Artifizielle humane Imprints

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Theresa Kühnel

aus Bernburg (Saale)
April 2020

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/72616
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20200825-075534-7

Alle Rechte vorbehalten.

I have not failed.

I've just found 10.000 ways that won't work.

(Thomas Edison)

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke
2. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis
3. Gutachter: ------

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Christian Johannes

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2020

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Kühnel, T., Heinz, H. S. B., Utz, N., Božić, T., Horsthemke, B. & Steenpass, L. (2020). A human somatic cell culture system for modelling gene silencing by transcriptional interference. *Heliyon*, *6*(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03261

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 5

Abkürzungsverzeichnis 12

Abbildungsverzeichnis 15

Tabellenverzeichnis 18

1 Einleitung 19

1.1 Genomisches Imprinting 19

1.1.1 Hintergrund - Die Entdeckung des Imprintings 19

1.1.2 Eltern-spezifische Effekte beim Menschen 21

1.1.3 Regulation elternspezifischer Expression durch DNA-Methylierung 23

1.2 Etablierung von DNA-Methylierung 25

1.2.1 DNA-Methyltransferasen und Histonmodifikationen 25

1.2.2 Rekrutierung von DNMTs durch Transkription und Histonmodifikationen 28

1.2.3 Durch Mutationen ausgelöstes transkriptionelles Durchlesen 29

1.2.4 Der Einfluss von transkriptionellem Durchlesen auf geimprintete Gene 30

1.3 Modellierung artifizieller humaner Imprints 31

1.3.1 Voraussetzungen für die Modellierung artifizieller humaner Imprints 31

1.3.2 Das Flp-In T-REx-System 32

1.3.3 Modifikation des Systems mit zwei Promotoren 34

1.4 Zielsetzung 35

2 Material und Methoden 37

2.1 Material 37

2.1.1 Technische Ausstattung 37

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 39

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien 42

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen 43

2.1.4.1 Puffer und Lösungen 43

2.1.4.2 Medien für die Kultivierung von Bakterien 45
2.1.4.3 Medien und Reagenzien für die Kultivierung von humanen Zellen .45
2.1.5 Organismen....49
2.1.5.1 Bakterienstämme 49
2.1.5.2 Zelllinien....49
2.1.6 Enzyme 50
2.1.6.1 Allgemeine Enzyme....50
2.1.6.2 Restriktionsendonukleasen 51
2.1.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (*Kits*)....51
2.1.8 DNA-/Protein-Größenstandards und Ladepuffer....52
2.1.8.1 DNA- und Protein-Größenstandard 52
2.1.8.2 Ladepuffer....52
2.1.9 Antikörper....53
2.1.9.1 Western Blot....53
2.1.9.2 Immunzytochemie 53
2.1.10 Plasmide 54
2.1.11 Oligonukleotide....56
2.1.12 Software....57
2.1.13 Statistik....57
2.2 Molekularbiologische Methoden....58
2.2.1 Polymerasekettenreaktion 58
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese....58
2.2.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..59
2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten....59
2.2.5 DNA-, RNA- und Protein-Extraktion aus Zellen....59
2.2.5.1 Isolation von genomischer DNA 59
2.2.5.2 RNA-Präparation aus Zellen....60
2.2.5.3 Extraktion von Proteinen 60

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 61
2.2.7 Molekulare Klonierung 61
2.2.7.1 Restriktionsendonukleaseverdauung 61
2.2.7.2 Dephosphorylierung von Vektoren 62
2.2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten 62
2.2.7.4 TOPO-Klonierung 64
2.2.7.5 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien 64
2.2.7.6 *Site-Directed Mutagenesis* von Plasmiden 65
2.2.7.7 Herstellung von Glycerolstocks 65
2.2.7.8 Präparation von Plasmid-DNA 65
2.2.8 Sequenzierung von DNA nach Sanger 66
2.2.9 RNA Analyse 67
2.2.9.1 RQ1-Verdau – Eliminierung von genomischer DNA 67
2.2.9.2 Reverse Transkription von RNA (cDNA Synthese) 67
2.2.9.3 Quantitative *Real-Time* PCR 68
2.2.10 Analyse von DNA-Methylierung 70
2.3 Zellbiologische Methoden 71
2.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien 71
2.3.2 Auftauen von kryokonservierten Zellen 72
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl 72
2.3.4 Generierung stabiler Zelllinien mit dem Flp-In T-REx-System 73
2.3.5 Selektion und Isolation transgener Zellkolonien 74
2.3.6 *lacZ*-Färbung zur Kontrolle transgener Zelllinien 74
2.3.7 Herstellung lentiviraler Partikel 75
2.3.8 Lentivirale Transduktion 76
2.3.9 Transiente Transfektion 77
2.3.10 Kryokonservierung von Zellen 77
2.3.11 Induktion von transienten und stabilen Zelllinien mittels Doxycyclin 77

2.3.12 Immunzytochemie 78
2.4 Proteinbiochemische Methoden 79
2.4.1 SDS-PAGE 79
2.4.2 Herstellung von Polyacrylamidgelen und Elektrophorese 79
2.4.3 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran 81
2.4.4 Antikörperdetektion 81
3 Ergebnisse 83
3.1 Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells 83
3.1.1 Generierung des pcDNA5_XL-Plasmids 83
3.1.2 Auswahl der zu untersuchenden Promotorregionen 84
3.1.3 Klonierung der Expressionsvektoren für das induzierbare Zellkulturmodell 87
3.1.4 Herstellung stabiler Flp-In T-REx-Zelllinien 89
3.2 Schwache Induktion von *ocHBB2* in Flp-In T-REx 293 91
3.3 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa 93
3.3.1 Kryptische *Splice Sites* in der *MSH2*-Promotorregion 94
3.3.2 Herstellung stabiler Zelllinien mit der $MSH2^{S}$_ex1_splice4-Promotorregion in Flp-In T-REx HeLa-Zellen 99
3.3.3 Reversibilitätsexperiment nach beendeter Doxycyclin-Induktion 100
3.4 Untersuchung der DNA-Methylierung 102
3.4.1 *DNMT3A*-Expressionsanalysen der Flp-In T-REx HeLa-Ausgangszelllinie 102
3.4.2 DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa-Zellen 104
3.5 Lentivirale Transduktion der Flp-In T-REx HeLa-Zellen 105
3.5.1 *DNMT3A*-Expressionsanalyse der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie 105
3.5.2 Herstellung stabiler Linien in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen 107
3.5.3 Analyse der DNA-Methylierung in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen 108

3.6 Transiente Überexpression von *DNMT3L* in Flp-In T-REx HeLa-DNMT3A2-Zellen....111
3.6.1 Analyse der DNMT3L-Expression....111
3.6.2 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3*....112
3.6.3 DNA-Methylierungsanalyse....113
3.7 Transiente Überexpression von *DNMT3A2* und *DNMT3L* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen....114
3.7.1 Analyse der DNMT3A- und DNMT3L-Expression....114
3.7.2 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3*....117
3.7.3 DNA-Methylierungsanalyse....118
3.8 Transiente Überexpression von *DNMT3A2, DNMT3L* und ZFP57 in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen....119
3.8.1 Analyse der DNMT3A-, DNMT3L- und ZFP57-Expression....119
3.8.2 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3*....121
3.8.3 DNA-Methylierungsanalyse....121
4 Diskussion....123
4.1 Verwendbarkeit eines artifiziellen Zellkultursystems zur Modellierung von transkriptionellem Durchlesen....123
4.1.1 Einfluss von Positionseffekten auf die Genexpression....123
4.1.2 Der Einfluss des *CMV*-Promotors auf die Stilllegung von Promotorregionen....125
4.1.3 Die Expressionsstärke des *ocHBB2*-Transkriptes hat keinen Einfluss auf die Repression des *exon1/3*-Transkriptes....127
4.1.4 Das artifizielle System entspricht nicht dem genomischen Kontext....128
4.2 Etablierung von DNA-Methylierung ist in somatischen Zellen möglich....129
4.2.1 Die Rolle von *DNMT3A* und *DNMT3L* in der DNA-Methylierung....129
4.2.2 Histonmodifikationen an den Testpromotoren konnten bisher nicht beurteilt werden....132
4.2.3 Auch nach Überexpression von ZFP57 konnte keine DNA-Methylierung beobachtet werden....133

4.3 Flp-In T-REx Hela-Zellen besitzen kein Differenzierungspotential 135
5 Ausblick 137
6 Zusammenfassung 138
7 Abstract 139
8 Literaturverzeichnis 140
9 Anhang 164
9.1 Oligonukleotide 164
9.2 DNA-Sequenzen der Testpromotoren 169
9.2.1 *MSH2* 169
9.2.2 *SNRPN* 170
9.2.3 *GNAS* 171
9.3 PCR-Ansätze und Thermal Cycler Programme 174
9.3.1 Reverse Transkription von RNA (cDNA Synthese) 174
9.3.2 Analyse von DNA-Methylierung 175
9.4 Plasmidkarten 177
9.5 Übersicht der Methylierungsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung 179
9.5.1 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa-Zellen 179
9.5.2 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen 180
9.5.3 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion 181
9.6 Übersicht der Methylierungsanalysen mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung 182
9.6.1 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen 182
9.6.2 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3L*-Transfektion 183

9.6.3 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion.....184

9.6.4 Tabellarische Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung.....185

9.7 Expressionsdaten des *Human Protein Atlas* 187

Danksagung.....188

Lebenslauf 191

Eidesstattliche Erklärung.....192

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-CdR	5-Aza-2‘-deoxycytidine
°C	Grad Celsius
µ	mikro
ADD	ATRX-DNMT3A-DNMT3L
ARE	AU-reiche, mRNA destabilisierende Elemente
AS	Angelman-Syndrom
AS-SRO	engl. *Angelman syndrome - shortest region of overlap*
bp	Basenpaar
BSA	Albumin aus Rinderserum, *engl.* Bovine Serum Albumin
CblC	Störung des Vitamin-B12 (Cobalamin) Stoffwechsels
cDNA	komplementäre DNA, engl. *complementary* DNA
CMV	engl. *Cytomegalovirus*
C_p	engl. *crossing point*
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5‘-3‘-Orientierung
CpG-Island	CG-reiche Region im Promotorbereich von Genen (>500 bp)
DMEM	engl. *Dulbecco’s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMR	differenziell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*)
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMT1	somatische Form der DNMT1
DNMT1O	oozytenspezifische Form der DNMT1
DNMT3A	*DNA methyltransferase 3 alpha*
DNMT3A2	*DNA methyltransferase 3 alpha Isoform 2*
DNMT3B	*DNA methyltransferase 3 alpha*
DNMT3L	*DNA methyltransferase 3 like*
Dox	Doxycyclin
DPBS	engl. *Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline*
E. coli	*Escherichia coli*
EtBr	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENCODE	engl. *Encyclopedia of DNA Elements*
EEF1A	Elongationsfaktor-1-Alpha

6-FAM	Reporter-Fluorophor, 6-carboxyfluorescein
FBS	fetales Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*)
FRT	FRT-Rekombinationsstelle (engl. *Flp-recombinase target)*
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s2)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GOI	engl. *gene of interest*
h	Stunde (engl. *hour*)
H3K4me1	Monomethylierung des Lysins an Position vier des Histons H3
H3K4me3	Trimethylierung des Lysins an Position vier des Histons H3
H3K9me3	Trimethylierung des Lysins an Position neun des Histons H3
H3K27ac	Acetylierung des Lysins an Position 27 des Histons H3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysins an Position 27 des Histons H3
H3K36me2	Dimethylierung des Lysins an Position 36 des Histons H3
H3K36me3	Trimethylierung des Lysins an Position 36 des Histons H3
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom, engl. *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer,* Lynch-Syndrom
IC	engl. *Imprinting Center*
ICR	*Imprinting*-Kontrollregion (engl.*Imprinting control region*)
Imprinting	Prägung (elternspezifische Genexpression)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase Gen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L-Glu	L-Glutamin
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA (engl. *long non-coding RNA*)
m	milli
M	mol/l
Mb	Megabasenpaar
MCS	engl*. Multiple cloning site*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute

ml	Milliliter
n	nano
n. a.	nicht auswertbar
NaOH	Natriumhydroxid/Natronlauge
ocHBB2	partielles Exon 2, Intron 2 und Exon 3 des *β-Globin*-Gens des Kaninchens
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PHP1b	Pseudohypoparathyroidismus Typ 1b
PWS	Prader-Willi Syndrom
PWS-SRO	engl. *Prader-Willi syndrome - shortest region of overlap*
PWWP	Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin Motiv
qRT-PCR	engl. *quantitative real-time PCR*
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease (engl. *ribonucleic acid*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. *rounds per minute*)
RT	reverse Transkription
s	Sekunde (engl. *second*)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	Einzelbasenaustausch (engl. *single nucleotide polymorphism*)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
$TetO_2$	Tet-Operator 2
T_m	*Primer*hybridisierungstemperatur (engl. *Annealing temperature*)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U	Unit
UCSC	University of California Santa Cruz, USA (http://genome.ucsc.edu) (engl. *UCSC Genome Browser*)
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid
ZFP57	KRAB-Zink-Finger-Protein-57-Homolog

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Murine Pronukleus-Transplantationsexperimente. 20
Abbildung 2: Schematischer Überblick über den Prader-Willi/Angelman-Syndrom Locus auf Chromosom 15. 23
Abbildung 3: Das Flp-In T-REx-System. 34
Abbildung 4: Modifikation des Flp-In T-REx-Expressionsplasmids. 35
Abbildung 5: Flp-In T-REx-Expressionszelllinie. 50
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Ligation. 63
Abbildung 7: Schematische Darstellung von *Site-Directed Mutagenesis Primern*. 65
Abbildung 8: *lacZ*-Färbung. 75
Abbildung 9: Aufbau *Semi-Dry* Blot unter Verwendung des *Semi-Dry System* Trans-Blot® SD (BioRad) 81
Abbildung 10: Das klonierte pcDNA5_XL-Plasmid. 84
Abbildung 11: Übersicht über die ausgewählten und modifizierten Promotorregionen. 87
Abbildung 12: Klonierte Expressionplasmide für die Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells. 89
Abbildung 13: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* im induzierbaren Zellkulturmodell. 91
Abbildung 14: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx 293. 92
Abbildung 15: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa. 94
Abbildung 16: Untersuchung der *MSH2*^{S}_ex1-Promotorregion auf das Vorhandensein kryptischer *Splice Sites*. 95
Abbildung 17: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa *MSH2*^{S}_ex1_splice3. 96
Abbildung 18: Zusammenfassung der detektierten krypitschen *Splice Sites* der unterschiedlich modifizierten *MSH2*-Promotorregionen. 97
Abbildung 19: Untersuchung der *MSH2*-Promotorregion auf das Vorhandensein kryptischer *Splice Sites* mit dem Programm *Alamut® Visual*. 98
Abbildung 20: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa. 99
Abbildung 21: Reversibilitätsexperimente für die Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa. 101
Abbildung 22: DNMT3A-Expression in Flp-In T-REx 293- und Flp-In T-REx HeLa-Zellen. 103
Abbildung 23: Analyse der DNA-Methylierung in Flp-In T-REx HeLa-Zellen. 105

Abbildung 24: DNMT3A-Expression in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen.....107
Abbildung 25: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2. 108
Abbildung 26: Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion.....109
Abbildung 27: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. 110
Abbildung 28: DNMT3L-Expressionsanalyse der mit *DNMT3L* transient transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. 112
Abbildung 29: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 nach transienter *DNMT3L*-Transfektion. 113
Abbildung 30: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3L*-Transfektion. 114
Abbildung 31: DNMT3A- und DNMT3L-Expressionsanalyse der transient mit *DNMT3A2* und *DNMT3L* co-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. 116
Abbildung 32: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 nach transienter *DNMT3A2 und DNMT3L* Co-Transfektion. 117
Abbildung 33: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion.....118
Abbildung 34: DNMT3A-, DNMT3L- und ZFP57-Expressionsanalyse der transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfizierten, Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. 120
Abbildung 35: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion...121
Abbildung 36: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion...122
Abbildung 37: *MSH2^S*_ex1-Testpromotorsequenz.....169
Abbildung 38: *MSH2^S*_ex1_splice3-Testpromotorsequenz.....169
Abbildung 39: *MSH2^S*_ex1_splice4-Testpromotorsequenz.....170
Abbildung 40: *SNRPN^S*_ex1_splice4-Testpromotorsequenz. 170
Abbildung 41: *GNAS^S*_ex1_1-Testpromotorsequenz. 171

Abbildung 42: *GNAS*^{S}_ex1_2-Testpromotorsequenz. 171
Abbildung 43: *GNAS*^{S}_ex1_comb-Testpromotorsequenz. 172
Abbildung 44: *GNAS*^{S}_ex1_long-Testpromotorsequenz. 172
Abbildung 45: *GNAS*^{S}_ex1_long_comb-Testpromotorsequenz. 173
Abbildung 46: Plasmidkarte von pcDNA5_XL. 177
Abbildung 47: Plasmidkarte von *MSH2*^{S}_ex1_splice4. 177
Abbildung 48: Plasmidkarte von *SNRPN*^{S}_ex1_splice4. 178
Abbildung 49: Plasmidkarte von pLJM1_DNMT3A2. 178
Abbildung 50: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa-Zellen. 179
Abbildung 51: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. 180
Abbildung 52: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion...181
Abbildung 53: Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion. 182
Abbildung 54: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3L*-Transfektion. 183
Abbildung 55: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion. 184

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel 80
Tabelle 2: Auswertung der *lacZ*-Färbung in den generierten Expressionszelllinien für die einzelnen Promotorregionen. 90
Tabelle 3: *Primer* für die Generierung der Promotorfragmente und des *Spacers.* ...164
Tabelle 4: *Primer* für die *Site-Directed Mutagenesis.* 165
Tabelle 5: *Primer* und Sonden für die qRT-PCR-Analyse. 166
Tabelle 6: Bisulfit-*Primer* für die Methylierungsanalysen der Promotorregionen mittels Sanger-und *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung. 167
Tabelle 7: *Index Primer* zur Generierung der Fragmente für die *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung. 168
Tabelle 8: Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregionen in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien ...185
Tabelle 9: Expressionsdaten des *Human Protein Atlas* für essenzielle Transkripte in der Etablierung der DNA-Methylierung. 187

1 Einleitung

1.1 Genomisches Imprinting

1.1.1 Hintergrund - Die Entdeckung des Imprintings

Genomisches Imprinting (genomische Prägung) ist als ein epigenetischer Mechanismus definiert, der elternspezifisch Gene oder Chromosomenabschnitte durch DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Methylierung markiert, (Horsthemke 2010; Ideraabdullah et al. 2008; Reik & Walter 2001b, 2001a). Der Begriff Imprinting wurde erstmals 1960 verwendet, um die Eliminierung des väterlichen X-Chromosoms in der Fliege *Sciara coprophila* zu beschreiben (Crouse 1960). Erstmals wurde der Begriff für Säugetiere in den 1980ern in Pronukleus-Transplantationsexperimenten bei Mäusen verwendet (Barton et al. 1984; Surani et al. 1984). Dabei wurde untersucht, ob das Vorhandensein des maternalen oder paternalen Chromosomensatzes für eine normale embryonale Entwicklung ausreichend ist (**Abbildung 1**A). Die Pronukleus-Transplantationsexperimente ermöglichten die Herstellung eines diploiden maternalen (gynogenetisch, **Abbildung 1**B) oder eines diploiden paternalen (androgenetisch, **Abbildung 1**C) Chromosomensatzes (uniparentale Chromosomensätze). Der gynogenetische Chromosomensatz führte hauptsächlich zur Entwicklung von embryonalem Gewebe, jedoch zeigte sich kaum entwickeltes extraembryonales Gewebe (Trophoblast). Ein androgenetischer Chromosomensatz führte zur Ausbildung von extraembryonalem Gewebe und stark unterentwickeltem embryonalem Gewebe (**Abbildung 1**B/C). In beiden Ansätzen konnte keine normale embryonale Entwicklung beobachtet werden (**Abbildung 1**A**)**. Die erzeugten Embryonen waren nicht lebensfähig und starben bereits innerhalb der normalen Tragezeit ab.

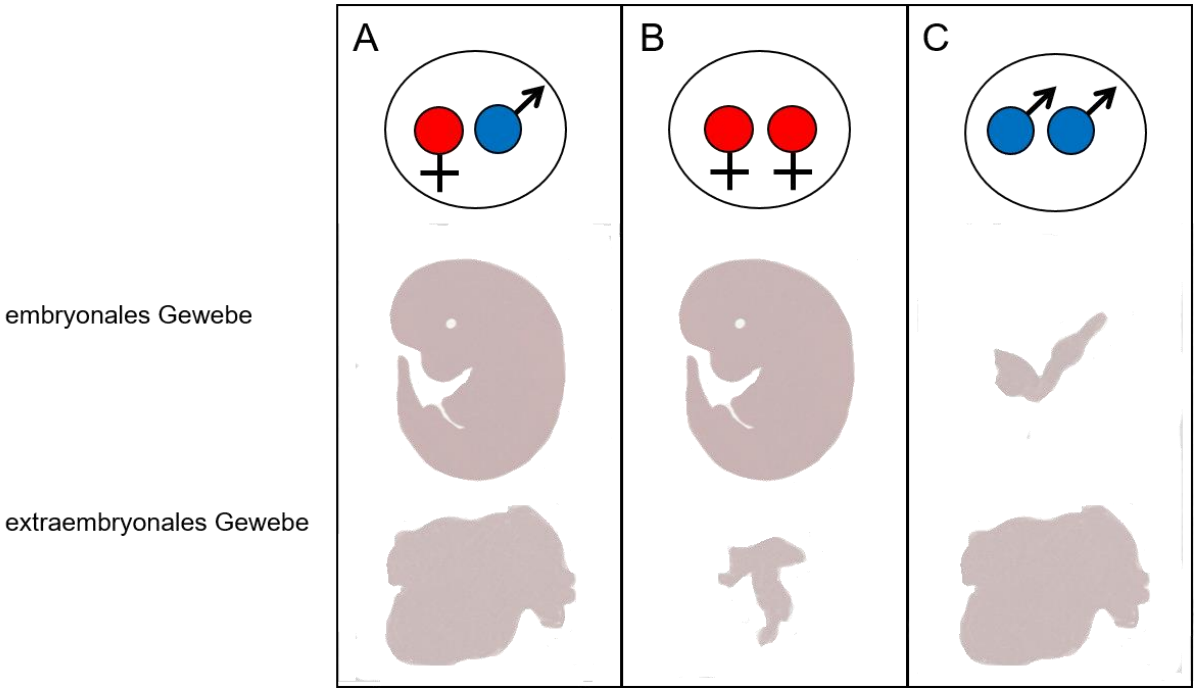


Abbildung 1: Murine Pronukleus-Transplantationsexperimente. Dargestellt ist die Entwicklung des embryonalen und extraembryonalen Gewebes in murinen Pronukleus-Transplantationsexperimenten in einem **A)** diploiden heterozygoten Chromosomensatz. **B)** diploiden gynogenetischen Chromosomensatz **C)** diploiden androgenetischen Chromosomensatz. Eigene Darstellung nach Barton et al. 1984 und Surani et al. 1984.

Kono et al. zeigten ebenfalls, dass es durch die genetische Manipulation der Dosis geimprinteter Gene zu einem fehlerhaften genomischen Imprinting kommt und somit die (murine) embryonale Entwicklung behindert wird (Kono et al. 2004). Die gezeigten Experimente verdeutlichten, dass für die normale embryonale Entwicklung eine normale Gen-Dosis maternal und paternal geimprinteter Gene notwendig ist (Cattanach & Kirk 1985; Kawahara et al. 2007; Kono et al. 2004). Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Menschen gemacht werden. Bei einem androgenetischen Chromosomensatz kommt es zur Bildung einer Blasenmole, einer Plazentafehlbildung. Diese besteht aus degeneriertem extraembryonalem Gewebe, zeigt aber keine Entwicklung des embryonalen Gewebes. Gynogenetische humane Embryonen entwickeln sich zu Ovarialteratomen und weisen Strukturen aller drei Keimblätter auf, jedoch werden keine extraembryonalen Gewebe ausgebildet (Fallahian et al. 2013; Hall 1990; Williams et al. 2010). Somit konnte gezeigt werden, dass die maternalen und paternalen Chromosomensätze funktionell nicht äquivalent sind. Die Nichtäquivalenz beruht darauf, dass geimprintete Gene nur vom paternalen bzw. nur vom maternalen Chromosom exprimiert werden (Barton et al. 1984; McGrath & Solter 1983, 1984; Surani et al. 1984; Surani & Barton 1983).

1.1.2 Eltern-spezifische Effekte beim Menschen

Das Vorhandensein des paternalen und maternalen Genoms ist für eine normale Embryonalentwicklung zwingend erforderlich. Fehlverteilungen von Chromosomen in der Meiose oder Mitose können dazu führen, dass ein Individuum bestimmte Chromosomen oder Chromosomenabschnitte des identischen parentalen Ursprungs besitzt (uniparentale Disomie). Eine uniparentale Disomie kann zu einer Imprintingerkrankung, sowie einer Veränderung des Phänotyps führen, da entweder Gene in doppelter Dosis oder, durch das fehlende parentale Chromosom, nicht exprimiert werden. Je nach betroffenem Chromosom bzw. Chromosomenabschnitt ist es aber auch möglich, dass eine uniparentale Disomie ohne Folgen bleibt (Engel 1980; Kotzot 2001, 2008). Durch komplexe Translokationsexperimente in Mäusen, bei denen diese Fehlverteilung nachempfunden wurde, war es möglich Chromosomenabschnitte zu identifizieren, die dem genomischen Imprinting unterliegen. Ebenso konnten einzelnen Chromosomen unterschiedliche elternspezifische Effekte (*parent-of-origin* Effekte) zugeordnet werden (Cattanach 1986; Cattanach & Kirk 1985; Ferguson-Smith 2011; Searle & Beechey 1978). Das Fehlen oder die Überexpression von geimprinteten Genen kann somit Entwicklungsstörungen verursachen (Ferguson-Smith 2011). Beim Menschen sind etwa 100 und bei der Maus circa 150 dem Imprinting unterliegende Gene bekannt (www.geneimprint.com; www.igc.otago.ac.nz; Bartolomei & Ferguson-Smith 2011; Dindot et al. 2009; Horsthemke 2014; Kanduri 2016; Luedi et al. 2005, 2007). Die Expression einiger geimprinteter Gene erfolgt nur in bestimmten Geweben oder zu bestimmten Zeitpunkten (Prickett & Oakey 2012). Bisher konnte genomisches Imprinting in Plazentatieren (Eutheria), Beuteltieren (Metatheria), Blütenpflanzen, Insekten, dem Zebrafisch und *Caenorhabditis elegans* beobachtet werden (Anaka et al. 2009; Bean et al. 2004; Feil & Berger 2007; Martin & McGowan 1995). Jedoch nicht in eierlegenden Kloakentieren (Monotremata, Renfree et al. 2009, 2013). Eine mögliche Erklärung für die Entstehung des genomischen Imprintings liefert die Geschlechtskonflikthypothese („*Kinship* Hypothese“, Moore & Haig 1991). Frauen können ihre Gene ausschließlich über eigene, multiple Schwangerschaften weitergeben, daher werden die vorhandenen Ressourcen auf mehrere Schwangerschaften verteilt. Männer können ihre Gene im Gegensatz dazu jedoch durch verschiedene Frauen weitergeben. Daher sollten möglichst viele Ressourcen der Frau für die Entwicklung des Fötus aufgebracht werden. Maternal exprimierte Gene begrenzen somit das Fötuswachstum, während paternal exprimierte Gene

dieses fördern (Haig 1997; Moore & Haig 1991; Trivers & Burt 1999; Wilkins & Haig 2003a, 2003b). Ein Beispiel, welches diese Hypothese unterstützt, findet sich im murinen paternal exprimierten Wachstumsfaktor *Igf2* (*Insulin-like growth factor 2*, DeChiara et al. 1991) und dem maternal exprimierten Wachstumsinhibitor *Igf2r (Insulin-like growth factor 2 receptor*, Barlow et al. 1991). Das murine *Igf2r,* gefolgt von *Igf2* und *H19*, wurde als erstes geimprintetes Gen beschrieben (Barlow et al. 1991; Chao & D'Amore 2008; DeChiara et al. 1991; Ferguson-Smith et al. 1991). In Monotremata sind die zur Verfügung stehenden mütterlichen Ressourcen von Beginn an limitiert. Aus diesem Grund wird vermutet, dass es in Säugetieren zu einer Co-Entwicklung zwischen dem genomischen Imprinting und der Plazentaentwicklung gekommen ist (Feil & Berger 2007; Horsthemke 2010; Renfree et al. 2009, 2013). Geimprintete Gene sind in Maus und Mensch nicht immer identisch. Ein Beispiel dafür ist das *RB1/Rb1 (RB transcriptional corepressor 1*-Gen), welches nur im Menschen dem Imprinting unterliegt (Kanber et al. 2009; Steenpass et al. 2013). Geimprintete Gene sind unregelmäßig über das Genom verteilt und zu 80 % in Clustern von mehreren Kilobasen (kb) bis Megabasen (Mb) Länge angeordnet. Die Gencluster können eine variierende Anzahl maternal und paternal exprimierter Gene enthalten (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011; Edwards & Ferguson-Smith 2007; Kanduri 2016; Reik & Maher 1997; Reik & Walter 2001b, 2001a; Smith et al. 2011). Im Menschen sind diese Cluster auf den Chromosomen 6, 7, 11, 14, 15 und 20 zu finden (Barlow & Bartolomei 2014; Horsthemke & Buiting 2008; Ideraabdullah et al. 2008). Die bereits erwähnten, elternspezifischen Effekte in der Genexpression können in allen geimprinteten Genen beobachtet werden. Ein Beispiel dafür stellt die mit dem *SNURF/SNRPN (SNRPN upstream reading frame/Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N)*-Gen assoziierte Region auf Chromosom 15 (15q11q13) dar (**Abbildung 2**A). Das *SNURF/SNRPN*-Gen ist auf dem paternalen Chromosom aktiv und auf dem maternalen Chromosom inaktiv. Folglich wird dieses Gen nur vom paternalen Allel exprimiert. Durch die paternal exprimierte lange, nicht-kodierende RNA (lncRNA) *SNHG14 (Small nucleolar RNA host gene 14)* wird, durch transkriptionelle Interferenz, die Expression des Angelman-Syndrom-Gens (*Ubiquitin Protein Ligase E3A*, *UBE3A*) in Neuronen auf dem entgegengesetzten Strang unterdrückt. Auf dem maternalen Chromosom ist *UBE3A* aktiv (**Abbildung 2**A, Meng et al. 2013; Numata et al. 2011). Diese festgelegte elternspezifische Expression kann durch die bereits erwähnten Fehlverteilungen von Chromosomen (uniparentale Disomien), Deletionen oder Imprintingdefekte gestört werden und zu

Imprintingerkrankungen führen. Im Chromosomenabschnitt 15q11q13 kann dabei das Angelman-Syndrom (maternales *UBE3A* nicht funktionsfähig) oder das Prader-Willi-Syndrom (paternale exprimierte Gene nicht funktionsfähig) auftreten (Buiting et al. 2003; Horsthemke 2014).

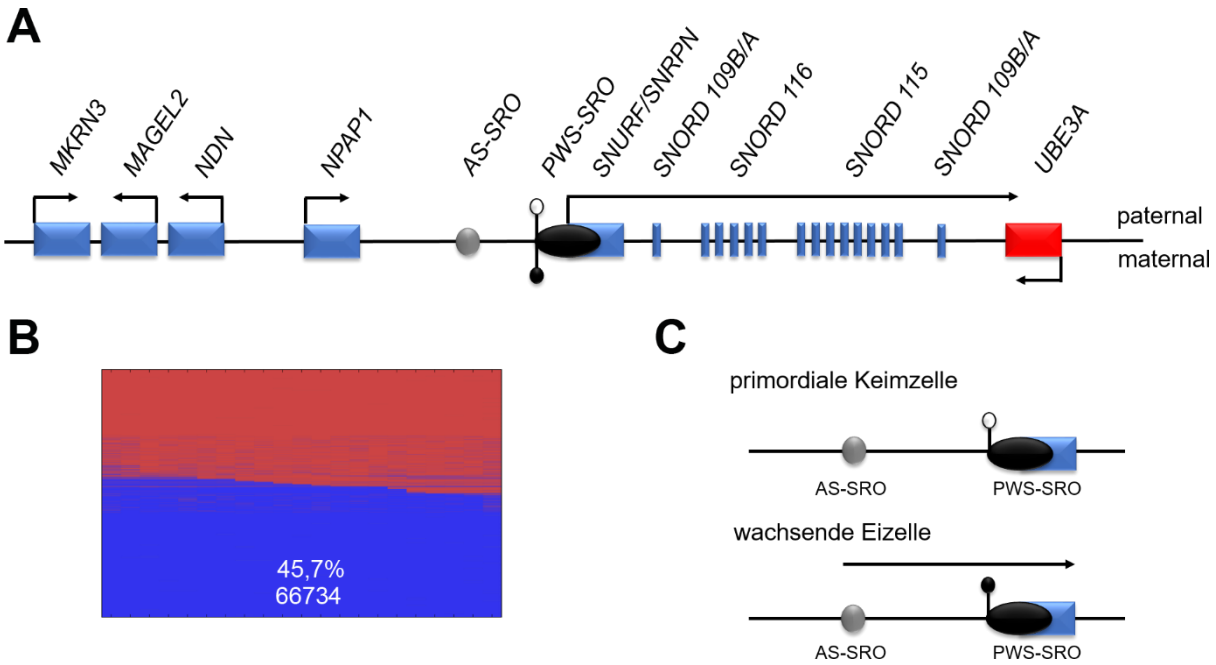


Abbildung 2: Schematischer Überblick über den Prader-Willi/Angelman-Syndrom Locus auf Chromosom 15. A) Dargestellt ist die maternale und paternale Genexpression des Prader-Willi/Angelman-Syndrom Locus in Neuronen. Die Expression der dargestellten Loci wird durch die Prader-Willi-Syndrom/Angelman-Syndrom *Imprinting Center*, bestehend aus AS-SRO (grauer Kreis) und PWS-SRO (schwarzes Oval), reguliert. Die DMR am PWS-SRO ist durch Kreise markiert (gefüllt: methyliert; ungefüllt: unmethyliert). Paternal exprimierte Gene sind durch blaue, maternal exprimierte Gene durch rote Boxen dargestellt. Abbildung modifiziert nach Lewis et al. 2014. **B)** Quantitative Methylierungsanalyse des PWS-SRO in Blut einer normalen Kontrollperson mittels *Next Generation Bisulfite Amplicon*-Sequenzierung. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Abbildung freundlicherweise von Dr. Jasmin Beygo zur Verfügung gestellt. **C)** Imprintetablierung am PWS-SRO durch transkriptionelles Durchlesen. In primordialen Keimzellen findet keine Transkription ausgehend vom AS-SRO statt (oben), der PWS-SRO ist umethyliert. Transkription wurde in wachsenden Oozyten am AS-SRO initiiert, der PWS-SRO wird methyliert (unten). Abbildung nicht maßstabsgetreu.

1.1.3 Regulation elternspezifischer Expression durch DNA-Methylierung

DNA-Methylierung hat einen epigenetischen Einfluss auf die X-Inaktivierung, Stilllegung von Genen, der Repression von Retrotransposons sowie auf die Kondensation des Chromatins geimprinteter Gene. Es wird allgemein angenommen, dass DNA-Methylierung mit Heterochromatin (transkriptionell inaktiv) im Genom assoziiert ist (Almouzni & Probst 2011; Brockdorff 2011; Dean et al. 2005; Haaf 2006; Hackett & Azim Surani 2013; Messerschmidt 2012; Reik et al. 2001; Rose & Klose 2014; Seisenberger et al. 2013). In Säugetieren kann die DNA-Methylierung größtenteils an CpG-Dinukleotiden (Cytosin gefolgt von Guanin in 5‘-3‘-

Orientierung) beobachtet werden. Dabei trägt das Cytosin eine Methylgruppe an der 5‘-Position und wird als 5-Methylcytosin bezeichnet (Bird 2002; Cedar & Bergman 2009). Die DNA-Methylierung gehört neben den Histonmodifikationen zu den epigenetischen Mechanismen, die die Aktivität von Genen beeinflusst, ohne eine Veränderung der Nukleotidsequenz zu verursachen (Mattick et al. 2009; Nordheim & Knippers 2015). Somatische Genome in Säugetieren sind global methyliert. CpG-reiche Regionen, so genannte *CpG-Islands*, bilden dabei eine Ausnahme und liegen überwiegend unmethyliert vor (Bird 1986; Illingworth & Bird 2009; Takai & Jones 2002). *CpG-Islands* sind größtenteils mit Promotoren (Deaton & Bird 2011; Messerschmidt et al. 2014; Saxonov et al. 2006) und seltener mit intergenen Bereichen assoziiert (Jones 2012; Messerschmidt et al. 2014). Gardiner-Garden und Frommer definierten *CpG-Islands* als Regionen, die mindestens 200 Basenpaare (bp) umfassen, einen GC-Gehalt von über 50 % beinhalten und einen Quotienten von über 0,6 für das Verhältnis von erwarteten zu vorhandenen CpGs aufweisen (Gardiner-Garden & Frommer 1987). Takai und Jones spezifizierten diese Definition noch einmal, auf eine Größe von mindestens 500 bp, einen GC-Gehalt von mindestens 55 % und einen Quotienten von 0,65 (Takai & Jones 2002). Damit sollten GC-reiche *Alu*-Repeat Sequenzen ausgeschlossen werden.

Unterliegt ein Locus dem genomischen Imprinting, ist das *CpG-Island* elternspezifisch methyliert und zeigt eine Gesamtmethylierung von 50 %, wie am *SNRPN*-DMR exemplarisch gezeigt (**Abbildung 2**B) und die Genexpression auf dem methylierten Allel wird verhindert. Das Muster der DNA-Methylierung an diesen sogenannten differenziell methylierten Regionen (DMRs) wird während der Entwicklung von Zelle zu Zelle stabil weitergegeben (Ideraabdullah et al. 2008; Kelsey & Feil 2013; Lucifero et al. 2004; Messerschmidt 2012; Reik & Walter 2001b, 2001a). Auf dem unmethylierten Allel ist eine monoallelische, elternspezifische Genexpression zu beobachten (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011; Goll & Bestor 2005). Die asymmetrische DNA-Methylierung spezifischer Loci zeigt somit noch einmal die Notwendigkeit beider parentaler Genome (Li et al. 1993). DNA-Methylierung ist somit der epigenetische Schlüsselmechanismus für die Regulation geimprinteter Gene (Horsthemke 2014).

Die monoallelische Expression geimprinteter Gene wird durch DMR-Elemente, wie die CpG-reichen Imprinting-Kontrollregionen (ICR), auch *Imprinting Center* (IC) genannt, in cis kontrolliert. Das X-Chromosom weißt eine ähnliche regulatorische Struktur, das

X-Inaktivierungszentrum, auf (zusammengefasst in: Barlow 2011; Bartolomei & Ferguson-Smith 2011; Buiting et al. 1995). Paternal methylierte ICRs, sind vorrangig in intergenen Regionen und maternal methylierte ICRs in Promotorregionen lokalisiert (Bartolomei & Ferguson-Smith 2011). Im Chromosomenabschnitt 15q11q13 handelt es sich um ein zweigeteiltes ICR, den AS-SRO und PWS-SRO (Angelman Syndrom/Prader-Willi Syndrom - *shortest region of overlap*; Buiting et al. 1995, 1999, **Abbildung 2**A). Die Etablierung der DNA-Methylierung erfolgt in einem bestimmten Ablauf während der Entwicklung der Keimzellen (**Abbildung 2**C). Die Mehrheit wird während der Oogenese und nur eine Minderheit während der Spermatogenese methyliert. Die differentielle DNA-Methylierung ist damit bereits in der maternalen bzw. paternalen Keimbahn etabliert. Diese Markierungen bleiben nach der Befruchtung, während der globalen Demethylierungswelle, und der gesamten Entwicklung erhalten (Hanna & Kelsey 2014; Messerschmidt 2012; Proudhon et al. 2012; Smallwood et al. 2014). In neu gebildeten primordialen Keimzellen kommt es zu einer Demethylierung und somit einer Auslöschung der Imprints (Ideraabdullah et al. 2008; Kelsey & Feil 2013; Lucifero et al. 2004; Messerschmidt 2012; Reik & Walter 2001b, 2001a).

1.2 Etablierung von DNA-Methylierung

1.2.1 DNA-Methyltransferasen und Histonmodifikationen

Die DNA-Methylierung in Promotorregionen inaktiviert die Transkription von Genen, wobei die DNA-Methylierung unter anderem von spezifischen DNA-Methyltransferasen (DNMTs) reguliert wird (Bestor 2000; Cedar & Bergman 2009; Goll & Bestor 2005). Dabei wird zwischen Methyltransferasen, für die *de novo* Methylierung und für die Aufrechterhaltung der Methylierung unterschieden. Bestor zeigte, dass *Dnmt1* (*DNA methyltransferase 1*), *Dnmt3a* (*DNA methyltransferase 3 alpha*) und *Dnmt3b* (*DNA methyltransferase 3 beta*) eine Methyltransferaseaktivität besitzen und sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich konserviert sind (Bestor 2000; Bestor et al. 1988) . Es wurde gezeigt, dass alle DNA-Methyltransferasen S-Adenosyl-Methionin als Methyl-Donor für den Transfer einer Methylgruppe verwenden (Goll & Bestor 2005). Bei *Dnmt3a und Dnmt3b* handelt es sich um *de novo* Methyltransferasen, die für die Etablierung der DNA-Methylierung benötigt werden (Denis et al. 2011; Goll & Bestor 2005). Sie sind für die normale embryonale Entwicklung zwingend erforderlich (Okano et al. 1999). In Keimzellen, speziell in

Oozyten, sind für die Etablierung *DNMT3A* und der Co-Faktor *DNMT3L* (*DNA methyltransferase 3 like*) verantwortlich (Barlow & Bartolomei 2014; Ferguson-Smith 2011; Okano et al. 1999; Suetake et al. 2006). Kaneda et al. zeigten das *Dnmt3a* essenziell für die Etablierung von maternalen und paternalen Imprints ist (Kaneda et al. 2004). *Dnmt3l* dient dabei als Regulator und interagiert insbesondere mit der *Dnmt3a*-Isoform *Dnmt3a2* (Chen et al. 2002; Gowher et al. 2005; Jia et al. 2007; Nimura et al. 2006), besitzt jedoch keine eigene enzymatische Aktivität (Bourc'his et al. 2001b; Hata et al. 2002; Kaneda et al. 2004). *In vivo* wurde gezeigt, dass ein *Dnmt3l*-Mangel zu einer Hypomethylierung maternal methylierter DMRs führt (Bourc'his et al., 2001). *DNMT3A* und *DNMT3L* spielen ebenso eine entscheidende Rolle in der Stilllegung von Retrotransposons in Spermatozyten und der Etablierung von paternalen Imprints (Bourc'his et al. 2001; Bourc'his & Bestor 2004; Kaneda et al. 2004; Lucifero et al. 2004; Suetake et al. 2006). *DNMT3B* wird für die *de novo* Methylierung in der frühen Embryogenese benötigt (Kaneda et al. 2004; Suetake et al. 2004). *In vivo* wurde gezeigt, dass der Verlust von *Dnmt3a*, *Dnmt3b* oder *Dnmt3l* zu fehlerhaften Methylierungsmustern und embryonaler Letalität führen (Messerschmidt et al. 2014).

DNMT1 war die erste identifizierte DNA-Methyltransferase in Säugetieren (Bestor et al. 1988; Yen et al. 1992) und ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung (Borowczyk et al. 2009; Howell et al. 2001; Nimura et al. 2006). Nach der Replikation liegt die DNA hemimethyliert vor. Das vorhandene Methylierungsmuster wird durch *DNMT1* auf den neu synthestisierten DNA-Strang übertragen (Arand et al. 2012; Avvakumov et al. 2008; Bestor & Ingram 1983; Bostick et al. 2007; Pradhan et al. 2001; Sharif et al. 2007). *Dnmt1o*, die oozytenspezifische Form der DNA-Methyltransferase *Dnmt1*, ist im Embryo für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung verantwortlich. Im Laufe der embryonalen Entwicklung wird diese Funktion durch *Dnmt1* übernommen (Howell et al. 2001; Li et al. 1993). In *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Dnmt1* zu einem globalen Verlust der DNA-Methylierung und zur Letalität während der Embryogenese führt. Die Überexpression führte jedoch ebenso zu einer embryonalen Letalität und eine Hypermethylierung der DNA (Biniszkiewicz et al. 2002; Clouaire & Stancheva 2008; Messerschmidt 2012).

Trotz der Trennung in *de novo* und Aufrechterhaltungs-Methyltransferasen, gibt es Hinweise, dass *DNMT1* eine mögliche *de novo* Methylierungsaktivität besitzt und

DNMT3A sowie *DNMT3B* an der Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass murine *Dnmt3a/Dnmt3b* Doppel-Knockout Stammzellen in der frühen Kultivierungsphase eine normale Methylierung vorweisen, dieser Methylierungsgrad nimmt jedoch im Laufe der Kultivierung ab. (Arand et al. 2012; Jackson et al. 2004). In verschiedenen Zellstudien wurde gezeigt, dass die Überexpression von *DNMT1* zu einem Anstieg der DNA-Methylierung in verschiedenen Loci führt (Feltus et al. 2003; Vertino et al. 1996; Wu et al. 1993). In Karzinomzellen wurde sowohl eine Überexpression von *DNMT1* als auch eine Hypermethylierung von Promotoren bestimmter Tumorsupressorgene beobachtet. Dies deutet auf die *DNMT1* vermittelte *de novo* DNA-Methylierung dieser Promotoren hin (Jair et al. 2006).

Die Funktionen der DNA-Methyltransferasen sind ebenso abhängig von bestimmten Histonmodifikationen, wie zum Beispiel Histonacetylierung und Histonmethylierung (Berger 2002; Li 2002; Nordheim & Knippers 2015). Histonacetylasen bewirken die Acetylierung von Lysin-Resten und bewirken somit eine Affinitätsveränderung zwischen Histon und DNA. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Chromatins und die DNA ist leichter zugänglich für RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren. Dadurch kann eine Aktivierung der Genexpression beobachtet werden (Jenuwein & Allis 2001; Kouzarides 2007). Die Histondeacetylierung zeigt den gegenteiligen Effekt und resultiert in der Repression der Genexpression (Li 2002). Für mehrere geimprintete Loci konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung mit einer Histon-Hypoacetylierung assoziiert ist (Fulmer-Smentek & Francke 2001; Gregory et al. 2001; Jeppesen & Turner 1993). Die Histonmethylierung, das N-terminale Anhängen von Methylgruppen an Arginin- und Lysinreste, kann sowohl zu einer Transkriptionsaktivierung als auch zu einer Transkriptionsrepression führen (Jenuwein & Allis 2001; Strahl & Allis 2000). In Heterochromatin, welches inaktive Gene beinhaltet, sind vor allem die Histonmodifikationen H3K27me3 (Trimethylierung des Lysins an Position 27 des Histons H3) und H3K9me3 (Trimethylierung des Lysins an der neunten Position des Histons H3) zu finden (Bannister & Kouzarides 2011). Inaktive Gene sind häufig mit DNA-Methylierung assoziiert. In Euchromatin, welches aktive Gene enthält, grenzen Histonmodifikationen funktionelle Elemente ab (Zhou et al. 2011). So sind die Trimethylierung des Lysins an der vierten Position des Histons H3 (H3K4me3) und die Acetylierung des Lysins an Position 27 des Histons H3 (H3K27ac) Merkmale aktiver Promotoren (Liang et al. 2004). H3K4me3 ist vorrangig

in der Nähe von Promotoren und Transkriptionsstartstellen zu finden (Meng et al. 2013; Xie et al. 2012). Dies zeigt, dass DNA-Methylierung und Histonmodifikationen eng miteinander verbunden sind.

1.2.2 Rekrutierung von DNMTs durch Transkription und Histonmodifikationen

Das menschliche Genom wird wahrscheinlich zu circa 90 % transkribiert, wobei es sich bei ungefähr 40 % aller Transkripte um überlappende Sequenzen handelt (Birney et al. 2007; Palmer et al. 2011; Wilusz et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Transkription eng miteinander verknüpfte Prozesse darstellen (Fuks 2005). Die genauen Bedingungen und molekularen Prozesse, wie Transkription zur DNA-Methylierung führt, sind jedoch weitestgehend unbekannt. Chotalia et al. haben die Rolle der Transkription in der Etablierung von maternaler DNA-Methylierung in der Keimbahn untersucht. Für die durchgeführten Experimente wurde der murine *Gnas*-Locus genutzt. In diesem finden sich mehrere überlappende geimprintete Transkripte (*Nesp*, *Nespas*, *Gnas XL*, *Gnas 1A und Gnas*). Die DMRs von *Nespas*/*Gnas XL* und *Gnas 1A* sind auf dem maternalen Allel methyliert. Die Etablierung der DNA-Methylierung erfolgt also in den Oozyten. Das *Nesp*-Transkript startet upstream des *Gnas XL*-DMRs und überliest dieses. Die Autoren zeigten in Mausexperimenten, dass eine unterbrochene Transkription des *upstream* gelegenen *Nesp* die normale Etablierung der Methylierung der DMRs in der Keimbahn verhindert (Chotalia et al. 2009). Ebenso sind humane, maternale Deletionen in der *NESP*-Region in einigen Familien mit Pseudohypoparathyroidism Typ 1b (PHP1b) mit einem Verlust der DNA-Methylierung in *NESPAS/GNAS XL* und *GNAS A/B* assoziiert (Bastepe et al. 2005; Bastepe & Jüppner 2005). Dies identifiziert die Transkription als wichtige regulatorische Funktion, um die Methylierung geimprinteter Gene zu beeinflussen (Berretta & Morillon 2009; Palmer et al. 2011). Der Mechanismus des transkriptionellen Durchlesens ist ein asymmetrischer Prozess, bei dem die Promotoraktivität eines schwachen Promotors durch einen Starken reduziert wird (Palmer et al. 2011; Shearwin et al. 2005), als Folge ist die Etablierung der DNA-Methylierung möglich. Somit scheint transkriptionelles Durchlesen ein Schlüsselprozess für die Stilllegung geimprinteter Gene zu sein (Chotalia et al. 2009). Es ist denkbar, dass es durch das transkriptionelle Durchlesen zu einer Veränderung der Histonmodifikationen und der Chromatinkonformation kommt und transkriptionelles Durchlesen somit einen Einfluss auf die Expression von Genen und die Etablierung von DNA-Methylierung ausübt. Die Histonmodifikation H3K36me3

(Trimethylierung des Lysins an Position 36 des Histons H3) markiert aktiv transkribierte Gene oder Genregionen (Baubec et al. 2015; Dhayalan et al. 2010; Jeziorska et al. 2017). Transkriptionelles Durchlesen sollte zu einer Verringerung von H3K4me3 und einer Erhöhung von H3K36me3 im transkribierten Bereich führen. Diese Chromatinmodifikation interagiert in Oozyten mit *DNMT3L* und rekrutiert die *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3A*. Im Anschluss folgt die Etablierung der DNA-Methylierung in der Region (Yang et al. 2014). Damit wurde gezeigt, dass *DNMT3A* von *DNMT3L* abhängig ist und H3K36me3 als Rekrutierungsfaktor für *DNMT3A* in Oozyten fungiert (Bourc'his et al. 2001; Xu et al. 2019). In somatischen Zellen ist die Histonmodifikation H3K36me2 (Dimethylierung des Lysins an Position 36 des Histons H3) für die Rekrutierung von *DNMT3A* verantwortlich und agiert ohne den Co-Faktor *DNMT3L* (Weinberg et al. 2019).

1.2.3 Durch Mutationen ausgelöstes transkriptionelles Durchlesen

In somatischen Zellen konnte der Einfluss des transkriptionellen Durchlesens auf die DNA-Methylierung nicht-geimprinteter Gene bereits an verschiedenen Loci beobachtet werden. Aberrante Transkription und daraus resultierende DNA-Methylierung können zu verschiedenen humanen Krankheiten führen. In einem Patienten mit alpha-Thalassämie führt eine 18 kb umfassende genomische Deletion auf Chromosom 16, die die Gene *HBA1*, *HBQ1* und das 3'-Ende des *LUC7L*-Gens umfasst, zu einem verlängerten *LUC7L*-Transkript (Tufarelli et al. 2003). Dies führte zum transkriptionellen Durchlesen von *LUC7L* über das *HBA2*-Gen und somit zur Stilllegung der *HBA2*-Genexpression sowie der DNA-Methylierung des Promotors. Dies konnte ebenfalls in transgenen Maus- und embryonalen Stammzellstudien gezeigt werden (Jeziorska et al. 2017; Tufarelli et al. 2003). Bei Patienten mit einem *CblC*-Defekt, einer Störung des Vitamin-B12 (Cobalamin) Stoffwechsels, kommt es durch eine Mutation der Spleißstelle im *PRDX1*-Gen zum Überspringen des letzten Exons inklusive des Transkriptions-Terminationssignals. Dies führt zum transkriptionellen Durchlesen des *PRDX1*-Transkriptes durch das *MMACHC*-Gen. Als Folge wird die Genexpression von *MMACHC* stillgelegt und der Promotor methyliert (Guéant et al. 2018). Ligtenberg et al. zeigten, dass in etwa 10 % der Patienten mit Lynch-Syndrom (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*, HNPCC) eine Deletion des Transkriptions-Terminationssignals des *EPCAM*-Gens (*TACSTD1*) zu finden ist. Dies führt in somatischen Zellen zur Transkription über das, von *EPCAM downstream* gelegene, *MSH2*-Gen und zu einer Reduktion der Expression, gefolgt von DNA-

Methylierung der *MSH2*-Promotorregion (Ligtenberg et al. 2009, 2013). Diese Beispiele zeigen, dass es in somatischen Zellen durch Veränderungen benachbarter Gene zu einem aberranten transkriptionellen Durchlesen über Promotoren kommen kann, welche in Folge dessen stillgelegt und methyliert werden.

Der *Igf2r/Airn*-Locus ist ein Beispiel in dem transkriptionelles Durchlesen regulär für die DNA-Methylierung eines Gens verantwortlich ist. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Trunkierung des *Airn*-Transkriptes im *Igf2r/Airn*-Locus zu einer fehlenden Stilllegung und fehlenden Methylierung im konvergenten paternalen *Igf2r*-Promotor führt (Latos et al. 2009; 2012).

1.2.4 Der Einfluss von transkriptionellem Durchlesen auf geimprintete Gene

Transkriptionelles Durchlesen spielt eine große Rolle in der Regulierung geimprinteter Gene und kann sowohl in Sense-Antisense- oder Tandem-Orientierung vorkommen. Wie in Kapitel 1.1.2 erwähnt, liegt das *CpG-Island* des *SNURF/SNRPN*-Gens maternal methyliert und paternal unmethyliert vor (Glenn et al. 1996; Horsthemke 2014). In Neuronen führt die paternal exprimierte lncRNA *SNHG14*, durch transkriptionelles Durchlesen, zu einer Stilllegung von *UBE3A* (Hsiao et al. 2001; Landers et al. 2004; Rougeulle et al. 1998). Die *UBE3A*-Promotorregion wird dadurch jedoch nicht methyliert (Lossie et al. 2001; Makedonski et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass die Transkription von *Snhg14* durch *Ube3a*, in Neuronen, nicht effizient ist und es zu einem Transkriptionsabbruch in Intron 4 von *Ube3a* kommt (Meng et al. 2013; Numata et al. 2011). Die paternale Stilllegung von *Ube3a* lässt sich auf die von Shearwin et al. beschriebenen RNA-Polymerase-Kollision zurückführen, bei der sich starke konvergent angeordnete Promotoren durch ihre überlappenden Transkripte beeinflussen (Palmer et al. 2011; Shearwin et al. 2005). Smith et al. zeigten jedoch, dass Transkription im Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Locus nicht nur zur paternalen Stilllegung von *Ube3a* in Neuronen, sondern auch in Oozyten zur Etablierung von DNA-Methylierung im PWS-SRO dient (**Abbildung 2**C, Smith et al. 2011). Die Interaktion zwischen AS-SRO und PWS-SRO für die Etablierung maternaler Imprints war bereits bekannt (Buiting et al. 2001; Dittrich et al. 1996; Horsthemke 1997; Mapendano et al. 2006). Aber erst 2011 wurde gezeigt, dass der *upstream* vom *SNURF/SNRPN* gelegene AS-SRO als oozytenspezifischer Promotor fungiert. Die konservierte AS-SRO Sequenz fehlt in der Maus. Anstelle dessen befinden sich neun alternative *upstream* Promotoren (U Exons). Das dort initiierte transkriptionelle Durchlesen über den PWS-SRO ist notwendig und initiiert die maternale DNA-

Methylierung von *Snrpn*. Neben dem murinen oozytenspezifischen Promotor konnte ebenfalls ein humanes und bovines Ortholog identifiziert werden (Lewis et al. 2014, 2019; Smith et al. 2011).

Die transkriptionsabhängige Methylierung von genomischen DMRs konnte in Mausexperimenten bewiesen werden. Chotalia et al. zeigten *in vivo* den Zusammenhang zwischen Transkription und DNA-Methylierung am *Gnas*-Locus (Chotalia et al. 2009). Eine Trunkierung des *upstream* beginnenden *Nesp*-Transkriptes führte zum Verlust des transkriptionellen Durchlesen in der Keimbahn über die *downstream* gelegen Regionen *Gnas XL* und *Gnas 1A*, so dass die Methylierung nicht korrekt gesetzt wurde und die DMRs dadurch unmethyliert vorlagen (Chotalia et al. 2009; Kelsey & Feil 2013; Mehta et al. 2015).

Die oozytenspezifische transkriptionsabhängige DNA-Methylierung konnte in *in vivo* Experimenten auch für die genomischen DMRs *Zrsr1* und *KvDMR1* beobachtet werden. Durch Trunkierungsexperimente konnte gezeigt werden das *Zrsr1* und *KvDMR1* durch transkriptionelles Durchlesen von *Commd1* und *Kcnq1* in Sense-Antisense-Orientierung maternal stillgelegt und methyliert werden (Joh et al. 2018; Singh et al. 2017). In Patienten mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom wurden auf Chromosom 11 Veränderungen, wie beispielsweise Spleißmutationen, intragene Duplikationen und Deletionen im *KCNQ1*-Locus identifiziert. Diese führen zu einer Unterbrechung der Transkription von *KCNQ1* durch das *KCNQ1OT1*-DMR und sind mit einer fehlenden DNA-Methylierung des DMRs assoziiert (Beygo et al. 2019; Valente et al. 2019).

1.3 Modellierung artifizieller humaner Imprints

1.3.1 Voraussetzungen für die Modellierung artifizieller humaner Imprints

Die genannten Beispiele zeigen, dass transkriptionelles Durchlesen ein Schlüsselfaktor für die Etablierung von DNA-Methylierung darstellt. Der genaue Mechanismus und die benötigten Faktoren sind jedoch nicht bekannt. Die von Shearwin et al. beschriebene Definition vom Einfluss des transkriptionellen Durchlesens eines Promotors auf einen Zweiten konnte in allen, in Kapitel 1.2.3 und 1.2.4, beschriebenen Fällen beobachtet werden (Shearwin et al. 2005). Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich um Keimzellen oder somatische Zellen handelte. Der Nachweis der transkriptionsabhängigen DNA-Methylierung in differentiell methylierten

Regionen ist durch den limitierten Zugang zu humanen Oozyten nicht möglich. Jedoch haben die in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Beispiele gezeigt, dass auch in somatischen Zellen die Etablierung von DNA-Methylierung durch transkriptionelles Durchlesen möglich ist und somit alle notwendigen begleitenden Faktoren enthalten sind.

