

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach**

**Funktionelle und genetische Analysen des
Cornelia de Lange-Syndroms**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Diana Braunholz
aus Leipzig
Lübeck 2012

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.07.2008-01.04.2012 im Institut für Humangenetik in Lübeck unter der Anleitung von Dr. Frank Kaiser durchgeführt.

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2012

Zum Druck genehmigt.
Lübeck, den 04.04.2013

Für Sandra

Im Rahmen meiner Doktorarbeit am Institut für Humangenetik in Lübeck konnten folgende Publikationen und Beiträge zu nationalen und internationalen Kongressen erzielt werden:

Publikationen

Deardorff M.A., Wilde J., Albrecht M., Dickinson E., Tennstedt S., **Braunholz D.**, Mönnich M., Yan Y., Xu W., Gil-Rodríguez M.C., Clark D., Hakonarson H, Halbach S., Michelis L.D., Rampuria A., Rossier E., Spranger S., Van Maldergem L., Lynch L.A., Gillessen-Kaesbach G., Ludecke H.J., Ramsay R.G., McKay M.J., Krantz I.D., Xu H., Horsfield J.A., Kaiser F.J., RAD21 mutations cause a human cohesinopathy (revised version). Am J Hum Genet. 2012

Braunholz D., Hullings M, Gil-Rodríguez MC, Fincher CT, Mallozzi MB, Loy E, Albrecht M, Kaur M, Limon J, Rampuria A, Clark D, Kline A, Dalski A, Eckhold J, Tzschach A, Hennekam R, Gillessen-Kaesbach G, Wierzba J, Krantz ID, Deardorff MA, Kaiser FJ. Isolated NIPBL missense mutations that cause Cornelia de Lange syndrome alter MAU2 interaction. Eur J Hum Genet. 20(3):271-6. 2012

Osmanovic A, Dendorfer A, Erogullari A, Uflacker N, **Braunholz D.**, Rakovic A, Vierke G, Gil-Rodríguez C, Münchau A, Albrecht M, Brüggemann N, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K, Kaiser FJ. Truncating mutations in THAP1 define the nuclear localization signal. Mov Disord. 26(8):1565-7. 2011.

Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, **Braunholz D.**, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). Ann Neurol. 68(4):554-9. 2010.

Wuelling M, Kaiser FJ, Buelens LA, **Braunholz D.**, Shivdasani RA, Depping R, Vortkamp A. Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. Dev Biol. 328(1):40-53. 2009.

Tagungsbeiträge

Vorträge:

Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik, Montreal 2011

Kaiser F.J., **Braunholz D.**, Wilde J., Albrecht M., Clark D., Rampuria A., Xu W., Krantz I.D., Gillessen-Kaesbach G., Horsfield J.A., Deardorff M.A. Mutations in RAD21 as a cause of a new cohesinopathy.

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Amsterdam 2011

Kaiser F. J., **Braunholz D.**, Wilde J., Gil-Rodríguez M. C., Albrecht M., Clark D., Rampuria A., Xu W., Krantz I. D., Gillessen-Kaesbach G., Horsfield J. A., Deardorff M. A. Mutations in RAD21 as a cause of a new cohesinopathy

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Amsterdam 2011

Stefanova I., Dalski A. , Vogt S. , **Braunholz D.**, Kaiser F. J. , Gillessen-Kaesbach G. Clinical and molecular findings in 91 patients with the clinical diagnosis of Cornelia de Lange Syndrome

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Regensburg, 2011

Kaiser F.J., **Braunholz D.**, Wilde J., Albrecht M., Clark D., Rampuria A., Xu W., Krantz I.D., Gillessen-Kaesbach G., Horsfield J.A., Deardorff M.A. Mutations in RAD21 as a cause of a new cohesinopathy. Medizinische Genetik 23 (1). 2011

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Regensburg, 2011

Erogullari A., Osmanovic A., Dendorfer A., Rakovic A., Uflacker N., **Braunholz D.**, Albrecht M., Gil-Rodríguez M. C., Gillessen-Kaesbach G., Klein C., Lohmann K., Kaiser F. J. Functional characterization of mutations in THAP1 causing dystonia 6. *Medizinische Genetik* 23 (1). 2011

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Regensburg, 2011

Stefanova I., Dalski A., Vogt S., **Braunholz D.**, Kaiser F.J., Gillessen-Kaesbach G. Clinical and molecular findings in 91 patients with the clinical diagnosis of Cornelia de Lange Syndrome. *Medizinische Genetik* 23 (1). 2011

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hamburg, 2010

Braunholz D., Albrecht M., Gil-Rodríguez M.C., Gillessen-Kaesbach G., Wilde J., Deardorff M., Kaiser F.J. Missense mutations affecting the N-terminal region of NIPBL almost completely abolish adherin complex formation with the cohesin-associated protein MAU-2. *Medizinische Genetik*. 22 (1). 2010

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hamburg, 2010

Osmanovic A., **Braunholz D.**, Orolicki S., Albrecht M., Gillessen-Kaesbach G.2 Klein C., Lohmann K., Kaiser F.J. A functional link between DYT1 and DYT6 dystonia: Regulation of DYT1 gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (DYT6). *Medizinische Genetik* 22 (1). 2010

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Aachen, 2009

Kaiser F.J., Wuelling M., Buelens L.A., **Braunholz D.**, Depping R., Gillessen-Kaesbach G., Vortkamp A. TRPS1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of GLI3. *Medizinische Genetik*. 21 (1). 2009

Treffen der Norddeutschen Humangenetiker, Greifswald, 2009

Braunholz D., Wilde J., Deardorff M., Krantz ID, Albrecht M., Gillessen-Kaesbach G, Kaiser F.J. Mutationen im *NIPBL*-Gen beeinflussen dessen Expression und die Protein-Interaktion mit dem Cohesin-assoziierten Faktor MAU-2

Vortrag - Cohesin-Meeting in Pontignano, Italy, 2009

Kaiser, FJ; Xu, WZ; Wuelling, M; Jahnke, P; **Braunholz, D**; Albrecht, M; Gillessen-Kaesbach, G, The Cohesin-Associated NIPBL Interacts With Chromatin Modifying Proteins, *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART A* Volume: 152A Issue: 7 Pages: 1634-1635
Published: JUL 2010

The European Society of Human Genetics - European Human Genetics Conference, Wien 2009

Kaiser F. J. , Wuelling M., Buelens L. A., **Braunholz D.**, Depping R., Gillessen-Kaesbach G., Vortkamp A. TRPS1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of GLI3

Poster:

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Amsterdam 2011

Erogullari A., Osmanovic A., Dendorfer A., Rakovic A., Uflacker N., **Braunholz D.**, Albrecht M., Gil-Rodríguez M.C., Gillessen-Kaesbach G., Klein C., Lohmann K., Kaiser F. J.. Functional characterization of mutations in THAP1 causing dystonia 6

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Göteborg 2010

Braunholz D., Albrecht M., Gil-Rodríguez M. C., Gillessen-Kaesbach G., Wilde J., Deardorff M. A., Kaiser F. J. Specific missense mutations affecting the N-terminal region of NIPBL almost completely abolish adherin complex formation with the cohesin-associated protein MAU-2

Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik, Washington 2010

Osmanovic A., Erogullari A., Rakovic A., Braunholz D., Uflacker N., Lohnau T., Albrecht M.,

Gillessen-Kaesbach G., Klein C., Lohmann K., Kaiser F.J. A functional link between *DYT1* and *DYT6* gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (DYT6)

Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Göteborg 2010

Erogullari A., Osmanovic A. , Rakovic A. , Orolicki S., **Braunholz D.**, Lohnau T., Albrecht M., Gillessen-Kaesbach G., Klein C., Lohmann K., Kaiser F. J. A functional link of *DYT1* and *DYT6* dystonia. Repression of *TOR1A* (*DYT1*) gene expression by the transcription factor activity of THAP1 (*DYT6*)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Aachen, 2009

D. Braunholz, D. Michelis, G. Gillessen-Kaesbach, M. Albrecht, I.D. Krantz, M.A. Deardorff, F.J. Kaiser. Identification and functional analyses of highly conserved regions in the *NIPBL* gene. *Medizinische Genetik* 21 (1).2009

Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik, Hawaii 2009

Kaiser F.J., Wuelling M., Buelens L.A., **Braunholz D.**, Depping R., Gillessen-Kaesbach G., Vortkamp A. *TRPS1*, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of *GLI3*. *Medizinische Genetik*. 21 (1). 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I

1. Einleitung

1.1.	Das Cornelia-de-Lange Syndrom	1
1.2.	Der Cohesin-Komplex – Aufbau und Funktion	3
1.3.	Das <i>NIPBL</i> -Gen und sein Genprodukt	8
1.3.1.	Die Funktion des NIPBL_Proteins	8
1.3.2.	<i>NIPBL</i> -Mutationen und deren Auswirkungen	10
1.4.	Regulative Elemente in der Genexpression	10
1.5.	Ziel der Arbeit	12

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

14

2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.2.	Geräte	15
2.1.3.	Software und Datenbanken	17
2.1.4.	Antikörper	18
2.1.5.	Enzym	19
2.1.6.	Kits	19
2.1.7.	Standards	21
2.1.8.	Antibiotika	20
2.1.9.	Primer	21
2.1.10.	Vektoren	21
2.1.11.	Bakterienstämme	21
2.1.12.	Hefestämme	22
2.1.13.	Zelllinie	22
2.1.14.	Lösungen, Medien und Puffer	22
2.1.14.1.	Agarosegelelektrophorese	22
2.1.14.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
2.1.14.3.	Medien	24
2.1.14.4.	DNA-Extraktion	25
2.1.14.5.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen (<i>Escherichia coli</i>)	25
2.1.14.6.	Transformation von Hefen	25
2.1.14.7.	Zellaufschluss	26
2.1.14.8.	Puffer in der Proteinchemie	26
2.1.14.9.	Calciumphosphat-Transfektion	26

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

27

2.2.1.1.	Kultivierung des <i>E. coli</i> -Stammes <i>DH5alpha</i>	27
2.2.1.2.	Über-Nacht-Kulturen (ÜN~) von <i>E. coli</i>	27
2.2.1.3.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (<i>E. coli</i>)	27
2.2.1.4.	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	27
2.2.1.5.	Kultivierung des Hefe-Stammes <i>AH109</i>	28
2.2.1.6.	Transformation des Hefestammes <i>AH109</i>	28

2.2.2. Zellbiologische Methoden

29

2.2.2.1.	Kultivierung von humanen Zellen	29
2.2.2.2.	Einfrieren von humanen Zellen	29
2.2.2.3.	Auftauen von humanen Zellen	29

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.4.	Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.2.5.	Transfektion von humanen Zellen für die transiente Expression von Proteinen	29
	• Transfektion mittels Lipid-DNA-Komplexierung (Lipofektion)	29
	• Transfektion von humanen Zellen mittels Elektroporation	30
	• Calcium-Phosphat-Transfektion	30
2.2.2.6.	Precocious sister chromatid separation-Assay (PSCS-Assay)	31
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	
2.2.3.1.	Polymerasekettenreaktion	31
2.2.3.2.	Sequenzierung	34
2.2.3.3.	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.3.4.	DNA-Extraktion	36
2.2.3.5.	Restriktionsverdau	37
2.2.3.6.	Ligation	38
2.2.3.7.	DNA-Konzentrationsbestimmung	38
2.2.3.8.	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
2.2.3.9.	Synthese von cDNA	39
2.2.3.10.	TaqMan-Assay	39
2.2.4.	Proteinchemische Methoden	
2.2.4.1.	Chemischer Zellaufschluss	40
2.2.4.2.	Mechanischer Zellaufschluss	40
2.2.4.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS_PAGE)	40
2.2.4.4.	2D-Gelelektrophorese	41
2.2.4.5.	Western Blot	42
	• Semi-Dry Western Blot	42
	• Wet Blot Verfahren	43
2.2.4.6.	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	43
2.2.4.7.	Luciferase-Reportergen-Assay	44
2.2.4.8.	Protein-Protein-Interaktions-Assays	
	• Immun- und Co-immunpräzipitation	45
	• Yeast-Two-Hybrid-Assay	46
	• Quantitativer β -Galaktosidase Test	46
	• Mammalian-Two-Hybrid-Assay	47
2.2.5.	Statistik	48

3. Ergebnisse

3.1.	Regulative Elemente des <i>NIPBL</i> Gens	
3.1.1.	Identifizierung des <i>NIPBL</i> -Promotors	49
3.1.2.	Sequenzierung des <i>NIPBL</i> -Promotors in Patienten mit CdLS	51
3.1.3.	Alternativer Promotor im <i>NIPBL</i> -Gen	54
3.1.4.	Identifizierung weiterer regulativer Elemente im <i>NIPBL</i> -Gen	55
3.2.	<i>NIPBL</i> und Cohesin-assoziierte Proteine	
3.2.1.	<i>NIPBL</i> interagiert mit MAU2	61
3.2.1.1.	Identifizierung der Interaktionsdomänen im <i>NIPBL</i> - und MAU2-Protein	61
3.2.1.2.	<i>NIPBL</i> interagiert mit MAU2 in humanen Zellen	63
3.2.1.3.	Identifizierung neuer Mutationen im <i>NIPBL</i> -Gen bei Patienten mit CdLS	64
3.2.1.4.	Funktionelle Charakterisierung der identifizierten <i>NIPBL</i> -Mutationen	67
3.2.1.5.	Co-Lokalisierung von <i>NIPBL</i> und MAU2 in lymphoblastoiden Zellen	70
3.2.1.6.	Die Mutation G15R hat keinen Effekt auf die Schwesterchromatidpaarung	71
3.2.1.7.	Klinische Merkmale der Patienten mit <i>NIPBL</i> -Mutationen und	

	<i>MAU2</i> -Varianten	71
3.2.2.	Identifizierung des NIPBL-Interaktionspartners HDAC8	72
3.2.2.1.	NIPBL interagiert mit HDAC8 in humanen Zellen	75
3.2.2.2.	Eingrenzung der HDAC8-Interaktionsdomäne in NIPBL	76
3.2.3.	Interaktion von NIPBL mit dem Co-Repressor SIN3A	77
3.2.4.	Interaktion von HDAC8 mit SIN3A	79
3.2.5.	Identifizierung weiterer Interaktionspartner von NIPBL	80
3.3.	Analyse weiterer CdLS-Kandidaten-Gene	
3.3.1.	<i>Sororin</i>	87
3.3.2.	RAD21	87
3.3.2.1.	Mutations-Analyse bei Patienten mit CdLS und CdLS-ähnlichem Phänotyp	87
3.3.2.2.	Funktionelle Analysen der identifizierten Mutationen	88
4.	Diskussion	
4.1.	Regulative Elemente des <i>NIPBL</i> Gens	91
4.2.	NIPBL und Cohesin-assoziierte Proteine	97
4.2.1.	NIPBL interagiert mit MAU2	97
4.2.2.	NIPBL und HDAC8	101
4.2.3.	NIPBL und Sin3A, HDAC8 und Sin3A	103
4.2.4.	NIPBL und potentielle Bindepartner (Hypothesenfreier Ansatz)	104
4.2.5.	Mutationsanalysen von <i>RAD21</i>	107
4.2.6.	Mutationsanalysen von <i>CDCA5</i> , bzw. <i>Sororin</i>	108
4.3.	Ausblick	108
5.	Zusammenfassung	111
6.	Literaturverzeichnis	113
7.	Anhang	
	Danksagung	IX
	Curriculum Vitae	X

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CdLS	Cornelia de Lange-Syndrom
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
evtl.	eventuell
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
h	Stunde
His	Histidin
LB	<i>Lysogeny broth</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
Leu	Leucin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
M2H	<i>Mammalian-two-Hybrid</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger Ribonucleid acid</i>
MW	Molekulargewicht

Abkürzungsverzeichnis

ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NIPBL	<i>Nipped-b-like</i>
NK	Negativkontrolle
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSCS	<i>Precocious sisterchromatid separation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Rowell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SCC	<i>Sister chromatid cohesion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SMC	<i>Structural maintenance of chromosomes</i>
T	Thymin
Taq	<i>Tehermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tentramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	Units
u.a.	unter anderem
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
WT	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast-two-Hybrid</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Cornelia de Lange-Syndrom

Das Cornelia de Lange-Syndrom (CdLS; MIM 122470) ist ein angeborenes, sehr heterogen ausgeprägtes Dysmorphiesyndrom, das 1916 zum ersten Mal von dem Pathologen Winfried Brachmann dokumentiert und später im Jahre 1933 von der holländischen Kinderärztin Cornelia de Lange im Detail beschrieben wurde^{30 16}. Die auch als Brachmann-de Lange-Syndrom bezeichnete Erkrankung wird dominant vererbt¹¹² und gehört mit einer Prävalenz von 1 in 45.000 bis 62.000 Geburten zu den seltenen Erberkrankungen. Meist tritt dieses Syndrom sporadisch auf¹³⁴. Die Patienten mit CdLS weisen einen sehr charakteristischen Phänotyp auf (Abb.1.1). Dabei sind vor allem faziale Merkmale hervorzuheben, zu denen dichte, zusammengewachsene Augenbrauen (Synophrys), lange, gebogene Wimpern, ein langes Philtrum und nach unten gerichtete Mundwinkel, sowie eine schmale Oberlippe gehören. Weiterhin haben die Patienten oftmals eine starke Körperbehaarung (Hirsutismus), eine Mikrozephalie, sowie Reduktionsfehlbildungen der oberen Extremitäten und sind kleinwüchsig

Neben den „äußeren Merkmalen“ zeigen die Patienten u.a. auch gastrointestinale Störungen, wie gastrooesophagealen Reflux,^{83 22 113}, die zu starken Ernährungsproblemen führen können, Herzfehler und Schädigungen des Gehörs. Zusätzlich sind bei einigen Patienten psychische Auffälligkeiten beschrieben. Hierzu gehören u.a. eine verzögerte verbale Kommunikation, Hyperaktivität, teilweise autistisches oder aggressives Verhalten, sowie Selbstverletzungen.^{8 96 37 11} Als weiteres charakteristisches Merkmal weisen Patienten mit CdLS eine kognitive Entwicklungsverzögerung auf und sind mental retardiert, wobei der IQ zwischen 30 und 86 liegt⁷⁷.

