde getestet, wobei sich eine noch stärkere Repression nach Runx1-Kotransfektion zeigte (Abb. 3.14 H). Diese Effekte ließen sich allerdings nur in HEK-293T-Zellen beobachten, während in P19-Zellen signifikante Veränderungen der Reporter-Aktivitäten nach Runx1-Kotransfektion ausblieben.

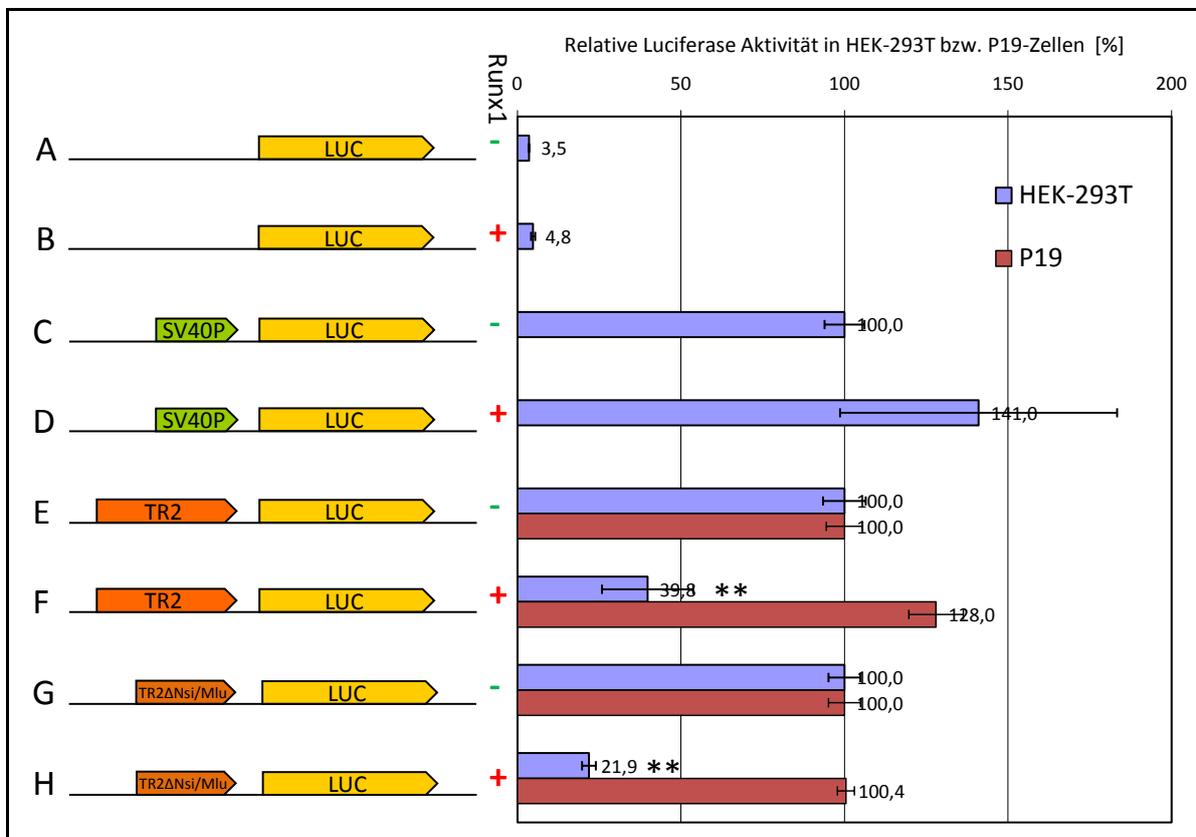


Abbildung 3.14: Kotransfektion von Runx1 hat negativen Einfluss auf die IG-DMR TR2 Promotor-Aktivität in HEK-293T-, nicht jedoch in P19-Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. Die mit Runx1 bezeichnete Spalte zeigt, ob das Runx1-exprimierende Plasmid (+) oder ein Kontroll-Plasmid (-) kotransfiziert wurde. Im rechten Bereich sind die gemessenen rel. Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das jeweilige Promotor-Konstrukt ohne Runx1-Kotransfektion (=100%) normalisiert. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate getestet. In P19-Zellen wurden nur zwei Experimente mit den Proben E-H durchgeführt. Signifikanter Unterschied mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ (**) zwischen den Datensets E und F bzw. G und H in HEK-293T-Zellen wurde durch einen ungepaarten t-Test errechnet.

Semiquantitative RT-PCRs zur Überprüfung der endogenen Expression der Runx-Proteinfamilie zeigten, dass in P19-Zellen Runx1 stark exprimiert wird, nicht jedoch in HEK-293T-Zellen (s. Anhang Abb. 6.13). Damit könnte in P19-Zellen das endogene Runx1-Protein die Reporter-Aktivität bereits in der Kontroll-Transfektion derart negativ beeinflussen, dass eine zusätzliche Kotransfektion von Runx1-Plasmid keinen Einfluss mehr ausübt. Unterstützt wird dieser Verdacht von der Tatsache, dass die Aktivität des TR2-Reporters in P19-Zellen unabhängig von Kotransfektionen deutlich geringer ist als in HEK-293T-Zellen (s. Abb. 3.4).

Auch im Bereich der humanen IG-DMR konnten putative Bindestellen für die Runx-Proteinfamilie identifiziert werden (s. Anhang Tab. 6.3; 6.4). Deshalb wurde der Teilbereich der humanen IG-DMR, der in den vorangegangenen Reporter-Assays Promotor-Aktivität zeigte (DNA-Fragment **V**) ebenfalls in Runx1-Kotransfektionen getestet (s. Anhang Abb. 6.16). Auch hier zeigte sich in HEK-293T-Zellen ein negativer Einfluss von Runx1 auf die Promotor-Aktivität. Aus zeitlichen Gründen konnte allerdings erst ein Experiment (in Triplikaten) durchgeführt werden, weshalb an dieser Stelle auf eine statistische Analyse verzichtet wurde.

3.1.2.9 Einfluss des MAR4-Elementes auf die IG-DMR TR2 Promotor-Aktivität

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation konnte die Interaktion eines sog. MAR-Elementes (**M**atrix **A**ttachment **R**egion) mit der IG-DMR gezeigt werden. Sie interagieren mit der nukleären Matrix, einem Netz aus Proteinen im Zellkern, welches die Morphologie des Nukleus bestimmt. Dieses Proteinnetz assoziiert mit bestimmten AT-reichen DNA-Regionen, den sog. MAR-Elementen (Laemmli et al. 1992). Sie werden u.a. mit der Regulation von Chromatin-Strukturen bzw. der Gen-Expression in Verbindung gebracht (Namciu et al. 1998). So zeigten bereits untersuchte MAR-Elemente einen Einfluss auf angrenzende *cis*-aktive Elemente wie Enhancer (Forrester et al. 1994; Gasser und Laemmli, 1986); andere wiederum können die Histon-Acetylierung und somit das Chromatin beeinflussen (Jenuwein et al. 1997; Forrester et al. 1999; Martens et al. 2002).

Auch in der *Dlk1/Gtl2* Region finden sich MAR-Elemente. Ein identifiziertes Element ist das hochkonservierte MAR4-Element (AJ320506 nt 60246-60325), ca. 50 Kilobasen stromabwärts von *Dlk1*. In 3C-Experimenten („Chromatin Conformation Capture“) konnte eine direkte Interaktion von MAR4 mit der IG-DMR im Bereich der beiden Tandem Repeats

3 Ergebnisse

beinhaltet, nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Interaktion vornehmlich auf dem methylierten paternalen Chromosom zu beobachten (Braem et al. 2008). Wie bereits beschrieben können MAR-Elemente das Verhalten *cis*-aktiver Elemente beeinflussen. Daher ist es interessant zu erfahren, ob MAR4 die Promotor-Aktivität des IG-DMR Tandem Repeat 2 Konstrukts beeinflussen kann. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der Interaktion von MAR4 mit der IG-DMR von Interesse. Das MAR4-Element wurde deshalb in Reporter-Konstrukte mit dem TR2 Promotor-Element bzw. dem SV40-Promotor eingebracht und entsprechende Reporter-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der Transfektionen in HEK-293T-Zellen sind in Abb. 3.15 dargestellt.

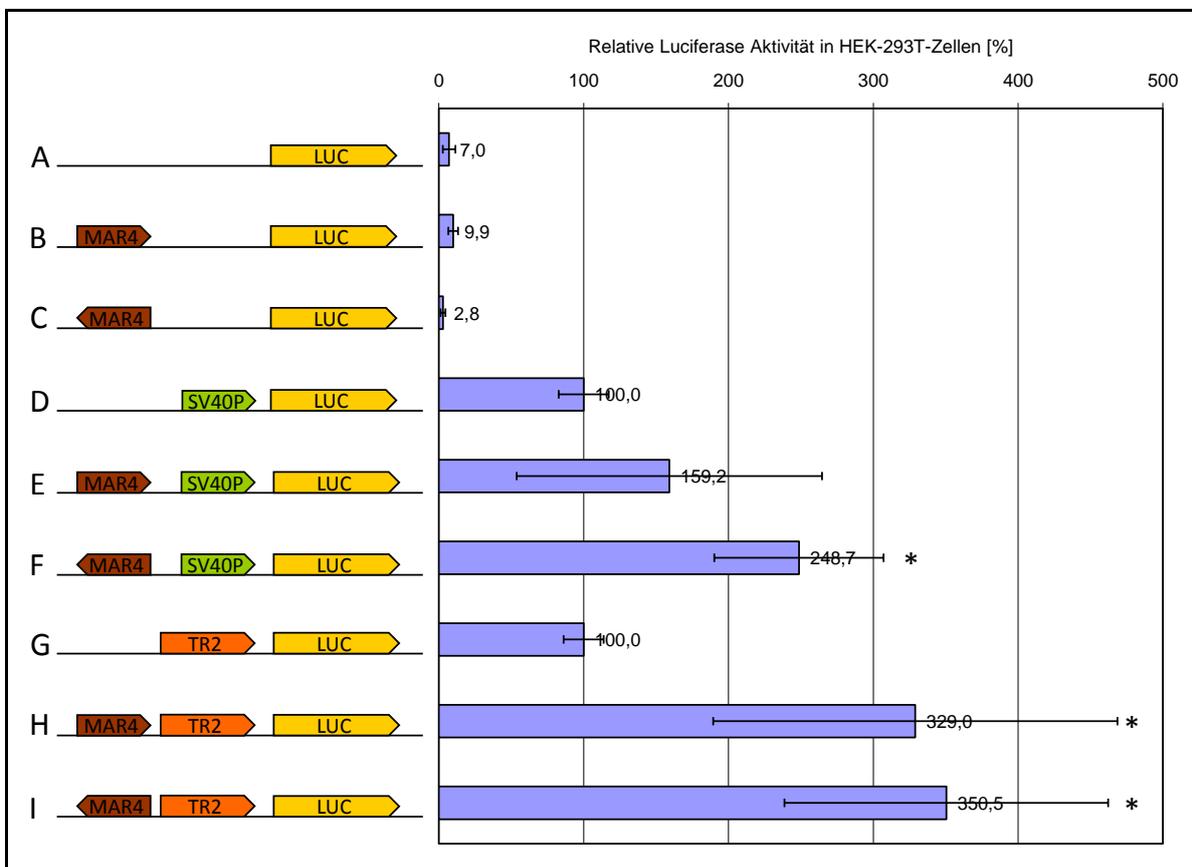


Abbildung 3.15: Einfluss des MAR4-Elementes auf die Promotor-Aktivität in HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. Im rechten Bereich sind die gemessenen rel. Luciferase-Aktivitäten gezeigt, normalisiert wurde gegen das SV40-Konstrukt. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Signifikanter Unterschied zwischen den Datensets **E** und **F** bzw. **G** und **H** mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) wurde durch einen ungepaarten t-Test errechnet.

Zunächst wurde das MAR4-Element auf Promotor-Potenzial getestet, was nicht der Fall war. Im Falle des SV40-Promotor-Plasmides ließ sich durch Einbringen des MAR4 Elementes die Luciferase-Aktivität steigern, allerdings war der Effekt nur im Falle einer Antisense-Orientierung von MAR4 signifikant. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Braem et al. 2008. Auch beim IG-DMR TR2 Promoter-Element konnte eine Steigerung der Promotor-Aktivität beobachtet werden, die aber unabhängig von der MAR4-Orientierung war.

3.1.2.10 Der IG-DMR Tandem Repeat 2 zeigt Enhancer Potential

Der IG-DMR TR2 wies in den vorangegangenen Experimenten Promotor-Aktivität in den Luciferase-Assays auf. Die Deletions-Experimente zeigten ferner, dass dies auf den 3' Bereich des Elementes beschränkt war. Somit stellt sich die Frage nach dem Grund für die Gesamtgröße des Repeats. Ein Grund könnte sein, dass der TR2 noch weitere regulatorische Funktionen inne hat. Um dies zu klären wurde zusätzlich ein Test auf Enhancer/Silencer-Potential durchgeführt.

Neben dem SV40-Promotor wurde der Einfluss des TR2 auf die Promotor-Bereiche von Genen der *Dlk1/Gtl2* Region getestet (*Dlk1*, *Gtl2* und *Begain (E1B)*). In einem Vorversuch wurde sichergestellt, dass die als Promotor eingesetzten Fragmente tatsächlich über Promotor-Potenzial verfügen (s. Anhang Abb. 6.19). Anschließend wurde in diese Reporter der murine IG-DMR Tandem Repeat 2 auf Enhancer/Silencer Position eingefügt und Transfektionen durchgeführt (s. Abb. 3.16). In allen untersuchten Proben zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung der relativen Luciferase-Aktivität durch Einschub des TR2 Elementes auf Enhancer/Silencer-Position. Der *Dlk1*-Promotor zeigte eine ca. 3,7-fache Steigerung, während beim *Gtl2*-Promotor mit rund 2-facher Steigerung der Effekt schwächer ausfiel. Der *Begain E1B*-Promotor wurde durch Anwesenheit des Tandem Repeats um etwa das 2,7-fache verstärkt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass der IG-DMR Tandem Repeat 2 die Aktivität anderer Promotoren positiv beeinflussen kann, er zeigt also Enhancer-Potential. Durch Kontroll-Konstrukte wurde sichergestellt, dass die beobachteten Effekte nicht durch die Promotor-Aktivität des TR2 Elementes verfälscht werden (Abb. 3.16 **B-C**).

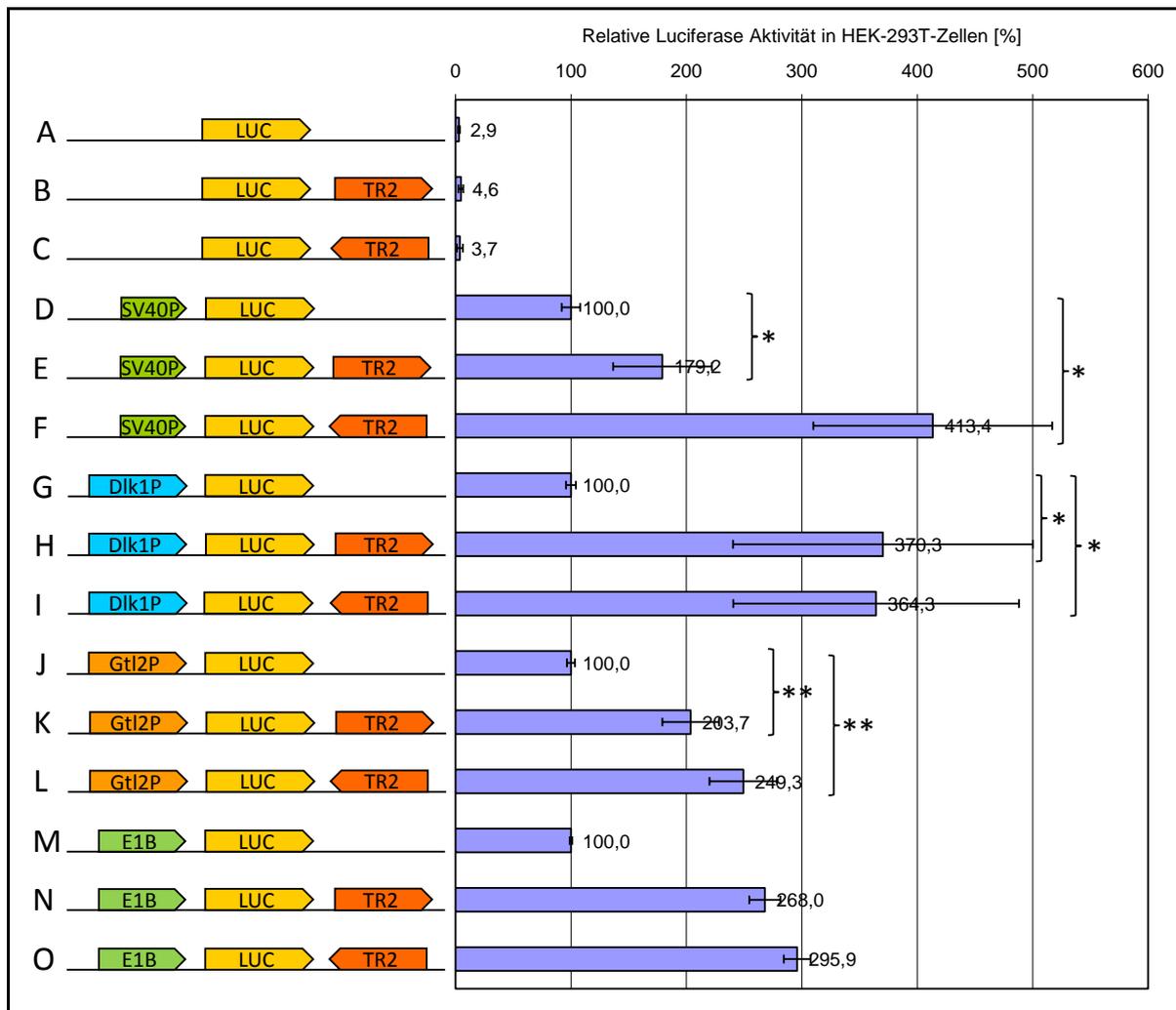


Abbildung 3.16: Der IG-DMR TR2 zeigt Enhancer-Aktivität auf den SV40-Promotor und Promotoren der *Dlk1/Gtl2* Region in HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (SV40: SV40-Promotor; Dlk1P: *Dlk1*-Promotor; Gtl2P: *Gtl2*-Promotor; E1B: *Begain*-Promotor (Variante Exon 1B); TR2: IG-DMR Tandem Repeat 2; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das jeweilige Promotor-Konstrukt ohne Repeat-Insertion normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert (Ausnahme: E1B-Promotor-Konstrukte, nur 1 Experiment mit Triplikaten). Analyse auf signifikanten Unterschied zwischen den durch Klammern verbundenen Datensets mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

3.1.2.11 Kotransfektion von Runx1 inhibiert die Enhancer-Funktion des TR2

In den in Abschnitt 3.1.2.8 beschriebenen Experimenten zeigte sich ein negativer Einfluss von Runx1-Kotransfektion auf die TR2 Promotor-Aktivität. Als nächstes wurde getestet, ob und in welcher Weise Runx1-Kotransfektion auch die im vorigen Kapitel beobachtete Enhancer-Aktivität des TR2 Elementes beeinflusst (s. Abb. 3.17). Durch zusätzliche

3 Ergebnisse

Kotransfektion von Runx1-Expressions-Plasmid wurde der Enhancer-Effekt des TR2 wieder aufgehoben. Es handelt sich hier um einen dominant negativen Effekt. Der Einfluss, den die Runx1-Kotransfektion auf Promotor-Konstrukte ohne TR2 auf Enhancer-Position ausübte, ist im Vergleich zu den TR2-tragenden Reportern nur gering.

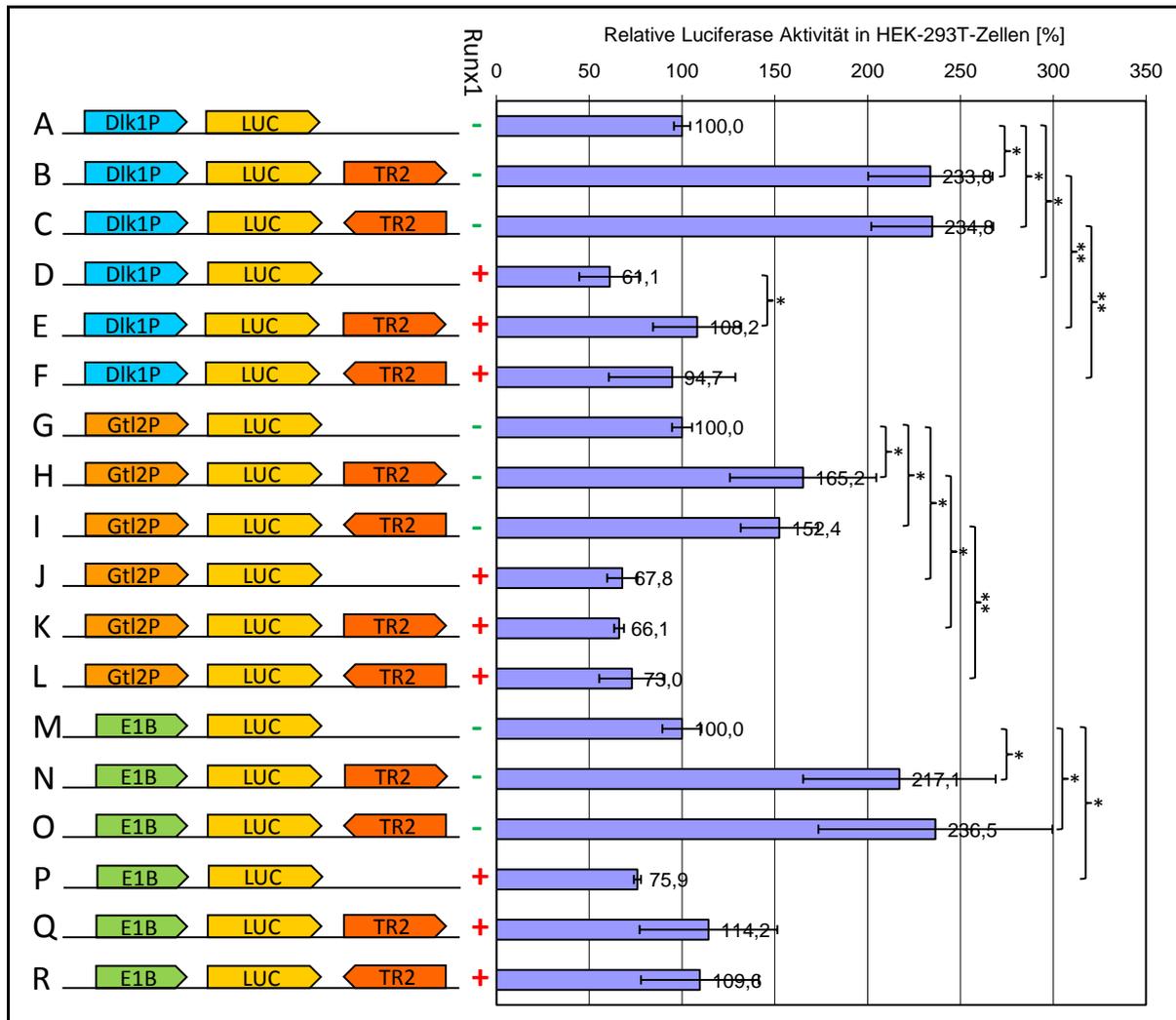


Abbildung 3.17: Kotransfektion von Runx1 inhibiert die Enhancer-Funktion des IG-DMR Tandem Repeat 2 in HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (Dik1P: *Dik1*-Promotor; Gtl2P: *Gtl2*-Promotor; E1B: *Begain*-Promotor (Variante Exon 1B); TR2: IG-DMR Tandem Repeat 2; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Die mit *Runx1* bezeichnete Spalte zeigt, ob das *Runx1*-exprimierende Plasmid (+) oder ein Kontroll-Plasmid (-) kotransfiziert wurde. Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das jeweilige Promotor-Konstrukt ohne TR2-Insertion sowie ohne *Runx1*-Kotransfektion (=100%) normalisiert. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate getestet (Ausnahme: E1B-Promotor-Konstrukte, nur zwei Experimente mit Triplikaten). Analyse auf signifikanten Unterschied zwischen den durch Klammern verbundenen Datensets mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

3.1.3 Der konservierte Tandem Repeat stromabwärts von *Gtl2/MEG3*

3.1.3.1 *In silico* Analyse

Die Präsenz mehrerer konservierter intergenischer Bereiche in der *Dlk1/Gtl2* Region lässt vermuten, dass sich neben den bereits bekannten DMRs (IG-DMR, *Gtl2*-DMR) zusätzliche Elemente finden, die zur Regulation der Imprints dienen. So finden sich beispielweise in der *H19/Igf2* Region außer der H19-DMR distal gelegene Enhancer-Elemente (s. Abb. 1.4).

In der Arbeitsgruppe wurde bereits ein stark konservierter Tandem Repeat stromabwärts des *Gtl2/MEG3*-Gens identifiziert (Tierling et al. 2006), der im Folgenden auch als *Gtl2dsTR* (Maus) bzw. *MEG3dsTR* (Mensch) bezeichnet wird (für „*Gtl2* downstream Tandem Repeat“ bzw. „*MEG3* downstream Tandem Repeat“). Die damaligen Analysen konzentrierten sich vor allem auf die Spezies Maus und Mensch. Zur Untermauerung der Aussagen bzgl. der Konservierung des *Gtl2dsTR* im Reich der Säugetiere wurde mit dem Elefanten (*Loxodonta africana*) eine weitere Spezies der *in silico* Analyse hinzugefügt. Aufgrund seiner entfernten Position zu Maus und Mensch innerhalb der Systematik der Säugetiere (der Elefant gehört zu den *Afrotheria*, Mensch und Maus zu den *Euarchontoglires*) eignet sich der Elefant dazu besonders gut. Auch hier konnte der Tandem Repeat mit Hilfe des Programmes „Tandem Repeats-Finder“ identifiziert werden. Für die Analysen im Bereich der IG-DMR stand die Elefant-Sequenz leider nicht zur Verfügung, da dieser Bereich (noch) nicht in den Datenbanken vorliegt.

Der gesamte Tandem Repeat umfasst bei Maus bzw. Elefant eine 12-fache, beim Menschen eine 13,8-fache Sequenzwiederholung (Maus: Genbank Accession Nummer AC152063.5, nt 114635-115498; Mensch: AL117190.6, nt 102720-103696; Elefant: BROADE1, scaffold 52210, nt 9984-11228). Sequenzabgleiche aller Einzelkopien der Tandem Repeats sind im Anhang dargestellt (s. Anhang Abb. 6.3 - 6.5).

In der vorliegenden Analyse wurden im „Tandem Repeats-Finder“-Programm andere Parameter als in der ursprünglichen eingesetzt (vgl. 2.2.5). Dies führt zu einer längeren Konsensus-Sequenz des Maus *Gtl2dsTR* ((Tierling et al. 2006): 57 Basen; vorliegende Analyse: 71 Basen), während beim Menschen bzw. Elefanten ein Konsensus von 70 Basen erhalten wurde. Der so erhaltene Konsensus der Maus zeigte eine starke Sequenzhomologie zu Mensch und Elefant. Abb. 3.18 zeigt den Abgleich der Konsensus-Sequenzen der drei analysierten Spezies mit Hilfe des ClustalW Programms. Es wird deutlich, dass nicht nur die

Position des Repeats, sondern auch seine Sequenz im Reich der Säugetiere hochkonserviert ist. Allerdings lässt sich der Repeat nicht in anderen Tierreichen finden, seine Existenz ist also auf Spezies, welche genomisches Imprinting aufweisen beschränkt; dies deutet auf eine Funktion in der Imprinting-Regulation der *Dlk1/Gtl2* Region hin.

Maus_Gtl2dsTR_Konsensus	CTTTGATGAAGCTCAGATGTCCAGAAAAGAGGGACCTCTCTGATGTTCCAG 50
Mensch_MEG3dsTR_Konsensus	CTCTGATGAAGCTCAGATGTCCAGAAAAGAGGGACCTCCTTGATGTTCTAG 50
Elephant_Gtl2dsTR_Konsensus	CTCTGATGAAGCTCAGGTGTCCAGAATGAGGGTCC-CCTTGATGTTCCAG 49
	** ***** * * ***** **
Maus_Gtl2dsTR_Konsensus	ATCTAGGACTCTACCTCCAGC 71
Mensch_MEG3dsTR_Konsensus	A-CCAGGACTCCAGCTCCAGC 70
Elephant_Gtl2dsTR_Konsensus	AGCCAGGACTTCAGCTCCAGC 70
	* * ***** * *****

Abbildung 3.18: Sequenzabgleich der Konsensus-Sequenzen des Gtl2/MEG3ds Tandem Repeats der Spezies Maus, Mensch und Elefant mit Hilfe des ClustalW-Programms.

3.1.3.2 Der *Gtl2/MEG3ds* Tandem Repeat zeigt starkes Silencer-Potential in DLAs

Die Identifizierung des *Gtl2/MEG3ds*TR stellt lediglich eine *in silico* gemachte Beobachtung dar. Um Informationen über sein mögliches *cis*-regulatorisches Potential zu erhalten wurden Reporter-Konstrukte hergestellt, welche den humanen bzw. den murinen Tandem Repeat enthalten und in Reporter-Assays getestet (s. Abb. 3.19). Tests auf eine mögliche Promotor-Aktivität verliefen negativ (s. Abb. 3.19 **B-E**). Daraufhin erfolgte der Test auf etwaiges Enhancer/Silencer-Potential des Tandem Repeats.

Beim Vergleich mit der SV40-Promotor-Kontrolle (=100%) zeigte sich in allen vier Test-Konstrukten ein starker Silencer-Effekt. Dieses *cis*-regulatorische Potential ist dabei zwischen Maus und Mensch konserviert und orientierungsunabhängig. Tests in anderen Zelllinien (P19, C2C12) zeigten ähnliche Ergebnisse (s. Anhang Abb. 6.17 und 6.18).

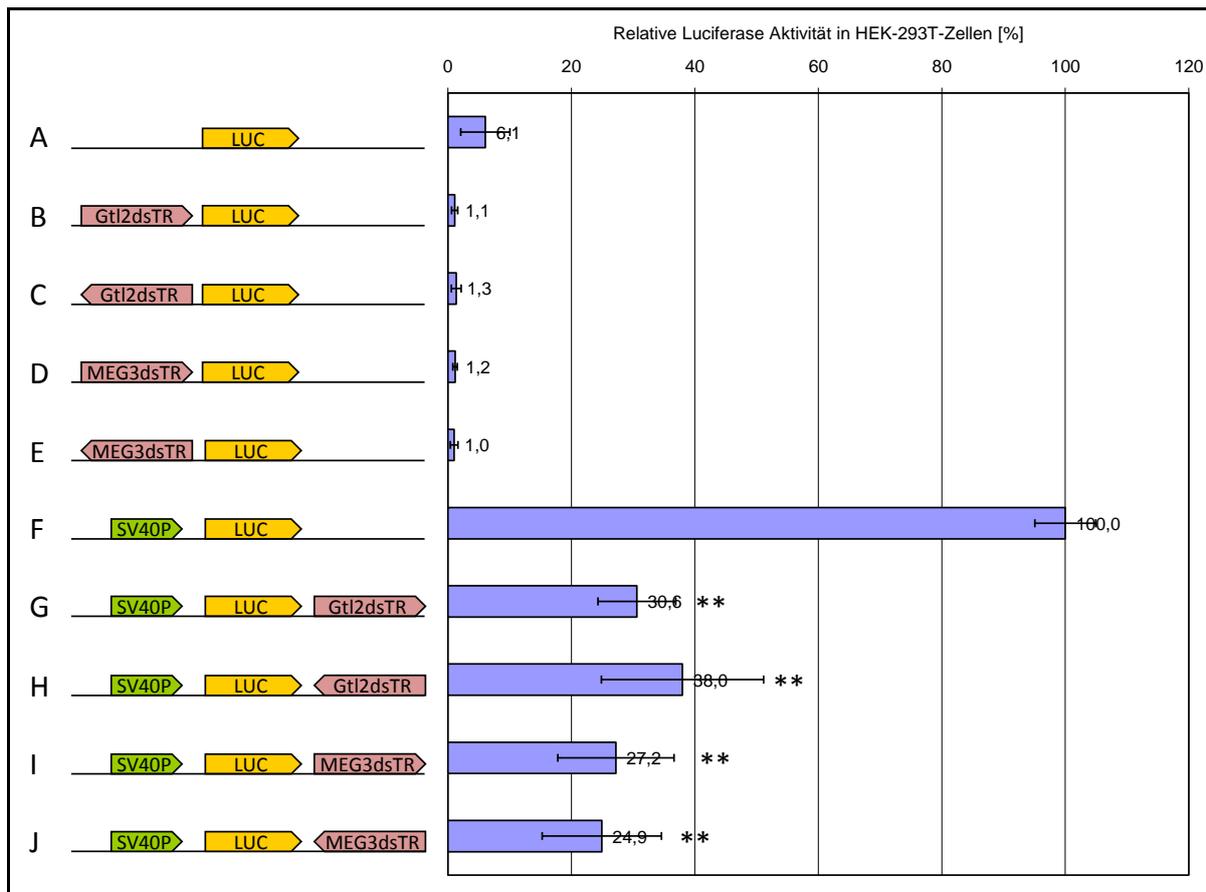


Abbildung 3.19: Der Tandem Repeat stromabwärts von *Gtl2/MEG3* zeigt starke Silencer Aktivität auf den SV40-Promotor in HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (SV40P: SV40-Promotor; Gtl2dsTR: Gtl2 downstream Tandem Repeat; MEG3dsTR: MEG3 downstream Tandem Repeat; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Konstrukt normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der SV40-Kontrolle und den Proben mit TR-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ (**).

3.1.3.3 Der Gtl2dsTR beeinflusst alle getesteten Promotoren der *Dlk1/Gtl2* Region

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der Gtl2dsTR starke Silencer-Wirkung auf den SV40-Promotor ausübt. Als nächstes wurde nun untersucht, ob der Gtl2dsTR auch Silencer-Effekte auf die Promotoren der *Dlk1/Gtl2* Region auszuüben vermag.

Nach Klonierung der Reporter-Plasmide wurden entsprechende Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Figur 3.20 dargestellt. Bei allen transfizierten Promotor-Konstrukten zeigte sich durch Insertion des Tandem Repeats eine verringerte relative Luciferase-Aktivität. Der durch den Repeat verursachte Silencer-Effekt ist für alle getesteten Proben konsistent.

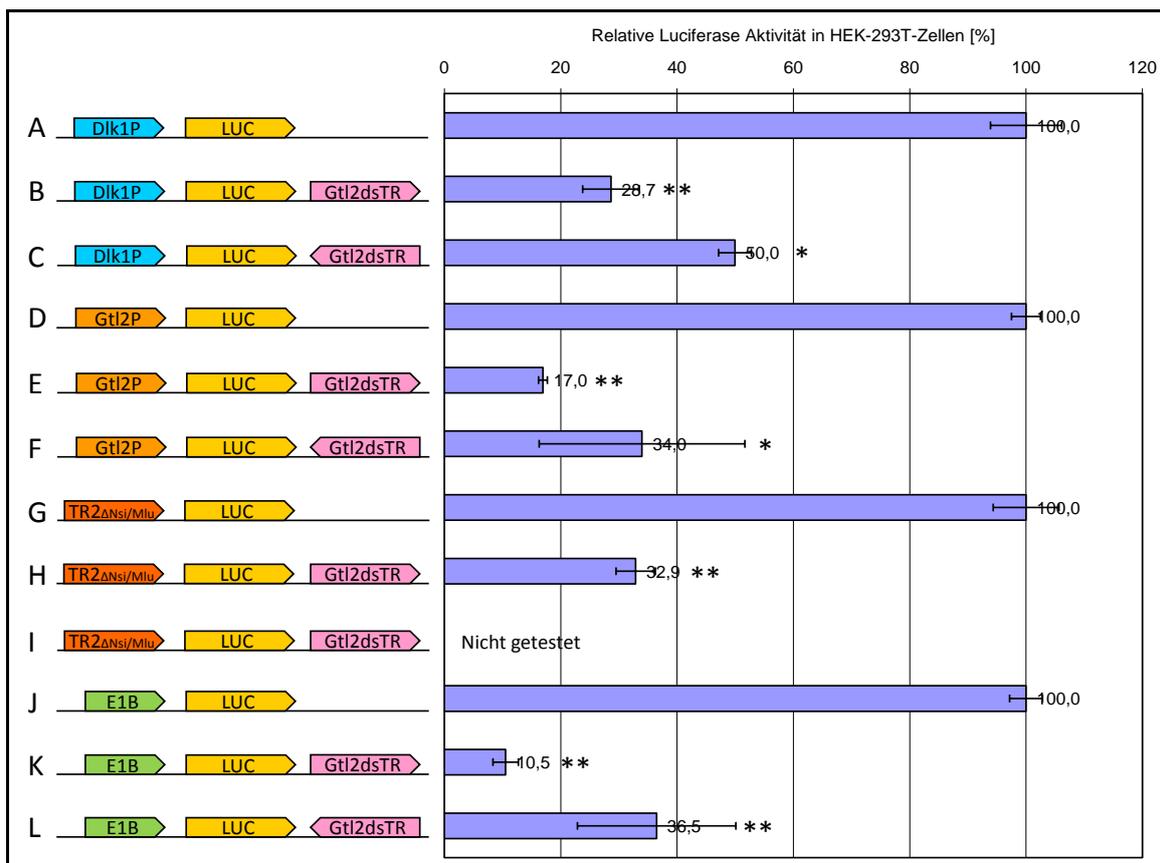


Abbildung 3.20: Der Gtl2dsTR zeigt starke Silencer Aktivität auf die Promotoren der *Dik1*/*Gtl2* Region in HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (*Dik1P*: *Dik1*-Promotor; *Gtl2P*: *Gtl2*-Promotor; TR2: IG-DMR Tandem Repeat 2; E1B: *Begain*-Promotor (Variante Exon 1B); Gtl2dsTR: Gtl2 downstream Tandem Repeat). Im rechten Bereich sind die relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das jeweilige Promotor-Konstrukt ohne Repeat-Insertion normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der jeweiligen Promotor-Kontrolle zu den Proben mit TR-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

3.1.4 Der konservierte IG-DMR Tandem Repeat 1

3.1.4.1 Reporter-Assays zur Analyse von Promotor/Enhancer/Silencer-Aktivität

Nach der Identifizierung des regulatorischen Potenzials des IG-DMR TR2 war es nahe liegend, auch den konservierten IG-DMR TR1/TR1G von Mensch bzw. Maus einer solchen Analyse zu unterziehen. Zum Test auf Promotor-, Enhancer- und Silencer-Aktivität wurden entsprechende Reporter-Plasmide kloniert und anschließend in HEK-293T-Zellen transfiziert (s. Abb. 3.21). Zusammenfassend kann man aus diesen Experimenten folgern, dass weder der murine TR1G noch der menschliche TR1 eine signifikante Promotor-, Silencer- oder Enhancer-Aktivität in den Dual-Luciferase-Assays zeigten.

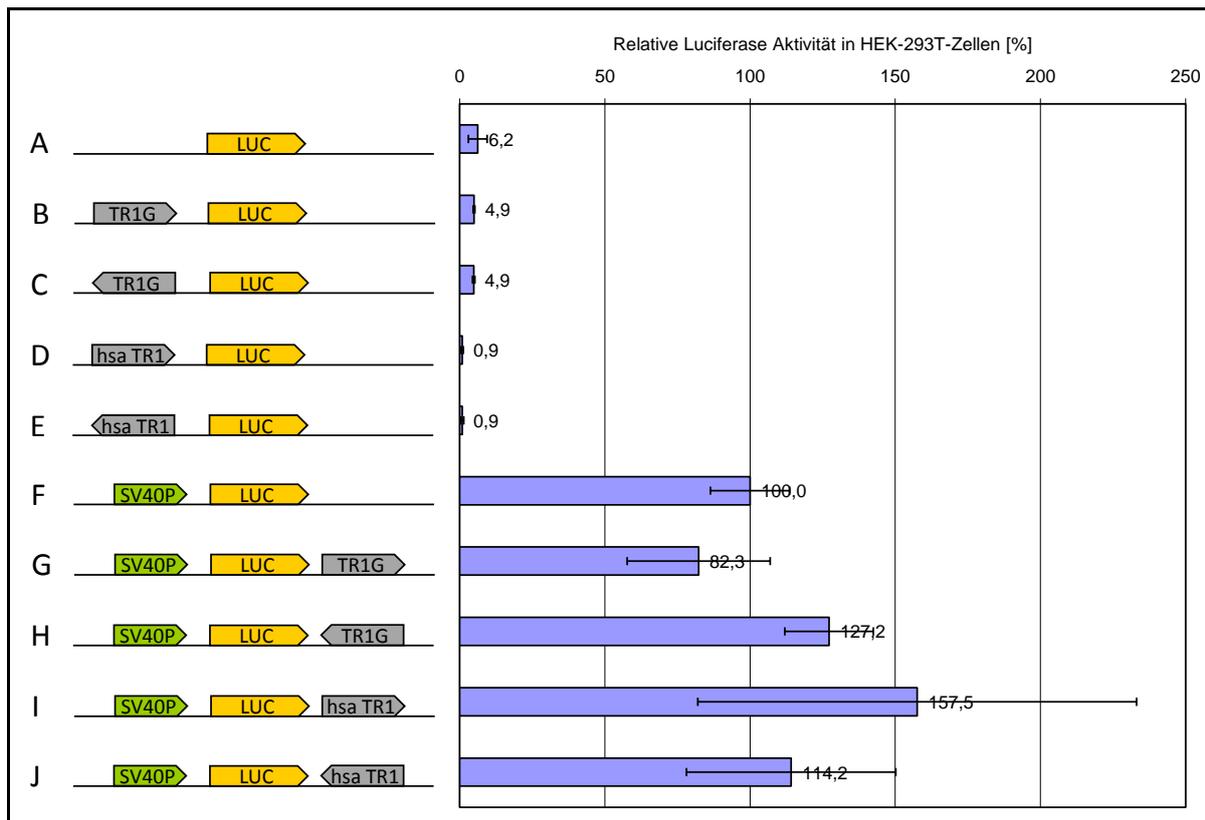


Abbildung 3.21: Der IG-DMR TR1/TR1G zeigt weder Promotor-, noch Enhancer- oder Silencer-Potenzial in HEK-293T-Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; hsa TR1: Mensch IG-DMR Tandem Repeat 1; SV40P: SV40-Promotor; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Konstrukt normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert.

3.1.4.2 Reporter-Assays zur Analyse auf Insulator-Potential des IG-DMR TR1

Eine weitere Möglichkeit neben der Promotor- bzw. Enhancer/Silencer-Aktivität ist die Funktion als isolierendes Element, ein sogenannter Insulator. Dabei dient der Insulator zur Separation zweier *cis*-aktiver Elemente (z.B. wird eine Interaktion zwischen Promotor und Enhancer unterbunden). Dass differentiell methylierte Regionen (DMRs, ICRs) als Insulator wirken können, wurde bereits in anderen Imprinting-Regionen gezeigt (Bell und Felsenfeld 2000; Kanduri et al. 2000; Kanduri et al. 2002; Kurukuti et al. 2006).

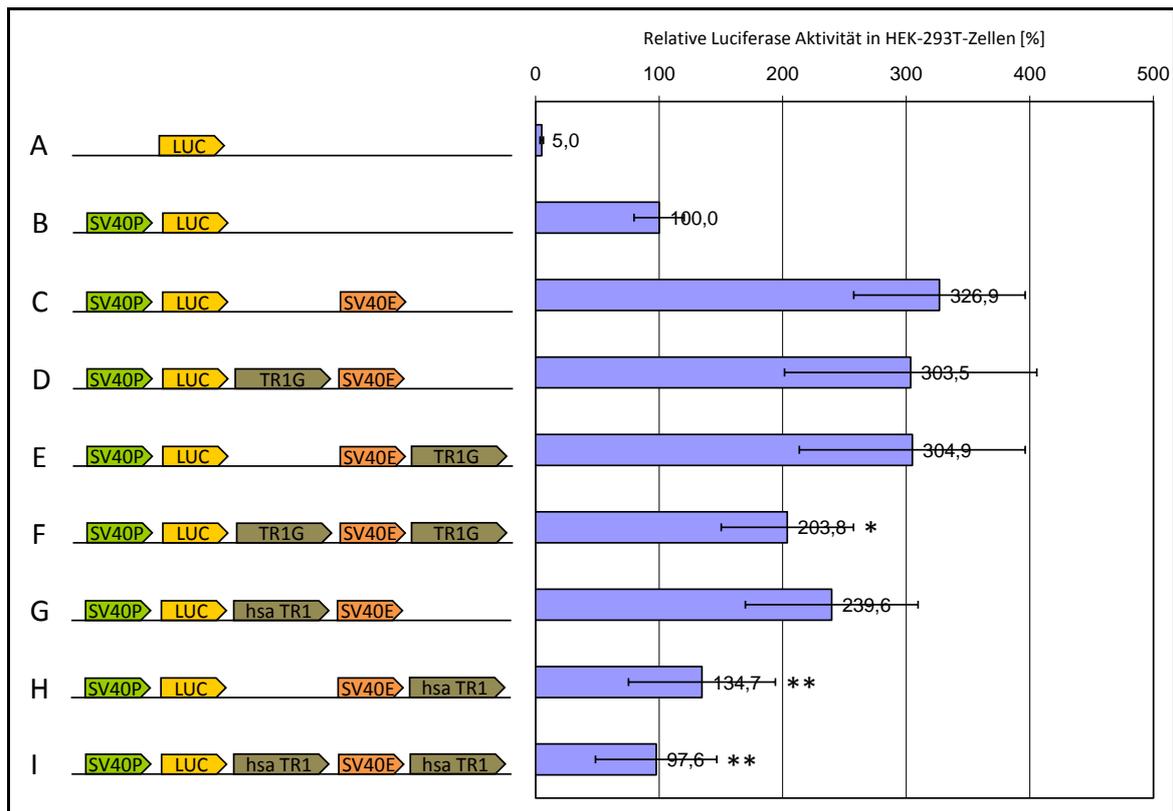


Abbildung 3.22: Der konservierte IG-DMR TR1 zeigt Insulator-Potential HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; hsa TR1: Mensch IG-DMR Tandem Repeat 1; SV40P: SV40-Promotor; SV40E: SV40-Enhancer; LUC: Luciferase Reporter Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Konstrukt normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der SV40-Enhancer-Kontrolle zu den Proben mit TR-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

Aus diesem Grunde wurde ein Reporter-Assay zur Detektion möglichen Insulator-Potentials entwickelt (s. Abb. 3.3 C). Der IG-DMR Tandem Repeat 1 von Mensch bzw. TR1G von Maus wurde in ein Kontroll-Plasmid (pGL3-Control, Promega) zu beiden Flanken des SV40-Enhancers eingebracht und sein Einfluss auf die Promotor-Enhancer-Interaktion untersucht (Abb. 3.22). Wie erwartet, zeigte das SV40-Promotor-Plasmid mit zusätzlichem SV40-Enhancer eine stärkere relative Luciferase-Aktivität als die Kontrolle ohne Enhancer-Element. Bei Insertion des murinen IG-DMR TR1G in dieses Plasmid auf nur einer Flanke des SV40-Enhancers, zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die Interaktion zwischen Promotor und Enhancer. Erfolgte jedoch Insertion des murinen Repeats zu beiden Seiten des Enhancers, nahm die relative Luciferase-Aktivität signifikant ab. Ähnliche, sogar etwas stärkere Effekte

zeigten sich für den humanen TR1. Es handelt sich damit um eine konservierte Insulator-Funktion des Repeats. Eine Erklärung für den stärkeren Effekt des menschlichen Tandem Repeats könnte die unterschiedliche Sequenz bzw. die Anzahl an Einzelkopien des Repeats sein.