Um den Einfluss des transkriptionellen Durchlesens auf die Etablierung der DNA-Methylierung zu untersuchen, musste im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein geeignetes somatisches System etabliert werden, in dem der Einfluss eines starken Promotors auf einen Zweiten untersucht werden konnte. Es wurden die bereits in Kapitel 1.2.3 und 1.2.4 beschrieben Promotorregionen von *MSH2*, *SNRPN* und *GNAS* untersucht. Alle drei Regionen wurden im humanen Kontext entweder innerhalb der normalen Entwicklung (*SNRPN* und *GNAS*) oder durch den Einfluss von Mutationen (*MSH2*) durch das transkriptionelle Durchlesen eines weiteren Promotors in Tandem-Orientierung stillgelegt und methyliert.

1.3.2 Das Flp-In T-REx-System

Das von Thermo Scientific kommerziell erwerbbare Flp-In T-REx-System wurde für die Herstellung isogener, stabil induzierbarer Säugetierzelllinien genutzt. Es ermöglicht die stabile Integration und Expression eines Gens unter Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren *CMV*-Promotors (*Cytomegalovirus*-Promotor). Für die Integration wird ein von *Saccharomyces cerevisiae* stammendes DNA-Rekombinationssystem verwendet. Dieses nutzt zur Integration eines Gens (*gene of interest*, GOI) eine DNA-Rekombinase (Flp) und eine Rekombination an einer spezifischen Stelle (FRT-Rekombinationsstelle) im Genom der somatischen Säugetierzellen (Craig 1988; O'Gorman et al. 1991; Sauer 1994*, Flp-In™ T-REx™ Core Kit Manual* Thermo Scientific). Die Ausgangszelllinie enthält ein *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen, ein Blasticidin-Resistenzgen, das Gen für den Tet-Repressor sowie eine einzige, stabil integrierte FRT-Rekombinationsstelle (**Abbildung 3**A). Diese ist *downstream* des ATG-Startcodons des *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgens integriert. Die Zellen weisen, durch die enthaltenen Resistenzgene, eine Resistenz gegen Zeocin und Blasticidin auf. Das *lacZ*-Gen, welches für das Enzym ß-Galactosidase kodiert, ermöglicht die Integrationskontrolle mittels *lacZ*-Färbung.
Für die Integration des GOI wird ein Expressionsplasmid genutzt. Dieses enthält den *CMV*-Promotor, den Tet-Operator 2 ($TetO_2$), eine FRT-Rekombinationsstelle und das Hygromycin-Resistenzgen (**Abbildung 3**B). Die Integration des GOI erfolgt in die

vorhandene *Multiple Cloning Site* (*MCS*) des Expressionsplasmids mittels Restriktionsendonukleaseverdauung. Das so generierte Plasmid wird als Einzelkopie mit Hilfe der Flp-Rekombinase und der FRT-Rekombinationsstelle in die Ausgangszelllinie integriert. Durch die Integration wird das Hygromycin-Resistenzgen des Expressionsplasmids *in frame* mit dem ATG-Startcodon gebracht. Durch eine erfolgreiche Rekombination verliert die generierte Expressionszelllinie somit sowohl die Zeocin-Resistenz als auch die Fähigkeit ß-Galactosidase zu exprimieren, besitzt jedoch dann eine Hygromycin-Resistenz (**Abbildung 3**C). Die Zellen sind bei einer *lacZ*-Färbung weiß. In die Sequenz des *CMV*-Promotors wurden zwei Tandem-Kopien der $TetO_2$-Sequenz eingefügt (Hillen et al. 1983; Hillen & Berens 1994). Das Flp-In T-REx-System exprimiert konstitutiv den Tet-Repressor. Dieser bildet in Abwesenheit von Doxycyclin/Tetracyclin ein Homodimer, welches an die Sequenz des $TetO_2$ bindet und so die Transkription des *CMV*-Promotors unterdrückt. Nach der Zugabe von Doxycyclin bindet dieses an das Tet-Repressor-Homodimer und bewirkt eine Konfirmationsänderung. Diese macht es dem Tet-Repressor unmöglich, weiterhin an den Tet-Operator zu binden. Der Doxycyclin-Tet-Repressor-Komplex dissoziiert vom Tet-Operator und ermöglicht so die Transkription des *CMV*-Promotors. In Anwesenheit von Doxycyclin kommt es somit zur Expression des vom *CMV*-Promotor regulierten Gens (Hillen & Berens 1994; Yao et al. 1998). Somit ist dieses System für die gezielte Induktion des transkriptionellen Durchlesens in einem Zellkulturmodell geeignet.

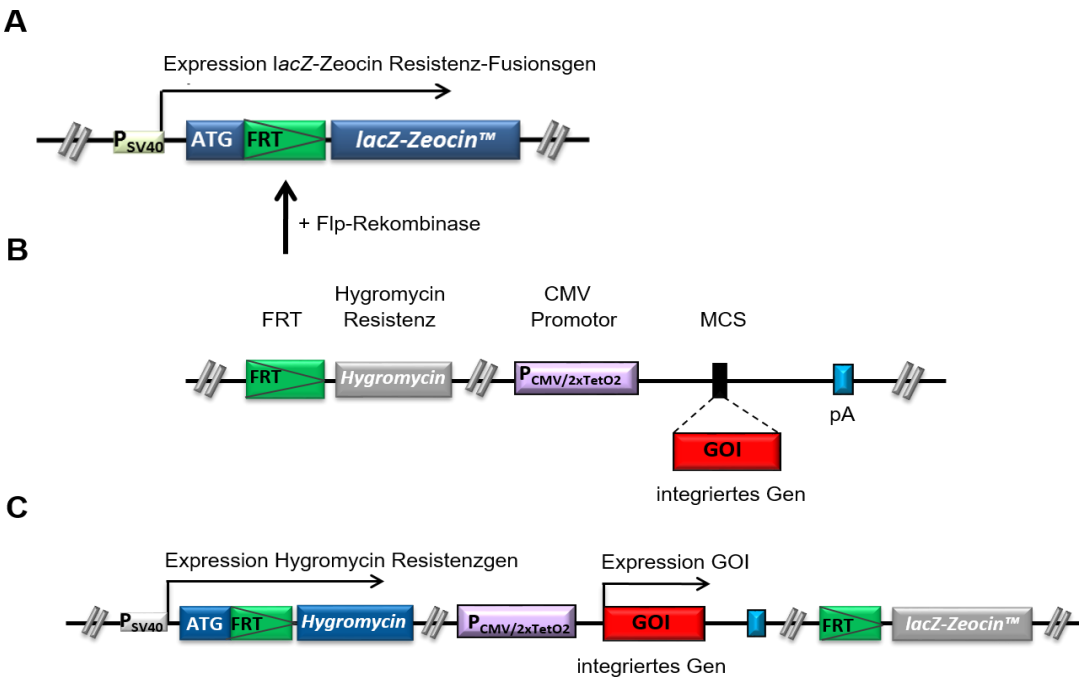


Abbildung 3: Das Flp-In T-REx-System. A) Genomischer Kontext der Flp-In T-REx-Ausgangszelllinie. Das *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen (blau) und die integrierte FRT-Rekombinationsstelle (grün) sind zufällig in das Genom integriert. Die Zellen tragen das Blasticidin-Resistenzgen und das Tet-Repressorgen an anderer Stelle im Genom (nicht gezeigt). Die Ausgangszelllinien wurden konstant mit Zeocin und Blasticidin selektioniert und zeigen eine positive *lacZ*-Färbung (blau gefärbte Zellen). **B)** Expressionsplasmid mit integriertem Gen (*gene of interest*, GOI; rot), das durch den *upstream* liegenden *CMV*-Promotor ($P_{CMV/2xTetO2}$, violett) kontrolliert wird. Das Expressionsplasmid enthält zudem das Hygromycin-Resistenzgen (grau), jedoch ohne ATG-Startcodon und eine FRT-Rekombinationsstelle (grün). **C)** Flp-In T-REx-Expressionszelllinie. Durch die Flp-Rekombinase erfolgte die Integration des Expressionsplasmids in die Ausgangszelllinie an der FRT-Rekombinationsstelle. Die Integration bringt den SV40-Promotor (grau) und das ATG-Startcodon (dunkelblau) mit dem Hygromycin-Resistenzgen (blau) zusammen. Zelllinien mit erfolgreicher Integration des Expressionsplasmids konnten mit Hygromycin und Blasticidin selektioniert werden (Blasticidin-Resistenzgen nicht gezeigt). Ebenso zeigten die Expressionszelllinien eine negative *lacZ*-Färbung, da sie die Fähigkeit ß-Galactosidase zu exprimieren, verloren haben**.** Abbildung nicht maßstabsgetreu und modifiziert nach dem *Manual* des *Flp-In T-REx Core Kits* von Thermo Scientific.

1.3.3 Modifikation des Systems mit zwei Promotoren

Um den von Shearwin et al. beschriebenen negativen Einfluss einer Transkriptionsaktivität auf eine Zweite in cis zu untersuchen, war es notwendig, das Expressionsplasmid des Flp-In T-REx-Sytems in dieser Arbeit zu modifizieren (Shearwin et al. 2005). Bei den in Kapitel 1.2.3 und 1.2.4 beschriebenen Beispielen von *MSH2*, *SNRPN* und *GNAS* handelt es sich jeweils um den Einfluss des transkriptionellen Durchlesens auf einen *downstream* gelegenen Promotor. Der dort beobachtete Effekt resultierte in einer Reduktion der Genexpression der *downstream* gelegenen Promotorregion, gefolgt von der Etablierung der DNA-Methylierung. Es handelt sich dabei um die Wirkung zweier Promotoren in Tandem-Orientierung aufeinander. Aus diesem Grund wurden das partielle Exon 2, das Intron 2 und Exon 3 des *ß-Globin*-Gens des Kaninchens (*ocHBB2*) in die *MCS* des Expressionsplasmids integriert. Die Expression des *ocHBB2*-Transkripts (*ocHBB2* Exon 2 spleißt auf *ocHBB2* Exon 3) wird durch den *CMV*-Promotor gesteuert und dient als *upstream*

Transkript. In das Intron 2 des *ocHBB2* wurde daraufhin eine Testpromotorregion integriert, um den Effekt des transkriptionellen Durchlesens des *ocHBB2*-Transkriptes auf die *downstream* gelegene Region zu untersuchen. Das so modifizierte Flp-In T-REx-System wurde bereits in Vorarbeiten am Institut für Humangenetik verwendet. In den zuvor durchgeführten Experimenten diente *EGFP* als Reportergen, jedoch kam es dabei zu aberrantem Spleißen (Dissertation Heinz 2016; Masterarbeit Utz 2015). Um aberrantes Spleißen in den hier verwendeten Promotorregionen zu vermeiden, wurde darauf geachtet das jeweils das komplette endogene Exon 1 der Promotorregionen enthalten war. Von den Testpromotoren *MSH2*, *SNRPN* und *GNAS* erfolgt die Transkription des jeweiligen *exon1/3*-Transkriptes, welches vom endogenen Exon 1 im Promotorfragment auf das *ocHBB2* Exon 3 spleißt. Um eine mögliche Behinderung der Transkriptionskomplexe auszuschließen, wurde der Abstand zwischen dem *CMV*-Promotor und der integrierten Testpromotorregion durch einen 1 kb großen *Spacer* vergrößert (**Abbildung 4**).

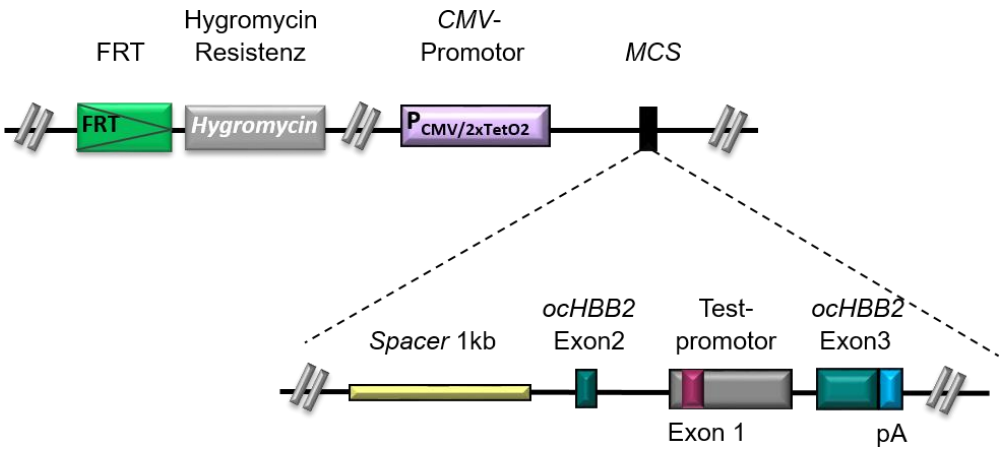


Abbildung 4: Modifikation des Flp-In T-REx-Expressionsplasmids. In die *Multiple Cloning Site* (*MCS*) des Expressionsplasmids wird ein 1 kb langer *Spacer* (gelb), *ocHBB2* (bestehend aus dem partiellen Exon 2, dem Intron 2 und Exon 3 des *β-Globin*-Gens des Kaninchens; türkis) mit integrierter Testpromotorregion (enthält *SNRPN* Exon 1, *MSH2* Exon 1 oder GNAS Exon A/B; grau/pink) und ein Terminationssignal (hellblau) integriert. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

1.4 Zielsetzung

Es ist allgemein anerkannt, dass transkriptionelles Durchlesen an der Stilllegung von Genen, der Etablierung von DNA-Methylierung und der Regulation geimprinteter Gene beteiligt ist. Jedoch sind die genauen Voraussetzungen und molekularen Mechanismen weitestgehend unbekannt. Die Etablierung der DNA-Methylierung findet bereits in der Keimbahn statt, jedoch ist der Zugang zu humanen Oozyten stark limitiert und die Untersuchung im natürlichen Kontext ist somit nicht möglich. Die aus der

Literatur bekannten Ergebnisse führten zu unserer Hypothese, dass somatische Zellen alle notwendigen Faktoren für die *de novo* DNA-Methylierung durch transkriptionelles Durchlesen besitzen. Die derzeit genutzten Systeme zur Untersuchung von transkriptionellem Durchlesen verwenden häufig Hefen, Bakterien oder synthetische Systeme (Bordoy et al. 2016; Bordoy & Chatterjee 2015; Hobson et al. 2012; Saeki & Svejstrup 2009). Diese Systeme ermöglichen die Verwendung von Reportersystemen und die einfache Herstellung von Konstrukten. Sie sind jedoch nicht geeignet, um transkriptionelles Durchlesen und die damit verbundenen komplexen epigenetischen Mechanismen in Säugetierzellen darzustellen. In Hefen und Bakterien kann keine DNA-Methylierung an *CpG-Islands* beobachtet werden. In synthetischen Systemen fehlt im Gegensatz dazu die Integration der Konstrukte in das Genom und somit der Einfluss von Chromatinwechselwirkungen (Capuano et al. 2014; Marinus & Løbner-Olesen 2014). Mausmodelle haben in der Vergangenheit wichtige Erkenntnisse über die Keimzellentwicklung, Embryogenese und Reprogrammierung erbracht. Obwohl das allgemeine Prinzip der Etablierung der DNA-Methylierung ähnlich zu sein scheint, bieten sie keine adäquate Lösung für die Untersuchung dieses Mechanismus, da nicht zu jedem geimprinteten murinen Gen ein humanes Ortholog vorhanden ist. In dieser Arbeit sollte daher ein einfaches, humanes Zellkultursystem etabliert werden, mit dem der Effekt des transkriptionellen Durchlesens und der Mechanismus der anschließenden *de novo* DNA-Methylierung genauer untersucht werden kann. In diesem System sollte artifizielle DNA-Methylierung durch den Prozess des transkriptionellen Durchlesens in beliebigen humanen Promotorregionen induziert und beobachtet werden. Der Beitrag epigenetischer Schlüsselfaktoren, wie zum Beispiel DNMT3A2, DNMT3L oder ZFP57, auf den Mechanismus der transkriptionsabhängigen DNA-Methylierung sollte mittels Überexpression untersucht werden. Außerdem sollten die zugehörigen Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K36me3 untersucht werden. Insgesamt sollte in dieser Arbeit die Auswirkung von transkriptionellem Durchlesen und die Rolle epigenetischer Regulatoren auf Promotoren in Tandem-Orientierung im Prozess der Etablierung von DNA-Methylierung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendete technische Ausstattung und Verbrauchsmittel sind nachfolgend aufgelistet.

2.1.1 Technische Ausstattung

Geräte	Modell	Hersteller
Autoklav	Systec VX-100	Systec
Chemilumineszenz-Imager (Western Blot)	ChemoStar Touch 21,5”	Intas
Digitaldrucker S/W	P93D	Mitsubishi
Elektrophoresekammern		
- für Agarosegele	40-2314 Class II	PeqLab
	H5 Serie 1087	Bethesda Research Laboratories (BRL)
- für SDS-PAGE	Mini-PROTEAN® 3 Cell	BioRad
Geldokumentation	ChemoStar Touch 21,5”	Intas
Magnetrührer-Heizplatte	M32	GLW
Mikroskope		
- für Zellkultur	Axio Vert. A1	Zeiss
- für Immunfluoreszenz	Leica SP8 gSTED super-resolution Confocal and FLIM	Leica
Inkubatoren		
- für Bakterienkultur	B6060	Heraeus
- für Zellkultur	HeraCell 240	Thermo Scientific
	Midi 40	Thermo Scientific
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Pipetten	Distriman	Gilson
	Eppendorf Research™	Eppendorf
	ErgoOne® Mehrkanal-Pipette	StarLab
	Pipetman	Gilson

Pipettierhelfer	Easypet®	Eppendorf
	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time PCR System	LightCycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics
Rollenmischer SRT 9	SRT 9	Stuart
Röntgenfilm-Entwicklermaschine	Curix 60	AGFA
Power Supply		
- für Agarosegele	Gene Power Supply GPS200/400	Pharmacia
- für SDS-Gele	Power supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Schüttler		
- für Bakterienkultur	G25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
- für Western Blot	Typ 3015 (GFL)	GFL
	Shaker S4	Elmi
SDS-PAGE Gießsystem	Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand and Clamps	BioRad
Semi-Dry Blot	Trans-Blot® SD	BioRad
Sequenzierer		
- MiSeq	Illumina MiSeq System	Illumina
- Sanger	Genetic Analyzer 3130XL	Applied Biosystems
Sicherheitswerkbänke		
- für Bakterienkultur	KS18 HeraSafe	Heraeus
- für Zellkultur	Laminar Flow Biological Safety Cabinet SterilGard class II Type A/B3	The Baker Company
Spektralphotometer	NanoDrop 1000	Thermo Scientific
	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Thermal Cycler	Veriti™ 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
	GeneAmp® PCR System 9700	

Thermomixer	comfort 5355	Eppendorf
Vakuumpumpe		
- für Bakterienkultur	MZ2	Vacubrand
- für Zellkultur	Vacusafe	Integra
Vakuumraupe	EZ-Vac Vacuum Manifold	Zymo Research
Vortexer	Genie 2/G-560E	Bender & Hobein AG
Waagen		
- Analysewaage	BP61	Satorius
- Präzisionswaage	EW 1500-2M	Kern & Sohn
Wasserbad		
- für Bakterienkultur	Julabo TWB12	Störk-Tronic
- für Zellkultur	Type 1001	GFL
Zählkammer	Hemocytometer Neubauer	Marienfeld
	Neubauer Improved	Optik Labor
Zentrifugen	Allegra X-22 Centrifuge	Beckman Coulter
	Avanti™ J-20 XP	Beckman Coulter
	Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf
	Megafuge 1.0	Heraeus
	Microzentrifuge MC-13	Millipore
	Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller	Katalognummer
10 cm-Zellkulturschalen	Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific	#172931
	Corning® BioCoat™ Fibronectin-coated Culture Dishes	Corning	#354451
24-Well-Platten	Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific	#142475
6-Well-Platten	Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific	#140675
Deckgläser	10 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht	#41001110
	12 mm		#41001112

Gelextraktionstool	X-TRACTA II	Biozym Scientific	#611004
Kryoröhrchen	CryoTube™ Vials	Thermo	
- für Bakterien	1,8 ml	Scientific	#363401
- für Zellen	1,8 ml		#377267
Nitrocellulosemembran	Pts 0.45 µm (300 mm x 4M)	GE Healthcare Life Science	#GE10600016
Mediumflaschen	non-treated Flask 75 cm^2, White Plug Seal Cap	CytoOne	#CC7672-4175
Objektträger	76 x 26 mm, 3 x1 inch, Mattrand geschnitten	Engelbrecht	#11102
Parafilm Verschlussfolie	PM996	Cole-Parmer	#GZ-06720-40
Pasteurpipetten	225mm	Brand	#747720
PCR Deckel für	8-Cap Strip	Applied	#N8010535
Reaktionsgefäße	12-Cap-Strip	Biosystems	#N8010534
PCR Reaktionsgefäße (Einzelgefäße)	MicroAmp Reaction Tube without Cap (0,2 ml)	Applied Biosystems	#N8010533
PCR Reaktionsgefäße (Streifen)	8-Tube Strip (0,2 ml)	Applied Biosystems	#N8010580
PCR-Platten/ Sequenzier-Platten	Fisher Brand 96-Well, PP, 0,3 ml semi-skirted	Fisher Scientific	#14230244
Petrischalen	Petrischale 92x16, ohne Nocken	Sarstedt	#82.1472
Pipettenspitzen	1000 µl,200 µl, 20 µl, 10 µl	StarLab	
	2µl	Gilson	
Polypropylenröhrchen	Cellstar®	Greiner Bio-One	
	15 ml		#188271
	50 ml		#227261

Reaktionsgefäße	0,5 ml	Sarstedt	#72.699
Schnappdeckel	1,5 ml		#72.690.001
	2 ml		#72.691
Reaktionsgefäße	Mikro-Schraubröhre	Sarstedt	
Schraubdeckel	1,5 ml		#72.692.005
	2 ml		#72.694.005
Röntgenfilme	Super RX-N Fuji medical X-ray film 18x24	Fujifilm	#4741019289
Sephadex-Platten	MultiScreen®-HV, 96-Well Plates, 0,45µm Hydrophilic, low Protein Binding	Merck	#MAHVN4550
Spritzen	Original-Perfusor® Syringe 50 ml Luer Lock	Braun	#8728810F
Spritzenfilter	Minisart Syringe Filter	Satorius	#10730792
	Spritzenvorsatzfilter 0,45µM PES Membran	VWR	#514-0075
Stabpipetten	Cellstar®	Greiner Bio-One	
	5 ml		#606180/5 ml
	10 ml		#607180/10 ml
	25 ml		#760180/25 ml
Vaseline	125 ml	Balea DM	
Zellkulturflaschen	Cellstar®Cellculture Flasks, red filter screw cap	Greiner Bio-One	
- T25	25 cm^2, 50 ml		#690175
- T75	75 cm^2, 250 ml		#658175
Zellschaber	25 cm	Sarstedt	#83.1830
Zellsiebe	40 µm Nylon	Falcon	#352340

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Die für die vorliegende Arbeit genutzten Chemikalien und Reagenzien sind nachfolgend aufgelistet.

Chemikalien/Reagenz	Hersteller	Katalognummer
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	#M6250
2-Propanol/Isopropanol	Merck	#1096342500
5-Sulfosalicylsäure	Carl Roth	#4119.1
Albumin Fraktion V (BSA, Albumin aus Rinderserum)	Carl Roth	#T844
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	#HP62
EDTA pH 8,0	AppliChem	#A4892,0100
Ethanol (absolut zur Analyse)	Merck	#1.00983.2500
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Thermo Scientific	#15585011
Formaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich	#252549
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich	#G7651
Glycerin 85 %	Merck	#1.04094.0500
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100x)	Thermo Scientific	#78442
Hi-Di™ Formamide	Thermo Scientfic	#4311320
illustra Sephadex G-50 DNA Grade	GE Healthcare Life Science	#17057301
Kaliumhexacyanoferrat (II) $K_4(FeCN_6)$	Sigma-Aldrich	#31254
Kaliumhexacyanoferrat (III) $K_3(FeCN_6)$	Sigma-Aldrich	#244023
Kanamycin	Roche	#10106801001
Laemmli Puffer (4x)	BioRad	#1610747
LE Agarose (für Gel-Elutionen)	Biozym Scientific	#840004
Luria-Bertani (LB)-Agar	Carl Roth	#X969.2
LB-Medium	Carl Roth	#X968.1
LightCycler® 480 Probe Master Mix	Roche	#04887301001
Magnesiumchlorid	Applied Biosystems	#4486224
Magermilchpulver	Carl Roth	#T145-2
Methanol	Carlo Erba	#414814
Natriumazid (NaAzide)	Merck	#1.06688.0100
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	#1.06482.1000

N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich	#D4551
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich	#74385
Oligo $d(T)_{16}$ Primer (50 µM)	Thermo Scientific	#N8080128
Paraformaldehyd (PFA), 16 %	Thermo Scientific	#28906
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab/VWR	#732-2789
Ponceau S	Sigma-Aldrich	#P3504
Proteinase K	Qiagen	#19131
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich	#258148
Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific	#34075
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich	#T0699
Trizma® base	Sigma-Aldrich	#T1503
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	#T8787
Tween® 20	Sigma-Aldrich	#P1379
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid)	Carl Roth	#2315.2
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium	Linaris	#H-1700-10

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sind nachfolgend aufgelistet. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders beschrieben, mit deionisiertem Wasser angesetzt. Eine Ausnahme hierbei bilden die Medien bzw. Reagenzien für die Kultivierung von humanen Zellen.

2.1.4.1 Puffer und Lösungen

Puffer	Hersteller	Katalognummer
CutSmart® Puffer	NEB	#B7204S
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, *no calcium, no magnesium* (DPBS, 1x)	Gibco	#14190-094
Gene Amp™ 10X PCR Buffer II & MgCl2	Life Technologies	#4379878
Laemmli Puffer (4x)	BioRad	#1610747
P1 Puffer	Qiagen	#19051
P2 Puffer	Qiagen	#19052

P3 Puffer	Qiagen	#19053
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE, 50x)	AppliChem	#A4686,1000
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS, 20x)	Thermo Scientific	#28358
Tris-EDTA Puffer (TE, 1x) pH 8	AppliChem	#A0386,0500
10x Tris/Glycine (Transferpuffer)	BioRad	#1610734
10x Tris/Glycine/SDS (Elektrophoresepuffer)	BioRad	#1610732

Puffer/Lösung	Bestandteil
Antikörperverdünnungspuffer	1,25 % BSA in 1x DPBS
Blocking-Puffer (Immunzytochemie)	5 % BSA in 1x DPBS, steril filtriert
Blocking-Puffer (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T
Doxycyclin (Stammlösung)	10 mg Doxycyclin in 10 ml sterilem H_2O
Fixierlösung *lacZ*-Färbung	1 % (v/v) Formaldehyd (37 %) 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in DPBS
Färbelösung *lacZ*-Färbung	5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) $K_3(FeCN_6)$ 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) $K_4(FeCN_6)$ 2 mM Magnesiumchlorid $MgCl_2$ (25 µM) 1 mg/ml X-Gal in *N, N*-Dimethylformamid (20 mg/ml) in DPBS
PFA 4 %	1 ml 16 % PFA 3 ml 1x DPBS
Ponceau S	2 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure 30 g 5-Sulfosalicylsäure in 100 ml H_2O

Protein Lyse Puffer	500 mM NaCl
	20 mM Tris pH 8,8
	1 mM EDTA
	0,5 % Nonidet P40 (NP-40)
	in 100 ml H_2O
TBS-T	1x TBS
	0,1 % Tween® 20
1 M Tris Puffer pH 6,8	12.114 g Trizma® base
(Sammelgelpuffer Western Blot)	in 100 ml H_2O
	pH-Wert auf 6,8 mit 1 M HCl einstellen
1,5 M Tris Puffer pH 8,8	18.171 g Trizma® base
(Trenngelpuffer Western Blot)	in 100 ml H_2O
	pH-Wert auf 8,8 mit 1 M HCl einstellen

2.1.4.2 Medien für die Kultivierung von Bakterien

Alle Medien für die Kultivierung von Bakterien wurden nach dem Ansetzen autoklaviert. Das jeweilige Selektionsantibiotikum wurde dem autoklavierten LB-Agar bzw. LB-Flüssigmedium zugegeben, abhängig vom jeweiligen Resistenzgen des eingefügten Plasmids.

LB-Agar	40 g/L LB-Agar (Carl Roth)
LB-Flüssigmedium	25 g/L LB-Flüssigmedium (Carl Roth)
Ampicillin	Stockkonzentration 100 mg/ml in H_2O (Carl Roth)
	Endkonzentration 100 µg/ml
Kanamycin	Stockkonzentration 30 mg/ml in H_2O (Roche)
	Endkonzentration 30 µg/ml

2.1.4.3 Medien und Reagenzien für die Kultivierung von humanen Zellen

Nachfolgend sind die genutzten Medien und Reagenzien zur Kultivierung humaner Zellen aufgelistet, sowie die Zusammensetzung der daraus hergestellten Medien angegeben.

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
2-Mercaptoethanol	Gibco	#31350-010
Blasticidin S 10 mg/ml	InvivoGen	#ant-bl-1
DMEM *high glucose, pyruvate*	Gibco	#41966-029
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	#D2650-100ML
Doxycyclin hyclate ≥98 % (TLC)	Sigma-Aldrich	#D9891-1G
Fetal Bovine Serum, *qualified South American origin;* für die Kultivierung humaner Zellen unter Standardbedingungen.	Gibco	#10270106
Fetal Bovine Serum, *certified*, *US origin*; für die Kultivierung humaner Zellen unter experimentellen Bedingungen. Laut Herstellerangaben als Tetracyclin-frei getestet.	Life Technologies	#16000-044
FuGene® HD Transfection Reagent	Promega	#E2311
Hygromycin B Gold 100 mg/ml	InvivoGen	#ant-hg-1
L-Glutamin 100x (200 mM)	Life Technologies	#25030024
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco	#31985-062
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 100x	Gibco	#15140122
Polybrene Infection/Transfection Reagent	Sigma-Aldrich	#TR-1003
Puromycin	Sigma-Aldrich	#P8833-10MG
Trypanblau (0,04 %(v/v))	Invitrogen	#T10282
Trypsin-EDTA (0,5 %), *no phenol red*	Life Technologies	#15400-054
Vitronectin-XF™	Stem Cell Technologies	#07180
Zeocin 100 mg/ml	InvivoGen	#ant-zn-1

Standardmedium für die Kultivierung von Wildtyp 293FT-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	200 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, qualified South American origin	10 % (v/v)	20 ml
Pen/Strep (100x)	1 % (v/v)	2 ml
L-Glutamin (100x)	1 % (v/v)	2 ml
DMEM, *high glucose, pyruvate*		

Standardmedium für die Kultivierung von Wildtyp Flp-In T-REx 293-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	200 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, qualified South American origin	10 % (v/v)	20 ml
Pen/Strep (100x)	1 % (v/v)	2 ml
Blasticidin S (10 mg/ml)	15 µg/ml	300 µl
Zeocin (100 mg/ml)	50 µg/ml	100 µl
DMEM, *high glucose, pyruvate*		add

Standardmedium für die Kultivierung von Wildtyp Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	200 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, qualified South American origin	10 % (v/v)	20 ml
Pen/Strep (100x)	1 % (v/v)	2 ml
Blasticidin S (10 mg/ml)	15 µg/ml	300 µl
Zeocin (100 mg/ml)	200 µg/ml	400 µl
DMEM, *high glucose, pyruvate*		add

Selektionsmedium für die Kultivierung von transgenen Flp-In T-REx 293-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	200 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, certified, US origin	10 % (v/v)	20 ml
Pen/Strep (100x)	1 % (v/v)	2 ml
Blasticidin S (10 mg/ml)	15 µg/ml	300 µl
Hygromycin B Gold (100 mg/ml)	100 µg/ml	200 µl
DMEM, *high glucose, pyruvate*		add

Selektionsmedium für Kultivierung von transgenen Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	200 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, certified, US origin	10 % (v/v)	20 ml
Pen/Strep (100x)	1 % (v/v)	2 ml
Blasticidin S (10 mg/ml)	15 µg/ml	300 µl
Hygromycin B Gold (100 mg/ml)	250 µg/ml	500 µl
DMEM, *high glucose, pyruvate*		add

Umsetzmedium nach stabiler Transfektion für Flp-In T-REx 293-/ Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	200 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, qualified South American origin	10 % (v/v)	20 ml
Pen/Strep (100x)	1 % (v/v)	2 ml
DMEM, *high glucose, pyruvate*		add

Induktionsmedium nach stabiler Transfektion für Flp-In T-REx 293-/ Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	20 ml Ansatz
Doxycyclin (1mg/ml)	1 µg/ml	20 µl
Selektionsmedium für transgene Flp-In T-REx 293- bzw. HeLa-Zellen		20 ml

Einfriermedium für Flp-In T-REx 293- und Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration	10 ml Ansatz
Fetal Bovine Serum, qualified South American origin	90 % (v/v)	9 ml
DMSO	10 % (v/v)	1 ml

2.1.5 Organismen

2.1.5.1 Bakterienstämme

Für die Klonierungsarbeiten wurden drei unterschiedliche *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämme verwendet.

Für die Klonierungen der verwendeten Plasmide und Testpromotoren wurde der Bakterienstamm DH5α NEB® 5-alpha kompetente *E. coli* (*High Efficiency*) der Firma NEB (#C2987H) verwendet.
Genotyp: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.*

Für die Klonierungsarbeiten mit den ausgewählten *GNAS* Fragmenten wurde der modifizierte *E. coli* DH5α Bakterienstamm NEB® 5-alpha F'I^q Competent *E. coli* (*High Efficiency*) der Firma NEB (#C2992H) genutzt. Dieser besitzt eine besonders hohe Transformationseffizienz und ist speziell für die Klonierung toxischer Gene entwickelt.
Genotyp: F´ *proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} Δ*(lacZ)M15 zzf::Tn10* (Tet^R) */fhuA2*Δ*(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.*

Im Rahmen der ortsspezifischen Mutagenese wurde der chemisch kompetente *E.coli* DH5α Bakterienstamm *One Shot™ MAX Effciency* DH5α™-T1R der Firma Thermo Scientific (#12297016) genutzt. Dieser Bakterienstamm ist Bestandteil des genutzten *GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis Systems* (Thermo Scientific, #A13282).
Genotyp: F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (confers resistance to phage T1).

2.1.5.2 Zelllinien

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden drei verschiedene Zelllinien genutzt.

Für die Produktion lentiviraler Partikel wurde die kommerziell erwerbbare 293FT-Zelllinie der Firma Thermo Scientific (#R70007) genutzt (Kapitel 2.3.7). Diese wurde durch die AG Schramm (Klinik für Innere Medizin, Tumorforschung, Universitätsmedizin Essen) zur Verfügung gestellt. Bei den 293FT-Zellen handelt es sich um humane, embryonale Nierenzellen (HEK) mit einem stabil integrierten SV40 *large* T-Antigen.

Das kommerziell erwerbbare Flp-In™ T-REx™ 293-Zellsystem (Thermo Scientific, #R78007), sowie das von AG Meyer (Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellte Flp-In™ T-REx™ HeLa-Zellsystem ermöglichen die einfache Herstellung stabiler Expressionszelllinien (**Abbildung 5**). Bei beiden Zelllinien handelt es sich um humane, adhärent wachsende Zelllinien. Die Herstellung stabiler Expressionszelllinien ist mittels Co-Transfektion mit dem pcDNA5_XL-Expressionsplasmid und dem pCSFLPe-Plasmid möglich. Das Plasmid pCSFLPe kodiert für die Flp-Rekombinase, mit der das Expressionsplasmid stabil ins Genom der Ausgangszelllinien an der FRT-Rekombinationsstelle integriert werden kann (Kapitel 1.3.2).

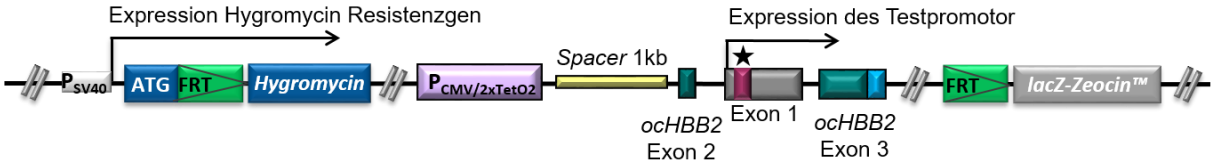


Abbildung 5: Flp-In T-REx-Expressionszelllinie. Flp-In T-REx-Expressionszelllinie. Durch das pCSFLPe-Plasmid erfolgte die Integration des Expressionsplasmids in die Ausgangszelllinie an der FRT-Rekombinationsstelle. Die Integration bringt den SV40-Promotor (grau) und das ATG-Startcodon (dunkelblau) mit dem Hygromycin-Resistenzgen (blau) zusammen. Zelllinien mit erfolgreicher Rekombination zeigten eine Hygromycin-Resistenz und eine negative *lacZ*-Färbung (weiße Zellen), da sie die Fähigkeit ß-Galactosidase zu exprimieren, verloren haben. Abbildung modifiziert nach dem *Manual* der Flp-In T-REx 293-Zelllinie von Thermo Scientific

2.1.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit genutzten Enzyme sind nachfolgend aufgelistet. Es wurden die jeweils mitgelieferten Puffer genutzt.

2.1.6.1 Allgemeine Enzyme

Enzym	Hersteller	Katalognummer
Fast AP Thermosensitive Alkalische Phosphatase (1 U/µl)	Thermo Scientific	#EF0651
RQ1 RNase-free DNase Kit	Promega	#M6101
RNase Inhibitor	Thermo Scientific	#8080119
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	Thermo Scientific	#K1423

2.1.6.2 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller	Katalognummer	Sequenz	Hitzeinaktivierung
EcoRI-HF (20.000 U/ml)	NEB	#R3101S	5' G▼AATTC 3' 3' CTTAA▲G 5'	65 °C für 20 min
EcoRV-HF (20.000 U/ml)	NEB	#R3195S	5' GAT▼ATC 3' 3' CTA▲TAG 5'	65 °C für 20 min
HindIII-HF (20.000 U/ml)	NEB	#R3104S	5' A▼AGCTT 3' 3' TTCGA▲A 5'	80 °C für 20 min
PstI-HF (20.000 U/ml)	NEB	#R3140S	5' CTGCA▼G 3' 3' G▲ACGTC 5'	keine Inaktivierung möglich
*Xho*I (20.000 U/ml)	NEB	#R0145S	5' C▼TCGAG 3' 3' GAGCT▲C 5'	65 °C für 20 min

2.1.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (*Kits*)

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten *Kits* aufgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Eventuelle Modifikationen des Herstellerprotokolls werden im jeweiligen Abschnitt dieser Arbeit erwähnt.

Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (*Kits*)	Hersteller	Katalognummer
Advantage® GC 2 PCR Kit	Clontech	#639119
AMPure XP PCR-Aufreinigungssystem	Beckman Coulter	#A63881
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Scientific	#4337451
DNA Clean & Concentrator-5 Kit	Zymo Research	#D4013
EZ DNA Methylation-Gold Kit	Zymo Research	#D5005
FlexiGene DNA Kit	Qiagen	#51206
Freeze 'N Squeeze™ DNA Gel Extraction Spin Colums	BioRad	#7326165
GeneAmp™ RNA PCR Core Kit	Thermo Scientific	#N8080143
GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis System	Thermo Scientific	#A13282
GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix Kit	Promega	#M7423
HotStarTaq® Master Mix Kit (1000 U)	Qiagen	#203445
LunaScript™ RT SuperMix Kit	NEB	#E3010L

Q5® Hot Start High Fidelity 2X Master Mix Kit	NEB	#M0494S
RNAeasy Mini Kit	Qiagen	#74104
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific	#K1423
TOPO™ TA Cloning™ Kit	Thermo Scientific	#450641
VenorGem OneStep Mycoplasma Detection Kit	Minverva Biolabs	#11-8100
Wizard® SV Gel and PCR clean-up system	Promega	#A9281
Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific	#450245
ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research	#D4202

2.1.8 DNA-/Protein-Größenstandards und Ladepuffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards und Ladepuffer sind nachfolgend aufgeführt.

2.1.8.1 DNA- und Protein-Größenstandard

Größenstandard	Hersteller	Katalognummer
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0311
MassRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM0383
FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM1233
FastRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	#SM1103
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa)	Thermo Scientific	#26619

2.1.8.2 Ladepuffer

Ladepuffer	Hersteller	Katalognummer
6x DNA Gel Loading Dye	Thermo Scientific	#R0611
4x Laemmli Buffer	BioRad	#1610747

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Western Blot

Antikörper	Hersteller/Katalognummer	Stock	Verdünnung
DNMT3A Mouse Monoclonal Antibody [Clone ID: 64B1446]	OriGene #TA336580	1 mg/ml	1:100
Anti-DNMT3L Antibody Purified MaxPab	Novus Biologicals #H00029947-D01P	0,5 mg/ml	1:250
Anti-Zfp57 Antibody	Abcam #ab50944	1 mg/ml	1:800 (1.25 µg/ml)
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology #2118S	100 µl	1:5000
β-Tubulin Antibody	Cell Signaling Technology #2146S	100 µl	1:1000
goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, HRP conjugate	Thermo Scientific #32430	10 µg/ml	1:1000
goat anti-rabbit IgG(H+L) secondary antibody, HRP conjugate	Thermo Scientific #32460	10 µg/ml	1:1000

2.1.9.2 Immunzytochemie

Antikörper/Reagenz	Hersteller/Katalognummer	Verdünnung
Anti-DNMT3L Antibody Purified MaxPab	Novus Biologicals #H00029947-D01P	30 µg/ml
Anti-Mouse IgG (H+L), F(ab‘)$_2$ Fragment (Alexa Fluor® 488)	Cell Signaling Technology #4408S	1:1000
Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')$_2$ Fragment (Alexa Fluor® 555)	Cell Signaling Technology #4413S	1:1000
Anti-Zfp57 Antibody	Abcam #ab50944	1:200 (5 µg/ml)
DAPI Solution 1 mg/ml (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)	Thermo Scientific #62248	1:1000

DNMT3A Mouse Monoclonal Antibody [Clone ID: 64B1446]	OriGene #TA336580	1:200 (5 µg/ml)

2.1.10 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind nachfolgend aufgelistet.

FRT-GFP2	pcDNA5/FRT/TO Vektor mit integriertem GFP-Reportergen. Diente als Positiv-/Selektionskontrolle für die stabile Transfektion und lentivirale Transduktion (Lucas et al. 2005). Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Ryffel, Institut für Zellbiologie, Universitätsmedizin Essen.
pBluescript II KS (+)	Standardklonierungsvektor (aus Lambda ZAPII) Agilent #212207
pBS-Ex2/3	pBluescript II KS (+) Vektor mit integriertem *ocHBB2*
pBS-Ex2/3_EcoRV	pBluescript II KS (+) Vektor mit integriertem *ocHBB2* und *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle im Intron 2 des *ocHBB2*
pBS_tkneo511_BGfrt	Enthält das partielle Exon 2, das vollständige Intron 2 und Exon 3, sowie das Terminationssignal des ß-Globingens des Kaninchens (*ocHBB2*, Sleutels et al. 2002). Zur Verfügung gestellt von Dr. D. Barlow, CeMM, Forschungszentrum für Molekulare Medizin GmbH, Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien, Österreich.
pcDNA5_Ex2/3_EcoRV	Vektor bestehend aus dem pcDNA5/FRT/TO Grundgerüst und *ocHBB2* mit integrierter *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle

pcDNA5/FRT/TO	Vektor für die Integration eines Zielgens in die humanen Flp-In T-REx-Zellsysteme **(Abbildung 3**B) Thermo Scientific #V65202020.
pcDNA5_XL	Vektor bestehend aus dem pcDNA5/FRT/TO Grundgerüst, einem 1 kb langen *Spacer* und *ocHBB2* (**Abbildung 46**).
pcDNA5_XL_*MSH2* new mut (*MSH2*^{S}_ex1)	Vektor bestehend aus dem pcDNA5_XL-Plasmid mit integrierter transgener *MSH2*-Promotorregion.
pcDNA5_XL_*MSH2* new mut splice3 (*MSH2*^{S}_ex1_splice3)	Vektor bestehend aus dem pcDNA5_XL-Plasmid mit integrierter transgener *MSH2*-Promotorregion und zwei modifizierten kryptischen *Splice Sites*.
pcDNA5_XL_*MSH2* new mut splice4 (*MSH2*^{S}_ex1_splice4)	Vektor bestehend aus dem pcDNA5_XL-Plasmid mit integrierter transgener *MSH2*-Promotorregion und vier modifizierten kryptischen *Splice Sites* (**Abbildung 47**).
pcDNA5_XL_*SNRPN* (*SNRPN*^{S}_ex1)	Vektor bestehend aus dem pcDNA5_XL-Plasmid mit integrierter transgener *SNRPN*-Promotorregion (**Abbildung 48**).
pCMV6-XL5_*DNMT3L*	*DNMT3L*-Expressionsplasmid, Origene #SC123782.
pCMV6-XL5_*ZFP57*	*ZFP57*-Expressionsplasmid, Origene #SC317111.
pCR™ 2.1-TOPO™	TOPO Vector für die Klonierung von DNA-Fragmenten mit 3'-Überhang. Thermo Fisher #K450001.
pCR™-Blunt-II-TOPO™	TOPO Vector für die Klonierung von DNA-Fragmenten ohne 3'-Überhang. Thermo Fisher #K2800J10.

pCR-Blunt_II_SNRPN_long_ds_mut1	Vektor bestehend aus dem pCR™-Blunt-II-TOPO™ Grundgerüst mit integrierter transgener *SNRPN*-Promotorregion.
pCSFLPe	Plasmid mit integriertem Flp-Rekombinasegen für die Integration von Zielgenen in die humanen Flp-In T-REx-Zellsysteme (Werdien et al. 2001). Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Ryffel, Institut für Zellbiologie, Universitätsmedizin Essen.
pLJM1_DNMT3A2	*DNMT3A2*-Expressionsplasmid. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Wagner, Helmholtz Institute for Biomedical Engineering, Division of Stem Cell Biology and Cellular Engineering, RWTH Aachen (Božić et al. 2018, **Abbildung 49**).
VSV-G/pMD2	Plasmid für die Herstellung lentiviraler Partikel. VSV-G wird für die Pseudotypisierung des vesikulären Stromatitis-Virus genutzt. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Schramm, Klinik für Innere Medizin (Tumorforschung), Universitätsmedizin Essen.
pSPAX	Lentivirales Verpackungsplasmid. pSPAX kodiert die Gene *gag, pol* und *env*. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Schramm, Klinik für Innere Medizin (Tumorforschung), Universitätsmedizin Essen.

2.1.11 Oligonukleotide

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg) synthetisiert und sind im Kapitel 9.1 des Anhangs aufgeführt. Vor Verwendung wurden sie in deionisiertem Wasser der Firma Merck (Darmstadt) von 100 µM auf eine Konzentration von 10 µM bzw. 5 µM verdünnt, entsprechend des Verwendungszwecks. Sonden für die qRT-PCR wurden von Roche Diagnostics

(Mannheim), Sigma-Aldrich (Hamburg) und Merck (Darmstadt) bezogen. Die für die qRT-PCR-Analyse verwendeten *Primer* und Sonden (**Tabelle 5**) wurden mithilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche Diagnostics) auf folgender Webseite generiert: https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center [Stand 06.12.2019, 18:24].

Die für die Methylierungsanalysen verwendeten *Primer* wurden, falls möglich, unter zu Hilfenahme von *MethPrimer* (Li & Dahiya 2002) auf folgender Webseite bestimmt: https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi [Stand 06.12.2019, 18:35]. Die *Primer* enthielten entweder einen spezifischen *forward*- oder *reverse*-*Tag*, die im weiteren Verlauf der Analysen als Bindungsstelle für die *Index Primer* der *Next Generation Bisulfite Amplicon*-Sequenzierung (*MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung) dienten und im Anhang (**Tabelle 8**) aufgeführt sind (Leitão et al. 2018).

2.1.12 Software

Software	Hersteller
Alamut® Visual	SOPHiA GENETICS company
Amplykyzer2	https://pypi.org/project/amplikyzer2/
Fiji Version 1.52	Wayne Rasband https://imagej.net/Fiji
Geneious R11/Geneious Prime	Biomatters
GraphPad Prism 8	GraphPad Software
LightCycler® 480 Software, Version 1.5.0	Roche
Microsoft Office	Microsoft
Sequencing Analysis V6.0 /V7.0	Thermo Scientific
Photoshop	Adobe

2.1.13 Statistik

Die hier präsentierten Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel +/- Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests und S*tudents t-test* für ungepaarte, zweireihige Datensätze (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$*)* berechnet. Für die Berechnung wurde die Software *GraphPad Prism* 8 genutzt. Ein p-Wert von ≤ 0,05 wurde als signifikant definiert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von spezifischen Regionen aus Plasmid-DNA, genomischer DNA oder Bisulfit-konvertierter DNA genutzt. Entsprechend der jeweiligen Anforderungen wurden das *Advantage® GC 2 PCR Kit* (Clontech), das *HotStarTaq® Master Mix Kit* (Qiagen), das *GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix Kit* (Promega) sowie der *Q5® Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix* (NEB) entsprechend der Herstellerangaben genutzt. Auf die initiale Denaturierungsphase folgten 25 - 55 Zyklen Denaturierung, *Primer*hybridisierung und Elongation, gefolgt von einer finalen Elongationsphase. Die optimalen Temperaturen der *Primer*hybridisierung (T_m) wurden durch die Software *Geneious R11/Geneious Prime* oder den *UCSC Genome Browser* ermittelt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Eine qualitative Analyse von DNA-Fragmenten (PCR Produkten, Plasmid-DNA sowie DNA-Fragmenten, die durch eine enzymatische Verdauung erzeugt wurden) erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf 1 - 2 % (w/v) Agarosegelen. Die Agarose (Peqlab/VWR) wurde in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE Puffer) aufgekocht, anschließend abgekühlt und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zur Detektion der DNA-Fragmente versetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Agarosegels mit DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) versehen. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen wurde ein DNA Größenstandard (Kapitel 2.1.8.1) mitgeführt. Anschließend wurden die Fragmente bei 120 V in 1x TAE Puffer mit 0,4 µg/ml EtBr für 45 min in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (BRL/PeqLab) aufgetrennt. Das eingesetzte EtBr, welches in die DNA interkaliert, ermöglicht somit die visuelle Detektion der DNA-Fragmentgrößen anhand des Größenstandards mittels UV-Licht in der Geldokumentation (ChemoStar Touch 21,5“, Intas) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

2.2.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von spezifischen DNA-Fragmenten wurde zunächst eine klassische Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Agarosegele wurde bei Gel-Elutionen jedoch eine andere Agarose (Biozym Scientific) verwendet. Zur Vermeidung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA wurden bei der Extraktion der spezifischen DNA-Fragmente lange UV-Belichtungszeiten vermieden, die Intensität des verwendeten UV-Licht auf 80 % reduziert und zusätzlich das Gelextraktionstool X-TRACTA II (Biozym Scientific) verwendet. Für die anschließende Aufreinigung der extrahierten DNA-Fragmente wurden die Gelstücke entweder über Nacht bei -20 °C eingefroren und anschließend mit dem *Wizard® SV Gel and PCR clean-up System* (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt oder es erfolgte ein verkürztes Verfahren. In diesem wurden die extrahierten DNA-Fragmente in einer *Freeze 'N Squeeze* Säule (BioRad) für 10 min bei -20 °C eingefroren und entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Im Anschluss konnte dieser Ansatz noch einmal mit dem *Clean & Concentrator-5 Kit* (Zymo Research) nach Herstellerangaben aufgereinigt werden und ermöglichte somit die genaue Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA mittels Spektralphotometer (Kapitel 2.2.6).

2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie von DNA-Fragmenten z.B. nach einer Restriktion, wurde mit dem *Clean & Concentrator-5 Kit* (Zymo Research) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5 DNA-, RNA- und Protein-Extraktion aus Zellen

2.2.5.1 Isolation von genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus humanen Zellen erfolgte mit Hilfe des *FlexiGene Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben und folgenden Modifikationen. Es wurden Zellen eines *Wells* einer *6-Well*-Platte (circa 2×10^6 Zellen) sedimentiert (Megafuge 1.0, 4 min, 1.000 rpm). Das so gewonnene Zellpellet wurde in 500 µl FG2-Puffer (versetzt mit 20 µl Proteinase K, >600 mAU/ml, Qiagen) resuspendiert. Der so gewonnene Ansatz wurde mehrmals invertiert und 15 min bei 56 °C und 850 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf) inkubiert. Zur anschließenden Fällung der gDNA wurde dem Ansatz 500 µl 100 % Isopropanol zugegeben. Durch

mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und als Fäden sichtbar. Für das nachfolgende Vorgehen standen zwei verschiedene Methoden, abhängig von der Sichtbarkeit der präzipitierten DNA, zur Verfügung.

a) Zentrifugationsmethode
Wenn keine oder wenig präzipitierte DNA sichtbar war, wurde im folgenden Verlauf die Zentrifugationsmethode genutzt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 3 min bei 10000 x g (5804R, Eppendorf) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 3 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

b) Glashaken „Angel"-Methode
Die sichtbare DNA wurde mit Hilfe eines Glashakens (Glaspasteurpipette wird über einer Gasflamme zu einem Haken ausgezogen) entnommen. Im nächsten Schritt wurde die DNA in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen.

Das Pellet wurde in beiden Methoden mindestens 5 min an der Luft getrocknet bis die gesamte Flüssigkeit verdunstet war. Anschließend wurde das Pellet bei beiden Methoden in mindestens 200 µl FG3-Puffer aufgenommen und für 1 h bei 65 °C und 850 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf) inkubiert und nachfolgend bei Raumtemperatur für 48 h auf dem Rollermischer (SRT9, Stuart, Staffordshire) vollständig gelöst.

2.2.5.2 RNA-Präparation aus Zellen

Falls nicht anders beschrieben wurden die Zellen eines *Wells* einer *6-Well*-Platte (circa 2 x 10^6 Zellen) geerntet und sedimentiert. Die Isolation von RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.5.3 Extraktion von Proteinen

Für die Extraktion von Proteinen wurden die Zellen eines *Wells* einer *6-Well*-Platte (circa 2 x 10^6 Zellen) sedimentiert und anschließend mit 100 µl Proteinlysepuffer und 1 µl 100x HALT™ Proteinase/Phosphatase Inhibitor (Thermo Scientific) lysiert. Die Lyse erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Proben wurden alle 10 min für circa 30 s auf dem Vortexer (Genie 2/G-560E, Bender & Hobein AG) gemischt und im Anschluss für 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (5804R,

Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß in Aliquots je 15 µl überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mit Hilfe eines *NanoDrop* 1000 bzw. 2000 UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Scientific) photometrisch bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte von 1 µl Probe bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient A bei 260/280 nm wurde für die Beurteilung der DNA- und RNA-Qualität verwendet. Ein Quotient von 1,8 sowie ~ 2,0 (1,9 - 2,1) wird für DNA und RNA generell als „rein“ akzeptiert (Michel et al. 2012). Der spezifische Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA beträgt 50 µg/ml und für einzelsträngige RNA/DNA 40 µg/ml. Die DNA- bzw. RNA-Konzentration *C* wird mit folgender Formel berechnet:

$$C\ [\mu g/ml] = A260 * Verd\ddot{u}nnungsfaktor\ * Extinktionskoeffizient[\mu g/ml]$$

2.2.7 Molekulare Klonierung

2.2.7.1 Restriktionsendonukleaseverdauung

Die enzymatische Verdauung von DNA, PCR-Fragmenten und Plasmiden dient der Herstellung und Analyse spezifischer DNA-Fragmente im Rahmen einer Klonierung. Um kompatible Enden zu generieren, wurden sowohl DNA- und PCR-Fragmente als auch das jeweilige Zielplasmid/Vektorplasmid mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym können die Fragmente nach der Restriktion entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder 3‘-bzw. 5‘-Überhänge (*overhangs* bzw. *sticky ends*) aufweisen. Die Liste der in dieser Arbeit genutzten Restriktionsendonukleasen sind in Kapitel 2.1.6.2 aufgeführt. Die Restriktionen wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und der universelle *CutSmart*® Puffer ermöglichte sowohl Einzel- als auch Mehrfachrestriktionen. Unter optimalen Bedingungen verdaut 1 U eines Restriktionsenzyms 1 µg DNA in 1 h. In der hier vorliegenden Arbeit wurden jeweils 1 µg DNA mittels Restriktionsendonuklease verdaut. Die Inkubationszeiten variierten, abhängig von Enzym und Art des Fragments von 1 h bis zur Inkubation über Nacht. Im Anschluss erfolgte, sofern möglich, eine Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C

bzw. 80 °C, abhängig vom genutzten Restriktionsenzym. Die enzymatische Verdauung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.7.2 Dephosphorylierung von Vektoren

Nach der enzymatischen Verdauung von Plasmiden ist eine Dephosphorylierung notwendig. Dabei werden die vorhandenen Phosphatreste des Plasmids (Vektor) durch alkalische Phosphatase entfernt, um eine Religation der Plasmide ohne *Insert* (DNA- oder PCR-Fragment) zu verhindern. Die Dephosphorylierungsreaktion von 1 µg linearisierten Plasmids erfolgte mit 1 U *FastAP* Thermosensitiver Alkalischer Phosphatase im mitgelieferten Reaktionspuffer (Thermo Scientific, 1x) in einem Endvolumen von 50 µl. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C gefolgt von 5 min bei 75 °C für die Inaktivierung der Reaktion. Standardmäßig lag die Endkonzentration des linearisierten dephosphorylierten Plasmids bei 25 ng/µl. Die benötigte Menge des linearisierten Plasmids pro Ansatz wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge Plasmid DNA } [\mu l] = \frac{Soll\ Konzentration\ [ng/\mu l]}{Ist\ Konzentration\ [ng/\mu l]} * \text{Volumen Ansatz } [\mu l]$$

2.2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Im Rahmen der molekularen Klonierung erfolgte die Ligation (**Abbildung 6**) als enzymatische Verknüpfung eines DNA-Fragmentes (*Insert*) mit einem linearisierten dephosphorylierten Plasmid (Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2). Mit Hilfe des *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Scientific) und der enthaltenen T4 Ligase wird zwischen dem 3'-Hydroxyende des Plasmids und des 5'-Phosphatendes des DNA-Fragments eine Phosphodiesterbindung hergestellt. Die einzelnen Schritte der Ligation erfolgten entsprechend der Herstellerangaben.