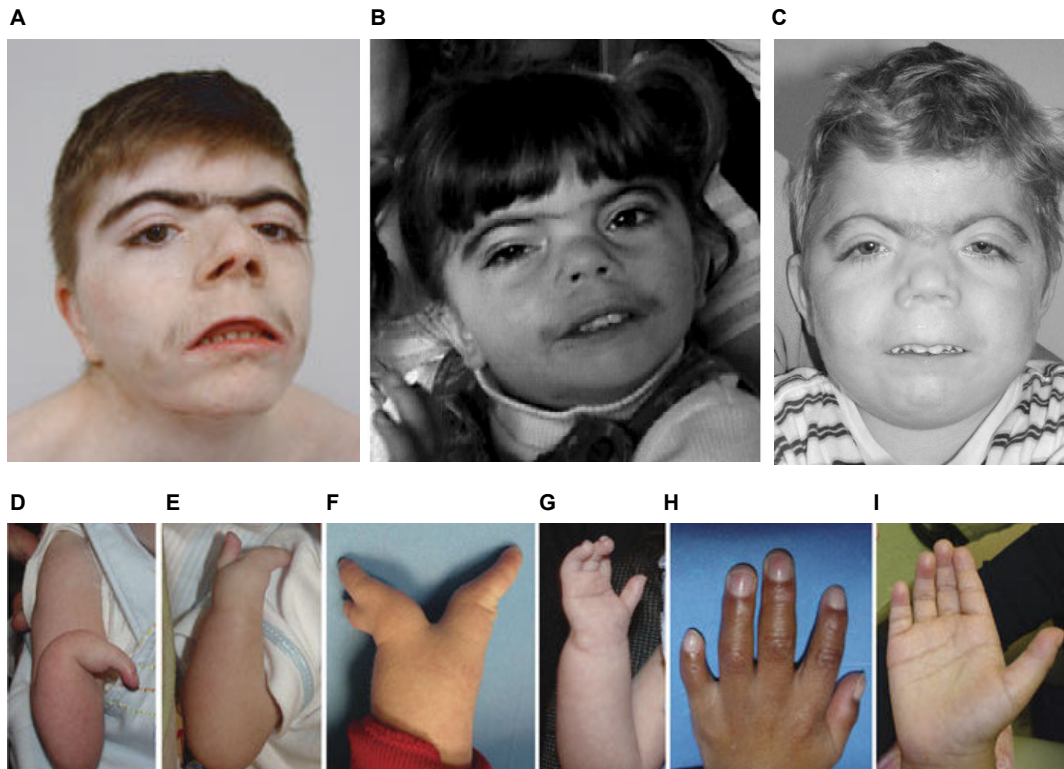


Abb.1.1: Phänotypische Merkmale bei Patienten mit Cornelia de Lange-Syndrom

Neben den typischen Gesichtsmerkmalen der Patienten, wie das lange Philtrum, Synophrys und schmale Oberlippe, die in den oberen Photographien (A-C) deutlich zu sehen sind, sind auch die Fehlbildungen der Arme und Hände sehr charakteristisch. Dabei können sowohl die Ulna, als auch die Mittelhandknochen (Phalangen, Metakarpalia) betroffen sein. Milder betroffene Patienten haben oftmals nur kleine Hände oder eine proximale angesetzte Daumen. Die Fehlbildungen können bei schwerer betroffenen Patienten von Oligodaktylie (Fehlen von Fingern oder Zehen) bis hin zur Monodaktylie (Einstrahligkeit) variieren. (D-I) Dies ist u.a. ein Beispiel für die sehr stark variierende Ausprägung des Phänotyps im Cornelia de Lange-Syndrom. (Photos: ^{88 36 12})

Patienten mit Cornelia de Lange-Syndrom (CdLS) weisen ein sehr breites phänotypisches Spektrum auf. Daher wurde eine Einteilung der Phänotypen in mild, moderat bis hin zu schwer betroffen festgelegt. ^{50 78} Für diese Unterscheidung werden besonders die klinischen Daten zur Wachstumsverzögerung, Fehlbildungen der oberen Extremitäten (Unterarmverkürzung) und kognitive Entwicklungsstörungen berücksichtigt. Weiterhin ist bekannt, dass das Cornelia de Lange-Syndrom auch pränatal mittels Ultraschall diagnostiziert, insbesondere wenn Extremitätenfehlbildungen vorliegen. ¹⁴⁸

Als Ursache für CdLS wurden bisher Mutationen in fünf Genen identifiziert. Das wichtigste Gen, welches bei über 50 % der Patienten eine Mutation aufweist, ist *NIPBL*, das humane Ortholog zum *Nipped-b* Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. ^{81 134} Die Gene *SMC1A* und *SMC3* (*Structural maintenance of chromosomes*), die für Untereinheiten des Cohesinringes (siehe 1.2.) kodieren, sind ebenfalls ursächlich für CdLS. Circa 5 % der Patienten, die nach der bereits beschriebenen phänotypischen Klassifizierungen eher mild bis moderat betroffen sind, tragen Mutationen in diesen Genen. ^{99 34} Dabei konnten neben Missense oder *Splicesite* Mutationen, auch *in-frame* Deletionen und Insertionen identifiziert

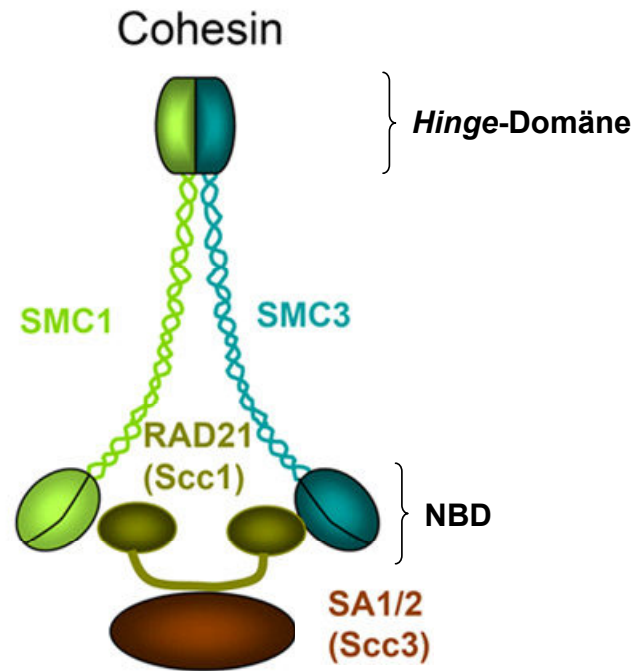
werden, jedoch keine Nonsense Mutationen oder größere Deletionen, ¹⁰⁷, welche einen vollständigen Funktionsverlust des betroffenen Allels verursachen würden, was bei vielen *NIPBL*-Mutationen der Fall ist. ³³

Kürzlich wurden Mutationen in zwei weiteren Genen, *HDAC8* und *RAD21*, bei Patienten mit CdLS nachgewiesen. Das Gen *RAD21* kodiert für eine Untereinheit des Cohesin-Komplexes. Für das Protein HDAC8 konnte gezeigt werden, dass diese Histondeacetylase die Cohesin-Untereinheit SMC3 deacetyliert und damit eine wichtige regulative Funktion im Acetylierungs-Deacetylierungs-Zyklus des Cohesin-Komplexes einnimmt. ^{31,32}

Alle fünf identifizierten und für das Cornelia de Lange-Syndrom ursächlichen Gene kodieren für Cohesinuntereinheiten oder für Proteine, die mit dem Cohesinring assoziiert sind.

1.2. Der Cohesin-Komplex – Aufbau und Funktion

Der für die Schwesterchromatidpaarung (*sister chromatid cohesion* - SCC) essentielle Cohesin-Komplex ist hoch konserviert und besteht aus drei Kernelementen, die zusammen eine Art Ringstruktur ausbilden. Dazu gehören die *Structural maintenance of chromosomes* Proteine SMC1 und SMC3, sowie das α -Kleisin RAD21 (Scc1) (Abb.1.2.). ^{90,101,127} Die beiden SMC-Proteine SMC1 und SMC3 besitzen eine intramolekulare, antiparallele Coiled-Coil-Struktur, so dass die beiden Hälften des jeweiligen Proteins symmetrisch umeinander gewickelt sind. Dadurch entstehen funktionell wichtige Domänen. Hierzu gehört zum einen der C- und N-Terminus, der zur Bildung einer ATP-Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) der ABC-Klasse in einer „Head“-Domäne führt und zum anderen entsteht aus der Mitte des Polypeptides eine „Hinge“-Domäne, die gleichzeitig eine Region der hydrophoben Interaktion zwischen den beiden SMC-Proteinen ist. ^{58,65,95}



Risa Kitagawa
 Key players in chromosome segregation in
Caenorhabditis elegans
 Frontiers in Bioscience 14, 1529-1557, Jan. 1, 2009

Abb.1.2: Aufbau und Struktur des Cohesinringes

Der Cohesinring besteht aus drei Kern-Untereinheiten, den SMC-Proteinen 1 und 3, sowie RAD21 (Scc1). Zusätzlich sind die Stromalinproteine STAG1, 2 oder 3 (Scc3) über Rad21 mit Cohesin assoziiert. Durch die Ringstruktur entstehen mehrere funktionell wichtige Domänen, zu denen die „Hinge“-Domäne und die Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) gehören.

Durch die Bindung der α -Kleisin Untereinheit RAD21 werden die beiden Proteine SMC1 und SMC3 über die NBDs miteinander verbunden, so dass sich der Cohesinring schließt⁵⁸. Über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert der C-Terminus von RAD21 mit der „Head“-Domäne von SMC1 und der N-Terminus mit der „Head“-Domäne von SMC3. Die Interaktion der beiden zusammengeführten SMC-Proteine erfolgt wahrscheinlich über ihre NBDs mit einer Bindung von ATP, während eine Dissoziation durch die ATP-Hydrolyse bewirkt wird,^{6,59} dass RAD21 zunächst an SMC1 bindet, was eine Konformationsänderung zur Folge hat. Diese ermöglicht die Bindung von ATP, sowie SMC3 und damit den Ringschluss von Cohesin. Der exakte Mechanismus der Strukturveränderung des Cohesin-Komplexes während der Assoziation an Chromatin ist bisher noch nicht aufgeklärt. Nach Bindung von RAD21 mit den beiden SMC-Proteinen werden die Stromalin Proteine (STAG1, 2, 3 (Scc3)) als weitere Untereinheit an den Komplex rekrutiert.

Die direkte Bindung des Cohesins an die Schwesterchromatide wurde bisher noch nicht experimentell bewiesen. Derzeit werden noch immer zwei Modelle diskutiert, die die Assoziation des Komplexes mit der DNA erklären könnten. Das wahrscheinlichste Modell ist dabei das topologische Modell, das einen Cohesinring zeigt, der beide Schwesterchromatide

umschließt und diese zusammenhält. Das alternative *Handcuff*-Modell postuliert, dass die Chromatiden von je einem Cohesinring umfasst werden und diese gleichzeitig miteinander interagieren.^{54,108}

Die Rekrutierung von Cohesin an Chromosomen in Vertebraten erfolgt während der Telophase, vor dem Beginn der DNA-Replikation und wird durch mehrere Faktoren beeinflusst.⁵⁹ Der wichtigste Faktor ist ein heterodimerer Komplex aus NIPBL und MAU2 (Scc2 und Scc4), der auch als Cohesin-Ladekomplex oder Adherin-Komplex bezeichnet wird.²⁶ In Abschnitt 1.4. ist die Funktion dieses heterodimeren Komplexes näher erklärt. Ein weiteres Protein, Sororin, ist für die Beladung und die Assoziation von Cohesin an DNA verantwortlich. Sororin interagiert mit der Acetyltransferase Esco2 zur Bildung der stabilen, bzw. „*cohesive*“ Kohäsion während der DNA-Replikation^{66,110}. Dieses Protein fungiert als Antagonist von WAPL, dass die Dissoziation von Cohesin vom Chromatin reguliert^{82,105}. Mutationen im humanen *ESCO2* Gen verursachen das mit dem CdLS phänotypisch überlappende Roberts-Syndrom (SC phocomelia).^{121,140} Die beiden Cohesin-assoziierten Proteine PDS5 und WAPL haben gegensätzliche Funktionen und sind für die Aufrechterhaltung des Cohesin-Zyklus verantwortlich.^{45,82} Es wurde nachgewiesen, dass PDS5 über die SMC-„*Hinge*“-Domäne mit Cohesin assoziiert ist. Diese ist wahrscheinlich die Zielregion für regulative Faktoren im Cohesin-Komplex.^{67,76,93,108} Die Assoziation und Dissoziation des Cohesinringes ist eng an den Zellzyklus gekoppelt und wird durch verschiedenste Faktoren (Acetylierungszyklus des Cohesins – siehe Abb. 1.3.) reguliert.¹⁵ Während die Beladung von Cohesin in Vertebraten während der Telophase stattfindet, erfolgt sie in Hefen während der G1-Phase.^{58,59} In der S-Phase wird die Kohäsion der Schwesterchromatide mittels Cohesin etabliert und stabilisiert.