3.1.4.3 Reduzierte Insulator-Funktion des Maus IG-DMR TR1G geg. dem *Gtl2dsTR*-Silencer

Im vorangehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der IG-DMR Tandem Repeat 1G von Maus bzw. IG-DMR TR1 von Mensch in den DLAs Insulator-Potential aufweist. Zuvor konnte in Abschnitt 3.1.3.3 mit dem TR stromabwärts des *Gtl2*-Gens ein Element mit starker Silencer-Funktion identifiziert werden. Ein weiterführendes Experiment war nun, die beiden Elemente in Kombination zu testen, also ob der *Gtl2dsTR*-vermittelte Silencing-Effekt durch den murinen IG-DMR Tandem Repeat 1G in seiner Eigenschaft als Insulator wieder aufgehoben/reduziert werden kann. Beim Test der *Gtl2*-Promotor-Konstrukte zeigten alle getesteten Reporter mit zusätzlicher TR1G-Insertion zum Silencer höhere relative Luc-Aktivitäten als die Silencer-Kontrolle alleine (s. Abb. 3.23). Allerdings war diese Steigerung nur in drei von sechs getesteten Proben statistisch signifikant. Im Anhang finden sich Auswertungen ähnlicher Experimente mit dem TR2 Promotor-Element, sowie den *Begain* E1B-, *Dlk1*- und SV40-Promotor-Konstrukten (s. Anhang Abb. 6.20-6.23). Nur bei Experimenten mit dem *Begain* bzw. dem TR2 Promotor-Konstrukten zeigte die Insertion des IG-DMR TR1G stets abschwächenden Einfluss auf die Silencer-Aktivität des *Gtl2dsTR*. Ein Grund könnte sein, dass der *Gtl2dsTR*-Silencer ein sehr starkes *cis*-aktives Element darstellt und trotz TR1G-Repeat-Insertion in der Lage ist, einen Promotor negativ zu beeinflussen (Dominant negativer Effekt). Schon in den vorangehenden Experimenten mit dem SV40-Enhancer zeigte der murine TR1G im Vergleich zum humanen einen schwächeren Insulator-Effekt. Sowohl die unterschiedliche Konsensus-Sequenz, als auch die unterschiedliche Anzahl an Einzelkopien im repetitiven Element könnten Gründe hierfür sein. Dies müsste systematisch untersucht werden. Ein Experiment ähnlich dem hier vorliegenden, jedoch mit dem humanen TR1 an Stelle des murinen TR1G wird gegenwärtig in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Als Erweiterung ist zusätzlich noch geplant, den TR1 vom Schaf zu testen, da in dieser Spezies der Repeat 38 Einzelkopien umfasst und damit wesentlich größer ist. Sollte ein Zusammenhang von Insulator-Potential und Tandem Repeat Größe bzw. Anzahl an

Einzelkopien des Repeats bestehen, wäre hier ein stärkerer Insulator-Effekt als beim Maus- bzw. Mensch-Repeat zu erwarten. Da auch im Bereich des IG-DMR TR1 mehrere putative Runx1-Bindestellen identifiziert werden konnten (s. Tab. 3.1; s. Abb. 6.6), wurde obiges Experiment mit zusätzlicher Runx1-Kotransfektion durchgeführt. Die Tests zeigten allerdings keinen signifikanten Einfluss von Runx1-Kotransfektion auf das TR1-Element (s. Abb. 6.24).

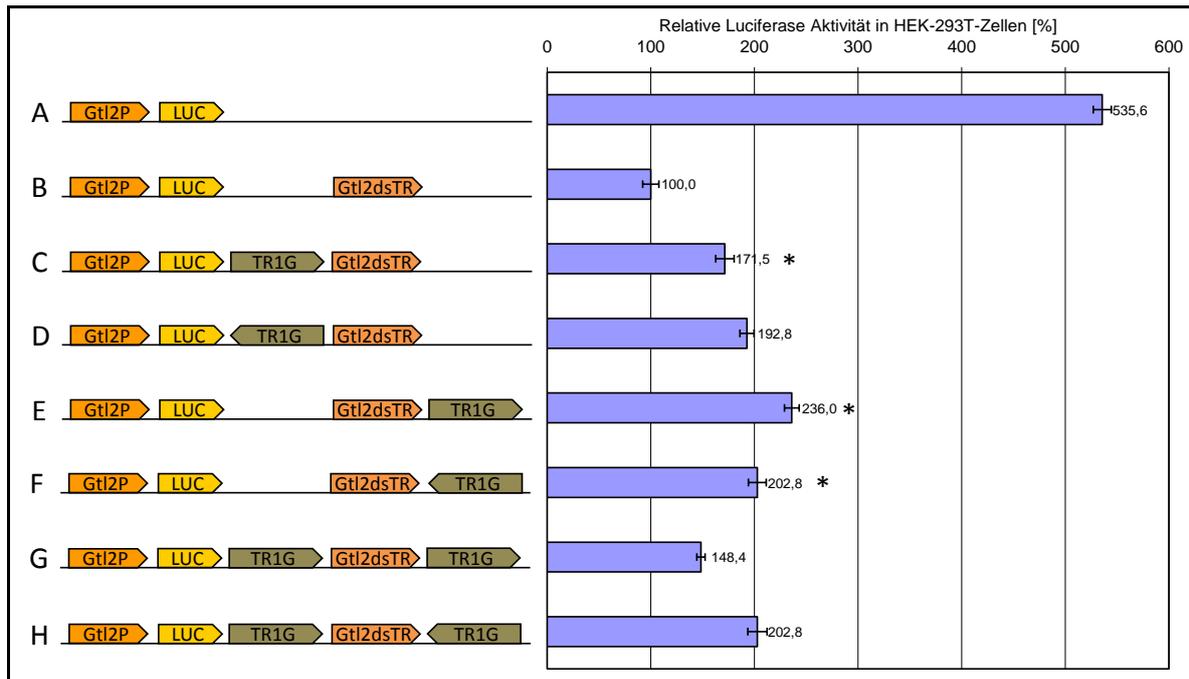


Abbildung 3.23: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G gegenüber dem Gtl2dsTR-Silencer in HEK-293T-Zellen. Links sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (mmu TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; *Gtl2dsTR*: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; *Gtl2P*: *Gtl2*-Promotor; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das *Gtl2*-Promotor-Konstrukt inklusive dem *Gtl2dsTR*-Silencer normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der Kontrolle (*Gtl2P*+*Gtl2dsTR*) zu den Proben mit TR1-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*).

3.1.5 Der nicht-konservierte Tandem Repeat stromaufwärts von *Gtl2*

3.1.5.1 *In silico*-Analyse

Da die detaillierte *in silico*-Analyse der murinen IG-DMR und die Charakterisierung der dort identifizierten Tandem Repeats zu interessanten Ergebnissen führte, wurde auch die *Gtl2*-DMR im 5'-Bereich des *Gtl2*-Gens analysiert. Wie in der IG-DMR wurde auch hier mit dem Programm „Tandem Repeat Finder“ nach repetitiven Elementen gesucht. Im Bereich der *Gtl2*-DMR konnte kein Tandem Repeat identifiziert werden, allerdings fand sich in

unmittelbarer Umgebung, 3 kb stromaufwärts ein solches Element (AJ320506 nt 90107-90590). Aufgrund seiner Lage wird er im Folgenden als **Tandem Repeat stromaufwärts von *Gtl2*** bezeichnet (*Gtl2usTR* für „*Gtl2* upstream Tandem Repeat“). Dieser Repeat besteht in der Maus aus drei Einzelkopien einer Konsensus-Sequenz von 158 Basen. Auch in der Ratte konnte der Repeat identifiziert werden und zeigte dabei hohe Übereinstimmung mit der Maus (RNOR03303428, nt 14796-15262) (s. Abb. 3.24; Abb. 6.7). In anderen Säugetieren fand sich dieses Element jedoch nicht, es muss also als nagerspezifisch angesehen werden.

Maus_Gtl2usTR_Konsensus	TAGGAAGGGGTTTGGAAAGCATGTGGCCAGAGATATCTGGGCATCTGGAG	50
Ratte_Gtl2usTR_Konsensus	TAGGAAGGGGTTTGGAAAGCATGTGGCCAGAGATATCTGGGCATCTGGAG	50

Maus_Gtl2usTR_Konsensus	GACAGTGACGTTTTAGGGGAACCTCTGGAAGTGCTTTTCCGGGCAGCATTTA	100
Ratte_Gtl2usTR_Konsensus	GACAGTGACGTTTTAGGGGAACCTCTGGAAGTGCTTTTCCGGGCAGCATTTA	100

Maus_Gtl2usTR_Konsensus	TATGCTGTTTTACAACAGAAGCTCAGCATGGTTTTACAAGTGCATTATTCT	150
Ratte_Gtl2usTR_Konsensus	TATGCTGTTTTACAACAGAAGCTCAGCATGGTTTTACAAGTGCATTATTCT	150

Maus_Gtl2usTR_Konsensus	CTGTGGGT	158
Ratte_Gtl2usTR_Konsensus	CTGTGGGT	158

Abbildung 3.24: Abgleich der Maus bzw. Ratte Konsensus-Sequenzen des *Gtl2usTR* mit Hilfe des ClustalW-Programms zeigt komplette Übereinstimmung. Abgleiche der Einzelkopien sind unter Abb. 6.7 zu finden.

3.1.5.2 Reporter-Assays mit dem *Gtl2usTR*-Element

Um mehr über die mögliche Funktion des *Gtl2usTR* zu erfahren, wurde der Repeat an entsprechende Positionen von Reporter-Plasmiden eingefügt und anschließend Transfektions-Experimente in HEK-293T-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der DLAs sind in Abb.3.25 aufgezeigt. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass der Tandem Repeat stromaufwärts des *Gtl2*-Gens in den Reporter-Assays keine *cis*-regulatorische Funktionalität zeigte. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der Tatsache, dass das Element nur geringe Konservierung aufweist, wurde auf weitergehende Experimente verzichtet.

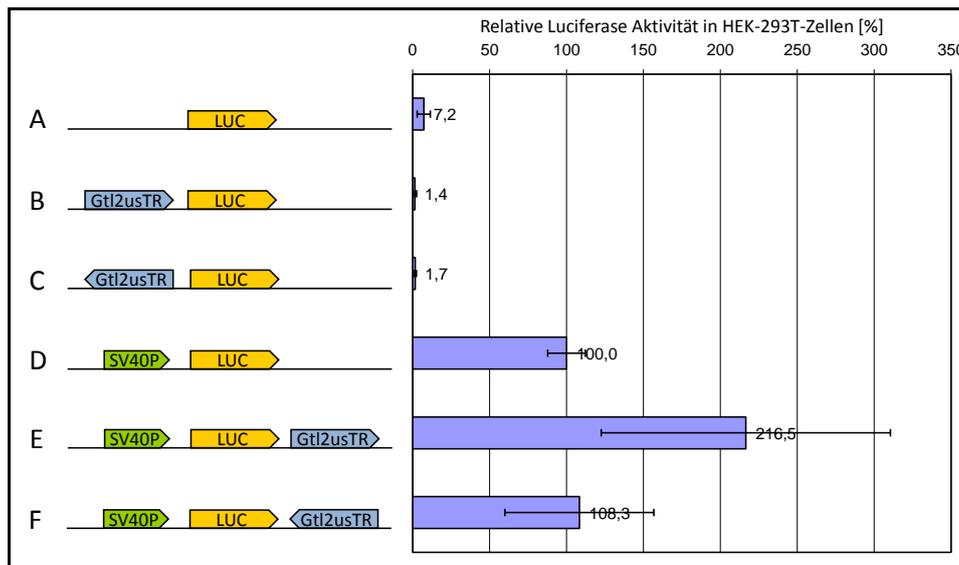


Abbildung 3.25: Der Gtl2usTR zeigt kein signifikantes *cis*-regulatorisches Potential in HEK-293T Zellen. Links sind die benutzten Reporter schematisch dargestellt. Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (Gtl2usTR: *Gtl2* upstream Tandem Repeat; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Konstrukt ohne Repeat-Insertion normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert.

3.2 Funktionelle Analyse *trans*-agierender Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region

In den vorangehenden Abschnitten wurden verschiedene konservierte und nicht-konservierte Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region auf ihr regulatorisches Potential in *cis* analysiert. Andererseits wurde z.B. für die durch *Rtl1as* kodierten miRNAs gezeigt, dass sie *in trans* die Expression von *Rtl1* post-transkriptionell regulieren (Davis et al. 2005). Dies verdeutlicht, dass in der *Dlk1/Gtl2* Region auch *trans*-agierende Mechanismen von Bedeutung sind. Mit über 50 identifizierten miRNAs beinhaltet die *Dlk1/Gtl2* Region den größten bekannten miRNA-Cluster im Maus-Genom (Seitz et al. 2003; Hagan et al. 2009). Die Identifizierung der Targets aller miRNAs des Clusters stellt eine enorme molekularbiologische Herausforderung dar, ist jedoch zum Verständnis der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region essentiell.

Da sich die Identifizierung von miRNA-Zielsequenzen im Labor kompliziert gestaltet und nur durch hohen technischen Aufwand erreicht wird, wird versucht die Funktion von microRNAs durch *in silico* Analysen zu untersuchen. Da jedoch die genauen Mechanismen der miRNA-Zielerkennung noch nicht vollständig verstanden sind, ist dies i.d.R. mit Problemen

verbunden (z. B. hohe Anzahl an falsch-Positiven bzw. falsch-Negativen). Aus diesem Grunde müssen alle theoretischen Vorhersagen individuell im Labor untersucht und verifiziert werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es u.a. ein Testsystem zum Nachweis miRNA-induzierter RNAi-Effekte zu entwickeln. Dazu wurden exemplarisch fünf miRNAs der *Dlk1/Gtl2* Region ausgewählt (mir-134, mir-154, mir-323, mir-409 und mir-411, s. Abb. 3.27) und in einem Reporter-Assay auf ihre Fähigkeit RNAi-Effekte zu induzieren getestet. Neben artifiziellen (100%igen) Bindestellen wurden auch natürliche *in silico* vorhergesagte Bindestellen in die Analyse mit aufgenommen.

3.2.1 Prinzip des DLAs zur Detektion von RNAi-Effekten

Um potentielle RNA-Interferenz-Effekte zu detektieren wurde der in den vorangehenden Abschnitten angewandte Dual-Luciferase-Assay modifiziert (s. Abb. 3.26).

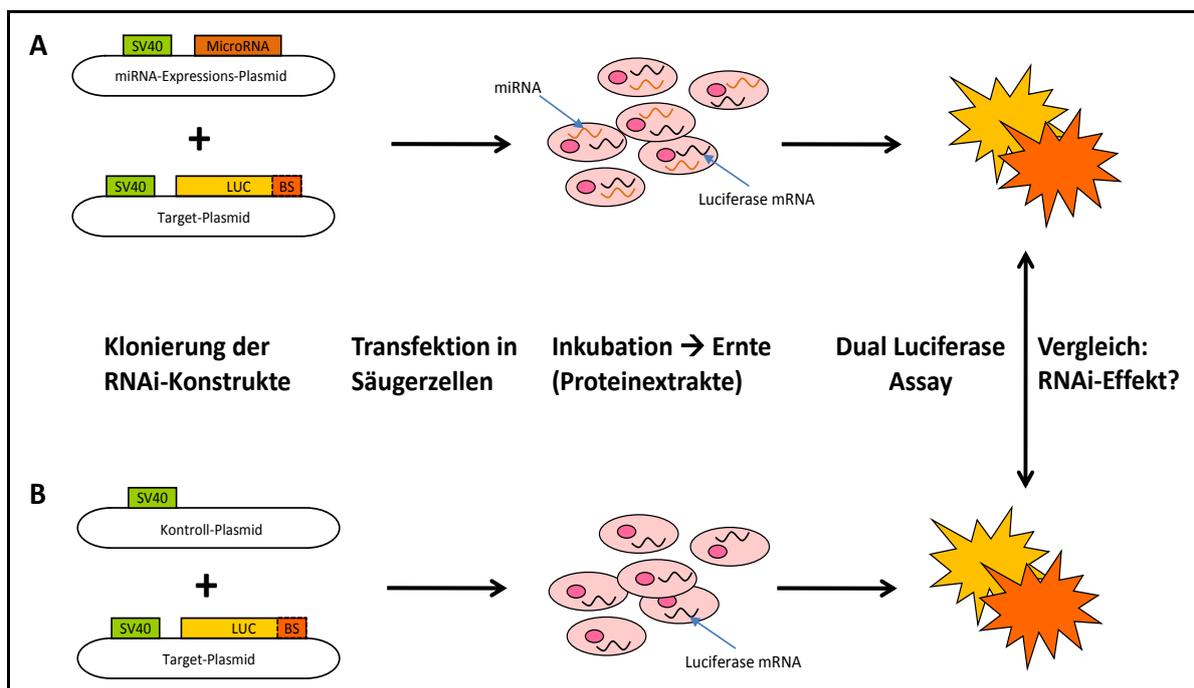


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung des DLAs zur Detektion von miRNA-induzierten RNAi-Effekten. (A) Die RNAi-Plasmide werden durch Transfektion in Säugerzelllinien eingebracht. Während der Inkubation werden die miRNAs prozessiert und binden an die eingefügte Bindestelle (BS) der Luciferase mRNA, wodurch ein RNAi-Effekt induziert wird. Anschließend erfolgt ein DLA mit den gewonnenen Proteinextrakten. **(B)** Statt eines miRNA-Expressions-Plasmides wird ein Kontroll-Plasmid kotransfiziert. Die hier gemessene Luciferase-Aktivität wird als 100%-Wert gesetzt und mit der miRNA-Transfektion verglichen.

Dazu wird in den 3'UTR-Bereich des Luciferase-Gens eine putative Bindestelle für eine bestimmte miRNA eingefügt. Wird dieser Luciferase-Reporter (auch als Target-Konstrukt bezeichnet) und die betreffende miRNA in Zelllinien kotransfiziert, kann die miRNA durch Anlagerung an die Bindestelle einen RNAi-Effekt induzieren. Dies sollte negativen Einfluss auf die Luciferase-Protein-Produktion haben und in einer verringerten relativen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Transfektionen ohne miRNA resultieren.

3.2.2 microRNA-Expressions-Plasmide

Um Experimente zur Detektion von RNAi-Effekten durchführen zu können, mussten zunächst Vektoren zur kontrollierten miRNA-Expression hergestellt werden; dies war im Falle der miRNA-154 bereits Gegenstand meiner Diplomarbeit „RNA-Interferenz-Effekte durch Transfektion des miRNA-154-Precursors in Säugetierzellen“ (2005) und ist dort detailliert beschrieben.

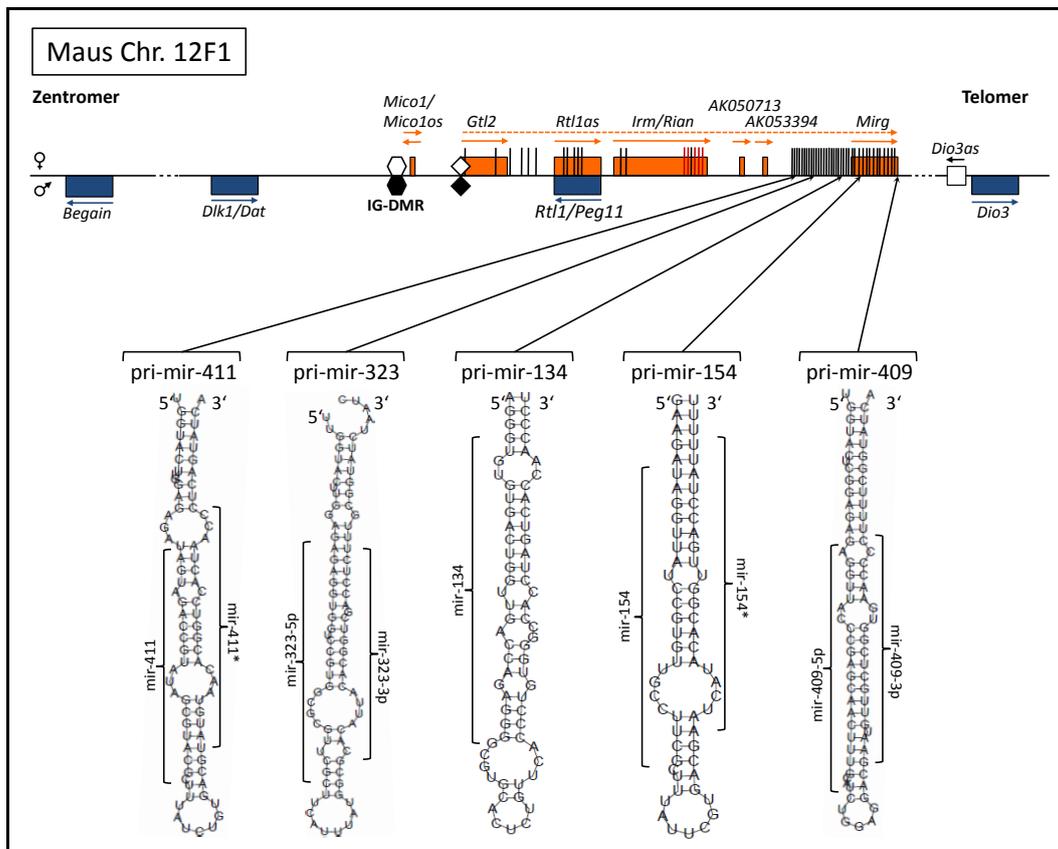


Abbildung 3.27: Haarnadel-Strukturen der mir-134, -154, -323, -409 bzw. -411-Vorläufer (Precursor) mit Hilfe des Programms RNAfold. Die aus den Vorläufern hervorgehenden reifen miRNAs sind durch Klammern gekennzeichnet. (miRNA-Sequenzen: Rfam-Datenbank; Legende: s. Abb. 1.7)

Zur Überexpression der mir-134, mir-323, mir-409 bzw. mir-411 wurden die entsprechenden miRNA-Gene mit je ungefähr 100 Basenpaaren flankierender Sequenz in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 eingefügt (vgl. 2.17). Aus den jeweiligen pri-miRNA-Vorläufern werden jeweils zwei reife miRNAs prozessiert (außer mir-134); je eine vom 5' Arm bzw. dem 3' Arm des Stammes der Haarnadelschleife (Hairpin). Bei der mir-154 und mir-411 unterscheidet man sie aus historischen Gründen als mir-154 und mir-154* bzw. mir-411 und mir-411*, während die reifen microRNAs der mir-323- bzw. mir-409-Precursor als mir-323-5p und mir-323-3p bzw. mir-409-3p und mir-409-5p bezeichnet werden (s. Abb. 3.27).

3.2.3 Northern-Blot Hybridisierung zur direkten miRNA-Detektion

Einige der klonierten miRNA-Plasmide wurden mit Hilfe von Northern-Blot Hybridisierung auf korrekte Expression und Prozessierung der reifen miRNAs überprüft. Dazu wurden die Vektoren in HEK-293T-Zellen per Transfektion eingebracht. Nach 48 stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA extrahiert.

Anschließend wurde eine Northern-Blot Hybridisierung zur miRNA-Detektion durchgeführt; dieser Teil des Experimentes wurde von Dipl. Biol. Daniel Jans durchgeführt (als Teil der von mir betreuten Diplomarbeit „Detektion und RNA-Interferenz-Effekte dreier microRNAs der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region nach Transfektion in Säugerzellen“ (2008)). Die Methode ist dort detailliert beschrieben. Abbildung 6.25 im Anhang zeigt exemplarisch Northern Blots der Transfektionen, welche mit Sonden für verschiedene miRNAs (mir-135, mir-154* mir-323-3p) hybridisiert wurden. Die Northern-Blot Hybridisierung mit einer Sonde für die mir-154* zeigt ein deutliches Signal in der mit dem mir-154-Plasmid transfizierten Probe. Die genaue Größe des Signals konnte nicht bestimmt werden, da der verfügbare Größenstandard die kleinste Bande bei 50 Nukleotiden besitzt. Das detektierte Signal liegt jedoch im Größenbereich wo in etwa eine reife miRNA zu erwarten ist (ca. 21 nt). Dies spricht dafür, dass es sich tatsächlich um ein spezifisches Signal der mir-154* handelt. Die mir-154* wird also durch Transfektion des mir-154-Plasmides in HEK-293T-Zellen exprimiert und korrekt prozessiert. In der mit dem mir-323-Plasmid transfizierten Probe ist ebenfalls eine leichte Färbung des Röntgenfilms zu beobachten, was evtl. durch eine Kreuzhybridisierung aufgrund der Ähnlichkeit der beiden miRNAs hervorgerufen werden könnte (s. Anhang Abb. 6.8). Wurde mit einer Sonde für die mir-323-3p hybridisiert, war das

Signal auf dem Röntgenfilm wesentlich schwächer, was auf eine weniger effiziente miRNA-Prozessierung der mir-323-3p im Vergleich zur mir-154* hinweist. Auch in diesem Fall zeigte sich eine Kreuzhybridisierung, dieses Mal in der Probe mit der mir-154-Transfektion. Die Tatsache, dass in der untransfizierten bzw. pSG5-transfizierten Kontrolle die beiden Signale nicht zu beobachten waren, spricht dafür, dass es sich um spezifische Signale von den reifen miRNAs handelt.

3.2.4 *In silico* Vorhersage von miRNA Bindestellen

Um eine Vorauswahl möglicher miRNA-Target-Kandidaten zu erhalten wurden verschiedene miRNA-Target-Vorhersage-Programme herangezogen. Diese unterscheiden sich in diversen Parametern (z.B. Konservierung, Bindungsenergie, etc.) erheblich voneinander. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe ein Programm entwickelt, das die einzelnen Vorhersage-Programme miteinander zu kombiniert (Kircher et al. 2008). Freundlicherweise wurden die Vorhersagen für die murine mir-154 von M. Kircher, M. Sc. zur Verfügung gestellt. Vier der fünf besten Vorhersagen wurden gewählt und in die experimentellen Tests aufgenommen. Ferner wurden putative Zielgene nach Vorhersage anderer Programme herangezogen (s. Tab. 3.2). Da für die mir-134 mit *Limk1* bereits ein verifiziertes Target bekannt ist, wurde dieses als Positiv-Kontrolle für RNAi-Effekte herangezogen. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass **keines** der genutzten Vorhersage-Programme die mir-134:*Limk1*-Interaktion treffend voraussagen konnte. Für das *Dlk1*-Gen gab keiner der verwendeten Algorithmen eine putative Bindestelle für die getesteten miRNAs an. Dennoch wurde der 3'UTR-Bereich dieses Gens getestet, da bereits mit *Rtl1* ein Gen der *Dlk1/Gtl2* Region durch miRNAs des Imprinting-Clusters reguliert wird und eine mögliche post-transkriptionelle Regulation von *Dlk1* über RNAi-Mechanismen als plausibel scheint. Für alle putativen miRNA-Targets wurde mit Hilfe des RNAhybrid-Programmes die Anlagerung der miRNA an die Ziel-mRNA berechnet (s. Anhang Abb. 6.9).

Tabelle 3.2: Getestete miRNA-Target-Gene und die zur Identifizierung der putativen Bindestellen genutzten Vorhersagen.

Target-Gen (Maus)	miRNA (Maus)	Vorhersage	Bemerkung
<i>Col1a1</i>	mir-154	Rusinov et al. 2005 (Microinspector)	Konservierung nicht berücksichtigt; nur Bindungsenergie wird berechnet
<i>Col1a2</i>	mir-154	Rusinov et al. 2005 (Microinspector)	
<i>Ayt12</i>	mir-154, mir-134	Rusinov et al. 2005 (Microinspector)	
<i>Actb</i>	mir-154	Rusinov et al. 2005 (Microinspector)	Konservierung berücksichtigt; Bindungsenergie und Bindung i. d. Seed-Region bilden einen Score-Wert
<i>Calm3</i>	mir-323	John et al. 2004 (Miranda)	
<i>Sos2</i>	mir-154	John et al. 2004 (Miranda)	verifiziert, ohne Verwendung einer <i>in silico</i> Vorhersage
<i>Limk1</i>	mir-134	Schratt et al. 2006	
<i>Arhgap27</i>	mir-154	Kircher et al. 2008	<i>In-silico</i> Vorhersagen durch Miranda, RNA-Hybrid und Microinspector werden in einem Score-Wert zusammengefasst (Analysen mit/ohne Berücksichtigung der Konservierung)
<i>Scn5a</i>	mir-154	Kircher et al. 2008	
<i>P2rx7</i>	mir-154	Kircher et al. 2008	
<i>5031439G07Rik</i>	mir-154	Kircher et al. 2008	
<i>P68</i>	mir-154	Miranda et al. 2006 (RNA22)	
<i>Ube3a</i>	mir-154	Miranda et al. 2006 (RNA22)	Konservierung nicht berücksichtigt; 3D-Struktur wird berücksichtigt
<i>Dlk1</i>	?	keine	Möglicher Kandidat da in <i>Dlk1/Gtl2</i> -Region

3.2.5 Konstruktion der RNAi-Reporter-Plasmide

Wie bereits erwähnt wurden für die sogenannten Target-Konstrukte Zielsequenzen für die verschiedenen miRNAs in den 3' Bereich der Luciferase eingefügt. Als Positivkontrollen wurden perfekte Bindestellen für die jeweiligen miRNAs eingebracht. Diese wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden (Metabion) in das Reporterplasmid eingebracht.

Bei den natürlichen, putativen miRNA-Bindestellen wurde wahlweise die Bindestelle alleine oder ein Teil der genomischen Umgebung in den Luciferase-Reporter eingebracht.

3.2.6 Dual Luciferase-Assays zur Detektion von RNAi-Effekten

Um zu überprüfen, ob das Testsystem im Prinzip funktioniert, wurden zunächst Luciferase-Reporter mit je einer perfekten Bindestelle für die testeten miRNAs in HEK-293T-Zellen transfiziert. Dazu wurde die jeweils entsprechende miRNA in Form ihres Expressionsplasmides kotransfiziert.

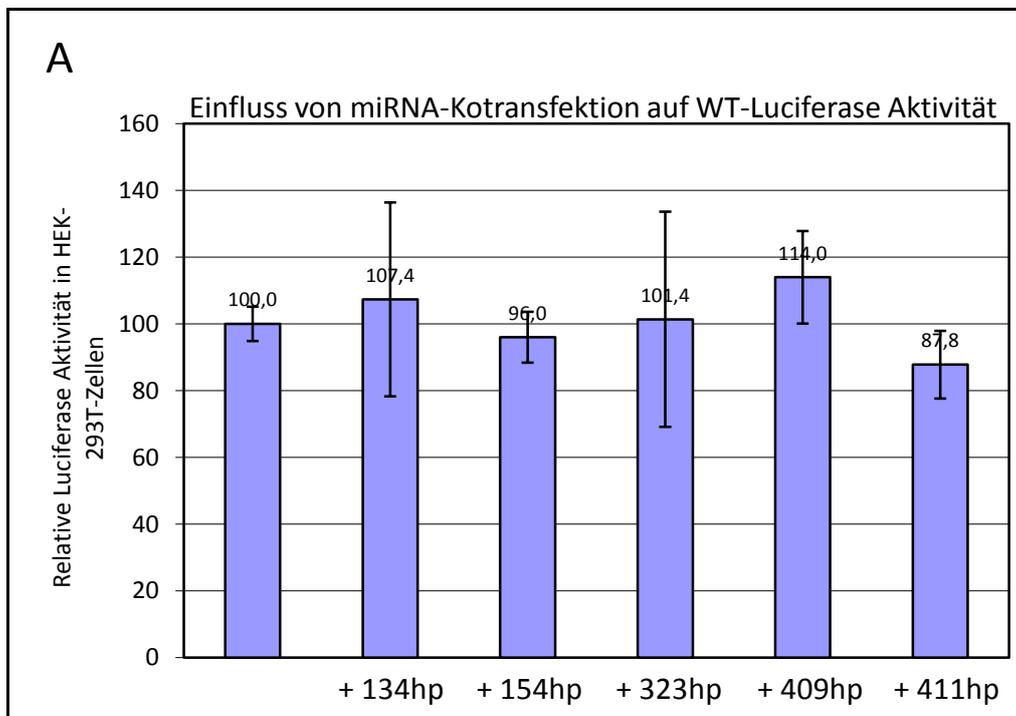
Bei Kontroll-Experimenten (Kotransfektion von miRNA-Expressions-Plasmiden mit Reportern ohne entsprechende miRNA-Bindestelle) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der rel. Luciferase-Aktivität im Vergleich zur pSG5-Kontrolltransfektion (= 100%, s. Abb. 3.28 A).

Besatz der Luciferase-Reporter jedoch eine perfekte Bindestelle für eine miRNA, reduzierte sich in der Transfektion mit der entsprechenden miRNA die relative Luciferase-Aktivität drastisch (s. Abb. 3.28 B): Bei Insertion einer Bindestelle für die mir-154 war nur noch eine

Restaktivität von 11,5% im Vergleich zur Kontrolltransfektion zu messen. Wurde eine mir-154*-Bindestelle in den Luciferase-Reporter eingefügt, zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Es zeigten sich also signifikante RNAi-Effekte für beide reifen miRNAs, die aus dem mir-154-Precursor hervorgehen. Dies spricht für eine korrekte Prozessierung sowohl der mir-154 als auch der mir-154*. Als zusätzliche Kontrolle wurden stets Transfektionen einer miRNA, welche nicht zum Target-Konstrukt passt, durchgeführt. In diesen Fällen traten erwartungsgemäß keine RNAi-Effekte auf.

Wurden perfekte Bindestellen für die mir-323-3p bzw. 323-5p getestet, zeigte sich auch nur in der entsprechenden miRNA-Transfektion ein signifikanter RNAi-Effekt. Bei letzterer war der RNAi-Effekt schwächer als bei den anderen miRNA-Bindestellen, aber immer noch signifikant. Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei der Prozessierung des mir-323-Vorläufers die mir-323-3p bevorzugt in den RISC-Komplex eingebaut wird.

Ähnliche Beobachtungen konnten für die mir-409-3p und mir 411* gemacht werden. Hier zeigten sich bei Kotransfektion der entsprechenden miRNA schwache aber signifikante RNAi-Effekte. Interessanterweise konnten für die mir-134 keine RNAi-Effekte beobachtet werden. Die Ursachen hierfür sind zu diskutieren.



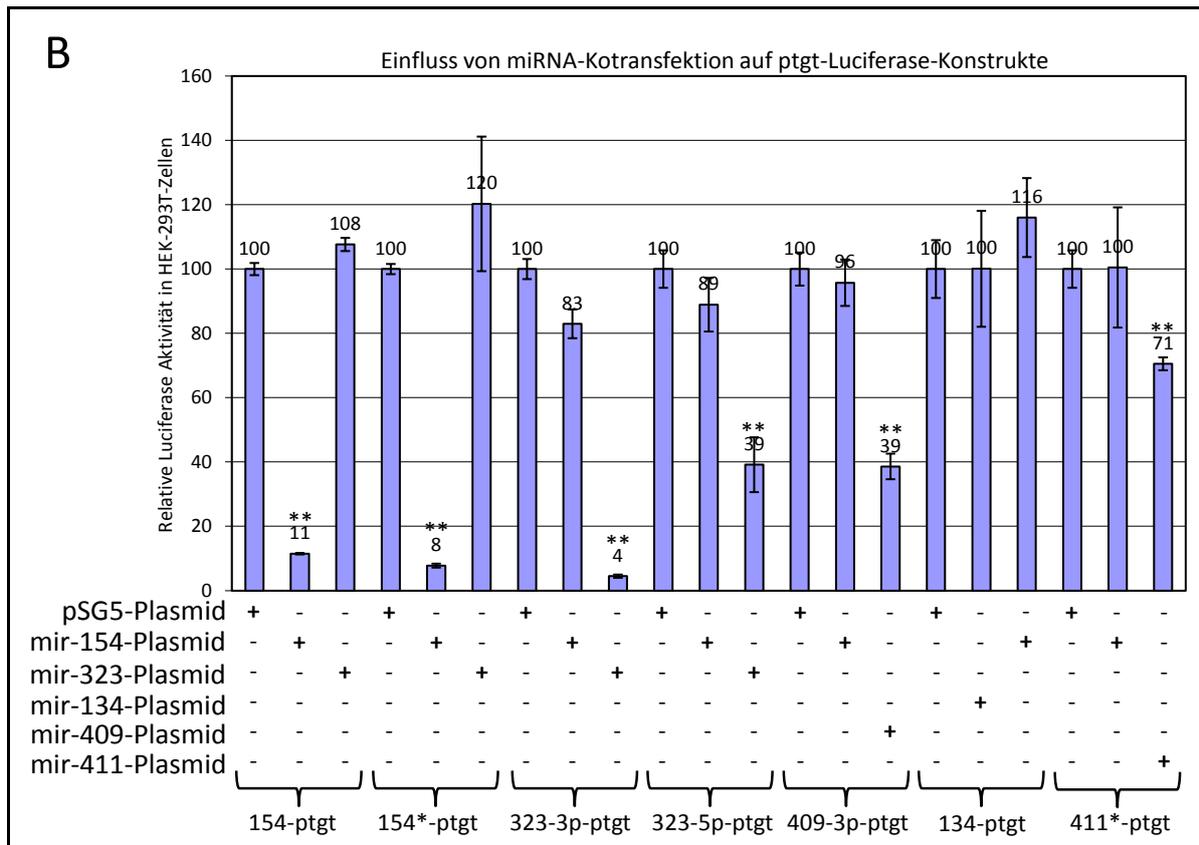


Abbildung 3.28: Dual Luciferase-Assay zur Detektion von RNAi-Effekten in HEK-293T-Zellen. HEK-293T-Zellen wurden mit je 40 ng Luciferase-Reporter ohne (A) bzw. mit (B) perfekter Bindestelle für die angegebene miRNA im 3'UTR-Bereich transfiziert. Wahlweise wurden 250 ng miRNA-Expressions- bzw. Kontroll-Plasmid kotransfiziert. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der Kontrolle zu den Proben mit miRNA-Kotransfektion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ (**). (UT: Untransfiziert; WT: Wildtyp; ptgt: perfektes target (=Zielsequenz))

Nach den Positiv-Kontrollen wurden nun putative natürliche Bindestellen auf RNAi-Effekte getestet. Dazu wurden analog dem oben beschriebenen Experiment Transfektionen durchgeführt mit dem Unterschied, dass in den Luciferase-Reportern die vorhergesagten, natürlichen miRNA-Bindestellen (s. Tab. 3.2) eingefügt wurden (s. Abb. 2.2).

Alle Transfektionen von Reportern mit potentiellen Bindestellen für die getesteten miRNAs wurden stets gegen die pSG5-Kontroll-Transfektion normalisiert (=100%). Bei allen getesteten Reportern zeigte sich bei miRNA-Kotransfektion kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (als RNAi-Effekt wurde eine Reduktion der rel. Luc-Aktivität um mehr als 30% angesehen). Es konnte also kein RNA-Interferenz-Effekt detektiert werden. Lediglich bei Insertion der *Scn5a*- bzw. des *P2rx7*-3'UTRs zeigte sich ein konsistenter Unterschied im Vergleich zur pSG5-Kontrolltransfektion (s. Abb. 3.29).

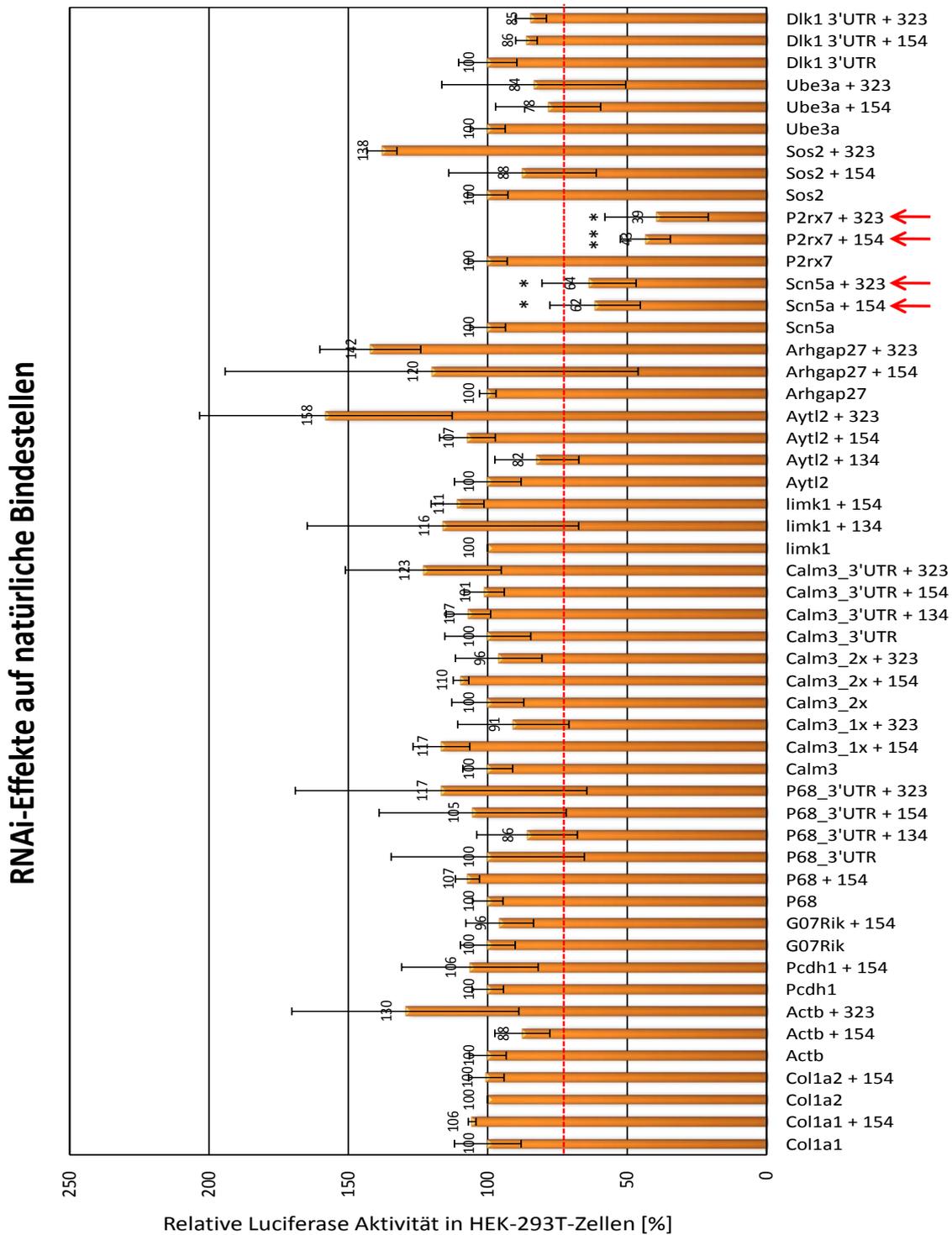


Abbildung 3.29: Luciferase-Assay zur Detektion von RNAi-Effekten auf natürliche miRNA-Bindestellen in HEK-293T-Zellen. HEK-293T-Zellen wurden mit je 40 ng Luciferase-Reporter mit bzw. ohne putative Bindestelle im 3'UTR-Bereich transfiziert. Wahlweise wurden 250 ng miRNA-Expressions- bzw. Kontroll-Plasmid kotransfiziert. Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Transfektionen, die einen konsistenten RNAi-Effekt zeigten sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Analyse auf signifikanten Unterschied der Kontrolle zu den Proben mit miRNA-Kotransfektion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ (**).