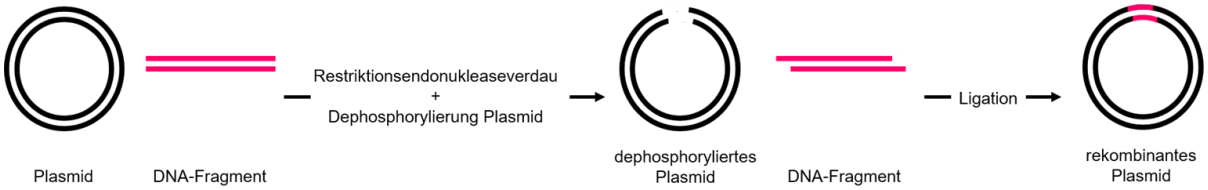


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Ligation. Links) Dargestellt sind Ausgangsplasmid, sowie das zu inserierende DNA-Fragment. **Mitte)** Durch eine Restriktionsendonukleaseverdauung mit anschließender Dephosphorylierung des Plasmids sind sowohl das Ausgangsplasmid als auch das DNA-Fragment durch kompatible Enden für die anschließende Ligation vorbereitet. **Rechts)** Ligation des linearisierten dephosphorylierten Plasmids mit dem DNA-Fragment führt zu einem rekombinanten Plasmid. In diesem ist das DNA-Fragment dauerhaft integriert.

Für die optimalen Bedingungen wurden unterschiedliche Vektor – *Insert* Verhältnisse getestet (1:3, 1:5 und 1:10). Es wurden pro Ligationsansatz 50 ng linearisiertes dephosphoryliertes Plasmid genutzt. Für die Berechnung des Vektor - *Insert* Verhältnisses wurde die Länge der DNA Moleküle berücksichtigt. Die Berechnung für ein 1:3 Verhältnis lautet wie folgt:

$$\text{Menge DNA} - \text{Fragment [ng]} = \frac{Länge\ DNA - Fragment\ [kb]}{Länge\ Plasmid\ [kb]} * \text{Menge Plasmid [ng]} * 3$$

Pro Ligation wurde ebenfalls eine Positivkontrolle und zwei Negativkontrollen mitgeführt. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um eine Ligationskontrolle, bei der das linearisierte, nicht-dephosphorylierte Plasmid mit T4 Ligase behandelt wurde. Bei einem optimalen Ergebnis kommt es dabei zur Religation des Plasmids. Bei den verwendeten Negativkontrollen handelt es sich zum einen um eine Probe, in der das linearisierte, nicht-dephosphorylierte Plasmid ohne T4 Ligase behandelt wurde und somit keine Religation möglich ist. Bei der zweiten Negativkontrolle handelt es sich um eine Dephosphorylierungskontrolle, bei der das linearisierte dephosphorylierte Plasmid mit T4 Ligase behandelt wurde. Unter optimalen Bedingungen ist der gesamte Ansatz dephosphoryliert und eine Religation ist aufgrund der abgebauten Phosphatreste nicht mehr möglich. Die Ligation erfolgte dann, entsprechend der Herstellerangaben, in einem Endvolumen von 20 µl für 5 min bei 22 °C und konnte anschließend in der Transformation verwendet werden.

2.2.7.4 TOPO-Klonierung

Mit der TOPO-Klonierung können DNA-Fragmente ohne zusätzliche Restriktionsverdauung und DNA-Ligase in ein Plasmid integriert werden. Ermöglicht wird dies durch die DNA-Topoisomerase I, welche kovalent an das 3‘-Ende des linearisierten Plasmids gekoppelt ist. Die DNA-Topoisomerase I katalysiert die kovalente Bindung der freien 5‘-Enden eines DNA-Fragments an die freien 3‘-Enden des Vektors. Eine Linearisierung und Dephosphorylierung des Vektors vor der Klonierung ist nicht nötig, da der Vektor bereits linearisiert vorliegt. Die Orientierung des Inserts im Vektor ist zufällig. Die Methode der TOPO-Klonierung eignet sich insbesondere um am integrierten *Insert* Modifikationen, wie zum Beispiel *Site-Directed Mutagenesis*, vorzunehmen. Abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase können die entstandenen DNA-Fragmente einen 3‘-Überhang oder ein glattes Ende aufweisen. DNA-Fragmente, die einen 3‘-Überhang aufweisen, wurden mit dem *TOPO TA Cloning® Kit* (Thermo Scientific) in den pCR™ 2.1 TOPO Vektor integriert. DNA-Fragmente ohne 3‘-Überhang wurden mit dem *Zero Blunt® Topo® PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific) in den pCR™ Blunt II TOPO Vektor integriert. Beide Methoden wurden entsprechend der Herstellerangaben mit 2 µl des unaufgereinigten PCR-Produktes durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien.

2.2.7.5 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Die Transformation von kompetenten *E.coli* mit einem Plasmid erfolgte standardmäßig mit dem Bakterienstamm DH5α NEB® 5-alpha kompetente *E. coli* (*High Efficiency*) der Firma NEB (Kapitel 2.1.5.1). Für einen Transformationsansatz wurden 5 µl eines Ligationsansatzes zu 50 µl kompetenten *E.coli* Bakterien gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C, gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 5 min. Nach Zugabe von 950 µl SOC Medium (im Lieferumfang enthalten) wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dieser Inkubationsschritt ist insbesondere bei Transformationen von Plasmiden wichtig, die eine Kanamycin-Resistenzkassette tragen. Nachfolgend wurden je 150 µl und 300 µl der Kultur mit Hilfe eines Drigalskispatels auf LB-Platten (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum) ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.7.6 *Site-Directed Mutagenesis* von Plasmiden

Um in dieser Arbeit zwischen dem integrierten Testpromotor und dem endogenen Promotor der Zelllinie zu differenzieren, wurde ein spezifischer Basenaustausch in den Testpromotor integriert. Dazu wurden zwei komplementäre *Primer* generiert, welche in ihrer Sequenzmitte die gewünschte Modifikation in Form eines veränderten Nukleotids enthielten (**Tabelle 4**). Beide *Primer* sollten etwa gleich lang (35-45 Nukleotide), 100% komplementär und ohne Überhänge sein (**Abbildung 7**). Die *Site-Directed Mutagenesis* erfolgte mit Hilfe des *GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis Systems* (Thermo Scientific) entsprechend der Herstellerangaben.

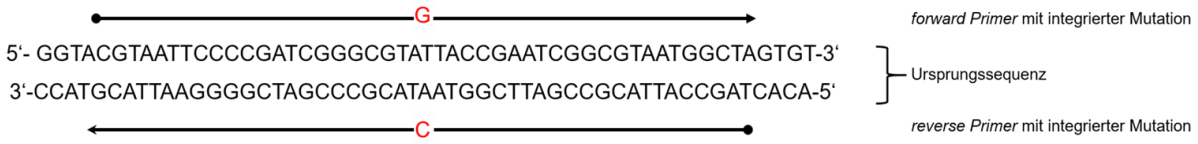


Abbildung 7: Schematische Darstellung von *Site-Directed Mutagenesis Primern*. Die komplementären *Primer* enthalten das veränderte Nukleotid in ihrer Sequenzmitte, Die *Primer* sind etwa gleich lang, 100% komplementär und ohne Überhänge.

2.2.7.7 Herstellung von Glycerolstocks

Für die langfristige Lagerung von Bakterienkulturen ist die Kryokonservierung (Bakterien-Glycerolstock) die am Weitesten verbreitete Methode. Das Ausgangsmaterial für einen Bakterien-Glycerolstock bildet eine LB-Flüssigkultur (Kapitel 2.1.4.2). Als Gefrierschutzmittel wurde in dieser Arbeit Glycerin (85 %, Merck) eingesetzt, um die Haltbarkeit der Bakterienkultur zu verlängern und den Gefrierpunkt des enthaltenen Wassers in den Bakterien herabzusetzen. Als ideale Gefrierrate, für die Kryokonservierung von Bakterien, gilt 1 Kelvin/min. Für den Glycerolstock werden zu 300 µl Glycerin 700 µl der entsprechenden Bakterienkultur in ein Kryoröhrchen gegeben und der Ansatz durch Invertieren gemischt. Im Anschluss wird der Glycerolstock bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.2.7.8 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurden je 3 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Kapitel 2.1.4.2) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (G25 *Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific) über Nacht inkubiert. Am nächsten

Tag wurden 1,5 ml der Übernachtkultur für 20 s bei 14.000 rpm sedimentiert (5804R, Eppendorf), der Überstand verworfen und das Zellsediment in 300 µl vorgekühltem P1 Puffer (Qiagen) resuspendiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 300 µl P2 Puffer (Qiagen) mehrmals invertiert und die Zellen durch die nachfolgende Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min alkalisch lysiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 300 µl P3 Puffer (Qiagen) und mehrmaliges Invertieren gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 500 µl 100% Ethanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch die Zentrifugation des Ansatzes für 10 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand erneut verworfen und das DNA-Präzipitat für circa 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 30 µl TE-Puffer gelöst.

Die Präparation von Plasmid-DNA in größeren Maßstäben erfolgte mit Hilfe des *ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kits* (Zymo Research) entsprechend der Herstellerangaben. Hierfür wurden 125 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, mit 3 ml einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (G25 *Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur in zwei Ansätze aufgeteilt und für 15 min bei 4.500 x g (Avanti™ J-20 XP, Beckman Coulter) sedimentiert. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.8 Sequenzierung von DNA nach Sanger

Die Sequenzierung von DNA- und PCR-Fragmenten, sowie Plasmid-DNA erfolgte nach der Sanger-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1977) und wurde mit dem *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Scientific) durchgeführt. Standardmäßig wurden 200 ng DNA, 1 µl *Primer* (5 µM), 1 µl *BigDye®* v1.1 und 4 µl *BigDye®* Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 20 µl angesetzt. Die Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Die Sequenzierreaktion umfasste eine initiale Denaturierungsphase bei 96 °C für 1 min. Danach folgten 25 Zyklen mit einer Denaturierungsphase bei 96 °C

für 10 s, einer standardmäßig genutzten *Primer*hybridisierungsphase bei 60 °C für 5 s, gefolgt von der Elongationsphase bei 60 °C für 4 min. Der Reaktionsansatz wurde nachfolgend durch Sephadex-Säulen aufgereinigt und somit freie Nukleotide entfernt. Für die Herstellung der Sephadex-Säulen wurden die *Wells* einer *MultiScreen-HV*-Platte (Merck) mit Sephadex-Pulver (GE Health Life Science) und je 300 µl deionisiertem Wasser gefüllt. Die Sephadex-Säulen wurden mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor dem Gebrauch wurde die Sephadex-Platte bei 910 x g für 5 min zentrifugiert (5804R, Eppendorf). In die nachfolgend benötigte Sequenzier-Platte (*Fisher Brand 96 Well*, Fisher Scientific) wurde pro Ansatz 10 µl *Hi-Di*™ Formamid (Thermo Scientific) vorgelegt. Die Sequenzierreaktion wurde auf die Sephadex-Säulen gegeben und bei 910 x g für 5 min in die vorbereitete Sequenzier-Platte zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse mit dem *Genetic Analyzer* 3130XL und die Auswertung der Ergebnisse mit den Programmen *Sequencing Analysis v6.0/v7.0* (Thermo Scientific) sowie *Geneious R11/Geneious Prime* (Biomatters).

2.2.9 RNA Analyse

2.2.9.1 RQ1-Verdau – Eliminierung von genomischer DNA

Beim RQ1-Verdau wird unter Verwendung des *RQ1 RNase-Free* DNase *Kits* (Promega) mit der Desoxyribonuklease (DNase) I einzel- oder doppelsträngige DNA abgebaut. Diese Methode ermöglicht die DNA-freie Präparation von RNA und verhindert somit potenzielle DNA-Kontaminationen in den nachfolgenden Reaktionen. Für die Reaktion wurden standardmäßig 500 ng RNA mit 1 U RQ1 *RNase-Free* DNase I pro 1 µg RNA in 1x RQ1-Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 min im Thermal Cycler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der DNAse I durch Zugabe von 2 µl RQ1 DNAse *Stop Solution* und der Inkubation bei 65 °C für 10 min.

2.2.9.2 Reverse Transkription von RNA (cDNA Synthese)

Mittels reverser Transkription wurde die einzelsträngige RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Sie diente nachfolgend als Template für die anschließende quantitative *Real-Time* PCR. Die reverse Transkription erfolgte mit 2/3 der zuvor behandelten RNA, dem *GeneAmp™ RNA PCR Core Kit* (Thermo Scientific) und Oligo $d(T)_{16}$ *Primern* (Thermo Scientific). 1/3 der zuvor behandelten RNA wurden für eine

Kontrollreaktion ohne die im *Kit* enthaltene MuLV reverse Transkriptase genutzt. Nachdem die Produktion des genutzte *GeneAmp™ RNA PCR Core Kit* eingestellt wurde, ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit das *LunaScript™ RT SuperMix Kit* (NEB) verwendet worden. Das *LunaScript™ RT SuperMix Kit* enthält sowohl Oligo $d(T)_{16}$ als auch *Random Hexamer Primer.* Beide *Kits* wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die jeweiligen Ansätze und PCR Bedingungen sind im Anhang (Kapitel 9.3) zu finden.

2.2.9.3 Quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) ist eine hochsensitive Methode zur zuverlässigen Quantifizierung von Transkripten und zur Detektion geringer Unterschiede in der Genexpression. Die Quantifizierung erfolgte in dieser Arbeit nach dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET, eine Form des Förster-Resonanzenergietransfers) und einer *TaqMan*-Hydrolyse-Sonde, deren 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorophor (6-FAM) sowie am 3'-Ende mit einem *dark Quencher* markiert ist. Sowohl *Primer* als auch Sonde binden sequenzspezifisch an die cDNA-Einzelstränge. Das Reporter-Fluorophor wird durch eine Lichtquelle angeregt und es kommt zu einem strahlungsfreien Energietransfer auf den in unmittelbarer Nähe befindlichen *dark Quencher*. Innerhalb der Strangverlängerungsphase wird die Sonde des Gegenstranges am 5'-Ende durch die DNA-Polymerase abgebaut und der Abstand zwischen Reporter und *dark Quencher* vergrößert sich. Dadurch ist ein strahlungsfreier Energietransfer nicht mehr möglich und die Reporter-Fluoreszenz kann detektiert werden. Somit steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur abgebauten Sonde und den entstehenden PCR-Produkten an.

Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt am Ende der Elongation in jedem Zyklus. Übersteigt die gemessene Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz, wird dies als C_p-Wert (*engl. crossing point*) angegeben. Mittels qRT-PCR wird die Expression eines Zielgens im Verhältnis zu einem stabil exprimierten Referenzgen untersucht (Pfaffl 2001; Pfaffl & Hageleit 2001). In den hier gezeigten Experimenten wurde *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) als Referenzgen und für die nachfolgende Normalisierung genutzt. Diese Normalisierung der untersuchten Gene erfolgte, um zum einen mögliche Präparationsunterschiede während der reversen Transkription auszugleichen und zum anderen, die Ergebnisse verschiedener qRT-PCRs untereinander vergleichen zu

können. Durch dieses Vorgehen heben sich individuelle Probeneffekte auf. Die Expression eines optimalen Referenzgens zeigt keinerlei Unterschiede innerhalb des Zellzyklus, zwischen unterschiedlichen Zelltypen oder Behandlungsmethoden und ist einfach zu detektieren. Die Berechnung der Expressionsunterschiede wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_p$ Methode (relative Quantifizierung ohne qRT-PCR Effizienzkorrektur) wie folgt durchgeführt:

$$\Delta\Delta Cp = \frac{\left(E_{Zielgen}\right)^{\Delta Cp_{Zielgen}(Kontrolle-Probe)}}{\left(E_{Referenzgen}\right)^{\Delta cp_{Referenzgen}(Kontrolle-Probe)}}$$

Die Genexpression des Zielgens wurde in der Referenzprobe auf 1 gesetzt. Für die relative Quantifizierung ohne Effizienzkorrektur wird eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus vorausgesetzt. Die hier gezeigten qRT-PCR-Analysen wurden in einem *Real-Time* PCR System (*LightCycler® 480* Instrument II, Roche) durchgeführt. Sie erfolgten nach der im Kapitel 2.2.9.2 beschriebenen reversen Transkription mit jeweils 2 µl cDNA, je 0,4 µM *forward*- bzw. *reverse-Primer* und 0,2 µM Sonde in 1x *LightCycler® 480 Probes Master Mix* (Roche) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Zunächst erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min. Die nachfolgenden 45 Zyklen beinhalteten eine Denaturierungsphase bei 95 °C für 10 s, eine *Primer*hybridisierungsphase bei 60 °C für 30 s und eine Elongationsphase bei 72 °C für 1 s. Abschließend erfolgte eine finale Elongation bei 40 °C für 30 s. Die verwendeten *Primer* sollten zielgenspezifisch sowie zwischen 22 und 25 bp lang sein. Des Weiteren sollten die *Primer*paare eine Schmelztemperatur von 60 – 65 °C und einem GC-Gehalt zwischen 40 - 60 % aufweisen, sowie über eine Exon-Exon Grenze gelegt werden. Die verwendete Sonde sollte möglichst nah am 3‘-Ende eines *Primers* liegen, ohne sich mit diesem zu überlappen. Die Hybridisierungstemperatur der Sonde liegt normalerweise circa 10 °C höher als die T_m der verwendeten *Primer*. Um das Quenching zu maximieren umfasst die verwendete Sonde nicht mehr als 30 Nukleotide mit einem GC-Gehalt von circa 50 % (Nolan et al. 2006). Optimalerweise zeigt das entstehende PCR-Produkt eine Größe von 100 - 150 bp. Die Messungen erfolgten standardmäßig im Triplikat.

2.2.10 Analyse von DNA-Methylierung

Um den Status der DNA-Methylierung in einer spezifischen DNA-Region beurteilen zu können, wurde zunächst eine Bisulfitbehandlung der zu analysierenden DNA durchgeführt. Diese Methode wurde von Frommer et al. entwickelt (Frommer et al. 1992). Bei ihr werden unmethylierte Cytosine durch Bisulfit desaminiert und in Uracil umgewandelt. Im Gegensatz dazu reagiert 5-Methylcytosin aufgrund der vorhandenen Methylgruppe nicht mit Bisulfit und verbleibt unverändert. In der darauffolgenden PCR wird Uracil durch Thymin ersetzt. Zwischen den methylierten und unmethylierten DNA-Sequenzen entstehen C/T-Ambivalenzen, die für die Bestimmung des Methylierungsstatus genutzt werden. Somit ist eine Differenzierung zwischen unmethylierten und methylierten DNA-Regionen mittels Sanger- oder *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung möglich.

Für die Konvertierung wurden standardmäßig 500 ng bzw. 1 µg gDNA mit dem *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research) entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Die Elution erfolgte in 10 bzw. 20 µl Endvolumen, abhängig von der zuvor für die Konvertierung eingesetzten Menge gDNA. Die Probe wurde bei -20 °C gelagert. Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde im Anschluss durch eine PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthielt 1 - 3 µl der Bisulfit-konvertierten DNA, jeweils 0,4 µM der spezifischen, *Tag*-markierten *forward-* und *reverse-Primer* und 1x *HotStarTaq® Master Mix* (Qiagen) in einem Endvolumen von 25 µl. Die Temperaturen der *Primer*hybridisierung sind im Anhang (Kapitel 9.3) aufgeführt. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung mittels Sanger oder *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung. Die Sanger Sequenzierung erfolgt mit 2 µl der PCR-Reaktion wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben. Um Veränderungen des Methylierungsstatus kleiner 10 % zu detektieren, wurde die Methode der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung genutzt. Hierbei erfolgt eine Re-PCR mit spezifischen *Index Primern* (**Tabelle 8**), welche an die *Tag*-Sequenz der zuvor genutzten *Primer* binden. Diese *Primer* enthalten eine probenspezifische Identifizierungssequenz, einen Adapter und eine Schlüsselsequenz für die Sequenzierung auf dem Illumina *MiSeq* System (Illumina). Der Re-PCR-Ansatz setzt sich aus 2 µl PCR-Produkt, jeweils 0,4 µM *forward-* und *reverse-Primer* und 1x *HotStarTaq® Master Mix* (Qiagen) in einem Endvolumen von 25 µl zusammen. Die PCR-Bedingungen sind im Anhang (Kapitel 9.3.2) aufgeführt. Das Produkt der Re-PCR wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2) auf unspezifische Produkte und eventuell vorhandenen *Primer*-Dimere untersucht. Die

weitere Probenaufreinigung erfolgte mit dem *AMPure XP* PCR-Aufreinigungssystem durch Claudia Mertel am Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Essen. Die aufgereinigten Proben wurden mit dem Illumina *MiSeq* System sequenziert und anschließend anhand ihrer probenspezifischen Identifikationssequenz mit dem *Amplikyzer* Programm (Rahmann et al. 2013) analysiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an S1-Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Alle genutzten Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert. Die humanen Zelllinien und ihre Derivate wurden unter Normalbedingungen im Inkubator (21 % O_2, 5 % CO_2, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Alle Zellen wurden regelmäßig auf Mycoplasmenkontamination (*VenorGem OneStep Mycoplasma Detection Kit*, Minerva Biolabs) entsprechend der Herstellerangaben getestet. Für die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden die in Kapitel 2.1.4.3 aufgelisteten Medien verwendet. Unter Standardbedingungen wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Hierfür wurde das Medium mittels einer Vakuumpumpe von den adhärent wachsenden Zellen abgesaugt, diese wurden dann mit DPBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurde frisches, vorgewärmtes Medium (37 °C) zugegeben. Während der Durchführung von Experimenten wurde das Medium täglich gewechselt. Die Zellen wurden zweimal pro Woche beim Erreichen von 90 % Konfluenz passagiert. Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt, Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend 0,5 – 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA zugegeben, abhängig vom verwendeten Kulturgefäß. Das zugefügte 0,05 % Trypsin-EDTA wurde direkt nach der Zugabe wieder abgesaugt und anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 2 min für Flp-In T-REx 293 bzw. 3 min für Flp-In T-REx HeLa, um die Zellen abzulösen. Die Zellen wurden in frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert und standardmäßig 1:10 bzw. 1:20 der Zellsuspension in ein neues Zellkulturgefäß mit frischem, vorgewärmtem Medium (37 °C) überführt.

2.3.2 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die Lagerung von kryokonservierten Zellen erfolgte kurzfristig bei -80 °C und langfristig in flüssigem Stickstoff bei -195 °C. Für die Kultivierung nach der Kryokonservierung wurden die Zellen möglichst schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend zu 9 ml vorgewärmten Medium gegeben und für 4 min bei 1.000 rpm (200 x g) und Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml vorgewärmten Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde abhängig von der Zellzahl anschließend zu 1 ml Medium in einem *6-Well*, zu 4 ml Medium in eine T25-Zellkulturflasche oder zu 9 ml Medium in eine T75-Zellkulturflasche gegeben und durch sanftes Schwenken gleichmäßig verteilt. Die gleichmäßige Verteilung wurde mittels Inversmikroskop (Axio Vert. A1, Zeiss) kontrolliert.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Für das Aussäen einer im Vorfeld definierten Anzahl von Lebendzellen wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (*Neubauer improved*, Marienfeld, Optik Labor) bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (0,04 %(v/v)) versetzt und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Anschließend wurden zweimal vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Das verwendete Trypanblau (0,04 %(v/v)) diente hierbei als Indikator für tote Zellen. Lebende Zellen können den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht aufnehmen. Tote Zellen nehmen den Farbstoff jedoch über ihre perforierte Zellmembran auf. Die Zellzahl pro ml ergibt sich durch das Auszählen von zweimal vier Großquadraten und folgender Rechnung:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \left(\frac{\text{gezählte lebende Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \times 10000\right) \times 2$$

Die Gesamtlebendzellzahl ergibt sich aus der berechneten Lebendzellzahl multipliziert mit dem vorhandenen Volumen. Um eine definierte Anzahl von Zellen auszusäen, wurde die benötigte Menge im Vorfeld mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Benötigte Zellsuspension [µl]} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{vorhandene Zellzahl}} \times 1000$$

Die benötigte Menge Zellsuspension wurde anschließend tropfenweise in ein neues Zellkulturgefäß gegeben und durch sanftes Schwenken gleichmäßig verteilt. Die gleichmäßige Verteilung im Zellkulturgefäß wurde im Anschluss mit Hilfe des Inversmikroskops (Axio Vert. A1, Zeiss) kontrolliert.

2.3.4 Generierung stabiler Zelllinien mit dem Flp-In T-REx-System

Die Herstellung stabiler Expressionszelllinien erfolgte durch die Co-Transfektion der Flp-In T-REx 293-, Flp-In T-REx HeLa- bzw. HeLa_DNMT3A2-Ausgangszelllinien mit dem pCSFLPe Flp-Rekombinase-Plasmid und dem pcDNA5_XL-Expressionsplasmid. Das Expressionsplasmid enthält den *upstream* gelegenen *CMV*-Promotor, einen 1 kb langen *Spacer*, *ocHBB2*, sowie den jeweiligen zu untersuchenden Testpromotor. Durch eine FRT-Rekombinationsstelle in den Ausgangszelllinien, sowie den jeweiligen Expressionsplasmiden ist eine zielgerichtete, stabile Integration gewährleistet. Für die stabile Transfektion wurden 2 x 10^5 Zellen der Flp-In T-REx 293-, Flp-In T-REx HeLa- bzw. HeLa_DNMT3A2-Ausgangszelllinie in jedes *Well* einer *6-Well*-Platte in 2 ml Standardmedium ausgesät. 48 h später erfolgte 2 h vor der Transfektion der Wechsel auf ein Kulturmedium ohne Antibiotikum (DMEM, 10 % FBS). Für die stabile Transfektion wurden sowohl das Transfektionsreagenz *FuGene® HD* als auch das Plasmid separat in *Opti-MEM™ I Reduced Serum* Medium verdünnt. Die einzelnen Ansätze wurden separat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zusammengeführt, anschließend erfolgte eine weitere Inkubation des Gesamtansatzes für 5 - 10 min bei Raumtemperatur. Jeder Transfektionsansatz setzte sich aus 10 µl *FuGene® HD* und 1 µg DNA (100 ng pcDNA5_XL-Expressionsplasmid + 900 ng pCSFLPe-Plasmid) zusammen. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen zugegeben und durch sanftes Schwenken der *6-Well*-Platte gleichmäßig verteilt. Pro Expressionsplasmid erfolgten zwei Transfektionsansätze. Als Positivkontrolle diente die Transfektion mit dem FRT-GFP2-Plasmid und als Negativkontrolle eine Transfektion die ausschließlich mit dem pCSFLPe-Plasmid erfolgte. 24 h nach der Transfektion wurden die adhärent wachsenden Zellen mit DPBS gewaschen und wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben abgelöst und in Umsetzmedium (DMEM, 10 % FBS, 1 % Pen/Strep) aufgenommen. Im Anschluss wurde jede Zellsuspension gleichmäßig auf vier 10 cm-Zellkulturschalen aufgeteilt, sodass die Konfluenz maximal 25 % betrug. Die Selektion der transgenen Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion mit dem jeweils in Kapitel 2.1.4.3 beschriebenen Selektionsmedium für 12 - 14 Tage.

2.3.5 Selektion und Isolation transgener Zellkolonien

Nach der erfolgreichen, zielgerichteten Integration des pcDNA5_XL-Expressionsplasmids an der FRT-Rekombinationsstelle, weisen die Flp-In T-REx 293- bzw. Flp-In T-REx HeLa-Zellen eine aktive Hygromycin-Resistenz anstelle eines *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgens auf. Die transgenen Zellen wurden mit dem in Kapitel 2.1.4.3 beschriebenen Hygromycin-haltigen Selektionsmedium der jeweiligen Zelllinie kultiviert. Das Medium wurde alle 48 h ohne Waschschritt erneuert. Die Selektion erfolgte für 12 - 14 Tage bis in der mitgeführten Negativkontrolle keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren. Die gewachsenen transgenen Zellkolonien der Expressionszelllinien konnten anschließend isoliert werden. Die Zellkolonien wurden mit Hilfe des Inversmikroskops (Axio Vert. A1, Zeiss) markiert und anschließend mit DPBS gewaschen. Für die Isolation der Zellkolonien wurden selbst hergestellte Isolationsringe, die aus dem oberen Teil der 200 µl Pipettenspitzen (StarLab) zugeschnitten und autoklaviert wurden, genutzt. Die Isolationsringe wurden auf einer Seite in autoklavierte Vaseline getaucht und danach um die zu isolierenden Zellkolonien gesetzt. Um einen optimalen Sitz der Isolationsringe zu gewährleisten wurden diese mit einer sterilen Pinzette festgedrückt. Zum Ablösen der Zellkolonien wurden je 40 µl 0,05 % Trypsin-EDTA in den jeweiligen Isolationsring gegeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µl Selektionsmedium und anschließendes Auf- und Abpipettieren des Mediums erfolgte das Ablösen und Vereinzeln der Zellkolonie von der 10 cm-Zellkulturschale. Die abgelösten Zellen wurden schließlich in ein *Well* einer *24-Well*-Platte mit 500 µl Selektionsmedium überführt. Die einzelnen Zellklone wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90 % kultiviert und dann expandiert. Nach der Expansion erfolgte die *lacZ*-Färbung der transgenen Zelllinien zur Kontrolle der erfolgreichen Integration des Expressionsplasmids.

2.3.6 *lacZ*-Färbung zur Kontrolle transgener Zelllinien

Nach der erfolgreichen Selektion und Isolation transgener Zellkolonien erfolgte die Kontrolle der erfolgreichen Integration des Expressionsplasmids in die Ausgangszelllinie. Wie bereits in Kapitel 1.3.2 erwähnt, weisen die Ausgangszelllinien ein *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen auf. Durch die erfolgreiche Integration des Expressionsplasmids in die Ausgangszelllinie mittels der beschriebenen FRT-Rekombinationsstelle verliert das *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen das

vorangestellte ATG-Startcodon und somit die beschriebene Zeocin-Resistenz, sowie die Möglichkeit das Enzym ß-Galactosidase zu exprimieren. Für die *lacZ*-Färbung wurden sowohl transgene Zelllinien als auch Ausgangszelllinien, als Positivkontrolle, genutzt. Die Zellen wurden in einer *24-Well*-Platte bis zu einer Konfluenz von maximal 60 % kultiviert. Zunächst wurden die Zellen mit 500 µl DPBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Fixierlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschritt mit 500 µl DPBS. Nach der Zugabe von 500 µl Färbelösung (Kapitel 2.1.4.1) erfolgte die Inkubation der Zellen für mindestens 2,5 h bei 37 °C im Dunkeln. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem Inversmikroskop (Axio Vert. A1, Zeiss) auf eine mögliche Blaufärbung und somit eine nicht erfolgreiche Integration des Expressionsplasmids untersucht. Nur Zelllinien, welche keine blau gefärbten Zellen aufwiesen, wurden für die weiteren Experimente genutzt, expandiert und kryokonserviert (**Abbildung 8**). Alle anderen Zelllinien wurden verworfen.

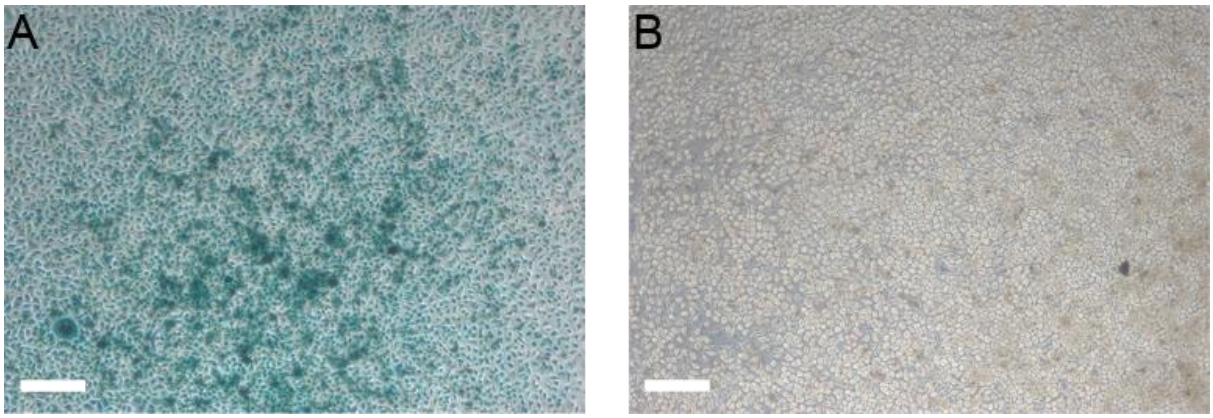


Abbildung 8: *lacZ*-Färbung. A) Positive *lacZ*-Färbung: blaue Zellen, keine Integration der Zielsequenz. **B)** Negative *lacZ*-Färbung: weiße Zellen, erfolgreiche Integration der Zielseqiuenz. Maßstabsbalken: 200µm.

2.3.7 Herstellung lentiviraler Partikel

Im Vorfeld der lentiviralen Transduktion wurden im S2-Labor der AG Schramm (Klinik für Innere Medizin, Tumorforschung, Universitätsmedizin Essen) unter Anleitung von Dr. Sophie Kalmbach lentivirale Partikel hergestellt. Hierfür wurden in einer mit Fibronectin beschichteten 10 cm-Zellkulturschale (Corning) 2 x 10^5 293FT-Zellen in Standardmedium für die Kultivierung von Wildtyp 293FT-Zellen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70 % erfolgte die Transfektion. 4 h vor der Transfektion erfolgte der Wechsel auf antibiotikafreies Medium (DMEM, 10 % FBS, 1 % L-Glu). Die Transfektion erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenz *FuGene® HD* (Promega). Jeder Transfektionsansatz besteht aus zwei Teilansätzen. In Teilansatz 1 wurden 1,5 µg VSV-G/pMD2-Plasmid, 3 µg pSPAX-Plasmid und 3 µg pLJM1-DNMT3A2-Plasmid in

insgesamt 500 µl *Opti-MEM™ I Reduced Serum* Medium verdünnt und gemischt. In Teilansatz 2 wurden 15 µl *FuGene® HD* in insgesamt 500 µl *Opti-MEM™ I Reduced Serum* Medium verdünnt. Die einzelnen Ansätze wurden separat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zusammengeführt, anschließend erfolgte eine weitere Inkubation des Gesamtansatzes für 15 min bei Raumtemperatur. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen zugegeben und durch sanftes Schwenken der 10 cm-Zellkulturschale gleichmäßig verteilt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend erneut in Standardmedium aufgenommen. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte 48 h nach der Transfektion anhand der mitgeführten Positivkontrolle, in der das FRT-GFP2-Plasmid anstelle des pLJM1-DNMT3A2-Plasmids transfiziert wurde. 72 h nach der Transfektion wurden die viruspartikelhaltigen Überstände in 15 ml Polypropylenröhrchen (Greiner Bio-One) überführt und sterilfiltriert (0,45 µM, VWR).

2.3.8 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion der Flp-In T-REx HeLa-Zellen wurde ebenfalls im S2-Labor der AG Schramm unter Anleitung von Dr. Sophie Kalmbach durchgeführt. Für die lentivirale Transduktion wurden 2×10^5 Zellen der Flp-In T-REx HeLa-Ausgangszelllinie in jedes *Well* einer *6-Well*-Platte in 2 ml Standardmedium ausgesät. 2 h vor der lentiviralen Transduktion wurde das Medium der der Flp-In T-REx HeLa-Ausgangszelllinie durch antibiotikafreies Medium (DMEM, 10 % FBS) ersetzt. Für die Transduktion wurden dem sterilfiltrierten, viruspartikelhaltigen Überstand 5 µg/ml *Polybrene Infection/Transfection Reagent (*Sigma) zugegeben. Anschließend werden je 100, 250 und 500 µl des viruspartikelhaltigen Überstand/*Polybrene*-Mixes zu den am Vortag ausgesäten Zellen gegeben. 24 h nach der Transduktion werden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und erneut in antibiotikafreies Medium (DMEM, 10 % FBS) aufgenommen. Die Selektion der transgenen Zellen erfolgte 48 h nach der Transduktion mit dem jeweils in Kapitel 2.1.4.3 beschriebenen Puromycin-haltigen Selektionsmedium. Als Selektionskontrolle wurden nicht-transduzierte Flp-In T-REx HeLa-Zellen mitgeführt. Die Selektion erfolgte bis in der mitgeführten Selektionskontrolle keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren. Im Anschluss wurden die so gewonnenen Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen expandiert und kryokonserviert.

2.3.9 Transiente Transfektion

Für das Einbringen spezifischer Expressionsplasmide (*DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57*) in die bereits hergestellten transgenen Zelllinien wurde die Methode der transienten Transfektion genutzt. 48 h vor der Transfektion wurden 2 x 10^5 Zellen pro *Well* einer *6-Well*-Platte ausgesät. 2 h vor der Transfektion erfolgte der Wechsel auf antibiotikafreies Medium (DMEM, 10 % FBS). Die Transfektion erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenz *FuGene® HD* (Promega) wie in Kapitel 2.3.4 für stabile Transfektion beschrieben. Im Unterschied zur stabilen Transfektion wurden jeweils 500 ng des zu untersuchenden Expressionsplasmids eingesetzt und es erfolgte im Anschluss keine Selektion. Nach 48 h erfolgte die Induktion der transient transfizierten, transgenen Zelllinien für drei Tage in Induktionsmedium, welches mit 1 µg/ml Doxycyclin versetzt wurde (Kapitel 2.1.4.3).

2.3.10 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung von humanen Zelllinien und ihren Derivaten wurden diese zunächst, wie beim Passagieren (siehe Kapitel 2.3.1). mit 0,05 % Trypsin-EDTA abgelöst und für 4 min bei 1.000 rpm und Raumtemperatur sedimentiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 2 ml (bei *6-Well*-Platten) bzw. 3 ml (bei T25- oder T75-Zellkulturflaschen) nicht vorgewärmtem Einfriermedium (Kapitel 2.1.4.3) resuspendiert und zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen für 20 min auf Eis gekühlt und dann bei -80 °C in Styroporboxen eingefroren. Dieses Vorgehen ermöglicht ein konstantes Absenken der Temperatur von ungefähr 1 °C/min. Für die langfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -195 °C eingefroren.

2.3.11 Induktion von transienten und stabilen Zelllinien mittels Doxycyclin

Für die Induktion der transgenen Zelllinien wurden die Zellen zunächst in einem Verhältnis von 1:10 passagiert und in je sechs *Wells* einer *6-Well*-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde mit der Induktionsbehandlung begonnen. In jeweils drei *Wells* einer *6-Well*-Platte wurde das vorhandene Selektionsmedium durch Induktionsmedium, versetzt mit 1 µg/ml Doxycyclin, ersetzt. Die verbliebenen drei *Wells* einer *6-Well*-Platte dienten als Kontrolle und wurden in Induktionsmedium ohne Doxycyclin kultiviert (Kapitel 2.1.4.3). Das Induktionsmedium wurde täglich gewechselt und die Zellen für drei bis 14 Tage kultiviert. Nach drei, sieben und zehn Tagen wurden die mit

Doxycyclin induzierten Zellen, sowie die Kontrollen passagiert. Nach drei und 14 Tagen wurden die mit Doxycyclin induzierten Zellen und die Kontrollzellen geerntet und für 4 min bei 1.000 rpm sedimentiert. Die so gewonnenen Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert und anschließend für die Extraktion von gDNA, RNA und Protein verwendet.

Die transient transfizierten Zellen wurden nach drei Tagen Induktionsbehandlung vollständig geerntet und sedimentiert. Für alle durchgeführten Induktionsexperimente wurde ausschließlich das *Fetal Bovine Serum, certified, US origin* verwendet, welches vom Hersteller als Tetracyclin-frei deklariert wurde.

2.3.12 Immunzytochemie

Für den Nachweis der Überexpression nach erfolgreicher transienter Transfektion wurden zusätzlich zu RNA- und Proteinanalysen noch Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläschen, beschichtet mit *Vitronectin-XF*™, in *24-Well*-Platten kultiviert und transfiziert. 24 h nach der transienten Transfektion wurden die Zellen einmal mit 500 µl DPBS gewaschen und anschließend je *Well* mit 250 µl 4 %igen PFA für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden dreimal für 5 min mit 500 µl DPBS gewaschen, für die intranukleare Färbung mit je 250 µl 0,3 % Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend dreimal für 5 min mit 500 µl DPBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Zellen mit je 500 µl *Blocking*-Puffer (5 % BSA in DPBS, steril filtriert) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären Antikörper (Kapitel 2.1.9.2) wurden in Antikörperverdünnungspuffer (1,25 % BSA in DPBS) verdünnt (Kapitel 2.1.4) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Negativkontrollen wurden ohne primären Antikörper mit Antikörperverdünnungspuffer inkubiert. Die Zellen wurden dreimal für 5 min mit 500 µl DPBS gewaschen und die fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper, in Antikörperverdünnungspuffer verdünnt (Kapitel 2.1.9.2), auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 2 h bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen erneut dreimal für 5 min mit 500 µl DPBS gewaschen. Für die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte eine Inkubation mit 200 µl DAPI (Stockkonzentration 1 mg/ml) in DPBS im Dunkeln für 30 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden anschließend dreimal für 5 min mit 500 µl DPBS gewaschen. Die Deckgläschen konnten dann mit Hilfe von *VECTASHIELD® Antifade Mounting* Medium (Linaris) auf Objektträgern

eingedeckelt werden. Um die Haltbarkeit zu erhöhen, wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt und die Objektträger bis zur Analyse im Dunkeln bei -20 °C gelagert. Die mikroskopische Analyse erfolgte durch Dr. Hannah Döpper mit dem Leica SP8 Confocal Mikroskop.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-PAGE

Für den Nachweis von Proteinen und Proteinmodifikationen wurde die Methode der diskontinuierlichen, denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) genutzt. Hierbei werden die Proteine elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur (BioRad) basierend auf ihrem molekularen Gewicht im Bereich von 5 – 250 kDa aufgetrennt (Laemmli 1970). Das verwendete Natriumdodecylsulfat (SDS) gehört zur Gruppe der anionischen Detergenzien und denaturiert aufgrund seiner Eigenschaften die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Des Weiteren lagert sich das enthaltene SDS an die Proteine, die somit gleichmäßig negativ geladen sind und innerhalb der SDS-PAGE, durch das Anlegen einer elektrischen Spannung, zur Anode wandern.

2.4.2 Herstellung von Polyacrylamidgelen und Elektrophorese

Die in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurden standardmäßig einen Tag vor der geplanten SDS-PAGE hergestellt. Hierfür wurde das *Mini-PROTEAN*® Gelgießsystem (BioRad) verwendet. Zu Beginn wurden alle Komponenten des Trenngels (**Tabelle 1**), mit Ausnahme von TEMED, gemischt. Die Bestandteile APS und TEMED wurden zuletzt zur Reaktion zugegeben, da diese den Polymerisationsprozess starten. Um ein Auslaufen der Gele zu verhindern, wurde als erstes ein Stopfen für die Gele angefertigt. Dafür wurden 500 µl des Trenngelgemisches, ohne TEMED, in ein Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurden zusätzlich 10 µl APS und 1 µl TEMED zugefügt und anschließend gemischt. Nachfolgend wurden 450 µl des Trenngelstopfens gleichmäßig auf 2 Gele verteilt. Die verbliebenen 50 µl dienten als Polymerisationskontrolle des Stopfens. Sobald der Stopfen polymerisiert ist, kann dem Trenngelgemisch TEMED zugesetzt werden und der noch flüssige Ansatz zügig in die Gelkammer gegeben werden. Standardmäßig werden pro Gel 5 x 630 µl Trenngelgemisch benötigt, die anschließend mit Isopropanol

überschichtet werden. Dieses Vorgehen ermöglicht zum einen eine glatte Oberfläche des Trenngels und zum anderen eine optimale Polymerisation durch den entstehenden Luftausschluss. Nach 20 - 30 min ist das Trenngel vollständig polymerisiert und das verwendete Isopropanol kann entfernt werden. Im Anschluss wird der flüssige Ansatz des Sammelgels (**Tabelle 1**) auf das Trenngel aufgeschichtet und ein 0,75 mm Kamm zur Erzeugung von Probentaschen eingesetzt. Nach 15 - 20 min ist das Sammelgel vollständig polymerisiert und die entstandenen Gele wurden sorgfältig feucht verpackt und bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert.

Tabelle 1: Komponenten für ein 10%iges Polyacrylamidgel

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
30% Bis-Acrylamid	3,3 ml	830 µl
1,5M Tris pH8,8	2,5 ml	–
1M Tris pH 6,8	–	630 µl
10% SDS	100 µl	50 µl
APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
H_2O	3,99 ml	3,4 ml

Am nächsten Tag wurde der Kamm aus dem Polyacrylamidgel entfernt und die entstandenen Probentaschen mit deionisiertem Wasser gespült. Das Gel wurden dann in die Mini-PROTEAN® Elektrophoresekammer (BioRad) gesetzt und die Kammer mit 1x Tris/Glycine/SDS Elektrophoresepuffer (BioRad) befüllt. Standardmäßig wurden 15 µl Proteinlysat versetzt mit 5 µl 4 x *Laemmli*-Puffer genutzt. Die Denaturierung des Proben-Puffer-Mix erfolgte für 5 min bei 96 °C. Die vorbereiteten, denaturierten Proteinproben können anschließend in die Probentaschen geladen werden. Als Proteingrößenstandard wurde der *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet. Eine niedrige Spannung von 23 V für 1 h ermöglicht das gleichmäßige Einlaufen der Proben in das Sammelgel. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei einer konstanten Spannung von 125 V für 2 - 3 h durchgeführt.

2.4.3 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Für die Visualisierung und weitere Bearbeitung ist es notwendig, die aufgetrennten Proteine von der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen. Dafür wurde die Methode des *Semi-Dry* Transfers genutzt. Die Nitrocellulosemembran und das Whatman-Papier wurden vor dem Transfer in 1x Tris/Glycine-Transferpuffer, versetzt mit 20 % Methanol, für 15 min abgepuffert. Der Aufbau erfolgte nach dem in **Abbildung 9** abgebildeten Schema. Der Transfer erfolgte anschließend bei 23 V für 1 h.

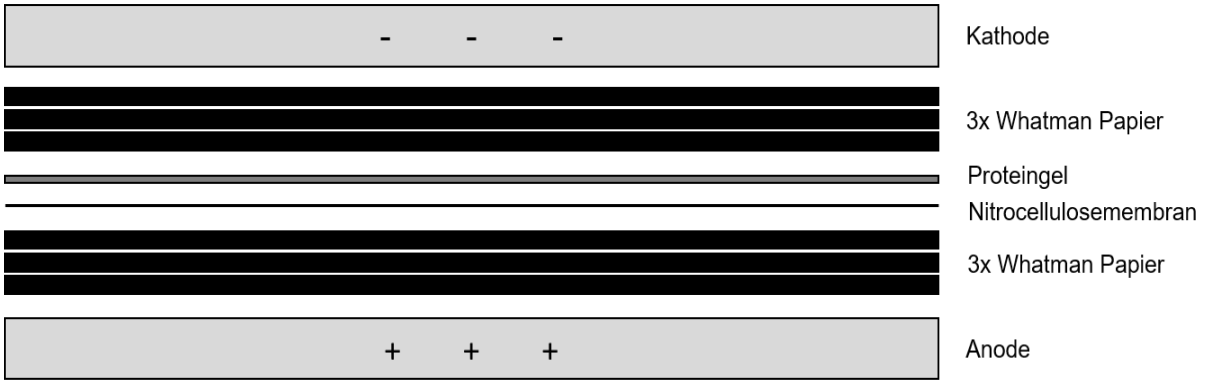


Abbildung 9: Aufbau *Semi-Dry* Blot unter Verwendung des *Semi-Dry System* Trans-Blot® SD (BioRad)

Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit einer *Ponceau S* Lösung für 15 min angefärbt. Überschüssige *Ponceau S* Lösung wurde mit deionisiertem Wasser entfernt. Nach der optischen Kontrolle wurde die Membran eingescannt. Anschließend wurde die Membran durch den Einsatz von *Blocking*-Puffer (5 % Magermilchpulver in TBS-T) zum einen wieder entfärbt und zum anderen wurden freie, unspezifische Antikörperbindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation erfolgte schüttelnd für 1 h bei Raumtemperatur.

2.4.4 Antikörperdetektion

Um Proteine auf der Nitrocellulosemembran zu detektieren, wurden spezifische Primärantikörper verwendet. Hierfür wurde die Membran mit dem Primärantikörper in *Blocking*-Puffer über Nacht bei 4 °C schüttelnd (*Shaker* S4, Elmi) inkubiert. Die verwendeten Antikörper, sowie die eingesetzten Verdünnungen können dem Kapitel 2.1.9.1 entnommen werden. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte dann durch HRP-gekoppelte Sekundärantikörper, die im Kapitel 2.1.9.1 aufgeführt sind. Die

verwendeten Sekundärantikörper wurden standardmäßig 1:1000 in *Blocking*-Puffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd (Typ 3015, GFL) inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Für die Proteindetektion wurde das *Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Detektion erfolgt auf Röntgenfilmen (Fujifilm) mit dem Curix 60 (AGFA) oder dem Chemilumineszenz-Imager (ChemoStar Touch 21,5“, Intas). Die Detektion mit Hilfe des Chemilumineszenz-Imagers erfolgte in Serienaufnahmen alle 30 s (1 x 1 oder 4 x 4 *binning*).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells

Für die Untersuchung von transkriptionellem Durchlesen und den möglichen Auswirkungen, wie die anschließende Etablierung von DNA-Methylierung, an humanen Promotoren wurden induzierbare Zellkulturmodelle generiert. Dafür wurden im Vorfeld drei geeignete Testpromotoren ausgewählt.

3.1.1 Generierung des pcDNA5_XL-Plasmids

Für die Generierung der Promotor-Expressionsplasmide erfolgte zunächst die Klonierung des pcDNA5_XL-Plasmids. Auf Grund von zwei Basenpaarmutationen im Hygromycin-Resistenzgen musste das bereits vorhandene Basic_XL-Plasmid im Rahmen dieser Arbeit neu kloniert werden und wird nachfolgend als pcDNA5_XL bezeichnet. Das Grundgerüst bildet dabei das kommerziell erwerbbare Plasmid pcDNA5/FRT/TO. Wie bereits in Kapitel 2.1.10 beschrieben enthält das Expressionsplasmid das partielle Exon 2, das vollständige Intron 2 und Exon 3, sowie das Terminationssignal des ß-Globingens des Kaninchens (*ocHBB2*). Diese Region wurde zunächst mittels Restriktionsendonukleaseverdauung (Kapitel 2.2.7.1) mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII*-HF und *XhoI* aus dem Plasmid pBS_tkneo511_BGfrt isoliert. Anschließend wurde das *ocHBB2*-Fragment mittels Ligation (Kapitel 2.2.7.3) in das Plasmid pBluescript II KS (+) integriert und resultierte somit in dem Plasmid pBS-Ex2/3. Im Anschluss wurde mit Hilfe der *Site-Directed Mutagenesis* eine *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle in das *ocHBB2*-Fragment eingefügt und führte zu dem Plasmid pBS-Ex2/3_EcoRV. Die integrierte *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle ermöglicht die spätere Integration der ausgewählten Promotorregionen in das Intron 2 von *ocHBB2*. Die verwendeten *Primer* sind in Kapitel 9.1 des Anhangs aufgeführt. Nachfolgend wurde das *ocHBB2*-Fragment mit integrierter *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle gerichtet in das pcDNA5/FRT/TO Plasmid kloniert und bildet dadurch das Plasmid pcDNA5_Ex2/3_EcoRV. Um den genomischen Kontext besser abzubilden und eine Behinderung der Transkriptionskomplexe zu verhindern, wurde der Abstand zwischen dem *upstream* gelegenen *CMV*-Promotor und dem im weiteren Verlauf integrierten Promotorregionen im *ocHBB2*-Fragment, mit Hilfe eines 1 kb *Spacers* (1065 bp, *UCSC Genome Browser, Human* GRCh37/hg19, chr2:47,624,371-47,625,435) vergrößert. Der *Spacer*

wurde mit flankierenden *HindIII*-Restriktionsschnittstellen (sowohl am 5‘- als auch am 3‘-Ende) mittels PCR generiert und anschließend in das Plasmid pcDNA5_Ex2/3_EcoRV inseriert. Die Orientierung des *Spacers* wurde mit Hilfe einer Restriktionsendonukleaseverdauung und Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Für die Restriktionsverdauung wurde die Restriktionsendonuklease *XhoI* verwendet und zeigte bei einer Tandem-Orientierung folgende Fragmente: 5102 bp und 2259 bp. Auf diese Weise entstand das Plasmid pcDNA5_XL (**Abbildung 10**), die entsprechende Plasmidkarte ist im Anhang aufgeführt (**Abbildung 46**).

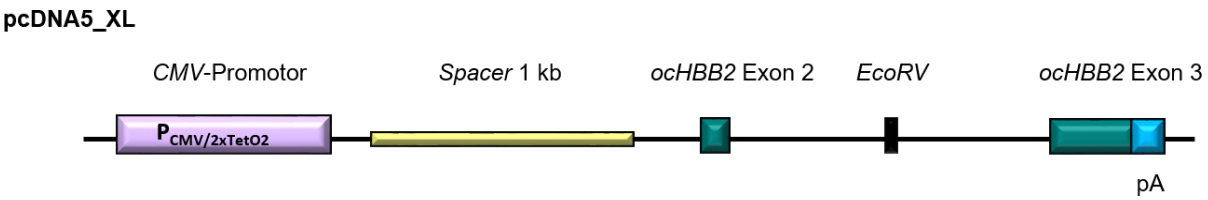


Abbildung 10: Das klonierte pcDNA5_XL-Plasmid. Das pcDNA5_XL-Plasmid enthält den induzierbaren *CMV*-Promotor (violett), einen 1 kb langen *Spacer* (gelb), *ocHBB2* (besteht aus Exon 2, Intron 2 und Exon 3; türkis) mit integrierter *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle (schwarz) und einem Terminationssignal (hellblau).

3.1.2 Auswahl der zu untersuchenden Promotorregionen

Um den Einfluss des transkriptionellen Durchlesens auf die Etablierung von *de novo* DNA-Methylierung zu untersuchen, wurden drei verschiedene Testpromotoren (*MSH2*, *SNRPN* und *GNAS A/B*) ausgewählt. Die Testpromotoren werden über die *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle, *downstream* vom *CMV*-Promotor, in das Zellkultursystem integriert. Der *MSH2*-Promotor ist in Patienten mit Lynch-Syndrom und einer Deletion des *upstream* gelegenen *EPCAM*-Gens methyliert. Die ausgewählten Promotoren *SNRPN* und *GNAS A/B* liegen in vivo maternal methyliert vor.

Das Vorkommen spezifischer Histonmodifikationen diente als Anhaltspunkt für die Auswahl der zu untersuchenden Promotorregionen von *MSH2*, *SNRPN* und *GNAS A/B*. Für die Auswahl und die nachfolgenden Abbildungen der einzelnen Promotorregionen wurden die Daten dem *UCSC Genome Browser* (*Human* GRCh37/hg19), sowie dem Konsortium *Encyclopedia of DNA Elements* (*ENCODE*) entnommen. Die dargestellten *ENCODE* Daten basieren auf den Chromatin-Immunopräzipitation-Hochdurchsatz DNA-Sequenzierungsergebnissen (ChIP-Seq) von sieben verschiedenen Zelllinien. Zu diesen gehörten die in dieser Arbeit verwendeten Flp-In T-REx 293- bzw. Flp-In T-REx HeLa-Zellen jedoch nicht. Ein

charakteristisches Merkmal für aktive Promotoren stellen H3K4me3, sowie H3K27ac dar. H3K4me3 ist vorrangig in der Nähe von Promotoren und Transkriptionsstartstellen zu finden (Meng et al. 2013; Xie et al. 2012). Des Weiteren kennzeichnen die Monomethylierung des Lysins an der vierten Position des Histons H3 (H3K4me1) und H3K27ac aktive *Enhancer* dar (Barski et al. 2007) und sind vorwiegend außerhalb von Promotorregionen bzw. in der Nähe von regulatorischen Elementen zu finden (Barski et al. 2007; Heintzman et al. 2007). Die in dieser Arbeit untersuchten Promotorregionen wurden entsprechend der beschriebenen Histonmodifikationen H3K4me1, H3K4me3 und H2K27ac ausgewählt und deckten mindestens 50 % des jeweils vorhandenen *CpG-Islands* ab. Die Sequenzen der generierten Promotorregionen sind im Anhang zu finden (**Abbildung 37 - 45**). Für *MSH2* wurde unter den genannten Kriterien ein 934 bp langer Bereich (*UCSC Genome Browser*, *Human* GRCh37/hg19, chr2:47,629,683 - 47,630,616) als Testpromotorregion ausgewählt **(Abbildung 11**A). In Vorarbeiten wurde für *MSH2* bereits ein 850 bp umfassender Bereich (*UCSC Genome Browser*, *Human* GRCh37/hg19, chr2:47,629,092-47,631,391) untersucht, dieser deckte jedoch nicht das komplette Exon 1 ab (Dissertation Heinz 2016). Aus diesem Grund erfolgte die Klonierung des erweiterten *MSH2*-Fragmentes. Die für *SNRPN* ausgewählte Testpromotorregion wurde bereits in einer Vorarbeit untersucht (Masterarbeit Utz 2015) und deckte einen 2109 bp langen Bereich (*UCSC Genome Browser*, *Human* GRCh37/hg19, chr15:25,199,040 - 25,201,150) auf Chromosom 15 (**Abbildung 11**B) ab. Um im Bereich von *GNAS A/B* die zu untersuchende Promotorregion größtmöglich abzudecken, wurden fünf unterschiedlich lange Fragmente generiert (**Abbildung 11**C). Dabei sollte der Bereich mit der höchsten Promotoraktivität im Luciferase-Reportergen-Assay für die nachfolgenden Experimente ausgewählt werden. Ebenso kann die Klonierung großer Fragmente mit Schwierigkeiten verbunden sein, aus diesem Grund wurde der Bereich in mehrere Fragmente aufgeteilt. Dabei handelt es sich zum einen um zwei kürzere Fragmente und ein längeres Fragment, welches beide kurzen Fragmente kombiniert (*UCSC Genome Browser*, *Human* GRCh37/hg19; *GNAS*^{S}_ex1_1: chr20:57,463,554 - 57,464,556, *GNAS*^{S}_ex1_2: chr20:57,464,150 - 57,465,272, *GNAS*^{S}_ex1_comb: chr20:57,463,554 - 57,465,272). Beide kurzen Fragmente enthalten das *GNAS* Exon *A/B* und zeigen eine Überlappung von 406 bp. Das kombinierte Fragment deckt einen 566 bp langen Bereich *upstream* des Exon *A/B*, das gesamte Exon *A/B* (230 bp) und einen 867 bp langen *downstream* gelegenen Bereich ab. Die dargestellten *ENCODE* Daten zeigen jedoch, dass sich der

Bereich des aktiven Promotors noch weiter in den *upstream* gelegenen Bereich der bisher beschriebenen Fragmente erstreckt. Um diesen Bereich ebenfalls zu untersuchen, wurden zwei weitere Fragmente generiert. Dabei handelt es sich zum einen um eine verlängerte Variante des *GNAS*^{S}_ex1_1 Fragmentes und um ein langes kombiniertes Fragment, welche alle zuvor beschriebenen Regionen abdeckt (*UCSC Genome Browser*, *Human* GRCh37/hg19; *GNAS*^{S}_ex1_long: chr20:57,463,050 - 57,464,556, *GNAS*^{S}_ex1_long_comb: chr20:57,463,050 - 57,465,272). Beide Fragmente enthalten ebenfalls das gesamte Exon *A/B* und decken insgesamt 1071 bp des *upstream* gelegenen Bereiches ab. Das lange, kombinierte Fragment enthält 1,6 kb des insgesamt 4,1 kb umfassenden *CpG-Islands*. Damit wurde sichergestellt, dass die aktive Promotorregion, welche durch die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27ac identifiziert wurde, durch mindestens ein Fragment abgedeckt wird.