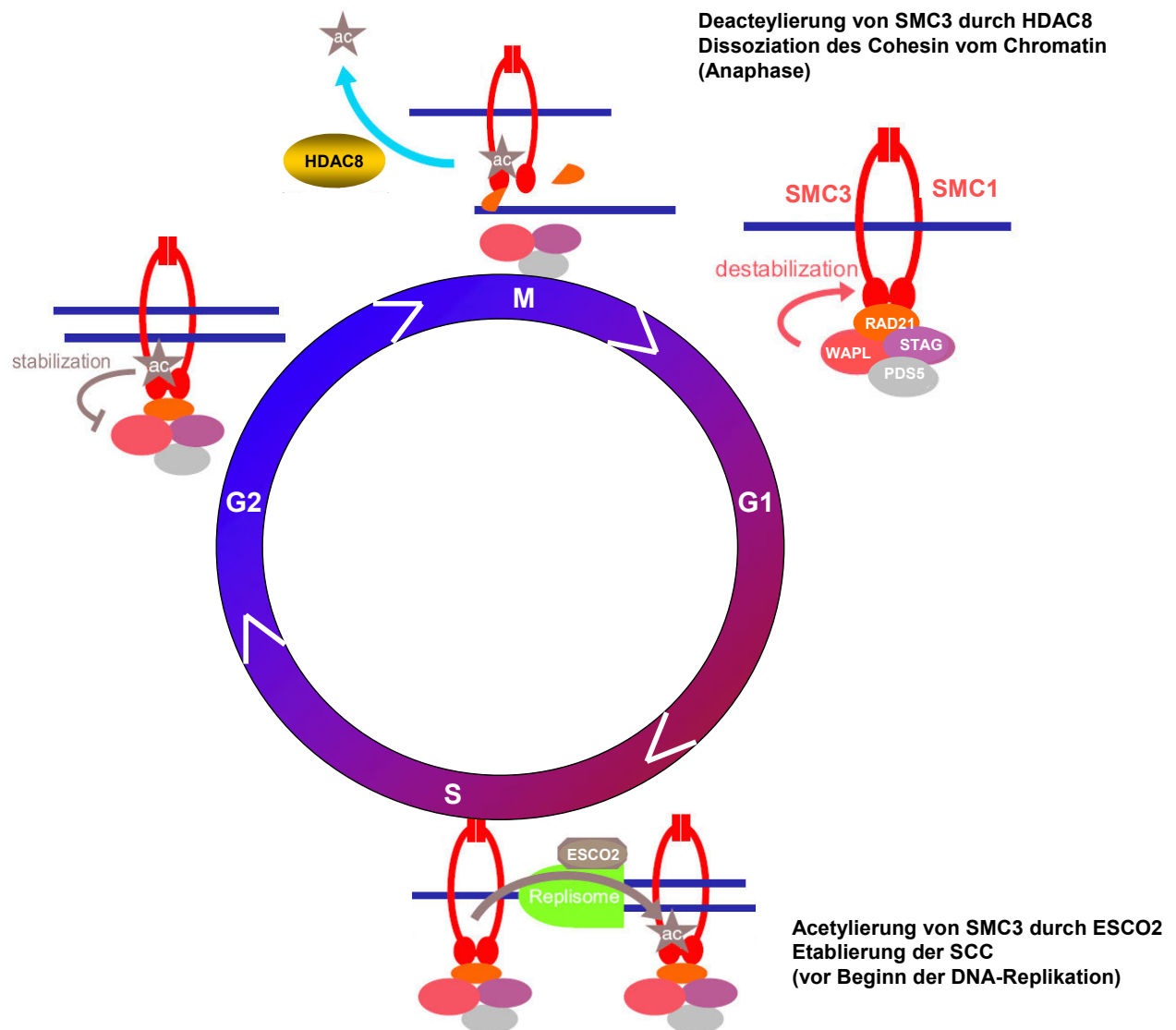


Abb.1.3: Acetylierungszyklus von SMC3 in Korrelation mit dem Zellzyklus in Vertebraten

Die Beladung des Cohesinringes erfolgt während der Telophase. Während der S-Phase, vor Beginn der DNA-Replikation, wird SMC3 durch das Enzym ESCO2 acetyliert und es kommt zur Etablierung der Schwesterchromatidpaarung (SCC). Die Kohäsion ist über die G2-Phase stabil und wird erst in der Anaphase der Mitose wieder durch die Deacetylierung von SMC3 durch HDAC8 gelöst und damit der Acetylierungszyklus von Cohesin geschlossen. Als weitere regulative Proteine sind PDS5 und WAPAL aufgeführt, die den Cohesinkomplex zusätzlich stabilisieren oder destabilisieren können.

(Schema variiert nach Borges *et al.* 2010¹⁵)

Die Dissoziation des Cohesin-Komplexes von den Schwesterchromatiden erfolgt dann in zwei Phasen durch verschiedene Mechanismen. Zunächst wird Cohesin während der Prophase von den Chromosomen mit Ausnahme der Centromere entfernt, was als centromerische Einschnürung oder Konstriktion (*centromeric constriction*) bezeichnet wird. Im zweiten Teil erfolgt in der Anaphase die Ablösung aller Cohesin-Komplexe durch die Spaltung von RAD21, bzw. Scc1 durch Separase. Dieses Enzym ist eine Thiolprotease,

deren proteolytische Aktivität bis zum Eintritt in die Anaphase von dem Protein Securin inhibiert wird. Durch den *anaphase-promoting-complex* (APC) wird der Inhibitor degradiert und die Separase aktiviert^{136,144} (Abb. 1.4.). Die enge Kopplung des Cohesin-Zyklus an den Zellzyklus und die nachweislich vielen Cohesin-Bindestellen an Genen, weisen auf weitere Funktionen dieses Protein-Komplexes hin. Dazu gehört u.a. die DNA-Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die Regulation der Genexpression und damit einhergehend, die Regulation der Chromosomenkonformation.^{48,60,70,133}

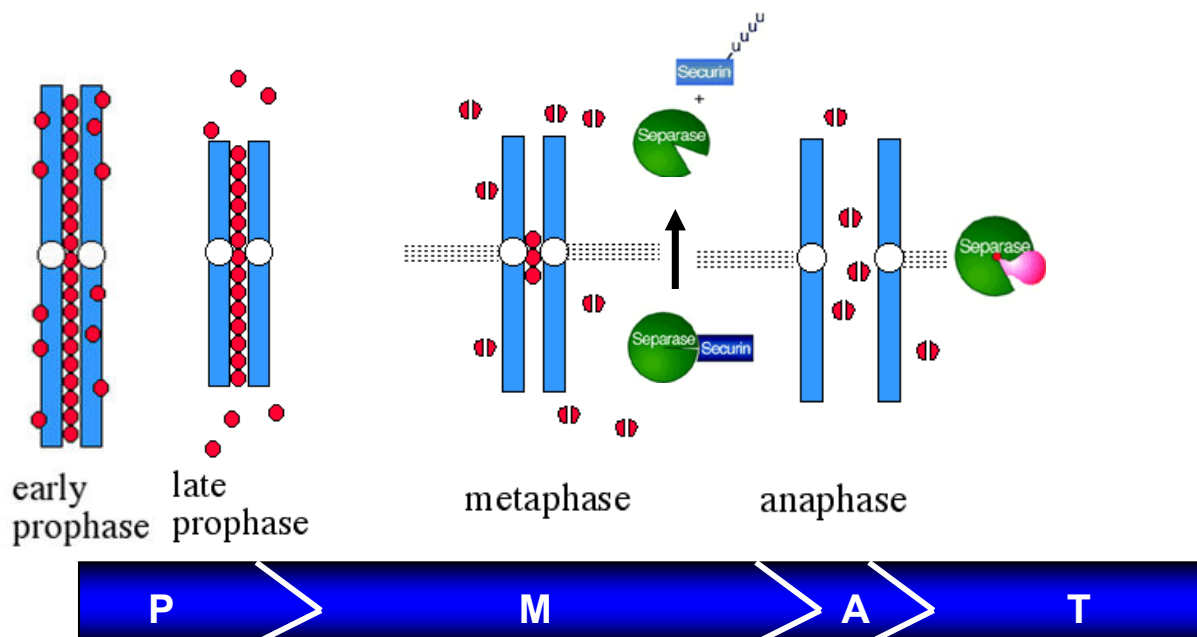


Abb.1.4: Cohesin-Zyklus in Abhängigkeit der Mitoseprogression

Während der Telophase bis zur G2-Phase erfolgt die Bindung und Stabilisierung von Cohesin an Chromatin zur Etablierung der SCC. Die Dissoziation des Komplexes findet in zwei unterschiedlichen Phasen statt. Zum einen lösen sich die Komplexe von den Chromosomenarmen (*Centromeric constriction*) während der Prophase und zum anderen erfolgt nach der Aktivierung des Enzyms Separase die Spaltung von RAD21, so dass alle Cohesin-Komplexe während der Anaphase vom Chromatin dissoziieren. (Schema variiert nach Arnon *et al.* 2001,⁴)

Analysen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigten, dass die Lokalisation des Cohesins mit aktiv transkribierten Genen korreliert⁹⁸ während der Komplex in der Hefe in intergenischen Regionen akkumuliert vorliegt.⁸⁶ In Vertebraten hingegen erfolgt die Bindung von Cohesin an DNase I-hypersensitiven Regionen. An diese „aktiven“ Bereiche bindet auch das Insulatorprotein CTCF. (siehe Abschnitt 1.7.) Dabei wurde eine Colokalisation von Cohesin und CTCF nachgewiesen.¹⁰⁹ CTCF wird auch als Grenzelement (*Insulator*) bezeichnet, da es häufig an Übergängen zwischen exprimierten und nicht exprimierten Genen lokalisiert ist.⁷⁵ Somit nimmt der Cohesin-Komplex eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedenster Gene ein.^{88,102} Demzufolge ist die Beladung des Cohesinringes an Chromatin ein sehr bedeutender Mechanismus, in dem das Protein NIPBL eine wichtige Funktion einnimmt. Bei Patienten mit CdLS wurde die Fehlregulation der Expression

verschiedenster Gene gezeigt.⁸⁹ Dabei konnte festgestellt werden, dass besonders Patienten mit einer *NIPBL*-Mutation eine höhere Abweichung in der Genexpression zeigen. Dies geht einher mit dem meist stärker ausgeprägten Phänotyp dieser Patienten.

1.3. Das *NIPBL*-Gen und sein Genprodukt

Ian Krantz und Emma Tonkin zeigten im Jahr 2004 zum ersten Mal, dass Mutationen im *NIPBL*-(*Nipped-B-like*)-Gen das Cornelia de Lange-Syndrom verursachen^{81,134}. Dieses Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 (Chr.5p13.2) und kodiert für mindestens zwei bekannte Isoformen A und B des *NIPBL*-Proteins. Diese bestehen aus insgesamt 46, bzw. 47 Exons (Isoform B/ A). Der Translationsstart befindet sich für beide Isoformen in Exon2, so dass die kodierende Sequenz eine Länge von 8049, bzw. 8415 bp besitzt. (Ensembl - ENST00000282516, ENST00000448238) *NIPBL* ist in seiner Sequenz vom *Homo sapiens* über Maus und Zebrafisch bis hin zur Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, (*Nipped-B* Homolog) und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*SCC2* Homolog) (NCBI-Homology) hoch konserviert.

Das Genprodukt *NIPBL*, auch Delangin genannt, besteht aus 2697, bzw. 2804 Aminosäuren (B/ A) und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 304, bzw. 306 kDa. Es ist im Zellkern lokalisiert und wird nahezu ubiquitär im Körper, sowohl in fetalen, als auch in adultem Gewebe exprimiert.⁸¹ Während vor allem glanduläre und epitheliale Zellen endokriner Gewebe (Schilddrüse, Nebennieren, Bauchspeicheldrüse) und Zellen des Gastrointestinaltraktes eine hohe Expression von *NIPBL* aufweisen, wurde das Protein weder in Zellen der Leber, noch in Gliazellen nachgewiesen.¹³⁵

1.3.1. Funktionen des *NIPBL*-Proteins

Bezugnehmend auf die Homologie zu den Genen *Nipped-B* aus *Drosophila melanogaster*, *Sister chromatid cohesion protein 2* (*Scc2*) aus *Saccharomyces cerevisiae* und weiteren Orthologen, wurde *NIPBL* zunächst zu einer Klasse von Adherinen zugeordnet, die während der Mitose und Meiose in der Schwesterchromatidpaarung (*Sister chromatid cohesion*), sowie Chromosomenkondensation und DNA-Reparatur eine wichtige Funktion übernehmen.^{43,97,123} In einem Bericht von Dale Dorsett im Jahr 2004 in „Current Biology“ ist die folgende Tabelle (Tabelle 1) zur Gegenüberstellung der orthologen Gene aufgeführt.²⁸ Bezogen auf seine Größe, sind für das *NIPBL* Protein sehr wenige funktionelle Domänen in den Proteindatenbanken aufgeführt (Abb. 1.2). Zu ihnen zählen vor allem die hochkonservierten, im C-Terminus lokalisierten HEAT *repeats* (violettes Kästchen-AA 1300-2500), die eine wichtige Funktion bei der Protein-Protein-Interaktion übernehmen und die Sister chromatid cohesion (SCC) - C-Terminus-Region (rotes Kästchen), die in *Nipped B* (*Drosophila melanogaster*), bzw. *SCC*-Proteinen häufig vorkommt.

Tabelle 1. Adherine und ihre Funktion aus Current Biology, Dale Dorsett, 2004

Organism	Adherin	Demonstrated functions
<i>C. cinereus</i>	Rad9	Meiotic DNA repair, chromatid cohesion, homolog pairing
<i>S. pombe</i>	Mis4	Mitotic sister chromatid cohesion, DNA repair
<i>S. cerevisiae</i>	Scs2	Mitotic sister chromatid cohesion
<i>Drosophila</i>	Nipped-B	Long-range gene activation, sister chromatid cohesion
<i>Xenopus</i>	XScs2A,B	Mitotic sister chromatid cohesion
<i>H. sapiens</i>	NIPBL-A,B	Physical and mental development

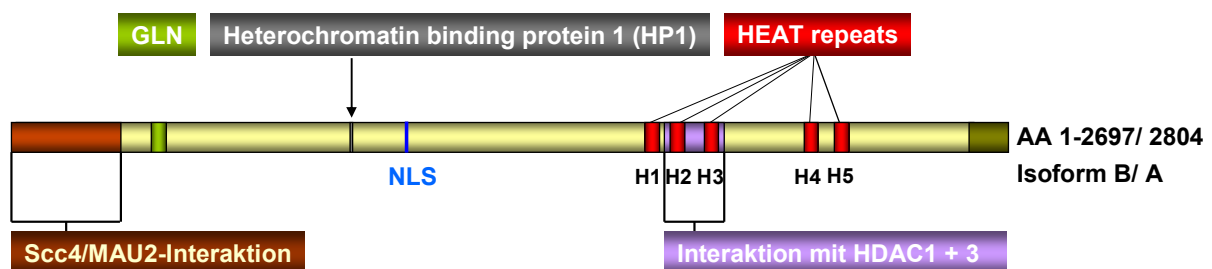


Abb.1.6: Funktionelle Domänen im NIPBL Protein

In dieser Abbildung sind die funktionellen Domänen gezeigt, die in der Literatur bereits beschrieben wurden. Neben den erwähnten HEAT *repeats*, sind auch der N-Terminus, zur Interaktion mit MAU2, sowie die Domäne zur Bindung von HP1 dargestellt. Zusätzlich wurde für die Proteinsequenz ein zweiseitiges Kernlokalisationsignal vorhergesagt.

In der Literatur wurden neben diesen vorhergesagten Regionen weitere funktionell relevante Proteindomänen im NIPBL-Protein identifiziert. Darunter sind die im N-Terminus liegende MAU2-Interaktionsdomäne (AA 1-277) und die Bindestelle des Heterochromatin-Bindeproteins 1 (HP1), das ein Marker für das Heterochromatin ist und zudem eine wichtige Funktion in der Formation der Chromatinstruktur hat.⁸⁵ Zusätzlich wurden ein zweiseitiges Kernlokalisationsignal und eine glutaminreiche Region vorhergesagt, die bisher nicht näher untersucht wurden. Als eine Funktion der HEAT *repeats* wurde durch unsere Arbeitsgruppe die Interaktionen von NIPBL mit den Histondeacetylasen 1 und 3 (HDAC 1 und 3) beschrieben.⁶⁸ Die Rekrutierung dieser Klasse I- HDACs durch NIPBL bewirkte eine lokale Veränderung der Chromatinstruktur.

In späteren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass NIPBL (Scs2 in Hefen) mit MAU2 (Scs4 in Hefen) einen heterodimeren Adherin-Komplex bildet, der die Beladung des Cohesin-

Komplexes an Chromatin reguliert.^{26,122} Die Rekrutierung von Cohesin erfolgt an viele chromosomale Regionen, wie z.B. Centromere, *Cohesion-attachment regiones* (CARs), und DNA-Doppelstrangbrüche während der Mitose und Meiose.^{40,80,146,152} Wie der Adhärenz-Komplex Cohesin an Chromatin lädt, ist allerdings weitestgehend unbekannt. In einer kürzlich erschienen Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die Beladung von NIPBL an DNA-Doppelstrangbrüche über die DNA-Damage Response Proteine MDC1, RNF168 und HP1 γ erfolgt.¹⁰⁶

1.3.2. NIPBL-Mutationen und deren Auswirkungen

Über 50 % der Patienten mit Cornelia de Lange-Syndrom zeigen Mutationen im *NIPBL*-Gen. In der *Leiden Open Variation Database* (LOVD) sind bisher 245 bekannte Variationen des Gens dokumentiert. Dabei sind sowohl Missense-, Nonsense Mutationen und Splice-site Mutationen, als auch Insertionen und Deletionen aufgeführt. Im Vergleich zu Patienten, die eine Mutation in *SMC1A*, *SMC3* oder *HDAC8* tragen, weisen CdLS-Patienten mit einer Mutation im *NIPBL*-Gen meist einen deutlich stärker ausgeprägten Phänotyp auf.⁸⁸ Weiterhin sind Patienten mit einer protein-trunkierenden Mutation in diesem Gen, wie z.B. bestimmte Splice site- oder Nonsense-Mutationen, sowie Leserahmenverschiebe (*out-of-frame* Deletionen, bzw. Insertionen) am schwersten betroffen. Auch funktionelle Analysen zeigten, dass schon eine kleine Änderung (~30 %) der *NIPBL*-Expression ausreicht, um einen Phänotyp zu verursachen.^{28,74} Somit deutet die Dosisabhängigkeit für diese Transkripte auf eine Haploinsuffizienz als krankheitsursächlichen Mechanismus hin.