3 Ergebnisse

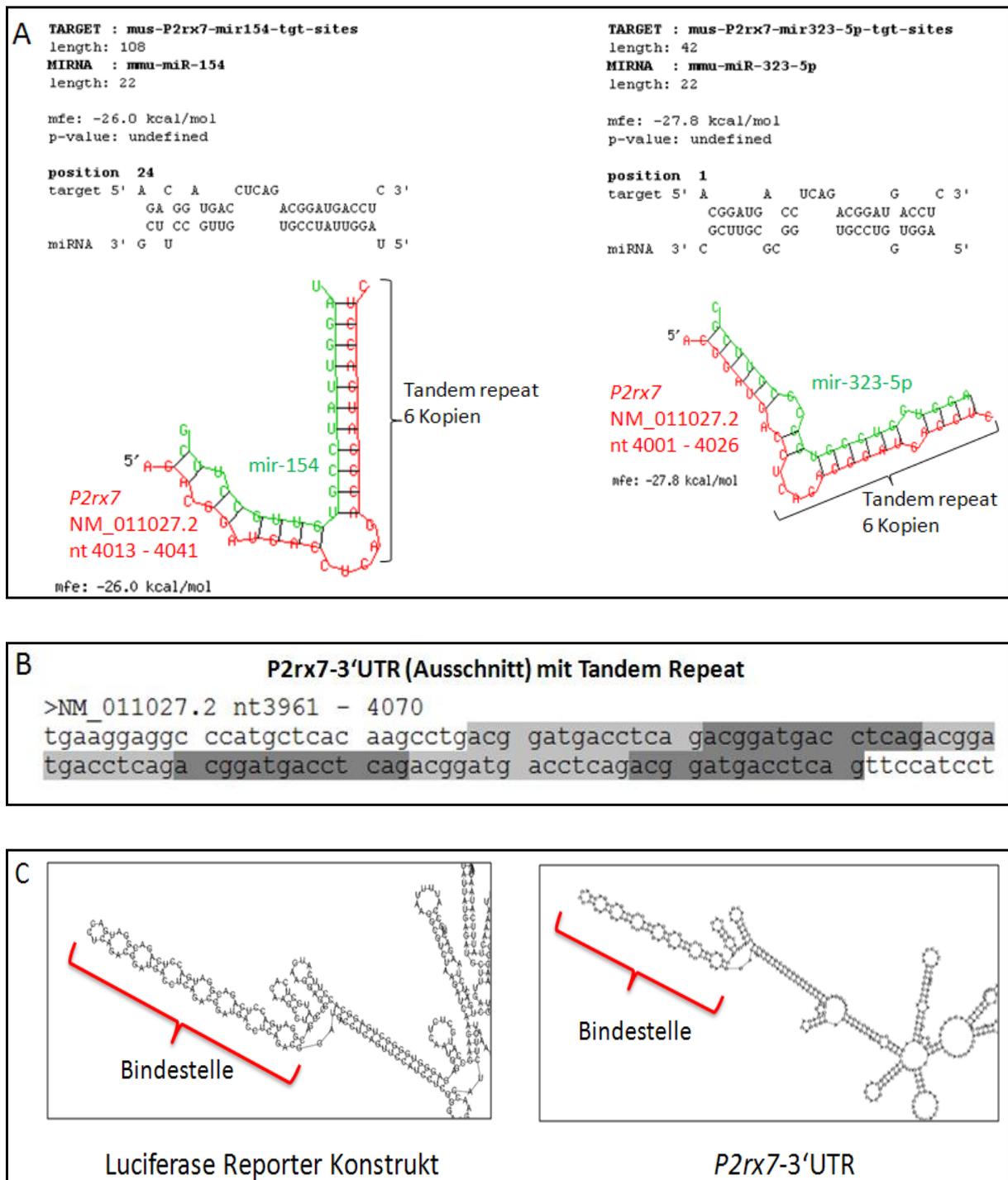


Abbildung 3.30: In silico Analyse der mir-154/mir-323-Bindestelle in der 3'UTR des murinen P2rx7-Gens.

(A) Beispielhafte Darstellung der mir-154 bzw. mir-323-5p Bindung im Bereich eines 6-fachen Tandem Repeats innerhalb der P2rx7-3'UTR. (B) Der identifizierte Tandem Repeat in der murinen P2rx7-3'UTR (grau). (C) Faltung des P2rx7-Luciferase-Reporter-Konstruktes im Vergleich zum natürlichen 3' UTR-Bereich (mFOLD; Ausschnitt). Die Faltung des Repeats im Reporterplasmid und im natürlichen Transkript ist identisch.

Interessanterweise besteht die putative miRNA-Bindestelle im *P2rx7*-3'UTR aus einem Tandem Repeat mit einer Konsensus-Sequenz von 14 Nukleotiden in welcher die sogenannte „Seed-Sequenz“ für die mir-154 und die mir-323-3p (mit 1 Fehlpaarung) enthalten sind (s. Abb. 3.30 A-B).

Um auszuschließen, dass die in den Reporter-Assays beobachteten RNAi-Effekte durch eine unnatürliche Faltung des 3' UTR-Bereiches verursacht werden (etwa durch Herauslösung der Sequenz aus seiner natürlichen Umgebung), wurde mit Hilfe des Programmes mFOLD die Faltung des natürlichen *P2rx7*-Transkriptes mit der des Luciferase-Reporters verglichen (s. Abb. 3.30 C).

Die mir-154- bzw. mir-323-Bindestelle, wie sie im Luciferase-Reporter-Assay untersucht wurde, ist im natürlichen Transkript identisch gefaltet. Dies spricht dafür, dass auch das endogene *P2rx7*-Transkript von den microRNAs mir-154 bzw. mir-323 gebunden und ein RNAi-Effekt induziert wird.

Um die Gene *P2rx7* und *Scn5a* eindeutig als Ziel-mRNA für die miRNAs mir-154 und mir-323 zu verifizieren sind jedoch noch weitere Experimente notwendig (s. Diskussion). Dies konnte jedoch im Zusammenhang mit der hier vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Zusammenfassend lässt sich zu diesen Experimenten sagen, dass ein Reporter-Assay zur Detektion microRNA-vermittelter RNAi-Effekte etabliert werden konnte. Dieser Assay wurde benutzt, um bioinformatische Vorhersagen möglicher miRNA-Bindestellen experimentell zu analysieren. Dabei zeigten lediglich **zwei** der getesteten Bindestellen einen signifikanten und konsistenten RNAi-Effekt.

4 Diskussion

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung *cis*-aktiver Regulations-Elemente der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region auf Chromosom 12 der Maus.

Die Region beinhaltet mindestens 10 elterlich geprägte Gene, deren Fehlregulation letal ist bzw. zu starken Plazenta-, Skelett- und Muskelmissbildungen sowie Wachstumsdefekten führen kann (Schuster-Gossler et al. 1996; Georgiades et al. 1998; Georgiades et al. 2000; Hagan et al. 2009). Die Identifizierung mehrerer differentiell methylierter Regionen lieferte erste Erkenntnisse über die Kontrolle der allelspezifischen Genexpression innerhalb der Region (Takada et al. 2002; Wylie et al. 2000). Die genauen Mechanismen, wie diese Elemente ihre Kontrolle ausüben, sind jedoch nur unvollständig verstanden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, DNA-Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region auf ihre regulatorischen Funktionen zu überprüfen und daraus ein Arbeitsmodell zu entwickeln, das die allelspezifische Genregulation auf beiden elterliche Chromosomen beschreibt. Zunächst wurden durch bioinformatische Analysen die IG-DMR und andere Bereiche der *Dlk1/Gtl2* Region untersucht, um in ihrer Struktur oder Konservierung auffällige DNA-Elemente zu identifizieren. Dies erlaubte eine Vorauswahl möglicher Kandidaten mit regulatorischer Funktion.

Auf experimenteller Seite wurde ein Reporter-Assay etabliert, der eine Identifizierung von Promotor-, Enhancer, Silencer- bzw. Insulator-Aktivität ermöglicht. Dieser Ansatz erlaubte es, alle relevanten Elemente der IG-DMR in ihrer Feinstruktur zu charakterisieren. Ähnliche Untersuchungen mit Elementen anderer Imprinting-Regionen führten bereits zur Entdeckung/Charakterisierung wichtiger Regulationsbereiche (Kim et al. 2003). Die Ergebnisse der Reporter-Assays (s. Abb. 4.1) dienen dazu, ein Arbeitsmodell über die Wirkungsweise einzelner Regulations-Elemente und deren Zusammenspiel zu entwickeln (vgl. 4.7). Daraus lassen sich Strategien zur genauen Aufklärung der in der Imprinting-Regulation der *Dlk1/Gtl2* Region wirkenden Mechanismen erarbeiten.

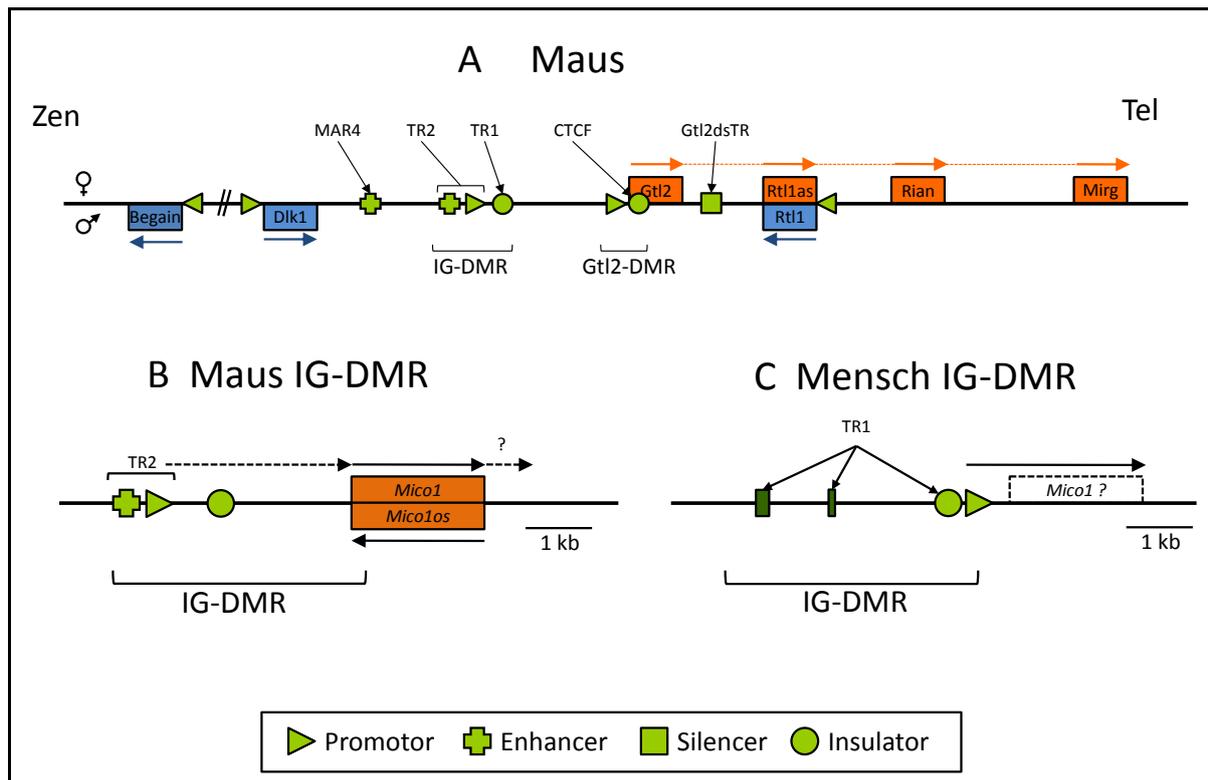


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der getesteten Elemente mit *cis*-regulatorischem Potenzial in Reporter-Assays (grün). (A) Im 5'Bereich der paternal exprimierten Gene (blau) konnten stets DNA-Elemente mit Promotor-Aktivität identifiziert werden. Von den maternal exprimierten Genen (orange) zeigt lediglich der 5'Bereich von *Gtl2*-Promotor-Aktivität. Innerhalb der IG-DMR wurde sowohl ein Element mit Insulator-Aktivität (TR1), als auch ein Element mit Promotor- und Enhancer-Potenzial identifiziert (TR2). Stromabwärts des *Gtl2*-Gens konnte ein repetitives Element mit starker Silencer-Funktion (Gtl2dsTR) charakterisiert werden, während das in einer anderen Studie (Braem et al. 2008) bereits beschriebene MAR4-Element Enhancer-Potenzial zeigte. Experimente zu den Gtl2-CTCF-Bindestellen s. Abschnitt 4.5. **(B+C)** Lage der Promotor- und Insulator-Elemente in der Maus- bzw. Mensch-IG-DMR sind unterschiedlich.

4.1 Promotor-Aktivität im Bereich der IG-DMR

Mit einer Größe von ca. 750 Basenpaaren macht der IG-DMR TR2 rund 20% der murinen IG-DMR aus (Lin et al. 2001). Da der Repeat nur in Ratte und Maus identifiziert werden konnte, stellt er wahrscheinlich ein nagerspezifisches Element dar. In der vorliegenden Arbeit wurde das Element auf potentielle regulatorische Funktionen getestet und zeigte signifikante unidirektionale Promotor-Aktivität in den Reporter-Assays (s. Abb. 3.4). Dies stellt den ersten experimentellen Nachweis von Promotor-Aktivität im Bereich der IG-DMR dar. Durch Deletions-Studien konnte der Promotor-Bereich innerhalb des TR2 auf ca. 250 Basenpaare eingegrenzt werden (s. Abb. 3.5). Anschließend wurde systematisch überprüft, ob auch die humane IG-DMR über Promotor-Potenzial verfügt, und in der Tat konnte am 3' Ende der

humanen IG-DMR ein Bereich mit schwacher aber signifikanter unidirektionaler Promotor-Aktivität identifiziert werden (DNA Fragment V, s. Abb. 3.7). Demnach zeigt in beiden Spezies ein Teilbereich der IG-DMR unidirektionale Promotor-Aktivität in Richtung des *Gtl2*-Gens. Ein *in silico* Vergleich der beiden Promotor-Elemente erbrachte, dass die beiden Elemente weder in ihrer Sequenz noch in der Struktur zueinander ähnlich sind. Nichtsdestotrotz erfüllen die beiden Promotoren möglicherweise eine konservierte Funktion, wie z.B. die einer durchgehenden Transkription zum *Gtl2*-Gen hin.

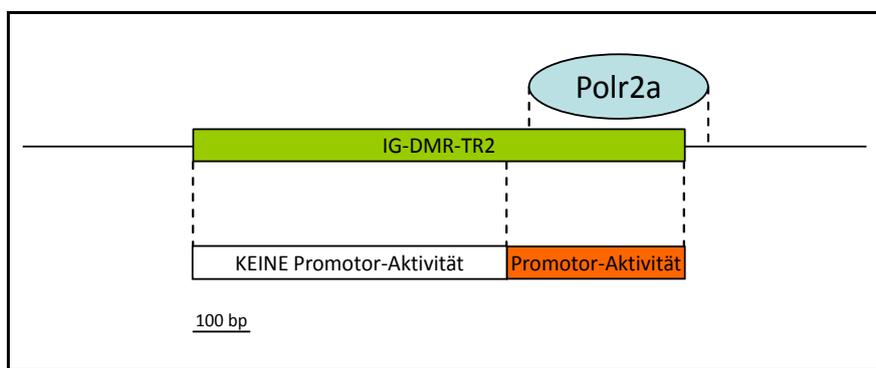


Abbildung 4.2: RNA-Polymerase II bindet den IG-DMR TR2. Durch Polr2a-ChIP-Seq-Analysen in murinen ESCs konnte Bindung von RNA-Polymerase II im Bereich des IG-DMR TR2 identifiziert werden. RNA-Pol. II bindet exakt in der Region, die in den Reporter-Assays Promotor-Aktivität zeigte. (Polr2a-Bindung: Chr12: 110.765.815-110.766.165; UCSC Genome Browser Mouse July 2007 Assembly; Datenquelle: Barrera et al. 2007)

Interessanterweise konnte in einer Studie mittels genomweiten ChIP-Seq-Analysen mit einem Polr2a-Antikörper Bindung der RNA-Polymerase II im Bereich des IG-DMR TR2 in murinen ESCs nachgewiesen werden (Barrera et al. 2007). Die Anlagerung der Polymerase fand sich exakt in dem Bereich des IG-DMR TR2, der in den Reporter-Assays Promotor-Aktivität zeigte (s. Abb.4.2). Die Ergebnisse der Studie sind somit ein weiterer Hinweis auf Promotor-Aktivität der IG-DMR, unabhängig von den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten.

Ein weiteres Indiz, das auf eine Promotor-Aktivität der IG-DMR hinweist, ist der durch ChIP-Seq-Analysen erbrachte Nachweis von H3K4Me2- und H3K4Me3-Anreicherung auf dem maternalen Allel in murinen ESC (Mikkelsen et al. 2007). Diese Histon-Modifikationen werden mit Promotor-Aktivität in Verbindung gebracht (Barski et al. 2007). Auf dem paternalen Allel konnten dagegen reprimierende Histon-Modifikation wie H3K9Me3 identifiziert werden (s. Abb. 4.3). Für DMRs anderer Imprinting-Regionen, wie z.B. die

KvDMR1, wurde eine (allelspezifische) Promotor-Aktivität bereits nachgewiesen (Smilnich et al. 1999). Das KvDMR-Promotor-Element kontrolliert die Expression des *Kcnq1ot1*-Transkriptes (*Lit1*; s. Abschnitt 1.5), welches die allelspezifische Genexpression des Locus *in cis* reguliert. Ob und in wie weit der identifizierte IG-DMR-Promotor von Maus und Mensch eine Rolle bei der Imprinting-Regulation der *Dlk1/Gtl2* Region spielt, muss durch weitere Studien geklärt werden. Ein experimenteller Ansatz wäre z.B. eine gezielte Deletion der jeweiligen Promotor-Elemente mit Hilfe der OPEN-Technik (**O**ligomerized **P**ool **E**ngineering). Dabei werden individuelle Zinkfinger-Nukleasen designt, die gezielte Doppelstrangbrüche im Genom generieren (Urnov et al. 2005; Lloyd et al. 2005; Maeder et al. 2008; Hockemeyer et al. 2009; Foley et al. 2009). Auch die Insertion eines Poly-Adenylierungs-Signals stromabwärts des Promotors zur vorzeitigen Terminierung der Transkription ist denkbar.

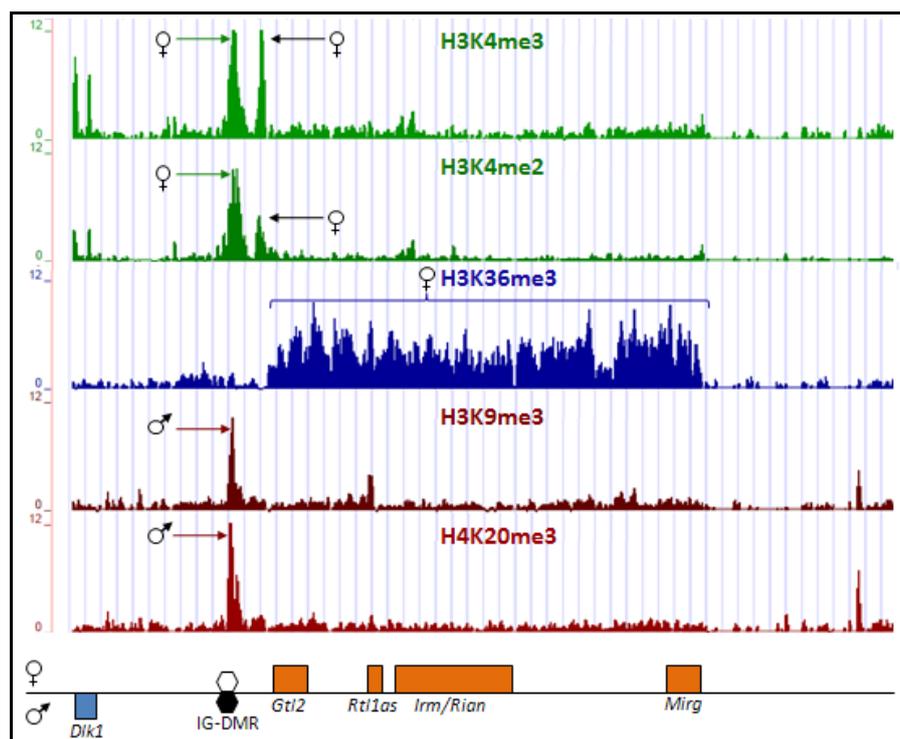


Abbildung 4.3: ChIP-Seq-Daten zur Histon-Methylierung in der *Dlk1/Gtl2* Region in ESC. Im Bereich der IG-DMR finden sich sowohl reprimierende (H3K9me3, H3K20me3; braune Pfeile) als auch aktivierende Histon-Modifikationen (H3K4me3, H3K4me2; grüne Pfeile). Am 5' Ende des *Gtl2*-Gens (*Gtl2*-DMR) sind ebenfalls aktivierende Histon-Modifikationen zu finden (schwarze Pfeile). Im Bereich vom *Gtl2* bis *Mirg* wurde ein Block mit Anreicherung für H3K36me3 detektiert, was auf ein durchgehendes intergenisches Transkript hinweist. H3K4- und H3K36-Methylierung findet sich vorzugsweise auf dem mütterlichen Allel, während H3K9- und H4K20-Methylierung auf dem paternalen Allel angereichert ist. (Daten: Mikkelsen et al. 2007; Abb. mit Hilfe des UCSC-Browsers erstellt)

4.2 Mögliche Funktionen der intergenischen Transkription im Bereich der IG-DMR

Um die Resultate der Luciferase-Assays zu untermauern und die Gefahr experimenteller Artefakte zu minimieren, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. So zeigten RT-PCR-Analysen im unmittelbaren Bereich stromabwärts der als Promotor identifizierten Region, dass in frühen (2-Zell Embryo) und mittleren (9.5 - 12.5 dpc) Embryonalstadien Transkription stattfindet, nicht jedoch in späteren Stadien (16.5 dpc) bzw. neugeborenen Mäusen. Dies spricht für eine mögliche Rolle der intergenischen Transkripte während der frühen Embryogenese. Da stromaufwärts des Promotor-Elements (PE) keine Transkription detektiert werden konnte, ist es nahe liegend, dass die Transkription im Bereich des TR2 startet. Möglich wäre allerdings auch, dass die Transkription vom *Gtl2*-Promotor ausgehend auf dem Gegenstrang in Richtung der IG-DMR verläuft. Sollte dies zutreffen, so müsste der *Gtl2*-Promotor bidirektional aktiv sein. Dies kann durch die Ergebnisse der Reporter-Assays jedoch nahezu ausgeschlossen werden (s. Anhang Abb. 6.19). In der Tat konnte durch strangspezifische RT-PCRs nachgewiesen werden, dass die Transkription von der IG-DMR ausgehend in Richtung des *Gtl2*-Gens verläuft (s. Abb. 3.10).

Allelspezifische SNUPE-Assays mit heterozygoten cDNAs konnten schließlich aufweisen, dass die Transkription auf das maternale Chromosom beschränkt ist. Dies legt nahe, dass die auf dem väterlichen Chromosom vorliegende Methylierung der IG-DMR die Transkription inhibiert. In der Tat zeigten *in vitro* methylierte TR2 Reporter-Plasmide keine Promotor-Aktivität mehr (s. Abb. 3.13). Dies zusammengenommen unterstützt die These, dass der TR2 nur auf dem unmethylierten maternalen Chromosom als Promotor-Element aktiv ist.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage nach der Funktion der maternalen Transkripte in der IG-DMR. In früheren Studien konnte bereits Transkription im Bereich zwischen IG-DMR und *Gtl2* während der Embryogenese gezeigt werden (Takeda et al. 2006; Murphy et al. 2006; Labialle et al. 2008). Allerdings konnte im Bereich der IG-DMR ein langes intergenisches Transkript, wie es von anderen Imprinting-Regionen bekannt ist (z.B. *Lit1*), nicht identifiziert werden. Stattdessen wurde in Maus-Embryos (8 dpc) eine etwa 2 kb große Transkriptionseinheit identifiziert, welche mit dem 3' Ende der IG-DMR überlappt. Das sog. *Mico1*-Transkript wird lediglich vom maternalen Chromosom transkribiert und seine Expression oszilliert im 24 Stunden Rhythmus. Zusätzlich wurde ein genau anti-parallel verlaufendes Transkript beschrieben (*Mico1os*), welches ebenfalls nur maternal exprimiert

wird. Die Funktion der beiden Transkripte ist momentan noch unklar, eine *in silico* Analyse deutet jedoch auf die Möglichkeit hin, dass sie miRNA-Vorläufer darstellen (Labielle et al. 2008). Es ist bereits bekannt, dass Sense-/Antisense Transkripte zur Bildung doppelsträngiger RNAs führen können, welche von der RNAi-Maschinerie erkannt werden und der Produktion von siRNAs dienen (Watanabe et al. 2008; Ghildiyal et al. 2008).

Mico1 und *Mico1os* liegen ca. 3 Kilobasen stromabwärts des IG-DMR TR2 Promotor-Elementes. Somit ist denkbar, dass der TR2 in seiner Eigenschaft als Promotor die Expression von *Mico1* kontrolliert. Dazu bedarf es allerdings weiterer Experimente. So könnte beispielsweise durch 5' RACE- bzw. 3' RACE-Versuche der genaue Anfang bzw. das Ende der IG-Transkription bestimmt werden. Auch könnte die intergenische Transkription durch Einsatz von siRNAs via RNAi gehemmt werden. So könnte eine mögliche Rolle der Transkripte für eine normale Funktion der IG-DMR untersucht werden; auch die oben beschriebenen Möglichkeiten zur funktionellen Charakterisierung des IG-DMR TR2 könnten dazu beitragen (Deletion des PEs, Insertion eines artifiziellen Poly-Adenylierungs-Signals).

Auch in anderen Imprinting-Regionen konnten intergenische Transkripte in DMRs identifiziert werden. So wurde für die H19-DMR im Maus-Embryo bzw. in einem transgenen *Drosophila*-Modell der murinen H19-DMR Transkription nachgewiesen (Schoenfelder et al. 2007; Chotalia et al. 2009). Ein siRNA Knock-down der Transkripte zeigte, dass sie zur normalen Silencer-Funktion der H19-DMR beitragen. Der Mechanismus über den sie agieren ist bislang aber nicht bekannt, im *Drosophila*-Modell scheinen sie zumindest nicht über den RNAi-Pfad (z.B. als siRNAs) zu wirken. Daneben wurden in anderen Imprinting-Regionen lange nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) identifiziert, die durch Rekrutierung repressiver Histon-Modifikationen die Stilllegung benachbarter Gene induzieren (Lewis et al. 2004; Umlauf et al. 2004). In den Arbeiten von Mikkelsen et al. (2007) an murinen ESCs konnte in der *Dlk1/Gtl2* Region ein ca. 200 Kilobasen umfassender Block an H3K36me3 detektiert werden, welcher vornehmlich vom maternalen Allel stammt und mit aktiver Transkription assoziiert wird (s. Abb. 4.3). Er reicht vom *Gtl2*-Gen bis hin zum *Mirg*-Gen (der Bereich um die IG-DMR zeigt jedoch keine Anreicherung). Dies legt die Existenz einer langen durchgehenden Transkriptionseinheit nahe, aus der kleinere Transkripte (z.B. miRNAs, snoRNAs) prozessiert werden könnten. Diese Möglichkeit wurde bereits in vorangehenden Arbeiten vorgeschlagen (Tierling et al. 2006) und durch die Tatsache gestützt, dass sich in

der intergenischen Region zwischen *Gtl2* und *Mirg* Transkription nachweisen lässt. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass außer dem *Gtl2*-Transkript wahrscheinlich keine der maternal exprimierten ncRNAs (*Rtl1as*, *Irm*, *Rian*, *Mirg* sowie snoRNAs und miRNAs) über einen Promotor verfügt (s. Anhang Abb. 6.19). In anderen Imprinting-Regionen wurden bereits lange ncRNAs beschrieben (z.B. *Air*, *Lit1*, *Xist*), welche *in cis* am Gen-Silencing beteiligt sind (s. Einleitung Abschnitt 1.5). Ob und in wie weit die putative ncRNA von *Gtl2* bis *Mirg* am Imprinting-Prozess involviert ist, ist gegenwärtig unbekannt.

4.3 Der IG-DMR Tandem Repeat 1 zeigt konservierte Insulator-Effekte

In einer früheren Publikation wurde bereits die Existenz eines in den Spezies Mensch, Maus und Schaf konservierten Tandem Repeats in der IG-DMR bioinformatisch nachgewiesen (Paulsen et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Analyse durch Integration zusätzlicher Sequenzdaten weiterer Spezies vertieft. Dabei zeigte sich, dass sich Nager hinsichtlich der Konsensus-Länge und -Sequenz des IG-DMR TR1 von allen anderen analysierten Säugern abgrenzen lassen. Einen Sonderfall stellte der Pfeifhase (Pika) dar, der sowohl die Nager-Variante des TR1 (TR1G) als auch die der anderen Säuger aufweist.

Bei der funktionellen Analyse des Elements in Reporter-Assays konnte sowohl für den humanen TR1 als auch den murinen TR1G weder Promotor-, Silencer- oder Enhancer-Potenzial beobachtet werden. Stattdessen wiesen beide Elemente signifikantes Insulator-Potenzial im Zusammenhang mit einem Enhancer-Element (SV40-Enhancer) auf. Beim Test des murinen TR1 auf Insulator-Effekte im Zusammenhang mit einem starken Silencer (*Gtl2dsTR*, s.u.) zeigten sich solche Effekte jedoch nicht. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der murine IG-DMR TR1 nur ein „schwaches“ Insulator-Element darstellt, welches zwar die Interaktion des SV40-Enhancers auf den SV40-Promotor, nicht jedoch den negativen Einfluss des *Gtl2dsTR*-Silencers auf den Promotor in den Reportern zu unterbinden vermag. Es wäre interessant zu testen, ob sich der humane TR1 oder der einer anderen Säugetier-Spezies aufgrund einer differentiellen Konsensus-Sequenz bzw. Anzahl an Einzelkopien in Reporter-Assays anders verhält. So könnten z.B. Tests mit dem IG-DMR TR1 von Hund (51 Einzelkopien) oder Schaf (38 Einzelkopien) klären, ob eine höhere Anzahl an Einzelkopien zu einem stärkeren Effekt führt. Auch in anderen Imprinting-Regionen wurden bereits DMRs

durch Reporter-Assays auf Insulator-Potenzial hin untersucht. Eine Studie konnte am Beispiel der humanen PEG3-DMR nachweisen, dass dort lokalisierte Tandem Repeats Insulator-Potenzial inne haben. Die Insulator-Effekte zeigten sich allerdings nur in bestimmter Anordnung bzw. Orientierung der getesteten Elemente (Kim et al. 2003). Um alle von der IG-DMR vermittelten *cis*-Effekte zu identifizieren, wäre deshalb auch ein Test der kompletten IG-DMR in Reportern ein sinnvolles Experiment. Alle Elemente der IG-DMR wären in solchen Konstrukten in ihrer natürlichen Anordnung bzw. im natürlichen Sequenz-Kontext.

4.4 Der Tandem Repeat stromabwärts von *Gtl2* zeigt Silencer-Potenzial

Eine frühere Arbeit zeigte bereits die Konservierung des Tandem Repeats stromabwärts des *Gtl2*-Gens (*Gtl2dsTR*) zwischen Maus und Mensch (Tierling et al. 2006). Durch Verwendung neuerer Sequenzdaten, leicht veränderter Analyse-Parameter, sowie Integration einer weiteren Spezies (Elefant) konnte der Grad der Konservierung dieses Elementes weiter herausgearbeitet werden; der *Gtl2dsTR* zeigte sowohl in seiner Position, Sequenz als auch Struktur eine sehr hohe Konservierung in Säugern.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals auch funktionelle Analysen in Form von Reporter-Assays durchgeführt. Sowohl der humane als auch der murine *Gtl2dsTR* zeigten in Kombination mit verschiedenen Promotoren konsistent starke Silencer-Effekte in allen getesteten Zelllinien. Damit konnte ein neues Element in der *Dlk1/Gtl2* Region mit *cis*-regulatorischem Potenzial identifiziert werden. Da der Silencer nur über sehr wenige CpG-Positionen verfügt, ist eine Regulation des Elements über differentielle DNA-Methylierung eher unwahrscheinlich. Alternativ könnte er über differentielle Histon-Modifikationen gesteuert werden, was sich gut durch CHIP-Analysen untersuchen lässt. Weitere sinnvolle Fragestellungen wären sicherlich, welche Gene der *Dlk1/Gtl2* Region durch den *Gtl2dsTR* reguliert werden und ob dies allelspezifisch geschieht. Denkbare Experimente sind eine gezielte Deletion des *Gtl2dsTR* und eine 3C-Analyse (Chromatin Conformation Capture) zur Detektion von DNA-Elementen, die mit dem *Gtl2dsTR* interagieren.

4.5 Mögliche Insulator-Funktion der Gtl2-CTCF-Bindestellen

Im Bereich der Gtl2-DMR konnten bereits mehrere Bindestellen des Zinkfinger-Proteins CTCF identifiziert werden (siehe Einleitung). In der *Igf2/H19* Imprinting-Region wurde bereits gezeigt, dass CTCF auf dem unmethylierten maternalen Chromosom an mehreren Positionen (in Form von Tandem Repeats) der H19-DMR bindet und als Insulator-Protein agiert. Nach dem sogenannte Enhancer-Competition-Modell konkurrieren die Gene *H19* und *Igf2* um stromabwärts gelegene Enhancer-Elemente. Die unterschiedlichen chromosomalen Konformationen auf den beiden elterlichen Chromosomen erlauben stets nur einem der beiden Gene mit den Enhancern zu interagieren. Dies resultiert in der entsprechenden allelspezifischen Genexpression. Denkbar ist, dass die Gtl2-CTCF-Bindestellen ähnlich den CTCF-Bindestellen in der H19-DMR eine Insulator-Funktion inne haben und so zur Regulation des benachbarten Silencer-Elementes (Gtl2dsTR) beitragen. Dies würde z.B. eine allelspezifische Interaktion des Gtl2dsTR-Silencers mit den flankierenden Genen ermöglichen. Um dies weiter zu untersuchen, werden derzeit die Gtl2-CTCF Bindestellen in Verbindung mit dem *Gtl2*-Silencer Element auf mögliches Insulator-Potenzial hin getestet (s. Abb. 4.4).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Experiment nicht vollständig abgeschlossen werden, es wird aber zurzeit in der Arbeitsgruppe weitergeführt. Erste Versuche zeigten aber, dass der Insertion der Gtl2-CTCF-Bindestellen zwischen dem Reporter-Gen und dem Silencer-Element eine Steigerung der Promotor-Aktivität folgt. Es konnten also Insulator-Effekte beobachtet werden. Dies sind nur vorläufige Ergebnisse, da noch einige Kontrollen zu testen sind. So könnte der beobachtete Effekt auch durch Enhancer-Potenzial des DNA-Elementes verursacht werden (wodurch der Silencer-Effekt überlagert wird). Angesichts des starken Silencer-Effektes des Gtl2dsTR erscheint dies jedoch als unwahrscheinlich. Gegenwärtig wird der Gtl2-CTCF-Bindebereich in entsprechenden Reporter-Assays auf Enhancer-Potenzial überprüft. Weiterführende Experimente könnten u.a. ein siRNA Knock-down von CTCF oder die gezielte Mutation der CTCF-Bindestellen sein. In beiden Strategien sollte durch die fehlende CTCF-Bindung in der Gtl2-DMR der Insulator-Effekt ausbleiben. Dies könnte zu einer Interaktion zwischen dem Gtl2dsTR-Silencer-Element und dem *Gtl2*-Promotor und so zur Deregulierung des *Gtl2*-Gens führen (vgl. Abschnitt 4.7).

Ein weiterer Aspekt der CTCF-Bindung in der Gtl2-DMR könnte die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Gtl2 Promotor sein. Eine Studie konnte herausarbeiten, dass CTCF direkt mit der großen Untereinheit der RNA Pol II interagiert (Chernukhin et al. 2007). So führte die Präsenz einer CTCF-Bindestelle zur Aktivierung eines Luciferase-Reporter-Konstrukts. Somit ist denkbar, dass CTCF im Bereich der Gtl2-DMR auf dem maternalen Chromosom eine duale Funktion ausübt: Zum einen fördert es die *Gtl2*-Transkription durch gezielte Rekrutierung der RNA-Pol II, zum anderen verhindert es die *Gtl2*-Repression durch den Gtl2dsTR-Silencer.

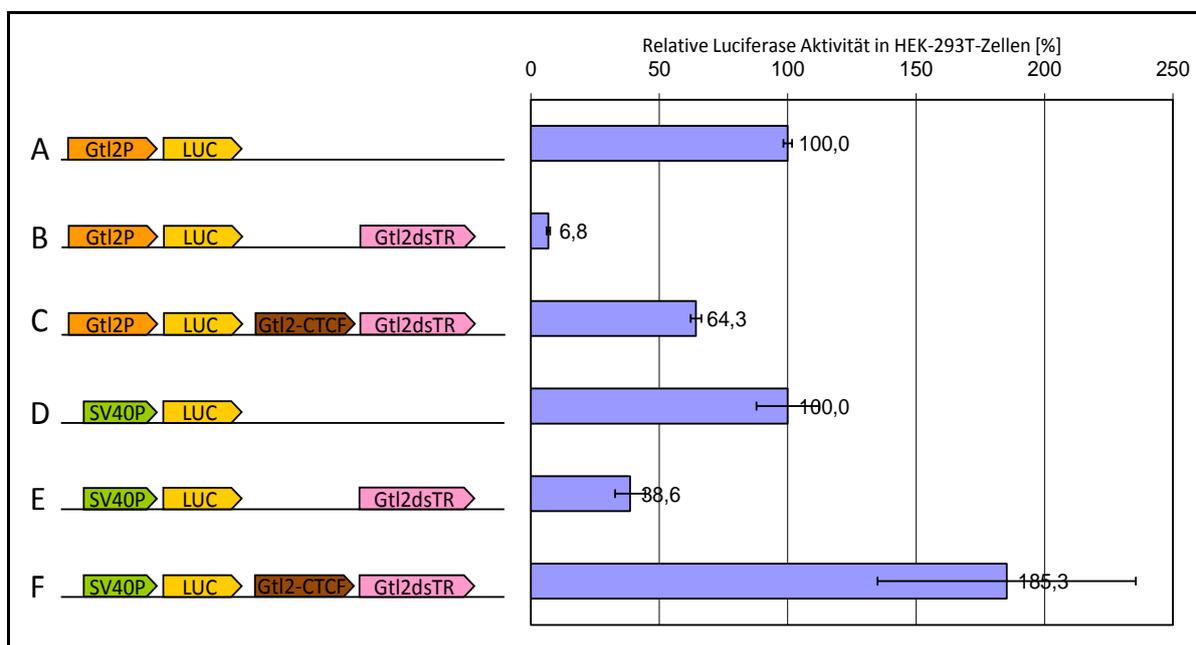


Abbildung 4.4: Insertion der Gtl2-CTCF-Bindestellen führt zur Inhibition des Gtl2dsTR induzierten Silencer-Effektes in HEK-293T Zellen (Pilot-Experiment). Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (mmu Gtl2dsTR: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; Gtl2P: *Gtl2*-Promotor; Gtl2-CTCF: *Gtl2*-CTCF-Bindestellen; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das jeweilige Promotor-Konstrukt normalisiert. Alle Proben wurden in zwei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert.

4.6 Runx1-Kotransfektion reprimiert Promotor- und Enhancer-Aktivität

Durch Reporter-Assays konnte gezeigt werden, dass die Promotor-Aktivität des TR2 Elementes in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ist. Dies könnte u.a. durch einen assoziierenden Transkriptionsfaktor verursacht werden, der in den transfizierten Zelllinien unterschiedlich exprimiert ist oder wirkt. Die *in silico* Analyse der humanen und murinen IG-DMR führte zur Identifizierung mehrerer putativer Bindestellen für die Familie der Runt-

Transkriptionsfaktoren (Runx1-3, Runx2, Runx3) im Bereich der IG-DMR Tandem Repeats 1 bzw. 2. Interessanterweise konnte eine Studie am Pu.1-Locus der Maus zeigen, dass Runx1 in der Lage ist, durch Beeinflussung der Chromatin-Struktur eine Genaktivierung zu induzieren (Hoogenkamp et al. 2009). Vor diesem Hintergrund scheint es denkbar, dass Runx1 durch (allelspezifische) Anlagerung im Bereich der IG-DMR als (epigenetischer) Modulator agiert.

In der Tat konnte in Runx1-Kotransfektionen (in HEK-293T-Zellen) ein (negativer) Einfluss auf die IG-DMR TR2 Promotor- bzw. Enhancer-Aktivität beobachtet werden (und auch auf das humane DNA-Fragment **V**). Dass dieser Effekt in der ebenfalls getesteten P19-Linie nicht zu beobachten war, lässt sich vermutlich durch die endogene Runx1-Expression erklären. Dabei wird bereits in der Kontroll-Transfektion die Aktivität der TR2 Reporter-Plasmide durch Bindung des endogenen Runx1-Proteins negativ beeinflusst. Ein zusätzliches Einbringen von Runx1-Protein via Kotransfektion bliebe so ohne zusätzlichen Effekt. Expressionsanalysen (RT-PCRs) zeigten, dass die P19-Linie in der Tat Runx1 exprimiert, die HEK-293T-Linie jedoch nicht (s. Abb. 6.13). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Runx1 nur in bestimmten Zelltypen als Repressor agiert. So verfügt das Runx1-Protein über Domänen, die die Interaktion sowohl mit Co-Aktivatoren als auch Co-Repressoren erlauben und dadurch zur Aktivierung oder zur Stilllegung von Target-Genen führen können (Wang et al. 2005; Satoh et al. 2008).

Obleich die Ergebnisse der Kotransfektions-Experimente für eine Interaktion von Runx1 mit der IG-DMR (TR2) sprechen, ist diese erst noch nachzuweisen. So wurde beispielweise der IG-DMR TR1 trotz putativer Runx1-Bindestellen durch Runx1-Kotransfektion in seiner Aktivität als Insulator nicht beeinflusst (weder in HEK-293T noch P19-Zellen). Darüber hinaus sollte man beachten, dass in Reporter-Assays stets eine Überexpression der untersuchten Elemente vorliegt; dies kann u.a. zu experimentellen Artefakten wie z.B. unspezifischer Bindung führen. Deshalb sollten zusätzliche Kontroll-Experimente durchgeführt werden, wie die Mutation der putativen Runx1-Bindestellen sowie Kotransfektions-Experimente mit einem rekombinanten Runx1-Protein, bei dem die DNA-Bindedomäne mutiert wurde. Eine weitere Möglichkeit bieten sog. Gel-Mobility-Shift-Assays (EMSA) und CHIP-Experimente. Letztere bieten zudem die Möglichkeit eine allelspezifische Bindung von Runx1 in der IG-DMR offen zu legen. Erst wenn eine Bindung von Runx1 in der IG-DMR nachgewiesen ist, sind weitere Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Runx1 auf die *Dlk1/Gtl2*

Imprinting-Region sinnvoll (z.B. Runx1 Knock-down bzw. Überexpression in Zelllinien, Mutation der Runx1-Bindestellen). Neben Runx1 existieren noch zwei weitere eng verwandte Transkriptionsfaktoren, die über die für die DNA-Bindung verantwortliche Runt-Domäne verfügen (Runx2, Runx3). Sie sind auch deshalb interessant, da sie in den Geweben exprimiert sind, in welchen bei Mutation in regulatorischen Bereichen der *Dlk1/Gtl2* Region auch phänotypische Effekte zu beobachten sind (vgl. 1.6.3 und 3.1.2.8). Alle Runx-Proteine binden dieselbe Konsensus-Sequenz wie Runx1. Prinzipiell kommen somit auch diese beiden Transkriptionsfaktoren als mögliche IG-DMR Bindeproteine in Frage. Aus Zeit- und Kostengründen wurden in der vorliegenden Arbeit nur Experimente mit Runx1 durchgeführt. Es ist jedoch sinnvoll in zukünftigen Untersuchungen auch Runx2 und Runx3 zu berücksichtigen.

4.7 Zusammenfassende Regulationsmodelle

Ziel der Arbeit war es u.a. ein Modell für die Imprinting-Regulation der *Dlk1/Gtl2* Region zu erarbeiten. Mit Hilfe von Reporter-Assays wurden diverse DNA-Elemente auf regulatorisches Potenzial hin getestet. Dies soll helfen, das Zusammenspiel aller (bekannten) Faktoren, die zu einer allelspezifischen Genexpression im *Dlk1/Gtl2*-Cluster beitragen, besser zu verstehen. Ausgehend von den Ergebnissen der Reporter-Assays wurden zwei Regulationsmodelle für die *Dlk1/Gtl2* Region erstellt (Modelle **A** und **B**; s. Abb. 4.5 – 4.6). Mit berücksichtigt wurden dabei die Expressionsdaten aus den verschiedenen Knock-out Maus-Modellen (Δ IG-DMR, Δ Gtl2-DMR; s. Abb. 1.9). Demnach kommt in der IG-DMR je nach Modell eine Promotor-, Enhancer- bzw. Insulator-Funktion zum Tragen, die auf das maternale Chromosom begrenzt ist.

In den beschriebenen Regulationsmodellen wird für die Gtl2-DMR eine Insulator-Funktion angenommen. Begründen lässt sich dies vor allem durch die bereits *in vivo* nachgewiesenen CTCF-Bindestellen (Kang et al. 2009) und die *Gtl2*-Deregulation nach CTCF Knock-down (Wan et al. 2008). Ein weiterer Anhaltspunkt dafür sind die vorläufigen Ergebnisse aus den Reporter-Assays (s.o.). Da die konservierten CTCF-Bindestellen in einem differentiell methylierten Bereich liegen, findet wahrscheinlich eine allelspezifische Bindung von CTCF statt. Ob dies tatsächlich der Fall ist, muss allerdings noch untersucht werden. Der Insulator könnte so (allelspezifisch) den Einfluss des Silencer-Elementes (Gtl2dsTR) auf den *Gtl2*-

Promotor unterbinden. Unterstützt wird diese Hypothese von Arbeiten der Gruppe um Marisa Bartolomei: In wachsenden Oozyten bzw. Embryos mit einem konditionellem CTCF Knock-down wurde eine starke Reduktion der *Gtl2*-Transkription beobachtet (Wan et al. 2008). Auch die Expressions-Daten der *Gtl2* Knock-out Mäuse können so erklärt werden (s. Abb. 1.9) (Takahashi et al. 2009).

Nach dem sog. Enhancer-Tracking-Modell „scannen“ Enhancer die DNA in einer Richtung ab, bis sie einen Promotor erreichen mit dem sie interagieren können. Dies konnte bereits für die *Igf2/H19* Region gezeigt werden (Engel et al. 2008). Auf dem maternalen Chromosom wird der *Gtl2*dsTR-Silencer in zentromerischer Richtung durch den *Gtl2*-DMR-Insulator blockiert. Auf dem väterlichen Chromosom, auf dem CTCF aufgrund der DNA-Methylierung nicht binden kann, interagiert das Silencer-Element mit dem *Gtl2*-Promotor.

Regulationsmodell A

In Modell **A** dient die IG-DMR in erster Linie der Etablierung der sekundären Imprints (*Gtl2*-DMR) während der frühen Embryogenese (s. Abb. 4.5 **A**). Dazu muss gewährleistet werden, dass auf dem maternalen Chromosom eine *de novo* Methylierung im Bereich der DMRs (IG-DMR, *Gtl2*-DMR) in diesem Entwicklungsstadium verhindert wird.

Aber was sind die genauen Mechanismen, welche die DNA-Methylierungsmaschinerie an der Methylierung hindern? Möglicherweise ist hierzu die Bindung von RNA-Polymerase II in der IG-DMR von Bedeutung (vgl. Abschnitt 4.1). Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte zeigen, dass in Krebszellen die Anlagerung von RNA-Polymerase II an Promotor-CpG-Inseln zur Verhinderung von DNA-Methylierung führt (Takeshima et al. 2009). RNA-Polymerase II formt mit anderen Proteinen einen Transkriptions-Komplex von bis zu 3 MDa Größe (Boeger et al. 2005). Denkbar ist, dass solch ein großer Komplex die Bindung der DNA-Methyltransferasen verhindert. Aber nicht nur die Präsenz von RNA-Pol. II in der IG-DMR, sondern auch die möglicherweise damit verbundene intergenische Transkription könnte einen Beitrag zum „Methylierungsschutz“ liefern. Danach verhindert entweder der Transkriptions-Vorgang selbst die Anlagerung des DNA-Methylierungs-Komplexes, oder Chromatin-Modifikationen, die in Zusammenhang mit Transkription auftreten, spielen hierbei eine Rolle (z.B. hohe H3K4Me3-Level). So benötigt der *de novo* Methylierungskomplex niedrige H3K4-Methylierungslevel, um effizient an DNA binden zu können (Ooi et al. 2007). Die IG-DMR

besitzt auf dem maternalen Allel jedoch hohe H3K4-Methylierungslevel (zumindest in ESC, s. Abb. 4.3) (Mikkelsen et al. 2007).