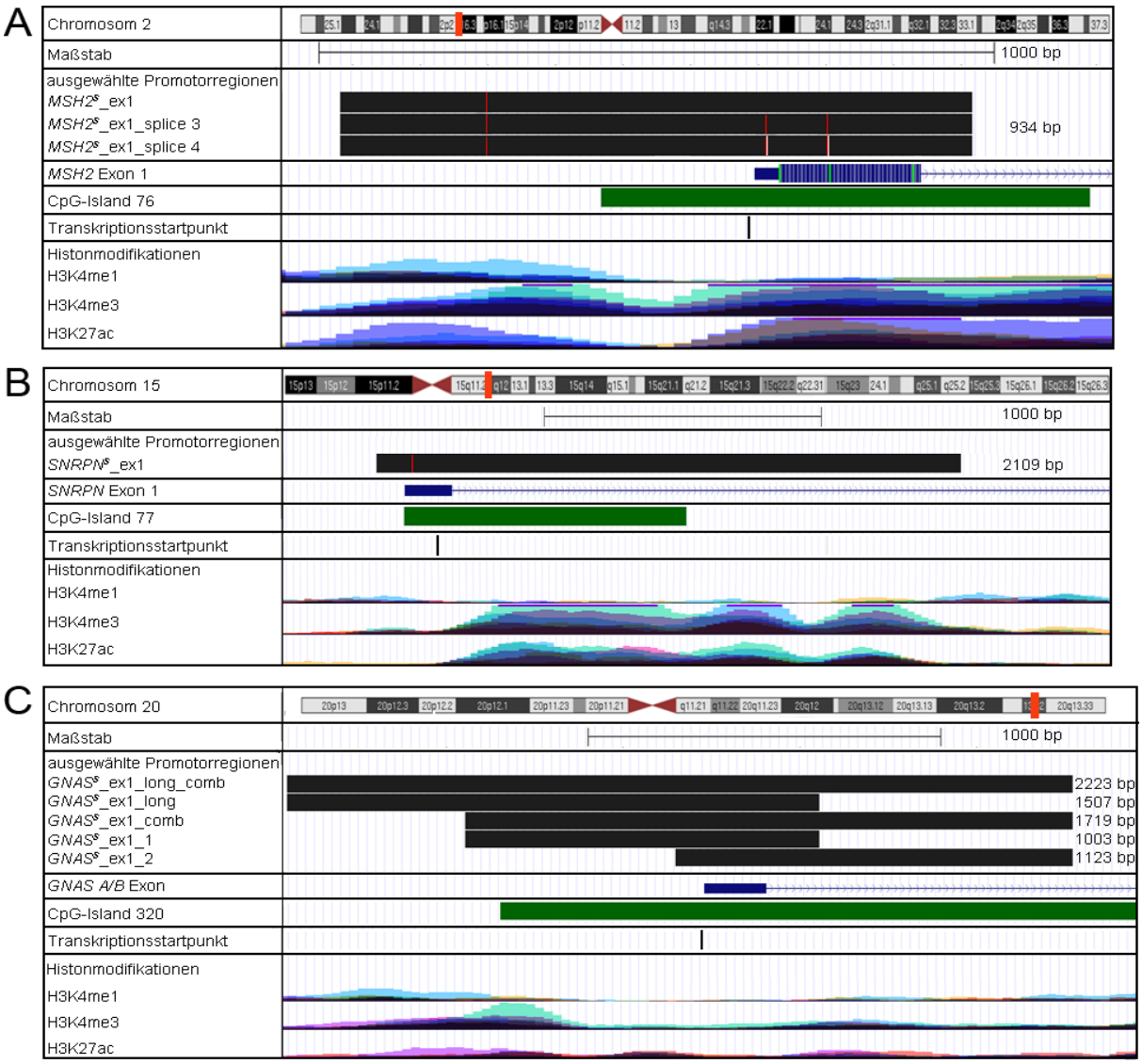


Abbildung 11: Übersicht über die ausgewählten und modifizierten Promotorregionen. Die Größen der generierten Fragmente sind angegeben. Sequenzunterschiede zur Differenzierung zwischen endogenen und transgenen Promotorregionen wurden jeweils integriert (rote und weiße Striche). Die Fragmente decken die *upstream* gelegenen Regionen, das vollständige Exon 1 (dunkelblau) sowie das jeweilige *CpG-Islands* (grüner Balken) der Promotorregion ganz oder teilweise ab. Der Transkriptionsstartpunkt (schwarzer Strich) wurde mit Hilfe von *SwitchGear Genomics* ermittelt. Daten der Histonmodifikationen H3K4me1, H3K4me3 und H3K27ac wurden ENCODE entnommen. Alle abgebildeten Informationen sind maßstabsgetreu gemäß den Daten des UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19 dargestellt. **A)** Genomische Region der *MSH2*-Promotorfragmente (schwarze Balken) auf Chromosom 2 (chr2:47,629,683-47,630,616). Transkriptionsstartpunkt (chr2:47630287). **B)** Genomische Region des *SNRPN*-Promotorfragments auf Chromosom 15 (chr15:25,199,040 - 25,201,150). Transkriptionsstartpunkt (chr15:25200129). **C)** Genomische Region der *GNAS*-Promotorfragmente auf Chromosom 20 (chr20:57,463,050 - 57,465,272). Transkriptionsstartpunkt (chr20:57464224).

3.1.3 Klonierung der Expressionsvektoren für das induzierbare Zellkulturmodell

Für die Etablierung des induzierbaren Zellkulturmodells wurden die ausgewählten Promotorregionen zunächst mit flankierenden *EcoRV*-Restriktionsschnittstellen mittels PCR generiert. Hierfür wurden für die Promotorregionen von *MSH2* und *GNAS A/B* gDNA der Flp-In T-REx 293-Zelllinie verwendet. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden auf Grund der verwendeten Polymerasen und den dadurch entstehenden 3‘-

Überhängen mittels Ligation (Kapitel 2.2.7.3) in den pCR™ 2.1-TOPO™ Vektor integriert, sowie durch Transformation und anschließender Plasmid-Präparation vervielfältigt (Kapitel 2.2.7.5). Anschließend wurden die Sequenzen der Promotorregionen mittels Sanger-Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Dabei wurden für alle generierten *GNAS* Fragmente jeweils unterschiedliche Sequenzunterschiede in der Basenpaarabfolge, im Vergleich zur Referenzsequenz, gefunden. Diese konnten auch nach mehrmaliger Wiederholung der PCRs, einem Wechsel der genutzten Polymerase und der Verwendung des spezifischen Bakterienstamms NEB® 5-alpha F'I^q Competent *E. coli* (*High Efficiency)* für die Klonierung toxischer Gene nicht verhindert werden. Da eine fehlerfreie Klonierung nicht möglich war, wurde eine Synthetisierung der entsprechenden Region angestrebt. Die Firmen Thermo Scientific und Eurofins stuften die ausgewählte Promotorregion jedoch als schwierig ein und konnten eine fehlerfreie Synthese nicht garantieren. Aus diesem Grund wurden die geplanten *GNAS A/B* Promotorregionen im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausgeschlossen und nicht weiterbearbeitet.

Um in den folgenden Experimenten zwischen der endogenen und transgenen Promotorregion von *MSH2* differenzieren zu können, wurde mittels *Site-Directed Mutagenesis* (Kapitel 2.2.7.6) ein Einzelbasenpaaraustausch entsprechend dem natürlich vorkommenden SNP (*single nucleotide polymorphism*) rs197887324 eingefügt. Die für die Generierung verwendeten Flp-In T-REx 293-, sowie die im späteren Verlauf dieser Arbeit verwendeten Flp-In T-REx HeLa-Zellen tragen ein Thymin an der gekennzeichneten Stelle, die integrierte transgene Promotorregion trägt jedoch durch den Basenpaaraustausch ein Guanin. Für die Generierung der Promotorregion von *SNRPN* wurde das Plasmid pCR-Blunt_II_SNRPN_long_ds_mut1 genutzt, welches bereits im Rahmen der Masterarbeit von Nadja Utz am Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin Essen generiert wurde. Dieses Plasmid enthält bereits die ausgewählte Promotorregion von *SNRPN* mit integriertem Basenpaaraustausch (*UCSC genome browser*, hg19 chr15:25,200,066), der ebenfalls mittels *Site-Directed Mutagenesis* integriert wurde. Die Ausgangssequenz zeigte an der genannten Stelle ein Adenin und die transgene Promotorregion ein Thymin. Die Promotorregionen von *MSH2* und *SNRPN* wurden nachfolgend mit Hilfe der *EcoRV*-Restriktionsendonuklease (siehe Kapitel 2.2.7.1) isoliert und mittels Ligation in das pcDNA5_XL-Plasmid integriert. Durch die Verwendung der Restriktionsendonuklease *EcoRV*-HF erfolgte die Ligation ungerichtet über kompatible, glatte Enden. Daher

wurde nach erfolgreicher Transformation und Plasmid-Präparation (Kapitel 2.2.7.5 und 2.2.7.8) die Orientierung der jeweils integrierten transgenen Promotorregionen in den Expressionsplasmiden mittels Restriktionsverdauung und Sanger-Sequenzierung überprüft. Zur Untersuchung der Auswirkungen von transkriptionellen Durchlesen sollten die ausgewählten Promotorregionen ausschließlich in Tandem-Orientierung (*Sense*) zu dem im pcDNA5_XL enthaltenen *CMV*-Promotor integriert werden (*MSH2*^{S}_ex1, *SNRPN*^{S}_ex1, **Abbildung 12**). Für *MSH2* wurde daher eine Restriktionsverdauung mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*-HF und *PstI*-HF durchgeführt. Bei einer *Sense*-Integration konnten mittels Agarose-Gelelektrophorese folgende Fragmente detektiert werden: 6100 bp, 1400 bp, 700 bp und 94 bp. Für *SNRPN* wurde die Restriktionsverdauung mit der Restriktionsendonuklease *HindIII*-HF durchgeführt und zeigte bei erfolgreicher Sense-Integration folgende Fragmente: 6200 bp, 2200 bp und 1000 bp. In bereits durchgeführten Luciferase-Reportergen-Experimenten wurde gezeigt, dass die ausgewählten Promotorregionen aktiv sind und in der Aktivität nicht durch Doxycyclin beeinflusst werden (Kühnel et al. 2020).

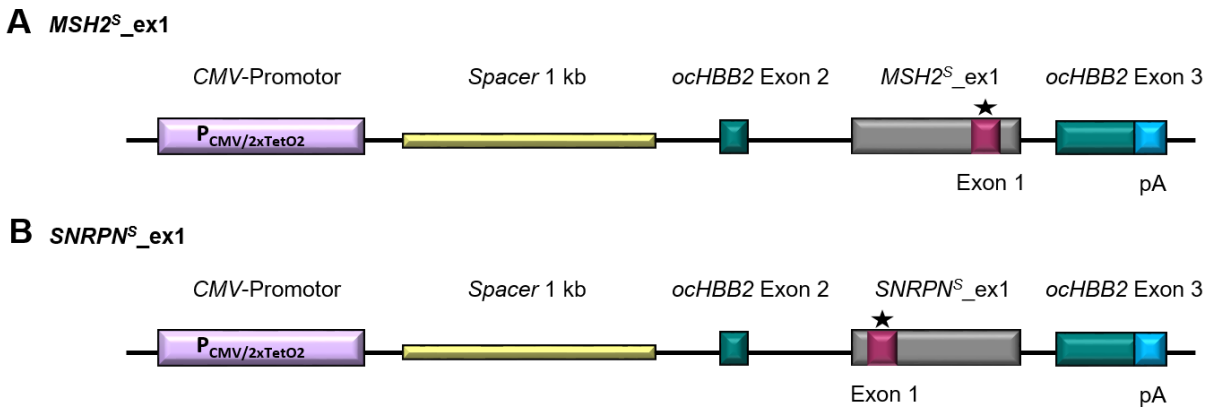


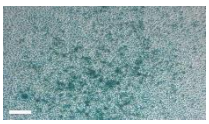
Abbildung 12: Klonierte Expressionplasmide für die Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells. Das in **Abbildung 10** aufgeführte pcDNA5_XL-Plasmid diente als Grundgerüst. Die Promotorregionen wurden in Tandem-Orientierung integriert. **A)** *MSH2*^{S}_ex1 enthält die *MSH2*-Promotorregion (grau) mit Exon 1 (pink) und integriertem Basenpaaraustausch (Sternchen) in Intron 2 von *ocHBB2*. **B)** *SNRPN*^{S}_ex1 enthält die *SNRPN*-Promotorregion (grau) mit Exon 1 (pink) und integriertem Basenpaaraustausch (Sternchen) in Intron 2 von *ocHBB2*.

3.1.4 Herstellung stabiler Flp-In T-REx-Zelllinien

Für die ersten Experimente wurde das kommerziell erwerbbare humane Flp-In™ T-REx™ 293-System für die Etablierung eines Zellkulturmodells verwendet. Dieses erlaubt, wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, mit Hilfe der Flp-Rekombinase die zielgerichtete, stabile Integration eines Zielgens in das Genom der Zellen. Die erfolgreiche Integration kann durch eine Hygromycin-Selektion mit anschließender *lacZ*-Färbung nachgewiesen werden (**Abbildung 8**). Auf diese Weise wurden für die

Promotorregionen von *MSH2* und *SNRPN* stabile Zelllinien erzeugt (**Tabelle 2**). Die ausgewählten Zellklone zeigten keine blau gefärbten Zellen. Für die nachfolgenden Experimente mit den Testpromotoren *MSH2*^{S}_ex1 und *SNRPN*^{S}_ex1 wurden jeweils drei Zellklone ausgewählt.

Tabelle 2: Auswertung der *lacZ*-Färbung in den generierten Expressionszelllinien für die einzelnen Promotorregionen. Die Anzahl der isolierten Zellklone und das Ergebnis der *lacZ*-Färbung sind aufgeführt. Eine positive *lacZ*-Färbung (blaue Zellen) zeigt eine nicht erfolgte Integration der jeweiligen Testpromotoren in die Ausgangszelllinie. Eine negative *lacZ*-Färbung (weiße Zellen) stellt eine erfolgreiche Integration dar. Die Differenz zwischen der Anzahl der isolierten und getesteten Zellklone ergibt sich aus der nicht erfolgreichen Kultivierung der fehlenden Zellklone. Maßstabsbalken: 200µm.

Zelllinie/ Promotorregion	isolierte Klone	*lacZ* positiv 	*lacZ* negativ
Flp-In T-REx 293			
MSH2^{S}_ex1	24	4	10
SNRPN^{S}_ex1	24	8	14
Flp-In T-REx HeLa			
MSH2^{S}_ex1	88	14	19
MSH2^{S}_ex1_splice3	24	7	11
MSH2^{S}_ex1_splice4	24	12	6
SNRPN^{S}_ex1	121	12	23
Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2			
MSH2^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2	24	9	13
SNRPN^{S}_ex1_DNMT3A2	24	6	16

Die ausgewählten Promotorregionen sind in den nicht-induzierten Zellen transkriptionell aktiv und führen zur Expression des *exon1/3*-Transkriptes. Im nicht-induzierten Zustand sollte der *CMV*-Promotor nur eine basale Expression des *ocHBB2*-Transkriptes zeigen (**Abbildung 13**A). In den mit Doxycyclin induzierten Zellen ist der *CMV*-Promotor stärker transkriptionell aktiv und zeigt einen Anstieg des *ocHBB2*-Transkriptes (**Abbildung 13**B). Der Effekt des *ocHBB2*-Transkriptes auf die Aktivität der Testpromotoren wurde im weiteren Verlauf untersucht. Erwartet wurde eine Reduktion der *exon1/3*-Expression durch das transkriptionelle Durchlesen des *ocHBB2*-Transkriptes (**Abbildung 13**B). Des Weiteren wurde untersucht, ob eine DNA-Methylierung der Testpromotoren erfolgt.

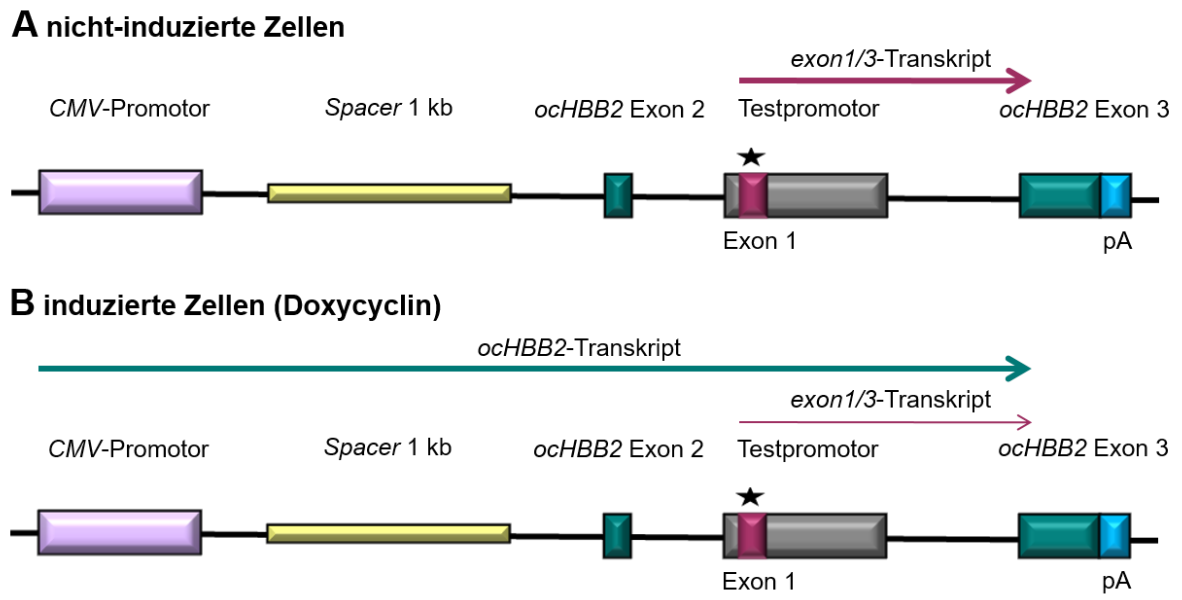


Abbildung 13: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* im induzierbaren Zellkulturmodell. Ohne Doxycyclin sollte der *CMV*-Promotor nicht transkriptionell aktiv sein. Vom Testpromotor wird das *exon1/3*-Transkript exprimiert (pinker Pfeil). **B)** In den mit Doxycyclin induzierten Zellen ist der *CMV*-Promotor aktiv und steuert die Expression des *ocHBB2*-Transkriptes (türkiser Pfeil). Durch das dadurch initiierte transkriptionelle Durchlesen wird eine Reduktion der *exon1/3*-Expression erwartet (pinker, schmaler Pfeil).

3.2 Schwache Induktion von *ocHBB2* in Flp-In T-REx 293

Nach erfolgreicher Herstellung der stabilen Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1 und *SNRPN*^{S}_ex1 in den Flp-In T-REx 293, wurde der *CMV*-Promotor durch die Zugabe von Doxycyclin in drei unabhängigen Zellklonen für zwei Tage induziert. Dadurch sollte das transkriptionelle Durchlesen der *ocHBB2*-Transkripte über die jeweiligen *exon1/3*-Transkripte hervorgerufen werden (**Abbildung 13**B). Für jeden Zellklon wurde ebenfalls eine nicht-induzierte Kontrolle mitgeführt. Die Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* wurde mittels qRT-PCR bestimmt. *GAPDH* diente in den qRT-PCR-Analysen als Referenzgen und wurde für die Normalisierung der Expressionsergebnisse genutzt. Der Mittelwert der Genexpression in den nicht-induzierten Kontrollen wurde auf eins gesetzt (**Abbildung 14**, gestrichelte Linie). Die Expression in den induzierten Klonen wurde relativ dazu bestimmt. Nach der Induktion des *CMV*-Promotors konnte für die Zelllinie *MSH2*^{S}_ex1 ein dreifacher und für die Zelllinie *SNRPN*^{S}_ex1 ein 1,3-facher Anstieg der *ocHBB2*-Expression beobachtet werden. Für die *exon1/3*-Expression wurde eine reduzierte Expression in den mit Doxycyclin induzierten Zellen erwartet. Dies konnte für die Zellklone der *SNRPN*^{S}_ex1-Zelllinie beobachtet werden, diese zeigten eine circa vierfach schwächere *exon1/3*-Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen (**Abbildung 14**). Für die *MSH2*^{S}_ex1-Zellklone wurde jedoch

keine Reduktion, sondern ein circa 19-facher Anstieg der *exon1/3*-Expression beobachtet.

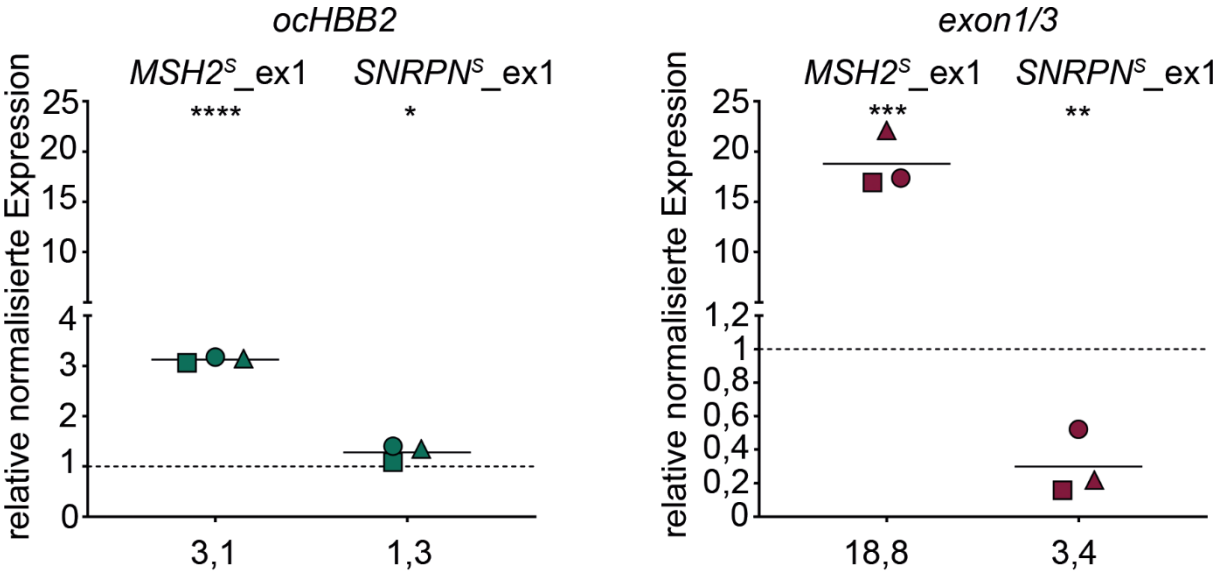


Abbildung 14: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx 293. Expression von *ocHBB2* (links, türkis) und *exon1/3* (rechts, pink) nach der Induktion mit Doxycyclin für zwei Tage. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte der einzelnen Transkripte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie). Die Expression der nicht-induzierten Zellklone wurde auf eins gesetzt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem *Student t-test* (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen zeigten für die beiden untersuchten Zelllinien nur eine geringe Induktion der *ocHBB2*-Expression. Ein möglicher Faktor hierfür könnte die verwendete Flp-In T-REx 293-Ausgangszelllinie und die Dauer der Doxycyclin-Induktion sein. In Vorarbeiten konnte für die *MSH2*-Promotorregion in Flp-In T-REx 293-Zellen ein circa zehnfacher Anstieg der *ocHBB2*-Expression beobachtet werden (Dissertation Heinz 2016). Um die verwendeten Flp-In T-REx 293-Zellen als Grund für die geringe Induktion auszuschließen, wurde die Zelllinie neu von der Firma Thermo Scientific erworben. Die daraufhin durchgeführten Experimente zeigten jedoch ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Flp-In T-REx HeLa-Zelllinie als Ausgangszelllinie für die Etablierung stabiler Expressionszelllinien genutzt. Durch bekannte Vorarbeiten wurde die Dauer der Doxycyclin-Induktion auf drei Tage verlängert (Dissertation Heinz 2016).

3.3 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa

Die Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1 und *SNRPN*^{S}_ex1 in den Flp-In T-REx HeLa-Zellen wurden wie bereits in Kapitel 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben, generiert. Die Ergebnisse der *lacZ*-Färbung sind in **Tabelle 2** dargestellt. Die Expressionszelllinien *MSH2*^{S}_ex1 und *SNRPN*^{S}_ex1 wurden in den nachfolgenden Experimenten für jeweils drei Tage mit Doxycyclin induziert (**Abbildung 15**). Wie bereits zuvor wurde während des Experiments für jeden Zellklon eine nicht-induzierte Kontrolle mitgeführt. Für die Zelllinie *MSH2*^{S}_ex1 konnte in den verwendeten Flp-In T-REx HeLa-Zellen ein 48-facher Anstieg und für *SNRPN*^{S}_ex1 eine verdoppelte *ocHBB2*-Expression nach der Induktion des *CMV*-Promotors nachgewiesen werden (**Abbildung 15**). Die *exon1/3*-Expression zeigte in den *MSH2*^{S}_ex1-Zellklonen jedoch erneut keine Reduktion, sondern eine 25-fache Steigerung. Die ebenso untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1-Zellklone zeigten, den Erwartungen entsprechend, eine 5-fache Reduktion der *exon1/3*-Expression (**Abbildung 15**). Die drei Zellklone der jeweiligen Zelllinien zeigten untereinander in den Experimenten keine wesentlichen Unterschiede oder Ausreißer. Das transkriptionelle Durchlesen des vom *CMV*-Promotor gesteuerten *ocHBB2*-Transkriptes sollte, entsprechend der Hypothese dieser Arbeit, für eine Reduktion der Expression des *downstream* gelegenen Testpromotors führen. Die Reduktion eines *MSH2*-Testpromotortranskriptes konnte bereits in Vorarbeiten beobachtet werden (Dissertation Heinz 2016). Da jedoch die *MSH2*^{S}_ex1-Zelllinie dieser Hypothese widerspricht, wurden weitere Untersuchungen der generierten Promotorregion durchgeführt.

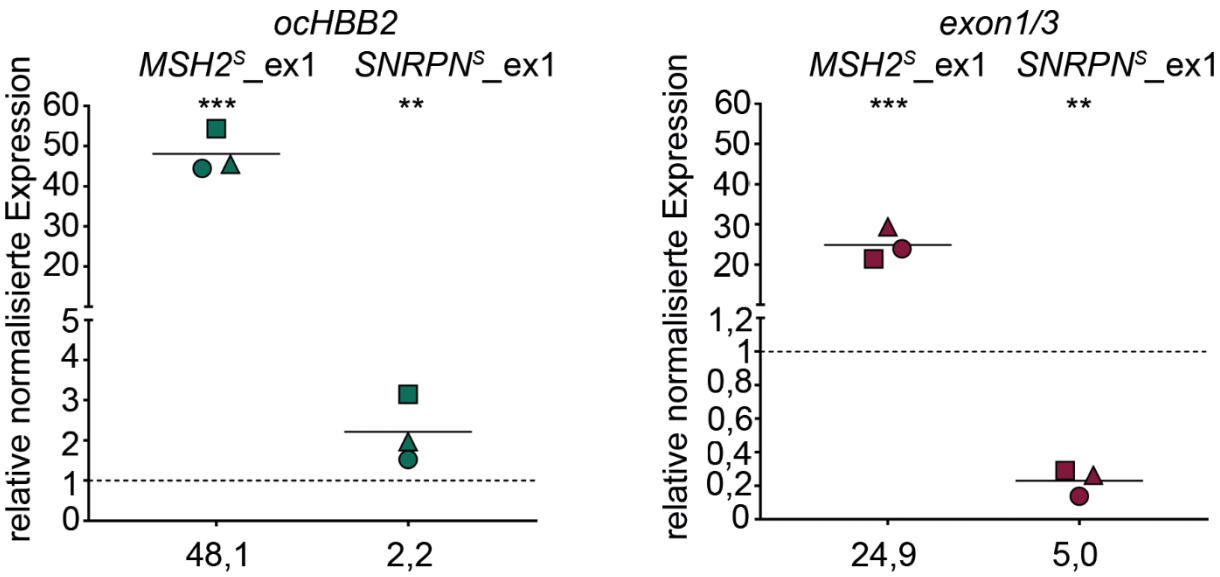


Abbildung 15: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa. *ocHBB2* (links, türkis) und *exon1/3* (rechts, pink) -Expression der *MSH2*^{S}_ex1 und *SNRPN*^{S}_ex1 Promotorregionen nach der Induktion mit Doxycyclin für drei Tage. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte der einzelnen Transkripte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem *Student t-test* (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.3.1 Kryptische *Splice Sites* in der *MSH2*-Promotorregion

Da die Expression des *exon1/3*-Transkripts in *MSH2*^{S}_ex1 mit Induktion des *CMV*-Promoters zunahm, bestand die Vermutung, dass die gewählten *Primer* für die qRT-PCR nicht nur das gespleißte *exon1/3*-Transkript detektieren, sondern zusätzliche Transkripte, die am *CMV*-Promotor begannen. Dafür wurde die qRT-PCR-Reaktion des *ocHBB2*-Transkriptes in einem 2 %igen Agarosegel analysiert. Dabei konnten zwei unterschiedlich große DNA-Fragmente detektiert werden (**Abbildung 16**A). Die detektierten Banden wurden aus dem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die genutzten *Primer* entsprechen den qRT-PCR-*Primern* für das *ocHBB2*-Transkript (**Tabelle 5**). Bei Fragment 1 handelt es sich um das reguläre *ocHBB2*-Transkript, d.h. *ocHBB2* Exon 2 gespleißt auf *ocHBB2* Exon 3, mit einer Länge von 61 bp (**Abbildung 16**B). Das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung von Fragment 2, Länge 270 bp, zeigte ein aberrantes *Splice*-Produkt, von *ocHBB2* Exon 2 auf *MSH2* Exon1, dass durch die Nutzung einer kryptischen *Splice Site* innerhalb des Exons 1 der *MSH2*-Promotorregion zu Stande kam (**Abbildung 16**B, C). Somit stellt Fragment 2 das *Splice*-Produkt von *ocHBB2* Exon 2 - *MSH2* Exon 1- *ocHBB2* Exon 3 dar (**Abbildung 16**B, C). In der qRT-PCR für das *exon1/3*-Transkript wurden somit zwei Produkte, *exon1/3* und das aberrante *Splice*-Produkt, amplifiziert und in der Quantifizierung

kumulativ erfasst. Dies führte zum beobachteten Anstieg in der Expression des *exon1/3*-Transkriptes nach Induktion.

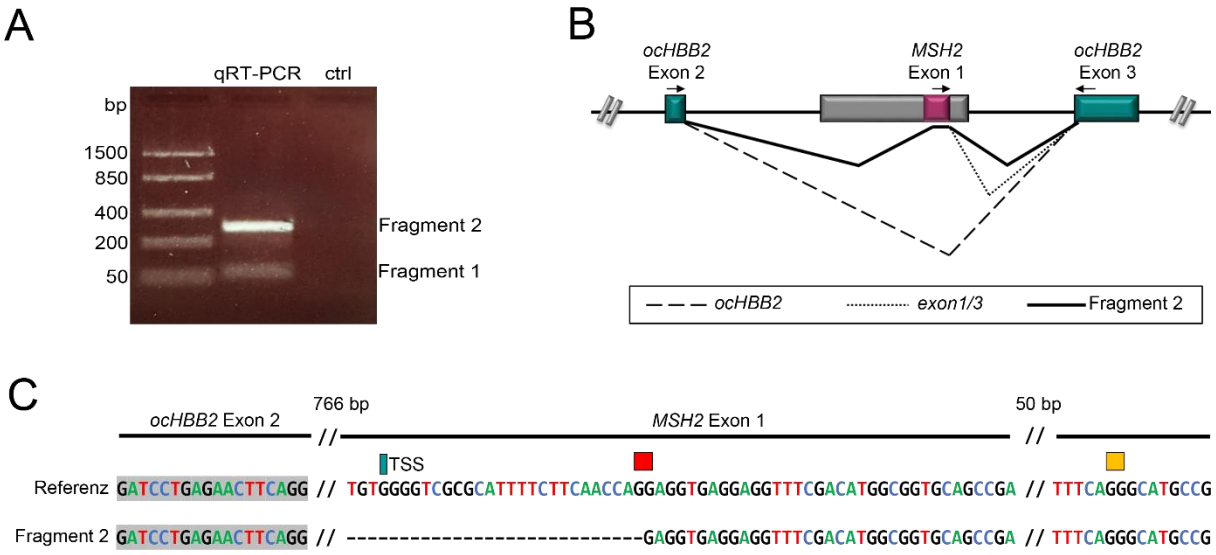


Abbildung 16: Untersuchung der *MSH2*^{S}_ex1-Promotorregion auf das Vorhandensein kryptischer *Splice Sites*. A) Gelelektrophorese des qRT-PCR Produktes für das *ocHBB2*-Transkript (qRT-PCR) und die H_2O Kontrolle (ctrl). Detektiert wurden zwei Fragmente bei 61 bp und 270 bp. Als Größenstandard diente der *Fast Ruler Low Range*. **B)** Erwartete und beobachtete *Splice*-Produkte. Dargestellt sind das *ocHBB2*-Transkript, das *MSH2 exon 1/3*-Transkript und das aberrante Spleißen von Fragment 2. **C)** Abgebildet sind im oberen Teil das partielle *ocHBB2* Exon 2 und ein Ausschnitt des Exon 1 der *MSH2*^{S}_ex1 Promotorregion. Die mittels Sanger-Sequenzierung detektierte *Splice Site* (rot), sowie die mit Hilfe des *Splice Site Prediction Tools* zusätzlich identifizierte *Splice Site* (gelb) sind dargestellt. Der Transkriptionsstartpunkt (TSS, hellblau) der *MSH2*-Promotorregion wurde mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* identifiziert. Im unteren Bereich ist das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung für Fragment 2 gezeigt. In dieser ist das aberrante Spleißen von *ocHBB2* Exon 2 auf *MSH2*^{S}_ex1 Exon 1 zu erkennen.

Daraufhin wurde die Sequenz des Exon 1 der *MSH2*-Promotorregion zusätzlich mit einem online verfügbaren *Splice Site Prediction Tool* (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) zur Vorhersage von möglichen *Splice Sites* überprüft. Mit diesem Tool konnten zwei kryptische *Splice Sites* im Exon 1 von *MSH2* detektiert werden, wobei eine bereits per Sanger-Sequenzierung von Fragment 2 identifiziert wurde (**Abbildung 16**C). Um diese unerwünschten *Splice*-Produkte zu verhindern, wurden die zwei vorhergesagten kryptischen *Splice Sites* mittels *Site-Directed Mutagenesis* (Kapitel 2.2.7.6) verändert. Bei einer anschießenden, erneuten Überprüfung mit dem *Splice Site Prediction Tool* konnten keine weiteren kryptischen *Splice Sites* detektiert werden. Mit dieser modifizierten *MSH2*-Promotorregion wurde die stabile *MSH2*^{S}_ex1_splice3-Zelllinie generiert (Kapitel 2.3.4). Die Ergebnisse der *lacZ*-Färbung sind in **Tabelle 2** dargestellt. Für die nachfolgenden Experimente wurden ebenfalls drei Zellklone der *MSH2*^{S}_ex1_splice3-Zelllinie verwendet. Nachdem die Zellklone für drei Tage mit Doxycyclin induziert wurden, ist für das *ocHBB2*-Transkript (**Abbildung 17**) ein 26-facher Anstieg der Expression im Vergleich

zu den nicht-induzierten Kontrollen zu beobachten. Für die *exon1/3*-Expression ist in den modifizierten *MSH2*^{S}_ex1_splice3-Zellklonen allerdings erneut keine Reduktion, sondern eine circa 12-fache Induktion nachweisbar (**Abbildung 17**).

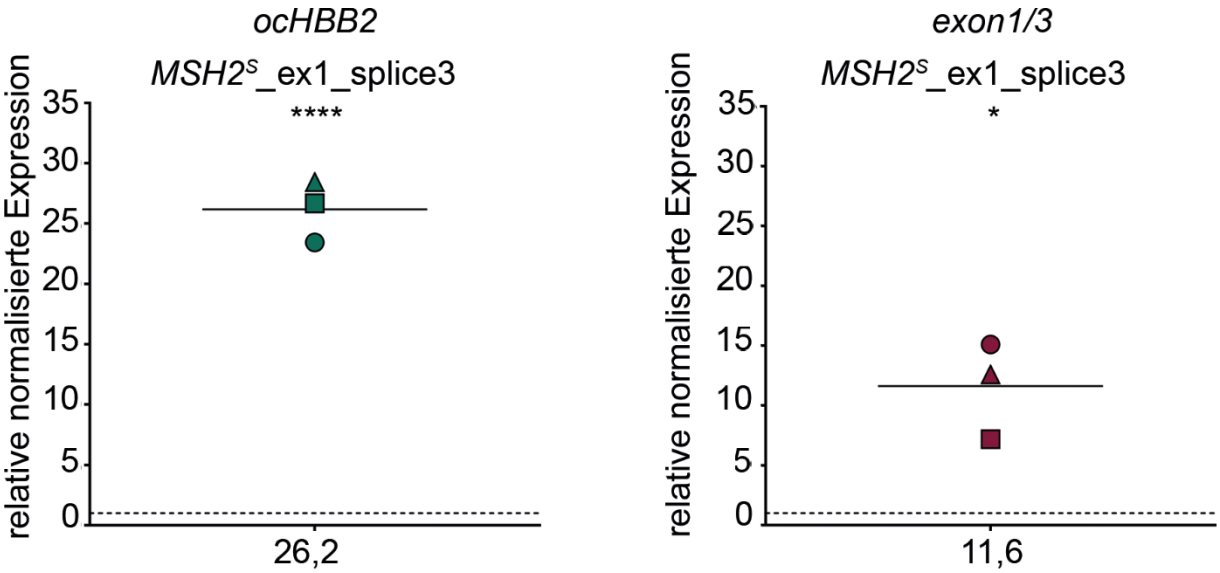


Abbildung 17: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa *MSH2*^{S}_ex1_splice3. *ocHBB2* (links, türkis) und *exon1/3* (rechts, pink) -Expression nach der Induktion mit Doxycyclin für drei Tage. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Für jeden Zellklon wurde eine nicht-induzierte Kontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze, durchgezogene Linie repräsentiert die mittlere Induktion der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem *Student t-test* (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

Dieses Ergebnis legte nahe, dass in der qRT-PCR immer noch Transkripte amplifiziert und detektiert wurden, die am *CMV*-Promotor und nicht in der *MSH2*-Promotorregion beginnen. Mittels Gelelektrophorese und anschließender Sanger-Sequenzierung zeigte sich erneut eine kryptische *Splice Site* innerhalb des Exons 1 der modifizierten *MSH2*^{S}_ex1_splice3-Promotorregion (**Abbildung 18**).

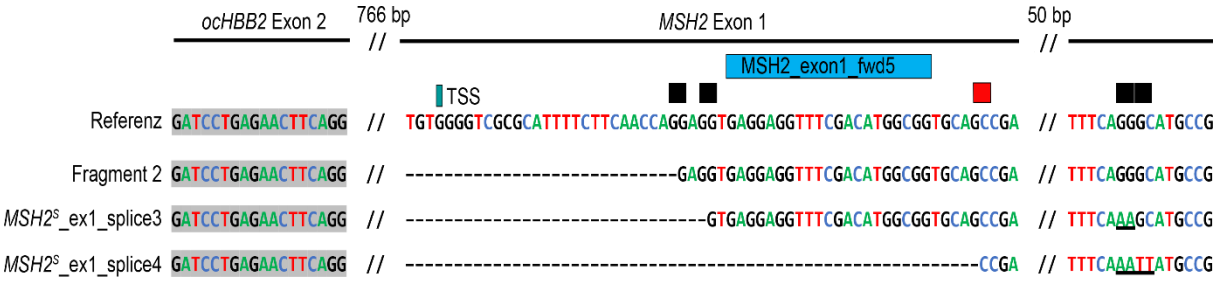


Abbildung 18: Zusammenfassung der detektierten krypitschen *Splice Sites* der unterschiedlich modifizierten *MSH2*-Promotorregionen. Abgebildet sind im oberen Teil der Abbildung das partielle *ocHBB2* Exon 2 und ein Ausschnitt des Exon 1 der *MSH2*^{S}_ex1 Promotorregion. Als Referenz dient die unveränderte Sequenz des *MSH2*^{S}_ex1-Expressionsplasmids. Die mittels Alamut® Visual (schwarze Kästchen) und Sanger-Sequenzierung (rotes Kästchen) identifizierten *Splice Sites* sind ebenfalls dargestellt. Der Transkriptionsstartpunkt (TSS, hellblau) wurde mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* identifiziert. Für die nachfolgenden qRT-PCRs wurde der *Primer* MSH2_exon1-fwd5 (blau) genutzt. Dieser befindet sich in der Region zwischen TSS und neu entstandener *Splice Site* (rotes Kästchen). Im unteren Bereich sind die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen für das extrahierte Fragment 2 (**Abbildung 16**) und die qRT-PCR Produkte der modifizierten *MSH2*^{S}_ex1_splice3 und *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Zelllinien gezeigt. Basenpaarmodifikationen mittels *Site-Directed Mutagenesis* sind schwarz unterstrichen gezeigt. Dargestellt ist das veränderte aberrante Spleißen nach der Sequenzmodifikation.

Nachfolgend wurde das Programm *Alamut® Visual* genutzt, um das Vorhandensein weiterer kryptischer *Splice Sites* zu untersuchen. Für die Detektion kryptischer *Splice Sites* werden bei diesem Programm die Informationen mehrerer webbasierter Tools wie *Genesplicer, SpliceSiteFinder, MaxEntScan*, *Human Splicing Finder* und *NNsplice* kombiniert. Somit wird ein breites Informationsspektrum zu potenziell vorhandenen *Splice Sites* bereitgestellt. Je mehr der genannten Programme eine mögliche *Splice Site* vorhersagen, umso wahrscheinlicher ist es, dass die vorhergesagte *Splice Site in vivo* auch genutzt wird. Vier der fünf involvierten Programme, zeigten zwei weitere kryptische *Splice Site*s im direkt *downstream* gelegenen Sequenzbereich der zuvor veränderten kryptischen *Splice Sites* (**Abbildung 19**A). Diese wurden ebenfalls mittels *Site-Directed Mutagenesis* verändert. Die modifizierte Sequenz wurde anschließend mit dem Programm *Alamut® Visual* erneut überprüft. Die Entstehung weiterer kryptischer *Splice Sites* wurde als unwahrscheinlich eingestuft, da nur ein bzw. zwei der involvierten Programme eine mögliche neue *Splice Site* vorhersagten (**Abbildung 19**B).

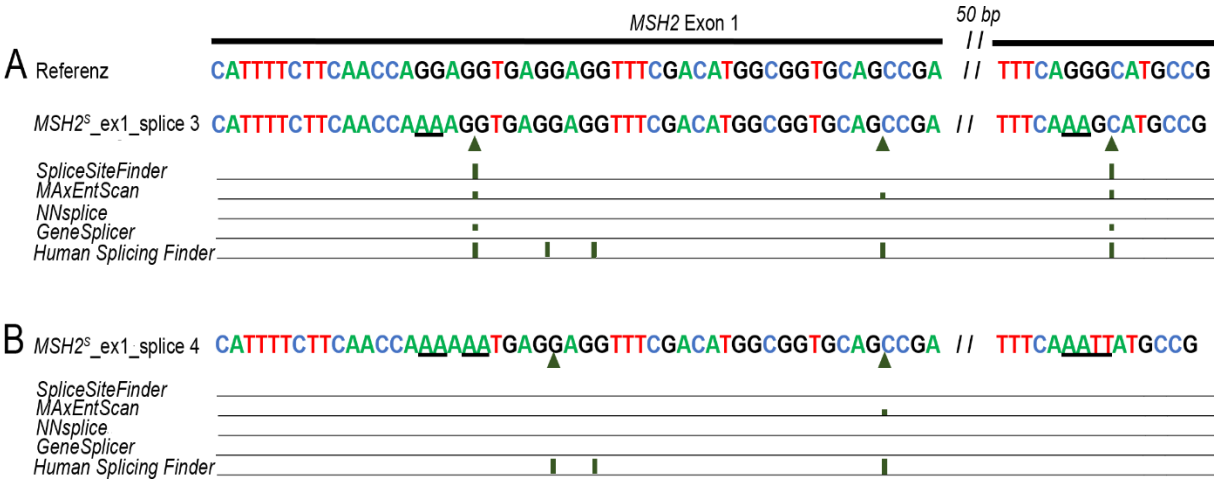


Abbildung 19: Untersuchung der *MSH2*-Promotorregion auf das Vorhandensein kryptischer *Splice Sites* mit dem Programm *Alamut*® *Visual*. Die dargestellten Angaben sind dem *Alamut*® *Visual* Programm entnommen. Für die Detektion kryptischer *Splice Sites* werden Informationen mehrerer webbasierter Tools wie *Genesplicer, SpliceSiteFinder, MaxEntScan, Human Splice Finder* und *NNsplice* genutzt. Abgebildet ist ein Teil des *MSH2* Exon 1 (Referenz). Vertikale Balken zeigen die Vorhersagen für eine *Splice Site* und Dreiecke zeigen bekannte konstitutive Spleißmuster an. Je mehr der vorhandenen Programme eine *Splice Site* vorhersagen, desto wahrscheinlicher ist es, dass die vorhergesagte *Splice Site in vivo* auch genutzt wird. Durch schwarze Unterstreichungen in der Sequenz sind die Modifikationen der Sequenz durch *Site-Directed Mutagenesis* gekennzeichnet. Die Analyse auf das Vorhandensein weiterer kryptischer *Splice Sites* erfolgte **A)** für die *MSH2*^{S}_ex1_splice3-Promotorregion **B)** für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion.

Mit dieser modifizierten *MSH2*-Promotorregion wurde die stabile *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Zelllinie generiert (Kapitel 2.3.4). Die Ergebnisse der *lacZ*-Färbung sind in **Tabelle 2** dargestellt. Mittels Sanger-Sequenzierung wurden die qRT-PCR Produkte der *ocHBB2*-Transkripte in der *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Zelllinie auf aberrantes Spleißen überprüft. Es zeigte sich erneut die Verwendung einer kryptischen *Splice Site* innerhalb des Exons 1 der modifizierten *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion (**Abbildung 18**). Nachfolgend wurde für die Detektion des *exon1/3*-Transkriptes ein *forward-Primer* (MSH2_exon1_fwd5) ausgewählt der nach der identifizierten Transkriptionsstartstelle (TSS) und vor der neu genutzten *Splice Site* (rotes Kästchen) lokalisiert ist (**Abbildung 18**). Durch die Sequenzveränderungen und den neu gewählten *Primer* wurde in den nachfolgenden qRT-PCR Experimenten, nur noch das *MSH2 exon1/3*-Transkript detektiert und nicht mehr das aberrant gespleißte Transkript der *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Zelllinie. Die modifizierte *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion enthält somit insgesamt vier modifizierte kryptische *Splice Sites* bzw. acht veränderte Nukleotide.

3.3.2 Herstellung stabiler Zelllinien mit der *MSH2^S*_ex1_splice4-Promotorregion in Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Mit der in Kapitel 3.3.1 modifizierten *MSH2*-Promotorregion wurden erneut stabile *MSH2^S*_ex1_splice4-Zelllinien generiert (Kapitel 2.3.4, **Tabelle 2**) Die generierten Zelllinien *MSH2^S*_ex1_splice4 und *SNRPN^S*_ex1 wurden für insgesamt 14 Tage mit Doxycyclin induziert. Nach drei und 14 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* mittels qRT-PCR untersucht. Für das *ocHBB2*-Transkript ist in *MSH2^S*_ex1_splice4-Zellklonen ein 24-facher und in *SNRPN^S*_ex1-Zellklonen ein zweifacher Anstieg im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen zu beobachten (**Abbildung 20**). Für die *exon1/3*-Expression ist in den modifizierten *MSH2^S*_ex1_splice4-Zellklonen eine 3,5-fache und für *SNRPN^S*_ex1 eine fünffache Reduktion zu beobachten (**Abbildung 20**). Die Ergebnisse der *SNRPN^S*_ex1-Zellklone nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion wurden bereits in Abbildung 15 gezeigt und sind hier nochmal für die bessere Verständlichkeit, sowie den Vergleich nach 14-tägiger Induktion aufgelistet. Das *ocHBB2*-Transkript wurde nach drei sowie 14 Tagen in den jeweiligen Zelllinien in ähnlicher Höhe exprimiert. Dieses Ergebnis ist auch für die Reduktion der exon1/3-Expression in den unterschiedlichen Zelllinien zu beobachten.

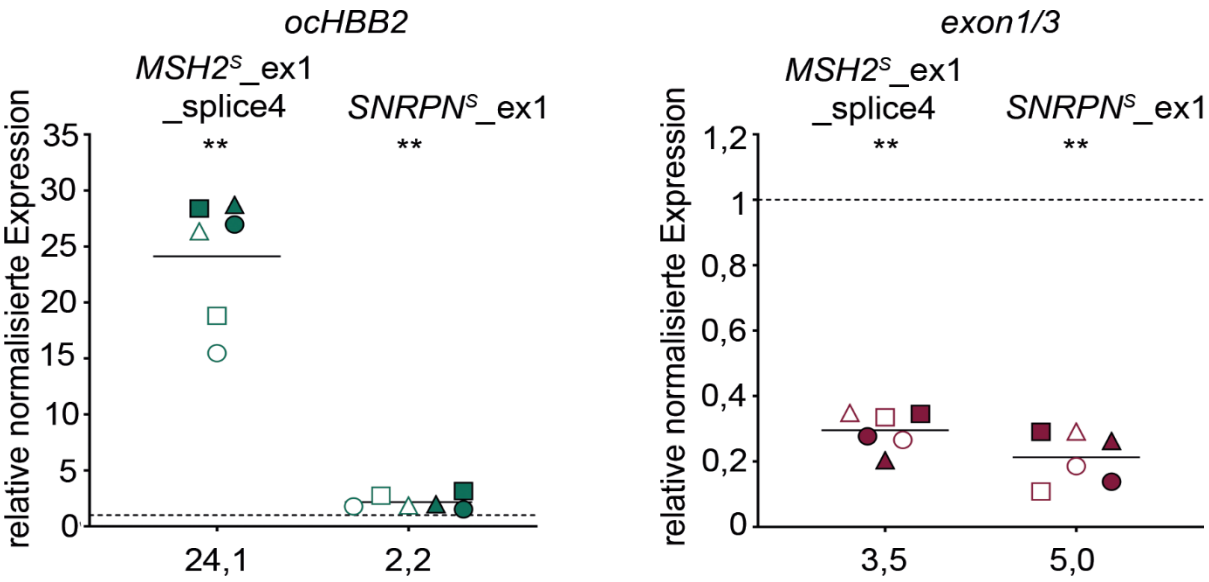


Abbildung 20: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa. *ocHBB2* (links, türkis) und *exon1/3* (rechts, pink) Expression der *MSH2^S*_ex1_splice4 und *SNRPN^S*_ex1 Promotorregionen nach der Induktion mit Doxycyclin für drei (gefüllte Symbole) und 14 Tage (offene Symbole). Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte der einzelnen Transkripte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-Test berechnet (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). Abbildung modifiziert nach Kühnel et al. 2020.

3.3.3 Reversibilitätsexperiment nach beendeter Doxycyclin-Induktion

Im nachfolgenden Experiment wurde untersucht, ob das transkriptionelle Durchlesen des *ocHBB2*-Transkriptes und damit sein Einfluss auf die nachfolgende Promotorregion zu einer stabilen Inaktivierung des Testpromotors führt. Die drei im Vorfeld bereits untersuchten Zellklone der Zelllinien Flp-In T-REx HeLa *MSH2*^{S}_ex1_splice4 und *SNRPN*^{S}_ex1 wurden für drei Tage mit Doxycyclin induziert und anschließend für weitere drei Tage in Induktionsmedium ohne Doxycyclin kultiviert. Für jeden Zellklon wurde eine nicht-induzierte Kontrolle mitgeführt. Nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion zeigten alle Klone der beiden untersuchten Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4 und *SNRPN*^{S}_ex1 die bereits zuvor beobachtete Zunahme der *ocHBB2*-Expression (***Abbildung* 25**A). Durch das so induzierte transkriptionelle Durchlesen konnte ebenso die bereits beobachtete Reduktion der *exon1/3*-Expression in allen untersuchten Zellklonen nachgewiesen werden (**Abbildung 21**B). Nach weiteren drei Tagen Kultivierung ohne Doxycyclin-Induktion zeigten alle untersuchten Zellklone sowohl für die *ocHBB2*- als auch *exon1/3*-Expression einen Wert in ähnlicher Höhe wie in den nicht-induzierten Kontrollen (**Abbildung 21**, gestreifte Balken). Diese Ergebnisse zeigen, dass das transkriptionelle Durchlesen des *ocHBB2*-Transkriptes in keiner der untersuchten Zelllinien zu einer stabilen Inaktivierung der ausgewählten Promotorregionen führt. Die durch die Doxycyclin-Induktion hervorgerufene Reduktion des *exon1/3*-Transkriptes beruht auf einem reversiblen Mechanismus.

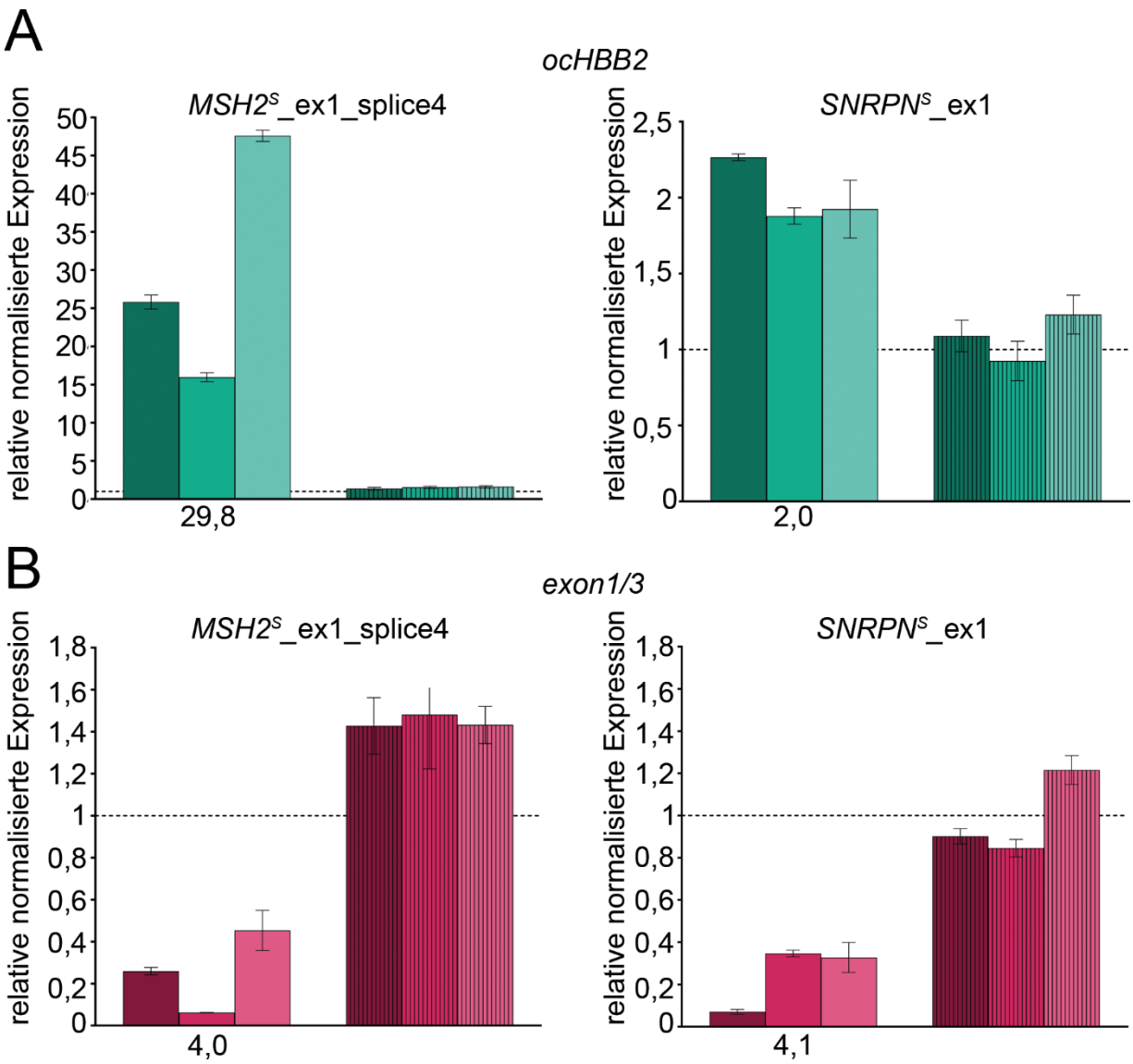


Abbildung 21: Reversibilitätsexperimente für die Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa. Die Normalisierung erfolgte mit dem Referenzgen *GAPDH***.** Nach dreitägiger Induktion mit Doxycyclin zeigten die induzierten Zellen die erwartete Zunahme der *ocHBB2*- (**A**) bzw. Reduktion der *exon1/3*- (**B**) Expression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte des Transkriptes im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Nach der Kultivierung der induzierten Zellen für weitere drei Tage in Induktionsmedium ohne Doxycyclin entsprach die Expression in den zuvor induzierten Zellen der der Kontrollen (gestreift). **A)** *ocHBB2*-Expression der *MSH2*^{S}_ex1_splice4- (links) und *SNRPN*^{S}_ex1- (rechts) Zelllinien. **B)** *exon1/3*-Expression der *MSH2*^{S}_ex1_splice4- (links) und *SNRPN*^{S}_ex1- (rechts) Zelllinien. Abbildung modifiziert nach Kühnel et al. 2020.

3.4 Untersuchung der DNA-Methylierung

Aus der gängigen Literatur ist bekannt, dass für die erfolgreiche Etablierung von DNA-Methylierung die Expression der *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3A*, speziell die Isoform 2 (*DNMT3A2*), und des Co-Faktors *DNMT3L* notwendig ist. Laut den Informationen aus dem *Human Protein Atlas* (**Tabelle 9**), ist *DNMT3A* in 293- und HeLa-Zellen gering und *DNMT3L* nicht exprimiert.

3.4.1 *DNMT3A*-Expressionsanalysen der Flp-In T-REx HeLa-Ausgangszelllinie

Da die Expression, der de novo DNA-Methyltransferasen *DNMT3A* und *DNMT3B* für die Etablierung von DNA-Methylierung essenziell ist, wurde die *DNMT3A*-Expression in den verwendeten Zelllinien mittels qRT-PCR- und Western Blot-Analyse getestet. Die Expression der zuvor genutzten Flp-In T-REx 293-Zellen wurde dabei auf eins gesetzt. Die qRT-PCR-Analysen (Kapitel 2.2.9.3) der *DNMT3A*-Expression zeigten in den Flp-In T-REx HeLa-Zellen einen circa 24-fachen Anstieg der *DNMT3A*-Expression im Vergleich zu den Flp-In T-REx-293-Zellen (**Abbildung 22**A). Die in **Tabelle 9** aufgeführten Informationen des *Human Protein Atlas* zeigen ebenfalls eine zweifach erhöhte *DNMT3A*-Expression in den Flp-In T-REx HeLa-Zellen. Mittels Western Blot konnte jedoch keine Expression von DNMT3A in beiden Zelllinien gezeigt werden (Kapitel 2.4, **Abbildung 22**B). Die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen (Kapitel 2.3.12) zeigten eine geringe DNMT3A-Expression in beiden Zelllinien (**Abbildung 22**C). Die Methoden der Proteinanalyse scheinen für die Detektion der, in der qRT-PCR nachgewiesenen, *DNMT3A*-Expression nicht sensitiv genug zu sein.