1.7. Regulative Elemente in der Genexpression

Da in Eukaryoten sowohl das Wachstum, die Entwicklung, als auch die Differenzierung und Homöostase durch die Transkription von selektiven Genen bestimmt wird, ist die zell- und entwicklungsspezifische Regulation ihrer Expression von großer Bedeutung. Als regulative Faktoren zur spezifischen Kontrolle der Genexpression unterscheidet man *cis*- und *trans*-Elemente. *Cis*-Elemente sind vor allem Promotoren, Enhancer, Silencer und die Transkriptionsstartstelle (TSS), die bei der Initiation der Transkription eine wichtige Funktion einnimmt. Die ebenfalls zur Transkriptionsregulation beitragenden *Trans*-Elemente sind vor allem Transkriptionsfaktoren, die an die regulativen *cis*-Elemente binden können. Für die Initiation der Transkription befindet sich in der näheren Umgebung der TSS ein sogenannter Kernpromotor (*core promoter*), an den der Präinitiationkomplex (PIC) bindet und damit das Ablesen der DNA startet. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass viele Gene mehrere TSS aufweisen, die zusammen ein Cluster bilden. Daher können für ein spezifisches Gen mehrere alternative Transkripte exprimiert werden. Zur Identifizierung von TSS mittels Hochdurchsatzverfahren finden neben den Hybridisierungsmethoden, wie *Tiling Arrays* und

ChIP-Chip, auch die 5'-tag-Sequenzierung, bzw. *Cap analysis of gene expression* (CAGE) Verwendung. Mit dieser Methode werden nur mRNA-Moleküle analysiert, die transkribiert wurden und somit ein 5'-Cap tragen. Von jeder mRNA werden nur die ersten 20-21 Nukleotide am 5'Ende *reverse* transkribiert, amplifiziert und anschließend sequenziert.¹²⁹ Die veröffentlichten CAGE Analysen¹³⁰ zeigten, dass die allgemeine Expression von Genen, im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen, über mehrere TSS erfolgt, die bis zu 100 Nukleotiden von einander entfernt liegen können. Diese sogenannten „*broad* TSS“ befinden sich unter der Kontrolle von „*broad*“ Promotoren, die sich u.a. durch einen hohen Gehalt an CG-Dinukleotiden, bzw. *CpG-Islands* auszeichnen. Promotoren dieser Klasse regulieren die Expression von mRNAs unterschiedlicher Länge, die aber meist für das gleiche Genprodukt kodieren. Im Vergleich zu den *broad*-TSS, die hauptsächlich in den ubiquitär exprimierten Genen vorkommen, weisen die sogenannten *sharp* TSS eine definierte Stelle des Transkriptionsstarts auf.⁵⁶ Diese seltene Art der Transkriptionsinitiation findet vor allem bei sehr gewebespezifischen Expressionen statt. Dabei befindet sich circa 28-34 bp stromaufwärts die Konsensussequenz TATAA, auch TATA-Box genannt, die die Bindung des PIC reguliert. Diese *sharp* Klasse weist, im Gegensatz zu den *broad* TSS, einen hohen Grad an Konservierung auf. Weiterhin gehören zu den allgemeinen DNA-Elementen das Initiator-Element mit der Konsensussequenz YYANWYY, das meist in Zusammenhang mit TATA-Box-Elementen auftritt, *Downstream promoter element* (*DPE*), welches, wie die TATA-Box, den PIC rekrutieren kann (*broad* TSS) und *TFIIB recognition element* (*BRE*), das die Transkription in Eukaryoten für TATA-Box abhängige Gene reguliert.¹¹⁶ Neben diesen Unterschieden haben alle TSS die Initiatorsequenz an Position -1 und +1 gemeinsam. Diese Sequenz beinhaltet ein Pyrimidin-Purin-Dinukleotid an den genannten Positionen.²¹

Die meisten proteinkodierenden Gene in Mensch und Maus sind mit mehreren Promotorregionen assoziiert, so dass für verschiedene Gewebetypen alternative Promotoren eines Gens vorhanden sind, die eine Expression alternativer Transkripte, bzw. Proteine ermöglichen. Eine Regulation der individuellen Gen-, bzw. Gencluster-Expressionen erfolgt durch weitere distale *cis*-Elemente, die mit den Promotorregionen der jeweiligen Gene interagieren, sowie die Chromatinstruktur und damit die Zugänglichkeit für beispielsweise Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Diese Regionen werden daher meist mit einer hohen DNase I-Hypersensitivität assoziiert.¹⁴⁹ Zu diesen regulatorischen DNA-Sequenzen gehören Enhancer, Silencer, sogenannte *locus control regions* (LCR) und Insulatoren, die meist weit vom Transkriptionsstart entfernt zu finden sind. Diese Elemente beeinflussen die Genexpression, in dem sie RNA-Polymerase II-Transkription, Konformationsänderungen des Chromatins, sowie die Organisation des Genoms im Zellkern regulieren. Mit der Methode *Chromosome Conformation Capture* (3C/4C) konnte nachgewiesen werden, dass diese DNA-Motive eine sogenannte *Long-range*-Interaktion zwischen den regulativen Elementen

(z.B. Promotor-Enhancer-Interaktion) ermöglichen, in dem sie Chromatinloops bilden, die durch eine zusätzliche Bindung von regulativen Proteinen stabilisiert werden. Während Enhancer und Silencer die Expression von Genen aktivieren, bzw. reprimieren, ermöglichen die LCR eine stabile Genexpression.⁹² Unterscheidung von Promotor- und Enhancer-Elementen kann über spezifische Histonmodifikationen erfolgen, die häufig charakteristisch für diese funktionellen DNA-Motive sind. Dabei weist die Monomethylierung des Lysins 4 am Histon 3 (H3K4me1) auf einen Enhancer und eine Trimethylierung (H3K4me3) eher auf einen Promotor hin.^{63,79} Bei den Insulatoren unterscheidet man zwei Klassen: Zum einen fungieren Insulatoren als Barriereelement, die Regionen bestimmter Chromatinstruktur und damit Transkriptionsaktivität, klar definieren und zum anderen sind es Enhancerblocker, die eine Interaktion zwischen Enhancer und Promotor verhindern.^{46,137} Der Transkriptionsfaktor CTCF spielt bei der Insulation verschiedener Gene eine wichtige Rolle. In der Literatur wurde bisher in mehreren Publikationen eine Colokalisation von Cohesin- und CTCF-Bindestellen nachgewiesen, was zu der Annahme führt, dass eine funktionelle Interaktion zwischen den beiden Proteinen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Genexpression und Entwicklung spielt.^{48,109}

1.8. Ziel der Arbeit

Obwohl bereits Mutationen in den fünf Genen *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* und *HDAC8* bei Patienten mit CdLS beschrieben wurden, ist die genetische Ursache bei circa 35-40 % der Patienten noch immer ungeklärt. Während etwa die Hälfte aller Patienten eine Mutation im *NIPBL*-Gen aufweist, finden sich Mutationen in den anderen Genen bei etwa 10 % der Betroffenen. Hierbei ist anzumerken, dass vor allem schwer betroffene oder im allgemeinen als „klassisch“-bezeichnete Patienten Mutationen im *NIPBL*-Gen zeigen, während Patienten mit Mutationen in den Genen *SMC1A*, *HDAC8* eher moderate bzw. in *SMC3* und *RAD21* sehr milde Phänotypen zeigen. In dem für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Kollektiv von Patienten mit CdLS finden sich einige Patienten mit einem klassischen bzw. schweren CdLS-Phänotypen, in denen bisher keine Mutation nachgewiesen werden konnte, obwohl, ausgehend von der klinischen Diagnose, eine Mutation im *NIPBL*-Gen als sehr wahrscheinlich angenommen wurde. Obwohl verschiedene Studien einen klaren Zusammenhang des *NIPBL*-Expressionslevels mit der Ausprägung des CdLS-Phänotyps zeigten, beschränken sich die bisher angewendeten diagnostischen Verfahren lediglich auf die protein-kodierenden Bereiche des *NIPBL*-Gens.

Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifizierung und Charakterisierung von funktionellen Elementen des *NIPBL*-Gens, welche direkt an der Regulation der Expression des wichtigsten CdLS-Gens beteiligt sind. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen anschließend in die klinische Diagnostik eingebunden werden. Die erweiterte molekulargenetische Analyse des

NIPBL-Gens bei Patienten mit einem CdLS soll die Identifizierung der genetischen Ursache bei weiteren Patienten ermöglichen.

Neben der Identifizierung regulativer Elemente des *NIPBL*-Gens, sollen weitere Analysen zur funktionellen Charakterisierung des *NIPBL*-Genproduktes durchgeführt werden. Die vorgestellten Analysen fokussieren sich dabei auf die Identifizierung direkter Interaktionspartner des NIPBL-Proteins. Über die Eingrenzung und Charakterisierung der dafür verantwortlichen Regionen innerhalb des NIPBL-Proteins und der funktionellen Analyse von CdLS-relevanten Mutationen für diese Protein-Protein-Interaktionen, sollen neue Erkenntnisse über zusätzliche Kandidatengene und pathophysiologische Mechanismen bei der Entstehung eines CdLS gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller-Firma
Acrylamid-30 % (Rotiphorese)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agar	Fluka Biochem. (Buchs, Deutschland)
Star Pure Agarose- Low EEO Standard	StarLab (Ahrensburg, Deutschland)
Aluminiumsulfat(-14-18)-Hydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumsulfat	Fluka Biochem. (Buchs, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bovine Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Calciumchlorid	Serva-Feimbiochemica (Heidelberg, Dtl.)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DTT	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Do-Supplement (-Leu/-Trp)	Clontech (MountainView, USA)
Do-Supplement (-Leu/-Trp/-Ade/-His)	Clontech (MountainView, USA)
EDTA	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
100 % Ethanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid 0,025 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FBS	Gibco-Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
FuGENE HD	Roche (Mannheim, Deutschland) / Promega (Hamburg, Deutschland)
Glycin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Glucose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glyzerin	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid	Fluka Biochem. (Buchs, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumacetat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Lipofectamin	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Lithiumacetat	Fluka Biochem. (Buchs, Deutschland)
Lithiumchlorid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Margermilchpulver	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Nonidet-P40 (NP40)	Fluka Biochem. (Buchs, Deutschland)
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid-(ONPG)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Fluka Biochem. (Buchs, Deutschland)
Pepton	Gibco (Scotland, UK)

Phenol	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
ProLong Gold antifade Reagent	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Promofectin	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-Base	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)
Triton-X-100	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Trypton	Beckton Dickinson (Sparks, USA)
Tween 20	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Yeast Extract	Beckton Dickinson (Sparks, USA)
Yeast nitrogen base	Beckton Dickinson (Sparks, USA)

2.1.2. Geräte

Gerät und Zubehör	Hersteller-Firma
Agarosegel-Elektrophorese-System	
HE 99x submarine electrophoretic unit	Amersham Bioscience (Upsala, Schweden)
Electrophoresis Power Supply – LKB GFP200/400	Biostad-Pharmacia (Quebec, Kanada)
IV-Kontaktlampe Chroma 43	Vetter GmbH (Wiesloch, Deutschland)
CCD Black and White Video Camera Module XC-ST70	SONY (Los Angeles, USA)
Digital Graphic printer UP-D895	SONY (Los Angeles, USA)
Inkubatoren	
Innova 4300 Incubator Shaker	New Brunswick/Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Certomat-H	B Braun/Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Certomat-U-Schüttler	B Braun/Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Köttermann-Typ 2735	Köttermann (Uetze/Hänigsen, Deutschland)
Galaxy 170S	New Brunswick/Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Heraeus-Typ B5028	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikroskopie	
BMS 74955	D.R.G. Schuchardt (Göttingen, Deutschland)
Laborlux 12	Leitz (Stuttgart, Deutschland)
Mikroskop-Zeiss	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus HBO100	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Fluoreszenzlampe ebq 100 isolated	Kübler (Deutschland)
Photometrie/Spektrometrie	
Helios Omega UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Scientific (Cambridge, UK)
Nanoküvette	Thermo Scientific (Cambridge, UK)
Pipetten	
Gilson	Gilson (Middleton, USA)
Eppendorf	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
SDS-PAGE und Western Blot	
PowerPac Basic Power Supply	BioRad (München, Deutschland)
Transblot SD SemiDry Transfer Cell	BioRad (München, Deutschland)
Mini PROTEAN Tetra Cell System	BioRad (München, Deutschland)
Glasplatten (0,75 mm Spacer)	BioRad (München, Deutschland)
Mini Trans-Blot Module (Wet Blot)	BioRad (München, Deutschland)

2D-Gelelektrophorese	
Typhoon FLA 900	GE Healthcare (München, Deutschland)
Etton Spot Picker	GE Healthcare (München, Deutschland)
Protean IEF Cell	BioRad (München, Deutschland)
Flaptop Tower	Gel Company (San Francisco, USA)
Thermocycler	
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Veriti 96 well Thermal Cycler	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
T-Gradient	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugation	
Centrifuge (well-Platten) 5804	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
5415C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Microfuge 22R Centrifuge	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Avanti J-30I Centrifuge	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Biofuge 13	Heraeus Sepatech (Hanau, Deutschland)
CombiSpinFVL-2400 Centrifuge/Vortex	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Sequencer	
3130X/Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Taq-Man-Real-Time System	
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Diverses	
Abzüge	Köttermann (Uetze/Hänigsen, Deutschland)
Autoklav-CS/VFKT	Webeco (Selmsdorf, Deutschland)
Easypet-Pipetboy 9V DC	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Magnetrührer MR3002	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Magnetrührer KAMAG RH	Jahnke und Kunkel (Staufen, Deutschland)
Microprocessor pH-Meter WTW	WTW (Weilheim, Deutschland)
<u>Kühlschränke/Gefrierschränke</u>	
Gefrierschrank-Liebherr Comfort und Profiline	Liebherr (Rostock, Deutschland)
Siemens GS34VV20-Kühlschrank	Siemens (München, Deutschland)
Bosch electronic Gefrierkombination	Bosch (München, Deutschland)
Sanyo Ultra Low -80°C Gefrierschrank	Sanyo (München, Deutschland)
<u>Sterilbänke</u>	
Heraeus Lamin Air HLB 2448GS	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Hera Safe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Gene pulser X Cell Electroporation System CE und PC Module	BioRad (München, Deutschland)
<u>Schüttler</u>	
Polymax 1040 Schüttler/Schwenker	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Heidolph-Schüttler	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Reax Overhead Shaker Heidolph	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
<u>Thermomixer</u>	
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<u>Waagen</u>	
Waage Kern	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Waage Sartorius Typ 2254	Sartorius (Göttingen, Deutschland) Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Analysewaage Typ 2492

Wasserbäder

GFL-Wasserbad Typ 1003

GFL (Burgwedel, Deutschland)

VakuumpumpeWOB-L PRES/Vac-Dry
Pump2Welch (Wisconsin, USA)
ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH
(Marktrechwitz, Deutschland)Vortexer

Top Mix 11118

Fisher Bioblock Scientific
(Illkirch-graffenstaden, Frankreich)

Vortex Genie

Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)

2.1.3. Software und Datenbanken

Software	Hersteller-Firma	Anwendung
Taq-Man Software	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	Real-Time-PCR
Sequencing analysis	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	Sequenzierung
Seq-Pilot	JSI Medical Systems GmbH (Kippenheim, Deutschland)	Auswertung Patientensequenzierung
Edit Seq	DNASar (Madison, USA)	Klonierung
SeqMan	DNASar (Madison, USA)	Klonierung
NebCutter V2.0	New England Biolabs	Analyse von Restriktionsschnittstellen in spezifischen Sequenzen
NCBI-Blast (versch.)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Analyse von Sequenzen
Oligo Calculator	http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html	Primerberechnung
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html	Genomdatenbank
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19	Genomdatenbank
Mutation Tasting	http://www.mutationtaster.org/	<i>In-silico</i> -Analyse von Mutationen
PolyPhen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/	<i>In-silico</i> -Analyse von Mutationen
PIP-Human Protein-Protein Interaction Prediction	http://www.compbio.dundee.ac.uk/	<i>In-silico</i> -Analyse von Protein-Protein- Interaktionen