Ferner unterstützen Studien im Bereich der *Igf2/H19* Region einen möglichen Zusammenhang von Transkription und „Methylierungsschutz“: So konnte gezeigt werden, dass CTCF (neben seiner Rolle bei der Insulator-Funktion der H19-DMR) zur Transkriptions-Initiation auf dem maternalen Allel beiträgt und so eine Methylierung auf dem maternalen Allel während der genomweiten *de novo* Methylierung in der frühen Embryonal-Entwicklung verhindert (Engel et al. 2006; Thorvaldsen et al. 2006). Unklar ist jedoch, ob die Transkription selbst oder die physikalische Präsenz von CTCF die maternale H19-DMR vor der Methylierung bewahrt. Bislang konnte keine CTCF-Bindung in der IG-DMR nachgewiesen werden (Carr et al. 2007). Allerdings konnten *in silico* Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Runx1 (s. 4.6) und Sox2 identifiziert werden (s. Anhang Tab. 6.2; 6.3). Sox2 spielt u.a. eine zentrale Rolle in der frühesten Embryogenese, der Erhaltung von Pluripotenz, aber auch der epigenetischen Stilllegung des X-Chromosoms durch Regulation der *Xist*-ncRNA (Masui et al. 2007; Navarro et al. 2008). In der Tat sind in einer murinen ESC-Linie mit Sox2 Knock-down die maternal exprimierten Gene (*Gtl2*, *Rian*, *Mirg*) der *Dlk1/Gtl2* Region dereguliert (Masui et al. 2007; Sharov et al. 2008). Weitere Analysen zu Sox2 konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden.

Wie bereits erwähnt, zeigen auch DMRs in anderen Imprinting-Regionen Promotor-Potenzial und kontrollieren die Transkription von ncRNAs, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der jeweiligen Imprinting-Domäne spielen. So führen im *Igf2r*-Locus bzw. der BWS-Region ncRNAs zur Etablierung einer repressiven Domäne (Heterochromatisierung), z.B. durch Rekrutierung der H3K9-Methyltransferase G9a (Nagano et al. 2008; Redrup et al. 2009). Daher ist es denkbar, dass auch die von der IG-DMR ausgehende Transkription zur Produktion von ncRNAs dient und diese Transkripte eine regulatorische Funktion in der *Dlk1/Gtl2* Region inne haben (Abb. 4.5 B).

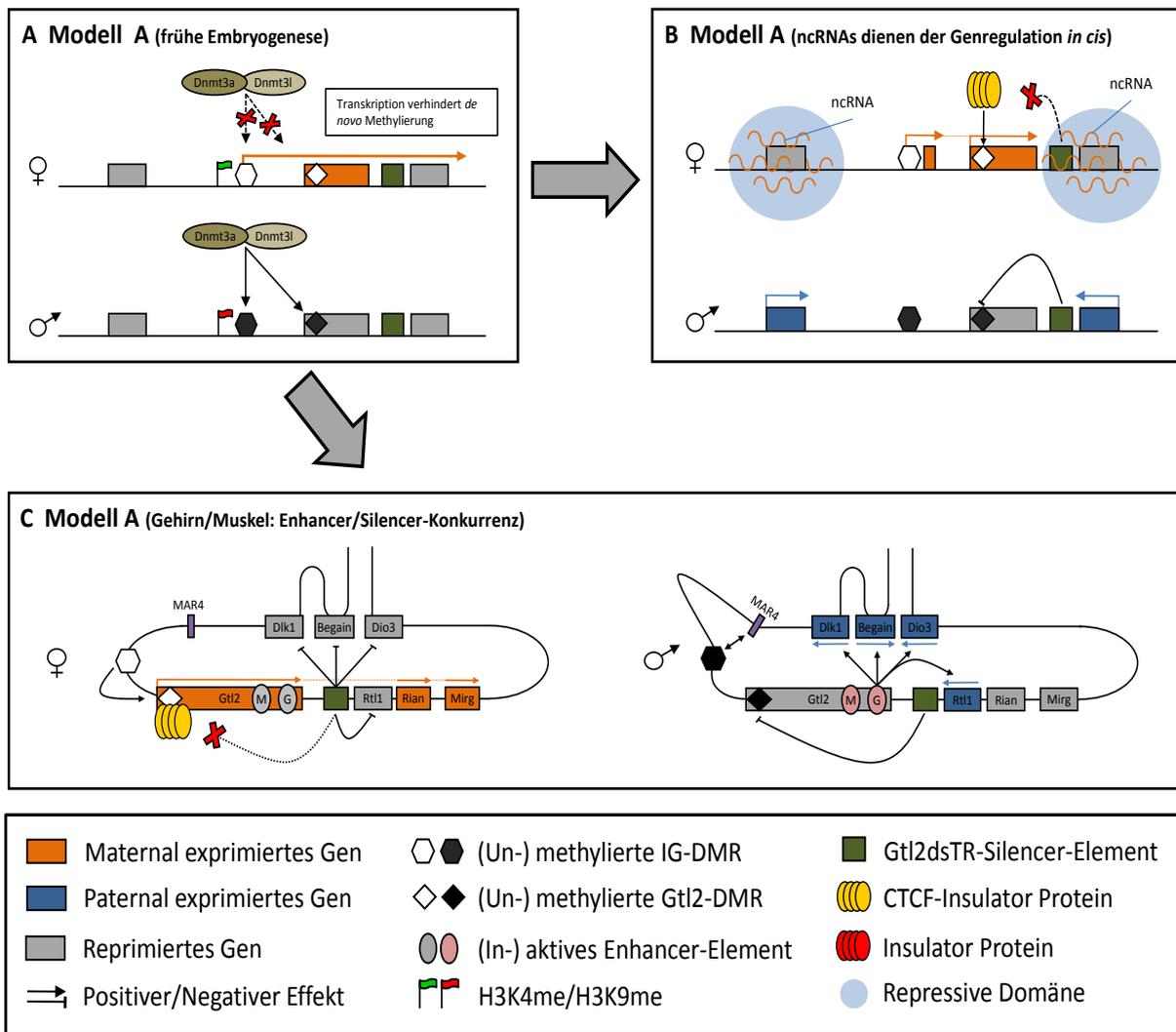


Abbildung 4.5: Regulationsmodell A der IG-DMR vermittelten allelspezifischen Genexpression in der *Dlk1/Gtl2* Region. (A) Die IG-DMR dient in erster Linie der Etablierung der sekundären Imprints während der frühen Embryogenese. Auf dem unmethylierten maternalen Chromosom induziert sie intergenische Transkription in Richtung der *Gtl2*-DMR. Dies verhindert eine *de novo* Methylierung, indem die Bindung der DNA-Methylierungsmaschinerie unterbunden wird. **(B)** Die IG-DMR vermittelte, maternale Transkription dient (u.U. auch) der Generierung von ncRNAs (z.B. *Mico1*, *Gtl2*). Diese führen *in cis* zur Etablierung repressiver Domänen im Bereich der paternalen Gene. Auf dem väterlichen Chromosom wird der *Gtl2*-Promotor durch den *Gtl2dsTR*-Silencer sowie DNA-Methylierung still gelegt. **(C) Regulation der allelspezifischen Genexpression im Gehirn/Muskel:** Auf dem mütterlichen Allel regelt der *Gtl2dsTR*-Silencer die Promotor-Aktivität der Proteinkodierenden Gene herab. Anlagerung von CTCF im Bereich der *Gtl2*-DMR verhindert Silencing des *Gtl2*-Gens durch den *Gtl2dsTR*-Silencer. Gleichzeitig führt Transkription über den *Gtl2*-Locus zur Inhibition gewebespezifischer Enhancer-Elemente (Gehirn, Muskel). Auf dem paternalen Chromosom wird *Gtl2* nicht transkribiert. Dies erlaubt den Enhancern im Bereich von *Gtl2* eine Interaktion mit den Promotoren der Proteinkodierenden Gene. Ermöglicht wird dies durch Interaktion der IG-DMR mit dem MAR4-Element, die in einer Konformations-Änderung des paternalen Chromosoms resultiert.

Für die murine *Dlk1/Gtl2* Region kämen die maternalen *Mico1/Mico1os*-Transkripte und das *Gtl2*-Transkript als mögliche ncRNAs in Frage. Ob sich im Menschen *Mico1/Mico1os*-entsprechende ncRNAs identifizieren lassen bzw. ob diese ncRNAs tatsächlich eine Funktion in der Imprinting-Regulation inne haben, sind zukünftig zu untersuchende Fragestellungen (z.B. durch einen konditionellen *Mico1/Mico1os* Knock-down mit siRNAs). An dieser Stelle ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass in dem Knock-out Maus-Modell, das zur Identifizierung und Charakterisierung der IG-DMR diente, auch eine partielle Deletion der *Mico1/Mico1os*-Transkripte vorlag. Interessante Experimente wären hier ein konditioneller siRNA Knock-down der ncRNAs während der frühen Embryogenese. So könnte ihr möglicher Einfluss auf die Methylierung des *Dlk1/Gtl2*-Locus überprüft werden.

Alternativ bzw. ergänzend zum ncRNA-Modell käme auch das Prinzip einer sog. „**Enhancer/Silencer-Kompetition**“ in Frage (s. Abb. 4.5 C). Danach konkurrieren Enhancer- und Silencer-Elemente um die Interaktion mit Promotoren. Als Silencer-Element käme der in der vorliegenden Arbeit identifizierte *Gtl2dsTR* in Frage. Auf dem maternalen Chromosom interagiert dieser Repeat mit den Promotoren der Protein-kodierenden Gene. Aufgrund allelspezifischer Bindung von CTCF im Bereich der *Gtl2*-DMR kann er jedoch nicht mit dem *Gtl2*-Promotor interagieren, wodurch dieser aktiv bleibt und *Gtl2* transkribiert wird.

Für dieses Szenario spricht u.a., dass in einer kürzlich erschienen Publikation durch CHIP-Seq-Analysen mit Antikörpern für das Enhancer-assoziierte Protein p300 zwei gewebespezifische Enhancer-Elemente (EE) innerhalb der *Gtl2*-Transkriptionseinheit identifiziert wurden (Visel et al. 2009). Bereits in den ersten Studien, die zur Identifikation des *Gtl2*-Gens führten, wurde die Existenz solcher EE diskutiert (Schuster-Gossler et al. 1998; Wylie et al. 2000). Während eines der EE (Chr.12: 110796525 – 110797426; mmu9-Assembly) spezifisch im Vorderhirn aktiv ist, wird das andere EE (Chr.12: 110791275–110791901) muskelspezifisch von p300 gebunden (Visel et al. 2009). Dieser Sachverhalt passt gut zu den Expressionsdaten der Gene *Begain* und *Dlk1*, die vor allem in diesen Geweben exprimiert werden. Die beiden EE werden gegenwärtig in der AG Walter mittels Reporter-Assays auf ihr *cis*-Potenzial hin evaluiert.

Auf dem väterlichen Chromosom hingegen ist die *Gtl2*-DMR hypermethyliert. Es findet keine CTCF-Anlagerung statt und der *Gtl2dsTR*-Silencer kann mit dem *Gtl2*-Promotor interagieren (und somit das Gen still legen). Denkbar wäre, dass der Silencer durch diese Interaktion

aufgrund chromosomaler Konformation nicht mehr zur Interaktion mit den anderen „paternalen“ Genen zur Verfügung steht (er wird durch die Interaktion mit dem *Gtl2*-Promotor „abgefangen“). Die reduzierte Expression von paternal exprimierten Genen bei Deletion der *Gtl2*-DMR auf dem väterlichen Chromosom legt eine solche Enhancer/Silencer-Kompetition nahe (s. Abb. 1.9; Takahashi et al. 2009). Durch den „Abfang“ des *Gtl2*dsTR-Silencers durch den *Gtl2*-Promotor können nun gewebespezifische Enhancer mit den Protein-kodierenden Genen interagieren (s. Abb. 4.5 C). Diese Interaktion ist jedoch nur auf dem väterlichen Chromosom möglich, da hier keine *Gtl2*-Transkription stattfindet, die dies unterbinden würde. Auf dem maternalen Chromosom dagegen wird durch die *Gtl2*-Transkription die Interaktion zwischen Enhancer und Promotor unterbunden.

Zusätzlich könnte dem MAR4-Element eine funktionelle Relevanz zukommen. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass es auf dem paternalen Chromosom mit der IG-DMR interagiert (Braem et al. 2008). Dies könnte zu einer DNA-Konformationsänderung führen, die eine Interaktion der Enhancer mit Promotoren begünstigt (oder überhaupt erst erlaubt). Denkbar wären auch verschiedene MAR-Elemente die gewebe- bzw. entwicklungspezifisch mit der IG-DMR interagieren und so zu spezifischen chromosomalen Konformationen führen. Gegenwärtig beschäftigen sich mehrere Studien mit der Frage, ob sich in der *Dlk1/Gtl2* Region weitere Regulations-Elemente finden (Dindot et al. 2009; Hammoud et al. 2009). Wie wichtig das korrekte Zusammenspiel der einzelnen regulatorischen Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region und die damit verbundene Genexpression ist, zeigt die Tatsache, dass Abweichungen in der *Dlk1*-Gendosis letal sind (da Rocha et al. 2009).

Regulationsmodell B

In Modell B wird sowohl für die IG-DMR als auch für die *Gtl2*-DMR eine Insulator-Funktion angenommen. Ferner wird ein Enhancer-Element postuliert, welches zwischen der IG-DMR und der *Gtl2*-DMR lokalisiert ist (s. Abb. 4.6). Auf dem väterlichen Chromosom aktiviert der Enhancer die Protein-kodierenden Gene. Ferner kann auf diesem Chromosom der *Gtl2*dsTR-Silencer mit dem *Gtl2*-Promotor interagieren und das Gen stilllegen. Die auf dem väterlichen Chromosom methylierten und daher inaktiven DMRs setzen diesen Interaktionen nichts entgegen.

Auf dem mütterlichen Chromosom binden sowohl im Bereich der IG-DMR als auch in der Gtl2-DMR Insulator-Proteine (wie CTCF). Der so vermittelte Insulator-Effekt führt dazu, dass das EE von den Promotoren abgeschottet wird. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch eine Interaktion der beiden DMRs. Der Gtl2dsTR-Silencer kann durch die CTCF-Bindung in der Gtl2-DMR nicht mehr mit dem *Gtl2*-Promotor interagieren. Stattdessen kann er die nun für eine Interaktion „frei“ gewordenen Promotoren der Protein-kodierenden Gene binden und diese Gene stilllegen.

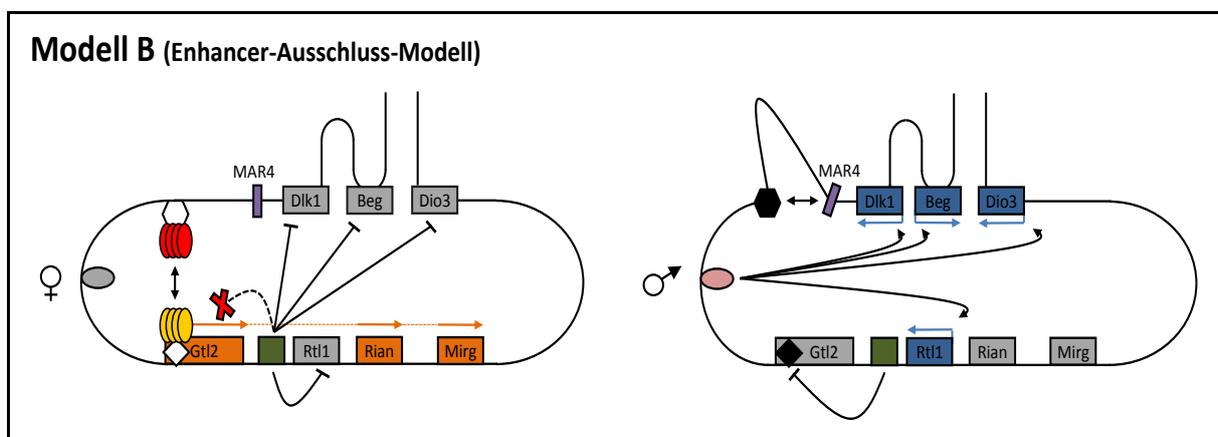


Abbildung 4.6: Regulationsmodell B der IG-DMR vermittelten allelspezifischen Genexpression in der *Dlk1/Gtl2* Region. Ein Enhancer-Element zwischen der IG-DMR und *Gtl2* reguliert die Genexpression der Protein-kodierenden Gene auf dem paternalen Chromosom. Auf dem mütterlichen Chromosom binden Insulator-Proteine (z.B. CTCF) in den differenziell methylierten Bereichen zu beiden Flanken des Enhancers (IG-DMR, *Gtl2*-DMR). Dadurch wird dessen Interaktion mit den Promotoren der paternalen Gene unterbunden. Diese sind nun frei für eine Interaktion mit dem *Gtl2*dsTR-Silencer und können so still gelegt werden. Der Promotor des mütterlich exprimierten *Gtl2*-Gens ist jedoch durch die CTCF-Bindung vor dem Einfluss des Silencers geschützt und *Gtl2* wird exprimiert. Da CTCF auf dem methylierten, paternalen Chromosom nicht bindet, wird hier *Gtl2* durch den Silencer negativ reguliert (Legende: s. Abb. 4.5)

Für dieses Modell spricht die nachgewiesene Bindung des Insulator-Proteins CTCF in der *Gtl2*-DMR, sowie die vorläufigen Ergebnisse der hier durchgeführten Reporter-Assays (vgl. Abschnitt 4.5). Aber auch der IG-DMR käme nach Modell B eine Insulator-Funktion zu. Der murine IG-DMR TR1G zeigte in den hier durchgeführten Experimenten allerdings nur ein reduziertes Insulator-Potenzial (vgl. Abschnitt 4.3). Durch weitere Experimente müsste geklärt werden, ob die IG-DMR in ihrer Gesamtheit in der Lage ist, als Insulator zu agieren. Derartige Versuche wurden in einer kürzlich publizierten Studie bereits durchgeführt, wobei sich kein Insulator-Potenzial detektieren ließ; das dazu genutzte Testsystem ist jedoch

weniger sensitiv als ein Luciferase-Reporter-Assay (Carr et al. 2007). Auch sind bislang keine die IG-DMR (allelspezifisch) bindenden Proteine bekannt. Mit Hilfe der neu entwickelten SILAC-Methode könnten diese möglicherweise identifiziert werden (Mittler et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden zwar *in silico* putative Bindestellen für die Runx-Protein-Familie identifiziert, Runx1-Kotransfektions-Experimente konnten (in den Insulator-Assays) allerdings keine Effekte induzieren (s. Abschnitt 3.1.4.3). Letztlich konnten bislang noch keine Enhancer-Elemente zwischen der IG-DMR und der Gtl2-DMR identifiziert werden. Aufgrund der gegenwärtigen Datenlage scheint daher Regulationsmodell B eher unwahrscheinlich, es kann jedoch nicht kategorisch ausgeschlossen werden.

4.8 RNAi-Assays

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Charakterisierung *cis*-agierender DNA-Elemente der *Dlk1/Gtl2* Region beschrieben. Eine weitere Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der zahlreichen miRNAs, die in der Imprinting-Region bislang identifiziert wurden. Dies ist vor allem deshalb interessant, da bereits für einige der miRNAs gezeigt werden konnte, dass sie auf post-transkriptioneller Ebene die *Rtl1*-Expression regulieren (Davis et al. 2005). Bislang liegt lediglich eine *in silico*-Target-Analyse der *Dlk1/Gtl2*-miRNAs vor (Kircher et al. 2008); vor allem deshalb, weil die Hochdurchsatz-Verifizierung von miRNA-Targets technisch nur schwer durchzuführen und mit hohen Kosten verbunden ist (Easow et al. 2007; Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008). Es zeigte sich, dass die Expression der vorhergesagten miRNA-Targets in bestimmten Hirngeweben im Vergleich zu den sog. Anti-Targets verändert ist. Dies könnte durch die miRNAs (mit-) verursacht werden, da sie im Gehirn exprimiert sind (Landgraf et al. 2007; Bak et al. 2008). Da eine kritische Evaluierung aller derzeit verfügbaren *in silico* Vorhersagen jedoch eine hohe Ungenauigkeit zu Tage brachte (Selbach et al. 2008), müssen putative miRNA-mRNA-Interaktionen individuell untersucht werden. In der von mir betreuten Diplom-Arbeit von Diplom-Biologin Julia Mehn („Proteomanalyse zur Detektion microRNA-induzierter RNA-Interferenzeffekte und Generierung stabiler Zelllinien zur Überexpression von microRNAs in Säugerzellen“, 2007) wurde bereits versucht, miRNA-induzierte RNAi-Effekte mittels 2D-PAGE zu detektieren und so miRNA-Targets zu identifizieren. Die Methode erwies sich jedoch als technisch aufwendig, kostspielig und nicht sensitiv genug. In der

vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein Test-System entwickelt werden, mit dem sich miRNA-induzierte RNAi-Effekte sensitiv und kostengünstig nachweisen lassen. Dazu wurde der bereits etablierte Reporter-Assay derart modifiziert, dass *in trans* vermittelte Effekte zu detektieren sind. Mit diesem RNAi-Assay könnte im niedrigen bis mittleren Probendurchsatz die Vorhersage *in vitro* verifiziert werden. Zunächst wurde der RNAi-Assay mit fünf verschiedenen miRNAs exemplarisch für die miRNAs der *Dlk1/Gtl2* Region (mir-134, mir-154, mir-323, mir-409, mir-411) auf seine Sensitivität überprüft. In allen Fällen (außer der mir-134) konnte bei Reportern mit einer perfekten Bindestelle für die entsprechende miRNA signifikante RNAi-Effekte beobachtet werden, nicht jedoch bei Transfektion einer anderen miRNA. Das Experiment zeigte erstens, dass der Assay in der Lage ist, RNAi-Effekte zu detektieren und zweitens, dass diese auch sequenzspezifisch sind.

Warum konnten keine RNAi-Effekte im Falle der mir-134 beobachtet werden? In der von mir betreuten Diplom-Arbeit von Diplom-Biologe Daniel Jans wurde in transienten Transfektionen die korrekte Expression/Prozessierung der miRNAs von mir-134-, mir-154- und mir-323-Expressionsplasmiden per Northern Blot-Hybridisierung überprüft („Detektion und RNA-Interferenz-Effekte dreier microRNAs der *Dlk1/Gtl2* Imprinting Region nach Transfektion in Säugerzellen“, 2008). Im Gegensatz zur mir-154 und mir-323 konnte für die mir-134 kein Signal detektiert werden. Dies zeigt, dass vom mir-134-Plasmid keine effektive Expression/Prozession der reifen mir-134 erfolgte.

Anschließend wurden ausgehend von den bioinformatischen Analysen (Kircher et al. 2008) 13 vorhergesagte miRNA-Bindestellen (für die mir-154 bzw. mir-323) im RNAi-Assay getestet. Dabei konnte lediglich für die Gene *Scn5a* und *P2rx7* ein signifikanter RNAi-Effekt beobachtet werden (>30% Reduktion der Luciferase-Aktivität). Dies zeigt, dass der etablierte RNAi-Assay in der Lage ist, microRNA-vermittelte RNAi-Effekte auf natürliche Bindestellen zu detektieren. Um *Scn5a* und *P2rx7* als mir-154/mir-323-Targets zu verifizieren, sollte mit mindestens einer weiteren unabhängigen Methode der Effekt der miRNAs auf die beiden Gene untersucht werden. Nahe liegend wären hier z.B. Western Blots in Zelllinien, die die beiden miRNAs überexprimieren. Hier sollte sich die endogene Proteinmenge der beiden Gene nach miRNA-Kotransfektion reduzieren.

P2rx2 (*P2X7*) gehört zur Familie der ATP-Purin-Rezeptoren und fungiert als Ligand-gebundener Ionenkanal in Neuronen. Studien zeigten eine Funktion in der Neurotransmitter-

Abgabe im Hippocampus der Ratte (Sperlágh et al. 2002). Ferner konnte nach *P2rx7*-Inhibition verstärktes Axon-Wachstum/Verzweigung verzeichnet werden (Díaz-Hernandez et al. 2008). Eine weitere Untersuchung entdeckte, dass *P2rx7* durch die miRNAs mir-150 und mir-186 auf post-transkriptioneller Ebene reguliert wird (Zhou et al. 2008). Die Identifizierung von *P2rx7* als mögliches Target zweier miRNAs der *Dlk1/Gtl2* Region ist besonders vor dem Hintergrund der Publikationen der Arbeitsgruppe G. Schratt interessant: sie konnten herausarbeiten, dass die microRNA-134 durch post-transkriptionelle Regulation von *Limk1* und *Pumilio2* die Dendritogenese reguliert (Schratt et al. 2006; Fiore et al. 2009). *Scn5a* kodiert für ein integrales Membran-Protein, welches Bestandteil eines Natrium-Ionenkanals ist. *Scn5a*-Mutationen führen zum sog. LongQT-Syndrom (auch: Brugada Syndrom), einer ernsten, meist asymptomatischen Herzerkrankung. Ursache ist eine geringfügige Abweichung in der elektrischen Signalübermittlung im Herzmuskel. Im Gehirn ist *Scn5a* allerdings nur schwach exprimiert.

Die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der getesteten Target-Sequenzen auch einen signifikanten Effekt im RNAi-Assay zeigte, macht deutlich, dass die derzeit für *in silico* Vorhersagen benutzten Algorithmen die Vorgänge bei der individuellen miRNA-mRNA-Interaktion nur unzureichend erfassen. Nichtsdestotrotz können sie helfen eine Kandidaten-Vorauswahl zu treffen. Mit der immer rascher fortschreitenden Entwicklung von Hochdurchsatz-Methoden ist die Identifizierung von miRNA-Targets bald in großem Maßstab möglich und *in silico* Vorhersagen werden hinfällig. Die bioinformatischen Analysen werden sich vielmehr damit befassen müssen, die zahlreichen post-transkriptionellen miRNA-Effekte in der Zelle in die bekannten regulatorischen Netzwerke einzubinden (Marson et al. 2008).

Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung wichtiger Regulations-Elemente der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wurden putative Regulations-Elemente ausgewählt und der experimentellen Analyse zugeführt. Zur Aufdeckung *cis*-regulatorischen Potenzials diente ein auf dem Luciferase-Gen basierender Reporter-Assay. Im Bereich der IG-DMR konnte so signifikantes regulatorisches Potenzial in Form von Promotor-Aktivität, Enhancer-Aktivität bzw. Insulator-Aktivität identifiziert werden. Durch RT-PCRs konnte ferner gezeigt werden, dass die murine IG-DMR Promotor-Aktivität auf das maternale Chromosom und frühe Embryonalstadien beschränkt ist. Des Weiteren wurden im Bereich des *Gtl2*-Gens zwei Elemente mit Silencer-Potenzial bzw. Insulator-Potenzial identifiziert. Die Auswertung der Reporter-Assays und die Einbeziehung von Literatur-Daten erlaubte schließlich die Erstellung mehrerer Modelle, die die *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Regulation beschreiben.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war die funktionelle Analyse von miRNAs der *Dlk1/Gtl2* Region. Dazu wurden exemplarisch fünf der ca. 50 miRNAs ausgewählt und einem eigens etablierten Reporter-Assay zur Detektion von RNAi-Effekten zugeführt. In den RNAi-Assays zeigten zwei der 15 getesteten Bindestellen signifikante RNA-Interferenz-Effekte. Dies sind die ersten bekannten Hinweise dafür, dass die Gene *P2rx7* und *Scn5a* direkte Targets der miRNAs mir-154 und mir-323 darstellen.

Summary

Main topic of this thesis was the identification and characterization of regulatory-elements of the *Dlk1/Gtl2* imprinted region. To identify putative regulatory elements a thorough *in silico* analysis was performed. Subsequently luciferase-gene based reporter-assays were used to uncover regulatory-potential. For the first time, regulatory potential could be observed in the IG-DMR revealing elements with significant promoter-activity, enhancer-activity and insulator-activity respectively. Additional experiments such as RT-PCRs and SNUPE-assays were used to characterize the murine IG-DMR promoter-element. Its activity was restricted to the maternal allele and to early embryonic development. This suggests a regulatory function of the IG-DMR mainly at pre-implantation stages. Furthermore two elements near the *Gtl2*-gene were revealed, showing silencer- and insulator-potential respectively. Finally, the results of the reporter-assays were conducted to develop a model describing imprinting-regulation of the *Dlk1/Gtl2* region.

Another aspect of the thesis was a functional analysis of the microRNA-cluster in the *Dlk1/Gtl2* domain. Therefore, five of the approx. 50 miRNA-genes were chosen and tested in a previously established reporter-assay, which detects RNAi-effects. The performed RNAi-assays resulted in the validation of two (out of 15) miRNA-binding sites. These are the first hints for a direct regulation of the *P2rx7* and *Scn5a*-genes by mir-154 and mir-323.

5 Referenzen

- Abdallah, B. M., C. H. Jensen, G. Gutierrez, R. G. Leslie, T. G. Jensen, and M. Kassem. "Regulation of Human Skeletal Stem Cells Differentiation by Dlk1/Pref-1." *J Bone Miner Res* 19, no. 5 (2004): 841-52.
- Allen, E., S. Horvath, F. Tong, P. Kraft, E. Spiteri, A. D. Riggs, and Y. Marahrens. "High Concentrations of Long Interspersed Nuclear Element Sequence Distinguish Monoallelically Expressed Genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, no. 17 (2003): 9940-5.
- Babak, T., B. Deveale, C. Armour, C. Raymond, M. A. Cleary, D. van der Kooy, J. M. Johnson, and L. P. Lim. "Global Survey of Genomic Imprinting by Transcriptome Sequencing." *Curr Biol* 18, no. 22 (2008): 1735-41.
- Bachellerie, J. P., J. Cavaille, and A. Huttenhofer. "The Expanding Snorna World." *Biochimie* 84, no. 8 (2002): 775-90.
- Baek, D., J. Villen, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi, and D. P. Bartel. "The Impact of Micrnas on Protein Output." *Nature* 455, no. 7209 (2008): 64-71.
- Bailey, J. A., L. Carrel, A. Chakravarti, and E. E. Eichler. "Molecular Evidence for a Relationship between Line-1 Elements and X Chromosome Inactivation: The Lyon Repeat Hypothesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 12 (2000): 6634-9.
- Bak, M., A. Silaharoglu, M. Moller, M. Christensen, M. F. Rath, B. Skryabin, N. Tommerup, and S. Kauppinen. "MicroRNA Expression in the Adult Mouse Central Nervous System." *RNA* 14, no. 3 (2008): 432-44.
- Baladron, V., M. J. Ruiz-Hidalgo, M. L. Nueda, M. J. Diaz-Guerra, J. J. Garcia-Ramirez, E. Bonvini, E. Gubina, and J. Laborda. "Dlk Acts as a Negative Regulator of Notch1 Activation through Interactions with Specific Egf-Like Repeats." *Exp Cell Res* 303, no. 2 (2005): 343-59.
- Banerjee, C., L. R. McCabe, J. Y. Choi, S. W. Hiebert, J. L. Stein, G. S. Stein, and J. B. Lian. "Runt Homology Domain Proteins in Osteoblast Differentiation: Aml3/Cbfa1 Is a Major Component of a Bone-Specific Complex." *J Cell Biochem* 66, no. 1 (1997): 1-8.
- Barlow, D. P., R. Stoger, B. G. Herrmann, K. Saito, and N. Schweifer. "The Mouse Insulin-Like Growth Factor Type-2 Receptor Is Imprinted and Closely Linked to the Tme Locus." *Nature* 349, no. 6304 (1991): 84-7.
- Barrera, L. O., Z. Li, A. D. Smith, K. C. Arden, W. K. Cavenee, M. Q. Zhang, R. D. Green, and B. Ren. "Genome-Wide Mapping and Analysis of Active Promoters in Mouse Embryonic Stem Cells and Adult Organs." *Genome Res* 18, no. 1 (2008): 46-59.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, and K. Zhao. "High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome." *Cell* 129, no. 4 (2007): 823-37.
- Bartel, D. P. "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." *Cell* 116, no. 2 (2004): 281-97.
- Beechey, C. V. "Appendix: Imprinted Genes and Regions in Mouse and Human." *Results Probl Cell Differ* 25 (1999): 303-23.
- Bell, A. C., and G. Felsenfeld. "Methylation of a Ctf-Dependent Boundary Controls Imprinted Expression of the Igf2 Gene." *Nature* 405, no. 6785 (2000): 482-5.

- Bernstein, B. E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D. K. Bailey, D. J. Huebert, S. McMahon, E. K. Karlsson, E. J. Kulbokas, 3rd, T. R. Gingeras, S. L. Schreiber, and E. S. Lander. "Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse." *Cell* 120, no. 2 (2005): 169-81.
- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber, and E. S. Lander. "A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells." *Cell* 125, no. 2 (2006): 315-26.
- Bernstein, E., A. M. Denli, and G. J. Hannon. "The Rest Is Silence." *RNA* 7, no. 11 (2001): 1509-21.
- Berteaux, N., N. Aptel, G. Cathala, C. Genton, J. Coll, A. Daccache, N. Spruyt, H. Hondermarck, T. Dugimont, J. J. Curgy, T. Forne, and E. Adriaenssens. "A Novel H19 Antisense Rna Overexpressed in Breast Cancer Contributes to Paternal Igf2 Expression." *Mol Cell Biol* 28, no. 22 (2008): 6731-45.
- Boeger, H., D. A. Bushnell, R. Davis, J. Griesenbeck, Y. Lorch, J. S. Strattan, K. D. Westover, and R. D. Kornberg. "Structural Basis of Eukaryotic Gene Transcription." *FEBS Lett* 579, no. 4 (2005): 899-903.
- Braem, C., B. Recolin, R. C. Rancourt, C. Angiolini, P. Barthes, P. Branchu, F. Court, G. Cathala, A. C. Ferguson-Smith, and T. Forne. "Genomic Matrix Attachment Region and Chromosome Conformation Capture Quantitative Real Time Pcr Assays Identify Novel Putative Regulatory Elements at the Imprinted Dlk1/Gtl2 Locus." *J Biol Chem* 283, no. 27 (2008): 18612-20.
- Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell, and S. M. Cohen. "Principles of MicroRNA-Target Recognition." *PLoS Biol* 3, no. 3 (2005): e85.
- Brink, R. A. "A Genetic Change Associated with the R Locus in Maize Which Is Directed and Potentially Reversible." *Genetics* 41, no. 6 (1956): 872-89.
- Cai, X., and B. R. Cullen. "The Imprinted H19 Noncoding Rna Is a Primary MicroRNA Precursor." *RNA* 13, no. 3 (2007): 313-6.
- Calin, G. A., and C. M. Croce. "MicroRNA Signatures in Human Cancers." *Nat Rev Cancer* 6, no. 11 (2006): 857-66.
- Cardazzo, B., L. Bargelloni, L. Toffolatti, P. Rimessi, A. Ferlini, and T. Patarnello. "Tempo and Mode of Evolution of a Primate-Specific Retrotransposon Belonging to the Line 1 Family." *J Mol Evol* 57 Suppl 1 (2003): S268-76.
- Carr, M. S., A. Yevtodiyeenko, C. L. Schmidt, and J. V. Schmidt. "Allele-Specific Histone Modifications Regulate Expression of the Dlk1-Gtl2 Imprinted Domain." *Genomics* 89, no. 2 (2007): 280-90.
- Cavaille, J., H. Seitz, M. Paulsen, A. C. Ferguson-Smith, and J. P. Bachellerie. "Identification of Tandemly-Repeated C/D Snorna Genes at the Imprinted Human 14q32 Domain Reminiscent of Those at the Prader-Willi/Angelman Syndrome Region." *Hum Mol Genet* 11, no. 13 (2002): 1527-38.
- Cavaille, J., P. Vitali, E. Basyuk, A. Huttenhofer, and J. P. Bachellerie. "A Novel Brain-Specific Box C/D Small Nucleolar Rna Processed from Tandemly Repeated Introns of a Noncoding Rna Gene in Rats." *J Biol Chem* 276, no. 28 (2001): 26374-83.
- Chapman, V., L. Forrester, J. Sanford, N. Hastie, and J. Rossant. "Cell Lineage-Specific Undermethylation of Mouse Repetitive DNA." *Nature* 307, no. 5948 (1984): 284-6.

- Charlier, C., K. Segers, L. Karim, T. Shay, G. Gyapay, N. Cockett, and M. Georges. "The Callipyge Mutation Enhances the Expression of Coregulated Imprinted Genes in Cis without Affecting Their Imprinting Status." *Nat Genet* 27, no. 4 (2001): 367-9.
- Charlier, C., K. Segers, D. Wagenaar, L. Karim, S. Berghmans, O. Jaillon, T. Shay, J. Weissenbach, N. Cockett, G. Gyapay, and M. Georges. "Human-Ovine Comparative Sequencing of a 250-Kb Imprinted Domain Encompassing the Callipyge (Clpg) Locus and Identification of Six Imprinted Transcripts: Dlk1, Dat, Gtl2, Peg11, Antipeg11, and Meg8." *Genome Res* 11, no. 5 (2001): 850-62.
- Chernukhin, I., S. Shamsuddin, S. Y. Kang, R. Bergstrom, Y. W. Kwon, W. Yu, J. Whitehead, R. Mukhopadhyay, F. Docquier, D. Farrar, I. Morrison, M. Vigneron, S. Y. Wu, C. M. Chiang, D. Loukinov, V. Lobanenko, R. Ohlsson, and E. Klenova. "CTCF Interacts with and Recruits the Largest Subunit of RNA Polymerase II to CTCF Target Sites Genome-Wide." *Mol Cell Biol* 27, no. 5 (2007): 1631-48.
- Choi, J. Y., J. Pratap, A. Javed, S. K. Zaidi, L. Xing, E. Balint, S. Dalamangas, B. Boyce, A. J. van Wijnen, J. B. Lian, J. L. Stein, S. N. Jones, and G. S. Stein. "Subnuclear Targeting of Runx/Cbfa/Aml Factors Is Essential for Tissue-Specific Differentiation During Embryonic Development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 15 (2001): 8650-5.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. "Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction." *Anal Biochem* 162, no. 1 (1987): 156-9.
- Chotalia, M., S. A. Smallwood, N. Ruf, C. Dawson, D. Lucifero, M. Frontera, K. James, W. Dean, and G. Kelsey. "Transcription Is Required for Establishment of Germline Methylation Marks at Imprinted Genes." *Genes Dev* 23, no. 1 (2009): 105-17.
- Coan, P. M., G. J. Burton, and A. C. Ferguson-Smith. "Imprinted Genes in the Placenta--a Review." *Placenta* 26 Suppl A (2005): S10-20.
- Cockett, N. E., S. P. Jackson, T. L. Shay, F. Farnir, S. Berghmans, G. D. Snowden, D. M. Nielsen, and M. Georges. "Polar Overdominance at the Ovine Callipyge Locus." *Science* 273, no. 5272 (1996): 236-8.
- Cockett, N. E., S. P. Jackson, T. L. Shay, D. Nielsen, S. S. Moore, M. R. Steele, W. Barendse, R. D. Green, and M. Georges. "Chromosomal Localization of the Callipyge Gene in Sheep (*Ovis Aries*) Using Bovine DNA Markers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, no. 8 (1994): 3019-23.
- Cotter, P. D., S. Kaffe, L. D. McCurdy, M. Jhaveri, J. P. Willner, and K. Hirschhorn. "Paternal Uniparental Disomy for Chromosome 14: A Case Report and Review." *Am J Med Genet* 70, no. 1 (1997): 74-9.
- Crosier, P. S., M. L. Kaley-Zylinska, C. J. Hall, M. V. Flores, J. A. Horsfield, and K. E. Crosier. "Pathways in Blood and Vessel Development Revealed through Zebrafish Genetics." *Int J Dev Biol* 46, no. 4 (2002): 493-502.
- Croteau, S., M. C. Charron, K. E. Latham, and A. K. Naumova. "Alternative Splicing and Imprinting Control of the Meg3/Gtl2-Dlk1 Locus in Mouse Embryos." *Mamm Genome* 14, no. 4 (2003): 231-41.
- Croteau, S., D. Roquis, M. C. Charron, D. Frappier, D. Yavin, J. C. Loredano-Osti, T. J. Hudson, and A. K. Naumova. "Increased Plasticity of Genomic Imprinting of Dlk1 in Brain Is Due to Genetic and Epigenetic Factors." *Mamm Genome* 16, no. 2 (2005): 127-35.
- da Rocha, S. T., M. Charalambous, S. P. Lin, I. Gutteridge, Y. Ito, D. Gray, W. Dean, and A. C. Ferguson-Smith. "Gene Dosage Effects of the Imprinted Delta-Like Homologue 1

- (Dlk1/Pref1) in Development: Implications for the Evolution of Imprinting." *PLoS Genet* 5, no. 2 (2009): e1000392.
- Davis, E., F. Caiment, X. Tordoir, J. Cavaille, A. Ferguson-Smith, N. Cockett, M. Georges, and C. Charlier. "Rnai-Mediated Allelic Trans-Interaction at the Imprinted Rtl1/Peg11 Locus." *Curr Biol* 15, no. 8 (2005): 743-9.
- Davis, E., C. H. Jensen, H. D. Schroder, F. Farnir, T. Shay-Hadfield, A. Kliem, N. Cockett, M. Georges, and C. Charlier. "Ectopic Expression of Dlk1 Protein in Skeletal Muscle of Padumnal Heterozygotes Causes the Callipyge Phenotype." *Curr Biol* 14, no. 20 (2004): 1858-62.
- DeChiara, T. M., E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. "Parental Imprinting of the Mouse Insulin-Like Growth Factor Ii Gene." *Cell* 64, no. 4 (1991): 849-59.
- Deguchi, M., Y. Hata, M. Takeuchi, N. Ide, K. Hirao, I. Yao, M. Irie, A. Toyoda, and Y. Takai. "Begain (Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein), a Novel Neuronal Psd-95/Sap90-Binding Protein." *J Biol Chem* 273, no. 41 (1998): 26269-72.
- Delaval, K., J. Govin, F. Cerqueira, S. Rousseaux, S. Khochbin, and R. Feil. "Differential Histone Modifications Mark Mouse Imprinting Control Regions During Spermatogenesis." *EMBO J* 26, no. 3 (2007): 720-9.
- Diaz-Hernandez, M., A. del Puerto, J. I. Diaz-Hernandez, M. Diez-Zaera, J. J. Lucas, J. J. Garrido, and M. T. Miras-Portugal. "Inhibition of the Atp-Gated P2x7 Receptor Promotes Axonal Growth and Branching in Cultured Hippocampal Neurons." *J Cell Sci* 121, no. Pt 22 (2008): 3717-28.
- Dindot, S. V., R. Person, M. Strivens, R. Garcia, and A. L. Beaudet. "Epigenetic Profiling at Mouse Imprinted Gene Clusters Reveals Novel Epigenetic and Genetic Features at Differentially Methylated Regions." *Genome Res* (2009).
- Doe, C. M., D. Relkovic, A. S. Garfield, J. W. Dalley, D. E. Theobald, T. Humby, L. S. Wilkinson, and A. R. Isles. "Loss of the Imprinted Snorna Mbii-52 Leads to Increased 5htr2c Pre-Rna Editing and Altered 5ht2cr-Mediated Behaviour." *Hum Mol Genet* 18, no. 12 (2009): 2140-8.
- Downing, J. R., D. R. Head, A. M. Curcio-Brint, M. G. Hulshof, T. A. Motroni, S. C. Raimondi, A. J. Carroll, H. A. Drabkin, C. Willman, K. S. Theil, and et al. "An Aml1/Eto Fusion Transcript Is Consistently Detected by Rna-Based Polymerase Chain Reaction in Acute Myelogenous Leukemia Containing the (8;21)(Q22;Q22) Translocation." *Blood* 81, no. 11 (1993): 2860-5.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty. "Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation." *Cell* 89, no. 5 (1997): 747-54.
- Easow, G., A. A. Teleman, and S. M. Cohen. "Isolation of Microna Targets by Mirnp Immunopurification." *RNA* 13, no. 8 (2007): 1198-204.
- Edwards, C. A., W. Rens, O. Clarke, A. J. Mungall, T. Hore, J. A. Graves, I. Dunham, A. C. Ferguson-Smith, and M. A. Ferguson-Smith. "The Evolution of Imprinting: Chromosomal Mapping of Orthologues of Mammalian Imprinted Domains in Monotreme and Marsupial Mammals." *BMC Evol Biol* 7 (2007): 157.
- Engel, N., A. K. Raval, J. L. Thorvaldsen, and S. M. Bartolomei. "Three-Dimensional Conformation at the H19/Igf2 Locus Supports a Model of Enhancer Tracking." *Hum Mol Genet* 17, no. 19 (2008): 3021-9.
- Engel, N., J. L. Thorvaldsen, and M. S. Bartolomei. "Ctcf Binding Sites Promote Transcription Initiation and Prevent DNA Methylation on the Maternal Allele at the Imprinted H19/Igf2 Locus." *Hum Mol Genet* 15, no. 19 (2006): 2945-54.