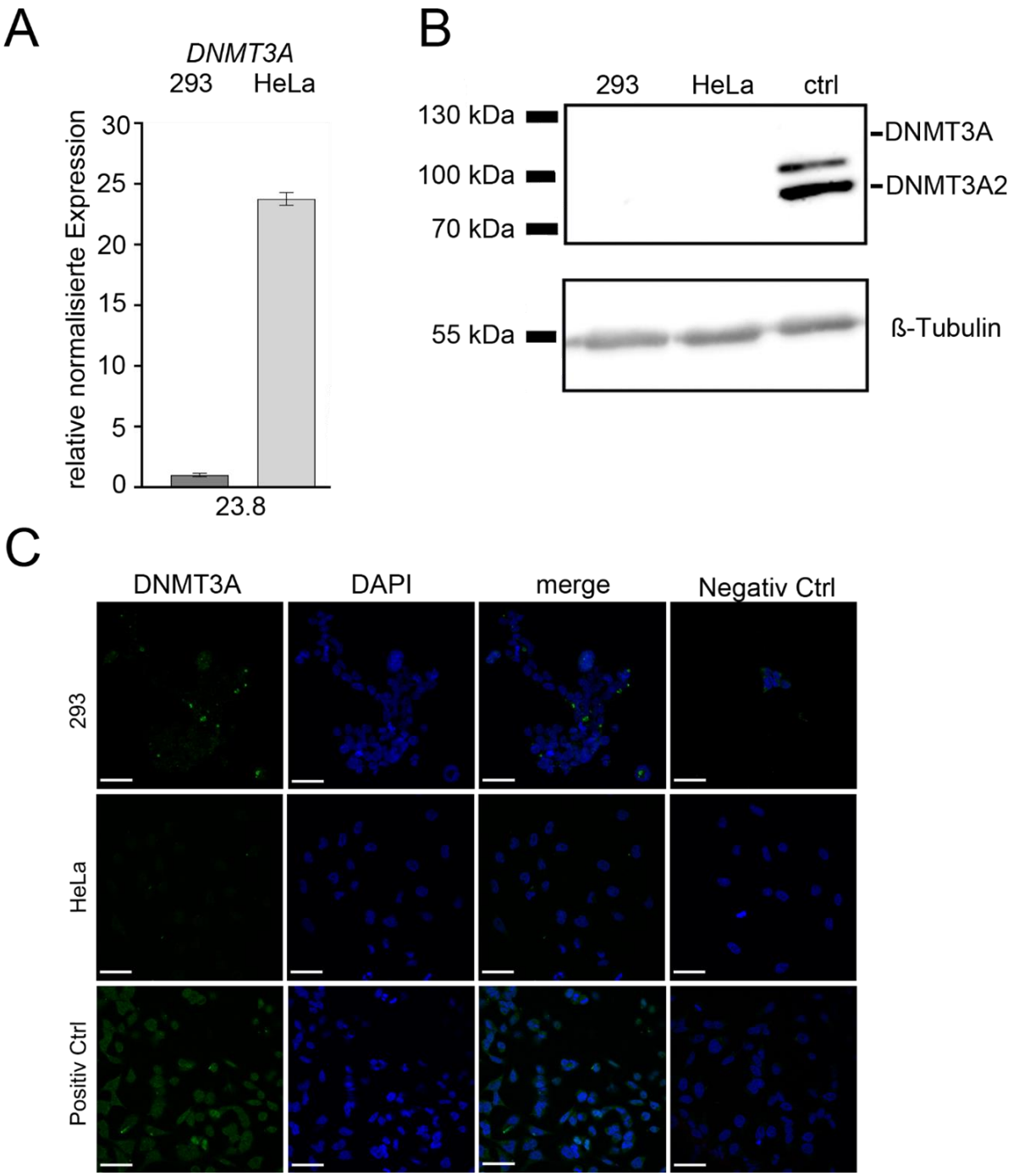


Abbildung 22: DNMT3A-Expression in Flp-In T-REx 293- und Flp-In T-REx HeLa-Zellen. Dargestellt ist der Vergleich der DNMT3A-Expression zwischen den Zelllinien Flp-In T-REx 293 (293) und Flp-In T-REx HeLa (HeLa). **A)** *DNMT3A*-Expression auf RNA-Level in Flp-In T-REx 293 (dunkelgrau) und Flp-In T-REx HeLa (hellgrau) mittels qRT-PCR. Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Der darunter angegebene Wert zeigt die relative Änderung der *DNMT3A*-Expression im Vergleich zur Expression in den Flp-In T-REx 293-Zellen (auf eins gesetzt). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte der technischen Triplikate mit den zugehörigen Standardabweichungen. Abbildung entnommen aus Kühnel et al. 2020. **B)** DNMT3A-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot in Flp-In T-REx 293 und Flp-In T-REx HeLa. β-Tubulin dient als Referenzprotein. Als Kontrollprobe (Ctrl) dienten Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen, die *DNMT3A2* stabil überexprimieren. Abbildung entnommen aus Kühnel et al. 2020 **C)** Immunzytochemische Analyse von DNMT3A. Die Zellen wurden gegen das Protein DNMT3A gefärbt. Die Detektion erfolgte über den Alexa Fluor® 488 (grün) konjugierten Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (blau) gefärbt. Positiv Ctrl: Als Positivkontrolle dienten Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen (transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfiziert), die *DNMT3A2* stabil überexprimieren. Negativ Ctrl: Bei dieser Negativkontrolle erfolgte keine Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper. Maßstabsbalken: 50µm.

3.4.2 DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Da das transkriptionelle Durchlesen zu einer Reduktion der Aktivität der Testpromotoren *MSH2^{S}*_ex1_splice4 und *SNRPN^{S}*_ex1 führte, wurde im Folgenden der Methylierungsstatus nach 14 Tagen Doxycyclin-Induktion mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Es wurde angenommen, dass dieser Zeitraum ausreichend ist, um DNA-Methylierung zu induzieren. Die verwendeten Zellen sind mit denen, die für die qRT-PCR-Analysen in Kapitel 3.3.2 verwendet wurden, identisch. Die Analyse des Methylierungsstatus erfolgte nach Bisulfit-Konvertierung, gefolgt von Sanger-Sequenzierung (Kapitel 2.2.10 und 2.2.8). Für die *MSH2^{S}*_ex1_splice4-Promotorregion zeigen die Methylierungsanalysen in den Elektropherogrammen der nicht-induzierten und induzierten Zellen, ein Thymin anstelle eines Cytosin-Nukleotids im Bereich der untersuchten CpG-Dinukleotide (**Abbildung 23**A, **Abbildung 50**A). Somit lag die *MSH2^{S}*_ex1_splice4-Promotorregion in allen untersuchten Zellklonen, den nicht-induzierten Kontrollen und den mit Doxycyclin induzierten Zellen, unmethyliert vor. Auch die Zellklone der *SNRPN^{S}*_ex1-Promotorregion zeigten nach 14-tägiger Induktion mit Doxycyclin, und dem dadurch induzierten transkriptionellen Durchlesens des *ocHBB2*-Transkriptes, keine Methylierung der untersuchten Promotorregion. Sowohl die nicht-induzierten als auch die mit Doxycyclin induzierten Zellen zeigten in der Promotorregion an jedem untersuchten CpG-Dinukleotid ein Thymin anstelle eines Cytosins (**Abbildung 23**B, **Abbildung 50**B).

Abbildung 23: Analyse der DNA-Methylierung in Flp-In T-REx HeLa-Zellen. Die für die Analyse verwendeten *Primer* (hellblau, dunkelblau) binden spezifisch im verwendeten Plasmid pcDNA5_XL und in der jeweiligen Promotorregion. Die Analyse erfolgte für nicht-induzierte (-Dox) und für 14 Tage mit Doxycyclin induzierte (+Dox) Zellen. Im vergrößerten Abschnitt ist die Referenzsequenz dargestellt. **A)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion unmethyliert vor. **B)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion unmethyliert vor.

3.5 Lentivirale Transduktion der Flp-In T-REx HeLa-Zellen

3.5.1 *DNMT3A*-Expressionsanalyse der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie

In den bisherigen Experimenten führte das transkriptionelle Durchlesen zur Repression des Testpromoters. Diese Repression wurde aber nicht durch DNA-Methylierung stabilisiert. Dies könnte an der geringen Expression der *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3A* in den verwendeten Flp-In T-REx HeLa-Zellen liegen. Wie **Abbildung 22** zeigt, war die Expression von DNMT3A auf Proteinebene mittels Western Blot nicht nachweisbar. Um eine stabile Expression von *DNMT3A2* in Flp-In T-REx HeLa-Zellen zu erreichen, wurden diese im Labor der AG Schramm (Klinik für Innere Medizin, Tumorforschung, Universitätsmedizin Essen) unter Anleitung von Dr. Sophie Kalmbach mit lentiviralen Partikeln, die das Plasmid pLJM1_DNMT3A2 enthielten, transduziert. Die dadurch hergestellte Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie wurde einer dauerhaften Puromycin-Selektion unterzogen, expandiert und kryokonserviert. In den nachfolgenden Analysen wurde die *DNMT3A*-Expression der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie mittels qRT-PCR, Western Blot und

Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Expression der Flp-In T-REx HeLa-Zellen wurde dabei auf eins gesetzt und mit der *DNMT3A*-Expression der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen verglichen. Die qRT-PCR-Analysen der *DNMT3A*-Expression zeigten in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen eine Verdopplung der Expression im Vergleich zu den zuvor genutzten, nicht-transduzierten Flp-In T-REx HeLa-Zellen (**Abbildung 24**A). Die Expression von DNMT3A auf Proteinebene konnte mittels Western Blot allerdings nicht gezeigt werden (**Abbildung 24**B). Auch in den Immunfluoreszenzfärbungen konnte keine Expression von DNMT3A gezeigt werden (**Abbildung 24**C).

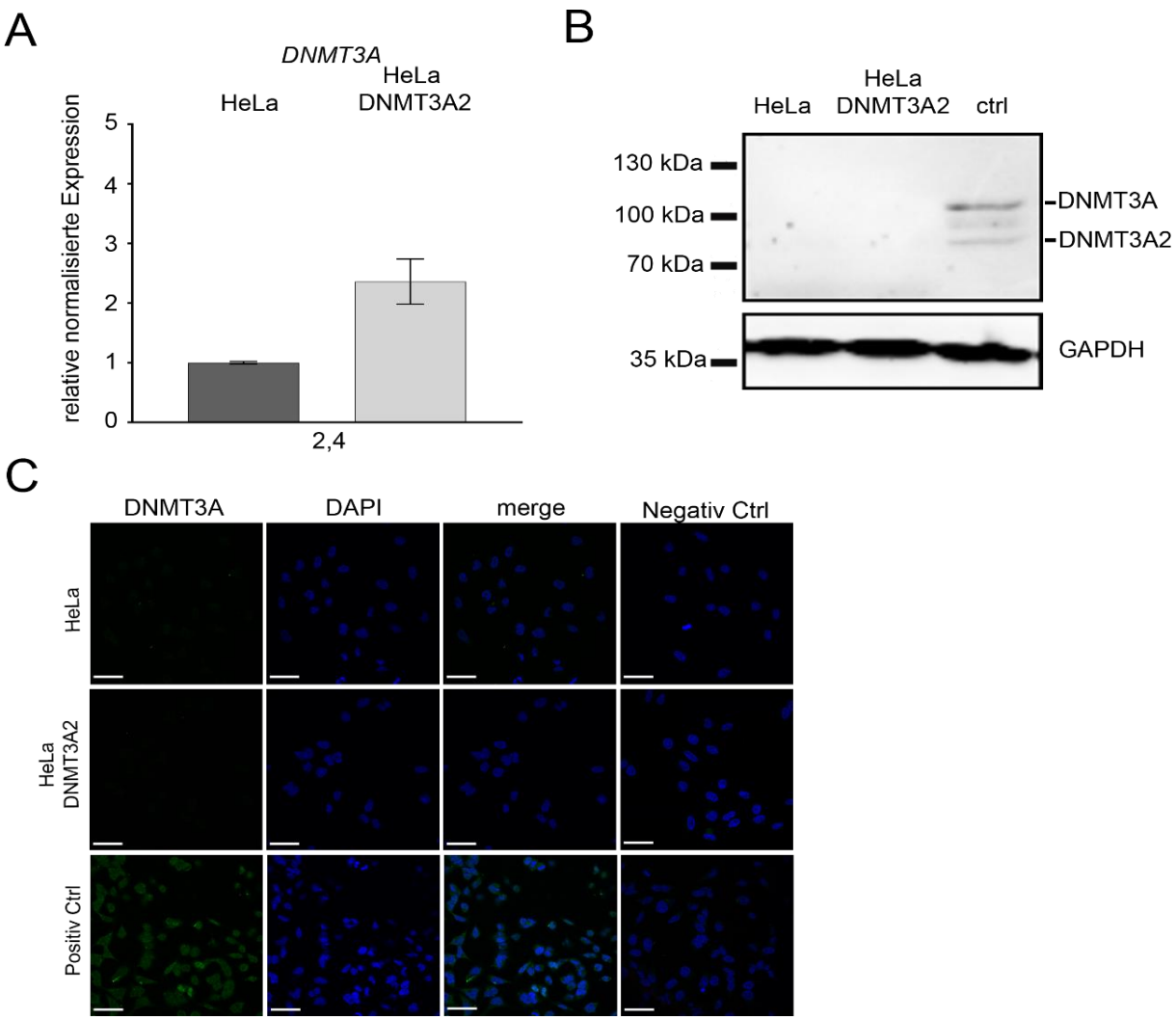


Abbildung 24: DNMT3A-Expression in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. Dargestellt ist der Vergleich der DNMT3A-Expression zwischen den Zelllinien Flp-In T-REx HeLa (HeLa) und Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 (HeLa DNMT3A2). **A)** *DNMT3A*-Expression auf RNA-Level in Flp-In T-REx HeLa (dunkelgrau) und Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 (hellgrau) mittels qRT-PCR. Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Der darunter angegebene Wert zeigt die relative Änderung der *DNMT3A*-Expression im Vergleich zur Expression in den Flp-In T-REx HeLa-Zellen (auf eins gesetzt). Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte der technischen Triplikate mit den zugehörigen Standardabweichungen. **B)** DNMT3A-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot in Flp-In T-REx HeLa und Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2. Als Referenzprotein wurde GAPDH und als Kontrollprobe (Ctrl) die induzierten pluripotenten Stammzellen ZIP13K2 genutzt. Abbildung entnommen aus Kühnel et al. 2020. **C)** Immunozytochemische Analyse von DNMT3A. Die Zellen wurden gegen das Protein DNMT3A gefärbt. Die Detektion erfolgte über den Alexa Fluor® 488 (grün) konjugierten Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (blau) gefärbt. Positiv Ctrl: Als Positivkontrolle dienten Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen (transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfiziert), die *DNMT3A2* stabil überexprimieren, dabei handelt es sich um die gleiche Kontrolle wie in **Abbildung 22**. Negativ Ctrl: Es erfolgt keine Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper. Maßstabsbalken: 50µm.

3.5.2 Herstellung stabiler Linien in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen

Die transduzierte Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie wurde nun zur Erzeugung der Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 genutzt (**Tabelle 2**). Für die nachfolgenden Analysen wurden pro Zelllinie drei Zellklone ausgewählt. Die Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4 _DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 wurden für drei und 14 Tage mit Doxycyclin induziert. Nach der Doxycyclin-Induktion zeigten die Zellklone der

MSH2^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie einen 11,7-fachen und für die *SNRPN*^{S}_ex_DNMT3A2-Zelllinie einen 2,3-fachen Anstieg der *ocHBB2*-Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen (**Abbildung 25**). Die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zellklone zeigten eine circa sechsfache und die *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellklone eine circa dreifache Reduktion der *exon1/3*-Expression (**Abbildung 25**). Das *ocHBB2*-Transkript ist nach drei sowie 14 Tagen in den jeweiligen Zelllinien in ähnlicher Höhe exprimiert. Dieses Ergebnis ist auch für die Reduktion der *exon1/3*-Expression in den unterschiedlichen Zelllinien und innerhalb der analysierten Zellklone zu beobachten. Jedoch zeigt die *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Zelllinie einen Ausreißer in der Genexpression von *ocHBB2* und die *SNRPN*^{S}_ex1-Zelllinie in der Expression von *exon1/3* nach 14-tägiger Induktion.

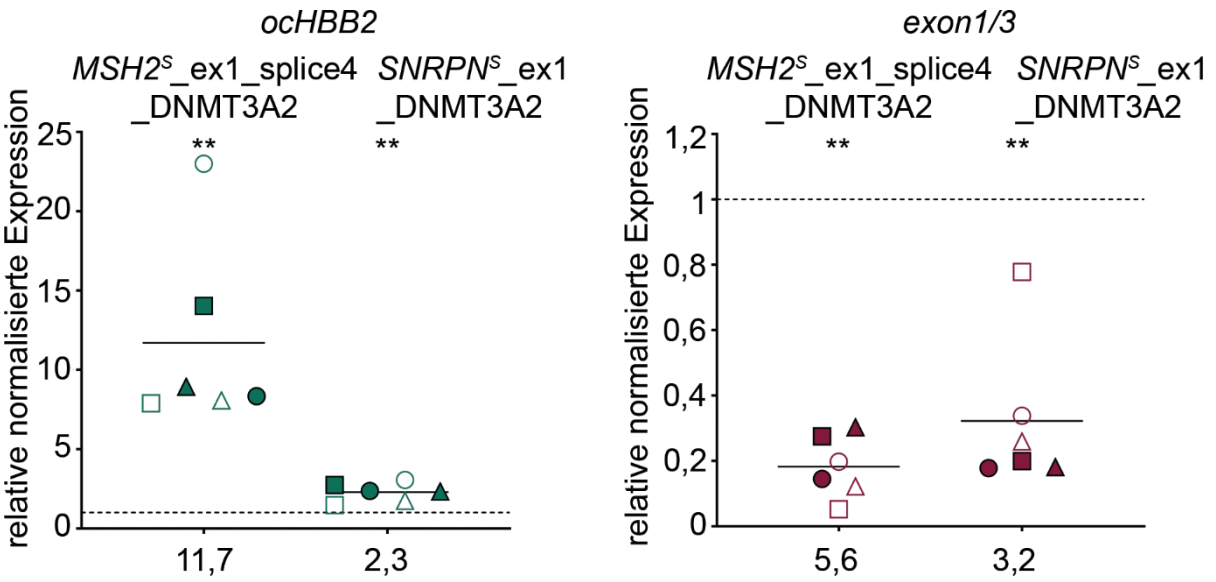


Abbildung 25: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2. Die Expression von *ocHBB2* (türkis) und *exon1/3* (pink) nach der Induktion mit Doxycyclin für drei (gefüllte Symbole) und 14 Tage (ungefüllte Symbole). Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Mann-Whitney-Test (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). Abbildung modifiziert nach Kühnel et al. 2020.

3.5.3 Analyse der DNA-Methylierung in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen

Nachdem der Effekt des transkriptionellen Durchlesens des *ocHBB2*-Transkriptes auf die *downstream* gelegenen Promotorregionen von *MSH2* und *SNRPN* nachgewiesen werden konnte, wurde der Effekt auf den Methylierungsstatus der Testpromotoren untersucht. Die Analyse des Methylierungstatus in jeweils drei Zellklonen jeder Zelllinie nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion erfolgte mittels *MiSeq-Amplicon-*

Sequenzierung, da bei dieser Methode auch Methylierungsänderungen unter 10% detektiert werden können. Bei der PCR-Reaktion wurden nur die Sequenzen der transgenen Testpromotoren vervielfältigt und analysiert. Für die ausgewählten Promotorregionen wurde zusätzlich der jeweilige integrierte Basenpaaraustausch für die Unterscheidung zwischen transgener und endogener Promotorregion abgedeckt. Im unmethylierten Zustand weisen die Zellen im Bereich der CpG-Dinukleotide ein Thymin anstelle eines Cytosins auf. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen bestimmt. Für die *MSH2*-Promotorregion wurden insgesamt 30 CpG-Dinukleotide und für die *SNRPN*-Promotorregion 21 CpG-Dinukleotide abgedeckt. Die Methylierungsanalyse zeigte für keine Zelllinie eine Änderung des Methylierungsstatus nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion. Exemplarisch ist in **Abbildung 26** jeweils ein Zellklon jeder Zelllinie dargestellt. Die Ergebnisse aller untersuchten Zellklone der jeweiligen Zelllinien sind im Anhang aufgeführt (**Abbildung 53, Tabelle 8**).

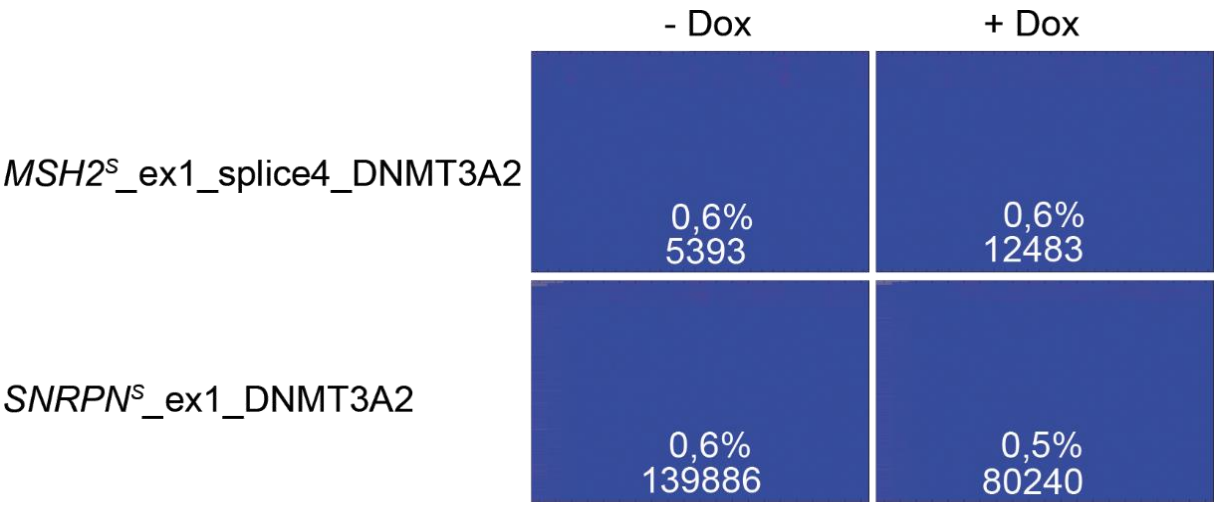


Abbildung 26: Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion. Für die Methylierungsanalyse wurde für die MSH2^S_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie ein 30 CpG-Dinukleotide umfassender Bereich der Promotorregion ausgewählt. Der ausgewählte Promotorbereich für die Methylierungsanalyse der SNRPN^S_ex1_DNMT3A2-Zelllinie deckte 21 CpG-Dinukleotide ab. Die Ergebnisse der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA nicht-induzierter Zellen (-Dox) und für drei Tage (+Dox) mit Doxycyclin induzierten Zellen sind dargestellt. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent (obere Zahl) wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (untere Zahl) bestimmt. Die Promotorregionen lagen in nicht-induzierten und induzierten Zellen beider Zelllinien ausschließlich unmethyliert vor. Abbildung entnommen aus Kühnel et al. 2020.

Da die Methylierungsanalyse der Promotorregionen nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung keine Methylierungsänderung ergab, wurden die Zellklone nach 14 Tagen Doxycyclin-Induktion mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. In **Abbildung 27** ist exemplarisch jeweils ein Zellklon der

untersuchten Promotorregionen dargestellt. Die verwendeten Zellen sind mit denen, die für die qRT-PCR-Analysen in Kapitel 3.5.2 verwendet wurden, identisch. Die Methylierungsanalyse der *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion mittels Sanger-Sequenzierung zeigt in den nicht-induzierten und induzierten Zellen, ein Thymin anstelle eines Cytosin Nukleotids im Bereich der untersuchten CpG-Dinukleotide (**Abbildung 27**A, **Abbildung 51**A). Somit lag die *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion in allen untersuchten Zellklonen unmethyliert vor. Auch die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion zeigte nach 14-tägiger Induktion mit Doxycyclin keine Methylierung der untersuchten Promotorregion in allen untersuchten Zellklonen. Sowohl die nicht-induzierten als auch mit Doxycyclin induzierten Zellen zeigten ein Thymin anstelle eines Cytosins an jedem untersuchten CpG-Dinukleotid (**Abbildung 27**B, **Abbildung 51**B).

Abbildung 27: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. Die für die Analyse verwendeten Primer (hellblau, dunkelblau) binden spezifisch im verwendeten Plasmid pcDNA5_XL und in der jeweiligen Promotorregion. Die Analyse erfolgte für nicht-induzierte (-Dox) und für 14 Tage mit Doxycyclin induzierte (+Dox) Zellen. Im vergrößerten Abschnitt ist die Referenzsequenz dargestellt. **A)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Promotorregion unmethyliert vor. **B)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion unmethyliert vor.

3.6 Transiente Überexpression von *DNMT3L* in Flp-In T-REx HeLa-DNMT3A2-Zellen

3.6.1 Analyse der DNMT3L-Expression

Die bisher verwendeten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen zeigten in den Methylierungsanalysen vollständig unmethylierte Promotorregionen in allen untersuchten Zelllinien. Die Daten des *Human Protein Atlas* zeigen, dass der aus der Literatur bekannte Co-Faktor *DNMT3L,* in HeLa-Zellen nicht exprimiert wird (**Tabelle 9)**. Aus diesem Grund wurden die bisher verwendeten Zelllinien aus Kapitel 3.5.2 mit *DNMT3L* transient transfiziert und der Einfluss auf die Genexpression der Testpromotoren und die Änderung des Methylierungsstatus untersucht. Die Überexpression von DNMT3L wurde mittels qRT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Die Expression von *DNMT3L* in den nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen wurde in der qRT-PCR-Analyse auf eins gesetzt. Die qRT-PCR-Analysen der transienten *DNMT3L* Transfektion zeigten in den *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinien einen signifikanten Anstieg der *DNMT3L*-Expression im Vergleich zu den zuvor genutzten, nicht-transfizierten Zellen (**Abbildung 28**A). Der Expressionsnachweis auf Proteinebene mittels Western Blot zeigte ebenfalls eine Überexpression von DNMT3L in beiden Zelllinien im Vergleich zu der nicht-transfizierten Kontrollprobe (**Abbildung 28**B). In der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung zeigte die mit *DNMT3L* transient transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Ausgangszelllinie einen deutlichen Anstieg der DNMT3L-Expression im Vergleich zu den nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen (**Abbildung 28**C).

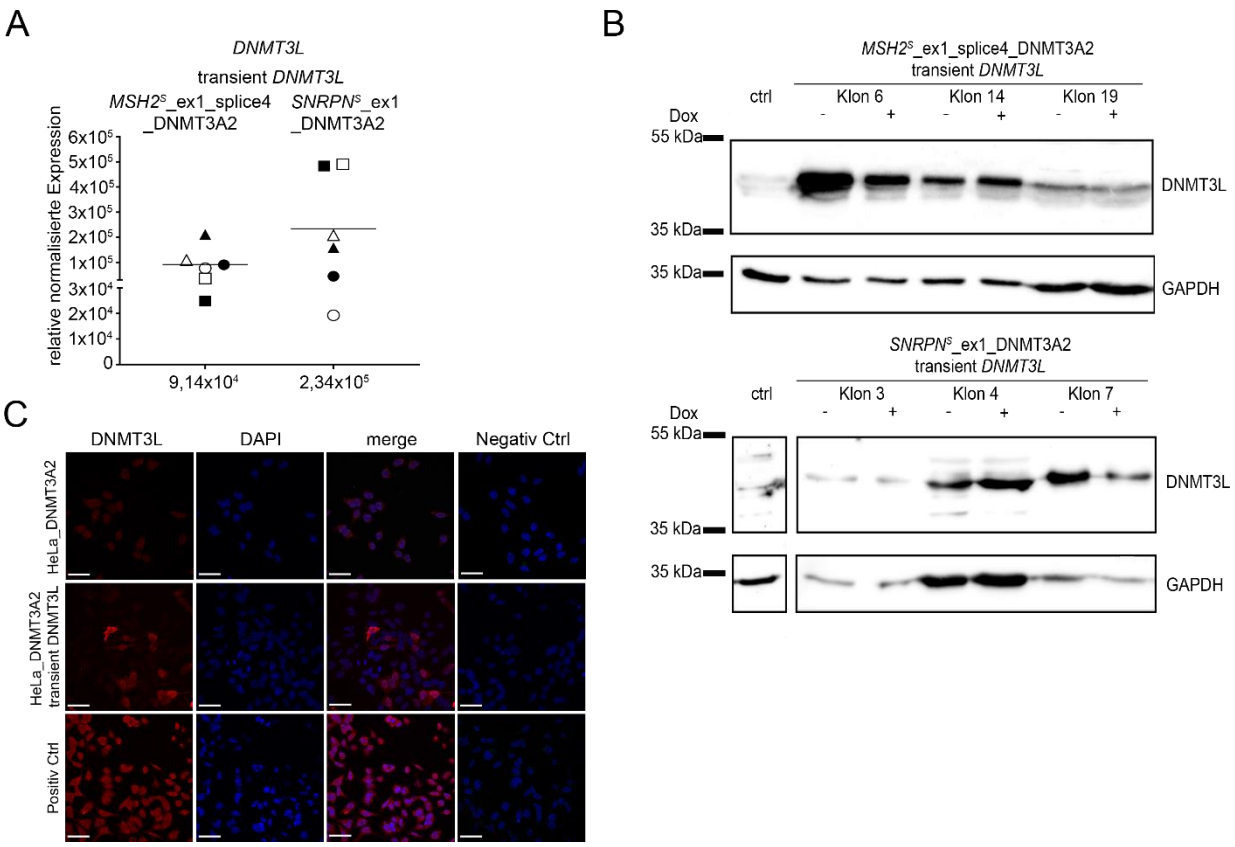


Abbildung 28: DNMT3L-Expressionsanalyse der mit *DNMT3L* transient transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. A) *DNMT3L*-Expression in *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellen, auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR, nach transienter Transfektion. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone, nicht-induzierte (schwarze Symbole) und für drei Tage mit Doxycyclin induzierte (weiße Symbole) Zellen. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Expression von *DNMT3L*. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte zu nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen, deren Expression auf eins gesetzt wurde. **B)** DNMT3L-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot in *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2. Als Referenzprotein wurde GAPDH und als Kontrollprobe (Ctrl) nicht-transfizierte Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen genutzt. **C)** Immunzytochemische Analyse von DNMT3L in der Flp-In T-REx_DNMT3A2-Ausgangszelllinie 24h nach transienter Transfektion. Die Zellen wurden gegen das Protein DNMT3L gefärbt. Die Detektion erfolgte über den Alexa Fluor® 555 (rot) konjugierten Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (blau) gefärbt. Positiv Ctrl: Als Positivkontrolle dienten Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen (transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfiziert), dabei handelt es sich um die gleiche Kontrolle wie in **Abbildung 22**. Negativ Ctrl: Es erfolgt keine Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper. Maßstabsbalken: 50µm.

3.6.2 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3*

Die mit *DNMT3L* transient transfizierten Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 wurden für drei Tage mit Doxycyclin induziert. Anschließend wurde der Effekt der Doxycyclin-Induktion, unter dem Einfluss der transienten *DNMT3L*-Transfektion, auf die Genexpression mittels qRT-PCR untersucht. Nach der Doxycyclin-Induktion zeigten die Zellklone der *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie einen achtfachen und die *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie einen zweifachen Anstieg der *ocHBB2*-Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen (**Abbildung 29**). Bei der Analyse der *exon1/3*-Expression zeigten beide Zelllinien eine circa dreifache Reduktion der *exon1/3*-Expression (**Abbildung 29**).

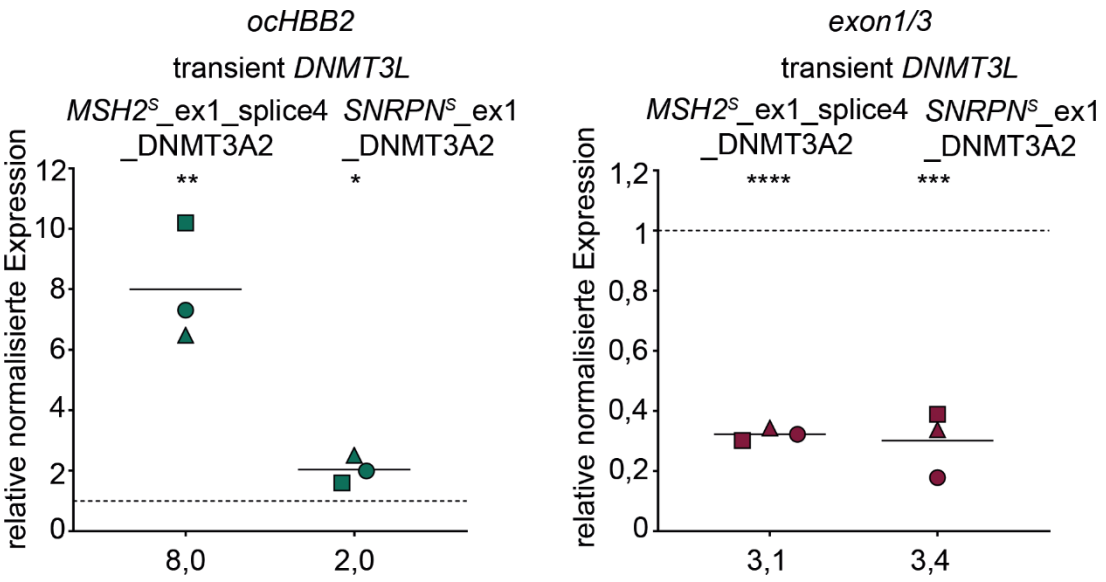


Abbildung 29: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 nach transienter *DNMT3L*-Transfektion. Expression von *ocHBB2* (türkis) und *exon1/3* (pink) nach transienter *DNMT3L*-Transfektion und dreitägiger Doxycyclin-Induktion in den Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels *Student t-test* (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.6.3 DNA-Methylierungsanalyse

Der Effekt der zusätzlichen transienten *DNMT3L*-Transfektion auf den Methylierungsstatus der Testpromotoren wurde nach drei Tagen Doxycyclin-Induktion mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung untersucht. Für die *MSH2*-Promotorregion wurden insgesamt 30 CpG-Dinukleotide und für die *SNRPN*-Promotorregion 21 CpG-Dinukleotide abgedeckt. Die untersuchten Zelllinien lagen in allen Zellklonen nach der transienten *DNMT3L*-Transfektion und dreitägiger Doxycyclin-Induktion vollständig unmethyliert vor. In **Abbildung 30** ist jeweils ein Zellklon jeder Zelllinie dargestellt. Die Ergebnisse aller untersuchten Zellklone der jeweiligen Zelllinie sind im Anhang aufgeführt (**Abbildung 54, Tabelle 8**).

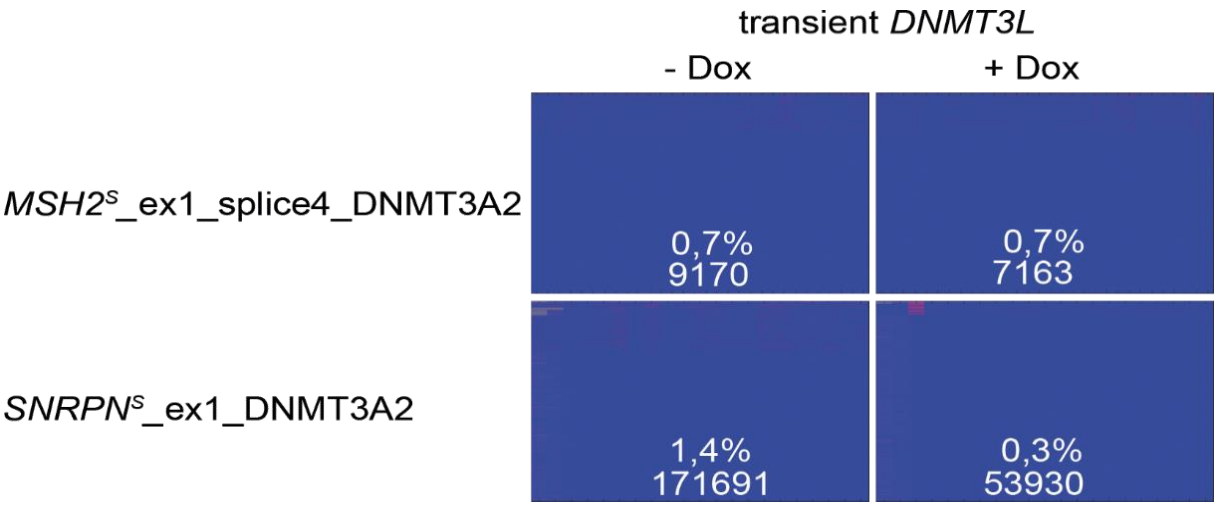


Abbildung 30: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3L*-Transfektion. Für die Methylierungsanalyse wurde für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie ein 30 CpG-Dinukleotide umfassender Bereich der Promotorregion ausgewählt. Der ausgewählte Promotorbereich für die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie deckte 21 CpG-Dinukleotide ab. Die Ergebnisse der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA nicht-induzierter Zellen (-Dox) und für drei Tage (+Dox) mit Doxycyclin induzierten Zellen sind dargestellt. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent (obere Zahl) wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (untere Zahl) bestimmt. Die Promotorregionen lagen in nicht-induzierten und induzierten Zellen beider Zelllinien ausschließlich unmethyliert vor.

3.7 Transiente Überexpression von *DNMT3A2* und *DNMT3L* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen

3.7.1 Analyse der DNMT3A- und DNMT3L-Expression

Die Methylierungsanalyse der mit *DNMT3L* transient transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien zeigte sowohl für die Promotorregion von *MSH2* als auch *SNRPN* keine Änderung der Methylierung nach erfolgreicher Induktion von *ocHBB2*. Dies zeigte, dass eine alleinige Überexpression von *DNMT3L* nicht ausreichend für die Etablierung von DNA-Methylierung durch das transkriptionelle Durchlesen eines *upstream* gelegenen Promotors ist. Es könnte daher sein, dass die Expression von *DNMT3A* immer noch nicht ausreichend hoch ist. Aus diesem Grund wurden die bereits im Vorfeld genutzten Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 in diesem experimentellen Ansatz transient mit der *DNMT3A*-Isoform *DNMT3A2* und *DNMT3L* co-transfiziert. Die, durch die transiente Transfektion generierte, DNMT3A2 und DNMT3L Überexpression wurde mittels qRT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Die Expression der nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen wurde in der Auswertung auf eins gesetzt. Die Überexpressionen von *DNMT3A* und *DNMT3L* (**Abbildung 31**A) zeigten in beiden Zelllinien einen signifikanten Expressionsanstieg im Vergleich zu den

zuvor genutzten, nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. Der Nachweis der Überexpression beider Faktoren auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot. Dabei zeigten beide Zelllinien sowohl für DNMT3A2 als auch DNMT3L eine deutliche Überexpression in allen untersuchten Zellklonen (**Abbildung 31**B). In den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die Zellen einen schwachen Anstieg der DNMT3A und DNMT3L-Expression in den co-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen (**Abbildung 31**C).

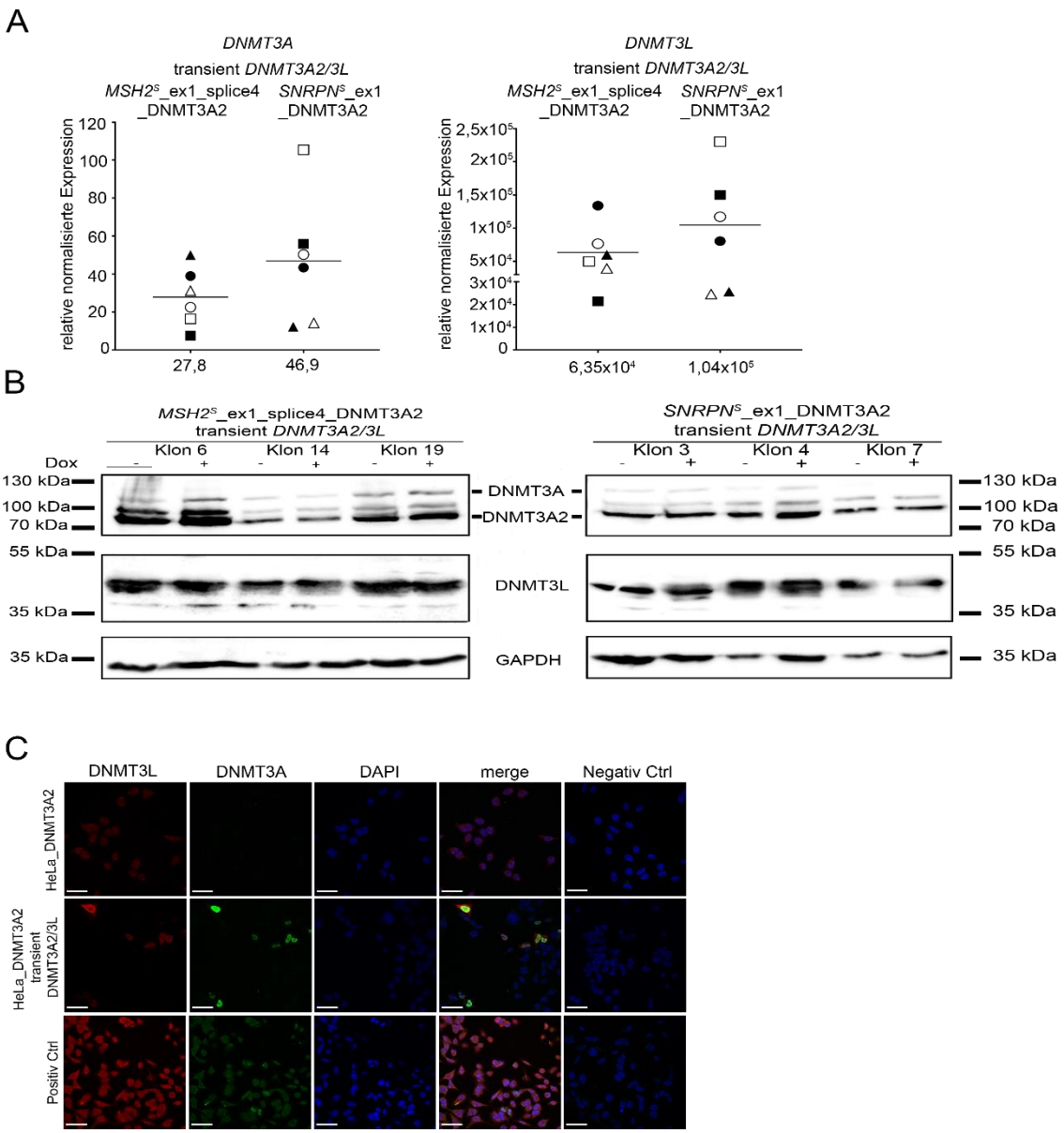


Abbildung 31: DNMT3A- und DNMT3L-Expressionsanalyse der transient mit *DNMT3A2* und *DNMT3L* co-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. A) *DNMT3A- und DNMT3L*-Expression in *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellen, auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR, nach transienter Co-Transfektion. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone, ohne (schwarze Symbole) und mit (weiße Symbole) Doxycyclin-Induktion für drei Tage. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Expression von *DNMT3A* bzw. *DNMT3L*. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte zu nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen, deren Expression auf eins gesetzt wurde. Abbildung modifiziert nach Kühnel et al. 2020. **B)** DNMT3A- und DNMT3L-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot in *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellklonen. Als Referenzprotein wurde GAPDH genutzt. Abbildung modifiziert nach Kühnel et al. 2020. **C)** Immunzytochemische Analyse von DNMT3A und DNMT3L Flp-In T-REx_DNMT3A2-Ausgangszelllinie 24h nach transienter Co-Transfektion. Die Zellen wurden gegen die Proteine DNMT3A und DNMT3L gefärbt. Die Detektion erfolgte über Alexa Fluor® 555 (DNMT3L; rot) und Alexa Fluor® 488 (DNMT3A; grün) konjugierten Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (blau) gefärbt. Positiv Ctrl: Als Positivkontrolle dienten Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen (transient mit DNMT3A2, DNMT3L und ZFP57 co-transfiziert), dabei handelt es sich um die gleiche Kontrolle wie in **Abbildung 22**. Negativ Ctrl: Es erfolgt keine Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper. Maßstabsbalken: 50µm.

3.7.2 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3*

Die im Vorfeld genutzten Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 wurden mit *DNMT3A2* und *DNMT3L* co-transfiziert, um den Einfluss beider Faktoren auf die Genexpression und Etablierung von DNA-Methylierung zu untersuchen. Die erfolgreiche Überexpression beider Faktoren wurde bereits im Kapitel 3.7.1 beschrieben. Die transient transfizierten Zelllinien wurden für drei Tage mit Doxycyclin induziert. Der Effekt der Doxycyclin-Induktion, unter dem Einfluss der transienten Co-Transfektion, auf die Genexpression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die Zellklone der *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie zeigten einen circa siebenfachen und die *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellklone einen circa dreifachen Anstieg der *ocHBB2*-Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen (**Abbildung 32**). Bei der Analyse der *exon1/3*-Expression konnte für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Zelllinie eine fünffache und für die *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie eine circa dreifache Reduktion der Expression (**Abbildung 32**) beobachtet werden.

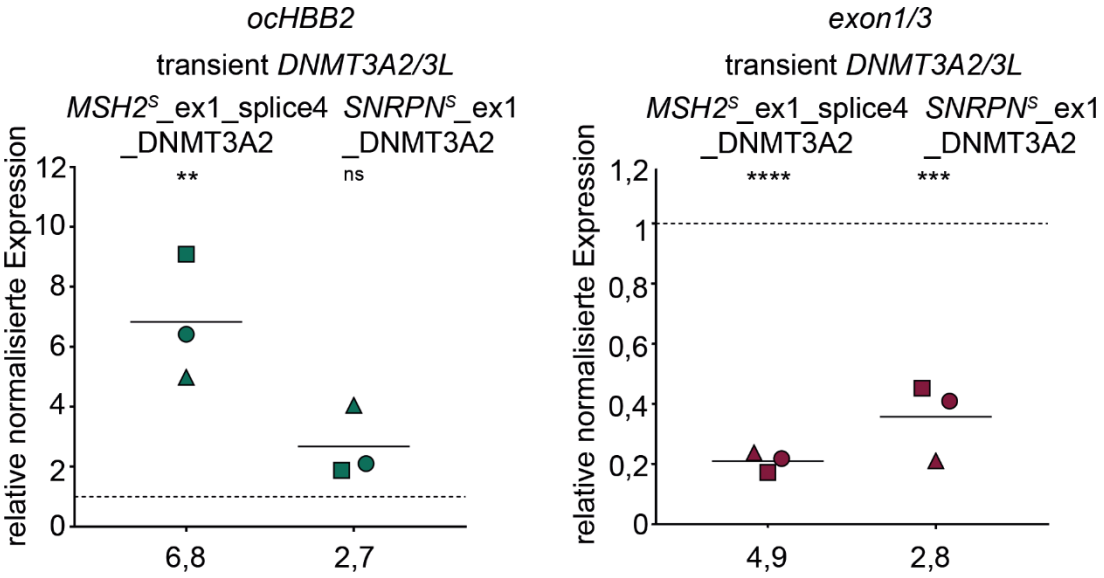


Abbildung 32: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 nach transienter *DNMT3A2 und DNMT3L* Co-Transfektion. Expression von *ocHBB2* (türkis) und *exon1/3* (pink) nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion und dreitägiger Doxycyclin-Induktion in den Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels *Student t-test (*ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). Abbildung modifiziert nach Kühnel et al. 2020.

3.7.3 DNA-Methylierungsanalyse

In den *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinien mit transienter Überexpression von *DNMT3A2* und *DNMT3L* konnte wieder eine erfolgreiche Induktion von *ocHBB2*- und einer Reduktion der *exon 1/3*-Transkription beobachtet werden. Daher wurde nun die Auswirkung der transienten Co-Transfektion mit *DNMT3A2* und *DNMT3L* auf die Methylierung der Testpromotoren nach drei Tagen Doxycyclin-Induktion mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung untersucht. Die Methylierungsanalyse zeigte jedoch weder für *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 noch für *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 eine Änderung des Methylierungsstatus. Die untersuchten Bereiche der Promotoren lagen in allen Zellklonen nach der transienten Überexpression von *DNMT3A2* und *DNMT3L* und dreitägiger Doxycyclin-Induktion vollständig unmethyliert vor. In **Abbildung 33** ist jeweils ein Zellklon jeder Zelllinie dargestellt. Die Ergebnisse aller untersuchten Zellklone der jeweiligen Zelllinien sind im Anhang aufgeführt (**Abbildung 55, Tabelle 8**).

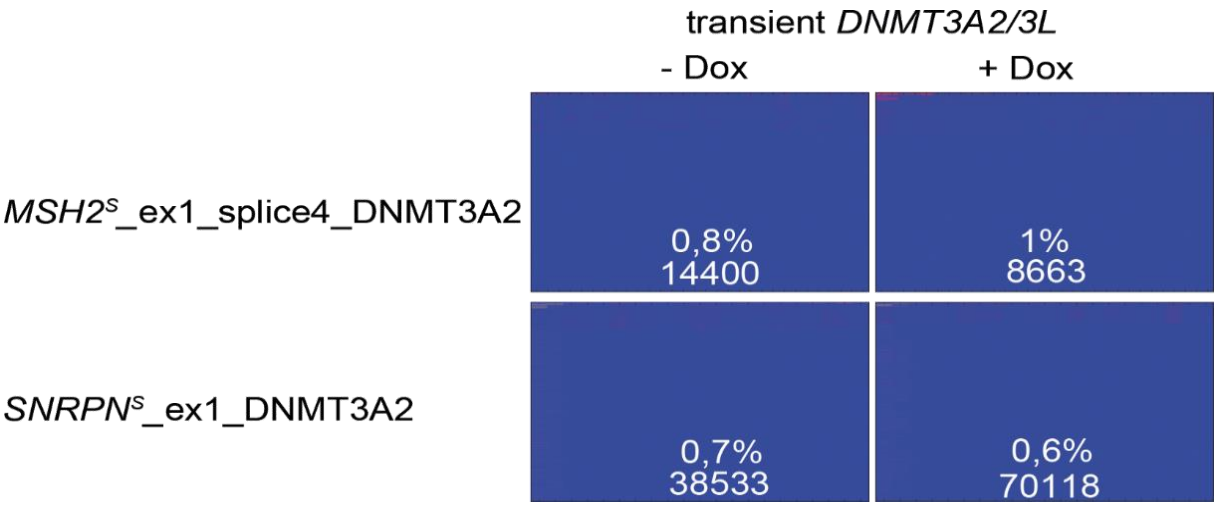


Abbildung 33: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion. Für die Methylierungsanalyse wurde für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie ein 30 CpG-Dinukleotide umfassender Bereich der Promotorregion ausgewählt. Der ausgewählte Promotorbereich für die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie deckte 21 CpG-Dinukleotide ab. Die Ergebnisse der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA nicht-induzierter Zellen (-Dox) und für drei Tage (+Dox) mit Doxycyclin induzierten Zellen sind dargestellt. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent (obere Zahl) wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (untere Zahl) bestimmt. Die Promotorregionen lagen in nicht-induzierten und induzierten Zellen beider Zelllinien ausschließlich unmethyliert vor. Abbildung entnommen aus Kühnel et al. 2020.

3.8 Transiente Überexpression von *DNMT3A2, DNMT3L* und ZFP57 in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen

Da die bisherigen Experimente keine Änderung des Methylierungsstatus in den untersuchten *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregionen nach sich führte, wurden die bereits in Kapitel 3.5.2 aufgeführten Zellklone der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und zusätzlich *ZFP57* co-transfiziert und erneut untersucht.

3.8.1 Analyse der DNMT3A-, DNMT3L- und ZFP57-Expression

Die bisherigen Experimente zeigten keine Änderung des Methylierungsstatus in den untersuchten *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregionen, obwohl transkriptionelles Durchlesen erfolgreich induziert wurde und zu einer Reduktion der *exon1/3*-Expression führte. Dies verdeutlicht, dass eine Überexpression von *DNMT3A2* in Kombination mit *DNMT3L* nicht ausreichend für die Etablierung von DNA-Methylierung an den untersuchten Promotorregionen von *MSH2* und *SNRPN* ist. Es stellte sich die Frage, ob die DNA-Methylierung nicht etabliert wurde, oder eventuell nur nicht erhalten wurde. *ZFP57* hat in der frühen embryonalen Entwicklung an spezifischen, methylierten Regionen einen Einfluss auf die DNA-Methylierung (Mackay et al. 2008; Okae et al. 2014). Daher wurden die Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 einer transienten Co-Transfektion mit *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* unterzogen. Die, durch die transiente Transfektion generierte Überexpression aller drei Faktoren wurde mittels qRT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Die Expression der nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen wurde in der Analyse auf eins gesetzt. Die Co-Transfektion in den Zelllinien *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2 zeigte für *DNMT3A*, *DNMT3L* und *ZFP57* einen signifikanten Expressionsanstieg im Vergleich zu den zuvor genutzten, nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen (**Abbildung 34**A). Die Analyse der Expression von DNMT3A, DNMT3L und ZFP57 auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot (**Abbildung 34**B). Dabei konnte für alle untersuchten Zellklone die Expression von DNMT3A, DNMT3L und ZFP57 nachgewiesen werden. Als positive Expressionskontrolle dienten mit *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* co-transfizierte Zellen der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie. In der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung zeigten die Zellen einen schwachen Anstieg der DNMT3A

und DNMT3L-Expression, aber keinen Anstieg der ZFP57-Expression (**Abbildung 34**C) in den co-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen.

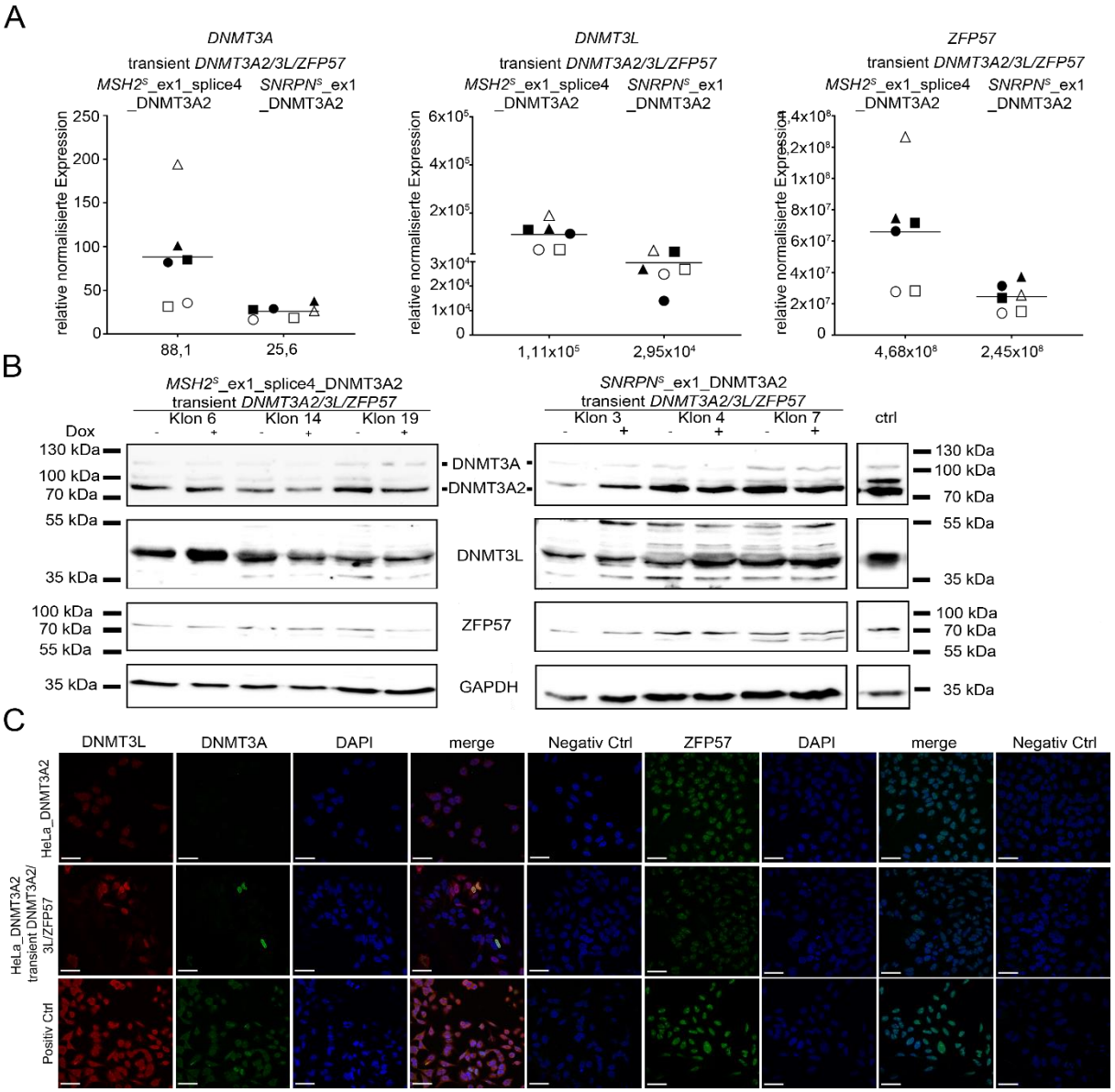


Abbildung 34: DNMT3A-, DNMT3L- und ZFP57-Expressionsanalyse der transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfizierten, Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. A) *DNMT3A-, DNMT3L-* und *ZFP57-*Expression in *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellen, auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR, nach transienter Co-Transfektion. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone, ohne (schwarze Symbole) und mit (weiße Symbole) Doxycyclin-Induktion für drei Tage. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Expression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte zu nicht-transfizierten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen, deren Expression auf eins gesetzt wurde. **B)** DNMT3A-, DNMT3L- und ZFP57-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot in *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zellklonen. Als Referenzprotein wurde GAPDH genutzt. Ctrl: mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfizierte Zellen der Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinie. **C)** Immunzytochemische Analyse von DNMT3A, DNMT3L und ZFP57 in der Flp-In T-REx_DNMT3A2-Ausgangszelllinie 24h nach transienter Co-Transfektion. Die Zellen wurden gegen die Proteine DNMT3A, DNMT3L und ZFP57 gefärbt. Die Detektion erfolgte über Alexa Fluor® 555 (DNMT3L; rot) und Alexa Fluor® 488 (DNMT3A, ZFP57; grün) konjugierte Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI (blau) gefärbt. Positiv Ctrl: Als Positivkontrolle dienten Flp-In T-REx 293_DNMT3A2-Zellen (transient mit DNMT3A2, DNMT3L und ZFP57 co-transfiziert), dabei handelt es sich um die gleiche Kontrolle wie in **Abbildung 22**. Negativ Ctrl: Es erfolgt keine Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper. Maßstabsbalken: 50µm

3.8.2 Induktion von *ocHBB2* und Repression von *exon1/3*

Die erfolgreiche Überexpression von *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* wurde bereits im Kapitel 3.8.1 beschrieben. Die Doxycyclin-Induktion der transient transfizierten Zelllinien *MSH2^S*_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN^S*_ex1_DNMT3A2 wurde für drei Tage durchgeführt. Mittels qRT-PCR wurde der Effekt der Doxycyclin-Induktion, unter dem Einfluss der transienten Co-Transfektion, auf die Genexpression untersucht. Die Zellklone der *MSH2^S*_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie zeigten einen circa siebenfachen und die *SNRPN^S*_ex1_DNMT3A2-Zellklone einen zweifachen Anstieg der *ocHBB2*-Expression im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen (**Abbildung 35**). Für die *exon1/3*-Expression konnte in den *MSH2^S*_ex1_splice4_DNMT3A2-Zellklonen eine circa siebenfache und in den *SNRPN^S*_ex1_DNMT3A2-Zellklonen eine sechsfache Reduktion der *exon1/3*-Expression (**Abbildung 35**) beobachtet werden.