Expsy Tools	http://expasy.org/tools/	<i>In-silico</i> Analysen
Gene regulation.com	http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html	<i>In-silico</i> Analysen zur Identifizierung von Promotoren
Protein Calculator v3.3	http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html	Berechnung des Molekulargewichtes von Proteinen
Progenesis Same Spots	Nonlinear Dynamics (Newcastle, UK)	Auswertung 2D-Gelelektrophorese
PRSS3	http://www.ch.embnet.org/software/PRSS_for_m.html	Proteinsequenz- <i>In-silico</i> Analysen-Alignment

2.1.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller-Firma	Anwendung
mouse-monoklonal α -FLAG M2	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)	Western Blot
rabbit-polyklonal α -GFP (ab290)	Abcam (Cambridge, UK)	Western Blot
rabbit-polyklonal α -NIPBL	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)	Western Blot, Immunpräzipitation
rat-monoklonal α -NIPBL KT55	Absea (Beijing, China)	Western Blot Immunpräzipitation, Immunhistochemie
rabbit-polyklonal α -Sccl4	Abcam (Cambridge, UK)	Western Blot, Immunpräzipitation, Immunhistochemie
mouse-monoklonal α -c-Myc (Myc.A7)-HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	Western Blot
mouse-monoklonal α -c-Myc HRP-konjugiert	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Deutschland)	Western Blot, Immunpräzipitation
mouse-monoklonal- α -Gal4 DNA-BD	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)	Western Blot
mouse-monoklonal- α -Gal4 DNA-BD	Abcam (Cambridge, UK)	Western Blot)
rabbit-polyklonal- α -Sin3A	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	Western Blot, Immunpräzipitation
goat- α -rabbit IgG-HRP	Thermo Scientific (Rockford, USA)	Western Blot
goat- α -rat IgG-HRP	Thermo Scientific (Rockford, USA)	Western Blot

goat- α -mouse IgG-HRP	Thermo Scientific (Rockford, USA)	Western Blot
mouse-polyklonal- α -Penta HIS		Western Blot
Rabbit-polyklonal- α -NFkB	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	Western Blot
Rabbit- α -rat IgG-Alexa Fluor488	Molecular Probes (Leiden, Netherlands)	Immunhistochemie
α -rabbit IgG-Alexa Fluor555	Molecular Probes (Leiden, Netherlands)	Immunhistochemie

2.1.5. Enzyme

Enzym	Hersteller-Firma	Anwendung
Taq-DNA-Polymerase	MP Biomedicals, LLC (Illkirch, Frankreich)	PCR, Klonierung, Sequenzierung
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen (Hamburg, Deutschland)	PCR, Klonierung
Expand Long Range dNTPack	Roche (Mannheim, Deutschland)	PCR, Klonierung
GC Rich	Roche (Mannheim, Deutschland)	PCR, Klonierung Sequenzierung
High Fidelity-Platinum	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	PCR, Klonierung
Phusion-DNA-Polymerase	Fermentas/ThermoFisher (St. Leon-Rot, Deutschland)	PCR, Klonierung
High-Fidelity-DNA- Polymerase	Fermentas/ThermoFisher (St. Leon-Rot, Deutschland)	PCR, Klonierung
ExoSAP	GE Healthcare (München, Deutschland)	Aufreinigung von PCR- Produkten
T4 Ligase	Roche (Mannheim, Deutschland)	Klonierung
Fast Digest Enzyme	Fermentas/ThermoFisher (St. Leon-Rot, Deutschland)	Klonierung
Trypsin	Serva	Zellkultur
RNase A	Qiagen (Hamburg, Deutschland)	Plasmid-Präparation

2.1.6. Kits

Kit	Hersteller-Firma	Anwendung
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen (Hamburg, Deutschland)	DNA Extraktion
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen (Hamburg, Deutschland)	Sequenzierung, DNA Extraktion

pGEM-T-easy-Vector System	Promega (Mannheim, Deutschland)	Klonierung,
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	Taqman, qPCR
SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	cDNA-Synthese
Pure Yield Plasmid-Midiprep-System	Promega (Mannheim, Deutschland)	Plasmidpräparation
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega (Mannheim, Deutschland)	Genreporter Assay
QuikChange Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Santa Clara, USA)	PCR, Klonierung, Mutagenese
ReadyPrep Clean up Kit	BioRad (München, Deutschland)	Aufreinigung von Proteinen
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hamburg, Deutschland)	RNA-Isolierung
SuperSignal West Femto/Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)	Western Blot-ECL
BigDye ® Terminator v. 1.1/ 3.1	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	Sequenzierung

2.1.7. Standards

Standard	Hersteller-Firma	Anwendung
Hyperladder I	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)	DNA-Marker
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	DNA-Marker
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas/ThermoFisher (St. Leon-Rot, Deutschland)	Protein-Marker

2.1.8. Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller-Firma	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	200 µg/ml
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)	70 µg/ml
Antibiotic-Antimycotic Solution	PAA (Pasching, Austria)	10 ml/l

2.1.9. Primer

Die verwendeten Primer wurden in der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert und zur Klonierung, sowie Mutagenese und Sequenzierung eingesetzt. Auf Grund der hohen Anzahl sind diese im Material und Methoden Teil nicht aufgeführt.

2.1.10. Vektoren

Vektor	Hersteller-Firma	Anwendung
pGEM-T-easy-Vector	Promega (Mannheim, Deutschland)	Klonierung,
pGL4.10[<i>luc2</i>]	Promega (Mannheim, Deutschland)	Luciferase-Assay
pGL4.74[<i>hRluc/TK</i>]	Promega (Mannheim, Deutschland)	Luciferase-Assay
pGL4.23[<i>luc2/minP</i>]	Promega (Mannheim, Deutschland)	Luciferase-Assay
pcDNA-3.1(A,B,C)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	Immunpräzipitation
pFLAG	Stratagene (Santa Clara, USA)	Immunpräzipitation
pEGFP-N3	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)	Genreporter-Assay Immunpräzipitation
pCMV-AD/BD	Stratagene (Santa Clara, USA)	Mammalian-Two-Hybrid
pFR-Luc	Stratagene (Santa Clara, USA)	Mammalian-Two-Hybrid
pBD-NF- κ B	Stratagene (Santa Clara, USA)	Mammalian-Two-Hybrid
pBD-p53	Stratagene (Santa Clara, USA)	Mammalian-Two-Hybrid
pAD-SV40T	Stratagene (Santa Clara, USA)	Mammalian-Two-Hybrid
pAD-TRAF	Stratagene (Santa Clara, USA)	Mammalian-Two-Hybrid
pGBKT7	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)	Yeast-Two-Hybrid
pGADT7	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)	Yeast-Two-Hybrid

2.1.11. Bakterienstämme

DH5 α

F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(*r_K⁻ m_K⁺*), λ -

C600

F⁻ *supE44 LacY1 thr-1 leuB6 mcrA thi-1 rfbD1 fhuA21 labmda-*

2.1.12. Hefestämme

AH109

MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*,
gal4Δ, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*,
GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, *MEL1*

2.1.13. Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in DMEM-Medium High Glucose (Invitrogen) kultiviert.

HeLa

epithelial-ähnliche Zelllinie aus humanem Zervix Karzinom, weiblich ^{118,141}

HEK293

fibroblastoide Zelllinie aus humaner, embryonaler Niere ⁵¹

U2OS

humane Zelllinie aus dem Osteosarcom, weiblich ⁶⁴

SH-SY5Y

epitheliale/ neuronale Zelllinie aus humanem Neuroblastom, weiblich

Für die Kultivierung war eine FBS-Konzentration von 15 % in Kulturmedium erforderlich ¹³

HEP-G2

epithelial-ähnliche Zelllinie aus humanem hepatozellulärem Karzinom ²

OVCAR

epitheliale Zelllinie aus humanem Adenokarzinom, weiblich

Lymphoblastoide Zelllinien

Zelllinien, die aus Patientenblut hergestellt wurden. Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS und 1 % Antibiotikum kultiviert.

2.1.14. Lösungen, Medien und Puffer

Chemikalie	Arbeitskonzentration
2.1.14.1. Agarosegelelektrophorese	
Agarosegele	
Agarosegel in 1x TBE-Puffer	1 % (w/v) + 0,33 µg/ ml EtBr
Agarosegel in 1x TBE-Puffer	2 % (w/v) + 0,33 µg/ ml EtBr
TBE Puffer	
Tris-Base	445 mM
Borsäure	445 mM
EDTA	10 mM

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,1 %
Xylen Cyanol	0,1 %
Glyzerin	25 %
EDTA	10 mM
H ₂ O dest.	

2.1.14.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**Polyacrylamidgele**

Trenngel	8 %	10 %	12 %	15 %
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
AA/BA 30 %	2,8 ml	3,33 ml	4,2 ml	5,0 ml
H ₂ O	4,6 ml	4,0 ml	3,2 ml	2,4 ml
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Sammelgel	4 %			
Sammelgel-Puffer	1,25 ml			
AA/BA 30 %	0,65 ml			
H ₂ O	3,1 ml			
10 % APS	75 µl			
TEMED	7,5 µl			

10 x SDS-Laufpuffer

Glycin	2 M
Tris-Base	1,25 M
SDS	1 % (w/v)

4 x SDS-Trenngelpuffer

Tris-Base pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

4 x SDS-Sammelgelpuffer

Tris-Base pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

4 x SDS-Probenpuffer (U. K. Laemmli-1970, Nature 277)

Tris-Base pH 6,8	62 mM
SDS	2 % (w/v)
Glyzerin	10 % (w/v)
DTT	5 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)

2D-Probenpuffer

Urea	7 M
Thiourea	2 M
CHAPS	4 % (w/v)
DTT	40 mM

Refraction 2D Lysis Buffer

Tris	30 mM
Urea	7 M
Thiourea	2 M
CHAPS	4 % (w/v)

Coomassie-Färbelösung

Ethanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Coomassie R250	0,75 mM
Entfärbelösung Coomassie	
Methanol	30 % (v/v)
Kolloidale Coomassie-Färbelösung	
Comassie-G250	0,02 % (w/v)
Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat	5 % (w/v)
Ethanol	10 % (v/v)
ortho-Phosphorsäure	2 % (v/v)
Entfärbelösung kolloidales Coomassie	
Ethanol	10 % (v/v)
ortho-Phosphorsäure	2 % (v/v)

2.1.14.3. Medien

Bakterienmedien

LB-Medium (Vollmedium)

Trypton Peptone	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	20 g/l

Φ-Medium

Hefe-Extrakt	5 g/l
MgSO ₄	5 g/l

pH 7,6 mit 1 M KOH eingestellt

Hefemedien

YPD Medium (Vollmedium)

Hefe-Extrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glucose (Zugabe nach Autoklavieren)	20 g/l

SD-Medium (Selektionsmedium für Yeast-two-Hybrid)

Yeast-Nitrogen-Base w/o aa (ohne Aminosäuren)	6,7 g/l
10 x Dropout Solution (-4/-2 SD) (Zugabe nach Autoklavieren)	1 x
Glucose (Zugabe nach Autoklavieren)	20 g/l

Dropout Solutions

-Leu/-Trp DO Supplement (-2 SD)	6,4 g/l
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (-4 SD)	6,0 g/l

Kultur-Agarplatten

LB-Medium + Agar

X-Gal (in Dimethylformamid)	40 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	35 µg/ml

YPD-full-Medium + Agar

	20 g/l
--	--------

SD-Medium + Agar

20 g/l

Zellkulturmedien und - Puffer

DMEM 101

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	1 x
FBS	10 %
Antibiotic/ Antimycotic Solution	1 %

RPMI-Medium

RPMI 1640-Medium	1 x
FBS	10 %

Antibiotic/ Antimycotic Solution	1 %
Einfriermedium	
DMEM 101	80 % (v/v)
DMSO	20 % (v/v)
Trypsin/ EDTA (in PBS)	
Trypsin	40 g/ l
EDTA	0,7 mM
PBS	
NaCl	137 mM
KCl	2,6 mM
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
2.1.14.4. DNA-Extraktion	
Minipräparation-Puffer 1	
EDTA	10 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
RNase	100 µg/ ml
Minipräparation-Puffer 2	
NaOH	0,2 M
SDS	1 %
Minipräparation-Puffer 3	
CH ₃ COO-K	3 M
pH 5,5 (CH ₃ COOH)	
2.1.14.5. Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen (<i>Escherichia coli</i>)	
Tfbl-Lösung	
CH ₃ COO-K	30 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glyzerin	15 % (v/v)
pH 5,8 (mit 0,2 M Essigsäure eingestellt)	
Tfbll-Lösung	
MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	10 mM
Glyzerin	15 % (v/v)
pH 6,5 (mit 1 M KOH eingestellt)	
2.1.14.6. Transformation von Hefen	
TE/ Lithiumacetat	
TE-Puffer	10 mM
LiAc	100 mM
pH 7,5 mit verdünnter Essigsäure eingestellt	
50 % Polyethylenglycol 4000	
TE-Puffer	10 mM
LiAc	100 mM
Polyethylenglycol 4000 in H ₂ O	50 % (w/v)
Z-Puffer (β-Galaktosidase-Assay)	
Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
β-Mercaptoethanol	0,027 % (v/v)

2.1.14.7. Zellaufschluss

RadiolimmunoPräzitation-Assay- (RIPA) Puffer

HEPES	50 mM
EDTA	1 mM
Nonidet-P40 (NP40)	1 %
LiCl	0,5 mM
pH 7,6 (mit NaOH eingestellt)	

2.1.14.8 Puffer in der Proteinchemie

Wet Blot-Transferpuffer

Glycin	192 mM
Tris-Base	25 mM

Semi-Dry-Transferpuffer

Tris-Base	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,05 %
Methanol	20 % (v/v)

Co-Immunpräzitation-Waschpuffer

Tris-Base pH 7,5	10 mM
NaCl	200 mM
Tween 20	0,05 %

Immunfluoreszenz-Equilibrierungspuffer

Tris-Base pH 7,5	10 mM
NaCl	100 mM
Tween20	0,05 %
BSA	1 %

Immunfluoreszenz-Waschpuffer

PBS	1 x
Tween 20	0,05 %
BSA	1 %

Equilibrierungspuffer

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,05 %
BSA	1 % (w/v)

2.1.14.9. Calciumphosphat-Transfektion

2 x HBS

HEPES pH 7,05	50 mM
NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	1,5 mM
Glucose	12 mM

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung des *E.coli*-Stammes *DH5alpha*

Die *E.coli*-Bakterien des Stammes *DH5alpha* wurden entweder in LB-Flüssigmedium angeimpft oder auf LB-Agarplatten ausgestrichen und anschließend für circa 16 Stunden bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 37°C inkubiert. Das Wachstum der Flüssigkulturen erfolgte im Schüttelinkubator bei einer Umdrehungszahl von 220 rpm. Als Selektionsmarker wurden dabei je nach Vektorresistenzgen entweder Ampicillin oder Kanamycin eingesetzt. (Arbeitskonzentrationen: siehe 2.1.8.)

2.2.1.2. Über-Nacht-Kulturen (ÜN ~) von *E.coli*

Zur Identifizierung positiver Transformanten bei der Klonierung wurden Flüssigkulturen von einzelnen Klonen für die anschließende Plasmidpräparation angelegt. Dazu wurden 3 ml LB-Flüssigmedium mit einem entsprechenden Volumen an Antibiotikum versetzt und einzelne Klone steril mit einem Zahnstocher inokuliert. Zur Amplifizierung verschiedener Expressionsplasmide für eine anschließende Plasmid-Midi-Präparation wurden 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum versetzt und mit circa 500 µl (1:200) einer ÜN-Kultur des entsprechenden, positiven Klons angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht, bzw. zwischen sechs und 16 Stunden bei 37°C und 220 rpm.