- Engemann, S., M. Stroedicke, M. Paulsen, O. Franck, R. Reinhardt, N. Lane, W. Reik, and J. Walter. "Sequence and Functional Comparison in the Beckwith-Wiedemann Region: Implications for a Novel Imprinting Centre and Extended Imprinting." *Hum Mol Genet* 9, no. 18 (2000): 2691-706.
- Enomoto, H., S. Shiojiri, K. Hoshi, T. Furuichi, R. Fukuyama, C. A. Yoshida, N. Kanatani, R. Nakamura, A. Mizuno, A. Zanma, K. Yano, H. Yasuda, K. Higashio, K. Takada, and T. Komori. "Induction of Osteoclast Differentiation by Runx2 through Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand (Rankl) and Osteoprotegerin Regulation and Partial Rescue of Osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} Mice by Rankl Transgene." *J Biol Chem* 278, no. 26 (2003): 23971-7.
- Feil, R., S. Khosla, P. Cappai, and P. Loi. "Genomic Imprinting in Ruminants: Allele-Specific Gene Expression in Parthenogenetic Sheep." *Mamm Genome* 9, no. 10 (1998): 831-4.
- Feil, R., J. Walter, N. D. Allen, and W. Reik. "Developmental Control of Allelic Methylation in the Imprinted Mouse Igf2 and H19 Genes." *Development* 120, no. 10 (1994): 2933-43.
- Ferguson-Smith, A. C., and J. M. Greally. "Epigenetics: Perceptive Enzymes." *Nature* 449, no. 7159 (2007): 148-9.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. "Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by Micrnas: Are the Answers in Sight?" *Nat Rev Genet* 9, no. 2 (2008): 102-14.
- Fiore, R., S. Khudayberdiev, M. Christensen, G. Siegel, S. W. Flavell, T. K. Kim, M. E. Greenberg, and G. Schratt. "Mef2-Mediated Transcription of the Mir379-410 Cluster Regulates Activity-Dependent Dendritogenesis by Fine-Tuning Pumilio2 Protein Levels." *EMBO J* 28, no. 6 (2009): 697-710.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded Rna in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 391, no. 6669 (1998): 806-11.
- Fitzpatrick, G. V., E. M. Pugacheva, J. Y. Shin, Z. Abdullaev, Y. Yang, K. Khatod, V. V. Lobanenkov, and M. J. Higgins. "Allele-Specific Binding of Ctf to the Multipartite Imprinting Control Region Kvdmr1." *Mol Cell Biol* 27, no. 7 (2007): 2636-47.
- Fitzpatrick, G. V., P. D. Soloway, and M. J. Higgins. "Regional Loss of Imprinting and Growth Deficiency in Mice with a Targeted Deletion of Kvdmr1." *Nat Genet* 32, no. 3 (2002): 426-31.
- Foley, J. E., J. R. Yeh, M. L. Maeder, D. Reyon, J. D. Sander, R. T. Peterson, and J. K. Joung. "Rapid Mutation of Endogenous Zebrafish Genes Using Zinc Finger Nucleases Made by Oligomerized Pool Engineering (OPEN)." *PLoS One* 4, no. 2 (2009): e4348.
- Forrester, W. C., L. A. Fernandez, and R. Grosschedl. "Nuclear Matrix Attachment Regions Antagonize Methylation-Dependent Repression of Long-Range Enhancer-Promoter Interactions." *Genes Dev* 13, no. 22 (1999): 3003-14.
- Forrester, W. C., C. van Genderen, T. Jenuwein, and R. Grosschedl. "Dependence of Enhancer-Mediated Transcription of the Immunoglobulin Mu Gene on Nuclear Matrix Attachment Regions." *Science* 265, no. 5176 (1994): 1221-5.
- Freking, B. A., J. W. Keele, C. W. Beattie, S. M. Kappes, T. P. Smith, T. S. Sonstegard, M. K. Nielsen, and K. A. Leymaster. "Evaluation of the Ovine Callipyge Locus: I. Relative Chromosomal Position and Gene Action." *J Anim Sci* 76, no. 8 (1998): 2062-71.

- Freking, B. A., J. W. Keele, M. K. Nielsen, and K. A. Leymaster. "Evaluation of the Ovine Callipyge Locus: Ii. Genotypic Effects on Growth, Slaughter, and Carcass Traits." *J Anim Sci* 76, no. 10 (1998): 2549-59.
- Freking, B. A., S. K. Murphy, A. A. Wylie, S. J. Rhodes, J. W. Keele, K. A. Leymaster, R. L. Jirtle, and T. P. Smith. "Identification of the Single Base Change Causing the Callipyge Muscle Hypertrophy Phenotype, the Only Known Example of Polar Overdominance in Mammals." *Genome Res* 12, no. 10 (2002): 1496-506.
- Gallagher, R. C., B. Pils, M. Albalwi, and U. Francke. "Evidence for the Role of Pwcr1/Hbii-85 C/D Box Small Nucleolar Rnas in Prader-Willi Syndrome." *Am J Hum Genet* 71, no. 3 (2002): 669-78.
- Galton, V. A., E. Martinez, A. Hernandez, E. A. St Germain, J. M. Bates, and D. L. St Germain. "Pregnant Rat Uterus Expresses High Levels of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase." *J Clin Invest* 103, no. 7 (1999): 979-87.
- Gardiner-Garden, M., and M. Frommer. "Cpg Islands in Vertebrate Genomes." *J Mol Biol* 196, no. 2 (1987): 261-82.
- Gasser, S. M., and U. K. Laemmli. "Cohabitation of Scaffold Binding Regions with Upstream/Enhancer Elements of Three Developmentally Regulated Genes of *D. Melanogaster*." *Cell* 46, no. 4 (1986): 521-30.
- Georges, M., C. Charlier, and N. Cockett. "The Callipyge Locus: Evidence for the Trans Interaction of Reciprocally Imprinted Genes." *Trends Genet* 19, no. 5 (2003): 248-52.
- Georgiades, P., C. Chierakul, and A. C. Ferguson-Smith. "Parental Origin Effects in Human Trisomy for Chromosome 14q: Implications for Genomic Imprinting." *J Med Genet* 35, no. 10 (1998): 821-4.
- Georgiades, P., M. Watkins, M. A. Surani, and A. C. Ferguson-Smith. "Parental Origin-Specific Developmental Defects in Mice with Uniparental Disomy for Chromosome 12." *Development* 127, no. 21 (2000): 4719-28.
- Ghildiyal, M., H. Seitz, M. D. Horwich, C. Li, T. Du, S. Lee, J. Xu, E. L. Kittler, M. L. Zapp, Z. Weng, and P. D. Zamore. "Endogenous Sirnas Derived from Transposons and Mrnas in *Drosophila* Somatic Cells." *Science* 320, no. 5879 (2008): 1077-81.
- Goll, M. G., F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C. L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen, and T. H. Bestor. "Methylation of Trnaasp by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2." *Science* 311, no. 5759 (2006): 395-8.
- Greally, J. M. "Short Interspersed Transposable Elements (Sines) Are Excluded from Imprinted Regions in the Human Genome." *Proc Natl Acad Sci USA* 99, no. 1 (2002): 327-32.
- Hagan, J. P., B. L. O'Neill, C. L. Stewart, S. V. Kozlov, and C. M. Croce. "At Least Ten Genes Define the Imprinted Dlk1-Dio3 Cluster on Mouse Chromosome 12qf1." *PLoS One* 4, no. 2 (2009): e4352.
- Hammoud, S. S., D. A. Nix, H. Zhang, J. Purwar, D. T. Carrell, and B. R. Cairns. "Distinctive Chromatin in Human Sperm Packages Genes for Embryo Development." *Nature* (2009).
- Hansen, R. S. "X Inactivation-Specific Methylation of Line-1 Elements by Dnmt3b: Implications for the Lyon Repeat Hypothesis." *Hum Mol Genet* 12, no. 19 (2003): 2559-67.
- Hark, A. T., C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. LeVorse, and S. M. Tilghman. "Ctcf Mediates Methylation-Sensitive Enhancer-Blocking Activity at the H19/Igf2 Locus." *Nature* 405, no. 6785 (2000): 486-9.

- Hark, A. T., and S. M. Tilghman. "Chromatin Conformation of the H19 Epigenetic Mark." *Hum Mol Genet* 7, no. 12 (1998): 1979-85.
- Hata, Y., and Y. Takai. "Roles of Postsynaptic Density-95/Synapse-Associated Protein 90 and Its Interacting Proteins in the Organization of Synapses." *Cell Mol Life Sci* 56, no. 5-6 (1999): 461-72.
- He, L., X. He, L. P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A. L. Jackson, P. S. Linsley, C. Chen, S. W. Lowe, M. A. Cleary, and G. J. Hannon. "A MicroRNA Component of the P53 Tumour Suppressor Network." *Nature* 447, no. 7148 (2007): 1130-4.
- He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, and S. M. Hammond. "A MicroRNA Polycistron as a Potential Human Oncogene." *Nature* 435, no. 7043 (2005): 828-33.
- Hernandez, A., S. Fiering, E. Martinez, V. A. Galton, and D. St Germain. "The Gene Locus Encoding Iodothyronine Deiodinase Type 3 (Dio3) Is Imprinted in the Fetus and Expresses Antisense Transcripts." *Endocrinology* 143, no. 11 (2002): 4483-6.
- Hernandez, A., J. P. Park, G. J. Lyon, T. K. Mohandas, and D. L. St Germain. "Localization of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase (Dio3) Gene to Human Chromosome 14q32 and Mouse Chromosome 12f1." *Genomics* 53, no. 1 (1998): 119-21.
- Hikichi, T., T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. "Imprinting Regulation of the Murine Meg1/Grb10 and Human Grb10 Genes; Roles of Brain-Specific Promoters and Mouse-Specific Ctf-Binding Sites." *Nucleic Acids Res* 31, no. 5 (2003): 1398-406.
- Hiura, H., J. Komiyama, M. Shirai, Y. Obata, H. Ogawa, and T. Kono. "DNA Methylation Imprints on the Ig-Dmr of the Dlk1-Gtl2 Domain in Mouse Male Germline." *FEBS Lett* 581, no. 7 (2007): 1255-60.
- Hockemeyer, D., F. Soldner, C. Beard, Q. Gao, M. Mitalipova, R. C. Dekelver, G. E. Katibah, R. Amora, E. A. Boydston, B. Zeitler, X. Meng, J. C. Miller, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov, and R. Jaenisch. "Efficient Targeting of Expressed and Silent Genes in Human ESCs and iPSCs Using Zinc-Finger Nucleases." *Nat Biotechnol* (2009).
- Hoogendoorn, B., M. J. Owen, P. J. Oefner, N. Williams, J. Austin, and M. C. O'Donovan. "Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms by Primer Extension and High Performance Liquid Chromatography." *Hum Genet* 104, no. 1 (1999): 89-93.
- Hoogenkamp, M., M. Lichtinger, H. Kryszynska, C. Lancrin, D. Clarke, A. Williamson, L. Mazzarella, R. Ingram, H. Jorgensen, A. Fisher, D. G. Tenen, V. Kouskoff, G. Lacaud, and C. Bonifer. "Early Chromatin Unfolding by Runx1: A Molecular Explanation for Differential Requirements During Specification Versus Maintenance of the Hematopoietic Gene Expression Program." *Blood* 114, no. 2 (2009): 299-309.
- Hutter, B., V. Helms, and M. Paulsen. "Tandem Repeats in the CpG Islands of Imprinted Genes." *Genomics* 88, no. 3 (2006): 323-32.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, and P. D. Zamore. "A Cellular Function for the Rna-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the Let-7 Small Temporal Rna." *Science* 293, no. 5531 (2001): 834-8.
- Hutvagner, G., and P. D. Zamore. "A MicroRNA in a Multiple-Turnover Rnai Enzyme Complex." *Science* 297, no. 5589 (2002): 2056-60.
- Inoue, K., T. Shiga, and Y. Ito. "Runx Transcription Factors in Neuronal Development." *Neural Dev* 3 (2008): 20.

- Ishihara, K., N. Hatano, H. Furuumi, R. Kato, T. Iwaki, K. Miura, Y. Jinno, and H. Sasaki. "Comparative Genomic Sequencing Identifies Novel Tissue-Specific Enhancers and Sequence Elements for Methylation-Sensitive Factors Implicated in Igf2/H19 Imprinting." *Genome Res* 10, no. 5 (2000): 664-71.
- Ishihara, K., and H. Sasaki. "An Evolutionarily Conserved Putative Insulator Element near the 3' Boundary of the Imprinted Igf2/H19 Domain." *Hum Mol Genet* 11, no. 14 (2002): 1627-36.
- Iwatsuki, K., K. Tanaka, T. Kaneko, R. Kazama, S. Okamoto, Y. Nakayama, Y. Ito, M. Satake, S. Takahashi, A. Miyajima, T. Watanabe, and T. Hara. "Runx1 Promotes Angiogenesis by Downregulation of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3." *Oncogene* 24, no. 7 (2005): 1129-37.
- Jensen, C. H., T. N. Krogh, P. Hojrup, P. P. Clausen, K. Skjodt, L. I. Larsson, J. J. Enghild, and B. Teisner. "Protein Structure of Fetal Antigen 1 (Fa1). A Novel Circulating Human Epidermal-Growth-Factor-Like Protein Expressed in Neuroendocrine Tumors and Its Relation to the Gene Products of Dlk and Pg2." *Eur J Biochem* 225, no. 1 (1994): 83-92.
- Jenuwein, T., W. C. Forrester, L. A. Fernandez-Herrero, G. Laible, M. Dull, and R. Grosschedl. "Extension of Chromatin Accessibility by Nuclear Matrix Attachment Regions." *Nature* 385, no. 6613 (1997): 269-72.
- Jia, D., R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch, and X. Cheng. "Structure of Dnmt3a Bound to Dnmt3l Suggests a Model for De Novo DNA Methylation." *Nature* 449, no. 7159 (2007): 248-51.
- Jiang, H., F. Zhang, T. Kurosu, and B. M. Peterlin. "Runx1 Binds Positive Transcription Elongation Factor B and Represses Transcriptional Elongation by Rna Polymerase Ii: Possible Mechanism of Cd4 Silencing." *Mol Cell Biol* 25, no. 24 (2005): 10675-83.
- John, B., A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks. "Human MicroRNA Targets." *PLoS Biol* 2, no. 11 (2004): e363.
- Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, and F. J. Slack. "Ras Is Regulated by the Let-7 MicroRNA Family." *Cell* 120, no. 5 (2005): 635-47.
- Jurkowska, R. Z., N. Anspach, C. Urbanke, D. Jia, R. Reinhardt, W. Nellen, X. Cheng, and A. Jeltsch. "Formation of Nucleoprotein Filaments by Mammalian DNA Methyltransferase Dnmt3a in Complex with Regulator Dnmt3l." *Nucleic Acids Res* 36, no. 21 (2008): 6656-63.
- Kagami, M., Y. Sekita, G. Nishimura, M. Irie, F. Kato, M. Okada, S. Yamamori, H. Kishimoto, M. Nakayama, Y. Tanaka, K. Matsuoka, T. Takahashi, M. Noguchi, K. Masumoto, T. Utsunomiya, H. Kouzan, Y. Komatsu, H. Ohashi, K. Kurosawa, K. Kosaki, A. C. Ferguson-Smith, F. Ishino, and T. Ogata. "Deletions and Epimutations Affecting the Human 14q32.2 Imprinted Region in Individuals with Paternal and Maternal Upd(14)-Like Phenotypes." *Nat Genet* 40, no. 2 (2008): 237-42.
- Kanduri, C., G. Fitzpatrick, R. Mukhopadhyay, M. Kanduri, V. Lobanenkova, M. Higgins, and R. Ohlsson. "A Differentially Methylated Imprinting Control Region within the Kcnq1 Locus Harbors a Methylation-Sensitive Chromatin Insulator." *J Biol Chem* 277, no. 20 (2002): 18106-10.
- Kanduri, C., V. Pant, D. Loukinov, E. Pugacheva, C. F. Qi, A. Wolffe, R. Ohlsson, and V. V. Lobanenkova. "Functional Association of Ctfc with the Insulator Upstream of the

- H19 Gene Is Parent of Origin-Specific and Methylation-Sensitive." *Curr Biol* 10, no. 14 (2000): 853-6.
- Kanduri, C., N. Thakur, and R. R. Pandey. "The Length of the Transcript Encoded from the Kcnq1ot1 Antisense Promoter Determines the Degree of Silencing." *EMBO J* 25, no. 10 (2006): 2096-106.
- Kanduri, M., C. Kanduri, P. Mariano, A. A. Vostrov, W. Quitschke, V. Lobanenko, and R. Ohlsson. "Multiple Nucleosome Positioning Sites Regulate the Ctf-Mediated Insulator Function of the H19 Imprinting Control Region." *Mol Cell Biol* 22, no. 10 (2002): 3339-44.
- Kaneda, M., M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li, and H. Sasaki. "Essential Role for De Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a in Paternal and Maternal Imprinting." *Nature* 429, no. 6994 (2004): 900-3.
- Kanellopoulou, C., S. A. Muljo, A. L. Kung, S. Ganesan, R. Drapkin, T. Jenuwein, D. M. Livingston, and K. Rajewsky. "Dicer-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells Are Defective in Differentiation and Centromeric Silencing." *Genes Dev* 19, no. 4 (2005): 489-501.
- Kang, K., J. H. Chung, and J. Kim. "Evolutionary Conserved Motif Finder (Ecmfinder) for Genome-Wide Identification of Clustered Yy1- and Ctf-Binding Sites." *Nucleic Acids Res* 37, no. 6 (2009): 2003-13.
- Kawahara, M., Q. Wu, A. C. Ferguson-Smith, and T. Kono. "Appropriate Expression of Imprinted Genes on Mouse Chromosome 12 Extends Development of Bi-Maternal Embryos to Term." *FEBS Lett* 581, no. 27 (2007): 5178-84.
- Kawahara, M., Q. Wu, N. Takahashi, S. Morita, K. Yamada, M. Ito, A. C. Ferguson-Smith, and T. Kono. "High-Frequency Generation of Viable Mice from Engineered Bi-Maternal Embryos." *Nat Biotechnol* 25, no. 9 (2007): 1045-50.
- Kawahara, M., Q. Wu, Y. Yaguchi, A. C. Ferguson-Smith, and T. Kono. "Complementary Roles of Genes Regulated by Two Paternally Methylated Imprinted Regions on Chromosomes 7 and 12 in Mouse Placentation." *Hum Mol Genet* 15, no. 19 (2006): 2869-79.
- Kawahara, Y., M. Megraw, E. Kreider, H. Iizasa, L. Valente, A. G. Hatzigeorgiou, and K. Nishikura. "Frequency and Fate of MicroRNA Editing in Human Brain." *Nucleic Acids Res* 36, no. 16 (2008): 5270-80.
- Kawahara, Y., B. Zinshteyn, T. P. Chendrimada, R. Shiekhattar, and K. Nishikura. "RNA Editing of the MicroRNA-151 Precursor Blocks Cleavage by the Dicer-Trbp Complex." *EMBO Rep* 8, no. 8 (2007): 763-9.
- Ke, X., and A. Collins. "Cpg Islands in Human X-Inactivation." *Ann Hum Genet* 67, no. Pt 3 (2003): 242-9.
- Ke, X., N. S. Thomas, D. O. Robinson, and A. Collins. "A Novel Approach for Identifying Candidate Imprinted Genes through Sequence Analysis of Imprinted and Control Genes." *Hum Genet* 111, no. 6 (2002): 511-20.
- Kester, M. H., R. Martinez de Mena, M. J. Obregon, D. Marinkovic, A. Howatson, T. J. Visser, R. Hume, and G. Morreale de Escobar. "Iodothyronine Levels in the Human Developing Brain: Major Regulatory Roles of Iodothyronine Deiodinases in Different Areas." *J Clin Endocrinol Metab* 89, no. 7 (2004): 3117-28.
- Khambata-Ford, S., Y. Liu, C. Gleason, M. Dickson, R. B. Altman, S. Batzoglou, and R. M. Myers. "Identification of Promoter Regions in the Human Genome by Using a Retroviral Plasmid Library-Based Functional Reporter Gene Assay." *Genome Res* 13, no. 7 (2003): 1765-74.

- Khosla, S., A. Aitchison, R. Gregory, N. D. Allen, and R. Feil. "Parental Allele-Specific Chromatin Configuration in a Boundary-Imprinting-Control Element Upstream of the Mouse H19 Gene." *Mol Cell Biol* 19, no. 4 (1999): 2556-66.
- Khvorova, A., A. Reynolds, and S. D. Jayasena. "Functional Sirnas and Mirnas Exhibit Strand Bias." *Cell* 115, no. 2 (2003): 209-16.
- Killian, J. K., J. C. Byrd, J. V. Jirtle, B. L. Munday, M. K. Stoskopf, R. G. MacDonald, and R. L. Jirtle. "M6p/Igf2r Imprinting Evolution in Mammals." *Mol Cell* 5, no. 4 (2000): 707-16.
- Kim, J. "Multiple Yy1 and Ctfc Binding Sites in Imprinting Control Regions." *Epigenetics* 3, no. 3 (2008): 115-8.
- Kim, J. D., A. K. Hinz, A. Bergmann, J. M. Huang, I. Ovcharenko, L. Stubbs, and J. Kim. "Identification of Clustered Yy1 Binding Sites in Imprinting Control Regions." *Genome Res* 16, no. 7 (2006): 901-11.
- Kim, J., A. Kollhoff, A. Bergmann, and L. Stubbs. "Methylation-Sensitive Binding of Transcription Factor Yy1 to an Insulator Sequence within the Paternally Expressed Imprinted Gene, Peg3." *Hum Mol Genet* 12, no. 3 (2003): 233-45.
- Kim, K., Y. S. Lee, and R. W. Carthew. "Conversion of Pre-Risc to Holo-Risc by Ago2 During Assembly of Rnai Complexes." *RNA* 13, no. 1 (2007): 22-9.
- Kim, T. H., L. O. Barrera, and B. Ren. "Chip-Chip for Genome-Wide Analysis of Protein Binding in Mammalian Cells." *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21 (2007): Unit 21 13.
- Kircher, M., C. Bock, and M. Paulsen. "Structural Conservation Versus Functional Divergence of Maternally Expressed Micrnas in the Dlk1/Gtl2 Imprinting Region." *BMC Genomics* 9 (2008): 346.
- Kobayashi, S., H. Wagatsuma, R. Ono, H. Ichikawa, M. Yamazaki, H. Tashiro, K. Aisaka, N. Miyoshi, T. Kohda, A. Ogura, M. Ohki, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. "Mouse Peg9/Dlk1 and Human Peg9/Dlk1 Are Paternally Expressed Imprinted Genes Closely Located to the Maternally Expressed Imprinted Genes: Mouse Meg3/Gtl2 and Human Meg3." *Genes Cells* 5, no. 12 (2000): 1029-37.
- Komor, M., S. Guller, C. D. Baldus, S. de Vos, D. Hoelzer, O. G. Ottmann, and W. K. Hofmann. "Transcriptional Profiling of Human Hematopoiesis During in Vitro Lineage-Specific Differentiation." *Stem Cells* 23, no. 8 (2005): 1154-69.
- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, Y. H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, and T. Kishimoto. "Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation Owing to Maturational Arrest of Osteoblasts." *Cell* 89, no. 5 (1997): 755-64.
- Kumar, M. S., J. Lu, K. L. Mercer, T. R. Golub, and T. Jacks. "Impaired Microrna Processing Enhances Cellular Transformation and Tumorigenesis." *Nat Genet* 39, no. 5 (2007): 673-7.
- Kurosawa, K., H. Sasaki, Y. Sato, M. Yamanaka, M. Shimizu, Y. Ito, T. Okuyama, M. Matsuo, K. Imaizumi, Y. Kuroki, and G. Nishimura. "Paternal Upd14 Is Responsible for a Distinctive Malformation Complex." *Am J Med Genet* 110, no. 3 (2002): 268-72.
- Kurukuti, S., V. K. Tiwari, G. Tavoosidana, E. Pugacheva, A. Murrell, Z. Zhao, V. Lobanenkova, W. Reik, and R. Ohlsson. "Ctfc Binding at the H19 Imprinting Control Region Mediates Maternally Inherited Higher-Order Chromatin Conformation to Restrict Enhancer Access to Igf2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, no. 28 (2006): 10684-9.

- Labialle, S., S. Croteau, V. Belanger, E. N. McMurray, X. Ruan, S. Moussette, M. Jonnaert, J. V. Schmidt, N. Cermakian, and A. K. Naumova. "Novel Imprinted Transcripts from the Dlk1-Gtl2 Intergenic Region, Mico1 and Mico1os, Show Circadian Oscillations." *Epigenetics* 3, no. 6 (2008): 322-9.
- Labialle, S., L. Yang, X. Ruan, A. Villemain, J. V. Schmidt, A. Hernandez, T. Wiltshire, N. Cermakian, and A. K. Naumova. "Coordinated Diurnal Regulation of Genes from the Dlk1-Dio3 Imprinted Domain: Implications for Regulation of Clusters of Non-Paralogous Genes." *Hum Mol Genet* 17, no. 1 (2008): 15-26.
- Laborda, J., E. A. Sausville, T. Hoffman, and V. Notario. "Dlk, a Putative Mammalian Homeotic Gene Differentially Expressed in Small Cell Lung Carcinoma and Neuroendocrine Tumor Cell Line." *J Biol Chem* 268, no. 6 (1993): 3817-20.
- Laemmli, U. K., E. Kas, L. Poljak, and Y. Adachi. "Scaffold-Associated Regions: Cis-Acting Determinants of Chromatin Structural Loops and Functional Domains." *Curr Opin Genet Dev* 2, no. 2 (1992): 275-85.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R. U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H. I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, and T. Tuschl. "A Mammalian MicroRNA Expression Atlas Based on Small Rna Library Sequencing." *Cell* 129, no. 7 (2007): 1401-14.
- Ledbetter, D. H., and E. Engel. "Uniparental Disomy in Humans: Development of an Imprinting Map and Its Implications for Prenatal Diagnosis." *Hum Mol Genet* 4 Spec No (1995): 1757-64.
- Lee, E. J., M. Baek, Y. Gusev, D. J. Brackett, G. J. Nuovo, and T. D. Schmittgen. "Systematic Evaluation of MicroRNA Processing Patterns in Tissues, Cell Lines, and Tumors." *RNA* 14, no. 1 (2008): 35-42.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. "The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14." *Cell* 75, no. 5 (1993): 843-54.
- Leighton, P. A., J. R. Saam, R. S. Ingram, C. L. Stewart, and S. M. Tilghman. "An Enhancer Deletion Affects Both H19 and Igf2 Expression." *Genes Dev* 9, no. 17 (1995): 2079-89.
- Leonhardt, H., A. W. Page, H. U. Weier, and T. H. Bestor. "A Targeting Sequence Directs DNA Methyltransferase to Sites of DNA Replication in Mammalian Nuclei." *Cell* 71, no. 5 (1992): 865-73.
- Levanon, D., D. Bettoun, C. Harris-Cerruti, E. Woolf, V. Negreanu, R. Eilam, Y. Bernstein, D. Goldenberg, C. Xiao, M. Fliegau, E. Kremer, F. Otto, O. Brenner, A. Lev-Tov, and Y. Groner. "The Runx3 Transcription Factor Regulates Development and Survival of Trkc Dorsal Root Ganglia Neurons." *EMBO J* 21, no. 13 (2002): 3454-63.
- Lewis, A., K. Mitsuya, M. Constanica, and W. Reik. "Tandem Repeat Hypothesis in Imprinting: Deletion of a Conserved Direct Repeat Element Upstream of H19 Has No Effect on Imprinting in the Igf2-H19 Region." *Mol Cell Biol* 24, no. 13 (2004): 5650-6.
- Lewis, A., K. Mitsuya, D. Umlauf, P. Smith, W. Dean, J. Walter, M. Higgins, R. Feil, and W. Reik. "Imprinting on Distal Chromosome 7 in the Placenta Involves Repressive

- Histone Methylation Independent of DNA Methylation." *Nat Genet* 36, no. 12 (2004): 1291-5.
- Lian, J. B., E. Balint, A. Javed, H. Drissi, R. Vitti, E. J. Quinlan, L. Zhang, A. J. Van Wijnen, J. L. Stein, N. Speck, and G. S. Stein. "Runx1/Aml1 Hematopoietic Transcription Factor Contributes to Skeletal Development in Vivo." *J Cell Physiol* 196, no. 2 (2003): 301-11.
- Lien, S., N. E. Cockett, H. Klunghand, N. Arnheim, M. Georges, and L. Gomez-Raya. "High-Resolution Gametic Map of the Sheep Callipyge Region: Linkage Heterogeneity among Rams Detected by Sperm Typing." *Anim Genet* 30, no. 1 (1999): 42-6.
- Lin, S. L., D. C. Chang, S. Chang-Lin, C. H. Lin, D. T. Wu, D. T. Chen, and S. Y. Ying. "Mir-302 Reprograms Human Skin Cancer Cells into a Pluripotent Es-Cell-Like State." *RNA* 14, no. 10 (2008): 2115-24.
- Lin, S. P., P. Coan, S. T. da Rocha, H. Seitz, J. Cavaille, P. W. Teng, S. Takada, and A. C. Ferguson-Smith. "Differential Regulation of Imprinting in the Murine Embryo and Placenta by the Dlk1-Dio3 Imprinting Control Region." *Development* 134, no. 2 (2007): 417-26.
- Lin, S. P., N. Youngson, S. Takada, H. Seitz, W. Reik, M. Paulsen, J. Cavaille, and A. C. Ferguson-Smith. "Asymmetric Regulation of Imprinting on the Maternal and Paternal Chromosomes at the Dlk1-Gtl2 Imprinted Cluster on Mouse Chromosome 12." *Nat Genet* 35, no. 1 (2003): 97-102.
- Lippman, Z., A. V. Gendrel, M. Black, M. W. Vaughn, N. Dedhia, W. R. McCombie, K. Lavine, V. Mittal, B. May, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, R. W. Doerge, V. Colot, and R. Martienssen. "Role of Transposable Elements in Heterochromatin and Epigenetic Control." *Nature* 430, no. 6998 (2004): 471-6.
- Liu, Q., T. A. Rand, S. Kalidas, F. Du, H. E. Kim, D. P. Smith, and X. Wang. "R2d2, a Bridge between the Initiation and Effector Steps of the Drosophila Rnai Pathway." *Science* 301, no. 5641 (2003): 1921-5.
- Lloyd, A., C. L. Plaisier, D. Carroll, and G. N. Drews. "Targeted Mutagenesis Using Zinc-Finger Nucleases in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, no. 6 (2005): 2232-7.
- Lopes, S., A. Lewis, P. Hajkova, W. Dean, J. Oswald, T. Forne, A. Murrell, M. Constancia, M. Bartolomei, J. Walter, and W. Reik. "Epigenetic Modifications in an Imprinting Cluster Are Controlled by a Hierarchy of Dmrs Suggesting Long-Range Chromatin Interactions." *Hum Mol Genet* 12, no. 3 (2003): 295-305.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, and T. R. Golub. "MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers." *Nature* 435, no. 7043 (2005): 834-8.
- Luedi, P. P., A. J. Hartemink, and R. L. Jirtle. "Genome-Wide Prediction of Imprinted Murine Genes." *Genome Res* 15, no. 6 (2005): 875-84.
- Lutterbach, B., and S. W. Hiebert. "Role of the Transcription Factor Aml-1 in Acute Leukemia and Hematopoietic Differentiation." *Gene* 245, no. 2 (2000): 223-35.
- Lyle, R., D. Watanabe, D. te Vruchte, W. Lerchner, O. W. Smrzka, A. Wutz, J. Schageman, L. Hahner, C. Davies, and D. P. Barlow. "The Imprinted Antisense Rna at the Igf2r Locus Overlaps but Does Not Imprint Mas1." *Nat Genet* 25, no. 1 (2000): 19-21.
- Lyon, M. F. "Imprinting and X-Chromosome Inactivation." *Results Probl Cell Differ* 25 (1999): 73-90.

- Maeder, M. L., S. Thibodeau-Beganny, A. Osiak, D. A. Wright, R. M. Anthony, M. Eichtinger, T. Jiang, J. E. Foley, R. J. Winfrey, J. A. Townsend, E. Unger-Wallace, J. D. Sander, F. Muller-Lerch, F. Fu, J. Pearlberg, C. Gobel, J. P. Dassie, S. M. Pruett-Miller, M. H. Porteus, D. C. Sgroi, A. J. Iafrate, D. Dobbs, P. B. McCray, Jr., T. Cathomen, D. F. Voytas, and J. K. Joung. "Rapid "Open-Source" Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification." *Mol Cell* 31, no. 2 (2008): 294-301.
- Maier, H., R. Ostraat, H. Gao, S. Fields, S. A. Shinton, K. L. Medina, T. Ikawa, C. Murre, H. Singh, R. R. Hardy, and J. Hagman. "Early B Cell Factor Cooperates with Runx1 and Mediates Epigenetic Changes Associated with Mb-1 Transcription." *Nat Immunol* 5, no. 10 (2004): 1069-77.
- Mancini-DiNardo, D., S. J. Steele, R. S. Ingram, and S. M. Tilghman. "A Differentially Methylated Region within the Gene Kcnq1 Functions as an Imprinted Promoter and Silencer." *Hum Mol Genet* 12, no. 3 (2003): 283-94.
- Mancini-Dinardo, D., S. J. Steele, J. M. Levorse, R. S. Ingram, and S. M. Tilghman. "Elongation of the Kcnq1ot1 Transcript Is Required for Genomic Imprinting of Neighboring Genes." *Genes Dev* 20, no. 10 (2006): 1268-82.
- Marson, A., S. S. Levine, M. F. Cole, G. M. Frampton, T. Brambrink, S. Johnstone, M. G. Guenther, W. K. Johnston, M. Wernig, J. Newman, J. M. Calabrese, L. M. Dennis, T. L. Volkert, S. Gupta, J. Love, N. Hannett, P. A. Sharp, D. P. Bartel, R. Jaenisch, and R. A. Young. "Connecting MicroRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells." *Cell* 134, no. 3 (2008): 521-33.
- Martens, J. H., M. Verlaan, E. Kalkhoven, J. C. Dorsman, and A. Zantema. "Scaffold/Matrix Attachment Region Elements Interact with a P300-Scaffold Attachment Factor a Complex and Are Bound by Acetylated Nucleosomes." *Mol Cell Biol* 22, no. 8 (2002): 2598-606.
- Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. A. Sharov, M. S. Ko, and H. Niwa. "Pluripotency Governed by Sox2 Via Regulation of Oct3/4 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells." *Nat Cell Biol* 9, no. 6 (2007): 625-35.
- Mayr, C., M. T. Hemann, and D. P. Bartel. "Disrupting the Pairing between Let-7 and Hmga2 Enhances Oncogenic Transformation." *Science* 315, no. 5818 (2007): 1576-9.
- McGrath, J., and D. Solter. "Inability of Mouse Blastomere Nuclei Transferred to Enucleated Zygotes to Support Development in Vitro." *Science* 226, no. 4680 (1984): 1317-9.
- Meister, G., and T. Tuschl. "Mechanisms of Gene Silencing by Double-Stranded Rna." *Nature* 431, no. 7006 (2004): 343-9.
- Mikkelsen, T. S., M. Ku, D. B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T. K. Kim, R. P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E. S. Lander, and B. E. Bernstein. "Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells." *Nature* 448, no. 7153 (2007): 553-60.
- Miranda, K. C., T. Huynh, Y. Tay, Y. S. Ang, W. L. Tam, A. M. Thomson, B. Lim, and I. Rigoutsos. "A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes." *Cell* 126, no. 6 (2006): 1203-17.
- Mitsuya, K., M. Meguro, M. P. Lee, M. Katoh, T. C. Schulz, H. Kugoh, M. A. Yoshida, N. Niikawa, A. P. Feinberg, and M. Oshimura. "Lit1, an Imprinted Antisense Rna in

- the Human Kvlqt1 Locus Identified by Screening for Differentially Expressed Transcripts Using Monochromosomal Hybrids." *Hum Mol Genet* 8, no. 7 (1999): 1209-17.
- Mittler, G., F. Butter, and M. Mann. "A Silac-Based DNA Protein Interaction Screen That Identifies Candidate Binding Proteins to Functional DNA Elements." *Genome Res* 19, no. 2 (2009): 284-93.
- Miyoshi, H., T. Kozu, K. Shimizu, K. Enomoto, N. Maseki, Y. Kaneko, N. Kamada, and M. Ohki. "The T(8;21) Translocation in Acute Myeloid Leukemia Results in Production of an Aml1-Mtg8 Fusion Transcript." *EMBO J* 12, no. 7 (1993): 2715-21.
- Miyoshi, N., H. Wagatsuma, S. Wakana, T. Shiroishi, M. Nomura, K. Aisaka, T. Kohda, M. A. Surani, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. "Identification of an Imprinted Gene, Meg3/Gtl2 and Its Human Homologue Meg3, First Mapped on Mouse Distal Chromosome 12 and Human Chromosome 14q." *Genes Cells* 5, no. 3 (2000): 211-20.
- Mohammad, F., R. R. Pandey, T. Nagano, L. Chakalova, T. Mondal, P. Fraser, and C. Kanduri. "Kcnq1ot1/Lit1 Noncoding Rna Mediates Transcriptional Silencing by Targeting to the Perinucleolar Region." *Mol Cell Biol* 28, no. 11 (2008): 3713-28.
- Monckton, D. G., R. Neumann, T. Guram, N. Fretwell, K. Tamaki, A. MacLeod, and A. J. Jeffreys. "Minisatellite Mutation Rate Variation Associated with a Flanking DNA Sequence Polymorphism." *Nat Genet* 8, no. 2 (1994): 162-70.
- Monk, D., R. Sanches, P. Arnaud, S. Apostolidou, F. A. Hills, S. Abu-Amero, A. Murrell, H. Friess, W. Reik, P. Stanier, M. Constancia, and G. E. Moore. "Imprinting of Igf2 P0 Transcript and Novel Alternatively Spliced Ins-Igf2 Isoforms Show Differences between Mouse and Human." *Hum Mol Genet* 15, no. 8 (2006): 1259-69.
- Moon, Y. S., C. M. Smas, K. Lee, J. A. Villena, K. H. Kim, E. J. Yun, and H. S. Sul. "Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1/Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity." *Mol Cell Biol* 22, no. 15 (2002): 5585-92.
- Moore, T., M. Constancia, M. Zubair, B. Bailleul, R. Feil, H. Sasaki, and W. Reik. "Multiple Imprinted Sense and Antisense Transcripts, Differential Methylation and Tandem Repeats in a Putative Imprinting Control Region Upstream of Mouse Igf2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, no. 23 (1997): 12509-14.
- Morison, I. M., J. P. Ramsay, and H. G. Spencer. "A Census of Mammalian Imprinting." *Trends Genet* 21, no. 8 (2005): 457-65.
- Morison, I. M., and A. E. Reeve. "A Catalogue of Imprinted Genes and Parent-of-Origin Effects in Humans and Animals." *Hum Mol Genet* 7, no. 10 (1998): 1599-609.
- Morlando, M., M. Ballarino, N. Gromak, F. Pagano, I. Bozzoni, and N. J. Proudfoot. "Primary MicroRNA Transcripts Are Processed Co-Transcriptionally." *Nat Struct Mol Biol* 15, no. 9 (2008): 902-9.
- Mundlos, S., F. Otto, C. Mundlos, J. B. Mulliken, A. S. Aylsworth, S. Albright, D. Lindhout, W. G. Cole, W. Henn, J. H. Knoll, M. J. Owen, R. Mertelsmann, B. U. Zabel, and B. R. Olsen. "Mutations Involving the Transcription Factor Cbfa1 Cause Cleidocranial Dysplasia." *Cell* 89, no. 5 (1997): 773-9.
- Murphy, S. K., B. A. Freking, T. P. Smith, K. Leymaster, C. M. Nolan, A. A. Wylie, H. K. Evans, and R. L. Jirtle. "Abnormal Postnatal Maintenance of Elevated Dlk1 Transcript Levels in Callipyge Sheep." *Mamm Genome* 16, no. 3 (2005): 171-83.
- Murphy, S. K., C. M. Nolan, Z. Huang, K. S. Kucera, B. A. Freking, T. P. Smith, K. A. Leymaster, J. R. Weidman, and R. L. Jirtle. "Callipyge Mutation Affects Gene

- Expression in Cis: A Potential Role for Chromatin Structure." *Genome Res* 16, no. 3 (2006): 340-6.
- Murrell, A., S. Heeson, and W. Reik. "Interaction between Differentially Methylated Regions Partitions the Imprinted Genes *Igf2* and *H19* into Parent-Specific Chromatin Loops." *Nat Genet* 36, no. 8 (2004): 889-93.
- Nagano, T., J. A. Mitchell, L. A. Sanz, F. M. Pauler, A. C. Ferguson-Smith, R. Feil, and P. Fraser. "The Air Noncoding Rna Epigenetically Silences Transcription by Targeting G9a to Chromatin." *Science* 322, no. 5908 (2008): 1717-20.
- Nagata, T., and M. H. Werner. "Functional Mutagenesis of *Aml1/Runx1* and *Pebp2* Beta/*Cbf Beta* Define Distinct, Non-Overlapping Sites for DNA Recognition and Heterodimerization by the Runt Domain." *J Mol Biol* 308, no. 2 (2001): 191-203.
- Nam, S., Y. H. Jin, Q. L. Li, K. Y. Lee, G. B. Jeong, Y. Ito, J. Lee, and S. C. Bae. "Expression Pattern, Regulation, and Biological Role of Runt Domain Transcription Factor, Run, in *Caenorhabditis Elegans*." *Mol Cell Biol* 22, no. 2 (2002): 547-54.
- Namciu, S. J., K. B. Blochlinger, and R. E. Fournier. "Human Matrix Attachment Regions Insulate Transgene Expression from Chromosomal Position Effects in *Drosophila Melanogaster*." *Mol Cell Biol* 18, no. 4 (1998): 2382-91.
- Navarro, P., I. Chambers, V. Karwacki-Neisius, C. Chureau, C. Morey, C. Rougeulle, and P. Avner. "Molecular Coupling of Xist Regulation and Pluripotency." *Science* 321, no. 5896 (2008): 1693-5.
- Neumann, B., and D. P. Barlow. "Multiple Roles for DNA Methylation in Gametic Imprinting." *Curr Opin Genet Dev* 6, no. 2 (1996): 159-63.
- North, T., T. L. Gu, T. Stacy, Q. Wang, L. Howard, M. Binder, M. Marin-Padilla, and N. A. Speck. "Cbfa2 Is Required for the Formation of Intra-Aortic Hematopoietic Clusters." *Development* 126, no. 11 (1999): 2563-75.
- Nueda, M. L., V. Baladron, B. Sanchez-Solana, M. A. Ballesteros, and J. Laborda. "The Egf-Like Protein *Dlk1* Inhibits Notch Signaling and Potentiates Adipogenesis of Mesenchymal Cells." *J Mol Biol* 367, no. 5 (2007): 1281-93.
- O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, and J. T. Mendell. "C-Myc-Regulated Micrnas Modulate *E2f1* Expression." *Nature* 435, no. 7043 (2005): 839-43.
- O'Neill, M. J., R. S. Ingram, P. B. Vrana, and S. M. Tilghman. "Allelic Expression of *Igf2* in Marsupials and Birds." *Dev Genes Evol* 210, no. 1 (2000): 18-20.
- O'Sullivan, F. M., S. K. Murphy, L. R. Simel, A. McCann, J. J. Callanan, and C. M. Nolan. "Imprinted Expression of the Canine *Igf2r*, in the Absence of an Anti-Sense Transcript or Promoter Methylation." *Evol Dev* 9, no. 6 (2007): 579-89.
- Obernosterer, G., P. J. Leuschner, M. Alenius, and J. Martinez. "Post-Transcriptional Regulation of MicroRNA Expression." *RNA* 12, no. 7 (2006): 1161-7.
- Okabe, S. "Molecular Anatomy of the Postsynaptic Density." *Mol Cell Neurosci* 34, no. 4 (2007): 503-18.
- Okamura, K., R. F. Wintle, and S. W. Scherer. "Characterization of the Differentially Methylated Region of the Impact Gene That Exhibits Glires-Specific Imprinting." *Genome Biol* 9, no. 11 (2008): R160.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li. "DNA Methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development." *Cell* 99, no. 3 (1999): 247-57.
- Okuda, T., J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld, and J. R. Downing. "*Aml1*, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis." *Cell* 84, no. 2 (1996): 321-30.

- Olins, A. L., and D. E. Olins. "Spheroid Chromatin Units (V Bodies)." *Science* 183, no. 4122 (1974): 330-2.
- Ooi, S. K., C. Qiu, E. Bernstein, K. Li, D. Jia, Z. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. P. Lin, C. D. Allis, X. Cheng, and T. H. Bestor. "Dnmt3l Connects Unmethylated Lysine 4 of Histone H3 to De Novo Methylation of DNA." *Nature* 448, no. 7154 (2007): 714-7.
- Otto, F., A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour, I. R. Rosewell, G. W. Stamp, R. S. Beddington, S. Mundlos, B. R. Olsen, P. B. Selby, and M. J. Owen. "Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development." *Cell* 89, no. 5 (1997): 765-71.
- Pall, G. S., and A. J. Hamilton. "Improved Northern Blot Method for Enhanced Detection of Small Rna." *Nat Protoc* 3, no. 6 (2008): 1077-84.
- Pandey, R. R., T. Mondal, F. Mohammad, S. Enroth, L. Redrup, J. Komorowski, T. Nagano, D. Mancini-Dinardo, and C. Kanduri. "Kcnq1ot1 Antisense Noncoding Rna Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation." *Mol Cell* 32, no. 2 (2008): 232-46.
- Paulsen, M., S. Takada, N. A. Youngson, M. Benchaib, C. Charlier, K. Segers, M. Georges, and A. C. Ferguson-Smith. "Comparative Sequence Analysis of the Imprinted Dlk1-Gtl2 Locus in Three Mammalian Species Reveals Highly Conserved Genomic Elements and Refines Comparison with the Igf2-H19 Region." *Genome Res* 11, no. 12 (2001): 2085-94.
- Pearsall, R. S., C. Plass, M. A. Romano, M. D. Garrick, H. Shibata, Y. Hayashizaki, and W. A. Held. "A Direct Repeat Sequence at the Rasgrf1 Locus and Imprinted Expression." *Genomics* 55, no. 2 (1999): 194-201.
- Pillai, R. S., C. G. Artus, and W. Filipowicz. "Tethering of Human Ago Proteins to Mrna Mimics the Mirna-Mediated Repression of Protein Synthesis." *RNA* 10, no. 10 (2004): 1518-25.
- Redrup, L., M. R. Branco, E. R. Perdeaux, C. Krueger, A. Lewis, F. Santos, T. Nagano, B. S. Cobb, P. Fraser, and W. Reik. "The Long Noncoding Rna Kcnq1ot1 Organises a Lineage-Specific Nuclear Domain for Epigenetic Gene Silencing." *Development* 136, no. 4 (2009): 525-30.
- Reed, R., and E. Hurt. "A Conserved Mrna Export Machinery Coupled to Pre-Mrna Splicing." *Cell* 108, no. 4 (2002): 523-31.
- Reik, W. "Genomic Imprinting in Mammals." *Results Probl Cell Differ* 18 (1992): 203-29.
- Reik, W., A. Collick, M. L. Norris, S. C. Barton, and M. A. Surani. "Genomic Imprinting Determines Methylation of Parental Alleles in Transgenic Mice." *Nature* 328, no. 6127 (1987): 248-51.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. "Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development." *Science* 293, no. 5532 (2001): 1089-93.
- Reinhart, B., M. Eljanne, and J. R. Chaillet. "Shared Role for Differentially Methylated Domains of Imprinted Genes." *Mol Cell Biol* 22, no. 7 (2002): 2089-98.
- Reinhart, B., A. Paoloni-Giacobino, and J. R. Chaillet. "Specific Differentially Methylated Domain Sequences Direct the Maintenance of Methylation at Imprinted Genes." *Mol Cell Biol* 26, no. 22 (2006): 8347-56.
- Richmond, T. J., J. T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes, and A. Klug. "Structure of the Nucleosome Core Particle at 7 a Resolution." *Nature* 311, no. 5986 (1984): 532-7.