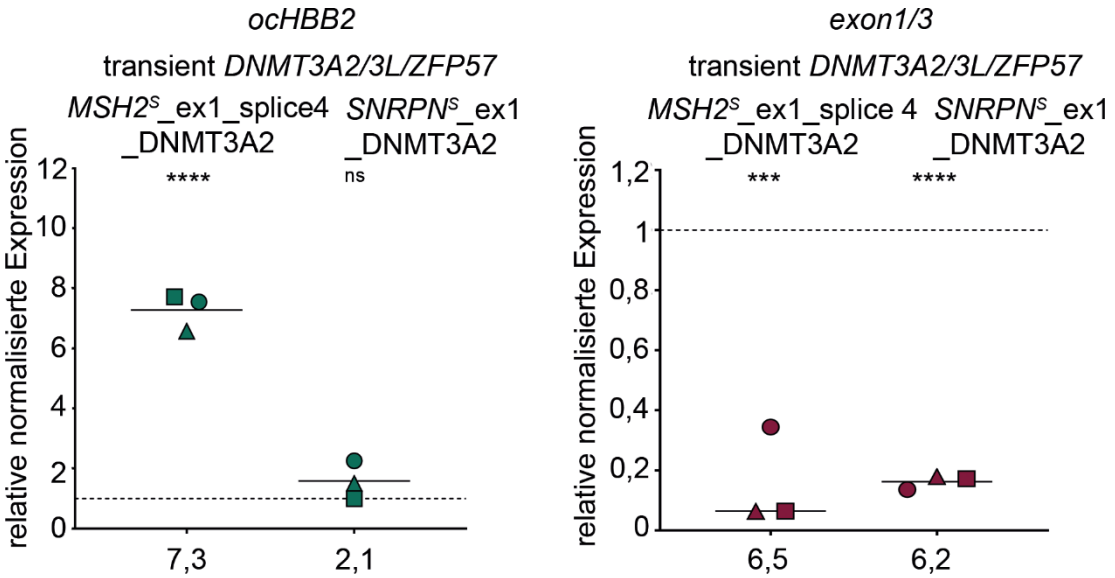


Abbildung 35: Expression von *ocHBB2* und *exon1/3* in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion. Expression von *ocHBB2* (türkis) und *exon1/3* (pink) nach transienter *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion und dreitägiger Doxycyclin-Induktion in den Zelllinien MSH2^S_ex1_splice4_DNMT3A2 und SNRPN^S_ex1_DNMT3A2. Die unterschiedlichen Symbole (Viereck, Kreis, Dreieck) symbolisieren unterschiedliche Zellklone. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die kurze Linie repräsentiert die mittlere Induktion (*ocHBB2*) bzw. Reduktion (*exon1/3*) der Genexpression. Die darunter angegebenen Zahlen zeigen die relative Änderung der Expressionswerte im induzierten Zustand zum nicht-induzierten Zustand (gestrichelte Linie, auf eins gesetzt). Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels *Student t-test* (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.8.3 DNA-Methylierungsanalyse

Die Überexpression der drei epigenetischen Faktoren *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* in den Zelllinien *MSH2^S*_ex1_splice4_DNMT3A2 und *SNRPN^S*_ex1_DNMT3A2 konnte bestätigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Induktion von

ocHBB2 zur Reduktion der Aktivität der Testpromotoren führt. Mittels Sanger-Sequenzierung wurde analysiert, ob die Überexpression der drei Faktoren zur Etablierung und Erhaltung von DNA-Methylierung geführt hat. In **Abbildung 36** ist exemplarisch jeweils ein Zellklon der untersuchten *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregionen nach transienter Co-Transfektion mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* dargestellt. Die in Kapitel 3.8.2 verwendeten Zellen der qRT-PCR-Analysen, sind mit denen für die Methylierungsanalyse identisch. Die Analyse des Methylierungsstatus der *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion nach Co-Transfektion mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* und dreitägiger Doxycyclin-Induktion mittels Sanger-Sequenzierung zeigt in allen untersuchten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosin-Nukleotids im Bereich der untersuchten CpG-Dinukleotide (**Abbildung 36**A, **Abbildung 52**A). Die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion zeigte ebenfalls keine Methylierung in allen untersuchten Zellklonen (**Abbildung 36**B, **Abbildung 52**B). Somit lagen die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und die *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion sowohl in nicht-induzierten als auch in induzierten Zellklonen vollständig unmethyliert vor.

Abbildung 36: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion. Die für die Analyse verwendeten *Primer* (hellblau, dunkelblau) binden spezifisch im verwendeten Plasmid pcDNA5_XL und in der Promotorregion. Die untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2- und *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinien wurden mit *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* co-transfiziert. Die Analyse erfolgte für nicht-induzierte (-Dox) und für drei Tage mit Doxycyclin induzierte (+Dox) Zellen. Im vergrößerten Abschnitt ist die Referenzsequenz dargestellt. **A)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion unmethyliert vor. **B)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion unmethyliert vor.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein einfaches, vielseitiges und induzierbares humanes Zellkulturmodell etabliert, um den Einfluss des transkriptionellen Durchlesens auf die Genexpression und die *de novo* DNA-Methylierung eines *downstream* gelegenen Promotors zu untersuchen. Transkriptionelles Durchlesen ist eine Art der transkriptionellen Interferenz, die als negativer Einfluss einer Transkriptionsaktivität auf eine Zweite in cis definiert ist (Shearwin et al. 2005). Bei beiden Testpromotoren, *MSH2* und *SNRPN*, handelte es sich um schwache Promotoren, die in Tandem-Orientierung zum *upstream* gelegenen *CMV*-Promotor integriert wurden. Die Repression beider Testpromotoren durch transkriptionelles Durchlesen des *upstream* initiierten *ocHBB2*-Transkriptes konnte konsistent nachgewiesen werden. Der beobachtete Effekt war nach beendeter Induktion reversibel und die *ocHBB2*- sowie *exon1/3*-Expression entsprach den Ausgangswerten ohne Induktion. Eine DNA-Methylierung der Testpromotoren, ausgelöst durch das transkriptionelle Durchlesen, konnte allerdings nicht gezeigt werden. Auch die Überexpression von, für die Etablierung von DNA-Methylierung relevanten, Faktoren wie *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* resultierte nicht in der Etablierung von *de novo* DNA-Methylierung im untersuchten Zellkulturmodell.

4.1 Verwendbarkeit eines artifiziellen Zellkultursystems zur Modellierung von transkriptionellem Durchlesen

4.1.1 Einfluss von Positionseffekten auf die Genexpression

Die Expression eines ins Genom integrierten Transgens kann durch den Kontext der Integrationsstelle, z.B. lokal vorhandene *Enhancer*, beeinflusst werden. Deshalb werden stabil integrierte Transgene oftmals unterschiedlich bzw. unzureichend exprimiert (Bestor 2000; Feng et al. 2001; Fiering et al. 2000). In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* reguliert das *white*-Gen die Produktion von Pigmenten im Auge (Xiao et al. 2017), dieser Effekt wurde erstmals 1910 von Thomas Hunt Morgan beobachtet (Morgan 1910). Wildtyp-Fliegen mit einem aktiven *white*-Gen zeigen eine normale Pigmentproduktion und somit rote Augen. Ist das *white*-Gen durch Mutationen inaktiviert, kommt es zu keiner Pigmentbildung und die Augen von *D. melanogaster* erscheinen weiß (Elgin & Reuter 2013). Herman Muller benutzte 1930 Röntgenstrahlen in Experimenten als Mutationsindikator und beobachtete dabei

erstmalig Positionseffekte in *D. melanogaster* (Muller 1930). Wird das Gen durch eine Translokation vom Euchromatin in die Nähe einer Heterochromatinregion gebracht, zeigen die betroffenen Fliegen rot-weiß gesprenkelte Augen. Dieser Effekt wird auch Positionseffekt-Variegation genannt. In den nicht-pigmentierten Bereichen des Auges ist das *white*-Gen durch den Effekt des benachbarten Heterochromatins inaktiv (Alberts et al. 2002; Elgin & Reuter 2013; Lloyd et al. 1999; Muller 1930; Weiler & Wakimoto 1995). In kultivierten Zellen können zwei Arten von Positionseffekten unterschieden werden. Zum einen stabile und zum anderen stilllegende Positionseffekte (Feng et al. 2001). Stabile Positionseffekte sind durch die pancelluäre Expression des Transgens, d.h Expression in jeder Zelle eines bestimmten Gewebes oder einer Zellpopulation, gekennzeichnet. Stilllegende Positionseffekte sind durch die Inaktivierung des Transgens, abhängig vom jeweiligen Integrationsort, charakterisiert. Durch die Inaktivierung kann die Expression des Transgens nur in wenigen Zellen beobachtet werden. Damit zeigt diese Art des Positionseffektes eine Ähnlichkeit zur zuvor beschriebenen Positionseffekt-Variegation in *D. melanogaster.* Ebenso wurde beobachtet, dass die Orientierung des integrierten Transgens einen Einfluss auf die Expression zeigen kann (Feng et al. 2001). Es stellte sich daher die Frage, ob im hier etablierten Zellkultursystem Positionseffekte wirken könnten, die die Etablierung von DNA-Methylierung verhindern.

Die in dieser Arbeit verwendeten Systeme ermöglichen die Integration eines Expressionsplasmids als Einzelkopie unter Verwendung der FRT-Rekombinationsstelle an einer festen, aber unbekannten, genomischen Position. Somit erfolgt die Integration der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in beiden Systemen (Flp-In T-REx 293 und Flp-In T-REx Hela) für alle untersuchten Zellklone an der identischen Position. Die Integration der untersuchten Promotorregionen von *MSH2* und *SNRPN* erfolgte in beiden Systemen in Tandem-Orientierung. Dadurch können Positionseffekte zwischen den integrierten Promotoren in den untersuchten Zellklonen, verursacht durch unterschiedliche genomische Integrationsstellen und Orientierungen, ausgeschlossen werden. Jedoch ist nicht bekannt wo genau die Integration der Transgene im Genom der Flp-In T-REx 293- bzw. Flp-In T-REx HeLa-Zellen erfolgt. Wenn man den Ort der Integration eines Transgens wählen könnte, würde man einen sogenannten „*Safe harbor locus*“ wählen. Als „*Safe harbor locus*“ wird ein Bereich definiert, in dem das integrierte Transgen zum einen stabil exprimiert wird und zum anderen nicht mit der endogenen Genexpression interferiert. In

Stammzellen würde die Integration in Intron 1 von *PPP1R12C* auf Chromosom 19 mittels CRISPR/Cas9 erfolgen. Diese Region ist als „*Safe harbor locus*“ in humanen Stammzellen definiert (Papapetrou & Schambach 2016). Es ist nicht bekannt, ob es sich bei der Integrationsstelle in den Flp-In T-REx-Zellen ebenfalls um einen „*Safe harbor locus*“ handelt. Die Integrationsstelle könnte somit zum einen die Expression der integrierten Testpromotoren oder aber die Expression des *CMV*-Promotors beeinflussen. Es wäre möglich, dass regulatorische Elemente in der unbekannten Integrationsstelle die Stärke des *CMV*-Promotors im Laufe der Zellkultivierung reduzieren oder durch Methylierung stilllegen. Aus den genannten Gründen können zwar Positionseffekte zwischen den integrierten Promotoren und zwischen den einzelnen Zellklonen ausgeschlossen werden. Jedoch ist es möglich, dass die generelle Integration der Transgene an einer Position im Genom der Zellen erfolgte, welche einen negativen Einfluss auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hat.

4.1.2 Der Einfluss des *CMV*-Promotors auf die Stilllegung von Promotorregionen

Die Genexpression des *ocHBB2*-Transkriptes wird im induzierbaren Flp-In T-REx-System durch den *CMV*-Promotor kontrolliert. Der integrierte *CMV*-Promotor ist an sich ein starker Promotor, dessen Aktivität allerdings zwischen unterschiedlichen Zelllinien sehr variabel ist (Qin et al. 2010). Es ist daher denkbar, dass der *CMV*-Promotor in den Flp-In T-REx HeLa-Zellen eine zu geringere Aktivität aufweist und somit das dort initiierte *ocHBB2*-Transkript nicht im nötigen Maße exprimiert wird, um die *downstream* gelegene Promotorregion dauerhaft stillzulegen und DNA-Methylierung zu etablieren. Dies könnte bedeuten, dass der verwendete *CMV*-Promotor nicht der geeignete Promotor für die dauerhafte Stilllegung der Testpromotoren ist. Es ist möglich, dass die *de novo* DNA-Methylierung nur in einem bestimmten Bereich der relativen Promotorstärke des *up*- und *downstream* gelegenen Promotors etabliert wird. Diese Bedingungen können in den endogenen Loci gegeben sein, in dem hier verwendeten Zellkultursystem aber nicht. Daher wäre es sinnvoll entweder das genutzte System zu überdenken oder den *CMV*-Promotor durch einen anderen starken Promotor zu ersetzen. Denkbar hierfür wäre der humane Elongationsfaktor-1-Alpha *(EEF1A)*-Promotor. Dieser zeigt eine ähnlich hohe Promotoraktivität wie der zuvor genutzte *CMV*-Promotor, die aber zelltyp- und gewebeübergreifend relativ konstant ist (Qin et al. 2010).

In Vorarbeiten am Institut für Humangenetik wurde bereits gezeigt, dass der *CMV*-Promotor auch ohne die Zugabe von Doxycyclin in den Flp-In T-REx 293-Zellen eine Basalaktivität aufweist (Dissertation Heinz 2016). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese sehr hohe Basalaktivität ebenfalls, sowohl in den verwendeten Flp-In T-REx 293- als auch in den Flp-In T-REx HeLa-Zellen, mittels qRT-PCR-Analysen beobachtet werden. Somit konnte in den Zellen auch ohne Zugabe von Doxycyclin die Expression des *ocHBB2*-Transkriptes gemessen werden. Diese Durchlässigkeit (*engl. Leakiness*) ist eine bekannte Schwachstelle des Flp-In T-REx-Zellsystems und wurde auch in der Literatur beschrieben (Pham et al. 2008; Senkel et al. 2009). Die *Leakiness* des Systems ist wahrscheinlich problematisch für die Analyse des Effekts des transkriptionellen Durchlesens. Aktiv transkribierte Gene oder Regionen werden durch die Histonmodifikation H3K36me3 markiert. Es folgt die Rekrutierung der *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3A* und die Etablierung der DNA-Methylierung in der Region. Durch die beobachtete *Leakiness* in dem genutzten Flp-In T-REx-System kommt es sowohl im nicht-induzierten als auch im induzierten Zustand zu einer Expression des *ocHBB2*-Transkriptes und somit zu transkriptionellem Durchlesen über die nachfolgende Testpromotorregion. Dadurch ist die Region *downstream* des *CMV*-Promotors wahrscheinlich in beiden Zuständen durch H3K36me3 markiert. Der Effekt wird in den mit Doxycyclin induzierten Zellen lediglich zusätzlich verstärkt. Jedoch ist es in beiden Zuständen nicht möglich DNA-Methylierung der Testpromotorregionen zu beobachten. Durch die so dauerhaft vorhandene H3K36me3-Markierung der Region ist es nahezu nicht möglich, den Effekt des transkriptionellen Durchlesens im Prozess der DNA-Methylierung zu beobachten. Es wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, um die Basalaktivität des *CMV*-Promotors zu minimieren. Pham et al. zeigten die Möglichkeit der Integration von zwei AU-reichen, mRNA destabilisierenden Elementen (ARE) in den 3‘-untranslatierten Bereich des Doxycyclin-induzierbaren Gens (Pham et al. 2008). Durch die Integration der AREs wurde die Expression des integrierten Gens ohne Doxycyclin-Induktion stark abgeschwächt und zeigte ein Expressionslevel in Höhe des Vektors ohne integriertes Gen. Senkel et al. ersetzten den *CMV*-Promotor durch eine am 5‘-Ende um 138 Basenpaaren deletierte Version, was zu einer Abschwächung der Basalaktivität führte (Senkel et al. 2009). Somit wäre es möglich, die Basalaktivität des Systems zu minimieren und damit die Genexpression des *ocHBB2*-Transkriptes im nicht-induzierten Zustand zu verringern. Ebenso wäre es denkbar das gesamte induzierbare Zellsystem, durch das heute am häufigsten verwendete *Tet-On* System der dritten Generation zu ersetzen (Zhou et

al. 2006). Das *Tet-On* System ist gekennzeichnet durch eine sehr niedrige Basalaktivität, sowie eine hohe Induzierbarkeit (Loew et al. 2010). Hier kommt es durch die Zugabe von Doxycyclin zu einer Konfirmationsänderung des Transaktivatorproteins, welches an den Promotor bindet und diesen aktiviert. Das *Tet-On* System der dritten Generation ist 100-fach sensitiver für Doxycyclin und siebenfach aktiver im Vergleich zum klassischen *Tet-On* System (Zhou et al. 2006). Die Verwendung dieses Systems würde den negativen Effekt der Basalaktivität des *upstream* gelegenen Promotors minimieren und einen uneingeschränkten Einblick auf den Effekt des transkriptionellen Durchlesens im Prozess der DNA-Methylierung ermöglichen.

4.1.3 Die Expressionsstärke des *ocHBB2*-Transkriptes hat keinen Einfluss auf die Repression des *exon1/3*-Transkriptes

Der Zusammenhang von transkriptionellem Durchlesen und dem repressiven Einfluss auf einen nachfolgenden Promotor ist in niederen Eukaryoten, wie zum Beispiel Hefen, gut charakterisiert (Ard et al. 2014; Greger et al. 2000; Gummalla et al. 2012; Hongay et al. 2006; Martens et al. 2005; Petruk et al. 2006). Ebenso wurde durch Jeziorska et al. in Experimenten mit embryonalen Mausstammzellen gezeigt, dass die Etablierung von DNA-Methylierung an intergenen Promotoren in Zusammenhang mit transkriptionellem Durchlesen, der Histonmodifikation H3K36me3 und der relativen Promotorstärke zusammenhängt (Jeziorska et al. 2017). Die Autoren beobachteten in embryonalen Mausstammzellen und Embryoid-Körpern (engl. *embryoid body*), dass der starke Promotor des *Aktin B*-Gens (*ACTB*) nicht durch den schwächeren, *upstream* gelegenen *LUC7L* Promotor methyliert werden kann. Somit sind starke, aktive *downstream* gelegene Promotoren, d.h. in denen die Anreicherung der RNA-Polymerase II höher als im gepaarten *upstream* gelegenen Promotor ist, vor transkriptionsvermittelter DNA-Methylierung geschützt (Jeziorska et al. 2017). Auch Lin et al. beobachteten sowohl in humanen Primärzellen als auch in verschiedenen Zelllinien (z.B. HT1080 oder HeLa), dass die Repression der Genexpression des *downstream* gelegenen *MICA* Promotors von der Stärke der *upstream* Transkription abhängig ist, jedoch nicht von der Art des Promotors (Lin et al. 2018).

In allen generierten Zelllinien konnte der Einfluss des transkriptionellen Durchlesens auf die Genexpression der *downstream* gelegenen Promotorregionen von *MSH2* und *SNRPN* nachgewiesen werden. In den durchgeführten Reversibilitätsexperimenten

konnte gezeigt werden, dass der reprimierende Effekt des transkriptionellen Durchlesens auf die *exon1/3*-Expression der Testpromotoren nach Beendigung der Doxycyclin-Induktion reversibel ist (**Abbildung 21**). Da bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass Doxycyclin keinen Einfluss auf die Genexpression der Testpromotoren hat (Kühnel et al. 2020), ist die beobachtete Abnahme der *exon1/3*-Transkription somit abhängig von der induzierten *ocHBB2*-Transkription. Die genutzten *MSH2*^{S}_ex1 und *SNRPN*^{S}_ex1 Flp-In T-REx HeLa-Zelllinien zeigten nach der Doxycyclin-Induktion für die Promotorregion von *MSH2* einen 24-facher Anstieg der Expression des *ocHBB2*-Transkriptes. Für die Promotorregion von *SNRPN* konnte ein zweifacher Anstieg der Expression von *ocHBB2* beobachtet werden (**Abbildung 20**). Die beobachteten Unterschiede in der Expression von *ocHBB2* nach Induktion könnten mit der Stärke der *downstream* gelegenen Testpromotoren zusammenhängen. Wie bereits beschrieben, handelt es sich sowohl bei *MSH2* als auch *SNRPN* um schwache Promotoren. Im Luciferase-Reportergen-Assay konnte jedoch gezeigt werden, dass *SNRPN* im Vergleich zu *MSH2* eine höhere Promotoraktivität zeigt (Kühnel et al. 2020). Diese erhöhte Promotoraktivität von *SNRPN* könnte somit die Transkription des *ocHBB2*-Transkriptes als Transkriptionsblockade „*Roadblock*“ behindern (Shearwin et al. 2005). Die sehr geringe Promotoraktivität des *MSH2*-Promotors scheint die Transkription des *CMV*-Promotors jedoch nicht zu beeinflussen. Die Höhe des Anstieges der *ocHBB2*-Expression nach Induktion hatte jedoch keinen Einfluss auf die Höhe der Reduktion des *exon1/3*-Transkriptes. Diese war innerhalb der Zelllinie und Zelllinien-übergreifend vergleichbar. Im Vergleich zum *CMV*-Promotor sind die hier verwendeten *downstream* gelegenen Promotoren eher schwache Promotoren, so dass das Ausbleiben der DNA-Methylierung hier nicht auf die Stärke der untersuchten Testpromotoren zurückgeführt werden kann.

4.1.4 Das artifizielle System entspricht nicht dem genomischen Kontext

Das hier verwendete modifizierte Flp-In T-REx-System ist ein artifizielles, vereinfachtes Zellkultursystem, um die Etablierung von DNA-Methylierung an unterschiedlichen Loci zu untersuchen. Deshalb entspricht das verwendete System nicht dem ursprünglichen genetischen Kontext der untersuchten Loci. In Patienten mit Lynch-Syndrom verursacht das deletierte Transkriptions-Terminationssignal des *EPCAM*-Gens das transkriptionelle Durchlesen des Transkriptes über das *downstream* gelegene *MSH2*-Gen und führt zur DNA-Methylierung dieser Region. Der

Abstand zwischen dem *EPCAM*- und *MSH2*-Promotor beträgt 16 kb (Ligtenberg et al. 2009, 2013). Im natürlichen Kontext des *SNURF/SNRPN*-Locus haben der oozytenspezifische *upstream* Promotor des AS-SRO und der durch das transkriptionelle Durchlesen beeinflusste *SNRPN*-Promotor einen Abstand von 35 kb zueinander (Lewis et al. 2014; Wawrzik et al. 2009). Der große Abstand zwischen miteinander agierenden Promotoren ist nicht nur in den zwei untersuchten Promotorregionen zu beobachten, sondern auch in anderen stillgelegten, sowie natürlich bzw. durch eine Deletion methylierten Regionen, wie zum Beispiel bei *Igf2r, GNAS und HBA2* (Bastepe et al. 2005; Jeziorska et al. 2017; Latos et al. 2012; Meng et al. 2013; Numata et al. 2011; Tufarelli et al. 2003). Das hier verwendete Zellkultursystem ist auf die essenziellen Kernpunkte reduziert. Der *CMV*-Promotor und die unterschiedlichen Promotorregionen zeigen daher lediglich einen Abstand von 1282 bp zueinander. Dies ist ein weitaus kleinerer Abstand als im natürlichen genomischen Kontext und könnte daher ein Grund für das Ausbleiben der DNA-Methylierung darstellen. Proteinkomplexe die für die Transkription, Histonmodifikationen und die Etablierung der DNA-Methylierung notwendig sind, könnten durch den geringen Abstand sterisch behindert werden. Des Weiteren ist es möglich, dass essenzielle, aber unbekannte, regulatorische Elemente für die DNA-Methylierung, die im natürlichen genomischen Kontext zwischen den zwei miteinander interagierenden Promotoren liegen, in dem hier verwendeten System nicht vorhanden sind.

4.2 Etablierung von DNA-Methylierung ist in somatischen Zellen möglich

4.2.1 Die Rolle von *DNMT3A* und *DNMT3L* in der DNA-Methylierung

Die durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass transkriptionelles Durchlesen allein nicht ausreichend für die Etablierung von DNA-Methylierung ist. Es handelt sich vielmehr um einen komplexen Prozess, bei dem das Vorhandensein spezifischer Faktoren, in der richtigen Menge und zum richtigen Zeitpunkt, notwendig ist.

Für die Etablierung von DNA-Methylierung in Keimzellen, ist die *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3A* und ihr Co-Faktor *DNMT3L* essenziell. Beide Faktoren sind wichtig für die Etablierung maternaler Imprints in Oozyten und für die Stilllegung von Retrotansposons und der Etablierung von paternalen Imprints in Spermatozyten (Bourc'his et al. 2001; Bourc'his & Bestor 2004; Kaneda et al. 2004; Lucifero et

al. 2007; Suetake et al. 2004). *Dnmt3l* besitzt keine eigene DNA-Methylierungsaktivität (Bourc'his et al. 2001b; Kaneda et al. 2004; Suetake et al. 2004). In *in vivo* Experimenten an embryonalen Mausstammzellen wurde gezeigt, dass *Dnmt3l* physisch und funktionell mit der *Dnmt3a*-Isoform *Dnmt3a2* sowie der *de novo* DNA-Methyltransferase *Dnmt3b* interagiert und die *de novo* DNA-Methylierung etabliert (Chen et al. 2002; Gowher et al. 2005; Hara et al. 2014; Jia et al. 2007; Nimura et al. 2006; Veland et al. 2019). In männlichen Mausgonozyten und embryonalen Mausstammzellen wurde gezeigt, dass *Dnmt3a2* nur in Gegenwart von *Dnmt3l* funktionell und stabil ist (Suetake et al. 2006; Veland et al. 2019; Yamada et al. 2003). Beide Proteine werden normalerweise in Zellen exprimiert, die Differenzierungspotential aufweisen. Dazu gehören unter anderem embryonale Stammzellen und Gonozyten (Chen et al. 2002; Suetake et al. 2006). In den genutzten Flp-In T-REx 293-Zellen wurde *DNMT3A* kaum und *DNMT3L* nicht exprimiert (Neumann et al. 2012). Die Flp-In T-REx HeLa-Zellen zeigten eine 24-fach höhere Expression von *DNMT3A*, die Expression von *DNMT3L* konnte in RNA-Analysen jedoch ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse decken sich mit den Informationen des *Human Protein Atlas* für HeLa-Zellen. Um die Menge an *DNMT3A* und *DNMT3L* in den Zellen zu erhöhen und die im natürlichen Kontext vorkommenden Faktoren für *de novo* DNA-Methylierung bereitzustellen, wurden diese Faktoren transient überexprimiert. Trotz der erfolgreichen Überexpression und dem nachgewiesenen Effekt des induzierten transkriptionellen Durchlesens, konnte eine Methylierung der untersuchten Testpromotorregionen auch dann in keinem experimentellen Ansatz nachgewiesen werden. In Patienten mit Lynch-Syndrom erfolgt die DNA-Methylierung des *MSH2*-Gens jedoch in somatischen Zellen durch das transkriptionelle Durchlesen des deletierten *upstream* gelegenen *EPCAM*-Gens. *DNMT3L* wird jedoch in somatischen Zellen nicht exprimiert (Duymich et al. 2016; Ligtenberg et al. 2009, 2013). Diese Tatsache spricht für einen weiteren bzw. anderen essenziellen Faktor im Mechanismus der Etablierung von DNA-Methylierung, der im untersuchten Zellkultursystem vermutlich abwesend ist.

Die Rekrutierung von *DNMT3A* erfolgt durch die Histonmodifikationen H3K36me3 in Promotorregionen und H3K36me2 in Genkörpern. Die PWWP-Domäne (Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin Motiv) von *Dnmt3a* erkennt *in vitro* sowohl H3K36me2 als auch H3k36me3, zeigt jedoch eine höhere Bindungsaffinität zu H3K36me2

(Baubec et al. 2015; Sendžikaitė et al. 2019; Weinberg et al. 2019). Die Modifikation H3K36me2 wird durch die Histon-Methyltransferase *NSD1* (*Nuclear receptor binding SET Domain Protein 1*) etabliert. H3K36me2 ist für die normale embryonale Entwicklung, die Rekrutierung von *DNMT3A* und die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung an intergenen Regionen erforderlich (Stec et al. 2000; Weinberg et al. 2019). *In vitro* führt die Reduktion der *Nsd1*-Expression zu einem Verlust von H3K36me2 und somit zu einer Hypomethylierung entsprechender Regionen durch die fehlende *Dnmt3a*-Rekrutierung (Weinberg et al. 2019). Somatische Mutationen in *DNMT3A* beim Menschen wurden beim Tatton-Brown-Rahmann-Syndrom beschrieben (Tatton-Brown et al. 2014). Wohingegen somatische Mutationen in *NSD1* ursächlich für das Sotos-Syndrom sind (Choufani et al. 2015). Bei beiden Syndromen handelt es sich um Großwuchssyndrome, die sich phänotypisch ähnlich sind (Choufani et al. 2015; Tatton-Brown et al. 2014; Weinberg et al. 2019). Eine Hypomethylierung intergener Regionen konnte in beiden Syndromen beobachtet werden.

Speziell *Dnmt3b* wurde in embryonalen Mausstammzellen in Regionen mit aktiver Transkription rekrutiert (Baubec et al. 2015). Yang et al. haben gezeigt, dass die DNA-Methylierung von Genkörpern in menschlichen Darmkarzinomzellen abhängig von aktiver Transkription und der Expression von *DNMT3B* ist (Yang et al. 2014). Genkörper die aktiv transkribiert werden sind durch H3K36me3 gekennzeichnet. Diese Histonmodifikation wird durch die Histon-Methyltransferase *SETD2* (*SET domain containing 2*) vermittelt. Die Bindung an H3K36me3 wurde für *Dnmt3b* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Baubec et al. 2015; Dhayalan et al. 2010; Jeziorska et al. 2017). Zusätzlich wurde gezeigt, dass katalytisch inaktive Isoformen von *DNMT3B* in somatischen Zellen als Co-Faktor für *DNMT3A* agieren können (Duymich et al. 2016). Humane *DNMT3B*-Knockout-Zelllinien wurden mit dem Methylierungs-Inhibitor 5-Aza-CdR (5-Aza-2‘-deoxycytidine) behandelt. 5-Aza-CdR reduziert die Aktivität der DNA-Methyltransferasen, hemmt die DNA-Methylierung und führt zu einem hypomethyliertem Zustand in den untersuchten Zellen (Jones & Taylor 1981). Eine Re-Methylierung fand in den *DNMT3B*-Knockout-Zellen nicht statt. Erst durch die Transfektion mit verschiedenen *DNMT3B*-Isoformen kam es, 42 Tage nach der 5-Aza-CdR-Behandlung, zu einer Re-Methylierung der untersuchten *CpG-Islands.* Diese Experimente zeigten, dass auch katalytisch inaktive *DNMT3B*-Isoformen in somatischen Zellen eine ähnliche Funktion wie *DNMT3L* in undifferenzierten Zellen

besitzen. Somit könnte *DNMT3B* das fehlende akzessorische *DNMT3L* in somatischen Zellen ersetzen und *DNMT3A* rekrutieren (Duymich et al. 2016; Gujar et al. 2019).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen die Expression von DNMT3A nach transienter Überexpression auf RNA- und Protein-Ebene (**Abbildung 34**). Auch die Expression von *DNMT3B* auf RNA-Ebene konnte beobachtet werden (Kühnel et al. 2020). Die Expression von *SETD2* und *NSD1* wird in dem hier verwendeten Zellkultursystem, aufgrund der vom *Human Protein Atlas* bereitgestellten Informationen für HeLa-Zellen, angenommen. Daher sollten alle Faktoren für die Etablierung der Histonmodifikationen H3K36me2 und H3K36me3 vorhanden sein, so dass eine Rekrutierung der *de novo* Methyltransferasen erfolgen sollte. Möglicherweise ist die Expression von *DNMT3B* jedoch zu gering, um die in der Literatur beschriebene Rolle für die Etablierung von DNA-Methylierung in somatischen Zellen zu übernehmen. Um diese Annahme zu testen, könnten die Experimente nach Überexpression von *DNMT3B* wiederholt werden.

4.2.2 Histonmodifikationen an den Testpromotoren konnten bisher nicht beurteilt werden

Die Histonmodifikation H3K4me3 ist ein charakteristisches Merkmal für aktive Promotoren (Liang et al. 2004). Transkriptionelles Durchlesen führt zur Reduktion der Genexpression des *exon1/3*-Transkriptes, so dass eine Verringerung der Histonmodifikation H3K4me3 erwartet werden würde. Da aber nur eine Reduktion und keine Stilllegung der Genexpression beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass die untersuchte Testpromotorregion weiterhin als aktive Promotorregion markiert ist und keine oder nur eine minimale Verringerung der Histonmodifikation H3K4me3 beobachtet werden könnte. H3K4me3 unterdrückt durch die ATRX-DNMT3A-DNMT3L (ADD)-Domäne die Aktivität und Bindung von *DNMT3A* und schützt dadurch aktive Promotoren und *Enhancer* vor der DNA-Methylierung (Guo et al. 2015; Z. Li et al. 2011; Xu et al. 2019; Zhang et al. 2010). Dies kann ebenfalls eine Möglichkeit für das Scheitern der DNA-Methylierung darstellen. Um den Status von H3K4me3 an den Testpromotoren zu bestimmen, sollte in Zukunft eine ChIP-qRT-PCR-Analyse durchgeführt werden.

Aktiv transkribierte Promotoren werden durch die Histonmodifikation H3K36me3 markiert. H3K36me3 dient als Rekrutierungsfaktor für *DNMT3A* in Oozyten und

Genkörpern. Die bisher beschriebene Funktion von *DNMT3A* ist abhängig von der Anwesenheit von *DNMT3L* und der Histon-Methyltransferase *SETD2*, die die Trimethylierung von H3K36 katalysiert (Bourc'his et al. 2001; Carrozza et al. 2005; Keogh et al. 2005; Lin et al. 2018; Xu et al. 2019). Durch das induzierte transkriptionelle Durchlesen des vom *CMV*-Promotor gesteuerten *ocHBB2*-Transkriptes über die Testpromotoren hinweg, sollte an diesen ein Anstieg von H3K36me3 zu beobachten sein. Für den Nachweis von H3K36me3 wurden ChIP-qRT-PCR-Analysen in verschiedenen Bereichen der Testpromotorregionen durchgeführt. In der Auswertung waren die Ergebnisse zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellklonen ähnlich. Für die Auswertung wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen und die zugehörigen *Input*-Proben (Proben ohne Antikörperbehandlung) mitgeführt. Die *Input*-Proben der Positivkontrolle und der Negativkontrolle sind dabei identisch, da bei beiden Proben dieselben Ausgangszellen ohne Antikörperbehandlung benutzt wurden. Jedoch zeigten sich dabei gravierende Schwankungen in den erhaltenen Ergebnissen der ChIP-qRT-PCR-Analysen. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse als nicht valide erachtet (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Grund für die ähnlichen Ergebnisse zwischen nicht-induzierten und induzierten Zellen könnte die hohe Basalexpression von *ocHBB2* im nicht-induzierten Zustand des Systems sein. Eine Wiederholung des Experimentes würde Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den erhaltenen Ergebnissen um einen Durchführungsfehler handelt oder ob sich das Niveau von H3K36me3 bei transkriptionellem Durchlesen tatsächlich nicht ändert. Durch die möglicherweise fehlende Änderung der H3K36me3-Markierung der Testpromotoren werden die, für die DNA-Methylierung notwendigen, Faktoren möglicherweise nicht rekrutiert.

4.2.3 Auch nach Überexpression von ZFP57 konnte keine DNA-Methylierung beobachtet werden

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die DNA-Methylierung im verwendeten Zellkultursystem nicht etabliert wurde oder ob sie nicht aufrechterhalten werden kann und aus diesem Grund nicht detektierbar ist. Es ist bekannt, dass die Faktoren *DNMT1* und *ZFP57* eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung spielen. Die DNA liegt nach der Replikation hemimethyliert vor. *DNMT1* überträgt das bestehende Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten DNA-Strang und ist damit für die Aufrechterhaltung von DNA-Methylierung verantwortlich (Avvakumov et al. 2008; Bestor & Ingram 1983; Bostick et al. 2007; Nimura et al. 2006; Pradhan et al. 2001;

Sharif et al. 2007). HeLa- und 293-Zellen zeigen, laut *Human Protein Atlas,* eine Expression der Methyltransferase *DNMT1*. Bei *ZFP57* handelt es sich um das KRAB-Zink-Finger-Protein-57-Homolog (KZFP-57-Homolog), welches spezifisch an methylierte DNA bindet. Die DNA-Methyltransferasen *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B* werden durch *ZFP57* und den Co-Faktor *KAP1* (KRAB assoziiertes Protein 1) rekrutiert (Quenneville et al. 2011; Zuo et al. 2012). In Mausexperimenten wurde gezeigt, dass in Regionen, die dem Imprinting unterliegen, *Zfp57* ein essenzieller Faktor für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung während der genomweiten epigenetischen Reprogrammierung nach der Befruchtung ist (Riso et al. 2016; Takahashi et al. 2019). So geht z.B. die maternale Methylierung des *Snrpn*-Locus ohne *Zfp57* verloren (Li et al. 2008; Strogantsev et al. 2015). Auch beim Menschen ist die Expression von *ZFP57* für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung während der embryonalen Entwicklung essenziell, vor allem an den DMRs von *PLAGL1*, *GRB10* und *PEG3* (Mackay et al. 2008; Okae et al. 2014). Da trankriptionelles Durchlesen in Kombination mit der gezielten Überexpression der Faktoren *DNMT3A2* und *DNMT3L* nicht zum Nachweis von DNA-Methylierung in den untersuchten Promotorregionen führte, untersuchten wir zusätzlich den Einfluss von *ZFP57*. Laut unseren Expressionsanalysen auf RNA-Ebene wird *ZFP57* in den verwendendet Flp-In T-REx HeLa-Zellen nicht exprimiert. Die verwendeten Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen wurden aus diesem Grund transient mit *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* co-transfiziert. Auf diese Weise sollten die bisher aufgeführten Faktoren, die laut Literatur für die Etablierung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung notwendig sind, abgedeckt werden. Trotz erfolgreicher Überexpression aller drei Faktoren konnte nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion in keiner der untersuchten Zelllinien DNA-Methylierung beobachtet werden.

Jedoch wird nur eine Minderheit der dem Imprinting unterliegenden differentiell methylierten Regionen von *ZFP57* beinflusst (Bak et al. 2016; Boonen et al. 2013; Court et al. 2013). In menschlichen Oozyten und den frühen Stadien der embryonalen Entwicklung ist *ZFP57* nicht exprimiert. Dies spricht dafür, dass *ZFP57* beim Menschen, im Vergleich zum murinen *Zfp57,* keine Rolle in der Aufrechterhaltung von differentieller DNA-Methylierung an geimprinteten Genen spielt (Mackay et al. 2008; Okae et al. 2014; Takahashi et al. 2019). So zeigten Takahashi et al. dass *ZNF445/ZFP445*, ein weiteres KZFP-Homolog, ein Hauptfaktor in der Aufrechterhaltung der Methylierung in der frühen embryonalen Entwicklung des

Menschen ist (Takahashi et al. 2019). Die Reduktion der *ZNF445*-Expression in humanen embryonalen Stammzellen führte zu einem Verlust der KAP1-Bindung und zu einer Reduktion der DNA-Methylierung in den Genen *MEG3* und *H19*. In der Maus ergänzen sich die Faktoren *Zfp57* und *Znf445*, wohingegen beim Menschen die alleinige Reduktion von *ZNF445* ausreichend war, um den Methylierungsstatus und somit die Genexpression zu beeinflussen (Takahashi et al. 2019). Die Expression von *ZNF445* wurde im verwendeten Zellkulturmodell noch nicht untersucht. Jedoch zeigen die Daten des *Human Protein Atlas* eine Expression von *ZNF445* in HeLa-Zellen. Es ist zu bedenken, dass es sich bei dem verwendeten Zellkulturmodell um ein vereinfachtes, artifizielles System handelt. Die nötigen Faktoren für die Etablierung von DNA-Methylierung sind möglicherweise auch durch transiente Transfektionen nicht in der benötigten Menge oder im richtigen Verhältnis zueinander exprimiert. Zusammen mit den bereits beschriebenen Unterschieden des Systems zum natürlichen genetischen Kontext, könnten diese Faktoren die Etablierung von DNA-Methylierung behindern. Jeziorska et al. stellten ebenfalls die Frage ob transkriptionelles Durchlesen allein, ohne die Beteiligung weiterer epigenetischer Veränderungen wie zum Beispiel durch Zelldifferenzierung ausgelöst, für die Etablierung von DNA-Methylierung ausreichend ist (Jeziorska et al. 2017).

4.3 Flp-In T-REx Hela-Zellen besitzen kein Differenzierungspotential

Jeziorska et al. haben bereits beschrieben, dass die Methylierung von *HBA2* in embryonalen Mausstammzellen mit transkriptionellem Durchlesen, der Histonmodifikation H3K36me3 und der relativen Promotorstärke zusammenhängt (Jeziorska et al. 2017). Die Autoren beschrieben aber ebenso den Zusammenhang zwischen der Etablierung von DNA-Methylierung und der Differenzierung. Die untersuchten *CpG-Islands* blieben in undifferenzierten embryonalen Mausstammzellen trotz transkriptionellem Durchlesen unmethyliert. Die *de novo* DNA-Methylierung erfolgte erst nach Differenzierung der embryonalen Mausstammzellen in Embryoid-Körper (Jeziorska et al. 2017). Durch die Differenzierung wird der „Grundzustand“ verändert und ermöglicht somit strukturelle und funktionelle Veränderungen in den Zellen. Die Stabilisierung des neu erreichten Differenzierungszustands erfolgt unter anderem durch DNA-Methylierung von stadienspezifischen Genen. Die DNA-Methylierung für den *HBA2*-Promotor im Rahmen der Differenzierung konnte *in vivo* ebenfalls von Tufarelli et al. beobachtet werden (Tufarelli et al. 2003). Es ist möglich, dass die DNA-Methylierung nur in einem

bestimmten Zeitfenster etabliert werden kann. Wie viel Zeit differenzierte Zellen, wie die Flp-In T-REx HeLa-Zellen, für die Etablierung der DNA-Methylierung, als Konsequenz des transkriptionellen Durchlesens, benötigen, ist jedoch unbekannt. Daher könnten die in dieser Arbeit gewählten Zeitfenster von drei und 14 Tagen möglicherweise zu kurz sein. Die durchgeführten transienten Transfektionen wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion analysiert. Die Autoren zeigten im Rahmen der Differenzierung eine Methylierung des *HBA2*-Promotors nach sieben Tagen (Tufarelli et al. 2003). Die entwicklungsabhängige DNA-Methylierung in Zusammenhang mit transkriptionellem Durchlesen konnte ebenfalls bei der X-Inaktivierung oder dem Imprinting beobachtet werden (Latos et al. 2012; Ohhata et al. 2008). Latos et al. haben gezeigt, dass das transkriptionelle Durchlesen des *Airn*-Transkriptes für die Stilllegung und DNA-Methylierung des paternalen *Igf2r*-Promotors verantwortlich ist. Dabei beobachteten sie in undifferenzierten embryonalen Stammzellen eine biallelische Expression von *Igf2r*. Erst während der Differenzierung wurde die Expression von *Airn* auf dem paternalen Allel induziert und führte im Anschluss zu elternspezifischer *Igf2r*-Expression vom maternalen Allel (Latos et al. 2012).

Die verwendeten Flp-In T-REx HeLa-Zellen sind jedoch ausdifferenziert und besitzen kein Differenzierungspotential mehr. Damit unterscheiden sie sich deutlich von Oozyten, embryonalen Stammzellen oder adulten Stammzellen z.B. des Darmepithels. In Patienten mit Lynch-Syndrom können sich diese adulten Darmepithel-Stammzellen in Kolonkarzinomzellen differenzieren, in denen *MSH2* durch das aberrante transkriptionelle Durchlesen des *upstream* gelegenen *EPCAM*-Gens methyliert werden kann. Die genutzten Flp-In T-REx HeLa-Zellen befinden sich damit vielleicht nicht in einem permissiven Zustand oder benötigen einen längeren Zeitraum, um mit der Etablierung von DNA-Methylierung auf das transkriptionelle Durchlesen und die Expression wichtiger epigenetischer Faktoren zu antworten. Um den Mechanismus der DNA-Methylierung genauer zu untersuchen, sollten die durchgeführten Experimente mit induzierten pluripotenten humanen Stammzellen wiederholt werden.

5 Ausblick

Patientenstudien zeigten, dass die Etablierung von DNA-Methylierung in somatischen Zellen generell möglich ist. Jedoch sind die dafür notwendigen Faktoren und Mechanismen, sowie deren Interaktionen zueinander noch unbekannt. In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass transkriptionelles Durchlesen einen negativen Effekt auf die Genexpression einer *downstream* gelegenen Promotorregion in somatischen Zellen zeigt. Damit ist der Grundstein für nachfolgende Forschungsprojekte gelegt, um essenzielle Faktoren und Mechanismen zur Etablierung von DNA-Methylierung im genomischen Kontext von Keimzellen und somatischen Zellen aufzudecken.

Mittlerweile ist klar, dass transkriptionelles Durchlesen nicht allein für die Etablierung von DNA-Methylierung verantwortlich ist. So spielen die Histonmodifikation H3K36me3, die DNA-Methyltransferasen und die relative Promotorstärke ebenfalls eine essenzielle Rolle. Die Fähigkeit der Differenzierung spielt jedoch eventuell die wichtigste Rolle in diesem Mechanismus. Um dies zu untersuchen wäre es denkbar, das induzierbare Zellkultursystem in eine induzierte pluripotente Stammzelllinie (iPSC-Linie) zu überführen. Dadurch könnte der Effekt des transkriptionellen Durchlesens auf die DNA-Methylierung in einem System mit Differenzierungspotential untersucht werden. Der natürlich vorkommende *upstream* gelegene AS-SRO könnte durch einen induzierbaren Promotor mittels CRISPR/Cas9 ausgetauscht werden, so dass die Auswirkung des transkriptionellen Durchlesens auf den *downstream* gelegenen *SNRPN*-Promotor im natürlichen genomischen Kontext untersucht werden kann. Als induzierbares System für die Integration sollte dabei auf ein *Tet-On* System der dritten Generation zurückgegriffen werden, um die bisher beobachtete Basalaktivität des Systems zu vermeiden. Da bekannt ist, dass der bisher verwendete *CMV*-Promotor in iPSC-Zelllinien durch Methylierung stillgelegt wird (Hsu et al. 2010; Moritz et al. 2015; Wang et al. 2017), empfiehlt sich der Wechsel des verwendeten Promotors, z.B. auf den *EEF1A*-Promotor. Mittels CRISPR/Cas9 könnten auf diese Weise auch andere Promotorregionen auf die Etablierung von DNA-Methylierung untersucht werden. Dies könnte klären ob transkriptionelles Durchlesen im richtigen Kontext universell für die DNA-Methylierung verantwortlich ist. Anschließend könnten bekannte epigenetische Faktoren wie *DNMT3A2*, *DNMT3L*, *DNMT3B*, sowie *ZFP57* in humanen embryonalen Knockout-Stammzelllinien inaktiviert werden. Der Einfluss der einzelnen Faktoren im Zusammenhang mit transkriptionellem Durchlesen auf die Etablierung der DNA-Methylierung in einzelnen Promotorregionen könnte damit untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die Etablierung von DNA-Methylierung ist ein komplexer Prozess, dessen genauer Mechanismus und die dafür notwendigen Faktoren noch nicht voll umfänglich bekannt sind. Allgemein anerkannt ist jedoch die Rolle des transkriptionellen Durchlesens als Schlüsselmechanismus für die DNA-Methylierung geimprinteter Gene, sowie der aberranten Stilllegung von Genen in bestimmten humanen Krankheitsbildern. Innerhalb dieser Arbeit wurde ein einfaches, vielseitiges, induzierbares humanes Zellkultursystem etabliert, um den Effekt des transkriptionellen Durchlesens auf beliebige, humane Promotoren zu ermöglichen. Hiermit sollten sowohl der Mechanismus als auch die notwendigen Faktoren für die Etablierung von DNA-Methylierung untersucht werden. Es wurden zwei Promotoren im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Zum einen der Promotor des geimprinteten Gens *SNRPN* und zum anderen der Promotor des *MSH2*-Gens, welcher durch aberrantes transkriptionelles Durchlesen in Patienten mit Lynch-Syndrom methyliert wird. Da beide Promotorregionen in ihrem natürlichen Kontext durch das transkriptionelle Durchlesen eines in Tandem-orientierten Promotors beeinflusst werden, wurde diese Situation durch den starken *CMV*-Promotor nachempfunden. Der *CMV*-Promotor wird durch die Zugabe von Doxycyclin aktiviert und steuert die Expression des *β-Globin*-Transkriptes *ocHBB2*. Von den Testpromotoren erfolgt die Transkription des *exon1/3*-Transkriptes, welches vom endogenen, im Promotorfragment enthaltenen, Exon 1 auf das *ocHBB2* Exon 3 spleißt. Mittels qRT-PCR wurde der Effekt des transkriptionellen Durchlesens des *ocHBB2*-Transkriptes auf die *exon1/3*-Expression untersucht. In allen generierten Zelllinien konnte durch die Induktion mit Doxycyclin eine Zunahme der *ocHBB2*-Expression beobachtet werden. Zeitgleich wurde die *exon1/3*-Expression der jeweiligen Testpromotoren reduziert. Die Reduktion der Expression konnte direkt auf das transkriptionelle Durchlesen des *ocHBB2*-Transkriptes zurückgeführt werden, da der beobachtete Effekt nach der Beendigung der Induktion reversibel war. Die Etablierung von DNA-Methylierung konnte jedoch bei keiner der getesteten Promotorregionen beobachtet werden. Auch die Überexpression epigenetischer Faktoren wie *DNMT3A2*, *DNMT3L* und *ZFP57* in Zusammenhang mit transkriptionellem Durchlesen führte nicht zur Etablierung von DNA-Methylierung, so dass weitere Faktoren wie der genomische Kontext der Promotorregionen und das Potenzial zur Differenzierung ebenfalls nötig zu sein scheinen.

7 Abstract

The establishment of DNA methylation is a complex process whose exact mechanism and the factors required are not yet fully known. However, the role of transcriptional read-through as a key mechanism for DNA methylation of imprinted genes and aberrant silencing of genes in certain human diseases is widely recognized. Within this work a simple, versatile, inducible human cell culture system was established to enable transcriptional read-through on human promoters. The aim was to investigate both, the mechanism and the necessary factors for the establishment of DNA methylation. Two promoters were analysed in this work: the promoter of the imprinted gene *SNRPN* and the one of *MSH2*, which becomes methylated by aberrant transcriptional read-through in patients with Lynch syndrome. In their natural context, both promoter regions are influenced by transcriptional read-through of a tandem-oriented promoter. This situation was simulated by inserting the strong *CMV* promoter upstream of the test promoters. The *CMV* promoter is activated by the addition of doxycycline and controls expression of the *β-globin* transcript *ocHBB2*, including *ocHBB2* exons 2 and 3. The test promoters were inserted into *ocHBB2* intron 2 and contained their endogenous exon 1, which results in transcription of the *exon1/3*-transcript splicing from endogenous exon 1 to *ocHBB2* exon 3. The effect of transcriptional read-through of the *ocHBB2* transcript on *exon 1/3* expression was investigated by qRT-PCR. In all generated cell lines, an increase in *ocHBB2* expression was observed by induction with doxycycline. At the same time, *exon1/3* expression of both test promoters was reduced. The reduction in expression could be directly attributed to transcriptional read-through of the *ocHBB2* transcript, since the observed effect was reversible after the induction was stopped. However, the establishment of DNA methylation could not be observed in any of the promoter regions tested. Also, the overexpression of epigenetic factors such as *DNMT3A2*, *DNMT3L* and *ZFP57* in connection with transcriptional read-through did not lead to the establishment of DNA methylation. This indicates that further factors, such as genomic context of the promoter regions and the potential for differentiation, are necessary. The system established in this work sets the basis for straight forward testing of further factors in the future.

8 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). The Cell. *Cell*, *77*, 67–109. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79240-8

Almouzni, G., & Probst, A. V. (2011). Heterochromatin maintenance and establishment: Lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus*, *2*(5). https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17707

Anaka, M., Lynn, A., McGinn, P., & Lloyd, V. K. (2009). Genomic imprinting in Drosophila has properties of both mammalian and insect imprinting. *Development Genes and Evolution*, *219*(2), 59–66. https://doi.org/10.1007/s00427-008-0267-3

Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M. R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., & Walter, J. (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genetics*, *8*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002750

Ard, R., Tong, P., & Allshire, R. C. (2014). Long non-coding RNA-mediated transcriptional interference of a permease gene confers drug tolerance in fission yeast. *Nature Communications*, *5*(1), 5576. https://doi.org/10.1038/ncomms6576

Avvakumov, G. V., Walker, J. R., Xue, S., Li, Y., Duan, S., Bronner, C., Arrowsmith, C. H., & Dhe-Paganon, S. (2008). Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature*, *455*(7214), 822–825. https://doi.org/10.1038/nature07273

Bak, M., Boonen, S. E., Dahl, C., Hahnemann, J. M. D., Mackay, D. J. D. G., Tümer, Z., Grønskov, K., Temple, I. K., Guldberg, P., & Tommerup, N. (2016). Genome-wide DNA methylation analysis of transient neonatal diabetes type 1 patients with mutations in ZFP57. *BMC Medical Genetics*, *17*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s12881-016-0292-4

Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. https://doi.org/10.1038/cr.2011.22

Barlow, D. P. (2011). Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annual Review of Genetics*, *45*(1), 379–403. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132459

Barlow, D. P., & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(2), a018382–a018382. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382

Barlow, D. P., Stöger, R., Herrmann, B. G., Saito, K., & Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, *349*(6304), 84–87. https://doi.org/10.1038/349084a0

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, *129*(4), 823–837. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009

Bartolomei, M. S., & Ferguson-Smith, A. C. (2011). Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(7), 1–18. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002592

Barton, S. C., Surani, M. A. H., & Norris, M. L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, *311*(5984), 374–376. https://doi.org/10.1038/311374a0

Bastepe, M., Fröhlich, L. F., Linglart, A., Abu-Zahra, H. S., Tojo, K., Ward, L. M., & Jüppner, H. (2005). Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type Ib. *Nature Genetics*, *37*(1), 25–27. https://doi.org/10.1038/ng1487

Bastepe, M., & Jüppner, H. (2005). Gnas Locus and Pseudohypoparathyroidism. *Hormone Research in Paediatrics*, *63*(2), 65–74. https://doi.org/10.1159/000083895

Baubec, T., Colombo, D. F., Wirbelauer, C., Schmidt, J., Burger, L., Krebs, A. R., Akalin, A., & Schübeler, D. (2015). Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature*, *520*(7546), 243–247. https://doi.org/10.1038/nature14176

Bean, C. J., Schaner, C. E., & Kelly, W. G. (2004). Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in Caenorhabditis elegans. *Nature Genetics*, *36*(1), 100–105. https://doi.org/10.1038/ng1283

Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, *12*(2), 142–148. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00279-4

Berretta, J., & Morillon, A. (2009). Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Reports*, *10*(9), 973–982. https://doi.org/10.1038/embor.2009.181

Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, *9*(16), 2395–2402. https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395

Bestor, T. H., & Ingram, V. M. (1983). Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(18), 5559–5563. https://doi.org/10.1073/pnas.80.18.5559

Bestor, T. H., Laudano, A., Mattaliano, R., & Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, *203*(4), 971–983. https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90122-2

Beygo, J., Bürger, J., Strom, T. M., Kaya, S., & Buiting, K. (2019). Disruption of KCNQ1 prevents methylation of the ICR2 and supports the hypothesis that its transcription is necessary for imprint establishment. *European Journal of Human Genetics*. https://doi.org/10.1038/s41431-019-0365-x

Biniszkiewicz, D., Gribnau, J., Ramsahoye, B., Gaudet, F., Eggan, K., Humpherys, D., Mastrangelo, M.-A., Jun, Z., Walter, J., & Jaenisch, R. (2002). Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(7), 2124–2135. https://doi.org/10.1128/mcb.22.7.2124-2135.2002

Bird, A. P. (1986). *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. 1–5.