2.2.1.3. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien (*E.coli*)

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode angewandt¹³². Dazu wurden zunächst die jeweiligen Bakterien auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Inokulieren einiger Klone in 20 ml ϕ-Medium und das anschließende Wachstum bei 37 °C für circa zwei Stunden, bis eine optische Dichte der Vorkultur (OD bei 600 nm) von 0,3 gemessen wurde. Im nächsten Schritt wurden 200 ml vorgewärmtes ϕ-Medium mit 10 ml der entsprechenden Vorkultur angeimpft und für etwa drei bis vier Stunden bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm den Zielwert von 0,48 erreicht hat. Nach dem Abzentrifugieren der Kultur bei 4 °C und 3000 rpm für 15 Minuten erfolgte das Waschen mit 20 ml kaltem Tfb I-Puffer für 90 Minuten auf Eis und daraufhin eine erneute Zentrifugation der Kultur bei 4 °C. Im Anschluss wurden die einzelnen Zellpellets in 2 ml kaltem Tfb II-Puffer resuspendiert und in 50 µl Aliquots in Reaktionsgefäße pipettiert. Die kompetenten Zellen wurden in Flüssigstickstoff schock-gefroren und dann bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Die Transformation wurde nach der Methode von Cohen *et al.*^{27,61} durchgeführt. Dazu wurden 50 µl der chemisch-kompetenten Zellen (siehe 2.2.1.3.) auf Eis aufgetaut und

vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA, dessen Volumen je nach Fragestellung und Konzentration 1-5 µl betrug. Für die Anlagerung der DNA an die Zellwand der Bakterien wurden die Zellen mit der DNA für circa 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der darauffolgende Hitzeschock bei 42 °C für zwei Minuten induzierte eine „Porenbildung“ in der Zellmembran, so dass die DNA in die Zelle aufgenommen werden konnte. Ein anschließendes kurzes Inkubieren auf Eis führte zur Schließung der entstandenen „Poren“. Durch Zugabe von 450 µl LB-Medium und einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator, wurde der entsprechende Selektionsmarker (β -Lactamase Neomycin-Phosphotransferase-NptII), zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz, exprimiert, so dass nach dem anschließenden Ausplattieren nur ein Wachstum der transformierten Bakterien auf den Antibiotika-behandelten LB-Agarplatten möglich war. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

2.2.1.5. Kultivierung des Hefe-Stammes AH109

Die Kultivierung von AH109 erfolgte auf YPD-Vollmedium-Agarplatten bei 30 °C meist über mehrere Tage. Für die Hefetransformation oder den Liquid-Assay wurden die Hefen in Voll- oder SD-Mangel-Flüssigmedium (siehe 2.1.14.3.) kultiviert.

2.2.1.6. Transformation des Hefe-Stammes AH109

Die Transformation der Hefen wurde nach der Methode von Schiestl und Gietz (1989)¹¹⁹ durchgeführt. Dazu wurde eine Vollmedium (YPD *full*) –Kultur angelegt und diese bei 30 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator für ein bis zwei Tage inkubiert. Für die Transformation wurden im Anschluss daran 4 ml der Vorkultur in 50 ml vorgewärmten YPD-Voll-Medium inokuliert und bei 30 °C und 220 rpm inkubiert, bis eine deutliche Trübung der Kultur zu erkennen war. Daraufhin erfolgte die Aufarbeitung der Hefezellen für die Transformation. Dazu wurde die Kultur bei 3000 rpm für fünf Minuten pelletiert, dann jeweils mit 20 ml sterilem, destilliertem Wasser ,1 ml einfachem TE-Puffer und 1 ml frisch angesetzttem TE-Lithiumacetat-Puffer (TE/LiAc) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation der Hefezellen erfolgte dann die Resuspension in 250-300 µl TE/LiAc. Für den Transformationsansatz wurden 5 µl denaturierte Lachsspermien-DNA, welche als Carrier für die Plasmid-DNA dient, 300 µl PEG40 und 1-2 µg Plasmid-DNA zusammen gegeben. Nach dem vorsichtigem Invertieren der Reaktionsgefäße folgte eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank bei 30 °C. Für die Aufnahme der DNA in die Zellen wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 Minuten durchgeführt. Nach Inkubation des Transformationsansatzes auf Eis für zwei Minuten, wurde dieser auf je zwei Platten -2 SD-Medium (Mangelmedium – siehe 2.1.14.3.) ausplattiert und bei 30 °C für 2-5 Tage kultiviert.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung von humanen Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte wie in Abschnitt 2.1.13. beschrieben in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) mit 10 % FBS und 1 % Antibiotikum in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Das Wachstum der einzelnen Zelllinien wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle drei Tage je nach Wachstum in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:9 (Zellsuspension : Medium). Meist wurden für die Kultivierung der Zellen 75 cm²-Zellkulturflaschen verwendet. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (75 cm²: 1,5 ml einer 0,1 % Trypsin/EDTA-Lösung- siehe 2.1.14.3.) eingesetzt.

2.2.2.2. Einfrieren von humanen Zellen

Zur Aufbewahrung von humane Zellen wurden diese in 145 cm-Gewebekulturschalen (Sarstedt) ausgesät. Beim Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Plattenboden gelöst und danach 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 500 µl Medium resuspendiert und in ein Cryoröhrchen (Nunc) mit 500 µl vorgelegtem Medium-DMSO-Gemisch (10:1) überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte schrittweise in einem Styroporbehälter bei -80 °C. Nach 24 Stunden wurden die Cryokulturen dann in Flüssigstickstoff für eine längerfristige Aufbewahrung der Zellen überführt.

2.2.2.3. Auftauen von humanen Zellen

Die in Flüssigstickstoff gelagerten humanen Zellen (Cryokulturen) wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in 20 ml Medium überführt, um das DMSO zu entfernen. Nach einem Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 1500 rpm wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Wechsel des Mediums.

2.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld) verwendet. Dabei wurden die Zellen 1:1 mit 0,4 %igen Trypanblau-Lösung gemischt (Verdünnungsfaktor 2) und anschließend auf die Zählkammer pipettiert. Insgesamt wurden die Zellen in 4 großen Quadraten gezählt und die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat berechnet. Die Zellzahl pro ml wurde nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ ml} = (\text{durchschnittliche Zellzahl/ Quadrat}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2.5. Transfektion von humanen Zellen für die transiente Expression von Proteinen

Transfektion mittels Lipid-DNA-Komplexierung (Lipofektion)

Bei der Lipofektion kommen kationische Lipide zum Einsatz, die mit Plasmiden DNA-Lipid-Komplexe bilden, die dann von den Zellen endozytotisch aufgenommen werden ⁴¹. Es

wurden verschiedene Transfektionsreagenzien wie z.B. FuGENE (Promega), Lipofectamin (Invitrogen), als auch X-treme Gene (Roche) für diese Methode eingesetzt. Für die Transfektion wurden 24 Stunden zuvor Zellen auf 100- oder 145 cm² Gewebekulturschalen so ausgesät, dass sich die Zellen bei der Transfektion innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Für quantitative Assays wurde stets eine bestimmte Anzahl an Zellen ausgesät. (siehe Luciferase- und M2H-Assay) Zur Bildung der Lipid-DNA-Komplexe wurden die Plasmide mit dem Transfektionsreagenz im Verhältnis 2:3 in FBS-freiem Medium zusammengegeben und für circa 25 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für große Kulturschalen (145 cm²) lag das Volumen des Transfektionsansatzes bei 1000 µl, für kleinere (100 cm²) bei 500 µl. Dabei wurden stets 20 µl, bzw. 10 µl Transfektionsreagenz eingesetzt. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen, erfolgte ein Mediumwechsel. Bei dieser Transfektionsmethode wurde das Medium DMEM mit 10 % FBS und 1 % Antibiotikum für die Kultivierung der transfizierten Zellen verwendet. Das Ernten der Zellen erfolgte meist 24 bis 48 Stunden nach Transfektion.

Transfektion von humanen Zellen mittels Elektroporation

Bei dieser Transfektionsmethode wird die Zellmembran durch Anlegen eines elektrischen Feldes permeabilisiert, so dass die Plasmid-DNA von der Zelle aufgenommen werden kann¹⁰³. Dazu wurden Zellen in großen Gewebekulturschalen 24 Stunden vor Transfektion so ausgesät, dass sich diese am nächsten Tag in der späten exponentiellen Phase befanden. Für die Transfektion wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 200 µl FBS-freiem Medium resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette (BioRad) überführt, in der die Plasmid-DNA (0,5-5 µg) bereits vorgelegt war. Im Anschluss erfolgte die Elektroporation mit dem Genepulser (BioRad) mit einem entsprechend der zu transfizierenden Zelllinie entwickeltem Protokoll. Meist erfolgte die Elektroporation bei einer Spannung von 75 V für circa 10 ms. Nach dem Anlegen der Spannung wurden die Zellen noch einmal resuspendiert und in eine neue Gewebekulturschale überführt. Das Ernten der Zellen erfolgte meist 24 bis 48 Stunden nach Transfektion.

Calcium-Phosphat-Transfektion

Diese Methode zur Transfektion von Zellen wurde nach dem Prinzip von Frank Graham und Alex van der Eb⁵² durchgeführt. Dabei wird die Formierung von Calciumphosphat und DNA zu unlöslichen und somit präzipitierbaren Komplexen ausgenutzt, die sich dann an die Zellmembran lagern und mittels Endozytose aufgenommen werden. Zur Durchführung der Transfektion wurden die Zellen in großen Gewebekulturplatten so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 80-85 % erreicht hatten. Eine Stunde bevor die Calcium-Phosphat-DNA-Copräzipitate zugegeben wurden, erfolgte ein Mediumwechsel in DMEM ohne Serum oder Antibiotikum. In einem 15 ml-Falcon-Tube wurde die DNA, meist 30 µg Plasmid, vorgelegt und 62,3 µl einer zwei molaren Calciumchlorid-Lösung, sowie 2,5 mM

HEPES (pH 7,13) auf ein Volumen von 500 µl zugegeben. Unter ständigem Schütteln erfolgte das sehr langsame Zutropfen der DNA-Calciumchlorid-Lösung in die vorgelegte 2 x HBS-Lösung ((siehe 2.1.14.9). Zur Ausbildung der Präzipitate folgte eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel zu DMEM mit Serum und Antibiotikum durchgeführt. Die Inkubation erfolgte dann für 24 Stunden bei 37 °C.

2.2.2.6. Precocious sister chromatid separation - Assay (PSCS - Assay)

Dieser Assay wurde zur Darstellung der Schwesterchromatidenpaarung in der Metaphase verwendet, um den Effekt spezifischer Mutationen auf die Schwesterchromatidpaarung zu charakterisieren. Hierzu wurden lymphoblastoide Zellen, die aus Patientenblut gewonnen wurden, durch die Zugabe von 0,8 µg/ ml Colchicin (Sigma Aldrich) und einer Inkubation von 20 min bei 37 °C, in der Metaphase arretiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Zellen mit hypotonischer 0,075 M KCl-Lösung und eine Fixierung mit Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1. Die Chromosomen wurden mit Wright's Stain (Fisher Scientific) gefärbt und die Metaphasen unter dem Mikroskop untersucht. Bei der Begutachtung von mindestens 50 Metaphasenchromosomen wurde eine Schwesterchromatidentrennung befunden, wenn keine Verbindung am Centromer bestand. Zur Auswertung wurden insgesamt 15 Mitosen ausgezählt.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten wurden je nach Versuchsansatz verschiedene Polymerasen und Oligonukleotide (Primer) verwendet. Eine Optimierung der PCR erfolgte über die Variation der *Template*-DNA-Menge, der *Annealing*-Temperatur, der Elongationszeit oder der Zyklenzahl.

PCR mittels *Taq*-Polymerase

Zur Amplifizierung von kurzen (bis 1,5 kb) DNA-Abschnitten wurde die PCR mit einer hitzebeständigen *Taq*-DNA-Polymerase (Q-Biogene, MP Biomedicals oder Qiagen) durchgeführt. Diese Methode wurde vorzugsweise zur Klonierung von DNA-Fragmenten und für die Sequenzierung eingesetzt.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [μ l]
10 x Reaktionspuffer	1 x	2,5
dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,5
Vorwärts-Primer	0,4 μ M	0,5
Rückwärts-Primer	0,4 μ M	0,5
<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 U	0,25
DNA	50 ng	
H ₂ O		ad 25 μ l

Temperatur	Zeit	
96 °C	3 min	
96 °C	30 s	Zyklen 25-35
45-65 °C	30 s	
68/72 °C	1 min/ kb	
72 °C	7 min	

PCR mittels *Expand-Long-Range* DNA-Polymerase (Roche)

Die *Expand-Long-Range* DNA-Polymerase wurde für die Amplifizierung von sehr großen (ab 2 kb) DNA-Fragmenten genutzt. Diese Polymerase beschreibt eigentlich ein Gemisch einer *Taq*-Polymerase und einer weiteren Polymerase, welche eine Exonuklease-*proofreading*-Aktivität aufweist, so dass Fehler im Prozess der Amplifikation deutlich reduziert werden. Diese Methode wurde meist bei Klonierung von längeren DNA-Fragmenten (wie beispielsweise von vollständigen kodierenden Regionen spezifischer Gene) eingesetzt.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [μ l]
5 x Reaktionspuffer	1 x	10
dNTP (10 mM)	0,2 mM	2,5
Vorwärts-Primer	3 μ M	0,75
Rückwärts-Primer	3 μ M	0,75
DMSO		3
DNA-Polymerase-Mix	1,75 U	0,7
DNA	50 ng	
H ₂ O		ad 50 μ l

Temperatur	Zeit	
92 °C	2 min	
92 °C	10 s	Zyklen 10
45-65 °C	15 s	
68/72 °C	1 kb/ min	
92 °C	10 s	
45-65 °C	15 s	Zyklen 15-25
68/72 °C	1 kb/ min + 20 s	
68/72 °C	7 min	

PCR mit dem GC-rich Kit (Roche)

Diese DNA-Polymerase wurde zur Amplifizierung von GC-reichen Zielregionen (wie beispielsweise Promotorregionen eines Gens) eingesetzt. Auch diese DNA-Polymerase ist ein Gemisch, bestehend aus einer *Taq*- und einer *Tgo*-DNA-Polymerase, die zusätzlich eine Exonuklease-*proofreading*-Aktivität besitzt. Diese Methode wurde ebenfalls zur Klonierung von verschiedenen DNA-Fragmenten und zur Sequenzierung eingesetzt.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [µl]
5 x Reaktionspuffer	1 x	2
dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,2
Vorwärts-Primer	1,25 µM	0,4
Rückwärts-Primer	1,25 µM	0,4
GC RICH Resolution solution		1
DNA-Polymerase-Mix	0,1 U	0,05
DNA	50 ng	
H ₂ O		ad 10 µl

Temperatur	Zeit	
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	Zyklen 10
45-65 °C	30 s	
68/72 °C	1 min/kb	
95 °C	30 s	
45-65 °C	30 s	Zyklen 20-25
68/72 °C	1 min/kb	
68/72 °C	7 min	

Mutagenese PCR

Diese Methode wurde angewandt, um Mutationen die bei Patienten identifiziert wurden, in ein entsprechendes Plasmidkonstrukt einzufügen. Die Durchführung der Mutagenese PCR erfolgte mit dem QuikChange Site directed Mutagenesis Kit von Stratagene gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [μ l]
10 x Reaktionspuffer	1 x	5
dNTP		1
Vorwärts-Primer	0,4 μ M	0,6
Rückwärts-Primer	0,4 μ M	0,6
<i>Pfu</i> -Polymerase	2,5 U	1
Plasmid-DNA	50 ng	
H ₂ O		ad 50 μ l

Temperatur	Zeit	
95 °C	30 s	Zyklen 12-18
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	
68 °C	1 min/kb	

Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde 1 μ l des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *DpnI* zur Spaltung der methylierten Template-DNA zum PCR-Ansatz gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Somit wird die Selektion der Mutation-tragenden, synthetisierten Plasmide von dem Template-Plasmid ermöglicht. Danach wurden 1-10 μ l des Mutagenese-Ansatzes zur Transformation von DH5 α Bakterien eingesetzt. Zur Identifizierung positiver Transformanten wurden ÜN-Kulturen hergestellt und diese, wie in 2.2.3.2. beschrieben, mit entsprechenden Primern sequenziert.

2.2.3.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mittels der Didesoxymethode nach Sanger.¹¹⁷ Dabei werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPS) in eine PCR eingesetzt, die aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Gruppe, eine Verlängerung des Synthesestranges durch die DNA-Polymerase verhindern. Daher wird diese Methode auch als Kettenabbruch-Methode bezeichnet. Über eine Kapillarelektrophorese werden die Abbruchfragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und die Farbstoffe mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt, die dann wiederum von einem Detektor erkannt und später analysiert werden. Anhand des erhaltenen Elektropherogramms kann man die Sequenz der Nukleotide direkt bestimmen.