- Ringrose, L., H. Ehret, and R. Paro. "Distinct Contributions of Histone H3 Lysine 9 and 27 Methylation to Locus-Specific Stability of Polycomb Complexes." *Mol Cell* 16, no. 4 (2004): 641-53.
- Rosa, A. L., Y. Q. Wu, B. Kwabi-Addo, K. J. Coveler, V. Reid Sutton, and L. G. Shaffer. "Allele-Specific Methylation of a Functional Ctf Binding Site Upstream of Meg3 in the Human Imprinted Domain of 14q32." *Chromosome Res* 13, no. 8 (2005): 809-18.
- Royo, H., E. Basyuk, V. Marty, M. Marques, E. Bertrand, and J. Cavaille. "Bsr, a Nuclear-Retained Rna with Monoallelic Expression." *Mol Biol Cell* 18, no. 8 (2007): 2817-27.
- Ruf, N., U. Dunzinger, A. Brinckmann, T. Haaf, P. Nurnberg, and U. Zechner. "Expression Profiling of Uniparental Mouse Embryos Is Inefficient in Identifying Novel Imprinted Genes." *Genomics* 87, no. 4 (2006): 509-19.
- Runte, M., A. Huttenhofer, S. Gross, M. Kiefmann, B. Horsthemke, and K. Buiting. "The Ic-Snurf-Snrpn Transcript Serves as a Host for Multiple Small Nucleolar Rna Species and as an Antisense Rna for Ube3a." *Hum Mol Genet* 10, no. 23 (2001): 2687-700.
- Rusinov, V., V. Baev, I. N. Minkov, and M. Tabler. "Microinspector: A Web Tool for Detection of Mirna Binding Sites in an Rna Sequence." *Nucleic Acids Res* 33, no. Web Server issue (2005): W696-700.
- Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J. M. Friedman, J. C. Chuang, G. A. Coetzee, and P. A. Jones. "Specific Activation of Microrna-127 with Downregulation of the Proto-Oncogene Bcl6 by Chromatin-Modifying Drugs in Human Cancer Cells." *Cancer Cell* 9, no. 6 (2006): 435-43.
- Sakajiri, S., J. O'Kelly, D. Yin, C. W. Miller, W. K. Hofmann, K. Oshimi, L. Y. Shih, K. H. Kim, H. S. Sul, C. H. Jensen, B. Teisner, N. Kawamata, and H. P. Koeffler. "Dlk1 in Normal and Abnormal Hematopoiesis." *Leukemia* 19, no. 8 (2005): 1404-10.
- Sasaki, H., K. Shimozaki, M. Zubair, N. Aoki, K. Ohta, N. Hatano, T. Moore, R. Feil, M. Constancia, W. Reik, and P. Rotwein. "Nucleotide Sequence of a 28-Kb Mouse Genomic Region Comprising the Imprinted Igf2 Gene." *DNA Res* 3, no. 5 (1996): 331-5.
- Satoh, Y., I. Matsumura, H. Tanaka, S. Ezoe, K. Fukushima, M. Tokunaga, M. Yasumi, H. Shibayama, M. Mizuki, T. Era, T. Okuda, and Y. Kanakura. "Aml1/Runx1 Works as a Negative Regulator of C-Mpl in Hematopoietic Stem Cells." *J Biol Chem* 283, no. 44 (2008): 30045-56.
- Schaefer, M., J. P. Steringer, and F. Lyko. "The Drosophila Cytosine-5 Methyltransferase Dnmt2 Is Associated with the Nuclear Matrix and Can Access DNA During Mitosis." *PLoS One* 3, no. 1 (2008): e1414.
- Schalch, T., S. Duda, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. "X-Ray Structure of a Tetranucleosome and Its Implications for the Chromatin Fibre." *Nature* 436, no. 7047 (2005): 138-41.
- Schoenfelder, S., G. Smits, P. Fraser, W. Reik, and R. Paro. "Non-Coding Transcripts in the H19 Imprinting Control Region Mediate Gene Silencing in Transgenic Drosophila." *EMBO Rep* 8, no. 11 (2007): 1068-73.
- Schratt, G. M., F. Tuebing, E. A. Nigh, C. G. Kane, M. E. Sabatini, M. Kiebler, and M. E. Greenberg. "A Brain-Specific Microrna Regulates Dendritic Spine Development." *Nature* 439, no. 7074 (2006): 283-9.
- Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, and G. Cavalli. "Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins." *Cell* 128, no. 4 (2007): 735-45.

- Schuster-Gossler, K., P. Bilinski, T. Sado, A. Ferguson-Smith, and A. Gossler. "The Mouse Gtl2 Gene Is Differentially Expressed During Embryonic Development, Encodes Multiple Alternatively Spliced Transcripts, and May Act as an Rna." *Dev Dyn* 212, no. 2 (1998): 214-28.
- Schuster-Gossler, K., D. Simon-Chazottes, J. L. Guenet, J. Zachgo, and A. Gossler. "Gtl2lacZ, an Insertional Mutation on Mouse Chromosome 12 with Parental Origin-Dependent Phenotype." *Mamm Genome* 7, no. 1 (1996): 20-4.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore. "Asymmetry in the Assembly of the Rnai Enzyme Complex." *Cell* 115, no. 2 (2003): 199-208.
- Scott, R. J., M. Spielman, J. Bailey, and H. G. Dickinson. "Parent-of-Origin Effects on Seed Development in Arabidopsis Thaliana." *Development* 125, no. 17 (1998): 3329-41.
- Seitz, H., N. Youngson, S. P. Lin, S. Dalbert, M. Paulsen, J. P. Bachellerie, A. C. Ferguson-Smith, and J. Cavaille. "Imprinted Microrna Genes Transcribed Antisense to a Reciprocally Imprinted Retrotransposon-Like Gene." *Nat Genet* 34, no. 3 (2003): 261-2.
- Sekita, Y., H. Wagatsuma, M. Irie, S. Kobayashi, T. Kohda, J. Matsuda, M. Yokoyama, A. Ogura, K. Schuster-Gossler, A. Gossler, F. Ishino, and T. Kaneko-Ishino. "Aberrant Regulation of Imprinted Gene Expression in Gtl2lacZ Mice." *Cytogenet Genome Res* 113, no. 1-4 (2006): 223-9.
- Sekita, Y., H. Wagatsuma, K. Nakamura, R. Ono, M. Kagami, N. Wakisaka, T. Hino, R. Suzuki-Migishima, T. Kohda, A. Ogura, T. Ogata, M. Yokoyama, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. "Role of Retrotransposon-Derived Imprinted Gene, Rtl1, in the Feto-Maternal Interface of Mouse Placenta." *Nat Genet* 40, no. 2 (2008): 243-8.
- Selbach, M., B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky. "Widespread Changes in Protein Synthesis Induced by Micrnas." *Nature* 455, no. 7209 (2008): 58-63.
- Sharov, A. A., S. Masui, L. V. Sharova, Y. Piao, K. Aiba, R. Matoba, L. Xin, H. Niwa, and M. S. Ko. "Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog Downstream Target Genes with Statistical Confidence by Applying a Novel Algorithm to Time Course Microarray and Genome-Wide Chromatin Immunoprecipitation Data." *BMC Genomics* 9 (2008): 269.
- Shibata, H., Y. Yoda, R. Kato, T. Ueda, M. Kamiya, N. Hiraiwa, A. Yoshiki, C. Plass, R. S. Pearsall, W. A. Held, M. Muramatsu, H. Sasaki, M. Kusakabe, and Y. Hayashizaki. "A Methylation Imprint Mark in the Mouse Imprinted Gene Grf1/Cdc25mm Locus Shares a Common Feature with the U2afbp-Rs Gene: An Association with a Short Tandem Repeat and a Hypermethylated Region." *Genomics* 49, no. 1 (1998): 30-7.
- Shin, J. Y., G. V. Fitzpatrick, and M. J. Higgins. "Two Distinct Mechanisms of Silencing by the Kvdmr1 Imprinting Control Region." *EMBO J* 27, no. 1 (2008): 168-78.
- Sleutels, F., G. Tjon, T. Ludwig, and D. P. Barlow. "Imprinted Silencing of Slc22a2 and Slc22a3 Does Not Need Transcriptional Overlap between Igf2r and Air." *EMBO J* 22, no. 14 (2003): 3696-704.
- Sleutels, F., R. Zwart, and D. P. Barlow. "The Non-Coding Air Rna Is Required for Silencing Autosomal Imprinted Genes." *Nature* 415, no. 6873 (2002): 810-3.
- Smas, C. M., and H. S. Sul. "Pref-1, a Protein Containing Egf-Like Repeats, Inhibits Adipocyte Differentiation." *Cell* 73, no. 4 (1993): 725-34.
- Smilnich, N. J., C. D. Day, G. V. Fitzpatrick, G. M. Caldwell, A. C. Lossie, P. R. Cooper, A. C. Smallwood, J. A. Joyce, P. N. Schofield, W. Reik, R. D. Nicholls, R. Weksberg, D. J.

- Driscoll, E. R. Maher, T. B. Shows, and M. J. Higgins. "A Maternally Methylated CpG Island in Kvlqt1 Is Associated with an Antisense Paternal Transcript and Loss of Imprinting in Beckwith-Wiedemann Syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, no. 14 (1999): 8064-9.
- Smit, M. A., X. Tordoir, G. Gyapay, N. E. Cockett, M. Georges, and C. Charlier. "Begain: A Novel Imprinted Gene That Generates Paternally Expressed Transcripts in a Tissue- and Promoter-Specific Manner in Sheep." *Mamm Genome* 16, no. 10 (2005): 801-14.
- Smit, M., K. Segers, L. G. Carrascosa, T. Shay, F. Baraldi, G. Gyapay, G. Snowden, M. Georges, N. Cockett, and C. Charlier. "Mosaicism of Solid Gold Supports the Causality of a Noncoding a-to-G Transition in the Determinism of the Callipyge Phenotype." *Genetics* 163, no. 1 (2003): 453-6.
- Smith, R. J., W. Dean, G. Konfortova, and G. Kelsey. "Identification of Novel Imprinted Genes in a Genome-Wide Screen for Maternal Methylation." *Genome Res* 13, no. 4 (2003): 558-69.
- Smrzka, O. W., I. Fae, R. Stoger, R. Kurzbauer, G. F. Fischer, T. Henn, A. Weith, and D. P. Barlow. "Conservation of a Maternal-Specific Methylation Signal at the Human Igf2r Locus." *Hum Mol Genet* 4, no. 10 (1995): 1945-52.
- Solter, D. "Differential Imprinting and Expression of Maternal and Paternal Genomes." *Annu Rev Genet* 22 (1988): 127-46.
- Song, G., and L. Wang. "Mir-433 and Mir-127 Arise from Independent Overlapping Primary Transcripts Encoded by the Mir-433-127 Locus." *PLoS One* 3, no. 10 (2008): e3574.
- Song, G., and L. Wang. "Transcriptional Mechanism for the Paired Mir-433 and Mir-127 Genes by Nuclear Receptors Shp and Errgamma." *Nucleic Acids Res* 36, no. 18 (2008): 5727-35.
- Sperligh, B., A. Kofalvi, J. Deuchars, L. Atkinson, C. J. Milligan, N. J. Buckley, and E. S. Vizi. "Involvement of P2x7 Receptors in the Regulation of Neurotransmitter Release in the Rat Hippocampus." *J Neurochem* 81, no. 6 (2002): 1196-211.
- Stadler, L. J. "Spontaneous Mutation at the R Locus in Maize. I. The Aleurone-Color and Plant-Color Effects." *Genetics* 31, no. 4 (1946): 377-94.
- Steshina, E. Y., M. S. Carr, E. A. Glick, A. Yevtodiyenko, O. K. Appelbe, and J. V. Schmidt. "Loss of Imprinting at the Dlk1-Gtl2 Locus Caused by Insertional Mutagenesis in the Gtl2 5' Region." *BMC Genet* 7 (2006): 44.
- Suh, M. R., Y. Lee, J. Y. Kim, S. K. Kim, S. H. Moon, J. Y. Lee, K. Y. Cha, H. M. Chung, H. S. Yoon, S. Y. Moon, V. N. Kim, and K. S. Kim. "Human Embryonic Stem Cells Express a Unique Set of Micrnas." *Dev Biol* 270, no. 2 (2004): 488-98.
- Surani, M. A., S. C. Barton, and M. L. Norris. "Development of Reconstituted Mouse Eggs Suggests Imprinting of the Genome During Gametogenesis." *Nature* 308, no. 5959 (1984): 548-50.
- Swain, J. L., T. A. Stewart, and P. Leder. "Parental Legacy Determines Methylation and Expression of an Autosomal Transgene: A Molecular Mechanism for Parental Imprinting." *Cell* 50, no. 5 (1987): 719-27.
- Szabo, P., S. H. Tang, A. Rentsendorj, G. P. Pfeifer, and J. R. Mann. "Maternal-Specific Footprints at Putative Ctf Sites in the H19 Imprinting Control Region Give Evidence for Insulator Function." *Curr Biol* 10, no. 10 (2000): 607-10.
- Tahirov, T. H., T. Inoue-Bungo, H. Morii, A. Fujikawa, M. Sasaki, K. Kimura, M. Shiina, K. Sato, T. Kumasaka, M. Yamamoto, S. Ishii, and K. Ogata. "Structural Analyses of

- DNA Recognition by the Aml1/Runx-1 Runt Domain and Its Allosteric Control by Cbfbeta." *Cell* 104, no. 5 (2001): 755-67.
- Takada, S., M. Paulsen, M. Tevendale, C. E. Tsai, G. Kelsey, B. M. Cattanach, and A. C. Ferguson-Smith. "Epigenetic Analysis of the Dlk1-Gtl2 Imprinted Domain on Mouse Chromosome 12: Implications for Imprinting Control from Comparison with Igf2-H19." *Hum Mol Genet* 11, no. 1 (2002): 77-86.
- Takada, S., M. Tevendale, J. Baker, P. Georgiades, E. Campbell, T. Freeman, M. H. Johnson, M. Paulsen, and A. C. Ferguson-Smith. "Delta-Like and Gtl2 Are Reciprocally Expressed, Differentially Methylated Linked Imprinted Genes on Mouse Chromosome 12." *Curr Biol* 10, no. 18 (2000): 1135-8.
- Takahashi, N., A. Okamoto, R. Kobayashi, M. Shirai, Y. Obata, H. Ogawa, Y. Sotomaru, and T. Kono. "Deletion of Gtl2, Imprinted Non-Coding Rna, with Its Differentially Methylated Region Induces Lethal Parent-Origin-Dependent Defects in Mice." *Hum Mol Genet* 18, no. 10 (2009): 1879-88.
- Takeda, H., F. Caiment, M. Smit, S. Hiard, X. Tordoir, N. Cockett, M. Georges, and C. Charlier. "The Callipyge Mutation Enhances Bidirectional Long-Range Dlk1-Gtl2 Intergenic Transcription in Cis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, no. 21 (2006): 8119-24.
- Tay, Y. M., W. L. Tam, Y. S. Ang, P. M. Gaughwin, H. Yang, W. Wang, R. Liu, J. George, H. H. Ng, R. J. Perera, T. Lufkin, I. Rigoutsos, A. M. Thomson, and B. Lim. "MicroRNA-134 Modulates the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, Where It Causes Post-Transcriptional Attenuation of Nanog and Lrh1." *Stem Cells* 26, no. 1 (2008): 17-29.
- Tay, Y., J. Zhang, A. M. Thomson, B. Lim, and I. Rigoutsos. "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 Coding Regions Modulate Embryonic Stem Cell Differentiation." *Nature* 455, no. 7216 (2008): 1124-8.
- Thakur, N., V. K. Tiwari, H. Thomassin, R. R. Pandey, M. Kanduri, A. Gondor, T. Grange, R. Ohlsson, and C. Kanduri. "An Antisense Rna Regulates the Bidirectional Silencing Property of the Kcnq1 Imprinting Control Region." *Mol Cell Biol* 24, no. 18 (2004): 7855-62.
- Thomson, J. M., M. Newman, J. S. Parker, E. M. Morin-Kensicki, T. Wright, and S. M. Hammond. "Extensive Post-Transcriptional Regulation of MicroRNAs and Its Implications for Cancer." *Genes Dev* 20, no. 16 (2006): 2202-7.
- Thorvaldsen, J. L., A. M. Fedoriw, S. Nguyen, and M. S. Bartolomei. "Developmental Profile of H19 Differentially Methylated Domain (Dmd) Deletion Alleles Reveals Multiple Roles of the Dmd in Regulating Allelic Expression and DNA Methylation at the Imprinted H19/Igf2 Locus." *Mol Cell Biol* 26, no. 4 (2006): 1245-58.
- Tierling, S., S. Dalbert, S. Schoppenhorst, C. E. Tsai, S. Oligier, A. C. Ferguson-Smith, M. Paulsen, and J. Walter. "High-Resolution Map and Imprinting Analysis of the Gtl2-Dnchc1 Domain on Mouse Chromosome 12." *Genomics* 87, no. 2 (2006): 225-35.
- Tierling, S., G. Gasparoni, N. Youngson, and M. Paulsen. "The Begain Gene Marks the Centromeric Boundary of the Imprinted Region on Mouse Chromosome 12." *Mamm Genome* (2009).
- Tremblay, K. D., K. L. Duran, and M. S. Bartolomei. "A 5' 2-Kilobase-Pair Region of the Imprinted Mouse H19 Gene Exhibits Exclusive Paternal Methylation Throughout Development." *Mol Cell Biol* 17, no. 8 (1997): 4322-9.

- Tsai, C. E., S. P. Lin, M. Ito, N. Takagi, S. Takada, and A. C. Ferguson-Smith. "Genomic Imprinting Contributes to Thyroid Hormone Metabolism in the Mouse Embryo." *Curr Biol* 12, no. 14 (2002): 1221-6.
- Umlauf, D., Y. Goto, R. Cao, F. Cerqueira, A. Wagschal, Y. Zhang, and R. Feil. "Imprinting Along the Kcnq1 Domain on Mouse Chromosome 7 Involves Repressive Histone Methylation and Recruitment of Polycomb Group Complexes." *Nat Genet* 36, no. 12 (2004): 1296-300.
- Urnov, F. D., J. C. Miller, Y. L. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, P. D. Gregory, and M. C. Holmes. "Highly Efficient Endogenous Human Gene Correction Using Designed Zinc-Finger Nucleases." *Nature* 435, no. 7042 (2005): 646-51.
- Van Limpt, V. A., A. J. Chan, P. G. Van Sluis, H. N. Caron, C. J. Van Noesel, and R. Versteeg. "High Delta-Like 1 Expression in a Subset of Neuroblastoma Cell Lines Corresponds to a Differentiated Chromaffin Cell Type." *Int J Cancer* 105, no. 1 (2003): 61-9.
- Vasudevan, S., Y. Tong, and J. A. Steitz. "Switching from Repression to Activation: Micrnas Can up-Regulate Translation." *Science* 318, no. 5858 (2007): 1931-4.
- Verona, R. I., J. L. Thorvaldsen, K. J. Reese, and M. S. Bartolomei. "The Transcriptional Status but Not the Imprinting Control Region Determines Allele-Specific Histone Modifications at the Imprinted H19 Locus." *Mol Cell Biol* 28, no. 1 (2008): 71-82.
- Visel, A., M. J. Blow, Z. Li, T. Zhang, J. A. Akiyama, A. Holt, I. Plajzer-Frick, M. Shoukry, C. Wright, F. Chen, V. Afzal, B. Ren, E. M. Rubin, and L. A. Pennacchio. "Chip-Seq Accurately Predicts Tissue-Specific Activity of Enhancers." *Nature* 457, no. 7231 (2009): 854-8.
- Visser, W. E., K. A. Heemstra, S. M. Swagemakers, Z. Ozgur, E. P. Corssmit, J. Burggraaf, W. F. van Ijcken, P. J. van der Spek, J. W. Smit, and T. J. Visser. "Physiological Thyroid Hormone Levels Regulate Numerous Skeletal Muscle Transcripts." *J Clin Endocrinol Metab* (2009).
- Vu, T. H., T. Li, and A. R. Hoffman. "Promoter-Restricted Histone Code, Not the Differentially Methylated DNA Regions or Antisense Transcripts, Marks the Imprinting Status of Igf2r in Human and Mouse." *Hum Mol Genet* 13, no. 19 (2004): 2233-45.
- Wagschal, A., and R. Feil. "Genomic Imprinting in the Placenta." *Cytogenet Genome Res* 113, no. 1-4 (2006): 90-8.
- Walter, C. A., L. G. Shaffer, C. I. Kaye, R. W. Huff, P. D. Ghidoni, C. McCaskill, M. B. McFarland, and C. M. Moore. "Short-Limb Dwarfism and Hypertrophic Cardiomyopathy in a Patient with Paternal Isodisomy 14: 45,Xy,Idic(14)(P11)." *Am J Med Genet* 65, no. 4 (1996): 259-65.
- Walter, J., B. Hutter, T. Khare, and M. Paulsen. "Repetitive Elements in Imprinted Genes." *Cytogenet Genome Res* 113, no. 1-4 (2006): 109-15.
- Wan, L. B., H. Pan, S. Hannenhalli, Y. Cheng, J. Ma, A. Fedoriw, V. Lobanenkov, K. E. Latham, R. M. Schultz, and M. S. Bartolomei. "Maternal Depletion of Ctcf Reveals Multiple Functions During Oocyte and Preimplantation Embryo Development." *Development* 135, no. 16 (2008): 2729-38.
- Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Marin-Padilla, A. H. Sharpe, and N. A. Speck. "Disruption of the Cbfa2 Gene Causes Necrosis and Hemorrhaging in the Central Nervous System and Blocks Definitive Hematopoiesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, no. 8 (1996): 3444-9.

- Wang, Q., Y. Wang, A. W. Minto, J. Wang, Q. Shi, X. Li, and R. J. Quigg. "MicroRNA-377 Is up-Regulated and Can Lead to Increased Fibronectin Production in Diabetic Nephropathy." *FASEB J* 22, no. 12 (2008): 4126-35.
- Wang, X., C. Blagden, J. Fan, S. J. Nowak, I. Taniuchi, D. R. Littman, and S. J. Burden. "Runx1 Prevents Wasting, Myofibrillar Disorganization, and Autophagy of Skeletal Muscle." *Genes Dev* 19, no. 14 (2005): 1715-22.
- Wang, X., Q. Sun, S. D. McGrath, E. R. Mardis, P. D. Soloway, and A. G. Clark. "Transcriptome-Wide Identification of Novel Imprinted Genes in Neonatal Mouse Brain." *PLoS One* 3, no. 12 (2008): e3839.
- Wang, Y., R. M. Belflower, Y. F. Dong, E. M. Schwarz, R. J. O'Keefe, and H. Drissi. "Runx1/Aml1/Cbfa2 Mediates Onset of Mesenchymal Cell Differentiation toward Chondrogenesis." *J Bone Miner Res* 20, no. 9 (2005): 1624-36.
- Wang, Y., and H. S. Sul. "Pref-1 Regulates Mesenchymal Cell Commitment and Differentiation through Sox9." *Cell Metab* 9, no. 3 (2009): 287-302.
- Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M. A. Surani, Y. Sakaki, and H. Sasaki. "Endogenous Sirnas from Naturally Formed Dsrnas Regulate Transcripts in Mouse Oocytes." *Nature* 453, no. 7194 (2008): 539-43.
- Weidman, J. R., D. C. Dolinoy, K. A. Maloney, J. F. Cheng, and R. L. Jirtle. "Imprinting of Opossum Igf2r in the Absence of Differential Methylation and Air." *Epigenetics* 1, no. 1 (2006): 49-54.
- Wen, B., H. Wu, H. Bjornsson, R. D. Green, R. Irizarry, and A. P. Feinberg. "Overlapping Euchromatin/Heterochromatin-Associated Marks Are Enriched in Imprinted Gene Regions and Predict Allele-Specific Modification." *Genome Res* 18, no. 11 (2008): 1806-13.
- Wen, B., H. Wu, Y. Shinkai, R. A. Irizarry, and A. P. Feinberg. "Large Histone H3 Lysine 9 Dimethylated Chromatin Blocks Distinguish Differentiated from Embryonic Stem Cells." *Nat Genet* 41, no. 2 (2009): 246-50.
- White, J. D., T. Vuocolo, M. McDonagh, M. D. Grounds, G. S. Harper, N. E. Cockett, and R. Tellam. "Analysis of the Callipyge Phenotype through Skeletal Muscle Development; Association of Dlk1 with Muscle Precursor Cells." *Differentiation* 76, no. 3 (2008): 283-98.
- Wienholds, E., W. P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. de Bruijn, H. R. Horvitz, S. Kauppinen, and R. H. Plasterk. "MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic Development." *Science* 309, no. 5732 (2005): 310-1.
- Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. "Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans*." *Cell* 75, no. 5 (1993): 855-62.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs. "Many Roads to Maturity: MicroRNA Biogenesis Pathways and Their Regulation." *Nat Cell Biol* 11, no. 3 (2009): 228-34.
- Wu, H., H. Xu, L. J. Miraglia, and S. T. Crooke. "Human Rnase Iii Is a 160-Kda Protein Involved in Preribosomal Rna Processing." *J Biol Chem* 275, no. 47 (2000): 36957-65.
- Wu, Q., M. Kawahara, and T. Kono. "Synergistic Role of Igf2 and Dlk1 in Fetal Liver Development and Hematopoiesis in Bi-Maternal Mice." *J Reprod Dev* 54, no. 3 (2008): 177-82.

- Wu, Q., T. Kumagai, M. Kawahara, H. Ogawa, H. Hiura, Y. Obata, R. Takano, and T. Kono. "Regulated Expression of Two Sets of Paternally Imprinted Genes Is Necessary for Mouse Parthenogenetic Development to Term." *Reproduction* 131, no. 3 (2006): 481-8.
- Wulczyn, F. G., L. Smirnova, A. Rybak, C. Brandt, E. Kwidzinski, O. Ninnemann, M. Strehle, A. Seiler, S. Schumacher, and R. Nitsch. "Post-Transcriptional Regulation of the Let-7 MicroRNA During Neural Cell Specification." *FASEB J* 21, no. 2 (2007): 415-26.
- Wutz, A., O. W. Smrzka, N. Schweifer, K. Schellander, E. F. Wagner, and D. P. Barlow. "Imprinted Expression of the Igf2r Gene Depends on an Intronic CpG Island." *Nature* 389, no. 6652 (1997): 745-9.
- Wylie, A. A., S. K. Murphy, T. C. Orton, and R. L. Jirtle. "Novel Imprinted Dlk1/Gtl2 Domain on Human Chromosome 14 Contains Motifs That Mimic Those Implicated in Igf2/H19 Regulation." *Genome Res* 10, no. 11 (2000): 1711-8.
- Yamasaki, Y., T. Kayashima, H. Soejima, A. Kinoshita, K. Yoshiura, N. Matsumoto, T. Ohta, T. Urano, H. Masuzaki, T. Ishimaru, T. Mukai, N. Niikawa, and T. Kishino. "Neuron-Specific Relaxation of Igf2r Imprinting Is Associated with Neuron-Specific Histone Modifications and Lack of Its Antisense Transcript Air." *Hum Mol Genet* 14, no. 17 (2005): 2511-20.
- Yang, Y., T. Li, T. H. Vu, G. A. Ulaner, J. F. Hu, and A. R. Hoffman. "The Histone Code Regulating Expression of the Imprinted Mouse Igf2r Gene." *Endocrinology* 144, no. 12 (2003): 5658-70.
- Yates, P. A., R. W. Burman, P. Mummaneni, S. Krussel, and M. S. Turker. "Tandem B1 Elements Located in a Mouse Methylation Center Provide a Target for De Novo DNA Methylation." *J Biol Chem* 274, no. 51 (1999): 36357-61.
- Yevtodiyenko, A., M. S. Carr, N. Patel, and J. V. Schmidt. "Analysis of Candidate Imprinted Genes Linked to Dlk1-Gtl2 Using a Congenic Mouse Line." *Mamm Genome* 13, no. 11 (2002): 633-8.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen. "Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-MicroRNAs and Short Hairpin RNAs." *Genes Dev* 17, no. 24 (2003): 3011-6.
- Yoon, B. J., H. Herman, A. Sikora, L. T. Smith, C. Plass, and P. D. Soloway. "Regulation of DNA Methylation of Rasgrf1." *Nat Genet* 30, no. 1 (2002): 92-6.
- Yotova, I. Y., I. M. Vlatkovic, F. M. Pauler, K. E. Warczok, P. F. Ambros, M. Oshimura, H. C. Theussl, M. Gessler, E. F. Wagner, and D. P. Barlow. "Identification of the Human Homolog of the Imprinted Mouse Air Non-Coding Rna." *Genomics* 92, no. 6 (2008): 464-73.
- Young, L. E., K. Fernandes, T. G. McEvoy, S. C. Butterwith, C. G. Gutierrez, C. Carolan, P. J. Broadbent, J. J. Robinson, I. Wilmut, and K. D. Sinclair. "Epigenetic Change in Igf2r Is Associated with Fetal Overgrowth after Sheep Embryo Culture." *Nat Genet* 27, no. 2 (2001): 153-4.
- Zeng, Y., and B. R. Cullen. "Sequence Requirements for Micro Rna Processing and Function in Human Cells." *RNA* 9, no. 1 (2003): 112-23.
- Zhang, L., S. Volinia, T. Bonome, G. A. Calin, J. Greshock, N. Yang, C. G. Liu, A. Giannakakis, P. Alexiou, K. Hasegawa, C. N. Johnstone, M. S. Megraw, S. Adams, H. Lassus, J. Huang, S. Kaur, S. Liang, P. Sethupathy, A. Leminen, V. A. Simossis, R. Sandaltzopoulos, Y. Naomoto, D. Katsaros, P. A. Gimotty, A. DeMichele, Q. Huang, R. Butzow, A. K. Rustgi, B. L. Weber, M. J. Birrer, A. G. Hatzigeorgiou, C. M. Croce, and G. Coukos. "Genomic and Epigenetic Alterations Deregulate MicroRNA

- Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, no. 19 (2008): 7004-9.
- Zhou, L., X. Qi, J. A. Potashkin, F. W. Abdul-Karim, and G. I. Gorodeski. "MicroRNAs Mir-186 and Mir-150 Down-Regulate Expression of the Pro-Apoptotic Purinergic P2x7 Receptor by Activation of Instability Sites at the 3'-Untranslated Region of the Gene That Decrease Steady-State Levels of the Transcript." *J Biol Chem* 283, no. 42 (2008): 28274-86.
- Zwart, R., F. Sleutels, A. Wutz, A. H. Schinkel, and D. P. Barlow. "Bidirectional Action of the Igf2r Imprint Control Element on Upstream and Downstream Imprinted Genes." *Genes Dev* 15, no. 18 (2001): 2361-6.

6 Anhang

6.1 DNA-Sequenz-Analysen

Tabelle 6.1: Koordinaten aller im Bereich der IG-DMR identifizierten Tandem Repeats.

Maus: UCSC Genome Browser/Mouse July 2007 Assembly		
Analysierter Bereich	Chr12	110,761,005 - 110,772,344
IG-DMR TR1	Chr12	110,767,616 - 110,767,657
IG-DMR TR1G (Nagerspezifisch)	Chr12	110,766,504 - 110,766,683
IG-DMR TR2	Chr12	110,765,226 - 110,766,014
Ratte: UCSC Genome Browser/Rat Nov. 2004 Assembly		
Analysierter Bereich	Chr6	134,099,580 - 134,109,362
IG-DMR TR1G (Nagerspezifisch)	Chr6	134,104,150 - 134,104,259
IG-DMR TR2	Chr6	134,102,808 - 134,103,562
Pika: Ensembl Genome Browser 53		
Analysierter Bereich	scaffold_3601	99,224 - 113,268
IG-DMR TR1	scaffold_3601	100,840 - 101,282
IG-DMR TR1G (Nagerspezifisch)	scaffold_3601	102,239 - 102,699
Gürteltier: Ensembl Genome Browser 53		
Analysierter Bereich	scaffold_49262	1 - 14,336
IG-DMR TR1	scaffold_49262	7,683 - 7,850
Kuh: UCSC Genome Browser/Cow Oct 2007 Assembly		
Analysierter Bereich	Chr21	65,790,764 - 65,801,016
IG-DMR TR1	Chr21	65,795,354 - 65,796,136
Pferd: UCSC Genome Browser/Horse Sep 2007 Assembly		
Analysierter Bereich	Chr 24	42,668,272 - 42,678,324
IG-DMR TR1	Chr 24	42,671,156 - 42,671,252 42,672,452 - 42,672,544
Schaf: NCBI/Genbank Database		
Analysierter Bereich	AF354168.2	78,751 - 88,750
IG-DMR TR1	AF354168.2	83,402 - 84,085
Hund: UCSC Genome Browser/Dog May 2005 Assembly		
Analysierter Bereich	Chr8	72,076,456 - 72,086,435
IG-DMR TR1	Chr8	72,080,361 - 72,081,281
Katze: UCSC Genome Browser/Cat Mar 2006 Assembly		
Analysierter Bereich	scaffold_147181	198,059 - 208,708
IG-DMR TR1	scaffold_147181	203,251 - 203,632 204,787 - 204,862
Katzen-spezifischer TR	scaffold_147181	201,459 - 201,534
Krallenaffe: UCSC Genome Browser/Marmoset June 2007 Assembly		
Analysierter Bereich	Contig845	47,113 - 56,412 (-)
IG-DMR TR1	Contig845	53,819 - 53,919 (-) 53,012 - 53,054 (-) 51,573 - 51,750 (-)
Krallenaffe-spezifischer TR	Contig845	54,608 - 54,813 (-)

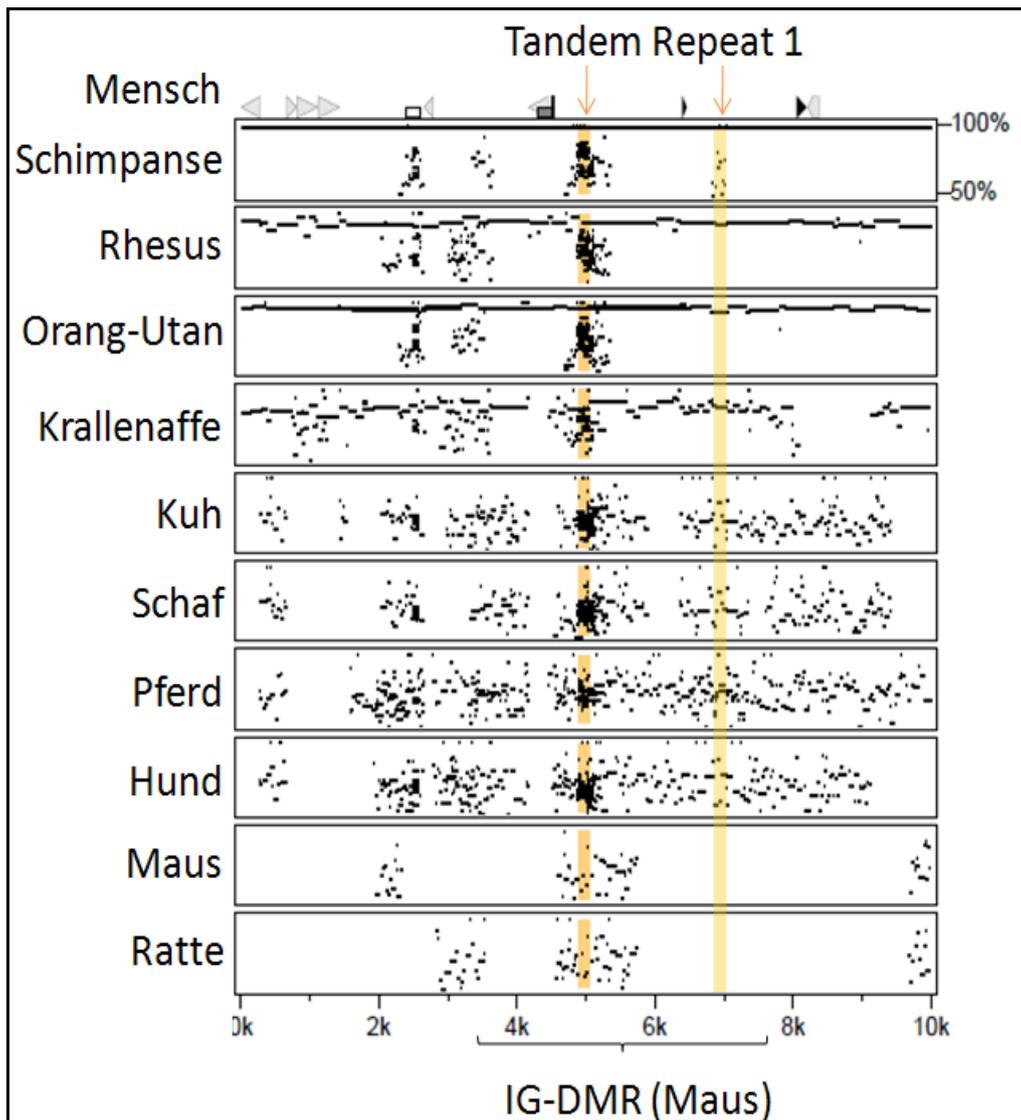


Abbildung 6.2: Sequenzabgleich des IG-DMR Tandem Repeat 1 in verschiedenen Säugetier-Spezies. Sequenzabgleich 5 kb stromauf- bzw. stromabwärts des TR1-Elementes (Pfeil) 11 verschiedener Säugetier-Spezies mit Hilfe des Multipipmaker-Programmes (Mensch=Mastersequenz). Homologien >50% zur Mastersequenz sind durch Punkte markiert. Der repetitive Charakter der IG-DMR führt zu multiplen Alignments, was als engmaschig gepunktete Wolken erscheint (Pfeile).

Tabelle 6.2: Putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Bereich der murinen IG-DMR. Bindestellen nach Vorhersagen des TF-Search-Programms (Threshold: 100 (=max); Vertebraten). Analytierte Sequenz: BAC-Klon AJ 320506, nt 79883-84038.

Position	Transkriptionsfaktor	Position	Transkriptionsfaktor
174-180 (+)	AML1a (Runx1)	2842-2847 (+)	AML1a (Runx1)
210-216 (-)	Cdxa	3056-3062 (+)	SRY (Sox2)
698-703 (+)	AML1a (Runx1)	3072-3078 (-)	Nkx-2
981-988 (+)	Cdxa	3287-3292 (+)	AML1a (Runx1)
1371-1376 (+)	AML1a (Runx1)	3721-3726 (-)	AML1a (Runx1)
2365-2370 (+)	AML1a (Runx1)	3798- 3803 (+)	AML1a (Runx1)
2672-2678 (-)	AML1a (Runx1)		

Tabelle 6.3: Putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Bereich der human IG-DMR. Bindestellen nach Vorhersagen des TF-Search-Programms (Threshold: 100 (=max); Vertebraten). Analyzierte Sequenz: UCSC, human Genome, Mar. 2006 Assembly; Chr14:100,339,502-100,348,951.

Position	Transkriptionsfaktor	Position	Transkriptionsfaktor
565-571 (+)	SRY (Sox2)	4869-4875 (-)	SRY (Sox2)
1843-1848 (-)	AML1a (Runx1)	5389-5394 (+)	AML1a (Runx1)
1884-1890 (-)	SRY (Sox2)	6075-6080 (-)	AML1a (Runx1)
2557-2563 (+)	Nkx-2	6521-6525 (-)	AML1a (Runx1)
2671-2677 (+)	Nkx-2	6558-6563 (-)	AML1a (Runx1)
2726-2731 (-)	AML1a (Runx1)	7006-7014 (-)	Lyf-1
2826-2834 (-)	Lyf-1	7500-7505 (+)	AML1a (Runx1)
3302-3310 (+)	Lyf-1	7720-7725 (+)	AML1a (Runx1)
3722-3727 (+)	AML1a (Runx1)	7817-7822 (-)	AML1a (Runx1)
3910-3916 (-)	Nkx-2	7866-7871 (-)	AML1a (Runx1)
4025-4031 (+)	SRY (Sox2)	8214-8219 (+)	AML1a (Runx1)
4328-4333 (+)	AML1a (Runx1)		

Tabelle 6.4: Putative Runx1 Bindestellen im Bereich der human IG-DMR. Runx-Proteine binden die Konsensus-Sequenz YGYGGY(Y) mit Präferenz für TGTGGT (dunkelgrau = Vorhersage des TF-Search-Programms). Die römischen Ziffern in Klammern geben an, in welchem der in den Reportern verwendeten Teifragmenten der humanen IG-DMR die betreffende Sequenz liegt (s. Abschnitt 3.1.2.4). Analyzierte Sequenz: UCSC, human Genome, Mar. 2006 Assembly; Chr14:100,339,502-100,348,951.

Position	Sequenz	Bemerkung	Position	Sequenz	Bemerkung
54	TGCGGTC		5975	CGCGGTT	TR1 (III)
2045	TGTGGCT		7500	TGTGGTT	TR1 (IV)
2063	TGCGGCT		7518	CGCGGCT	TR1 (IV)
3722	TGTGGT	(I)	7554	TGCGGCT	TR1 (IV)
4237	TGCGGTT		7572	TGTGGCT	TR1 (IV)
4328	TGTGGTC		7590	CGTGGCT	TR1 (IV)
5103	CGTGGTT	TR1 (II)	7608	CGTGGCT	TR1 (IV)
5121	CGTGGTT	TR1 (II)	7696	CGCGGTC	TR1 (V)
5389	TGTGGTT	(II)	7720	TGTGGT	(V)
5457	TGTGGCT	(II)	8214	TGTGGT	(V)
5957	CGCGGTT	TR1 (III)	8571	TGTGGCC	

	1	18
Mensch-TR1	ACCAGTTGCCCGTGGCTC	
Schimpanse-TR1	ACCAGTTGCCCGTGGCTC	
Orang Utan-TR1	ACCAGTTGCCCGGGCTC	
Krallenaffe-TR1	ACCAGTTGCCCGGGCTC	
Schaf-TR1	GCCAGTTGCCCGGGTCC	
Hund-TR1	GCCAGTTGCCCGGGTCC	
Pferd-TR1	GCCAGTTGCCCGGGTCT	
Katze-TR1	GCCAGT C GCCCGGGTCC	
Guerteltier-TR1	GCC GGTGG CCCGGGTTC	
Kuh-TR1	GCCAGTTGCC CA TGGCCT	
Pika-TR1	ACCAGTTGC - CGCGGCTC	
Maus-TR1	ACCAGTT CCT CGTGGTTT	
TR1-Konsensus	UCCAGTTGCCCGYGGYY	
Runx-KonsensusYGYGGYY.	
*****.	