Bird, A. P. (2002). Epigentic Memory. *Genes and Development*, *16*, 16–21. https://doi.org/10.1101/gad.947102.6

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., … De Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, *447*(7146), 799–816. https://doi.org/10.1038/nature05874

Boonen, S. E., Mackay, D. J. G., Hahnemann, J. M. D., Docherty, L., Grønskov, K., Lehmann, A., Larsen, L. G., Haemers, A. P., Kockaerts, Y., Dooms, L., Vu, D. C., Ngoc, C. T. B., Nguyen, P. B., Kordonouri, O., Sundberg, F., Dayanikli, P., Puthi, V., Acerini, C., Massoud, A. F., … Temple, I. K. (2013). Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care*, *36*(3), 505–512. https://doi.org/10.2337/dc12-0700

Bordoy, A. E., & Chatterjee, A. (2015). Cis-Antisense transcription gives rise to tunable genetic switch behavior: A mathematical modeling approach. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133873

Bordoy, A. E., Varanasi, U. S., Courtney, C. M., & Chatterjee, A. (2016). Transcriptional Interference in Convergent Promoters as a Means for Tunable Gene Expression. *ACS Synthetic Biology*, *5*(12), 1331–1341. https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00223

Borowczyk, E., Mohan, K. N., D'Aiuto, L., Cirio, M. C., & Chaillet, J. R. (2009). Identification of a region of the DNMT1 methyltransferase that regulates the maintenance of genomic imprints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(49), 20806–20811. https://doi.org/10.1073/pnas.0905668106

Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science*, *317*(5845), 1760 LP – 1764. https://doi.org/10.1126/science.1147939

Bourc'his, D., & Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, *431*(7004), 96–99. https://doi.org/10.1038/nature02886

Bourc'his, D., Xu, G.-L., Lin, C.-S., Bollman, B., & Bestor, T. H. (2001a). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, *294*(5551), 2536–2539. https://doi.org/10.1126/science.1065848

Bourc'his, D., Xu, G. L., Lin, C. S., Bollman, B., & Bestor, T. H. (2001b). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, *294*(5551), 2536–2539. https://doi.org/10.1126/science.1065848

Božić, T., Frobel, J., Raic, A., Ticconi, F., Kuo, C.-C., Heilmann-Heimbach, S., Goecke, T. W., Zenke, M., Jost, E., Costa, I. G., & Wagner, W. (2018). Variants of DNMT3A cause transcript-specific DNA methylation patterns and affect hematopoiesis. *Life Science Alliance*, *1*(6), e201800153. https://doi.org/10.26508/lsa.201800153

Brockdorff, N. (2011). Chromosome silencing mechanisms in X-chromosome inactivation: Unknown unknowns. *Development*, *138*(23), 5057–5065. https://doi.org/10.1242/dev.065276

Buiting, K., Barnicoat, A., Lich, C., Pembrey, M., Malcolm, S., & Horsthemke, B. (2001). Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *68*(5), 1290–1294. https://doi.org/10.1086/320120

Buiting, K., Groß, S., Lich, C., Gillessen-Kaesbach, G., El-Maarri, O., & Horsthemke, B. (2003). Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: A molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *American Journal of Human Genetics*, *72*(3), 571–577. https://doi.org/10.1086/367926

Buiting, K., Lich, C., Cottrell, S., Barnicoat, A., & Horsthemke, B. (1999). A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Human Genetics*, *105*(6), 665–666. https://doi.org/10.1007/s004390051160

Buiting, K., Saitoh, S., Gross, S., Dittrich, B., Schwartz, S., Nicholls, R. D., & Horsthemke, B. (1995). the Angelman and Prader-Willi centre on human chromosome 15. *Nature Genetics*, *9*, 395–400.

Capuano, F., Mülleder, M., Kok, R., Blom, H. J., & Ralser, M. (2014). Cytosine DNA methylation is found in Drosophila melanogaster but absent in Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and other yeast species. *Analytical Chemistry*, *86*(8), 3697–3702. https://doi.org/10.1021/ac500447w

Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., Shia, W.-J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M. P., & Workman, J. L. (2005). Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress

Spurious Intragenic Transcription. *Cell*, *123*(4), 581–592. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.023

Cattanach, B. M. (1986). Parental origin effects in mice. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *97*(SUPPL.), 137–150.

Cattanach, B. M., & Kirk, M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*, *315*(6019), 496–498. https://doi.org/10.1038/315496a0

Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, *10*(5), 295–304. https://doi.org/10.1038/nrg2540

Chao, W., & D'Amore, P. A. (2008). IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *19*(2), 111–120. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.01.005

Chen, T., Ueda, Y., Xie, S., & Li, E. (2002). A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(41), 38746–38754. https://doi.org/10.1074/jbc.M205312200

Chotalia, M., Smallwood, S. A., Ruf, N., Dawson, C., Lucifero, D., Frontera, M., James, K., Dean, W., & Kelsey, G. (2009). Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes and Development*, *23*(1), 105–117. https://doi.org/10.1101/gad.495809

Choufani, S., Cytrynbaum, C., Chung, B. H. Y., Turinsky, A. L., Grafodatskaya, D., Chen, Y. A., Cohen, A. S. A., Dupuis, L., Butcher, D. T., Siu, M. T., Luk, H. M., Lo, I. F. M., Lam, S. T. S., Caluseriu, O., Stavropoulos, D. J., Reardon, W., Mendoza-Londono, R., Brudno, M., Gibson, W. T., … Weksberg, R. (2015). NSD1 mutations generate a genome-wide DNA methylation signature. *Nature Communications*, *6*. https://doi.org/10.1038/ncomms10207

Clouaire, T., & Stancheva, I. (2008). Methyl-CpG binding proteins: Specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(10), 1509–1522. https://doi.org/10.1007/s00018-008-7324-y

Court, F., Martin-Trujillo, A., Romanelli, V., Garin, I., Iglesias-Platas, I., Salafsky, I., Guitart, M., Perez de Nanclares, G., Lapunzina, P., & Monk, D. (2013). Genome-Wide Allelic Methylation Analysis Reveals Disease-Specific Susceptibility to Multiple Methylation Defects in Imprinting Syndromes. *Human Mutation*, *34*(4), 595–602. https://doi.org/10.1002/humu.22276

Craig, N. L. (1988). THE MECHANISM OF CONSERVATIVE SITE-SPECIFIC RECOMBINATION. *Annual Review of Genetics*, *22*(1), 77–105. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.000453

Crouse, H. V. (1960). The nature of the influence of X-translocations on sex of progeny in Sciara coprophila. *Chromosoma*, *11*(1), 146–166. https://doi.org/10.1007/BF00328650

Dean, W., Lucifero, D., & Santos, F. (2005). DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, *75*(2), 98–111. https://doi.org/10.1002/bdrc.20037

Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development*, *25*(10), 1010–1022. https://doi.org/10.1101/gad.2037511

DeChiara, T. M., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, *64*(4), 849–859. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90513-X

Denis, H., Ndlovu, M. N., & Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*, *12*(7), 647–656. https://doi.org/10.1038/embor.2011.110

Dhayalan, A., Rajavelu, A., Rathert, P., Tamas, R., Jurkowska, R. Z., Ragozin, S., & Jeltsch, A. (2010). The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(34), 26114–26120. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089433

Dindot, S. V., Person, R., Strivens, M., Garcia, R., & Beaudet, A. L. (2009). Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Research*, *19*(8), 1374–1383. https://doi.org/10.1101/gr.089185.108

Dittrich, B., Buiting, K., Korn, B., Rickard, S., Buxton, J., Saitoh, S., Nicholls, R. D., Poustka, A., Winterpacht, A., Zabel, B., & Horsthemke, B. (1996). Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nature Genetics*, *14*(2), 163–170. https://doi.org/10.1038/ng1096-163

Duymich, C. E., Charlet, J., Yang, X., Jones, P. A., & Liang, G. (2016). DNMT3B isoforms without catalytic activity stimulate gene body methylation as accessory proteins in somatic cells. *Nature Communications*, *7*, 11453. https://doi.org/10.1038/ncomms11453

Edwards, C. A., & Ferguson-Smith, A. C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(3), 281–289. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.013

Elgin, S. C. R., & Reuter, G. (2013). Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in Drosophila. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(8), 1–26. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017780

Engel, E. (1980). A new genetic concept: Uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *American Journal of Medical Genetics*, *6*(2), 137–143. https://doi.org/10.1002/ajmg.1320060207

Fallahian, M., Sebire, N. J., Savage, P. M., Seckl, M. J., & Fisher, R. A. (2013). Mutations in NLRP7 and KHDC3L Confer a Complete Hydatidiform Mole Phenotype on Digynic Triploid Conceptions. *Human Mutation*, *34*(2), 301–308. https://doi.org/10.1002/humu.22228

Feil, R., & Berger, F. (2007). Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends in Genetics*, *23*(4), 192–199. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.004

Feltus, F. A., Lee, E. K., Costello, J. F., Plass, C., & Vertino, P. M. (2003). Predicting aberrant CpG island methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(21), 12253–12258. https://doi.org/10.1073/pnas.2037852100

Feng, Y. Q., Lorincz, M. C., Fiering, S., Greally, J. M., & Bouhassira, E. E. (2001). Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(1), 298–309. https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.298-309.2001

Ferguson-Smith, A. C. (2011). Genomic imprinting: The emergence of an epigenetic paradigm. *Nature Reviews Genetics*, *12*(8), 565–575. https://doi.org/10.1038/nrg3032

Ferguson-Smith, A. C., Cattanach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V., & Surani, M. A. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature*, *351*(6328), 667–670. https://doi.org/10.1038/351667a0

Fiering, S., Whitelaw, E., & Martin, D. I. K. (2000). To be or not to be active: the stochastic nature of enhancer action. *BioEssays*, *22*(4), 381–387. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200004)22:4<381::AID-BIES8>3.0.CO;2-E

Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(5), 1827–1831. https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827

Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, *15*(5), 490–495. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.08.002

Fulmer-Smentek, S. B., & Francke, U. (2001). Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader–Willi deletion region. *Human Molecular Genetics*, *10*(6), 645–652. https://doi.org/10.1093/hmg/10.6.645

Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, *196*(2), 261–282. https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9

Glenn, C. C., Saitoh, S., Jong, M. T. C., Filbrandt, M. M., Surti, U., Driscoll, D. J., & Nicholls, R. D. (1996). Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *American Journal of Human Genetics*, *58*(2), 335–346.

Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, *74*(1), 481–514. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721

Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., & Jeltsch, A. (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13341–13348. https://doi.org/10.1074/jbc.M413412200

Greger, I. H., Aranda, A., & Proudfoot, N. (2000). Balancing transcriptional interference and initiation on the GAL7 promoter of Saccharomyces cerevisiae *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(15), 8415 LP – 8420. https://doi.org/10.1073/pnas.140217697

Gregory, R. I., Randall, T. E., Johnson, C. A., Khosla, S., Hatada, I., O'Neill, L. P., Turner, B. M., & Feil, R. (2001). DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes Snrpn and U2af1-rs1. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(16), 5426–5436. https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5426-5436.2001

Guéant, J. L., Chéry, C., Oussalah, A., Nadaf, J., Coelho, D., Josse, T., Flayac, J., Robert, A., Koscinski, I., Gastin, I., Filhine-Tresarrieu, P., Pupavac, M., Brebner, A., Watkins, D., Pastinen, T., Montpetit, A., Hariri, F., Tregouët, D., Raby, B. A., … Rosenblatt, D. S. (2018). APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nature Communications*, *9*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02306-5

Gujar, H., Weisenberger, D. J., & Liang, G. (2019). The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/genes10020172

Gummalla, M., Maeda, R. K., Castro Alvarez, J. J., Gyurkovics, H., Singari, S., Edwards, K. A., Karch, F., & Bender, W. (2012). abd-A regulation by the iab-8 noncoding RNA. *PLoS Genetics*, *8*(5), e1002720–e1002720. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002720

Guo, X., Wang, L., Li, J., Ding, Z., Xiao, J., Yin, X., He, S., Shi, P., Dong, L., Li, G., Tian, C., Wang, J., Cong, Y., & Xu, Y. (2015). Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. *Nature*, *517*(7536), 640–644. https://doi.org/10.1038/nature13899

Haaf, T. (2006). *Methylation Dynamics in the Early Mammalian Embryo: Implications of Genome Reprogramming Defects for Development BT - DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer* (W. Doerfler & P. Böhm (eds.); pp. 13–22). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5_2

Hackett, J. A., & Azim Surani, M. (2013). DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609), 1–8. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0328

Haig, D. (1997). Parental antagonism, relatedness asymmetries, and genomic imprinting. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *264*(1388), 1657–1662. https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0230

Hall, J. G. (1990). Genomic imprinting: Review and relevance to human diseases. *American Journal of Human Genetics*, *46*(5), 857–873.

Hanna, C. W., & Kelsey, G. (2014). The specification of imprints in mammals. *Heredity*, *113*(2), 176–183. https://doi.org/10.1038/hdy.2014.54

Hara, S., Takano, T., Fujikawa, T., Yamada, M., Wakai, T., Kono, T., & Obata, Y. (2014). Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but not functional genomic imprinting. *Human Molecular Genetics*, *23*(14), 3853–3864. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu100

Hata, K., Okano, M., Lei, H., & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, *129*(8), 1983–1993.

Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., & Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics*, *39*(3), 311–318. https://doi.org/10.1038/ng1966

Heinz, H. (2016). *Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur Untersuchung transkriptioneller Interferenz*. https://duepublico.uni-due.de/servlets/DocumentServlet?id=41627

Hillen, W., & Berens, C. (1994). MECHANISMS UNDERLYING EXPRESSION OF TN10 ENCODED TETRACYCLINE RESISTANCE. *Annual Review of Microbiology*, *48*(1), 345–369. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002021

Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K., & Meier, I. (1983). Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes: Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *Journal of Molecular Biology*, *169*(3), 707–721. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80166-1

Hobson, D. J., Wei, W., Steinmetz, L. M., & Svejstrup, J. Q. (2012). RNA Polymerase II Collision Interrupts Convergent Transcription. *Molecular Cell*, *48*(3), 365–374. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.027

Hongay, C. F., Grisafi, P. L., Galitski, T., & Fink, G. R. (2006). Antisense Transcription Controls Cell Fate in Saccharomyces cerevisiae. *Cell*, *127*(4), 735–745. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.038

Horsthemke, B. (1997). Structure and function of the human chromosome 15 imprinting center. *Journal of Cellular Physiology*, *173*(2), 237–241. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<237::AID-JCP28>3.0.CO;2-B

Horsthemke, B. (2010). Mechanisms of imprint dysregulation. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, *154*(3), 321–328. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30269

Horsthemke, B. (2014). In brief: Genomic imprinting and imprinting diseases. *Journal of Pathology*, *232*(5), 485–487. https://doi.org/10.1002/path.4326

Horsthemke, B., & Buiting, K. (2008). Chapter 8 Genomic Imprinting and Imprinting Defects in Humans. *Advances in Genetics*, *61*(07), 225–246. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(07)00008-9

Howell, C. Y., Bestor, T. H., Ding, F., Latham, K. E., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Chaillet, J. R. (2001). Genomic Imprinting Disrupted by a Maternal Effect Mutation in the Dnmt1 Gene. *Cell*, *104*(6), 829–838. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00280-X

Hsiao, L. L., Dangond, F., Yoshida, T., Hong, R., Jensen, R. V, Misra, J., Dillon, W., Lee, K. F., Clark, K. E., Haverty, P., Weng, Z., Mutter, G. L., Frosch, M. P., MacDonald, M. E., Milford, E. L., Crum, C. P., Bueno, R., Pratt, R. E., Mahadevappa, M., … Gullans, S. R. (2001). A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiological Genomics*, *7*(2), 97–104. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00040.2001

Hsu, C. C., Li, H. P., Hung, Y. H., Leu, Y. W., Wu, W. H., Wang, F. S., Lee, K. Der, Chang, P. J., Wu, C. S., Lu, Y. J., Huang, T. H. M., Chang, Y. S., & Hsiao, S. H. (2010). Targeted methylation of CMV and E1A viral promoters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *402*(2), 228–234. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.131

Ideraabdullah, F. Y., Vigneau, S., & Bartolomei, M. S. (2008). Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *647*(1–2), 77–85. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.08.008

Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands - “A rough guide.” *FEBS Letters*, *583*(11), 1713–1720. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012

Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J., & Ramsahoye, B. (2004). Severe Global DNA Hypomethylation Blocks Differentiation and Induces Histone Hyperacetylation in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(20), 8862–8871. https://doi.org/10.1128/mcb.24.20.8862-8871.2004

Jair, K. W., Bachman, K. E., Suzuki, H., Ting, A. H., Rhee, I., Yen, R. W. C., Baylin, S. B., & Schuebel, K. E. (2006). De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Research*, *66*(2), 682–692. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1980

Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, *293*(5532), 1074–1080. https://doi.org/10.1126/science.1063127

Jeppesen, P., & Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, *74*(2), 281–289. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90419-Q

Jeziorska, D. M., Murray, R. J. S., De Gobbi, M., Gaentzsch, R., Garrick, D., Ayyub, H., Chen, T., Li, E., Telenius, J., Lynch, M., Graham, B., Smith, A. J. H., Lund, J. N., Hughes, J. R., Higgs, D. R., & Tufarelli, C. (2017). DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(36), E7526–E7535. https://doi.org/10.1073/pnas.1703087114

Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A., & Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, *449*(7159), 248–251. https://doi.org/10.1038/nature06146

Joh, K., Matsuhisa, F., Kitajima, S., Nishioka, K., Higashimoto, K., Yatsuki, H., Kono, T., Koseki, H., & Soejima, H. (2018). Growing oocyte-specific transcription-dependent de novo DNA methylation at the imprinted Zrsr1-DMR. *Epigenetics and Chromatin*, *11*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s13072-018-0200-6

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *13*(7), 484–492. https://doi.org/10.1038/nrg3230

Jones, P. A., & Taylor, S. M. (1981). Hemimethylated duplex DNAs prepared from 5-azacytidine-treated cells. *Nucleic Acids Research*, *9*(12), 2933–2947. https://doi.org/10.1093/nar/9.12.2933

Kanber, D., Berulava, T., Ammerpohl, O., Mitter, D., Richter, J., Siebert, R., Horsthemke, B., Lohmann, D., & Buiting, K. (2009). The human retinoblastoma gene is imprinted. *PLoS Genetics*, *5*(12), 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000790

Kanduri, C. (2016). Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(1), 102–111. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.05.006

Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, H., Li, E., & Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, *429*(6994), 900–903. https://doi.org/10.1038/nature02633

Kawahara, M., Wu, Q., Takahashi, N., Morita, S., Yamada, K., Ito, M., Ferguson-Smith, A. C., & Kono, T. (2007). High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nature Biotechnology*, *25*(9), 1045–1050. https://doi.org/10.1038/nbt1331

Kelsey, G., & Feil, R. (2013). New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609). https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0336

Keogh, M.-C., Kurdistani, S. K., Morris, S. A., Ahn, S. H., Podolny, V., Collins, S. R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N. J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J. S., Hughes, T. R., Strahl, B. D., Grunstein, M., Greenblatt, J. F., Buratowski, S., & Krogan, N. J. (2005). Cotranscriptional Set2 Methylation of Histone H3 Lysine 36 Recruits a Repressive Rpd3 Complex. *Cell*, *123*(4), 593–605. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.025

Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Hiwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Park, E. S., Seo, J. S., & Ogawa, H. (2004). Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, *428*(6985), 860–864. https://doi.org/10.1038/nature02402

Kotzot, D. (2001). Complex and segmental uniparental disomy (UPD): Review and lessons from rare chromosomal complements. *Journal of Medical Genetics*, *38*(8), 497–507. https://doi.org/10.1136/jmg.38.8.497

Kotzot, D. (2008). Prenatal testing for uniparental disomy: Indications and clinical relevance. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *31*(1), 100–105. https://doi.org/10.1002/uog.5133

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, *128*(4), 693–705. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005

Kühnel, T., Heinz, H. S. B., Utz, N., Božić, T., Horsthemke, B., & Steenpass, L. (2020). A human somatic cell culture system for modelling gene silencing by transcriptional interference. *Heliyon*, *6*(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03261

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Landers, M., Bancescu, D. L., Le Meur, E., Rougeulle, C., Glatt-Deeley, H., Brannan, C., Muscatelli, F., & Lalande, M. (2004). Regulation of the large (~1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Research*, *32*(11), 3480–3492. https://doi.org/10.1093/nar/gkh670

Latos, P. A., Stricker, S. H., Steenpass, L., Pauler, F. M., Huang, R., Senergin, B. H., Regha, K., Koerner, M. V., Warczok, K. E., Unger, C., & Barlow, D. P. (2009). An in vitro ES cell imprinting model shows that imprinted expression of the Igf2r gene arises from an allele-specific expression bias. *Development*, *136*(3), 437–448. https://doi.org/10.1242/dev.032060

Latos, Paulina A, Pauler, F. M., Koerner, M. V, Şenergin, H. B., Hudson, Q. J., Stocsits, R. R., Allhoff, W., Stricker, S. H., Klement, R. M., Warczok, K. E., Aumayr, K., Pasierbek, P., & Barlow, D. P. (2012). Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing. *Science*, *338*(6113), 1469–1472. https://doi.org/10.1126/science.1228110

Leitão, E., Beygo, J., Zeschnigk, M., Klein-Hitpass, L., Bargull, M., Rahmann, S., & Horsthemke, B. (2018). Locus-Specific DNA Methylation Analysis by Targeted Deep Bisulfite Sequencing. In *Buchwald's Atlas of Metabolic & Bariatric Surgical Techniques and Procedures* (Vol. 1767, pp. 351–366). Elsevier. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7774-1_19

Lewis, M. W., Brant, J. O., Kramer, J. M., Moss, J. I., Yang, T. P., Hansen, P. J., Williams, R. S., & Resnick, J. L. (2014). Angelman syndrome imprinting center encodes a transcriptional promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(22), 6871–6875. https://doi.org/10.1073/pnas.1411261111

Lewis, M. W., Vargas-Franco, D., Morse, D. A., & Resnick, J. L. (2019). A mouse model of Angelman syndrome imprinting defects. *Human Molecular Genetics*, *28*(2), 220–229. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy345

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, *3*(9), 662–673. https://doi.org/10.1038/nrg887

Li, E., Beard, C., & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, *366*(6453), 362–365. https://doi.org/10.1038/366362a0

Li, L.-C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *18*(11), 1427—1431. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427

Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., & Ferguson-Smith, A. C. (2008). A Maternal-Zygotic Effect Gene, Zfp57, Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. *Developmental Cell*, *15*(4), 547–557. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.014

Li, Z., Cai, X., Cai, C.-L., Wang, J., Zhang, W., Petersen, B. E., Yang, F.-C., & Xu, M. (2011). Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, *118*(17), 4509–4518. https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-325241

Liang, G., Lin, J. C. Y., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F. A., & Jones, P. A. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(19), 7357–7362. https://doi.org/10.1073/pnas.0401866101

Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., Chan, T. L., Goossens, M., Hebeda, K. M., Voorendt, M., Lee, T. Y. H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S. J. B., Tsui, W. Y., Kong, C. K., Brunner, H. G., Van Kessel, A. G., Yuen, S. T., Van Krieken, J. H. J. M., Leung, S. Y., & Hoogerbrugge, N. (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3′ exons of TACSTD1. *Nature Genetics*, *41*(1), 112–117. https://doi.org/10.1038/ng.283

Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., Geurts Van Kessel, A., & Hoogerbrugge, N. (2013). EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Familial Cancer*, *12*(2), 169–174. https://doi.org/10.1007/s10689-012-9591-x

Lin, D., Hiron, T. K., & O'Callaghan, C. A. (2018). Intragenic transcriptional interference regulates the human immune ligand MICA. *The EMBO Journal*, *37*(10), 1–20. https://doi.org/10.15252/embj.201797138

Lloyd, V. K., Sinclair, D. A., & Grigliatti, T. A. (1999). Genomic imprinting and position-effect variegation in Drosophila melanogaster. *Genetics*, *151*(4), 1503–1516.

Loew, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H., & Gossen, M. (2010). Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnology*, *10*, 81. https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-81

Lossie, A. C., Whitney, M. M., Amidon, D., Dong, H. J., Chen, P., Theriaque, D., Hutson, A., Nicholls, R. D., Zori, R. T., Williams, C. A., & Driscoll, D. J. (2001). Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *38*(12), 834–845. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748306%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1734773

Lucas, B., Grigo, K., Erdmann, S., Lausen, J., Klein-Hitpass, L., & Ryffel, G. U. (2005). HNF4α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene*, *24*(42), 6418–6431. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208794

Lucifero, D., La Salle, S., Bourc'his, D., Martel, J., Bestor, T. H., & Trasler, J. M. (2007). Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Developmental Biology*, *7*, 1–14. https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-36

Lucifero, D., Mann, M. R. W., Bartolomei, M. S., & Trasler, J. M. (2004). Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Human Molecular Genetics*, *13*(8), 839–849. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh104

Luedi, P. P., Dietrich, F. S., Weidman, J. R., Bosko, J. M., Jirtle, R. L., & Hartemink, A. J. (2007). Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Research*, *17*(12), 1723–1730. https://doi.org/10.1101/gr.6584707

Luedi, P. P., Hartemink, A. J., & Jirtle, R. L. (2005). Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Research*, *15*(6), 875–884. https://doi.org/10.1101/gr.3303505

Mackay, D. J. G., Callaway, J. L. A., Marks, S. M., White, H. E., Acerini, C. L., Boonen, S. E., Dayanikli, P., Firth, H. V., Goodship, J. A., Haemers, A. P., Hahnemann, J. M. D., Kordonouri, O., Masoud, A. F., Oestergaard, E., Storr, J., Ellard, S., Hattersley, A. T., Robinson, D. O., & Temple, I. K. (2008). Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nature Genetics*, *40*(8), 949–951. https://doi.org/10.1038/ng.187

Makedonski, K., Abuhatzira, L., Kaufman, Y., Razin, A., & Shemer, R. (2005). MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Human Molecular Genetics*, *14*(8), 1049–1058. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi097

Mapendano, C. K., Kishino, T., Miyazaki, K., Kondo, S., Yoshiura, K. I., Hishikawa, Y., Koji, T., Niikawa, N., & Ohta, T. (2006). Expression of the Snurf-Snrpn IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *Journal of Human Genetics*, *51*(3), 236–243. https://doi.org/10.1007/s10038-005-0351-8

Marinus, M. G., & Løbner-Olesen, A. (2014). DNA Methylation. *EcoSal Plus*, *6*(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0003–2013. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013

Martens, J. A., Wu, P. Y. J., & Winston, F. (2005). Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in Saccharomyces cerevisiae. *Genes and Development*, *19*(22), 2695–2704. https://doi.org/10.1101/gad.1367605

Martin, C. C., & McGowan, R. (1995). Genotype-specific modifiers of transgene methylation and expression in the zebrafish, Danio rerio. *Genetical Research*, *65*(1), 21–28. https://doi.org/10.1017/S0016672300032973

Mattick, J. S., Amaral, P. P., Dinger, M. E., Mercer, T. R., & Mehler, M. F. (2009). RNA regulation of epigenetic processes. *BioEssays*, *31*(1), 51–59. https://doi.org/10.1002/bies.080099

McGrath, J., & Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, *220*(4603), 1300–1302. https://doi.org/10.1126/science.6857250

McGrath, J., & Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, *37*(1), 179–183. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90313-1

Mehta, S., Williamson, C. M., Ball, S., Tibbit, C., Beechey, C., Fray, M., & Peters, J. (2015). Transcription driven somatic DNA methylation within the imprinted Gnas cluster. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117378

Meng, L., Person, R. E., Huang, W., Zhu, P. J., Costa-Mattioli, M., & Beaudet, A. L. (2013). Truncation of Ube3a-ATS Unsilences Paternal Ube3a and Ameliorates Behavioral Defects in the Angelman Syndrome Mouse Model. *PLoS Genetics*, *9*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004039

Messerschmidt, D. M. (2012). Should I stay or should I go: protection and maintenance of DNA methylation at imprinted genes. *Epigenetics*, *7*(9), 969–975. https://doi.org/10.4161/epi.21337

Messerschmidt, D. M., Knowles, B. B., & Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & Development*, *28*(8), 812–828. https://doi.org/10.1101/gad.234294.113

Michel, P. O., Degen, C., Hubert, M., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2012). A NanoDrop-based method for rapid determination of viability decline in suspension cultures of animal cells. *Analytical Biochemistry*, *430*(2), 138–140. https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.028

Moore, T., & Haig, D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in Genetics*, *7*(2), 45–49. https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90230-N

Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in Drosophila Author (s): T . H . Morgan Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/1635471. *Science*, *32*(812), 120–122.

Moritz, B., Becker, P. B., & Göpfert, U. (2015). CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. *Scientific Reports*, *5*, 1–8. https://doi.org/10.1038/srep16952

Muller, H. J. (1930). Types of visible variations induced by X-rays inDrosophila. *Journal of Genetics*, *22*(3), 299–334. https://doi.org/10.1007/BF02984195

Neumann, L. C., Markaki, Y., Mladenov, E., Hoffmann, D., Buiting, K., & Horsthemke, B. (2012). The imprinted NPAP1/C15orf2 gene in the Prader–Willi syndrome region encodes a nuclear pore complex associated protein. *Human Molecular Genetics*, *21*(18), 4038–4048. https://doi.org/10.1093/hmg/dds228

Nimura, K., Ishida, C., Koriyama, H., Hata, K., Yamanaka, S., Li, E., Ura, K., & Kaneda, Y. (2006). Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin.pdf. *Genes to Cells*, *11*, 1225–1237. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.001012.x

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. a. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, *1*(3), 1559–1582. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236

Nordheim, A., & Knippers, R. (2015). Molekulare Genetik 11.Auflage. In *Georg Thieme Verlag*.

Numata, K., Kohama, C., Abe, K., & Kiyosawa, H. (2011). Highly parallel SNP genotyping reveals high-resolution landscape of mono-allelic Ube3a expression associated with locus-wide antisense transcription. *Nucleic Acids Research*, *39*(7), 2649–2657. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1201

O'Gorman, S., Fox, D. T., & Wahl, G. M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*, *251*(4999), 1351 LP – 1355. https://doi.org/10.1126/science.1900642

Ohhata, T., Hoki, Y., Sasaki, H., & Sado, T. (2008). Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification. *Development*, *135*(2), 227–235. https://doi.org/10.1242/dev.008490

Okae, H., Chiba, H., Hiura, H., Hamada, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Kikuchi, H., Yoshida, H., Tanaka, A., Suyama, M., & Arima, T. (2014). Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Dynamics during Early Human Development. *PLoS Genetics*, *10*(12), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004868

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, *99*(3), 247–257. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6

Palmer, A. C., Barry Egan, J., & Shearwin, K. E. (2011). Transcriptional interference by RNA polymerase pausing and dislodgement of transcription factors. *Transcription*, *2*(1), 9–14. https://doi.org/10.4161/trns.2.1.13511

Papapetrou, E. P., & Schambach, A. (2016). Gene insertion into genomic safe harbors for human gene therapy. *Molecular Therapy*, *24*(4), 678–684. https://doi.org/10.1038/mt.2016.38

Petruk, S., Sedkov, Y., Riley, K. M., Hodgson, J., Schweisguth, F., Hirose, S., Jaynes, J. B., Brock, H. W., & Mazo, A. (2006). Transcription of bxd Noncoding RNAs Promoted by Trithorax Represses Ubx in cis by Transcriptional Interference. *Cell*, *127*(6), 1209–1221. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.039

Pfaffl, M W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Pfaffl, Michael W., & Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, *23*, 275–282. https://doi.org/10.1023/A:1005658330108

Pham, D. H., Moretti, P. A. B., Goodall, G. J., & Pitson, S. M. (2008). Attenuation of leakiness in doxycycline-inducible expression via incorporation of 3′ AU-rich mRNA destabilizing elements. *BioTechniques*, *45*(2), 155–162. https://doi.org/10.2144/000112896

Pradhan, S., Bacolla, A., Larson, J. E., Roberts, R. J., & Wells, R. D. (2001). Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(21), 18605–18613. https://doi.org/10.1074/jbc.m100404200

Prickett, A. R., & Oakey, R. J. (2012). A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. *Molecular Genetics and Genomics*, *287*(8), 621–630. https://doi.org/10.1007/s00438-012-0708-6

Proudhon, C., Duffié, R., Ajjan, S., Cowley, M., Iranzo, J., Carbajosa, G., Saadeh, H., Holland, M. L., Oakey, R. J., Rakyan, V. K., Schulz, R., & Bourc'his, D. (2012). Protection against De Novo Methylation Is Instrumental in Maintaining Parent-of-Origin Methylation Inherited from the Gametes. *Molecular Cell*, *47*(6), 909–920. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.010

Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hulur, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., & Lahn, B. T. (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE*, *5*(5), 3–6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611

Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P. V., Grimaldi, G., Riccio, A., & Trono, D. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Molecular Cell*, *44*(3), 361–372. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.032

Rahmann, S., Beygo, J., Kanber, D., Martin, M., Horsthemke, B., & Buiting, K. (2013). Amplikyzer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing. *PeerJ Preprints*, 1–27. https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.122

Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, *293*(5532), 1089–1093. https://doi.org/10.1126/science.1063443

Reik, W., & Maher, E. R. (1997). Imprinting in clusters: Lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. In *Trends in Genetics* (Vol. 13, Issue 8, pp. 330–334). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01200-6

Reik, W., & Walter, J. (2001a). Evolution of imprinting mechanisms: The battle of the sexes begins in the zygote. *Nature Genetics*, *27*(3), 255–256. https://doi.org/10.1038/85804

Reik, W., & Walter, J. (2001b). Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics*, *2*(1), 21–32. https://doi.org/10.1038/35047554

Renfree, M. B., Hore, T. A., Shaw, G., Marshall Graves, J. A., & Pask, A. J. (2009). Evolution of Genomic Imprinting: Insights from Marsupials and Monotremes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*(1), 241–262. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150026

Renfree, M. B., Suzuki, S., & Kaneko-Ishino, T. (2013). The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609). https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0151

Riso, V., Cammisa, M., Kukreja, H., Anvar, Z., Verde, G., Sparago, A., Acurzio, B., Lad, S., Lonardo, E., Sankar, A., Helin, K., Feil, R., Fico, A., Angelini, C., Grimaldi, G., & Riccio, A. (2016). ZFP57 maintains the parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes and differentially affects non-imprinted targets in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, *44*(17). https://doi.org/10.1093/nar/gkw505

Rose, N. R., & Klose, R. J. (2014). Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1839*(12), 1362–1372. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.02.007

Rougeulle, C., Cardoso, C., Fontés, M., Colleaux, L., & Lalande, M. (1998). An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nature Genetics*, *19*(1), 15–16. https://doi.org/10.1038/ng0598-15

Saeki, H., & Svejstrup, J. Q. (2009). Stability, Flexibility, and Dynamic Interactions of Colliding RNA Polymerase II Elongation Complexes. *Molecular Cell*, *35*(2), 191–205. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.009

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Sauer, B. (1994). Site-specific recombination: developments and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *5*(5), 521–527. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90068-X

Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1412–1417. https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103

Searle, A. G., & Beechey, C. V. (1978). Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenetic and Genome Research*, *20*(1–6), 282–303. https://doi.org/10.1159/000130859

Seisenberger, S., Peat, J. R., Hore, T. A., Santos, F., Dean, W., & Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: Building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609), 1–11. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0330

Sendžikaitė, G., Hanna, C. W., Stewart-Morgan, K. R., Ivanova, E., & Kelsey, G. (2019). A DNMT3A PWWP mutation leads to methylation of bivalent chromatin and growth retardation in mice. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-09713-w

Senkel, S., Waldner, C., Ryffel, G., & Thomas, H. (2009). Improved conditional expression systems resulting in physiological level of HNF4 expression confirm HNF4 induced apoptosis in the pancreatic -cell line INS-1. *BMC Research Notes*, *2*, 1–7. https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-210

Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S. I., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M., & Koseki, H. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, *450*(7171), 908–912. https://doi.org/10.1038/nature06397

Shearwin, K. E., Callen, B. P., & Egan, J. B. (2005). Transcriptional interference - A crash course. *Trends in Genetics*, *21*(6), 339–345. https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.04.009

Singh, V. B., Sribenja, S., Wilson, K. E., Attwood, K. M., Hillman, J. C., Pathak, S., & Higgins, M. J. (2017). Blocked transcription through KvDMR1 results in absence of methylation and gene silencing resembling Beckwith-Wiedemann syndrome. *Development*, *144*(10), 1820–1830. https://doi.org/10.1242/dev.145136

Sleutels, F., Zwart, R., & Barlow, D. P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, *415*(6873), 810–813. https://doi.org/10.1038/415810a

Smallwood, S. A., Lee, H. J., Angermueller, C., Krueger, F., Saadeh, H., Peat, J., Andrews, S. R., Stegle, O., Reik, W., & Kelsey, G. (2014). Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nature Methods*, *11*(8), 817–820. https://doi.org/10.1038/nmeth.3035

Smith, E. Y., Futtner, C. R., Chamberlain, S. J., Johnstone, K. A., & Resnick, J. L. (2011). Transcription is required to establish maternal imprinting at the Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome locus. *PLoS Genetics*, *7*(12), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002422

Stec, I., Nagl, S. B., Van Ommen, G. J. B., & Den Dunnen, J. T. (2000). The PWWP domain: A potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Letters*, *473*(1), 1–5. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01449-6

Steenpass, L., Kanber, D., Hiber, M., Buiting, K., Horsthemke, B., & Lohmann, D. (2013). Human PPP1R26P1 Functions as cis-Repressive Element in Mouse Rb1. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074159

Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, *403*(6765), 41–45. https://doi.org/10.1038/47412

Strogantsev, R., Krueger, F., Yamazawa, K., Shi, H., Gould, P., Goldman-Roberts, M., McEwen, K., Sun, B., Pedersen, R., & Ferguson-Smith, A. C. (2015). Allele-specific binding of ZFP57 in the epigenetic regulation of imprinted and non-imprinted monoallelic expression. *Genome Biology*, *16*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0672-7

Suetake, I., Morimoto, Y., Fuchikami, T., Abe, K., & Tajima, S. (2006). Stimulation effect of Dnmt3L on the DNA methylation activity of Dnmt3a2. *Journal of Biochemistry*, *140*(4), 553–559. https://doi.org/10.1093/jb/mvj185

Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(26), 27816–27823. https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200

Surani, M. A. H., & Barton, S. C. (1983). Development of Gynogenetic Eggs. *Science*, *222*, 1034–1036.

Surani, M. A. H., Barton, S. C., & Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, *308*(5959), 548–550. https://doi.org/10.1038/308548a0

Takahashi, N., Coluccio, A., Thorball, C. W., Planet, E., Shi, H., Offner, S., Turelli, P., Imbeault, M., Ferguson-Smith, A. C., & Trono, D. (2019). ZNF445 is a primary regulator of genomic imprinting. *Genes and Development*, *33*(1–2), 49–54. https://doi.org/10.1101/gad.320069.118

Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3740–3745. https://doi.org/10.1073/pnas.052410099

Tatton-Brown, K., Seal, S., Ruark, E., Harmer, J., Ramsay, E., Del Vecchio Duarte, S., Zachariou, A., Hanks, S., O'Brien, E., Aksglaede, L., Baralle, D., Dabir, T., Gener, B., Goudie, D., Homfray, T., Kumar, A., Pilz, D. T., Selicorni, A., Temple, I. K., … Rahman, N. (2014). Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability. *Nature Genetics*, *46*(4), 385–388. https://doi.org/10.1038/ng.2917

Thermo Scientific. (2012). *Flp-In T-REx Core Kit Manual, 2012, Version 25-0366. 25*.

Trivers, R., & Burt, A. (1999). Kinship and Genomic Imprinting. In R. Ohlsson (Ed.), *Genomic Imprinting: An Interdisciplinary Approach* (pp. 1–21). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69111-2_1

Tufarelli, Stanley, J. A. S., Garrick, D., Sharpe, J. A., Ayyub, H., Wood, W. G., & Higgs, D. R. (2003). Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nature Genetics*, *34*(2), 157–165.

Utz, N. (2015). *Analysis of transcriptional read-through of imprinted promoters in a cell culture model*.

Valente, F. M., Sparago, A., Freschi, A., Hill-Harfe, K., Maas, S. M., Frints, S. G. M., Alders, M., Pignata, L., Franzese, M., Angelini, C., Carli, D., Mussa, A., Gazzin, A., Gabbarini, F., Acurzio, B., Ferrero, G. B., Bliek, J., Williams, C. A., Riccio, A., & Cerrato, F. (2019). Transcription alterations of KCNQ1 associated with imprinted methylation defects in the Beckwith–Wiedemann locus. *Genetics in Medicine*, *0*(0), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41436-018-0416-7

Veland, N., Lu, Y., Hardikar, S., Gaddis, S., Zeng, Y., Liu, B., Estecio, M. R., Takata, Y., Lin, K., Tomida, M. W., Shen, J., Saha, D., Gowher, H., Zhao, H., & Chen, T. (2019). DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, *47*(1), 152–167. https://doi.org/10.1093/nar/gky947

Vertino, P. M., Yen, R. W., Gao, J., & Baylin, S. B. (1996). De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(8), 4555–4565. https://doi.org/10.1128/mcb.16.8.4555

Wang, X., Xu, Z., Tian, Z., Zhang, X., Xu, D., Li, Q., Zhang, J., & Wang, T. (2017). The EF-1α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *21*(11), 3044–3054. https://doi.org/10.1111/jcmm.13216

Wawrzik, M., Spiess, A. N., Herrmann, R., Buiting, K., & Horsthemke, B. (2009). Expression of SNURF-SNRPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *European Journal of Human Genetics*, *17*(11), 1463–1470. https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.83

Weiler, K., & Wakimoto, B. (1995). Heterochromatin and. *Annual Reviews of Genetics*, *29*, 577–605.

Weinberg, D. N., Papillon-cavanagh, S., Chen, H., Yue, Y., Chen, X., Rajagopalan, K. N., Mcguire, J. T., Xu, X., Nikbakht, H., Lemiesz, A. E., Marchione, D. M., Marunde, M. R., Meiners, M. J., Cheek, M. A., Keogh, M., Bareke, E., Djedid, A., & Harutyunyan, A. S. (2019). The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature*. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1534-3

Werdien, D., Peiler, G., & Ryffel, G. U. (2001). FLP and Cre recombinase function in Xenopus embryos. *Nucleic Acids Research*, *29*(11), E53-e53. https://doi.org/10.1093/nar/29.11.e53

Wilkins, J. F., & Haig, D. (2003a). Inbreeding, maternal care and genomic imprinting. *Journal of Theoretical Biology*, *221*(4), 559–564. https://doi.org/10.1006/jtbi.2003.3206

Wilkins, J. F., & Haig, D. (2003b). What good is genomic imprinting: The function of parent-specific gene expression. *Nature Reviews Genetics*, *4*(5), 359–368. https://doi.org/10.1038/nrg1062

Williams, D., Hodgetts, V., & Gupta, J. (2010). Recurrent hydatidiform moles. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, *150*(1), 3–7. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.01.003

Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world. *Genes and Development*, *23*(13), 1494–1504. https://doi.org/10.1101/gad.1800909

Wu, J., Issa, J. P., Herman, J., Bassett, D. E., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1993). Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(19), 8891–8895. https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8891

Xiao, C., Qiu, S., & Robertson, R. M. (2017). The white gene controls copulation success in Drosophila melanogaster. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08155-y

Xie, W., Barr, C. L., Kim, A., Yue, F., Lee, A. Y., Eubanks, J., Dempster, E. L., & Ren, B. (2012). Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell*, *148*(4), 816–831. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.035

Xu, Q., Xiang, Y., Wang, Q., Wang, L., Brind'Amour, J., Bogutz, A. B., Zhang, Y., Zhang, B., Yu, G., Xia, W., Du, Z., Huang, C., Ma, J., Zheng, H., Li, Y., Liu, C., Walker, C. L., Jonasch, E., Lefebvre, L., … Xie, W. (2019). SETD2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development. *Nature Genetics*, *51*(5), 844–856. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0398-7

Yamada, K., Lim, J., Dale, J. H., Chen, H., Shinn, P., Palm, C. J., Southwick, A. M., Wu, H. C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, S. X., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., … Ecker, J. R. (2003). Empirical Analysis of Transcriptional Activity in the Arabidopsis Genome. *Science*, *302*(5646), 842–846. https://doi.org/10.1126/science.1088305

Yang, X., Han, H., DeCarvalho, D. D., Lay, F. D., Jones, P. A., & Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*, *26*(4), 577–590. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028

Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., & Eriksson, E. (1998). Tetracycline Repressor, tetR, rather than the tetR–Mammalian Cell Transcription Factor Fusion Derivatives, Regulates Inducible Gene Expression in Mammalian Cells. *Human Gene Therapy*, *9*(13), 1939–1950. https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.13-1939

Yen, R. W., Vertino, P. M., Nelkin, B. D., Yu, J. J., el-Deiry, W., Cumaraswamy, A., Lennon, G. G., Trask, B. J., Celano, P., & Baylin, S. B. (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, *20*(9), 2287–2291. https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2287

Zhang, Y., Jurkowska, R., Soeroes, S., Rajavelu, A., Dhayalan, A., Bock, I., Rathert, P., Brandt, O., Reinhardt, R., Fischle, W., & Jeltsch, A. (2010). Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Research*, *38*(13), 4246–4253. https://doi.org/10.1093/nar/gkq147

Zhou, V. W., Goren, A., & Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics*, *12*(1), 7–18. https://doi.org/10.1038/nrg2905

Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy*, *13*(19), 1382–1390. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302780

Zuo, X., Sheng, J., Lau, H. T., McDonald, C. M., Andrade, M., Cullen, D. E., Bell, F. T., Iacovino, M., Kyba, M., Xu, G., & Li, X. (2012). Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(3), 2107–2118. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322644

9 Anhang

9.1 Oligonukleotide

Tabelle 3: *Primer* für die Generierung der Promotorfragmente und des *Spacers*. Die *Primer* weisen Restriktionsschnittstellen (rot) auf.

Fragment	Primer	Sequenz (5' – 3')
MSH2^{S}_ex1	MSH2-ex1-EcoRV-fwd	GACTGATATCGGGACATAGCAGGCCATATA
	MSH2-prom-EcoRV-rev	GACTGATATCACTCTCTGAGGCGGGAAAG
SNRPN^{S}_ex1	SNRPN_CpG77_F3	GACTGATATCCCCCCTCTCATTGCAACAGT
	SNRPN_CpG77_R3	GACTGATATCGCCGCCACCACTCTAGTTTA
GNAS^{S}_ex1_1	GNAS_1_fwd	GACTGATATCGGCGGGACACTTGAGAGTTT
	GNAS_1_rev	GACTGATATCTCCTTGGTTTGGCTCTTGGG
GNAS^{S}_ex1_2	GNAS_2_fwd	GACTGATATCATTTTTCGCGCTTCCCCTTC
	GNAS_2_rev	GACTGATATCCCTCCTCCTGGGCTTCTGG
GNAS^{S}_ex1_comb	GNAS_1_fwd	GACTGATATCGGCGGGACACTTGAGAGTTT
	GNAS_2_rev	GACTGATATCCCTCCTCCTGGGCTTCTGG
GNAS^{S}_ex1_long	GNAS_3_fwd	GACTGATATCGAAGTGGAGCAAACTGGGGA
	GNAS_1_rev	GACTGATATCTCCTTGGTTTGGCTCTTGGG
GNAS^{S}_ex1_long_comb	GNAS_3_fwd	GACTGATATCGAAGTGGAGCAAACTGGGGA
	GNAS_2_rev	GACTGATATCCCTCCTCCTGGGCTTCTGG
Spacer	Intergenic_MSH2_F	GACTAAGCTTCAGCCTGAGTGATAGGAGCG
	Intergenic_MSH2_R	GACTAAGCTTCAGGCTGGATTGCAGTGGTA

Tabelle 4: *Primer* für die *Site-Directed Mutagenesis*. Die verwendeten *Primer* weisen entweder Restriktionsschnittstellen (rot) oder einen Basenaustausch (blau) in der Sequenz auf.

Fragment	Primer	Sequenz (5' – 3')
pcDNA5_XL	SdM_BXL-nolinker_fwd	AGAGGAGACAATGGTTCTATAGAGAGTAGAAAGTGAAAGAAA
	SdM_BXL-nolinker_rev	TTTCACTTTCTACTCTGATATCAACCATTGTCTCCTCTTA
MSH2^{S}_ex1	MSH2_promoter_mut_F	AGGAGGAAGGCTAGTTTTTTTGTTGTTTTCAAGTTTCCTTCTG
	MSH2_promoter_mut_R	CAGAAGGAAACTTGAAAACAACAAAAAAACTAGCCTTCCTCCT
MSH2^{S}_ex1_splice 3	MSH2_exon1_mut1_F	GTCGCGCATTTTCTTCAACCAAAGGTGAGGAGGTTTCGACATG
	MSH2_exon1_mut1_R	CATGTCGAAACCTCCTCACCTTTTGGTTGAAGAAAATGCGCGAC
	MSH2_exon1_mut2_F	CGGCTTCGTGCGCTTCTTTCAAGCATGCCGGAGAAGCCGACCA
	MSH2_exon1_mut2_R	TGGTCGGCTTCTCCGGCATGCTTTGAAAGAAGCGCACGAAGCCG
MSH2^{S}_ex1_splice 4	MSH2_exon1_mut3_F	GCGCATTTTCTTCAACCAAAAATGAGGAGGTTTCGACATGGCG
	MSH2_exon1_mut3_R	CGCCATGTCGAAACCTCCTCATTTTTTGGTTGAAGAAAATGCGC
	MSH2_exon1_mut4_F	GCTTCGTGCGCTTCTTTCAAATTATGCCGGAGAAGCCGACCACC
	MSH2_exon1_mut4_R	GGTGGTCGGCTTCTCCGGCATAATTTGAAAGAAGCGCACGAAGC
SNRPN^{S}_ex1	SNRPN_1_sdM_F	CCTGCGCGGCCGCAGTGGCAGGCTGGCGCGC
	SNRPN_1_sdM_R	GCGCGCCAGCCTGCCACTGCGGCCGCGCAGG

Tabelle 5: *Primer* und Sonden für die qRT-PCR-Analyse.

Fragment	Primer	Sequenz (5' – 3')	UPL
ocHBB2	rBG_UPLF2 rBG_UPLR2	TGTCGAGATCCTGAGAACTTCA GATGAGACAGCACAACAACCA	61
MSH2 exon1/3	MSH2_exon1_fwd rBG_UPLR2	CTTCGTGCGCTTCTTTCAGG GATGAGACAGCACAACAACCA	61
	MSH2_exon1_fwd5_TSS rBG_UPLR2	GAGGTGAGGAGGTTTCGACAT GATGAGACAGCACAACAACCA	61
SNRPN exon1/3	SNRPN_exon1_fwd rBG_UPLR2	CTCAGGCGGGGATGTGTG GATGAGACAGCACAACAACCA	61
GAPDH	GAPDH_UPLF2 GAPDH_UPLR2	GCACCAGGTGGTCTCCTCT TGACAAAGTGGTCGTTGAGG	25
DNMT3A	DNMT3A2_UPL_F2 DNMT3A2_UPL_R2	AATTTGACCCTCCAAAGGTTTAC AAGTCCTTCAGCACCAGGAG	33
DNMT3L	DNMT3L_UPL_F1 DNMT3L_UPL_R1	CTCTCAAGCTCCGTTTCACC GGAGACTTCCGCAGCAGAT	13
ZFP57	ZFP57_UPL_F2 ZFP57_UPL_R2	GCTGAAGCCAATCGAACCTA GCCACATCCTCAAAGGTGAC	67

Tabelle 6: Bisulfit-*Primer* für die Methylierungsanalysen der Promotorregionen mittels Sanger-und *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung. Die für die Amplifikation Bisulfit-konvertierter DNA verwendeten *Primer* weisen nicht-spezifische *Tag*-Sequenzen auf (F-*Tag*: grün, R-*Tag*: braun). An diese Sequenzen binden in der Re-PCR die spezifischen *Index Primer* für die anschließende Analyse mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung. Die enthaltenen Mischbasen („*Wobble*“) sind in blau dargestellt.

Fragment	Primer	Sequenz (5’ – 3’)
MSH2 (Sanger-Sequenzierung)	pcDNA5_XL_Bis_F1	CTTGCTTCCTGGCACGAGTGGGAAGATGTTTTTTGTATTATTATG
	MSH2_CpG_RM13_1	CAGGAAACAGCTATGACACCCAATCAACTTCCAAAACTAC
MSH2 Fragment 1	pcDNA5_XL_Bis_F1	CTTGCTTCCTGGCACGAGTGGGAAGATGTTTTTTGTATTATTATG
	MSH2_Bis_R5	CAGGAAACAGCTATGACAAACATAAAAATAACATCAAAAAAAA
MSH2 Fragment 2	MSH2_Bis_F5	CTTGCTTCCTGGCACGAGTAGTAAGGAGGTTGTGTAGAATAAATT
	MSH2_Bis_R7	CAGGAAACAGCTATGACTAAAACTCCTTTCTATATTTACTCAACTAC
MSH2 Fragment 3	MSH2_Bis_F2	CTTGCTTCCTGGCACGAGTTTGTAGTTGAGTAAATATAGAAAGGAGTT
	MSH2_Bis_R2	CAGGAAACAGCTATGACCTCCAACTACAACRTCTCCTTC
MSH2 Fragment 4	MSH2_Bis_F1	CTTGCTTCCTGGCACGAGGAAGGAGAYGTTGTAGTGG
	MSH2_Bis_R4	CAGGAAACAGCTATGACAAAAAAAACAATAATTAATATCACTCTCTA
SNRPN	pcDNA5_XL_Bis_F1	CTTGCTTCCTGGCACGAGTGGGAAGATGTTTTTTGTATTATTATG
	SNRPN_RM13	CAGGAAACAGCTATGACCCCCAAACTATCTCTTAAAAAAAACCACC

Tabelle 7: *Index Primer* zur Generierung der Fragmente für die *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung. Spezifische *Index Primer* binden an die zuvor genutzten Bisulfit-*Primer. Die Primer*-Sequenz setzt sich wie folgt zusamen: P5 Adapter (schwarz, 5‘), *Index* (rot), P5 *Primer* (schwarz, Mitte), variable Sequenz (blau), F-*Tag* (grün), R-*Tag* (braun). *Primer* wurden aus Leitão et al. 2018 entnommen.

Index Primer	Sequenz (5’ – 3’)
NSE 501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGATCGCACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTTATAGC CTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTCTATACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTATAGAG CTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATCCTCTACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTCCTATC CTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGTAGAACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTGGCTCT CTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAAGGAGACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTAGGCGACTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTGCATAACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTTAATCTCTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGAGTAACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTCAGGACCTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTAAGCCTACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTGTACTGCTTGCTTCCTGGCACGAG
NSE 517	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCGTAAGAACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTTAGATCCTTGCTTCCTGGCACGAG
N701	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N702	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N703	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTGCCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N704	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTCAGGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N705	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGGAGTCCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N706	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGCCTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N707	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGAGAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N708	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCCTCTCTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N709	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCGTAGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N710	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAGCCTCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N711	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGCCTCTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC
N712	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCCTCTACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT CTTCCGATCTCAGGAAACAGCTATGAC

9.2 DNA-Sequenzen der Testpromotoren

Nachfolgend sind die für die Etablierung des Zellkultursystems genutzten DNA-Sequenzen der Testpromotorregionen angegeben.

9.2.1 *MSH2*

GGGACATAGCAGGCCATATAAATGTTTTCGAATGAGTGAATCATCAACGAGTGGATGAAACGATAATGTGG
CTAACAGGCAGCAGTAAGGAGGCTGTGTAGAATAAACCCGTAATCCCGATGTTGGCAGTTTGCTTAGAAA
GAAAAAGGGAGGCAGTCGGAGAGGGGCACACGTTTTAACAAAATACTGGGAGGAGGAGGAAGGCTAGTT
TTTTT**G**TTGTTTTCAAGTTTCCTTCTGATGTTACTCCCATGCTTCCGGGCACATTACGAGCTCAGTGCCTGC
CGGAAATCTCCCACCTGGTGGCAACCTACCCTTGCATACACCCCACCCAGGGGCTTCAAGCCTTGCAGCT
GAGTAAACACAGAAAGGAGCTCTACTAAGGATGCGCGTCTGCGGGTTTCCGCGCGACCTAGGCGCAGGC
ATGCGCAGTAGCTAAAGTCACCAGCGTGCGCGGGAAGCTGGGCCGCGTCTGCTTATGATTGGTTGCCGC
GGCAGACTCCCACCCACCGAAACGCAGCCCTGGAAGCTGATTGGGTGTGGTCGCCGTGGCCGGACGCC
GCTCGGGGGACGTGGGAGGGGAGGCGGGAAACAGCTTAGTGGGTGTGGGGTCGCGCATTTTCTTCAAC
CAGGAGGTGAGGAGGTTTCGACATGGCGGTGCAGCCGAAGGAGACGCTGCAGTTGGAGAGCGCGGCCG
AGGTCGGCTTCGTGCGCTTCTTTCAGGGCATGCCGGAGAAGCCGACCACCACAGTGCGCCTTTTCGACC
GGGGCGACTTCTATACGGCGCACGGCGAGGACGCGCTGCTGGCCGCCCGGGAGGTGTTCAAGACCCAG
GGGGTGATCAAGTACATGGGGCCGGCAGGTGAGGGCCGGGACGGCGCGTGCTGGGGAGGGACCCGGG
GCCTTGTGGCGCGGCTCCTTTCCCGCCTCAGAGAGT

Abbildung 37: *MSH2*^{S}_ex1-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *MSH2*^{S}_ex1 ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 934 bp. Die Sequenzunterschiede zum endogenen Promotor der Zelllinie Flp-In T-REx HeLa sind in der Sequenz rot markiert, das Exon 1 ist grau hinterlegt.

GGGACATAGCAGGCCATATAAATGTTTTCGAATGAGTGAATCATCAACGAGTGGATGAAACGATAATGTGG
CTAACAGGCAGCAGTAAGGAGGCTGTGTAGAATAAACCCGTAATCCCGATGTTGGCAGTTTGCTTAGAAA
GAAAAAGGGAGGCAGTCGGAGAGGGGCACACGTTTTAACAAAATACTGGGAGGAGGAGGAAGGCTAGTT
TTTTT**G**TTGTTTTCAAGTTTCCTTCTGATGTTACTCCCATGCTTCCGGGCACATTACGAGCTCAGTGCCTGC
CGGAAATCTCCCACCTGGTGGCAACCTACCCTTGCATACACCCCACCCAGGGGCTTCAAGCCTTGCAGCT
GAGTAAACACAGAAAGGAGCTCTACTAAGGATGCGCGTCTGCGGGTTTCCGCGCGACCTAGGCGCAGGC
ATGCGCAGTAGCTAAAGTCACCAGCGTGCGCGGGAAGCTGGGCCGCGTCTGCTTATGATTGGTTGCCGC
GGCAGACTCCCACCCACCGAAACGCAGCCCTGGAAGCTGATTGGGTGTGGTCGCCGTGGCCGGACGCC
GCTCGGGGGACGTGGGAGGGGAGGCGGGAAACAGCTTAGTGGGTGTGGGGTCGCGCATTTTCTTCAAC
CA**AA**AGGTGAGGAGGTTTCGACATGGCGGTGCAGCCGAAGGAGACGCTGCAGTTGGAGAGCGCGGCCG
AGGTCGGCTTCGTGCGCTTCTTTCA**AA**GCATGCCGGAGAAGCCGACCACCACAGTGCGCCTTTTCGACC
GGGGCGACTTCTATACGGCGCACGGCGAGGACGCGCTGCTGGCCGCCCGGGAGGTGTTCAAGACCCAG
GGGGTGATCAAGTACATGGGGCCGGCAGGTGAGGGCCGGGACGGCGCGTGCTGGGGAGGGACCCGGG
GCCTTGTGGCGCGGCTCCTTTCCCGCCTCAGAGAGT

Abbildung 38: *MSH2*^{S}_ex1_splice3-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *MSH2*^{S}_ex1_splice3 ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 934 bp. Die Sequenzunterschiede zum endogenen Promotor der Zelllinie Flp-In T-REx HeLa sind in der Sequenz rot markiert, das Exon 1 ist grau hinterlegt.