Sequenzierung von Patienten-DNA

Zur Identifizierung von Mutationen bei Patienten mit CdLS wurde die Sequenzierung nach Sanger durchgeführt, bei der zunächst die zu analysierenden Genregionen mittels PCR (siehe 2.2.3.1.) amplifiziert und die Produkte anschließend über eine Agarosegelelektrophorese mit dem *Low Mass Ladder* als DNA-Marker auf Spezifität und Produktmenge überprüft wurden. Zur Entfernung von Komponenten aus dem PCR-Ansatzes, die die Sequenzierung stören, wie nicht eingebaute Primer oder dNTPs, erfolgte im Anschluss ein enzymatischer Verdau mit ExoSAP (GE Healthcare). Dabei wurden 5 µl (100 ng) des PCR-Produktes und 2 µl ExoSAP zusammen pipettiert und 15 Minuten bei 37 °C und danach 15 Minuten bei 80 °C inkubiert. Im Anschluss daran folgte die Sequenz-PCR, die in den folgenden Tabellen beschrieben ist.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [µl]
Sequenzierpuffer	1 x	1,5
BigDye ® Terminator v. 1.1/ 3.1 (Applied Biosystems)	1 x	0,5
Sequenzierprimer		0,5
DNA	~ 20 ng	1-3
H ₂ O		ad 10 µl

Temperatur	Zeit	
96 °C	1 min	Zyklen 25
96 °C	10 s	
48-55 °C	5 s	
60 °C	1 min	

Die Produkte der Sequenz-PCR wurden danach, wie in Abschnitt 2.2.3.4. beschrieben aufgereinigt und 15 µl davon mit 5 µl Formamid (HiDi-Formamid-Applied Biosystems) zur Sequenzierung in eine Messplatte (96-well Optical Reaction Plate, Applied Biosystems) überführt. Die Messung mit dem 3130X/Genetic Analyzer (Applied Biosystems) erfolgte dann je nach PCR-Produkt zwischen 6 und 45 Sekunden. Die Auswertung erfolgte mit der Software Sequence Analysis (Applied Biosystems) oder mit dem Programm SeqPilot (JSI Medical Systems).

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Auch zur Kontrolle von Klonierungen, PCR-basierten Mutagenesen etc. wurde die bereits beschriebene Sequenzierungs-Methode angewandt. Hierbei wurde die extrahierte Plasmid-DNA direkt in die Sequenzreaktion eingesetzt. Zuvor erfolgte anhand des Restriktionsprofils der Plasmide eine Abschätzung der DNA-Menge. Die Sequenz-PCR wurde wie folgt angesetzt:

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [μ l]
Sequenzierpuffer	1 x	1,0
BigDye ® Terminator v. 1.1/ 3.1	1 x	2,0
Sequenzierprimer		1,0
DNA	~ 20 ng	1-3
H ₂ O		ad 10 μ l

Wie bei der Sequenzierung von genomischer DNA wurde das beschriebene Thermocycler-Programm verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte und die Messung mit dem 3130X/Genetic Analyzer erfolgten wie zuvor beschrieben. Eine Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen SeqMan und EditSeq (DNASTar), bei der die sequenzierten Basen mit einer Referenzsequenz verglichen wurden.

2.2.3.3. Agarosegelelektrophorese

Diese Methode wurde zur Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Molekülen als Kontrolle von PCR-Produkten und Spaltprodukten nach einem Restriktionsverdau eingesetzt. Dabei werden die DNA-Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld aufgetrennt. Bei der Kontrolle von PCR-Produkten wurde DNA-Ladepuffer (siehe 2.1.7.) im Verhältnis 1:3 zugegeben. Spaltprodukte hingegen waren in einem speziellen Puffer (green buffer-Fermentas), so dass diese direkt auf das Gel geladen werden konnten. Für die Auftrennung wurden meist 1 %-ige Agarosegele (ab 300 bp) verwendet, die 0,33 μ g/ ml des in DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid enthielten. Die Elektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente 20 bis 90 Minuten bei 120 mV, unter Verwendung der Elektrophoresekammern von Amersham, durchgeführt. Dabei wurde die *Hyper ladder* von Bioline als DNA-Marker verwendet. Die Darstellung der DNA-Moleküle erfolgte auf einem UV-Tisch mit Hilfe der CCD Black and White Video Camera von SONY. Mit UV-Licht wurde das Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt und die DNA-Banden photographisch dokumentiert.

2.2.3.4. DNA-Extraktionen

Plasmid-Mini-Präparation

Die Präparation von Plasmiden aus transformierten *E.coli* wurde mit den Puffern, wie in Abschnitt 2.1.14.4. beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden dafür 1,5 ml der ÜN-Kultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und anschließend in 300 μ l Puffer 1 resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte die alkalische Lyse mit 300 μ l Puffer 2 für drei Minuten bei Raumtemperatur und die Präzipitation von Proteinen und RNA durch die Zugabe von 300 μ l vorgekühltem Puffer 3. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 10 000 rpm und 4 °C, erfolgte die Überführung des Plasmid-enthaltenden, wässrigen Überstandes in 500 μ l eiskaltes Ethanol, zur Präzipitation der DNA und dann eine erneute Zentrifugation für 20

Minuten bei 13 000 rpm und 4 °C. Als nächstes wurde das DNA-Pellet in 300 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, anschließend in einer SpeedVac getrocknet und in 15 µl destilliertem, endotoxinfreiem Wasser gelöst. Zur Kontrolle positiver Klone wurden die Plasmide im Anschluss mit Restriktionsenzymen gespalten (2.2.3.5.) und danach gegebenenfalls auf das Vorhandensein von Mutationen durch Sequenzierung der Inserts (2.2.3.1.) geprüft.

Plasmid-Midi-Präparation

Expressionsplasmide für spätere funktionelle Analysen wurden mittels Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Dafür wurden 100 ml-Kulturen wie in Abschnitt 2.2.1.2. beschrieben angelegt. Die DNA-Konzentration der isolierten Plasmide wurde anschließend bestimmt. (siehe 2.2.3.7.)

Gelextraktion

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Qiagen-Kit „QIAquick Gel extraction Kit“ nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte je nach DNA-Menge in einem Volumen von 10 bis 20 µl destilliertem Wasser.

Aufreinigung von Vektoren nach einem Restriktionsverdau

Die gespaltenen Vektoren wurden mit Millipore Centrifugal Filter Units (Gelfiltration) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Aufreinigung von Sequenzierproben

Kleinere Mengen an Sequenzierproben wurden mit dem Qiagen „DyeEx 2.0 Spin Kit“ nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei größeren Mengen an Sequenzierproben wurde die Gelfiltration in Multiscreen-Filterplatten (Millipore, Irland) mit Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade (GE Healthcare) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.3.5. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen Typ II spalten doppelsträngige DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz und werden daher u.a. für die Klonierung eingesetzt. Der Ansatz für den Restriktionsverdau enthielt 10 x Restriktionspuffer und 1 Unit Enzym pro 1 µg DNA, sowie entsprechend H₂O. Das Gesamtvolumen für Kontrollrestriktionen (2.2.3.4.) betrug 15 µl, für den enzymatischen Verdau von Vektoren mit anschließender Aufreinigung der gespaltenen DNA 50 µl. Spaltungen, bei denen eine anschließende Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der Spaltprodukte erforderlich war, wurde ein spezieller Restriktionspuffer, „*green restriction buffer*“ (Fermentas), eingesetzt. Der Restriktionsverdau zur Plasmidkontrolle erfolgte 20 min bei 37 °C und 1 h bei Vektorrestriktionen oder Plasmiden, die zur Insertion verdaut wurden.

2.2.3.6. Ligation

TA-Klonierung

Bei der TA-Klonierung wird die Eigenschaft der Taq-Polymerase, ein zusätzliches A-Nukleotid an das 3`Ende des synthetisierten Stranges anzufügen, genutzt. Durch den T-Überhang in der *multiple cloning site* (MCS) des entsprechenden Klonierungsvektors, hier meist pGEM-T *Easy* (Promega-TA-cloning Kit), kann das PCR-Produkt mit seinem A-Überhang in den Vektor inseriert werden. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit einem 10 X Ligasepuffer, 1 Unit T4-Ligase, sowie mit dem Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:5 für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss folgte die Transformation des *E.coli*-Stammes DH5α mit dem Ligationsprodukt (siehe 2.2.1.4.).

Ligation von gespaltenen Vektoren und Inserts zur gerichteten Klonierung

Für die Ligation von bereits sequenzierten Inserts wurden diese und die Expressionsvektoren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und anschließend extrahiert. Die Ligation erfolgte mit 1 Unit der T4-Ligase von Roche in dessen 10 x Reaktionspuffer, sowie Vektor und Insert im Verhältnis 1:5 für eine Stunde bei 17 °C oder über Nacht bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Nach der Inkubation folgte die Transformation des DH5α-*E.coli*-Stammes.

Blunt-End-Ligation

Bei PCR-Produkten, bei denen kein zusätzliches Nukleotid an den synthetisierten Strang angehängt wurde, so genannte Blunt-End-PCR-Produkte, erfolgte die Ligation mit einem TOPO-Vektor (pCRII Blunt-TOPO-Vektor). Für die Ligation wurden 1 µl Salzlösung, Vektor und Insert im Verhältnis 1:5 und entsprechend H₂O zusammengegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Transformation des *E.coli*-Stammes DH5α.

2.2.3.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das Helios Omega UV-Vis Spektrophotometer mit einer Nanoküvette verwendet. Dabei wurden 2 µl der zu messenden DNA eingesetzt und dessen Lichtabsorption bei den Wellenlängen von 280 und 260 nm detektiert. Die Reinheit der DNA-Proben wurde mit dem Quotienten aus der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Dabei sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.3.8. Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die 2-D-Gelelektrophorese musste eine Proteinbestimmung durchgeführt werden. Dies erfolgte mit EZQ Protein Quantitation Kit von Molecular Probes nach dem Herstellerprotokoll. Für die Messung wurde jeweils 1 µl der Proteinlösung eingesetzt und dreifach bestimmt.

Diese Methode wurde im chirurgischen Forschungslabor in der Klinik für Chirurgie von Timo Gemoll an der Universität zu Lübeck durchgeführt.

2.2.3.9. Synthese von cDNA

Das Umschreiben von aus Patientenblut isolierter RNA in cDNA für die folgende Taq-Man-Analyse, erfolgte mit der SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase von Invitrogen nach dem Herstellerprotokoll. Dazu wurden zunächst 500 ng Oligo-dT-Primer, 0,5 mM dNTPs und 1 µg RNA in einem Volumen von 12 µl zusammen pipettiert, bei 65 °C für 5 min erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 x-First-Strand-Puffer, 10 mM DTT und 2 Units RNaseOut und eine Inkubation bei 42 °C für 2 min. Durch das Zufügen von 10 Units SuperScript II RT wurde die cDNA-Synthese bei 42 °C gestartet und nach 50 min durch eine Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 15 min gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde entweder anschließend für den TaqMan-Assay zur Genexpressionskontrolle von *NIPBL* eingesetzt, oder bei -20 °C gelagert.

2.2.3.10. TaqMan Assay

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde der TaqMan-Assay angewandt, einer spezifischeren Methode, als die konservative real-time PCR. Dabei kommen sequenzspezifische Hydrolyse-Sonden zum Einsatz, die komplementär an die Template DNA binden. An diese Sonden sind am 5'-Ende ein Reporterfarbstoff und am 3'-Ende ein Quencher gebunden, so dass die Fluoreszenz des Reporters durch die sterische Nähe der beiden Moleküle inhibiert wird. Im Verlauf der PCR wird der Reporterfarbstoff, durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase von der Sonde entfernt. Dadurch steigt die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes, die dann detektiert werden kann. Die quantitative PCR wurde, wie in den folgenden Tabellen beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde das Gerät 7300 Real-Time PCR System von Applied Biosystems verwendet. Als interne Kontrolle, zur Normalisierung der Messwerte, wurde eine Sonde für die MAP-Kinase1 mitgeführt.

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen [µl]
2 x TaqMan Gene Expression Master Mix	1 x	10
20 x TaqMan Gene Expression Assay (NIPBL-Sonde) oder	1 x	1
20 x TaqMan Gene Expression Assay (Kontroll-MAPK1-Sonde)	1 x	1
cDNA		1
H ₂ O		ad 20 µl

Temperatur	Zeit	
50 °C	2 min	Zyklen 40
95 °C	10 min	
95 °C	15 s	
60 °C	1 min	

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der vom Hersteller ausgelieferten Software (Applied Biosystems) und Microsoft Excel, zur Berechnung der ΔC_T -Werte und der relative Expression.

2.2.4. Proteinchemische Methoden

2.2.4.1. Chemischer Zellaufschluss

Der chemische Zellaufschluss wurde meist bei Säugerzellen angewandt und erfolgte mit dem Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer (RIPA). Dieser Puffer enthält u.a. Detergenzien, wie Nonidet P40 (NP40), welches die Zellmembran zerstört, Lithiumchlorid zur Aufrechterhaltung der Ionenstärke und EDTA, zur Komplexierung von proteaseaktivierenden, zweiwertigen Kationen. Als Puffergrundlage wird in diesem Puffer HEPES eingesetzt, dass den physiologischen pH-Wert stabilisiert. Weiterhin wurde zur Inaktivierung von Proteasen, ein Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC, Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) im Verhältnis 250:1 frisch zugegeben. Je nach Zellmenge wurden 50 μ l bis zu 1000 μ l RIPA-PIC-Puffer zur Zellyse eingesetzt und anschließend 5 Minuten bei RT inkubiert. Zur Gewinnung des Rohextraktes erfolgte anschließend eine 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C, bei der die löslichen Bestandteile von den unlöslichen Zelltrümmern getrennt wurden. Bei Expressionskontrollen wurden meist sowohl lösliche, als auch unlösliche Bestandteile auf die Polyacrylamidgele aufgetragen, um die Effizienz der Zellyse einschätzen zu können.

2.2.4.2. Mechanischer Zellaufschluss

Diese Methode wurde vor allem bei Hefezellen oder in Kombination mit der chemischen Zellyse bei problematischen Aufschlüssen humaner Zellen angewandt. Hierbei erfolgte in alternierender Reihenfolge das Schockfrieren der resuspendierten Zellen in Flüssigstickstoff und das Auftauen bei 37 °C im Wasserbad in 4-5 Zyklen.

2.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde sowohl für Expressionskontrollen, als auch für die Analyse der Immunpräzipitationen angewandt. Zunächst erfolgte die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele, bei denen die Bis-Acrylamid-Konzentration der Trenngele je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine von 8 % bis 12 % variierte. Das Sammelgel hatte stets eine Konzentration von 4 %. Bei der Probenaufarbeitung wurde die Proteinlösung mit

Laemmlipuffer (siehe 2.1.14.2.) im Verhältnis 1,5:1 versetzt, um eine einheitliche Ladung der Proteine zu erzeugen. Nach dem Aufkochen der SDS-Proben für 5 min bei 95 °C wurden die Proben in die Sammelgeltaschen geladen. Als Proteinstandard wurden 1,5 µl des Prestained Protein Markers von Fermentas aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde in Elektrophoresekammern der Firma BioRad bei einer Spannung von 80mV gestartet. Wenn die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 mV erhöht. In Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins betrug die Laufzeit der SDS-PAGE zwischen ein und zwei Stunden.