Abbildung 6.6: Die IG-DMR TR1-Konsensus-Sequenzen tragen eine putative Bindestelle für Runx-Proteine. ClustalW-Sequenzabgleich der TR1-Konsensus-Sequenzen 12 verschiedener Säugetier-Arten zur Generierung einer TR1-Master.Konsensus-Sequenz. Diese beherbergt am 3' Ende eine mögliche Bindestelle für Runx-Proteine. (U = Purin; Y = Pyrimidin)

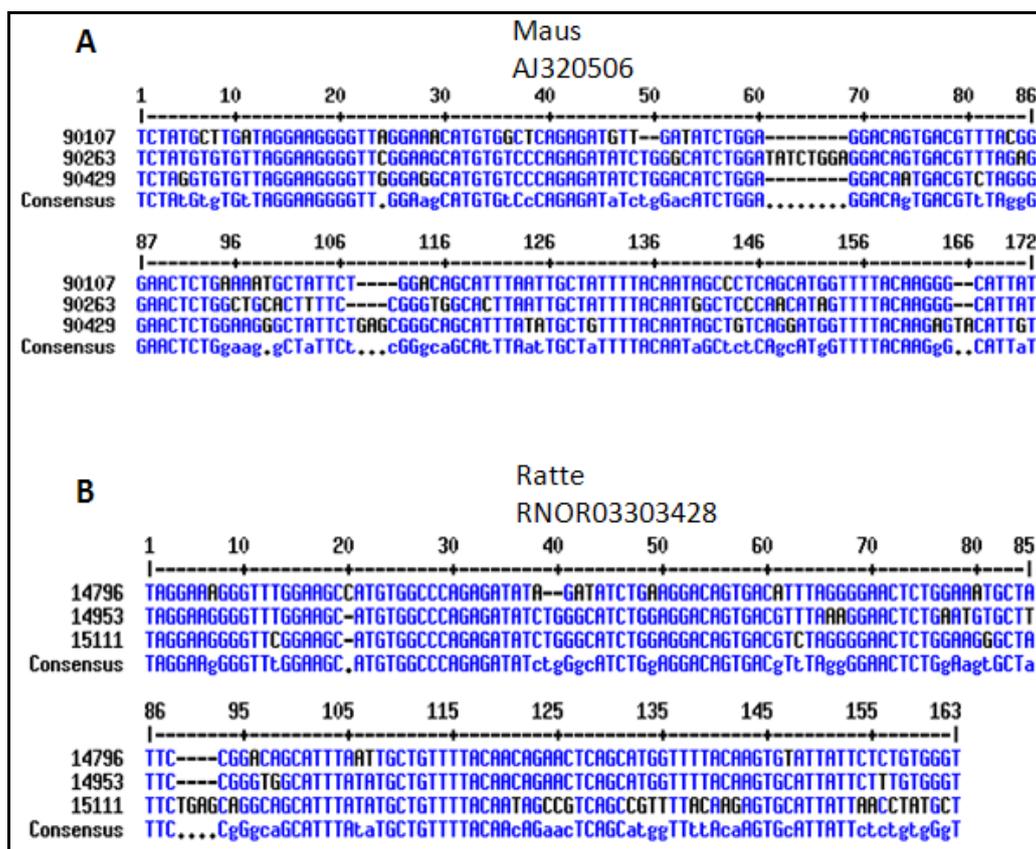
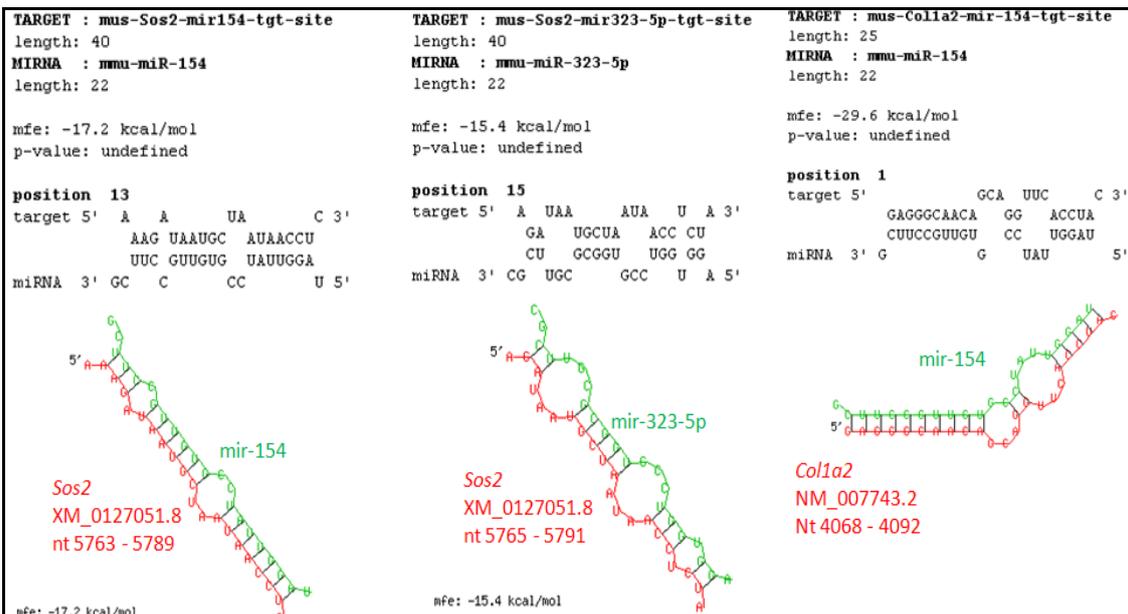
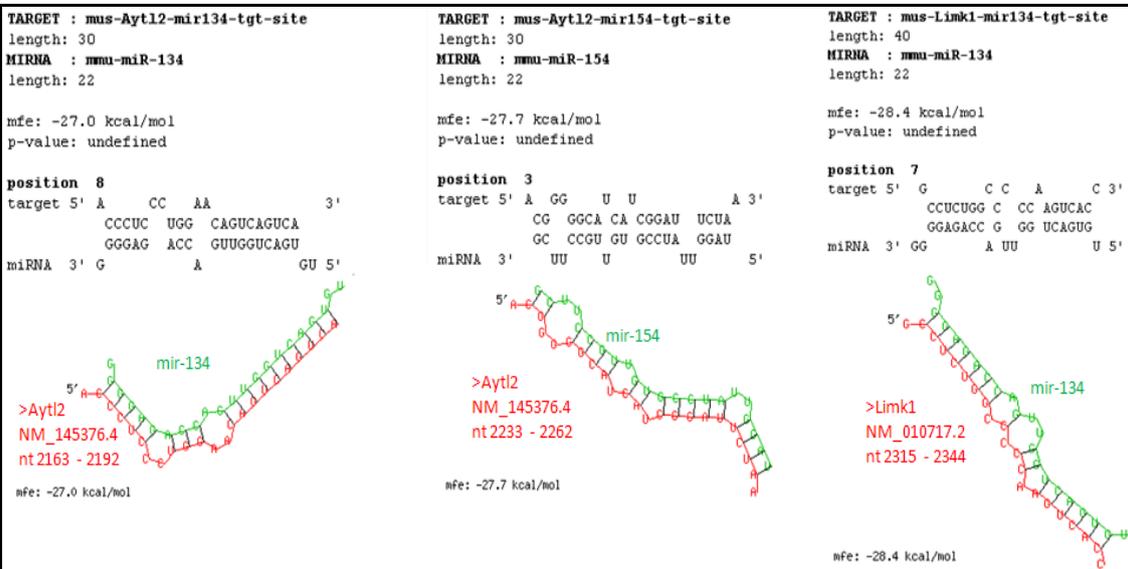
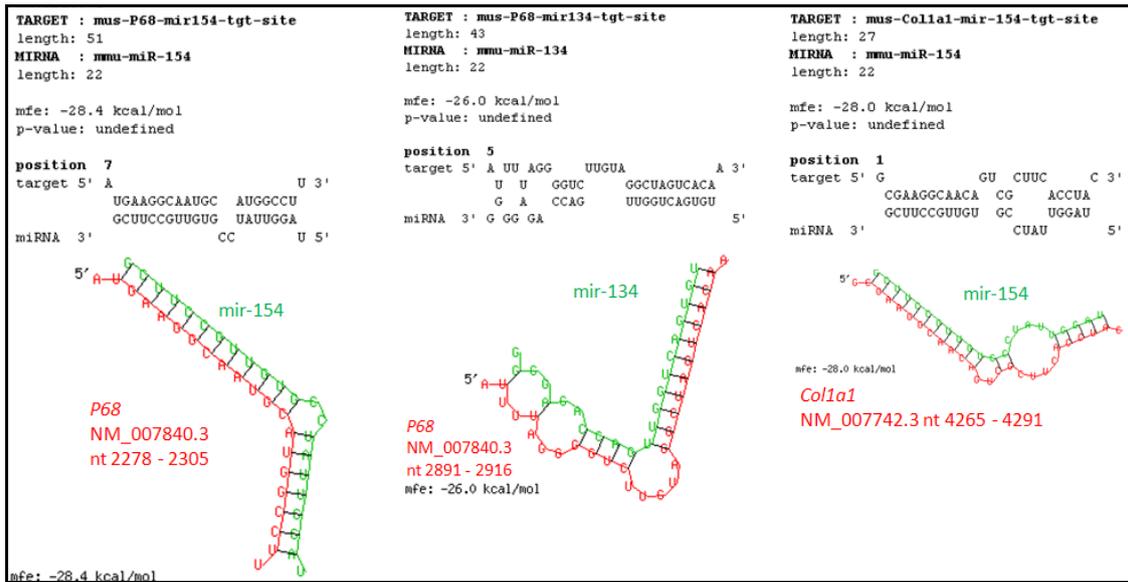


Abbildung 6.7: Sequenzabgleich der einzelnen Kopien des Repeats stromaufwärts von *Gtl2* (*Gtl2uTR*) von Maus (A) und Ratte (B) mit Hilfe des MultAlin-Programms. Der gesamte Tandem Repeat besteht aus 3 Kopien einer 158 nukleotid-langen Konsensus-Sequenz. Übereinstimmungen der Einzelsequenzen mit dem Konsensus sind in blauen, Unterschiede in schwarzen Lettern

6 Anhang



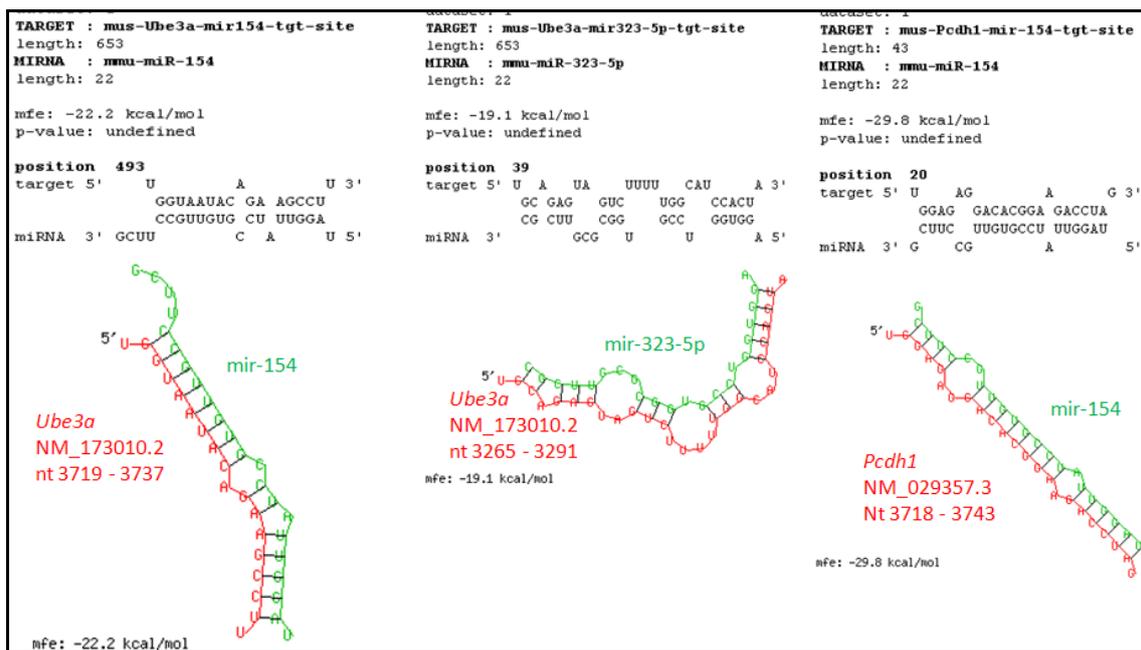
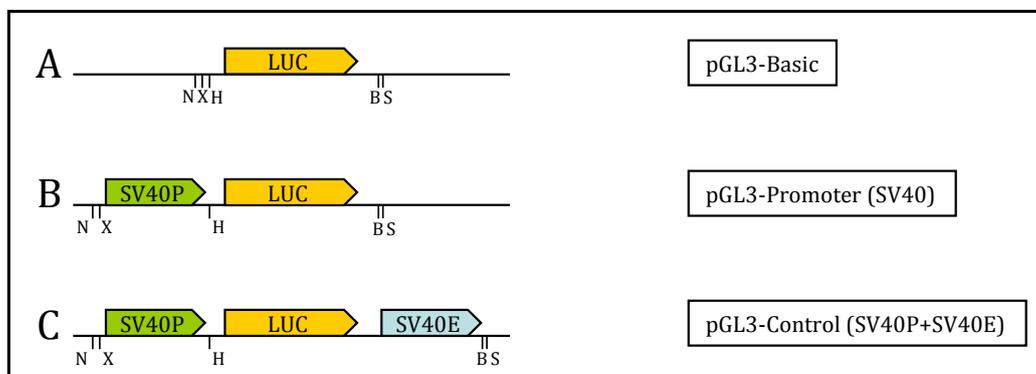


Abbildung 6.9: *In silico* Alignments aller getesteten miRNAs mit den putativen Bindestellen. Benutzt wurde das Programm RNA-hybrid mit den vorgegebenen Standard-Einstellungen.

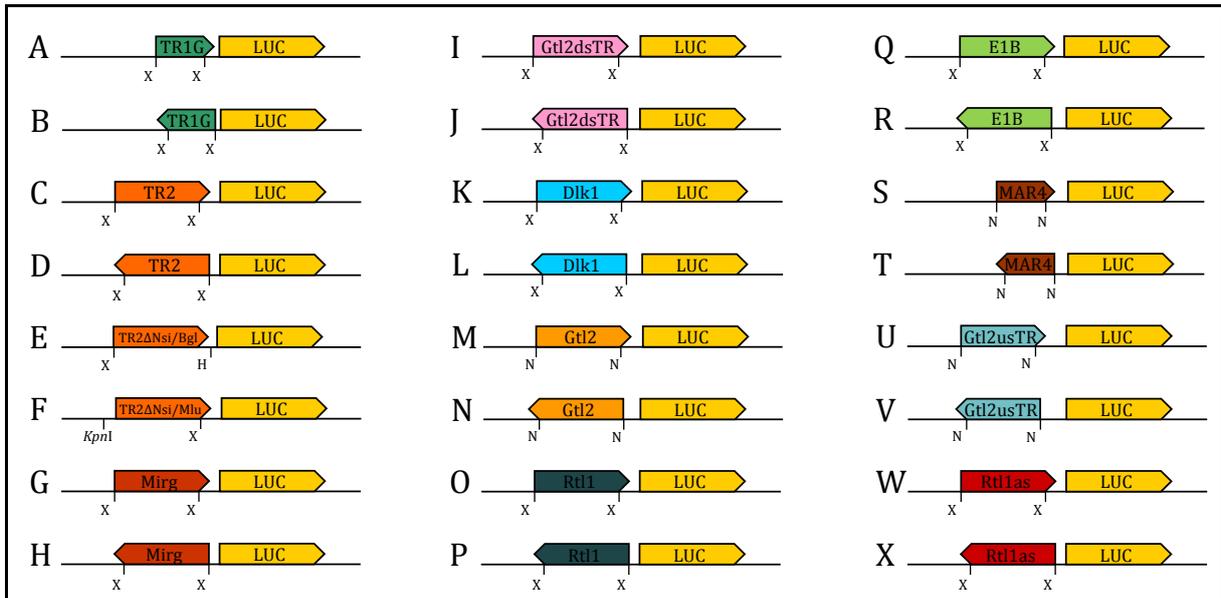
6.3 Plasmid-Katalog (auf pGL3-Basierend)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer großen Anzahl an verschiedenen Plasmiden gearbeitet. Um eine Übersicht zu geben, sind im Folgenden alle in dieser Arbeit hergestellten bzw. benutzten Plasmide schematisch aufgelistet (Abb. 6.10 (I-XI)).

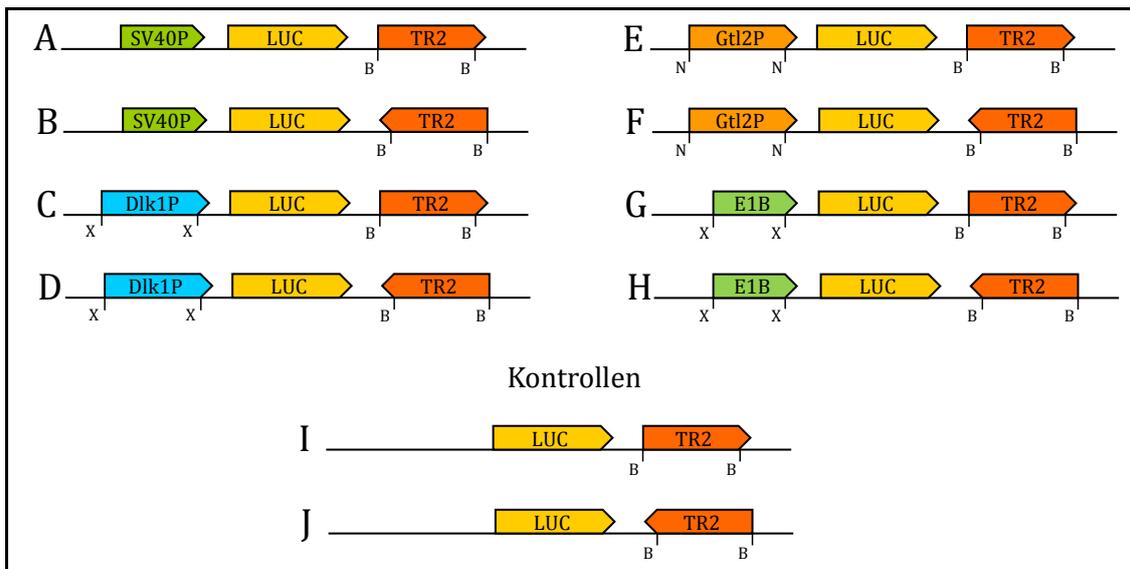
I pGL3-Kontroll-Plasmide



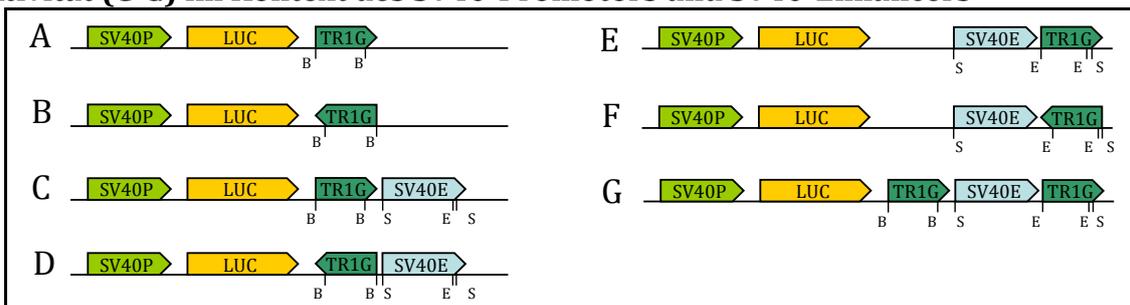
II Test verschiedener DNA-Fragmente auf Promotor-Aktivität (Maus)



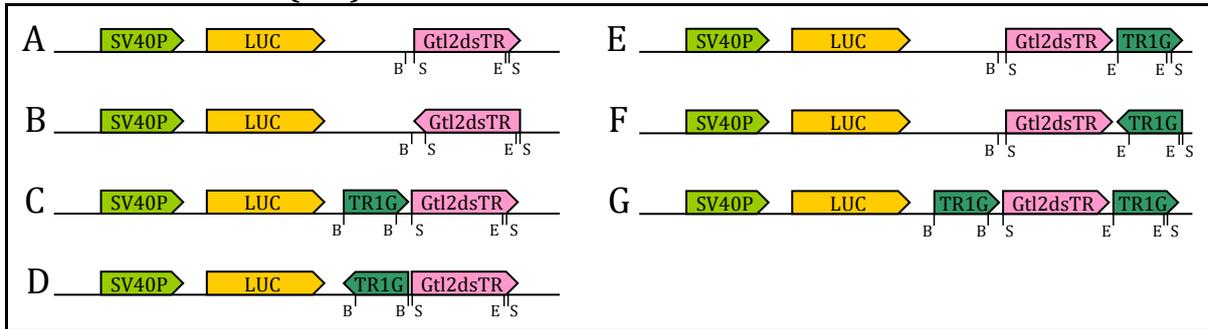
III Test des IG-DMR Tandem Repeat 2 bzgl. Enhancer/Silencer-Potenzial



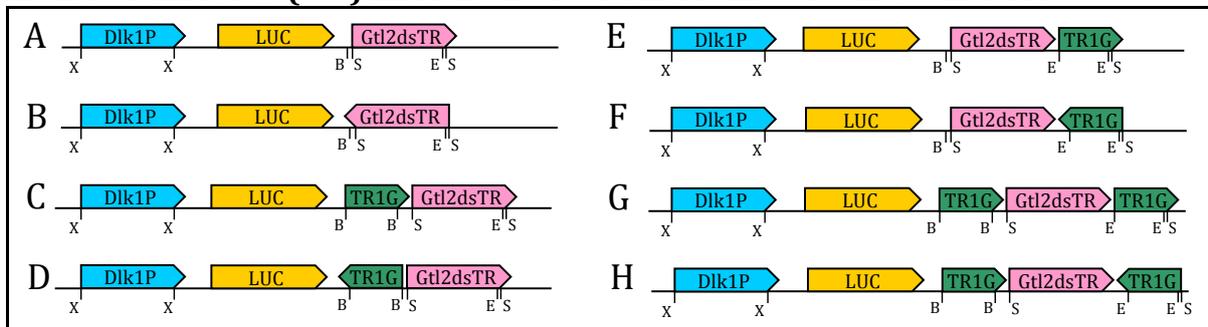
IV Test des murinen TR1G auf Enhancer/Silencer-Aktivität (A-B) bzw. Insulator-Aktivität (C-G) im Kontext des SV40-Promotors und SV40-Enhancers



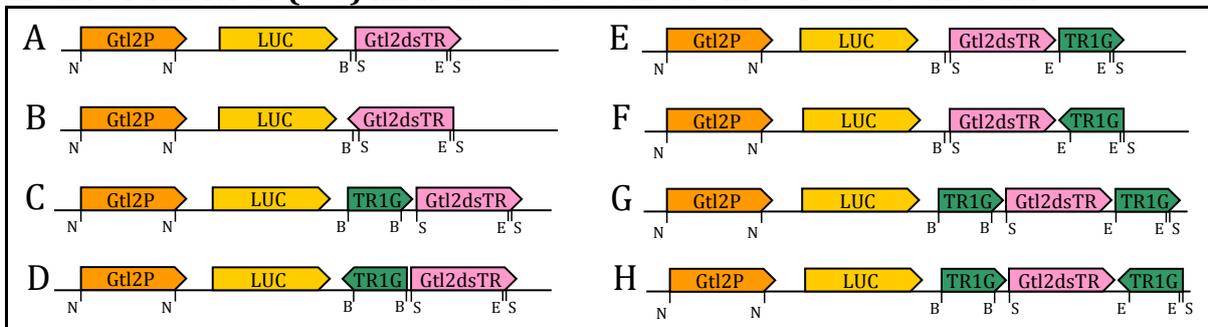
V Test des Gtl2dsTR auf Enhancer/Silencer-Aktivität (A-B) bzw. des TR1G auf Insulator-Aktivität (C-G) im Kontext des SV40-Promotors und Gtl2dsTR



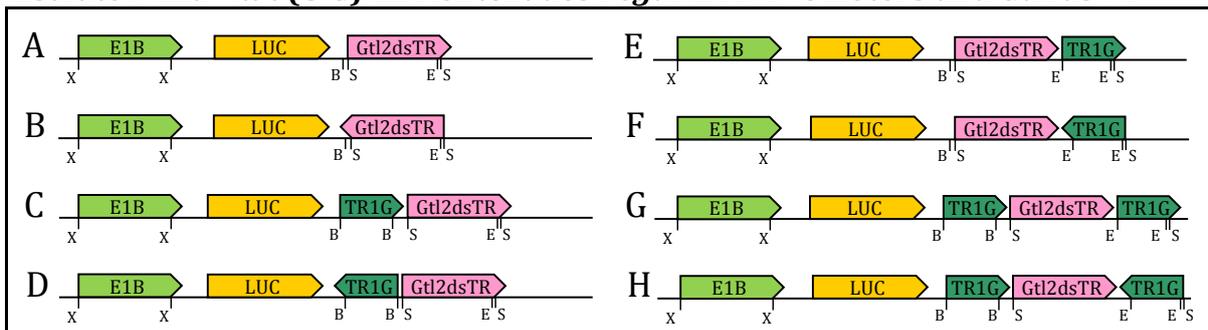
VI Test des Gtl2dsTR auf Enhancer/Silencer-Aktivität (A-B) bzw. des TR1G auf Insulator-Aktivität (C-G) im Kontext des Dlk1-Promotors und Gtl2dsTR



VII Test des Gtl2dsTR auf Enhancer/Silencer-Aktivität (A-B) bzw. des TR1G auf Insulator-Aktivität (C-G) im Kontext des Gtl2-Promotors und Gtl2dsTR



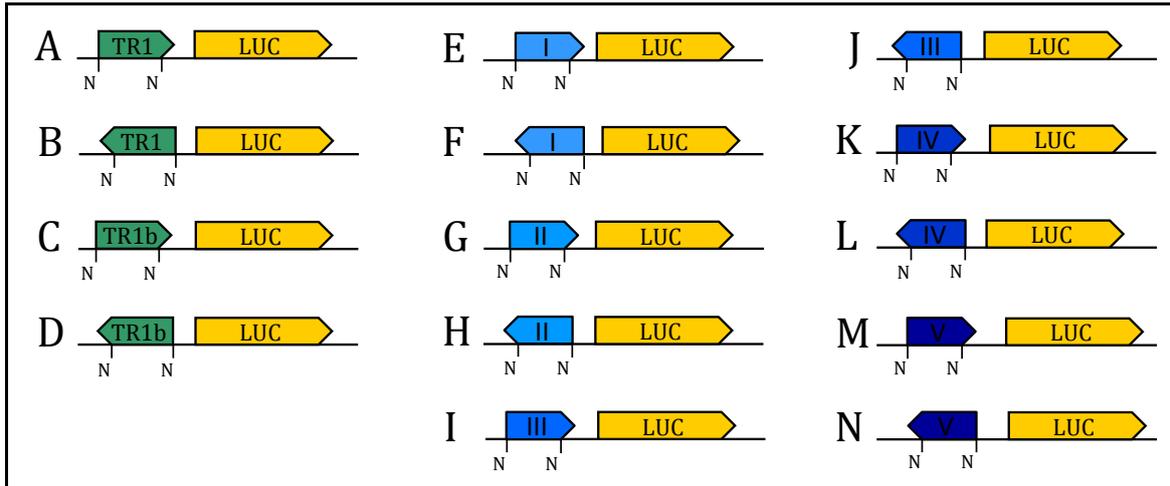
VIII Test des Gtl2dsTR auf Enhancer/Silencer-Aktivität (A-B) bzw. des TR1G auf Insulator-Aktivität (C-G) im Kontext des BegainE1B-Promotors und Gtl2dsTR



IX Test der Gtl2-CTCF-Bindestellen auf Insulator-Potenzial im Kontext des SV40/Gtl2-Promotors und Gtl2dsTR-Silencers



X Test verschiedener IG-DMR-Fragmente auf Promotor-Aktivität (Mensch)



XI Test des MEG3dsTR auf Promotor (A-B) bzw. Enhancer/Silencer-Aktivität im Kontext des SV40-Promotors (C-D)

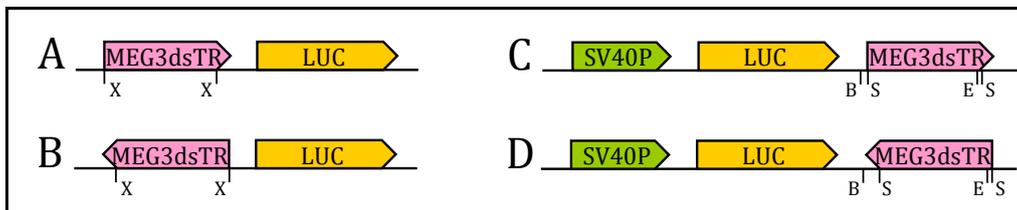


Abbildung 6.10 (I-XI): Schematische Darstellung der benutzten pGL3-Kontroll-Plasmide. Die Reporter-Konstrukte sind schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar (SV40P: SV40-Promotor; SV40E: SV40-Enhancer; B: *Bam*HI; Bg: *Bgl*II; E: *Eco*RI N: *Nhe*I; S: *Sal*I; X: *Xho*I; LUC: Luciferase Reporter-Gen).

6.4 RT-PCRs

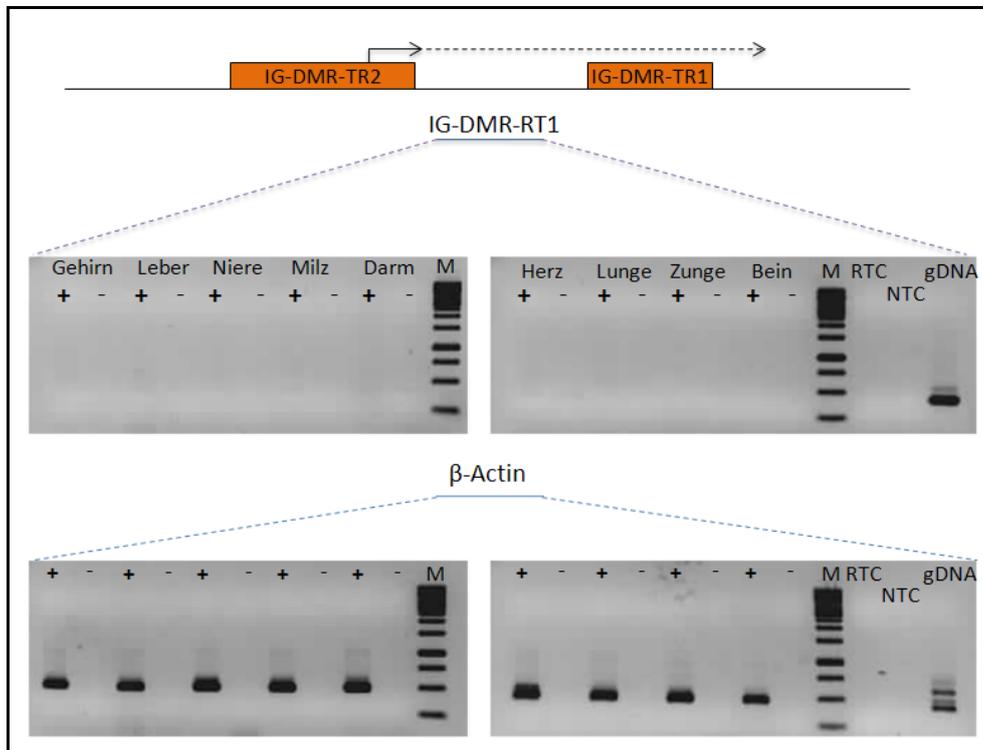


Abbildung 6.11: RT-PCRs mit verschiedenen Geweben einer neugeborenen Maus. Gesamt-RNA verschiedener Gewebe einer neugeborenen Maus wurde präpariert, mit *DNAse*1 behandelt und durch Reverse Transkription mit Random Primern in cDNA umgeschrieben. (+) bzw. (-) bezeichnen RT-Reaktionen mit bzw. ohne Reverse Transkriptase. Anschließend wurden RT-PCRs durchgeführt. Mit einem Primerpaar stromabwärts des IG-DMR TR2 ließ sich in den getesteten Proben kein PCR-Produkt generieren (35 Zyklen). Eine Actin-Kontroll-PCR (30 Zyklen) zeigte, dass die eingesetzte cDNA intakt war. (NTC: Wasserkontrolle der PCR; RTC: Wasserkontrolle der RT; gDNA: genomische DNA)

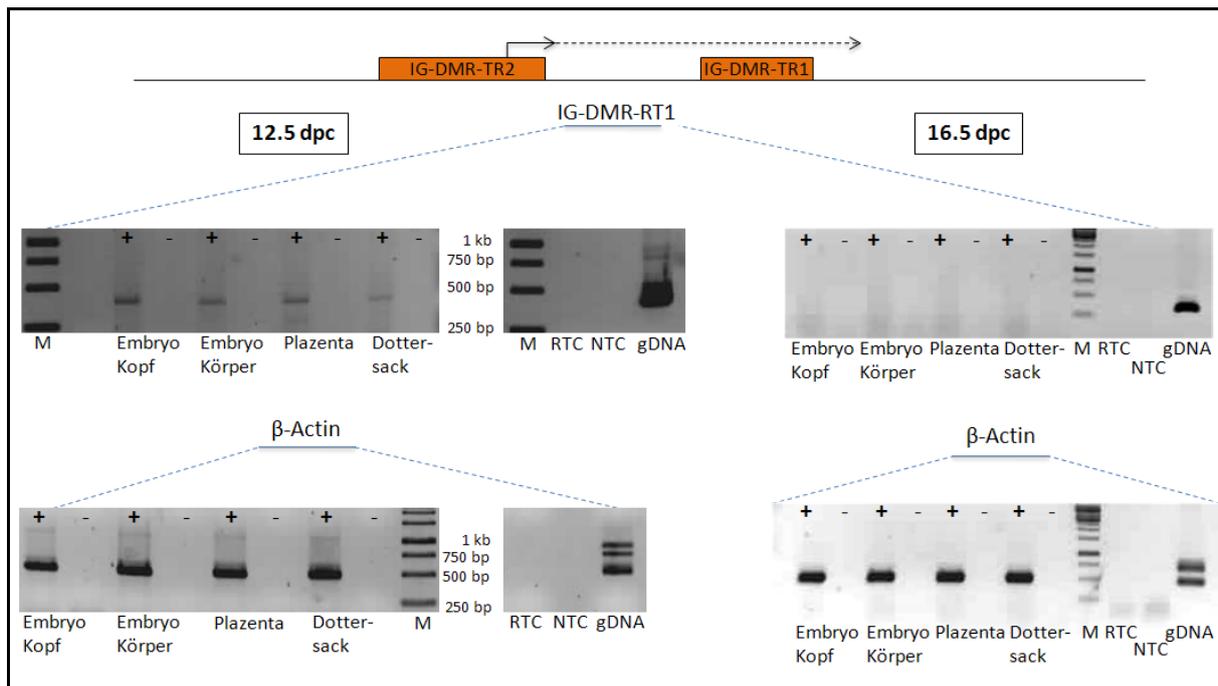


Abbildung 6.12: RT-PCRs mit embryonalen Mausgeweben (e12.5 bzw. e16.5 dpc). Gesamt-RNA embryonaler Gewebe 12.5 dpc bzw. 16.5 dpc Maus wurde präpariert, mit DNaseI behandelt und durch Reverse Transkription mit Random Primern in cDNA umgeschrieben. (+) bzw. (-) bezeichnen RT-Reaktionen mit bzw. ohne Reverse Transkriptase. Anschließend wurden RT-PCRs durchgeführt. Mit einem Primerpaar stromabwärts des IG-DMR TR2 ließ sich in den getesteten Proben kein PCR-Produkt generieren (35 Zyklen). Eine β -Actin-Kontroll-PCR (30 Zyklen) zeigte, dass die eingesetzte cDNA intakt war. (M: 1kb-DNA-Leiter; NTC: Wasserkontrolle der PCR; RTC: Wasserkontrolle der RT; gDNA: genomische DNA)

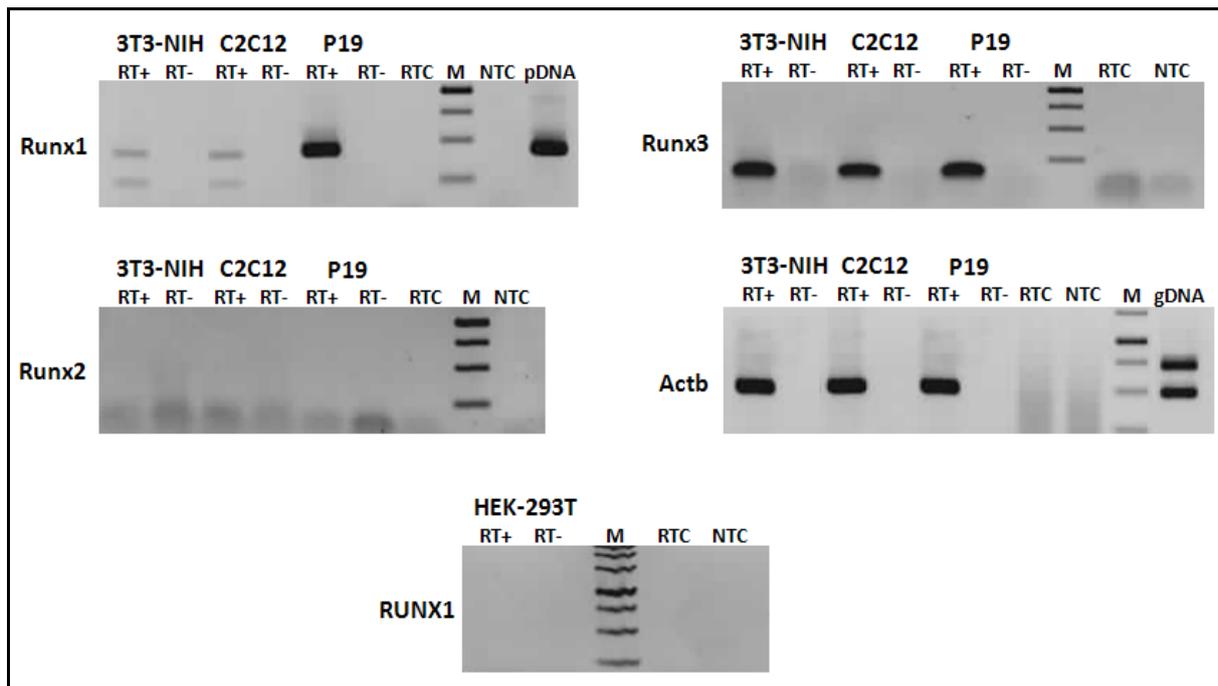


Abbildung 6.13: Runx1, Runx2 und Runx3-RT-PCRs mit verschiedenen Zelllinien. Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien wurde präpariert und durch Reverse Transkription mit Random Primern in cDNA umgeschrieben. (+) bzw. (-) bezeichnen RT-Reaktionen mit bzw. ohne Reverse Transkriptase. Anschließend wurden RT-PCRs mit Primern für die murinen *Runx1*, *Runx2*, *Runx3*-Gene bzw. das humane *RUNX1*-Gen durchgeführt. Eine Actin-Kontroll-PCR (30 Zyklen) zeigte, dass die eingesetzte cDNA intakt war. (NTC: Wasserkontrolle der PCR; RTC: Wasserkontrolle der RT; gDNA: genomische DNA; pDNA: Plasmid-DNA)

6.5 Genotypisierung und SNUPE-Assays

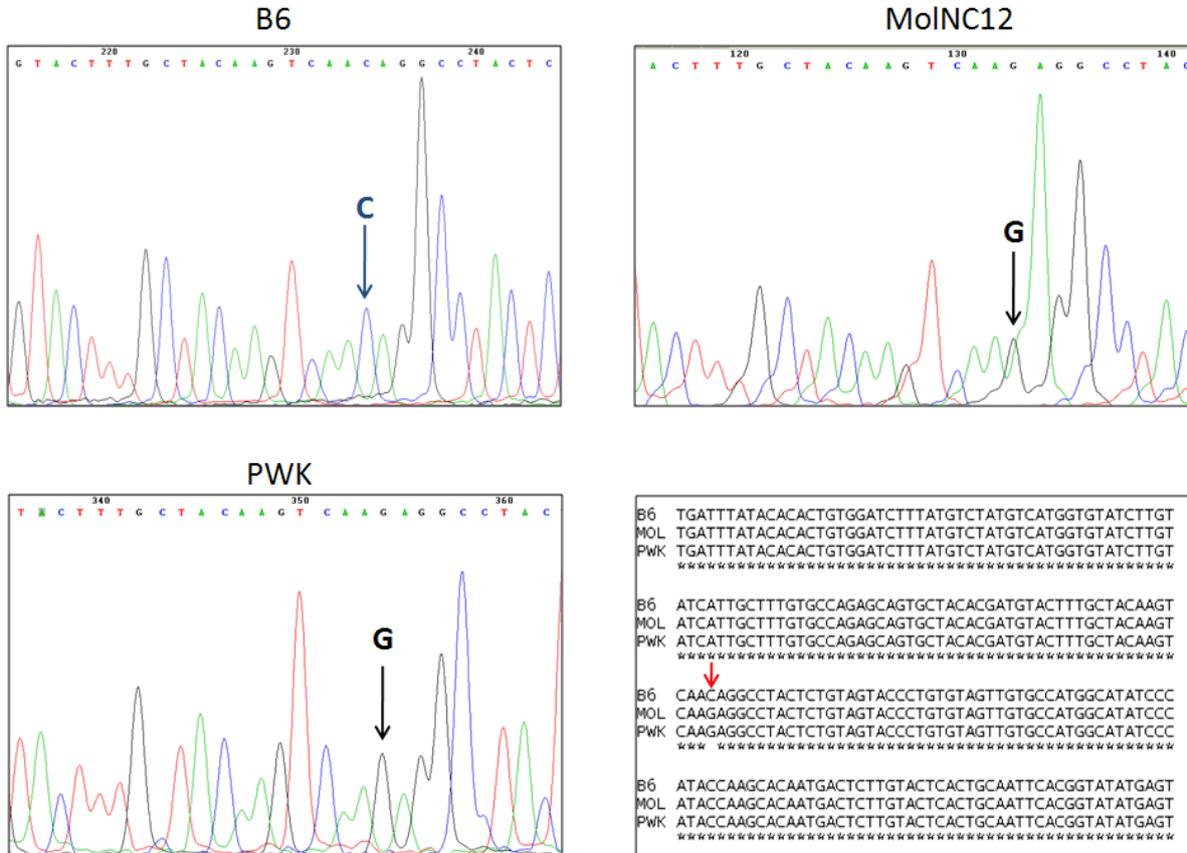


Abbildung 6.14: Identifizierung eines C/G-SNPs im Bereich stromabwärts des IG-DMR TR2. Chromatogrammausschnitte von gDNA-Sequenzierungen des Bereiches stromabwärts des IG-DMR TR2 in B6, MoINC12 bzw. PWK-Mäusen. An Position 80963 nt im BAC-Klon AJ 320506 konnte ein SNP (Pfeil) identifiziert werden. Hier befindet sich in B6-Mäusen ein Cytosin während der MoINC12 und PWK-Stamm ein Guanin aufweist.

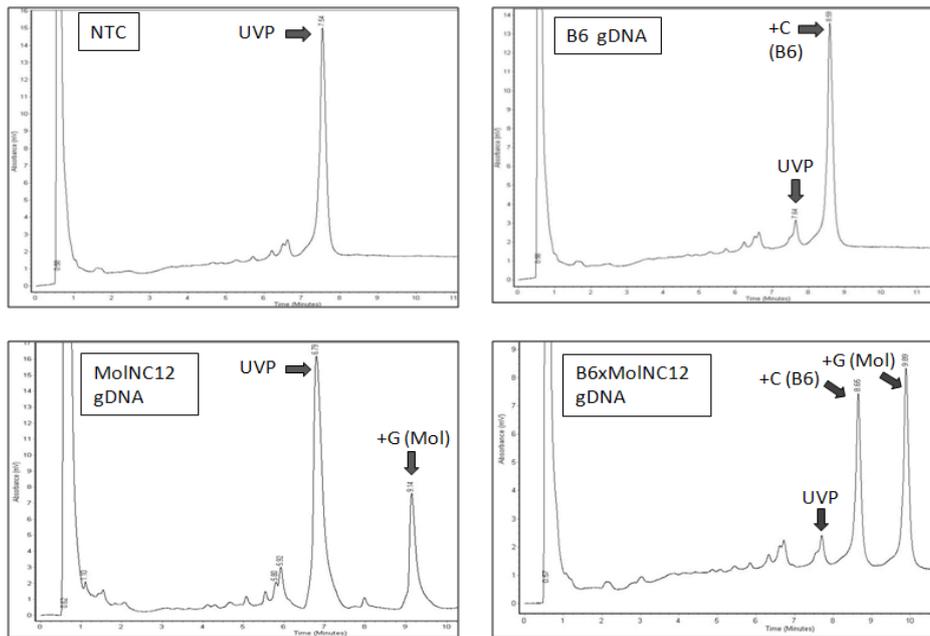


Abbildung 6.15: Etablierung der SNuPE-Assays auf genomischer DNA. Der C/G-Polymorphismus stromabwärts des IG-DMR TR2 zwischen den Mausstämmen B6 und MoINC12 lässt sich per SNuPE-Assay analysieren. Die beiden möglichen Primerextensions-Produkte könne über eine HPLC aufgetrennt werden (UVP: Unverlängerter Primer; NTC: Wasserkontrolle)

6.6 Dual-Luciferase-Reporter-Assays (DLAs)

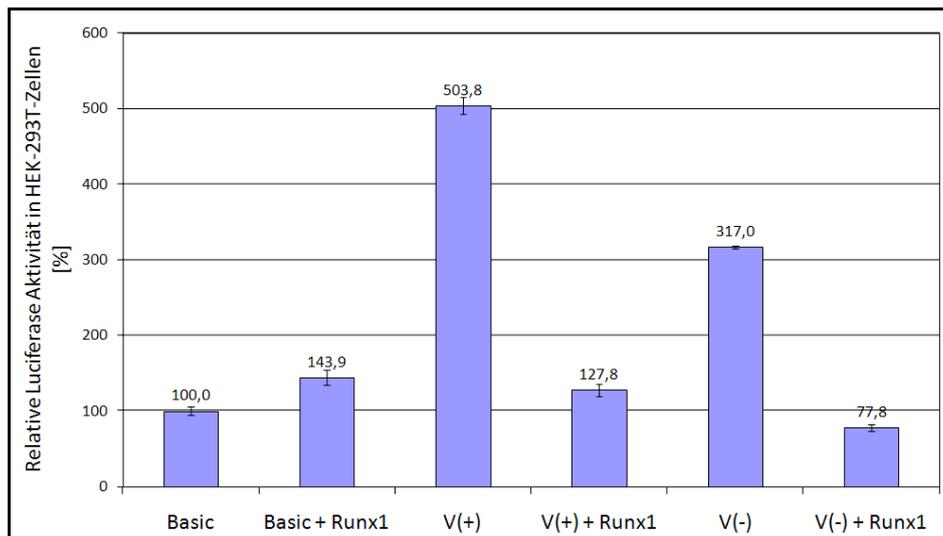


Abbildung 6.16: Runx1-Kotransfektion hat negativen Einfluss auf die Aktivität v. DNA-Fragment V der humanen IG-DMR in HEK-293T-Zellen. Die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten wurden gegen das pGL3-Basic Plasmid ohne Runx1-Kotransfektion (=100%) normalisiert. Allerdings liegen erst Daten aus einem Experiment (mit Triplikaten) vor. Aus diesem Grund wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

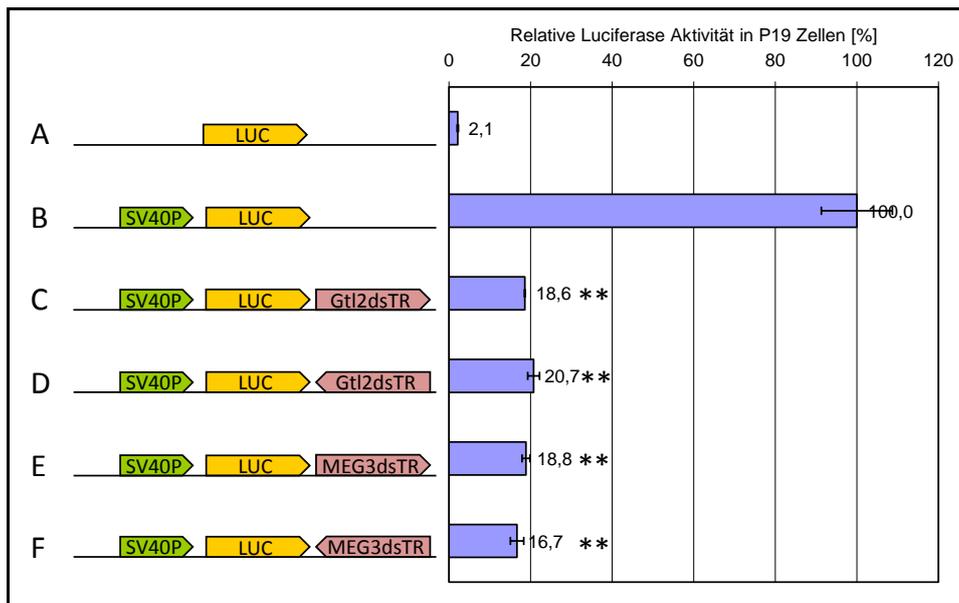


Abbildung 6.17: Der Gtl2dsTR zeigt Silencer Aktivität auf den SV40-Promotor in P19 Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (SV40P: SV40-Promotor; Gtl2dsTR: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; MEG3dsTR: *MEG3* downstream Tandem Repeat; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Konstrukt normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in zwei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert.