GGGACATAGCAGGCCATATAAATGTTTTCGAATGAGTGAATCATCAACGAGTGGATGAAACGATAATGTGG
CTAACAGGCAGCAGTAAGGAGGCTGTGTAGAATAAACCCGTAATCCCGATGTTGGCAGTTTGCTTAGAAA
GAAAAAGGGAGGCAGTCGGAGAGGGGCACACGTTTTAACAAAATACTGGGAGGAGGAGGAAGGCTAGTT
TTTTT**G**TTGTTTTCAAGTTTCCTTCTGATGTTACTCCCATGCTTCCGGGCACATTACGAGCTCAGTGCCTGC
CGGAAATCTCCCACCTGGTGGCAACCTACCCTTGCATACACCCCACCCAGGGGCTTCAAGCCTTGCAGCT
GAGTAAACACAGAAAGGAGCTCTACTAAGGATGCGCGTCTGCGGGTTTCCGCGCGACCTAGGCGCAGGC
ATGCGCAGTAGCTAAAGTCACCAGCGTGCGCGGGAAGCTGGGCCGCGTCTGCTTATGATTGGTTGCCGC
GGCAGACTCCCACCCACCGAAACGCAGCCCTGGAAGCTGATTGGGTGTGGTCGCCGTGGCCGGACGCC
GCTCGGGGGACGTGGGAGGGGAGGCGGGAAACAGCTTAGTGGGTGTGGGGTCGCGCATTTTCTTCAAC
CA**AA**A**AA**TGAGGAGGTTTCGACATGGCGGTGCAGCCGAAGGAGACGCTGCAGTTGGAGAGCGCGGCCG
AGGTCGGCTTCGTGCGCTTCTTTCA**AATT**ATGCCGGAGAAGCCGACCACCACAGTGCGCCTTTTCGACCG
GGGCGACTTCTATACGGCGCACGGCGAGGACGCGCTGCTGGCCGCCCGGGAGGTGTTCAAGACCCAGG
GGGTGATCAAGTACATGGGGCCGGCAGGTGAGGGCCGGGACGGCGCGTGCTGGGGAGGGACCCGGGG
CCTTGTGGCGCGGCTCCTTTCCCGCCTCAGAGAGT

Abbildung 39: *MSH2*^{S}_ex1_splice4-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *MSH2*^{S}_ex1_splice4 ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 934 bp. Die Sequenzunterschiede zum endogenen Promotor der Zelllinie Flp-In T-REx HeLa sind in der Sequenz rot markiert, das Exon 1 ist grau hinterlegt.

9.2.2 *SNRPN*

CCCCCTCTCATTGCAACAGTGCTGTGGGGCCCTAGGGGTCCAGTAGCCCCCTCCCCCCAGGTCATTCCG
GTGAGGGAGGGAGCTGGGACCCCTGCACTGCGGCAAACAAGCACGCCTGCGCGGCCGCAG**T**GGCAGG
CTGGCGCGCATGCTCAGGCGGGGATGTGTGCGAAGCCTGCCGCTGCTGCAGCGAGTCTGGCGCAGAGT
GGAGCGGCCGCCGGAGATGCCTGACGCATCTGTCTGAGGAGCGGTCAGTGACGCGATGGAGCGGGCAA
GGTCAGCTGTGCCGGTGGCTTCTCTCAAGAGACAGCCTGGGGAGCGGCCACTTTTATTCATCAGATATTC
CAAGTTTTTAGGACTTGGAGTACTGAATAAACGGAATTTGGGCCCTAAAGTCCTTTGTTCTGGAGAACCAG
ATCCGGAATGTTCAGAGGCTTGCTGTTGTGCCGTTCTGCCCCGATGGTATCCTGTCCGCTCGCATTGGGG
CGCGTCCCCCATCCGCCCCCAACTGTGGTGTCGCGACAGGTCCTATTGCGGGTGTCTGCGGTGGGAAG
GGCGGTGGTGACTGGGAGCATGCGGGGTAACCGCAGTGGGCAAGGGACATGGGTGGAGGTGGGTACAT
CAGGGTGATTGCAGTTCCGTGTGGCGAGGGTACGTGGGGGGACCAGTGCATAGGGATTTTAGGCGGAG
GTAGGTATATTGGAGTGATTGTGGCGGGGCGAAGGTACGTGAAGTGATCGGTATTTAGGGGGTGTTGAG
CGCAGGTAGGTGTATAATAGTGACCACTGCGTGGTGGAGCAGGGTACGTGGGGCGACTGGGGGGGGAA
TTCGTCGCAGTGACCGAGGCGAGGAGGCTATGGCAGTGGACCAGGGGGATGAGTCGGTGTGACAGTGG
TGGGGGTTGTGTTGGTGGTCGCGGCGCGGGGAGAGTCCGTAGGAAGTGGCTGGGAGGTAGGGGGAAG
GCGGCGACAGTGGGTATTGGCGGCGGTGGGCATTGGCAGCGGGTAGGCATGGCGGTGGTGGACTTTGG
CGGCGGTAGGCATGGCGGCGGTGGGCATGGCATGGAGGCGGTGGGCATGGCGGCCGCGGGGCCTGTC
GCTGTCCGGAGTGACTAAGGGACGCTGAATGATTGCTGTGTAGAGGAGGGGGCATCAGAAGGGGCAGTA
GCACAGTCCGCAGCCTTTAATTTTCCTGTGACCTGCGATGGTCATCTGGTTTGCCTACTGTGGTGGTGGT
GCTTTTTTATTAAAACTGCGCAATGCCTACACTGCCGCAGGGGCTGCAGAAATGCGTGGAATCCTTGCGT
ACCCTTTAGGAACCCTCGCTTTAGAGGCTATGGCATAAGAAGACTGGAATGATGTGCAGAACTTGCATTTA
CAGATCTTTTGACTGATAGGCCAGGTGATGCCTGGGGGGTTACTTTTTTTTTCATTGTTTCTCTCTGTTGGGAA
CCAGGTCTTGGAAGGCTATGTCGAAATAACCTGGGGGTCTGTGTTGCGTCACTGCCATTGTGCAGCTCCT
TCAAGATGGCCGCCGCTGCAGCGGCTTAGATCTGCGCAAGCGCTTCAGCGGGGGGGTGGCCGCTTCCT
CCCTGTAGAGCCGCCAGTGGGGAGGGGGCAGGTGGTGTGTGTTCAGCTTCTGCTGTTTCGGAGTTTCAG
CCGTACCCTCTTTAGGGTGCAGTGGTAAGGAGAGGAAGCCGGCCAAGGTGGGCGGCTGCCCCCTCCCC
AAAGTGCTGCTTGGGAAAGGATGCAGGTTGCGCAGACGCAGCAGAGGTGACAGTCGCCTCCGCTTGCAG
TGGGGCGAGACGTGGGGCAGGGGAGCGAGGGCTTACGCAGCTTTTGCCTGGAAGGAATGGCAGCCCTC
CCCTTCACCTGGCTGATACAGCAGCTGTTCCTTTCCGGTTGTGGCGCAGTAGAGGGGGGAGGAGGGAGA
TGGGTTGGCGCAGGCTCCGCCTAGCAAGCTTGGCAGCCACCCCTTACCCACGGTGCAGCAGTAGAGGAC
TGGAGGGGAATGTGGCTAGAGGCCAGGCATTTGTACCACCTCCGCCTGTGTGGGATGGCAGCTGCACTG
GGCTACTGCTTTTCAGCTCTGCAGTAAACTAGAGTGGTGGCGGC

Abbildung 40: *SNRPN*^{S}_ex1_splice4-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *SNRPN*^{S}_ex1 ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 2109 bp. Die Sequenzunterschiede zum endogenen Promotor der Zelllinie Flp-In T-REx HeLa sind in der Sequenz rot markiert, das Exon 1 ist grau hinterlegt.

9.2.3 *GNAS*

AACCCTCAAACAAGTTCACGTTCCGTAAACTACTTTTCCCTCTGTTCCAGAGCCCCCAGGGCGCCCAGGC
AAGGCCGCCACCTCTCCCACCTGGGAGGACGCCTCGAGCACCGACTCCACAGCCACGGCCACCGCTCC
TCGGCTCCCGTGACACCGGCGCGCCTGCTGCTTCGAGCAGGGGAGGCTTTGCACTCCCATCGCACTTTT
CTCGTCCGAAGATACGAAACTCCGTCCGGGCGTCGCAAATAATTCGAATTCGGCTCTCTGACACCTACCT
CGGCGGGCGCGCGCCGCTGGGAGGGCGGGGTGGGTGGCTGGAGGTAAGGAGGCGCACAGCAGGGGT
AAGCGCCGCCGTCGCACACTTTGCACGCCGCCCAGGGCTACACCACTCACCGAAAATTGGGAGGCAGGT
CTGGGAGGCGGGGTTGAGCGCCCACCGCCTTGGGCGCGCCCGCGCCCCCCGCCATCGCGGCCCCCGC
GCCCCCGGCCCACGCCCGCGCGGTCCCGGCACCGGCCTGCACCCCCAGGGTGCGCGGCGGCCCATTT
GGGTGCGTCCCCGGTGGGCCGATTTTTCGCGCTTCCCCTTCGGTTTATAGGGGCCGCTGCTATGGGTCG
GTCCTCTGAAGAGGCTGGGGCGTCATCGGGGCCGGTTAGAAGCTCTGCTCCCCGGCGGGGACACTCAG
TCGCGTCGGCACCGCGGAGCGGGCTGCGTCAGGTGGCTGGCCGGCGCGGCGCTCCCCTGCTCTCTGG
CTCCGGGCTGCGGCGCGGCGGCTGGAGCGAGCCCCTGTCCCGGCGCGGGGCGGCGGCGGGCGGCCG
GCAGGCGCTGCCTTGCGTGTGAGTGCACCTCACTCACATGTAAGTCGGGGAGCGCCGGGGCCTCCCGC
GGAAGTGCGAGTCGCCCGGCGCAGGCAAGAGCCGCCGGGTCCGGGACAAGGCAGGGGCGCCCGGGC
GCCGCTGCCTTGCCCCGGGGCGCCTCCGGGCACCCCCCAATTCTCTCTCTTTT

Abbildung 41: *GNAS*^{S}_ex1_1-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *GNAS*^{S}_ex1_1 ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 1003 bp. Exon A/B ist grau hinterlegt.

GGGCCGCTGCTATGGGTCGGTCCTCTGAAGAGGCTGGGGCGTCATCGGGGCCGGTTAGAAGCTCTGCT
CCCCGGCGGGGACACTCAGTCGCGTCGGCACCGCGGAGCGGGCTGCGTCAGGTGGCTGGCCGGCGCG
GCGCTCCCCTGCTCTCTGGCTCCGGGCTGCGGCGCGGCGGCTGGAGCGAGCCCCTGTCCCGGCGCGG
GGCGGCGGCGGGCGGCCGGCAGGCGCTGCCTTGCGTGTGAGTGCACCTCACTCACATGTAAGTCGGGG
AGCGCCGGGGCCTCCCGCGGAAGTGCGAGTCGCCCGGCGCAGGCAAGAGCCGCCGGGTCCGGGACAA
GGCAGGGGCGCCCGGGCGCCGCTGCCTTGCCCCGGGGCGCCTCCGGGCACCCCCCAATTCTCTCTCTT
TTCTCTTCTCCATTGGCGTGCCCAAGAGCCAAACCAAGGAGCGCCTGAGGGTAAACAGACTCCTGCCATC
CGCGCCTTTGCACTTTTCTTTTTGAGTTGACATTTCTTGGTGCTTTTTGGTTTCTCGCTGTTGTTGGGTGCT
TTTTGGTTTGTTCTTGTCCCTTTTTCGTTTGCTCATCCTTTTTGGCGCTAACTCTTAGGCAGCCAGCCCAGC
AGCCCGAAGCCCGGGCAGCCGCGCTCCGCGGCCCCGGGGCAGCGCGGCGGGAACCGCAGCCAAGCC
CCCCGACACGGGGCGCACGGGGGCCGGGCAGCCCGAGGCCGGGGGCAAGCAGGGAGCCCGGGCCAG
GCGCGAGCCGAGCTCCCCGAGGTGGCCGGGCCACCATGCTGAAGATGGCCATGAAGCTCAAAGCCCGG
GCGGCGGAGAGCGAGAAGAAGACGGCCGCGGCGGCTGCCGAGGTGGCTGCCGAAGCTGCGGCGGCG
GCTGCGGCGTTGGCCGAGCCGAGAGAGCCGCTCGCGCCGCGGAAGAGCGGGGACCCCGAGAAGCTCG
CGAAGAACCCCAAGAACCCGGCGCGGGAGGCGCTCCCCGAAAAGTTCCTAACAGACAAGGAGCGCAAG
AAGCTCGAGAAGAAGCTGCTGGAGCAGAGGCGAAAGGAGGAGAAGAAGAAGGAGAAGGAGAGGAAGAA
GATGGAGAAGATGCTGAAGAAGAAGAAGAAGG

Abbildung 42: *GNAS*^{S}_ex1_2-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *GNAS*^{S}_ex1_2 ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 1123 bp. Exon A/B ist grau hinterlegt.

AACCCTCAAACAAGTTCACGTTCCGTAAACTACTTTTCCCTCTGTTCCAGAGCCCCCAGGGCGCCCAGGC
AAGGCCGCCACCTCTCCCACCTGGGAGGACGCCTCGAGCACCGACTCCACAGCCACGGCCACCGCTCC
TCGGCTCCCGTGACACCGGCGCGCCTGCTGCTTCGAGCAGGGGAGGCTTTGCACTCCCATCGCACTTTT
CTCGTCCGAAGATACGAAACTCCGTCCGGGCGTCGCAAATAATTCGAATTCGGCTCTCTGACACCTACCT
CGGCGGGCGCGCGCCGCTGGGAGGGCGGGGTGGGTGGCTGGAGGTAAGGAGGCGCACAGCAGGGGT
AAGCGCCGCCGTCGCACACTTTGCACGCCGCCCAGGGCTACACCACTCACCGAAAATTGGGAGGCAGGT
CTGGGAGGCGGGGTTGAGCGCCCACCGCCTTGGGCGCGCCCGCGCCCCCCGCCATCGCGGCCCCCGC
GCCCCCGGCCCACGCCCGCGCGGTCCCGGCACCGGCCTGCACCCCCAGGGTGCGCGGCGGCCCATTT
GGGTGCGTCCCCGGTGGGCCGATTTTTCGCGCTTCCCCTTCGGTTTATAGGGGCCGCTGCTATGGGTCG
GTCCTCTGAAGAGGCTGGGGCGTCATCGGGGCCGGTTAGAAGCTCTGCTCCCCGGCGGGGACACTCAG
TCGCGTCGGCACCGCGGAGCGGGCTGCGTCAGGTGGCTGGCCGGCGCGGCGCTCCCCTGCTCTCTGG
CTCCGGGCTGCGGCGCGGCGGCTGGAGCGAGCCCCTGTCCCGGCGCGGGGCGGCGGCGGGCGGCCG
GCAGGCGCTGCCTTGCGTGTGAGTGCACCTCACTCACATGTAAGTCGGGGAGCGCCGGGGCCTCCCGC
GGAAGTGCGAGTCGCCCGGCGCAGGCAAGAGCCGCCGGGTCCGGGACAAGGCAGGGGCGCCCGGGC
GCCGCTGCCTTGCCCCGGGGCGCCTCCGGGCACCCCCCAATTCTCTCTCTTTTCTCTTCTCCATTGGCGT
GCCCAAGAGCCAAACCAAGGAGCGCCTGAGGGTAAACAGACTCCTGCCATCCGCGCCTTTGCACTTTTCT
TTTTGAGTTGACATTTCTTGGTGCTTTTTGGTTTCTCGCTGTTGTTGGGTGCTTTTTGGTTTGTTCTTGTCC
CTTTTTCGTTTGCTCATCCTTTTTGGCGCTAACTCTTAGGCAGCCAGCCCAGCAGCCCGAAGCCCGGGCA
GCCGCGCTCCGCGGCCCCGGGGCAGCGCGGCGGGAACCGCAGCCAAGCCCCCCGACACGGGGCGCA
CGGGGGCCGGGCAGCCCGAGGCCGGGGGCAAGCAGGGAGCCCGGGCCAGGCGCGAGCCGAGCTCCC
CGAGGTGGCCGGGCCACCATGCTGAAGATGGCCATGAAGCTCAAAGCCCGGGCGGCGGAGAGCGAGAA
GAAGACGGCCGCGGCGGCTGCCGAGGTGGCTGCCGAAGCTGCGGCGGCGGCTGCGGCGTTGGCCGAG
CCGAGAGAGCCGCTCGCGCCGCGGAAGAGCGGGGACCCCGAGAAGCTCGCGAAGAACCCCAAGAACC
CGGCGCGGGAGGCGCTCCCCGAAAAGTTCCTAACAGACAAGGAGCGCAAGAAGCTCGAGAAGAAGCTG
CTGGAGCAGAGGCGAAAGGAGGAGAAGAAGAAGGAGAAGGAGAGGAAGAAGATGGAGAAGATGCTGAA
GAAGAAGAAGAAGAAGG

Abbildung 43: *GNAS*^{S}_ex1_comb-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *GNAS*^{S}_ex1_comb ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 1719 bp. Exon A/B ist grau hinterlegt.

TTTCAAAGCTAACTTAAAATGATACAAGTTTGCTCAAGGCCTCTGGTGGTATCAGCCGCCCCATACCCCTG
GGGACTGTTAAATGTGTTTCCATTTATAGGTAGACTTTTCTTTTTTCTCCTTCTCCATCAAACATCTTAAGTT
TCATGGGCTCTGTTAAGAAGTCAAAGAAAAAGTTGGAAGACAGTTTGTGGACTTTGCATATCTGGGCTTTC
CGGGACGTAGGCCTGTGTCCCATCCAAGACACTGCTCACGTCTTAGCCTGATTACCTGGCCGCCTCGGC
TCACCTGGGCACATGGTGAGCCGCGGAACTGGCAGGCACCAAACATTTATTGAATGAATAAACCGTATCC
CAGCAGACACCATGGTGGCAGCAGATGACCTAACCAAGGTCCCAGGAAAGGCGGGCTGGGGTCAACTG
CTTGAAAATTTAGTAACCCTGCTCCTAATCCCGTGCACTGCTATATCCTAGTGTGCGGCGGGACACTTGAG
AGTTTTGAAAGAACCCTCAAACAAGTTCACGTTCCGTAAACTACTTTTCCCTCTGTTCCAGAGCCCCCAGG
GCGCCCAGGCAAGGCCGCCACCTCTCCCACCTGGGAGGACGCCTCGAGCACCGACTCCACAGCCACGG
CCACCGCTCCTCGGCTCCCGTGACACCGGCGCGCCTGCTGCTTCGAGCAGGGGAGGCTTTGCACTCCC
ATCGCACTTTTCTCGTCCGAAGATACGAAACTCCGTCCGGGCGTCGCAAATAATTCGAATTCGGCTCTCTG
ACACCTACCTCGGCGGGCGCGCGCCGCTGGGAGGGCGGGGTGGGTGGCTGGAGGTAAGGAGGCGCAC
AGCAGGGGTAAGCGCCGCCGTCGCACACTTTGCACGCCGCCCAGGGCTACACCACTCACCGAAAATTGG
GAGGCAGGTCTGGGAGGCGGGGTTGAGCGCCCACCGCCTTGGGCGCGCCCGCGCCCCCCGCCATCGC
GGCCCCCGCGCCCCCGGCCCACGCCCGCGCGGTCCCGGCACCGGCCTGCACCCCCAGGGTGCGCGGC
GGCCCATTTGGGTGCGTCCCCGGTGGGCCGATTTTTCGCGCTTCCCCTTCGGTTTATAGGGGCCGCTGC
TATGGGTCGGTCCTCTGAAGAGGCTGGGGCGTCATCGGGGCCGGTTAGAAGCTCTGCTCCCCGGCGGG
GACACTCAGTCGCGTCGGCACCGCGGAGCGGGCTGCGTCAGGTGGCTGGCCGGCGCGGCGCTCCCCT
GCTCTCTGGCTCCGGGCTGCGGCGCGGCGGCTGGAGCGAGCCCCTGTCCCGGCGCGGGGCGGCGGC
GGGCGGCCGGCAGGCGCTGCCTTGCGTGTGAGTGCACCTCACTCACATGTAAGTCGGGGAGCGCCGGG
GCCTCCCGCGGAAGTGCGAGTCGCCCGGCGCAGGCAAGAGCCGCCGGGTCCGGGACAAGGCAGGGGC
GCCCGGGCGCCGCTGCCTTGCCCCGGGGCGCCTCCGGGCACCCCCCAATTCTCTCTCTTTT

Abbildung 44: *GNAS*^{S}_ex1_long-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *GNAS*^{S}_ex1_long ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 1507 bp. Exon A/B ist grau hinterlegt.

TTTCAAAGCTAACTTAAAATGATACAAGTTTGCTCAAGGCCTCTGGTGGTATCAGCCGCCCCATACCCCTG
GGGACTGTTAAATGTGTTTCCATTTATAGGTAGACTTTTCTTTTTTCTCCTTCTCCATCAAACATCTTAAGTT
TCATGGGCTCTGTTAAGAAGTCAAAGAAAAAGTTGGAAGACAGTTTGTGGACTTTGCATATCTGGGCTTTC
CGGGACGTAGGCCTGTGTCCCATCCAAGACACTGCTCACGTCTTAGCCTGATTACCTGGCCGCCTCGGC
TCACCTGGGCACATGGTGAGCCGCGGAACTGGCAGGCACCAAACATTTATTGAATGAATAAACCGTATCC
CAGCAGACACCATGGTGGCAGCAGATGACCTAACCAAGGTCCCAGGAAAGGCGGGCTGGGGTCAACTG
CTTGAAAATTTAGTAACCCTGCTCCTAATCCCGTGCACTGCTATATCCTAGTGTGCGGCGGGACACTTGAG
AGTTTTGAAAGAACCCTCAAACAAGTTCACGTTCCGTAAACTACTTTTCCCTCTGTTCCAGAGCCCCCAGG
GCGCCCAGGCAAGGCCGCCACCTCTCCCACCTGGGAGGACGCCTCGAGCACCGACTCCACAGCCACGG
CCACCGCTCCTCGGCTCCCGTGACACCGGCGCGCCTGCTGCTTCGAGCAGGGGAGGCTTTGCACTCCC
ATCGCACTTTTCTCGTCCGAAGATACGAAACTCCGTCCGGGCGTCGCAAATAATTCGAATTCGGCTCTCTG
ACACCTACCTCGGCGGGCGCGCCGCTGGGAGGGCGGGGTGGGTGGCTGGAGGTAAGGAGGCGCAC
AGCAGGGGTAAGCGCCGCCGTCGCACACTTTGCACGCCGCCCAGGGCTACACCACTCACCGAAAATTGG
GAGGCAGGTCTGGGAGGCGGGGTTGAGCGCCCACCGCCTTGGGCGCGCCCGCGCCCCCCGCCATCGC
GGCCCCCGCGCCCCCGGCCCACGCCCGCGCGGTCCCGGCACCGGCCTGCACCCCCAGGGTGCGCGGC
GGCCCATTTGGGTGCGTCCCCGGTGGGCCGATTTTTCGCGCTTCCCCTTCGGTTTATAGGGGCCGCTGC
TATGGGTCGGTCCTCTGAAGAGGCTGGGGCGTCATCGGGGCCGGTTAGAAGCTCTGCTCCCCGGCGGG
GACACTCAGTCGCGTCGGCACCGCGGAGCGGGCTGCGTCAGGTGGCTGGCCGGCGCGGCGCTCCCCT
GCTCTCTGGCTCCGGGCTGCGGCGCGGCGGCTGGAGCGAGCCCCTGTCCCGGCGCGGGGCGGCGGC
GGGCGGCCGGCAGGCGCTGCCTTGCGTGTGAGTGCACCTCACTCACATGTAAGTCGGGGAGCGCCGGG
GCCTCCCGCGGAAGTGCGAGTCGCCCGGCGCAGGCAAGAGCCGCCGGGTCCGGGACAAGGCAGGGGC
GCCCGGGCGCCGCTGCCTTGCCCCGGGGCGCCTCCGGGCACCCCCCAATTCTCTCTCTTTTCTCTTCTC
CATTGGCGTGCCCAAGAGCCAAACCAAGGAGCGCCTGAGGGTAAACAGACTCCTGCCATCCGCGCCTTT
GCACTTTTCTTTTTGAGTTGACATTTCTTGGTGCTTTTTGGTTTCTCGCTGTTGTTGGGTGCTTTTTGGTTTG
TTCTTGTCCCTTTTTCGTTTGCTCATCCTTTTTGGCGCTAACTCTTAGGCAGCCAGCCCAGCAGCCCGAAG
CCCGGGCAGCCGCGCTCCGCGGCCCCGGGGCAGCGCGGCGGGAACCGCAGCCAAGCCCCCCGACAC
GGGGCGCACGGGGGCCGGGCAGCCCGAGGCCGGGGGCAAGCAGGGAGCCCGGGCCAGGCGCGAGCC
GAGCTCCCCGAGGTGGCCGGGCCACCATGCTGAAGATGGCCATGAAGCTCAAAGCCCGGGCGGCGGAG
AGCGAGAAGAAGACGGCCGCGGCGGCTGCCGAGGTGGCTGCCGAAGCTGCGGCGGCGGCTGCGGCGT
TGGCCGAGCCGAGAGAGCCGCTCGCGCCGCGGAAGAGCGGGGACCCCGAGAAGCTCGCGAAGAACCC
CAAGAACCCGGCGCGGGAGGCGCTCCCCGAAAAGTTCCTAACAGACAAGGAGCGCAAGAAGCTCGAGA
AGAAGCTGCTGGAGCAGAGGCGAAAGGAGGAGAAGAAGAAGGAGAAGGAGAGGAAGAAGATGGAGAAG
ATGCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGG

Abbildung 45: *GNAS*^{S}_ex1_long_comb-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *GNAS*^{S}_ex1_long_comb ist in 5´-3´-Orientierung angegeben und umfasst 2223 bp. Exon A/B ist grau hinterlegt.

9.3 PCR-Ansätze und Thermal Cycler Programme

9.3.1 Reverse Transkription von RNA (cDNA Synthese)

GeneAmp™ RNA PCR Core Kit

Ansatz:

	+RT	-RT
MgCl2 (25 mM)	7,2 µl	3,6 µl
10x Buffer II	6 µl	3 µl
A (100 mM)	0,6 µl	0,3 µl
C (100 mM)	0,6 µl	0,3 µl
G (100 mM)	0,6 µl	0,3 µl
T (100 mM)	0,6 µl	0,3 µl
Oligo d(T) 16 (50µM)	3 µl	1,5 µl
Rnase Inhibitor (20U/µl)	3 µl	1,5 µl
RT Enzym	3 µl	-
RNA	14 µl	7 µl
H_2O	21,4 µl	12,2 µl
	60 µl	30 µl

PCR-Programm:

21 °C	10 min
42 °C	15 min
99 °C	5 min
4 °C	∞

LunaScript™ RT SuperMix Kit

Ansatz:

	+RT	-RT
Luna Script Mastermix +RT	4 µl	-
Luna Script Mastermix -RT	-	4 µl
RNA	14 µl	7 µl
H_2O	2 µl	7 µl
	20 µl	20 µl

PCR-Programm:

25 °C	2 min
55 °C	10 min
95 °C	1 min
4 °C	∞

Im Anschluss wird die +RT Reaktion mit deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 60 µl und die -RT Reaktion auf 30 µl gebracht.

9.3.2 Analyse von DNA-Methylierung

Bisulfit PCR

Ansatz:

2x *HotStarTaq® Master Mix*	12,5 µl
Primer fwd (10 µm)	1 µl
Primer rev (10 µm)	1 µl
PCR-Produkt	1-3 µl
H_2O	add
	25 µl

PCR-Programm:

95 °C	15 min	
95 °C	30 s	45 – 55 x
T_m °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Fragmente Sanger-Sequenzierung:

	T_m	Zyklen
MSH2	56 °C	45 x
SNRPN	56 °C	45 x

Fragmente *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung:

	T_m	Zyklen
MSH2 Fragment 1	52 °C	50 x
MSH2 Fragment 2	56 °C	45 x
MSH2 Fragment 3	56 °C	45 x
MSH2 Fragment 4	56 °C	50 x
SNRPN	56 °C	55 x

Re-PCR mit spezifischen *Index Primern* für *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung

Ansatz:

2x *HotStarTaq® Master Mix*	12,5 µl
Primer fwd (10 µm)	0,5 µl
Primer rev (10 µm)	0,5 µl
PCR-Produkt	2 µl
H_2O	9,5 µl
	25 µl

PCR-Programm *2Step*:

95 °C	15 min	
95 °C	30 s	50 x
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

PCR-Programm *3Step*

95 °C	15 min	
95 °C	30 s	55 x
58 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

9.4 Plasmidkarten

Nachfolgend sind die Plasmidkarten einzelner Konstrukte aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden. Diese wurden mit dem Programm *Geneious R11/Geneious Prime* (Biomatters) erstellt.

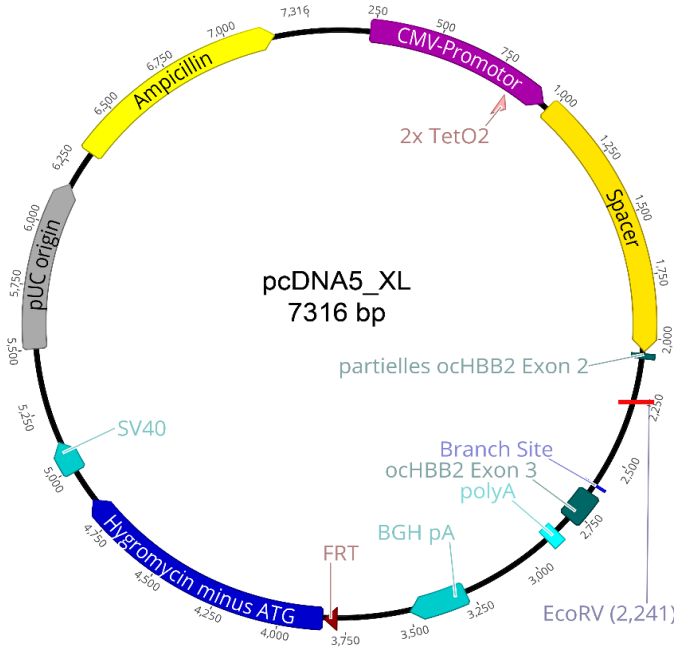


Abbildung 46: Plasmidkarte von pcDNA5_XL. Vektor bestehend aus dem pcDNA5/FRT/TO Grundgerüst, einem 1 kb *Spacer* und *ocHBB2* (partielles Exon 2, das vollständige Intron 2 und Exon 3, sowie das Terminationssignal des *ß-Globin*-Gens des Kaninchens) und einer integrierten *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle (rot).

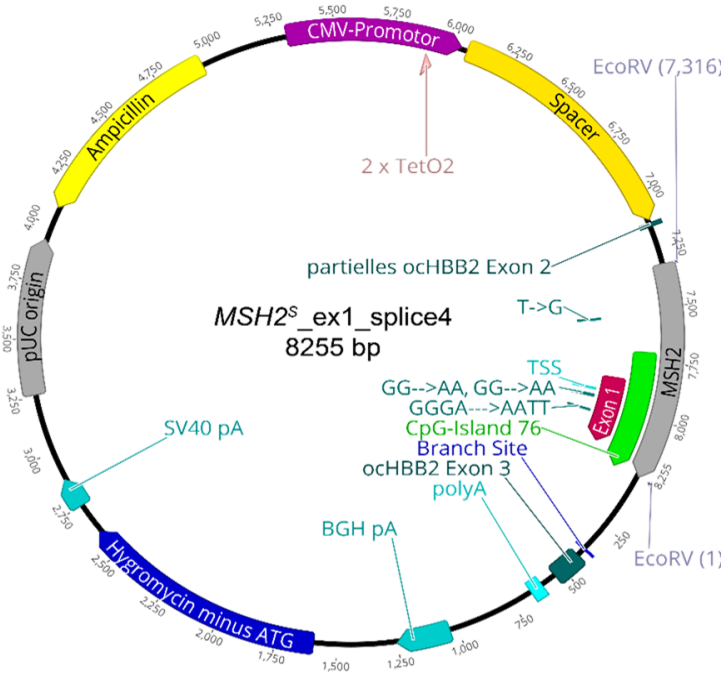


Abbildung 47: Plasmidkarte von *MSH2*^{S}_ex1_splice4. Vektor bestehend aus dem pcDNA5_XL-Plasmid mit integrierter transgener *MSH2*-Promotorregion und vier modifizierten kryptischen *Splice Sites*.

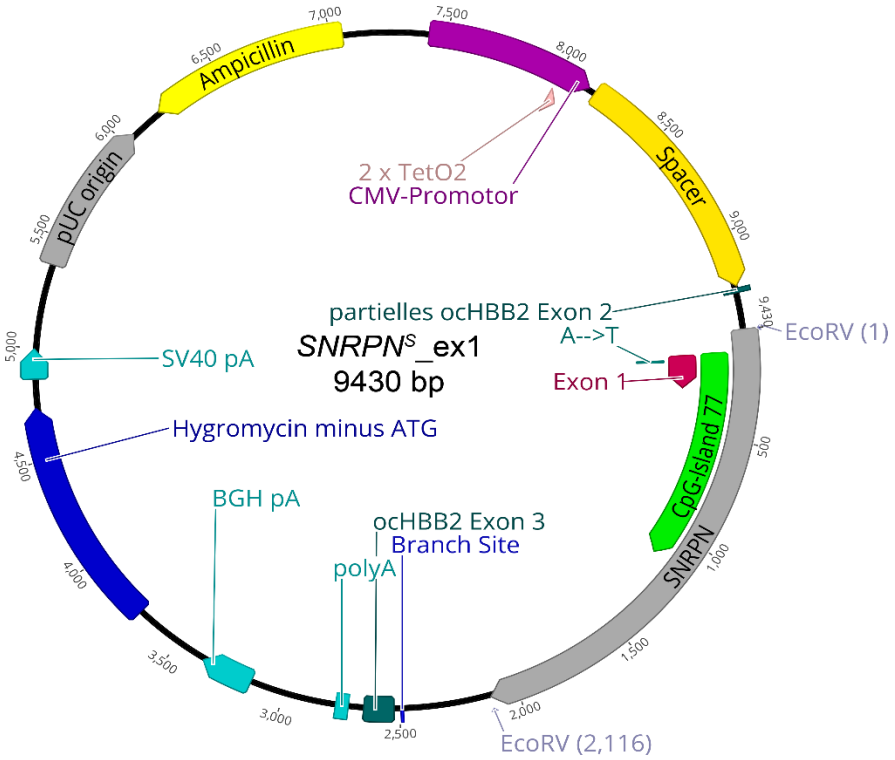


Abbildung 48: Plasmidkarte von *SNRPN*^{S}_ex1_splice4. Vektor bestehend aus dem pcDNA5_XL-Plasmid mit integrierter transgener *SNRPN*-Promotorregion.

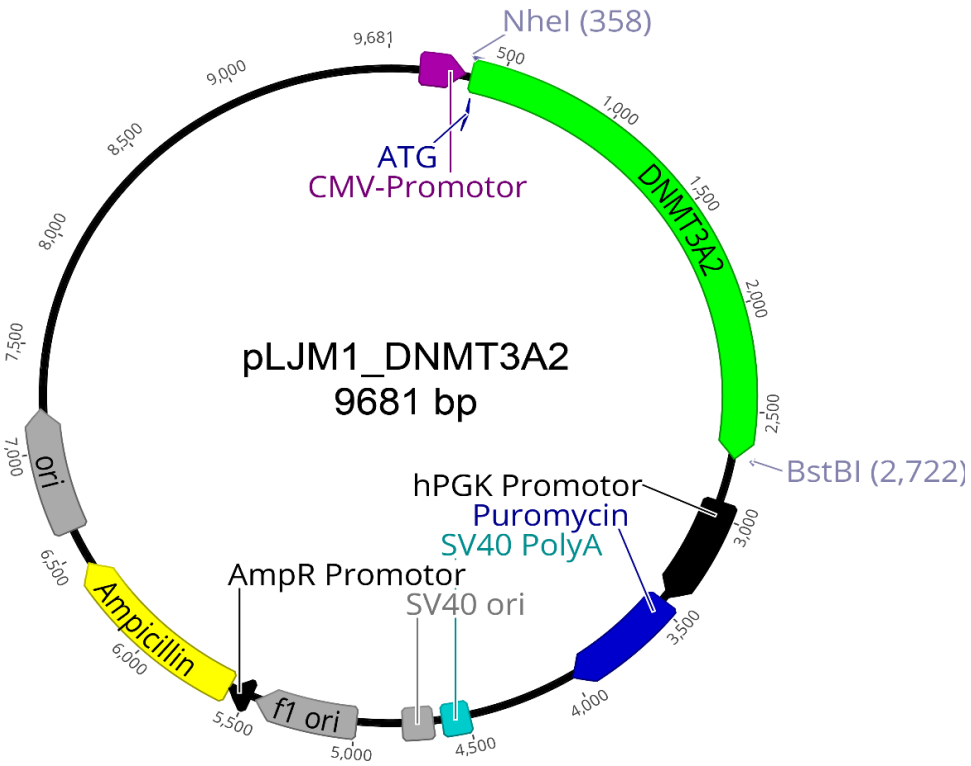


Abbildung 49: Plasmidkarte von pLJM1_DNMT3A2. Das *DNMT3A2*-Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Wagner, Helmholtz for Biomedical Engineering, Division of Stem Cell Biology and Cellular Engineering, RWTH Aachen zur Verfügung gestellt (Božić et al. 2018).

9.5 Übersicht der Methylierungsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung

9.5.1 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa-Zellen

Abbildung 50: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa-Zellen. Die für die Analyse verwendeten Primer (hellblau, dunkelblau) binden spezifisch im verwendeten Plasmid pcDNA5_XL und in der Promotorregion. Die Analyse erfolgte für nicht-induzierte (-Dox) und für 14 Tage mit Doxycyclin induzierte (+Dox) Zellen. Im vergrößerten Abschnitt ist die Referenzsequenz dargestellt. **A)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *MSH2*^{S}_ex1-Promotorregion für alle Zellklone ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *MSH2*^{S}_ex1-Promotorregion unmethyliert vor. **B)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion für alle Zellklone ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *SNRPN*^{S}_ex1-Promotorregion unmethyliert vor

9.5.2 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen

Abbildung 51: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen. Die für die Analyse verwendeten Primer (hellblau, dunkelblau) binden spezifisch im verwendeten Plasmid pcDNA5_XL und in der Promotorregion. Die Analyse erfolgte für nicht-induzierte (-Dox) und für 14 Tage mit Doxycyclin induzierte (+Dox) Zellen. Im vergrößerten Abschnitt ist die Referenzsequenz dargestellt. **A)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion für alle Zellklone ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion unmethyliert vor. **B)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion für alle Zellklone ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion unmethyliert vor.

9.5.3 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion

Abbildung 52: DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* Co-Transfektion. Die für die Analyse verwendeten Primer (hellblau, dunkelblau) binden spezifisch im verwendeten Plasmid pcDNA5_XL und in der Promotorregion. Die untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4- und *SNRPN*^{S}_ex1-Zellen wurden mit *DNMT3A2, DNMT3L* und *ZFP57* co-transfiziert. Die Analyse erfolgte für nicht-induzierte (-Dox) und für drei Tage mit Doxycyclin induzierte (+Dox) Zellen. Im vergrößerten Abschnitt ist die Referenzsequenz dargestellt. **A)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion für alle Zellklone ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Promotorregion unmethyliert vor. **B)** Der für die Methylierungsanalyse ausgewählte Bereich der untersuchten *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion für alle Zellklone ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die Elektropherogramme zeigen sowohl in nicht-induzierten als auch induzierten Zellen ein Thymin anstelle eines Cytosins. Somit liegt die untersuchte *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Promotorregion unmethyliert vor.

9.6 Übersicht der Methylierungsanalysen mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung

9.6.1 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen

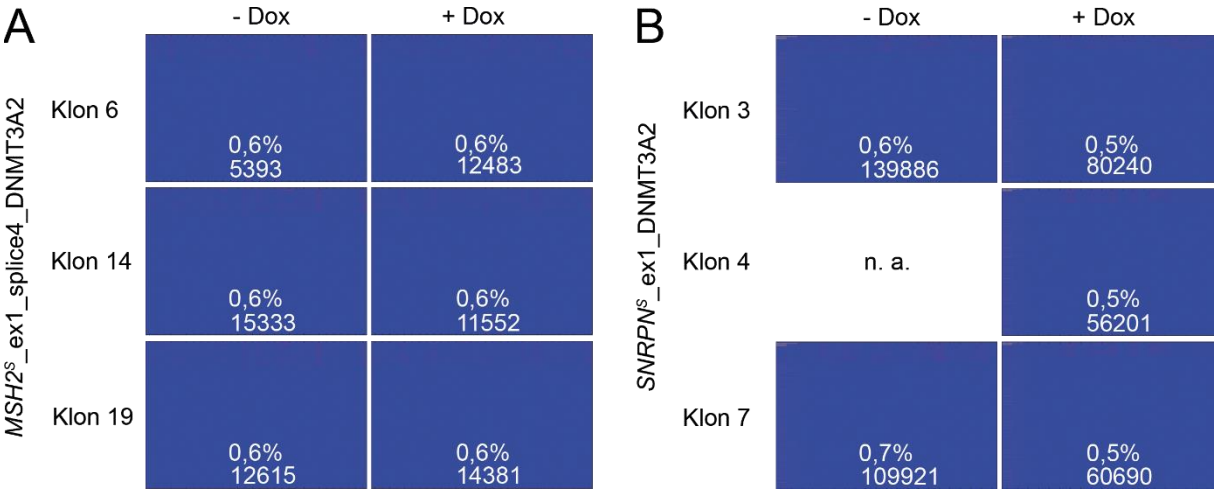


Abbildung 53: Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach dreitägiger Doxycyclin-Induktion. Für die Methylierungsanalyse wurde für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie ein 30 CpG-Dinukleotide umfassender Bereich der Promotorregion ausgewählt. Der ausgewählte Promotorbereich für die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie deckte 21 CpG-Dinukleotide ab. Die Ergebnisse der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA nicht-induzierter Zellen (-Dox) und für drei Tage (+Dox) mit Doxycyclin induzierten Zellen sind dargestellt. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent (obere Zahl) wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (untere Zahl) bestimmt. Die Promotorregionen lagen in nicht-induzierten und induzierten Zellen beider Zelllinien ausschließlich unmethyliert vor. n.a.: nicht auswertbar.

9.6.2 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3L*-Transfektion

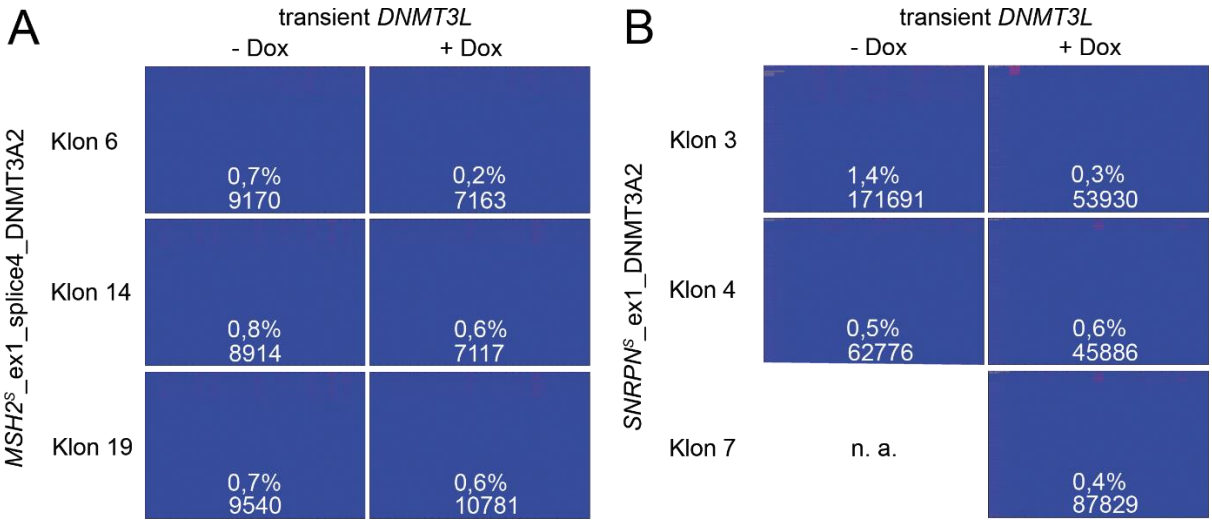


Abbildung 54: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3L*-Transfektion. Für die Methylierungsanalyse wurde für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie ein 30 CpG-Dinukleotide umfassender Bereich der Promotorregion ausgewählt. Der ausgewählte Promotorbereich für die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie deckte 21 CpG-Dinukleotide ab. Die Ergebnisse der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA nicht-induzierter Zellen (-Dox) und für drei Tage (+Dox) mit Doxycyclin induzierten Zellen sind dargestellt. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent (obere Zahl) wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (untere Zahl) bestimmt. Die Promotorregionen lagen in nicht-induzierte und induzierte Zellen beider Zelllinien ausschließlich unmethyliert vor. n.a.: nicht auswertbar.

9.6.3 Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion

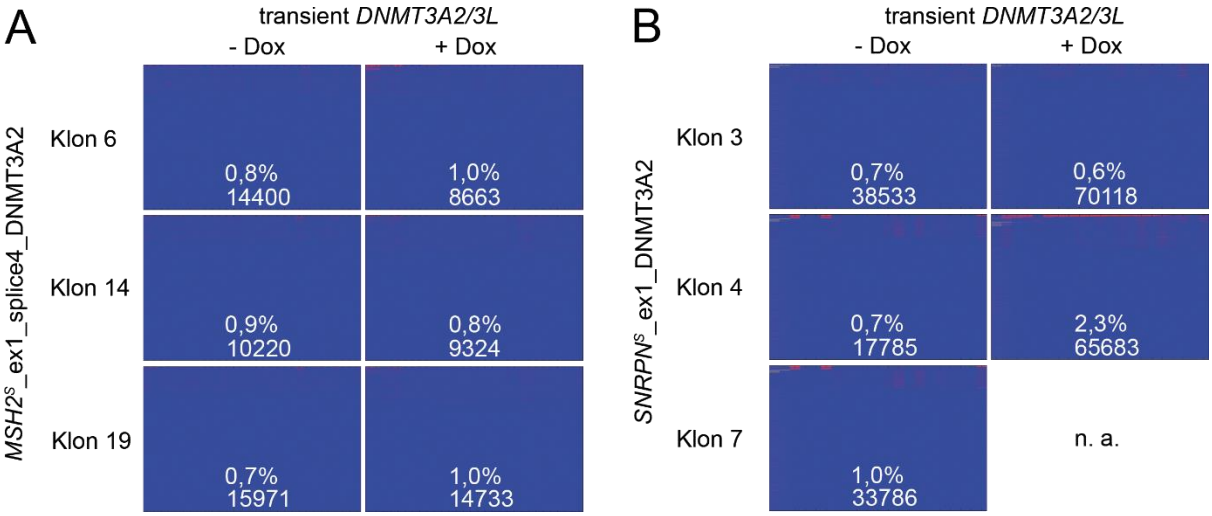


Abbildung 55: DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregion in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien nach transienter *DNMT3A2* und *DNMT3L* Co-Transfektion. Für die Methylierungsanalyse wurde für die *MSH2*^{S}_ex1_splice4_DNMT3A2-Zelllinie ein 30 CpG-Dinukleotide umfassender Bereich der Promotorregion ausgewählt. Der ausgewählte Promotorbereich für die Methylierungsanalyse der *SNRPN*^{S}_ex1_DNMT3A2-Zelllinie deckte 21 CpG-Dinukleotide ab. Die Ergebnisse der *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA nicht-induzierter Zellen (-Dox) und für drei Tage (+Dox) mit Doxycyclin induzierten Zellen sind dargestellt. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Die durchschnittliche Methylierung in Prozent (obere Zahl) wurde anhand der Anzahl der analysierten Einzelsequenzen (untere Zahl) bestimmt. Die Promotorregionen lagen in nicht-induzierte und induzierte Zellen beider Zelllinien ausschließlich unmethyliert vor. n.a: nicht auswertbar.

9.6.4 Tabellarische Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse in Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zellen mittels *MiSeq-Amplicon*-Sequenzierung

Tabelle 8: Übersicht der DNA-Methylierungsanalyse der *MSH2*- und *SNRPN*-Promotorregionen in den Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2-Zelllinien

Locus	Klon	CpG-Dinukleotide	Methylierung in [%]	Reads
Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2				
MSH2 Fragment 1	Klon 6 3d-Dox	8	0,3	11875
	Klon 6 3d+Dox	8	0,2	55716
	Klon 14 3d-Dox	8	0,5	89996
	Klon 14 3d+Dox	8	0,9	118437
	Klon 19 3d-Dox	8	0,9	97968
	Klon 19 3d+Dox	8	0,7	87585
MSH2 Fragment 2	Klon 6 3d-Dox	7	0,7	24689
	Klon 6 3d+Dox	7	0,7	28170
	Klon 14 3d-Dox	7	0,8	28071
	Klon 14 3d+Dox	7	1,0	27826
	Klon 19 3d-Dox	7	0,6	32131
	Klon 19 3d+Dox	7	1,0	29603
MSH2 Fragment 3	Klon 6 3d-Dox	30	0,6	5393
	Klon 6 3d+Dox	30	0,6	12483
	Klon 14 3d-Dox	30	0,6	15333
	Klon 14 3d+Dox	30	0,6	11552
	Klon 19 3d-Dox	30	0,6	12615
	Klon 19 3d+Dox	30	0,6	14381
MSH2 Fragment 4	Klon 6 3d-Dox	29	0,3	114417
	Klon 6 3d+Dox	29	1,7	116019
	Klon 14 3d-Dox	29	0,2	135116
	Klon 14 3d+Dox	29	0,3	81849
	Klon 19 3d-Dox	29	0,3	157586
	Klon 19 3d+Dox	29	2,4	123156
Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 transiente *DNMT3L*-Transfektion				
MSH2 Fragment 1	Klon 6 3d-Dox	8	0,6	81700
	Klon 6 3d+Dox	8	1,0	64141
	Klon 14 3d-Dox	8	n.a.	n.a.
	Klon 14 3d+Dox	8	1,1	54581
	Klon 19 3d-Dox	8	0,2	106227
	Klon 19 3d+Dox	8	0,4	110945

Locus	Klon	CpG-Dinukleotide	Methylierung in [%]	Reads
Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 transiente *DNMT3L*-Transfektion				
MSH2 Fragment 2	Klon 6 3d-Dox	7	1,1	23611
	Klon 6 3d+Dox	7	1,1	25078
	Klon 14 3d-Dox	7	1,3	14521
	Klon 14 3d+Dox	7	1,1	12716
	Klon 19 3d-Dox	7	0,8	21022
	Klon 19 3d+Dox	7	1,1	25446
MSH2 Fragment 3	Klon 6 3d-Dox	30	0,7	9170
	Klon 6 3d+Dox	30	0,2	7163
	Klon 14 3d-Dox	30	0,8	8914
	Klon 14 3d+Dox	30	0,6	7117
	Klon 19 3d-Dox	30	0,7	9540
	Klon 19 3d+Dox	30	0,6	10781
MSH2 Fragment 4	Klon 6 3d-Dox	29	0,2	121124
	Klon 6 3d+Dox	29	0,3	97068
	Klon 14 3d-Dox	29	1,7	111313
	Klon 14 3d+Dox	29	3,2	94926
	Klon 19 3d-Dox	29	1,8	113321
	Klon 19 3d+Dox	29	0,2	99178
Flp-In T-REx HeLa_DNMT3A2 transiente *DNMT3A2 und DNMT3L* Co-Transfektion				
MSH2 Fragment 1	Klon 6 3d-Dox	8	0,8	78112
	Klon 6 3d+Dox	8	0,4	56124
	Klon 14 3d-Dox	8	1,0	154309
	Klon 14 3d+Dox	8	0,2	155682
	Klon 19 3d-Dox	8	0,3	97754
	Klon 19 3d+Dox	8	0,2	63389
MSH2 Fragment 2	Klon 6 3d-Dox	7	3,3	26479
	Klon 6 3d+Dox	7	4,3	23921
	Klon 14 3d-Dox	7	2,6	29861
	Klon 14 3d+Dox	7	2,7	29706
	Klon 19 3d-Dox	7	3,7	56364
	Klon 19 3d+Dox	7	2,2	27808
MSH2 Fragment 3	Klon 6 3d-Dox	30	0,8	14400
	Klon 6 3d+Dox	30	1,0	8663
	Klon 14 3d-Dox	30	0,9	10220
	Klon 14 3d+Dox	30	0,8	9324
	Klon 19 3d-Dox	30	0,7	15971
	Klon 19 3d+Dox	30	1,0	14733
MSH2 Fragment 4	Klon 6 3d-Dox	29	1,8	113321
	Klon 6 3d+Dox	29	0,3	80106
	Klon 14 3d-Dox	29	0,9	50605
	Klon 14 3d+Dox	29	0,2	62856
	Klon 19 3d-Dox	29	0,3	103176
	Klon 19 3d+Dox	29	n.a.	n.a.

9.7 Expressionsdaten des *Human Protein Atlas*

Die ermittelten Expressionsdaten wurden dem *Human Protein Atlas* (https://www.proteinatlas.org) entnommen und sind nachfolgend für 293- und HeLa-Zellen aufgelistet.

Tabelle 9: Expressionsdaten des *Human Protein Atlas* für essenzielle Transkripte in der Etablierung der DNA-Methylierung. Expression von *DNMT3A*, *DNMT3L*, *DNMT3B*, *DNMT1*, *ZFP57*, *NSD1*, *SETD2* und *ZNF445* in 293- und HeLa-Zelllinien in NX (RNAseq, normalisierte Expression). Daten von https://www.proteinatlas.org.

Gen	293	HeLa
DNMT3A	2,5	5,3
DNMT3L	0,0	0,8
DNMT3B	3,1	0,7
DNMT1	31,9	13,6
ZFP57	0,0	0,0
NSD1	12,6	14,2
SETD2	6,5	15,1
ZNF445	2,3	5,9

DNMT3A: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000119772-DNMT3A/cell [Stand 17.12.2019, 20:20]

DNMT3L: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142182-DNMT3L/cell [Stand 17.12.2019, 20:24])

DNMT3B: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088305-DNMT3B/cell [Stand 07.01.2020, 08:17

DNMT1: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130816-DNMT1/cell [Stand 28.12.2019, 18:25]

ZFP57: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204644-ZFP57/cell [Stand 06.01.2020, 14:25]

NSD1: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165671-NSD1/cell [Stand 13.02.2020, 17:53]

SETD2: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181555-SETD2/cell [Stand 13.02.2020, 17:58]

ZNF445: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185219-ZNF445/cell [Stand 09.02.2020, 16:20]

Danksagung

Am Ende eines langen Weges, ist es Zeit, einmal zurück zu blicken. Nach 3 ½ Jahren harter Arbeit, unendlichen Stunden im Labor und manchen Krisen neigt sich ein Kapitel seinem Ende zu. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und auf vielfältige Art und Weise zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn **Prof. Dr. Bernhard Horsthemke** für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Humangenetik anzufertigen, das sehr interessante Forschungsprojekt, die wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Ideen, Anregungen und Diskussionen im Verlauf dieses Projektes sowie die Gelegenheit, an wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen.

Herrn **Prof. Dr. George Iliakis** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Laura Steenpaß** für die umfangreiche Betreuung, die vielen Ratschläge und Ideen. Laura ich danke dir für all deine Geduld, deine Fähigkeit mich immer wieder zu motivieren und mit deiner Begeisterungsfähigkeit zu inspirieren. Durch all deine Hilfe und Erfahrung habe ich mehr gelernt, als ich je erwartet hätte. Auch hast du maßgeblich zu den 3371 Bindestrichen in dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für deine Unterstützung, sowohl im fachlichen als auch privaten Bereich.

Herrn **Prof Dr. Wolfgang Wagner** für die Zurverfügungstellung des *DNMT3A2*-Expressionsplasmids sowie Frau **Dr. Tanja Božić** für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge zum Thema „*DNMT3A2*“.

Herrn **Prof. Dr. Alexander Schramm** für die Nutzung seines S2-Labors und Frau **Dr. Sophie Kalmbach** für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der lentiviralen Transduktion. Sophie, danke für deine Hilfe und die gute Zusammenarbeit.

Mein weiterer Dank gilt Frau **Prof. Dr. Christel Depienne** für die Unterstützung mit dem Programm *Alamut® Visual*.

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, Frau **Julia Menges** von Herzen zu danken. Die gemeinsamen, manchmal sehr langen Stunden im Labor sind mit dir quasi verflogen. Ich glaube wir zwei haben das gesamte Institut auf Trapp gehalten und jeder, der ein bisschen Aufmunterung brauchte oder einmal herzhaft lachen wollte, kam zu uns ins 19er. Nicht umsonst waren wir ja das „trubelige 19er Labor“. Ich danke dir für all deine Hilfe, die langen Diskussionen und all die witzigen Momente im Labor. Gemeinsam haben wir doch jedes Problem gelöst. Wenn ich zurückblicke, dann immer mit einem Lachen auf den Lippen. Mit wem sonst könnte man lauthals Disney-Songs im Labor singen? Danke für die gemeinsamen, selbstgekochten Mittagessen und all unsere „Fritten-Dates“. Du bist meine „Arbeitsehefrau“ und eine Freundin, die man sich so nur wünschen kann. Danke für Alles.

Des Weiteren möchte ich Frau **Michaela Hiber** für ihre erstklassige technische Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Bei Frau **Dr. Deniz Kanber** und Frau **Dr. Jasmin Beygo** möchte ich mich für die interessanten Diskussionen, die großartige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Danke, dass ihr immer ein „offenes Ohr“ hattet.

Frau **Dr. Hannah Döpper** möchte ich für die großartigen Immunfluoreszenzaufnahmen danken. Auch danke ich dir für all die witzigen Momente im Labor. Zusammen mit Julia waren wir die „drei Bösen aus der Humangenetik“. Ich denke ihr Beide versteht diese Anspielung.

Herrn **Alexander Kalmbach** danke ich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung im täglichen „Labor-Wahnsinn“. Danke, dass du unser Süßigkeiten-Level immer aufrechterhalten hast. Ich weiß die 17 Kuchen waren schon hoch angesetzt.

Allen Mitarbeitern des Instituts (jetzigen und ehemaligen), vor allem **Sabine**, **Claudia Karin**, **Martina**, **Stephanie**, **Martina**, **Nathalie**, **Leonie**, **Christine** und **Rituja** für die schöne Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Meinen Freunden danke ich ebenfalls für die Unterstützung und auch die willkommenen Ablenkungen vom Ernst des Lebens.

Meinen Eltern **Thomas** und **Steffi**, meinen Großeltern **Erika**, **Heinz**, **Ruth** und **Günther** sowie meiner kleinen Schwester **Michelle** möchte ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Ihr habt mich *geprägt*.

Mein größter Dank gilt allerdings meinem Mann **Carlo**. Du bist der Ruhepol in meinem Leben, treibst mich zu Höchstleistungen an und trocknest meine Tränen mit all dem Quatsch, den du dir nur für mich ausdenkst. Allein während der Schreibphase hast du mich mit schätzungsweise 180 l Cola versorgt, um den Zug am Laufen zu halten. Du hast nie den Glauben an mich und meine Fähigkeiten verloren, selbst wenn ich nicht davon überzeugt war, diesen Berg bezwingen zu können. Unserer Tochter **Lieselore** gebührt ebenfalls mein Dank für die wundervolle Zeit, die ich bisher mit ihr erleben durfte. Lilo ohne dich hätte mir vielleicht der Ansporn für den Endspurt gefehlt.

Dankeschön auch an all diejenigen, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegeben Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____ _____

Unterschrift der Doktorandin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____ _____

Unterschrift der Doktorandin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Artifizielle humane Imprints“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Theresa Kühnel befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

_____

Name des Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Essen, den _____ _____

Unterschrift des Mitglieds der Universität Duisburg-Essen