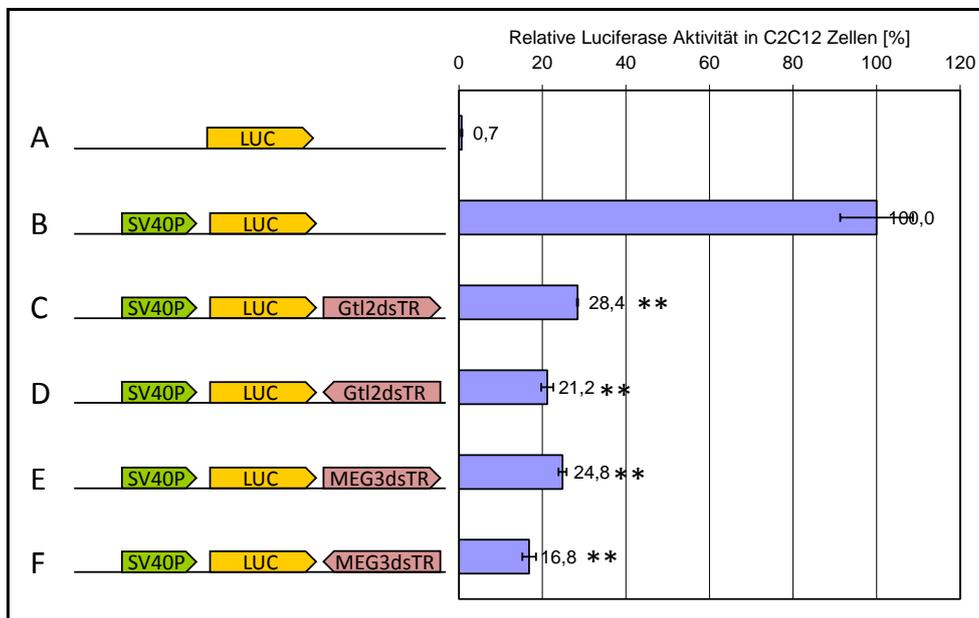


Abbildung 6.18: Der Gtl2dsTR zeigt Silencer Aktivität auf den SV40-Promotor in C2C12 Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (SV40P: SV40-Promotor; Gtl2dsTR: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; MEG3dsTR: *MEG3* downstream Tandem Repeat). Rechts sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Konstrukt normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in zwei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert.

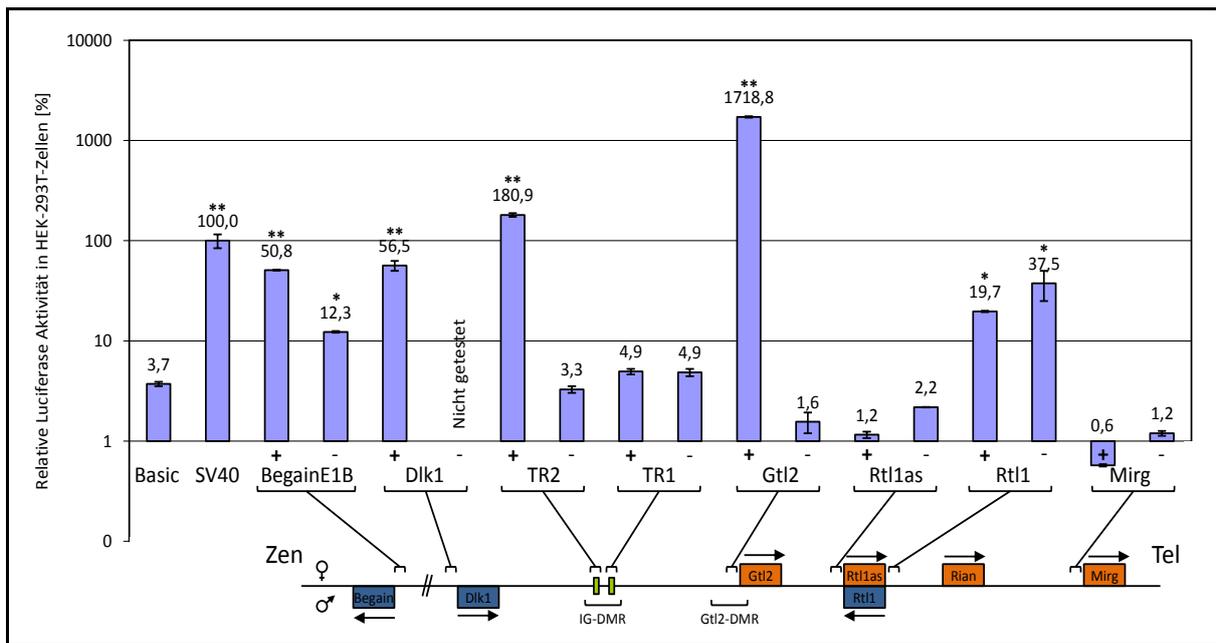


Abbildung 6.19: Promotor-Potenzial in der *Dlk1/Gtl2* Imprinting-Region. Promotor-Bereiche der Gene der *Dlk1/Gtl2* Region wurden in Sense (+) bzw. Antisense-Orientierung (-) in Reporter-Plasmide eingebracht und in HEK-293T-Zellen transfiziert. Gezeigt sind die relativen Luciferase-Aktivitäten, normalisiert gegen das SV40-Promotor-Konstrukt (=100%). Alle Proben wurden in zwei Experimenten als Triplikate. Aufgrund der hohen Werte für den *Gtl2*-Promotor wurde eine logarithmische γ -Achsenkalierung gewählt. Für *Rian* konnte kein PCR-Produkt generiert werden. Analyse auf signifikanten Unterschied zur Kontrolle (pGL3-Basic) mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

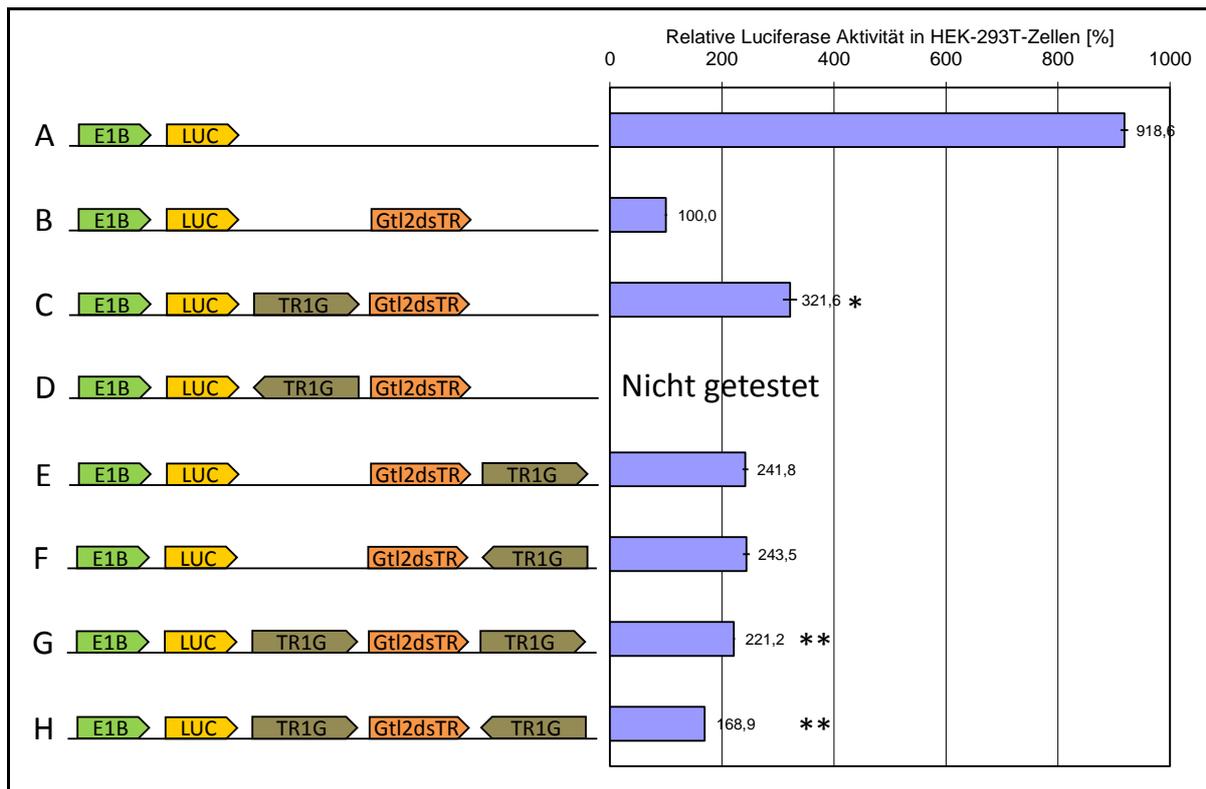


Abbildung 6.20: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem *Begain E1B*-Promotor in HEK-293T-Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; *Gtl2dsTR*: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; E1B: *Begain E1B* Promotor; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das *Begain E1B*-Promotor-Konstrukt mit dem Gtl2dsTR-Silencer normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der Kontrolle (E1B+Gtl2dsTR) zu den Proben mit TR1G-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

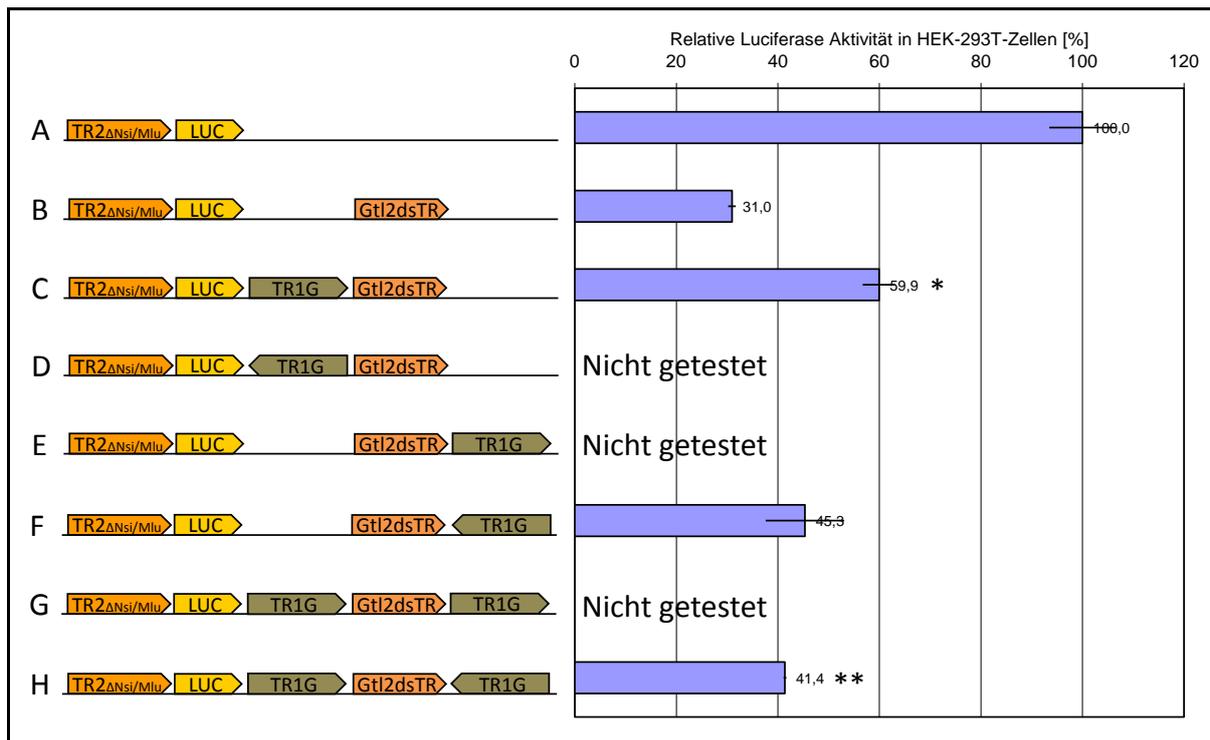


Abbildung 6.21: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem TR2 Promotor-Element in HEK-293T-Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; *Gtl2dsTR*: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; TR2 Δ Nsi/Mlu: IG-DMR Tandem Repeat 2 Δ Nsi/Mlu-Deletions-Konstrukt; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das TR2 Δ Nsi/Mlu-Promotor-Konstrukt normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der Kontrolle (TR2 Δ Nsi/Mlu+Gtl2dsTR) zu den Proben mit TR1G-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

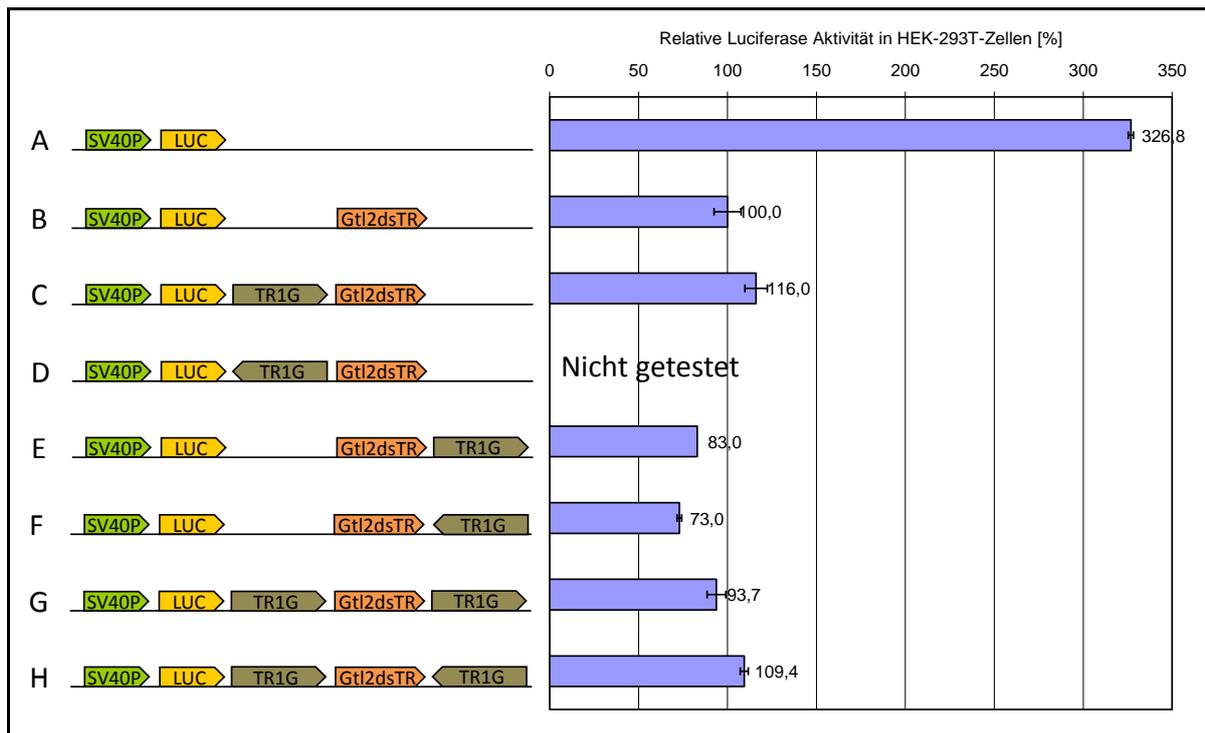


Abbildung 6.22: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem SV40-Promotor in HEK-293T-Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; *Gtl2dsTR*: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; SV40P: SV40-Promotor; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das SV40-Promotor-Plasmid mit dem *Gtl2ds*-Silencer normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert.

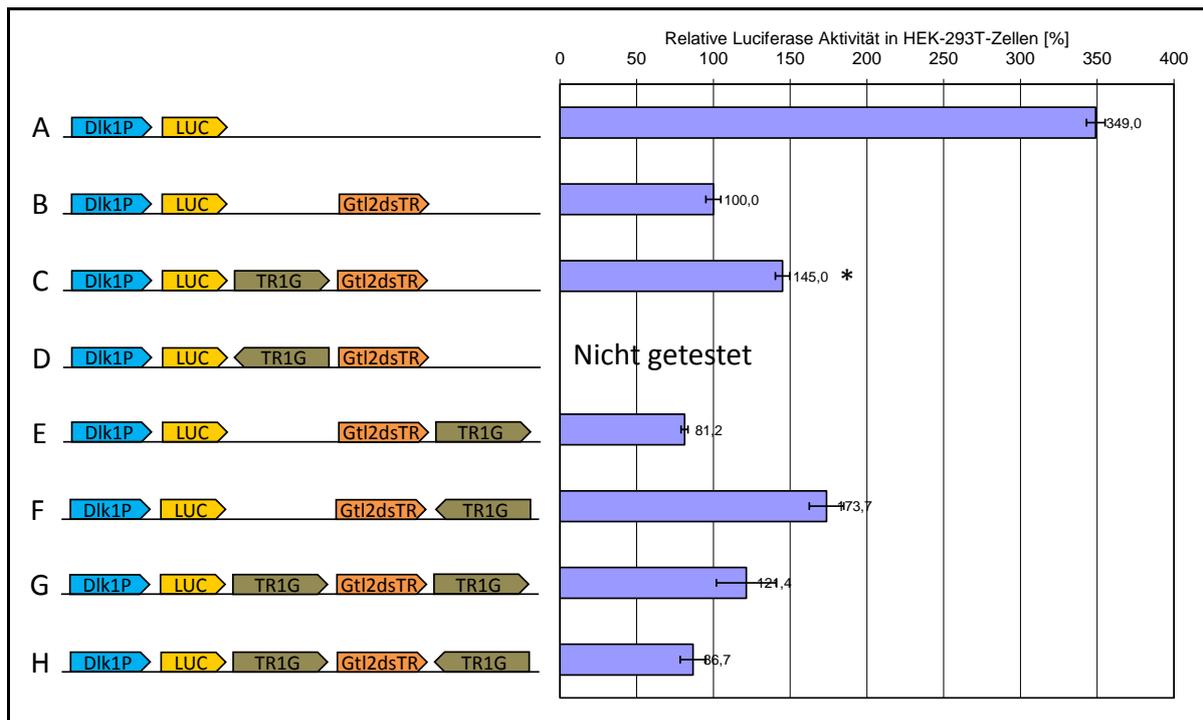


Abbildung 6.23: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem *Dlk1*-Promotor in HEK-293T-Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (TR1G: Maus IG-DMR Tandem Repeat 1G; *Gtl2dsTR*: *Gtl2* downstream Tandem Repeat; *Dlk1P*: *Dlk1*-Promotor; LUC: Luciferase Reporter-Gen). Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das *Dlk1*-Promotor-Konstrukt mit dem *Gtl2dsTR*-Silencer normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate transfiziert. Analyse auf signifikanten Unterschied der Kontrolle (Dlk1P+Gtl2dsTR) zu den Proben mit TR1G-Insertion mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*).

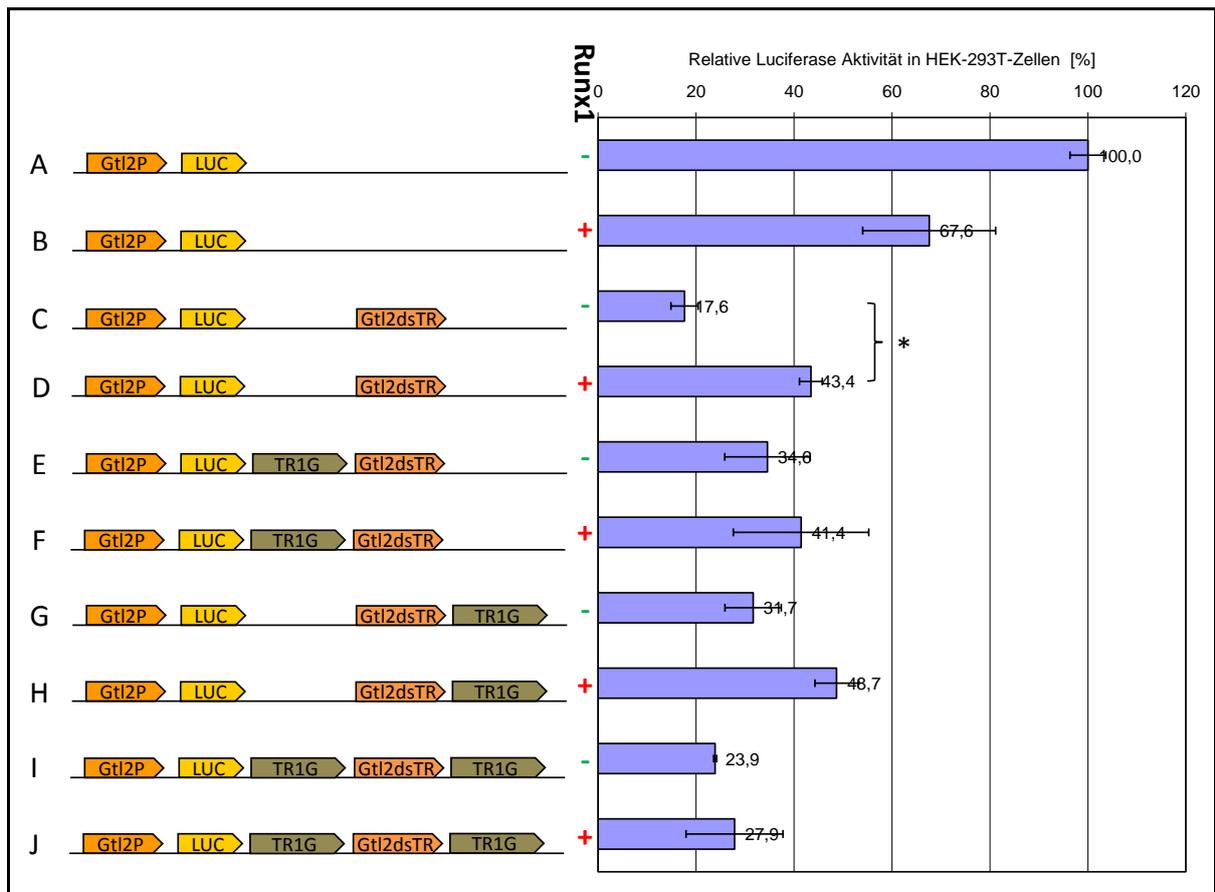


Abbildung 6.24: Kein Einfluss von Runx1-Kotransfektion auf das Maus TR1G-Element in HEK-293T Zellen. Im linken Bereich sind die transfizierten Reporter-Konstrukte schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der eingefügten DNA-Fragmente dar. (Gtl2P: *Gtl2*-Promotor). Die mit *Runx1* bezeichnete Spalte zeigt, ob das *Runx1*-exprimierende Plasmid (+) oder ein Kontroll-Plasmid (-) kotransfiziert wurde. Im rechten Bereich sind die gemessenen relativen Luciferase-Aktivitäten gezeigt, dabei wurde gegen das Promotor-Konstrukt ohne Repeat-Insertion und ohne *Runx1*-Kotransfektion normalisiert (=100%). Alle Proben wurden in drei unabhängigen Experimenten als Triplikate getestet. Analyse auf signifikanten Unterschied zwischen den durch Klammern verbundenen Datensets mit Hilfe eines ungepaarten t-Test ergaben eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*).

6.7 Northern Blot Hybridisierung

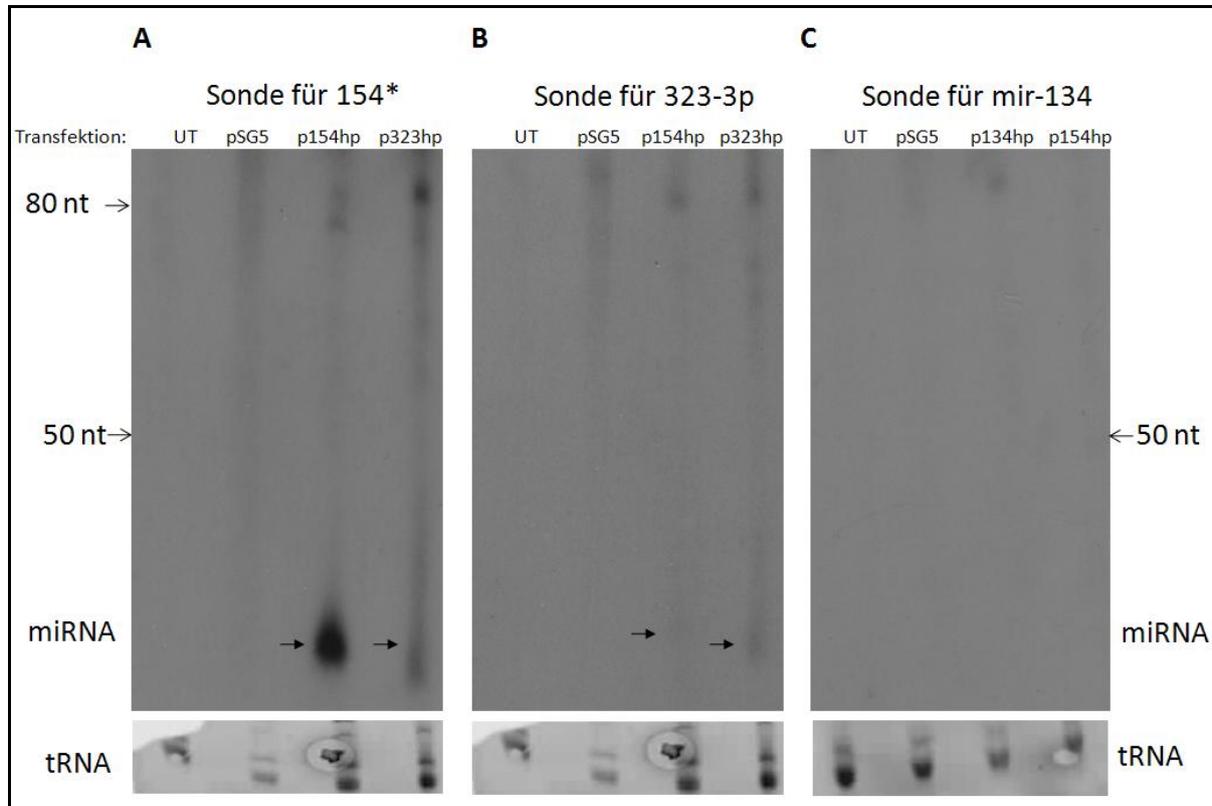


Abbildung 6.25: Northern Blot Hybridisierung zur Detektion von miRNAs in HEK-293T-Zellen. HEK-293T-Zellen wurden mit miRNA-Expressions-Plasmiden bzw. Kontroll-Plasmid transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde von den Transfektionen sowie von untransfizierten HEK-Zellen Gesamt-RNA präpariert und je 40µg in einem 15%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Daraufhin wurde die RNA per Semi-Dry Blotting auf eine Membran übertragen und dort durch chemisches cross-linking fixiert. Zur Hybridisierung dienten radioaktiv markierte Sonden für die mir-154* (**A**), mir-323-3p (**B**) bzw. mir-134 (**C**). Röntgenfilme lagen 72 Stunden bei -80° C den Blots auf. Als Ladekontrolle diente die im Acrylamidgel mit Ethidiumbromid angefärbte tRNA (UT: Untransfiziert; pSG5: Transfektion mit pSG5; p134hp: Transfektion mit mir-134hp-Expressions-Plasmid; p154hp: Transfektion mit mir-154-Expressions-Plasmid; p323hp: Transfektion mir 323-Expressions-Plasmid)

6.8 Gelelektrophoretische DNA-Auftrennung

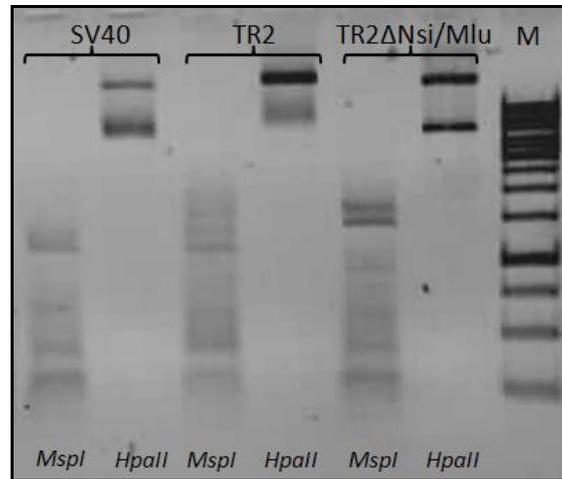


Abbildung 6.26: Überprüfung der mit *SssI* *in vitro* methylierten Reporterplasmide durch *MspI* bzw. *HpaII*-Restriktion. *In vitro* Methylierung von Reporter-Plasmiden erfolgte durch Inkubation mit *SssI*. Zur Kontrolle wurden die methylierten Vektoren (pGL3-Promotor, TR2 Reporter-Plasmid, TR2ΔNsi/Mlu-Reporter-Plasmid) wahlweise mit *MspI* bzw. *HpaII* inkubiert. Beide Enzyme schneiden die Ziel-Sequenz „CCGG“, mit dem Unterschied, dass nur *MspI* methylierte DNA schneidet. (M: 1kb-DNA-Leiter)

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Amp	Ampicillin
as	antisense
bp	Basenpaare
C	Celsius
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpc	days post coitum
dsRNA	doublestranded RNA (doppelsträngige Ribonukleinsäure)
ds	downstream (stromabwärts)
e	embryonic day (Embryonalstadium)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	Enhancer-Element
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
for	forward
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	hour (Stunde)
hp	hairpin (Haarnadel[-Struktur])
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
IE	Insulator-Element
kb	Kilobase
l	Liter
LB	lysogeny broth
M	Molar
m	Milli
μ	mikro
MCS	multiple cloning site
min	Minute
miRNA	microRNA (micro Ribonukleinsäure)
miRNP	miRNA ribonucleoprotein Komplex
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
n	nano
nm	Nanometer
nt	Nukleotide

OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
ori	origin of replication (Replikationsursprung)
P	Promotor
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Promotor-Element
pH	potentia Hydrogenii
pre-miRNA	precursor micro Ribonucleic acid (Vorläufer-micro Ribonukleinsäure)
pri-miRNA	primary micro Ribonucleic acid (primäre micro Ribonukleinsäure)
ptgt	perfect Target (perfekte "Ziel"-Sequenz)
rev	reverse
RISC	Ribonucleic acid Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SE	Silencer-Element
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssRNA	singlestranded Ribonucleic acid (einzelsträngige Ribonukleinsäure)
sec	Sekunde
sRNAs	small Ribonucleic acids (kleine Ribonukleinsäuren)
siRNA	small interfering Ribonucleic acid
snoRNA	small nucleolar Ribonucleic acid
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelbasen-Polymorphismus)
SNuPE	Single Nucleotide Primer Extension
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TR	Tandem Repeat
U	Units
us	upstream (stromaufwärts)
3'UTR	3'untranslatierte Region
5'UTR	5'untranslatierte Region
W	Watt
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
v	Volumen
V	Volt
Y	Pyrimidin

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Alle bislang identifizierten imprinteten Gene der Maus.	- 3 -
Abbildung 1.2: Schematische Anordnung der Histone zweier Nukleosome.....	- 6 -
Abbildung 1.3: BWS Region auf Chromosom 11p15.5 des Menschen.....	- 8 -
Abbildung 1.4: Differentiell methylierte Regionen der <i>Igf2/H19</i> Region.....	- 10 -
Abbildung 1.5: Normale und UPD12-Mäuse zum Zeitpunkt 15.5 dpc und 18.5 dpc.	- 15 -
Abbildung 1.6: Normale und +/ <i>Gtl2LacZ</i> -Maus zum Zeitpkt. d. Abstillens (A); Callipyge u. normale Schafe (B). .	- 16 -
Abbildung 1.7: <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region in Maus und Mensch	- 17 -
Abbildung 1.8: DMRs und andere regulatorische Elemente in der <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region der Maus	- 22 -
Abbildung 1.9: Etablierte IG-DMR-KO und <i>Gtl2</i> -DMR-KO-Modelle	- 24 -
Abbildung 1.10: Wichtige Schritte der miRNA-Prozessierung	- 28 -
Abbildung 2.1: Vektorkarte von pSG5.....	- 39 -
Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau der RNAi-Konstrukte	- 40 -
Abbildung 2.3: Vektorkarten der benutzen pGL3-Plasmide	- 42 -
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung repetitiver Elemente im Bereich der IG-DMR	- 69 -
Abbildung 3.2: Abgleiche der IG-DMR TR-Konsensus-Sequenzen	- 70 -
Abbildung 3.3: Strategien zur Analyse von <i>cis</i> -Effekten durch Reporter-Assays	- 73 -
Abbildung 3.4: Der IG-DMR TR2 zeigt Promotor-Aktivität in allen getesteten Zelllinien.....	- 74 -
Abbildung 3.5: TR2-Deletions-Strategie und Test der Deletions-Konstrukte im Reporter-Assay	- 75 -
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des IG-DMR TR2 und seiner Eigenschaften	- 76 -
Abbildung 3.7: Test der humanen IG-DMR auf Promotor-Aktivität.....	- 77 -
Abbildung 3.8: RT-PCRs in der intergenischen Region zwischen IG-DMR und <i>Gtl2</i>	- 79 -
Abbildung 3.9: RT-PCRs mit 2-Zell Embryos	- 80 -
Abbildung 3.10: Strangspezifische RT-PCRs mit P19-Gesamt-RNA	- 81 -
Abbildung 3.11: SNUPE-Analyse mit RT-PCR-Produkten stromabwärts des IG-DMR TR2	- 82 -
Abbildung 3.12: Auswertung aller SNUPE-Assays	- 83 -
Abbildung 3.13: CpG-Methylierung inhibiert die Promotor-Aktivität der TR2 Reporter-Plasmide	- 84 -
Abbildung 3.14: Kotransfektion von <i>Runx1</i> hat negativen Einfluss auf die IG-DMR TR2 Promotor-Aktivität ..	- 87 -
Abbildung 3.15: Einfluss des MAR4-Elementes auf die Promotor-Aktivität in HEK-293T Zellen	- 89 -
Abbildung 3.16: Der IG-DMR TR2 zeigt Enhancer-Aktivität	- 91 -
Abbildung 3.17: Kotransfektion von <i>Runx1</i> inhibiert die Enhancer-Funktion des IG-DMR Tandem Repeat 2 .	- 92 -
Abbildung 3.18: Sequenzabgleich der Konsensus-Sequenzen des <i>Gtl2/MEG3ds</i> Tandem Repeats.....	- 94 -
Abbildung 3.19: Der Tandem Repeat stromabwärts von <i>Gtl2/MEG3</i> zeigt starke Silencer Aktivität	- 95 -
Abbildung 3.20: Der <i>Gtl2dsTR</i> zeigt starke Silencer Aktivität auf die Promotoren der <i>Dlk1/Gtl2</i> Region	- 96 -
Abbildung 3.21: Der IG-DMR TR1/TR1G zeigt weder Promotor-, noch Enhancer- oder Silencer-Potenzial	- 97 -

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.22: Der konservierte IG-DMR TR1 zeigt Insulator-Potential HEK-293T Zellen.....	- 98 -
Abbildung 3.23: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G gegenüber dem Gtl2dsTR-Silencer.....	- 100 -
Abbildung 3.24: Abgleich der Maus bzw. Ratte Konsensus-Sequenzen des Gtl2usTR	- 101 -
Abbildung 3.25: Der Gtl2usTR zeigt kein signifikantes <i>cis</i> -regulatorisches Potential in HEK-293T Zellen	- 102 -
Abbildung 3.26: Schematische Darstellung des DLAs zur Detektion von miRNA-induzierten RNAi-Effekten	- 103 -
Abbildung 3.27: Haarnadel-Strukturen der mir-134, -154, -323, -409 bzw. -411-Vorläufer (Precursor).....	- 104 -
Abbildung 3.28: Dual Luciferase-Assay zur Detektion von RNAi-Effekten in HEK-293T-Zellen.....	- 109 -
Abbildung 3.29: Luciferase-Assay zur Detektion von RNAi-Effekten auf natürliche miRNA-Bindestellen.....	- 110 -
Abbildung 3.30: <i>In silico</i> Analyse der mir-154/mir-323-Bindestelle in der 3'UTR des murinen <i>P2rx7</i> -Gens ..	- 111 -
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der getesteten Elemente mit <i>cis</i> -regulatorischem Potenzial	- 114 -
Abbildung 4.2: RNA-Polymerase II bindet den IG-DMR TR2	- 115 -
Abbildung 4.3: ChIP-Seq-Daten zur Histon-Methylierung in der <i>Dlk1/Gtl2</i> Region in ESC	- 116 -
Abbildung 4.4: Insertion der Gtl2-CTCF-Bindestellen führt zur Inhibition des Gtl2dsTR induzierten Silencer-Effektes	- 122 -
Abbildung 4.5: Regulationsmodell A der IG-DMR vermittelten allelspezifischen Genexpression	- 127 -
Abbildung 4.6: Regulationsmodell B der IG-DMR vermittelten allelspezifischen Genexpression	- 130 -
Abbildung 6.1: <i>In silico</i> Analyse des IG-DMR TR2 in Maus und Ratte	- 161 -
Abbildung 6.2: Sequenzabgleich des IG-DMR Tandem Repeat 1 in verschiedenen Säugetier-Spezies	- 162 -
Abbildung 6.3: Sequenzabgleich der einzelnen Kopien des Gtl2dsTRs der Maus.....	- 164 -
Abbildung 6.4: Sequenzabgleich der einzelnen Kopien MEG3dsTRs des Menschen	- 164 -
Abbildung 6.5: Sequenzabgleich der einzelnen Kopien des Gtl2dsTRs des Elefanten	- 164 -
Abbildung 6.6: Die IG-DMR TR1-Konsensus-Sequenzen tragen eine putative Bindestelle für Runx-Proteine-	- 165 -
Abbildung 6.7: Sequenzabgleich der einzelnen Kopien des Repeats stromaufwärts von <i>Gtl2</i> (Gtl2usTR).....	- 165 -
Abbildung 6.8: Culst1W Sequenzabgleich der mir-154 bzw. mir-323-Precursor-Sequenzen	- 166 -
Abbildung 6.9: <i>In silico</i> Alignments aller getesteten miRNAs mit den putativen Bindestellen.....	- 168 -
Abbildung 6.10: Schematische Darstellung der benutzten pGL3-Kontroll-Plasmide.....	- 171 -
Abbildung 6.11: RT-PCRs mit verschiedenen Geweben einer neugeborenen Maus	- 172 -
Abbildung 6.12: RT-PCRs mit embryonalen Mausgeweben (e12.5 bzw. e16.5 dpc)	- 173 -
Abbildung 6.13: Runx1, Runx2 und Runx3-RT-PCRs mit verschiedenen Zelllinien	- 174 -
Abbildung 6.14: Identifizierung eines C/G-SNPs im Bereich stromabwärts des IG-DMR TR2	- 175 -
Abbildung 6.15: Etablierung der SNUPE-Assays auf genomischer DNA	- 176 -
Abbildung 6.16: Runx1-Kotransfektion hat negativen Einfluss auf die Aktivität von DNA-Fragment V	- 176 -
Abbildung 6.17: Der Gtl2dsTR zeigt Silencer Aktivität auf den SV40-Promotor in P19 Zellen.....	- 177 -
Abbildung 6.18: Der Gtl2dsTR zeigt Silencer Aktivität auf den SV40-Promotor in C2C12 Zellen.....	- 177 -
Abbildung 6.19: Promotor-Potenzial in der <i>Dlk1/Gtl2</i> Imprinting-Region.....	- 178 -
Abbildung 6.20: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem <i>Begain</i> E1B-Promotor in HEK-293T-Zellen	- 179 -

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 6.21: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem TR2 Promotor-Element	- 180 -
Abbildung 6.22: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem SV40-Promotor	- 181 -
Abbildung 6.23: Reduziertes Insulator-Potenzial des Maus TR1G auf den Gtl2dsTR-Silencer in Verbindung mit dem <i>Dlk1</i> -Promotor	- 182 -
Abbildung 6.24: Kein Einfluss von Runx1-Kotransfektion auf das Maus TR1G-Element in HEK-293T Zellen..	- 183 -
Abbildung 6.25: Northern Blot Hybridisierung zur Detektion von miRNAs in HEK-293T-Zellen	- 184 -
Abbildung 6.26: Überprüfung der mit <i>SssI</i> <i>in vitro</i> methylierten Reporterplasmide durch <i>MspI</i> bzw. <i>HpaII</i> -Restriktion	- 185 -

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Die zur Selektion eingesetzten Stoffe und deren Konzentrationen.....	- 38 -
Tabelle 2.2: Auflistung der in Maus (A) bzw. Mensch (B) untersuchten DNA-Elemente	- 43 -
Tabelle 2.3: Auflistung aller in der vorliegenden Arbeit benutzten Oligonukleotide (Primerliste).....	- 44 -
Tabelle 2.4: Zur Kultivierung, Transfektion bzw. zum Einfrieren eukaryotischer Zelllinien verwendete Medien	- 48 -
Tabelle 2.5: Standard-Parameter der PCRs zur Amplifizierung von gDNA	- 54 -
Tabelle 2.6: Parameter der durchgeführten RT-PCRs zur Amplifizierung von cDNA	- 54 -
Tabelle 2.7: Zyklenzahl Y in den verschiedenen RT-PCRs	- 55 -
Tabelle 2.8: Parameter der durchgeführten Kolonie-PCRs	- 55 -
Tabelle 2.9: Parameter der SNUPE-Ansätze	- 55 -
Tabelle 2.10: SNUPE-Gradienten zur Auftrennung des C/G-Polymorphismus	- 56 -
Tabelle 2.11: Parameter der Sequenzier-Reaktion und der darauf folgenden Fällung.	- 57 -
Tabelle 2.12: Auflistung der durchgeführten Transfektionen und dabei benutzter Reaktionsvolumina...	- 62 -
Tabelle 3.1: Putative Runx1 Bindestellen innerhalb der murinen IG-DMR.....	- 86 -
Tabelle 3.2: Getestete miRNA-Target-Gene	- 107 -
Tabelle 6.1: Koordinaten aller im Bereich der IG-DMR identifizierten Tandem Repeats.	- 160 -
Tabelle 6.2: Putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Bereich der murinen IG-DMR.....	- 162 -
Tabelle 6.3: Putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Bereich der human IG-DMR.	- 163 -
Tabelle 6.4: Putative Runx1 Bindestellen im Bereich der human IG-DMR.....	- 163 -

10 Lebenslauf

Gilles Gasparoni
Diplom-Biologe

Heidenkopferdell 27
66123 Saarbrücken

0681 / 40 161 80
0176/512 259 78
gillesgasparoni@googlemail.com

Persönliche Daten

Geburtsdatum	19. August 1976
Geburtsort	Völklingen
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulen

1983 bis 1987	Grundschule Viktoria Püttlingen
1987 bis 1996	Staatliches Realgymnasium Völklingen
1996	Abitur

Studium

10/1997 bis 04/2005	Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes Abschluss des Diplom-Studienganges Biologie Prüfung und Anfertigung der Diplomarbeit Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Mikrobiologie, Virologie Thema der Diplomarbeit: „ <i>RNA-Interferenz-Effekte durch Transfektion des miRNA-154 Precursors in Säugetierzellen</i> “
---------------------	---

Beruflicher Werdegang

07/2001 bis 10/2003	Wissenschaftliche Hilfskraft (HiWi) am Institut für Neue Materialien (INM), Saarbrücken
06/2005 bis 03/2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik/Epigenetik der Universität des Saarlandes
06/2005 bis ca. 09/2009	Promotionsarbeit; Thema der Dissertation: „ <i>Funktionelle Analyse von cis- bzw. trans-regulierenden Elementen der Dlk1/Gtl2 Imprinting-Region</i> “
Seit 06/2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Psychiatrie/Neurobiologie AG Prof. Dr. Riemenschneider am Uniklinikum Homburg der Universität des Saarlandes

**Externe Weiterbildung
(Auswahl)**

27/10 bis 29/10/2005	“6th annual meeting of the DFG priority program 1109: Embryonic and somatic stem cells”, Max Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden
30/10/2005	“workshop of the DFG priority program 1129”, Max Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden
10/05/2006	“international conference: RNAi and disease“, Université de Liège, Belgien
28/09 bis 30/09/2006	“workshop of the DFG priority program 1129“, Überherrn
24/06 bis 26/06/2007	“DMMC international workshop epigenetics: from mechanisms to medicines“, University College Dublin, Ireland
30/09 bis 02/10/2007	“23. Ernst Klenk symposium in molecular medicine: non-coding RNA“, ZMMK Universität zu Köln
11/07 bis 12/07/2008	“ international conference on epigenetics of the DFG priority program SPP 1129“, Charité Campus, Berlin
24/06 bis 27/06/2009	Kompetenznetz Degenerative Demenzen (KNDD) “KNDD status Colloquium 2009 + Summer School 2009“, Hotel Freigeist, Northeim

Publikationsverzeichnis

Tierling, S., **G. Gasparoni**, N. Youngson, and M. Paulsen. “The *Begain* gene marks the centromeric boundary of the imprinted region on mouse chromosome 12” *Mammalian Genome*, 2009

Posterbeiträge

03/05/2006 - *Konferenz: CNRS, Jaques Monod-Konferenz: “Multiple functions of RNA in gene regulation”, Roscoff, Frankreich*
 07/05/2006 *Poster: „Characterization of miRNA encoding transcripts in the imprinted domain on mouse chromosome 12”*

24/06/2007 - *Konferenz: DMMC International Workshop Epigenetics: “From Mechanisms to medicines”, University College Dublin, Dublin*
 27/06/2007 *Poster: “Imprinting border effects: Identification of splice variant-specific allelic biases in *Begain* expression in mouse”*
Poster: “Target genes of maternally expressed miRNAs”

Vorträge

- 06/10/2008 Unit of animal genomics, GIGA-R and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège
*Titel: "cis-acting elements in the *Dlk1/Gtl2* imprinted-region on mouse chromosome 12"*
- 23/10/2008 Pharmazeutisches Kolloquium der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
*Titel: "cis-acting elements in the IG-DMR of the imprinted *Dlk1/Gtl2* region on mouse chromosome 12"*

Betreute Diplomarbeiten

Mehn, Julia: „Proteomanalyse zur Detektion microRNA-induzierter RNA-Interferenzeffekte und Generierung stabiler Zelllinien zur Überexpression von microRNAs in Säugierzellen“ (2007)

*Jans, Daniel: „Detektion und RNA-Interferenz-Effekte dreier microRNAs der *Dlk1/Gtl2*-Imprinting Region nach Transfektion in Säugierzellen“ (2008)*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, im September 2009

Gilles Gasparoni