Bei der Etablierung der Immunpräzipitation von nativem NIPBL-Protein wurden die SDS-Gele anschließend mit kolloidalem Coomassie nach der modifizierten Methode von Kang *et.al.* ^{20,72} gefärbt. Bei dieser Art der Färbung können Proteine bis auf ein Nanogramm je Bande nachgewiesen werden. Zunächst wurde das SDS-Gel zweimal für je 10 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in die Färbelösung (siehe 2.1.14.2.) überführt. Die Inkubation in der Lösung erfolgte zwischen 3 h bei RT und über Nacht bei 4 °C. Vor Zugabe der Entfärbelösung wurde zweimal mit destilliertem Wasser für je 10 min gewaschen. Die Entfärbung wurde für mehrere Stunden bei RT durchgeführt und das SDS-Gel anschließend in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

2.2.4.4. 2D-Gelelektrophorese

Die 2-D-Gelelektrophorese wurde in Kollaboration mit dem chirurgischen Forschungslabor in der Klinik für Chirurgie von Timo Gemoll durchgeführt. Nach der Immunpräzipitation (siehe 2.2.4.8.) wurden die im 2D-Probenpuffer (siehe 2.1.14.2.) eluierten Proteine zunächst mit dem ReadyPrep Clean up Kit von BioRad nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Für die anschließende 2D-Gelelektrophorese erfolgte dann eine Markierung der aufgereinigten Proteine mit den verschiedenen G-Dye-Fluoreszenzfarbstoffen von NH Dyeagnostics nach dem Herstellerprotokoll. Durch die simultane Auftrennung mehrerer Proben in einem Ansatz, war ein direkter Vergleich der präzipitierten Proteine aus den verschiedenen Kontrollgruppen möglich. Zur Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension wurden die aufgereinigten Proteine über Nacht den Gelstreifen aus einer Polyacrylamidmatrix (Immobiline DryStrip pH 4-7, 24 cm, GE Healthcare) inkubiert, so dass am nächsten Tag die elektrische Fokussierung in der Protean IEF Cell erfolgen konnte. Die zweite Dimension wurde mit dem Flaptop Tower von Gel Company in einem 10 %igem Polyacrylamidgel durchgeführt. Mit dem Typhoon FLA900 (GE Healthcare) erfolgte dann die Dokumentation der aufgetrennten Proteinspots. Zur Auswertung, bzw. zum Vergleich der Proteine aus den verschiedenen Versuchsgruppen wurde die Progenesis Same Spots Software von Nonlinear Dynamics verwendet. Zur Darstellung der identifizierten NIPBL-Interaktionspartner mit deren bereits dokumentierten Wechselwirkungspartnern wurde das Programm IPA (Ingenuity systems Pathway Analysis) verwendet.

2.2.4.5. Western Blot

Diese Methode wurde angewandt, um verschiedenste Proteine aus Zellextrakten oder Eluaten spezifisch mit Antikörpern nachweisen zu können. Der Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran wurde in zwei unterschiedliche Verfahren durchgeführt. Das Semi-Dry-Verfahren wurde für Proteine mit einem Molekulargewicht unter 100 kDa verwendet. Da eine höhere Effizienz des Proteintransfers mit diesem System im Vergleich zu dem Wet Blot Verfahren erreicht wird, ist die SemiDry-Methode für diese Proteingröße von Vorteil. Die zweite Methode (Wet Blot) wird für Proteine mit einem Molekulargewicht über 100 kDa angewandt. Weiterhin wurden für den Proteintransfer sowohl Nitrocellulose-, als auch PVDF-Membranen eingesetzt. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen den transferierten Proteinen und der Membran, ist die spezifische Detektion mit Antikörpern möglich.

Semi-Dry Western Blot

Bei dieser Methode wurden die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine beim Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Bei Verwendung einer PVDF-Membran, wurde diese zuvor in reinem Methanol für eine Minute aktiviert und anschließend in den entsprechenden Transferpuffer (siehe 2.1.14.8.) überführt. Zusätzlich wurden das Whatman-Papier im Transferpuffer genässt. Der Transfer der Proteine erfolgte in der Semi-Dry Transfer Cell von BioRad bei 100 mA für 1 bis 2 h, bis der Proteinmarker (Fermentas, siehe 2.1.7.) komplett auf die Membran transferiert wurde. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese nach Beendigung des Transfers für 20 min luftgetrocknet und anschließend erneut für 30 sec in reinem Methanol aktiviert. Nach einer kurzen Inkubation in destilliertem Wasser, erfolgte eine Inkubation der Membran in einer 4 %-igen Magermilch-PBS -Lösung für 1 h bei 4 °C, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C, meist in einer 1:1000 Verdünnung (4 %-iger Magermilch-PBS). Nach drei Waschschritten mit PBS für je 10 min bei RT wurde mit sekundärem Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung (4 %-iger Magermilch) für ein bis zwei Stunden inkubiert. Alle verwendeten Antikörper sind in Material und Methoden Abschnitt 2.1.4. aufgelistet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kit von Pierce in einem 1:1 Gemisch. Das Peroxidase-Enzym (HRP), das am Sekundärantikörper konjugiert ist, erzeugt eine Reaktion mit den zugegebenen Substraten, wobei Licht emittiert wird, das von einem Detektor eingefangen wird. Die Detektion wurde in der Klinik für Pädiatrie in der Arbeitsgruppe von Dr. Ralf Werner mit dem Dokumentationssystem von Vilber Lourmat mit der vom Hersteller mitgelieferten Software Fusion durchgeführt.

Wet Blot-Verfahren

Beim Wet Blot-Verfahren wurden die Proteine in einem Mini Trans Blot Module von BioRad mit dem in Abschnitt 2.1.14.8. beschriebenen Transferpuffer durchgeführt. Zuvor wurden das SDS-Gel, die Membran und das Whatman-Papier für 30 min im Transferpuffer inkubiert. Durch die starke Wärmeentwicklung beim Transfer, musste stets gekühlt werden. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 350 mA für 1 h. Anschließend wurde der Western Blot, wie bereits im vorherigen Abschnitt (*Semi Dry Blot*) beschrieben, fortgeführt.

2.2.4.6. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Diese Methode wurde angewandt, um mit spezifischen Antikörpern Proteine in der Zelle zu lokalisieren. Neben der Darstellung von NIPBL und MAU2 im Zellkern, diente diese Methode auch zur Untersuchung identifizierter Mutationen im *NIPBL*-Gen und ihren Einfluss auf die Co-Lokalisierung der beiden Interaktionspartner. Bei den Experimenten wurden sowohl HeLa-Zellen, als auch lymphoblastoide Zellen für die Analyse der Mutationen, eingesetzt. Für die Färbung von HeLa-Zellen wurden $1,5 \cdot 10^5$ -Zellen in 24-well-Platten auf kleinen Deckgläschen ausgesät. Um Medium-Rückstände zu entfernen wurde mit PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd für 15 min bei RT. Die Fixierung mit Methanol wurde hier nicht angewendet, da die Zellen nach der Färbung eine stark diffuse Fluoreszenz aufwiesen. Für die Permeabilisierung erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS. Die Inkubation der fixierten Zellen mit dem jeweiligen Antikörper erfolgte im Equilibrierungspuffer (siehe 2.1.14.8.). Davor wurden die Zellen in diesem Puffer für 30 min bei RT equilibriert. Die Bindung des ersten Primäantikörpers erfolgte in einer 1:500 Verdünnung für 1 h bei RT. Danach folgten drei Waschschrte mit Equilibrierungspuffer und anschließend die Färbung mit dem Sekundäantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, ebenfalls in einer 1:500 Verdünnung für 1 h bei RT, im Dunkeln. Bei Co-Lokalisierungen wurde die Inkubation mit dem zweiten Primär- und Sekundäantikörper gleichermaßen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zwischen den einzelnen Färbungen jeweils dreimal mit Equilibrierungspuffer gewaschen. Die immuncytochemische Färbung lymphoblastoiden Zellen erfolgte nach dem gleichen Verfahren in einem Reaktionsgefäß mit den entsprechenden Antikörpern. Dazu wurden circa $1 \cdot 10^6$ Zellen aus der Kultur entnommen und für 2 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach jedem Waschschrte, bzw. jeder Inkubation, wurde diese Zentrifugation wiederholt. Die Behandlung der Zellen im 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte für alle Lösungen in einem Volumen von 1 ml und die Inkubation auf einer Schwenkapparatur. Zur Konservierung der Färbung wurden die Zellen zum Schluss mit ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung der Lokalisierung erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LEICA TCS SP5) im Institut für Pharmakologie.

2.2.4.7. Luciferase-Reportergen-Assay

Der Luciferase Assay ist ein Reportergen-Assay und wurde zur Identifizierung und Charakterisierung von Promotor- und Enhancer-Regionen im *NIPBL*-Gen angewendet. Zur Untersuchung von Promotoren wurde der pGL4.10 Vektor und für die Identifizierung von Enhancerregionen der pGL4.23 Vektor (Promega) genutzt. Im pGL4.10 Vektor werden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte 5' zum Luciferase-Reporter-Gen inseriert, im pGL4.23 Vektor ist ein zusätzlicher Minimalpromotor zwischen dem inserierten DNA-Fragment und dem Luciferase-Gen geschaltet. Dieses Luciferase-Gen ist das synthetische *firefly* Gen *luc2* (*Photium pyratris*). Zur Normalisierung der firefly-Messwerte, bzw. als Kontrolle der Transfektionseffizienz, wurde ein zweites Reportergen eingesetzt. Der pGL4.74-Vektor enthält das *Renilla hRluc* Luciferase-Gen (*Renilla Reniformis*) das ein anderes Substrat, als das *firefly*-Reportergen in einer Lichtreaktion umsetzt, so dass die biolumineszenten Reaktionen separat von einander gemessen werden können. (Siehe Abb. 2.1.)

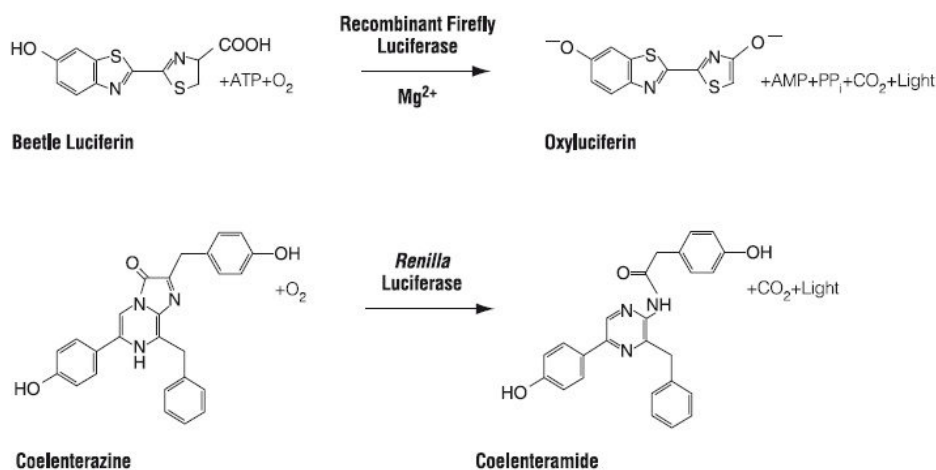


Abb. 2.1 Biolumineszente Reaktionen katalysiert durch *Firefly* und *Renilla* Luciferase

(Technical manual - Dual Luciferase Reporter Assay – Promega, Deutschland)

Für den Versuch wurden 24 h vor der Transfektion $2 \cdot 10^4$ Zellen pro well in einer 24-well-Platte ausgesät. Der Transfektionsansatz mit einem Volumen von 100 µl pro well enthielt 600 ng *luc2*-Plasmid-DNA, 25 ng *hRluc*-Plasmid-DNA, so wie 1 µl Transfektionsreagenz (FuGENE, Promega oder X-treme Gene, Roche) und DMEM ohne FBS oder Antibiotikum. Nach einer Inkubationszeit von 25-30 min bei RT wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen, dessen Medium kurz zuvor gewechselt wurde, gegeben. Die Proteinexpression erfolgte dann für 24 Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator. Zum Lysieren der Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl passivem Lysepuffer (Promega, Deutschland) für 15 min bei RT auf einem Schüttler behandelt. Für die Messung der Biolumineszenz wurden 20 µl des Zelllysates in eine 96-well-Microtiterplatte (Perkin Elmer, Deutschland) überführt. Zur Quantifizierung der Luciferase-Aktivität wurde das

Dual Luciferase Reporter Assay-Kits von Promega als Substrat für die beiden Enzyme verwendet. Im Berthold Luminometer erfolgte zunächst die automatische Zugabe des *firefly* Luciferasesubstrates, dann eine Einwirkungszeit von 2 sec und anschließend die Messung der Lumineszenz für 10 sec. Durch die Zugabe des Stop&Glow-Reagenz wurde diese Reaktion „gequench“ und die *Renilla*-Luciferasereaktion gestartet. Dabei erfolgte die Einwirkung und Messung in der gleichen zeitlichen Abfolge, wie der *firefly* Luciferasereaktion. Mit der Herstellersoftware Microwin und Microsoft Excel wurden die Messwerte im Anschluss analysiert und die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Alle Versuche wurden stets in Triplets durchgeführt.

2.2.4.8. Protein-Protein-Interaktions-Assays

Immun- und Co-Immunpräzipitation

Mit dieser Methode ist es möglich, durch den Einsatz von Antikörpern, Proteine oder mit diesen Proteinen assoziierte Faktoren zu untersuchen. Dabei werden die entsprechenden Antikörper auf Agarosebeads über ihre Fc-Region an A/G-Proteine gebunden. Diese A/G-Proteine sind auf den Agarosebeads immobilisiert und haben eine hohe Affinität zu den schweren Ketten der Immunglobuline. Die immobilisierten Antikörper isolieren das spezifische Protein aus z.B. einem Zelllysate, so dass eine Aufkonzentrierung des Proteins stattfindet und dieses mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot spezifisch nachgewiesen werden kann. Bei einer Co-Immunpräzipitation werden mit dem isolierten Protein weitere assoziierte Proteine präzipitiert.

Zur Durchführung der Co-Immunpräzipitation wurden zum einen Zelllysate mit überexprimierten Fusions-Proteinen und zum anderen Zelllysate von nicht transfizierten Zellen eingesetzt. Für die Expression von Proteinen mit einem Fusions-Tag, wie z.B. FLAG-(pFLAG; Clontech-based) oder myc-Tag (pcDNA3.1-His-A,B,C; Invitrogen), wurden humane Zellen mit den entsprechenden Plasmiden mittels Lipofektion transfiziert (siehe 2.2.2.4.) und für mindestens 24 Stunden inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte wie in 2.2.4.1. beschrieben. Zur Vorbereitung der ProteinG Plus/Protein A-Agarosebeads (Calbiochem), wurden diese vor der Inkubation mit dem Zellextrakt zweimal mit einer PBS-BSA (5mg/ ml)-Lösung gewaschen. Das Volumen der einzusetzenden Agarosematrix (*Beads*) betrug zwischen 50 und 100 µl. Zur Trennung der Waschlösung von den *Beads* wurde stets 1 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Beladung der *Beads* mit 10 µl des spezifischen Antikörpers erfolgte in der oben beschriebenen PBS-BSA-Lösung für 6 Stunden bei 4 °C in einem *Over-head-Shaker*. Anschließend wurde die Inkubation der beladenen *Beads* mit Zellextrakt über Nacht bei 4 °C im *Over-head-Shaker* durchgeführt. Am nächsten Tag folgten zwei Waschschrte, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Dabei wurden, je nach erforderlicher Stringenz, sowohl RIPA-Puffer (2.1.14.7.) für sehr stringente Waschbedingungen, als auch ein Tris-Puffer oder PBS physiologischer Salzkonzentration

(siehe 2.1.14.8.), für mildere oder weniger stringente Bedingungen verwendet. Zur Elution der gebundenen Proteine zum anschließenden Nachweis eines bestimmten Interaktionspartners mittels Western Blot wurden 50-80 µl Laemmli-SDS-Probenpuffer eingesetzt und die Beads für 5 min bei 95 °C erhitzt. Bei der Immunpräzipitation von nativem NIPBL zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern, erfolgte die Elution der Proteine im 2D-Probenpuffer (2.1.14.2.). Dieser enthält eine hohe Konzentration an Harnstoff, so dass die Proteine denaturiert und von den Beads gelöst wurden. Die Inkubation im 2D-Probenpuffer (60 µl) erfolgte bei RT für 30 min. Im Anschluss daran wurden die Proben zur Sedimentierung der Agarosematrix für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den eluierten Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Yeast-Two-Hybrid-Assay

Diese Methode wurde nach dem Prinzip von Fields & Song (1989) und Chien (1991)^{24,42} durchgeführt, um Protein-Protein-Interaktionen identifizieren und näher charakterisieren zu können. Das Prinzip dieser *in-vivo* Methode ist, dass ein Köder (*bait*)-Protein als Fusion mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne und ein Beute (*prey*)-Protein als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert werden. Findet zwischen den beiden Proteinen (*bait* und *prey*) eine Interaktion statt, gelangen die beiden Fusionsdomänen in sterische Nähe, agieren gemeinsam als Transkriptionsfaktor und aktivieren damit, über die Bindung an Gal4-*upstream activating sequences* (UAS) und TATA-Boxen, die Expression von insgesamt vier Reportergenen (*ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*), welche im Genom des Hefestammes AH109 inseriert sind. Dieser im Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) verwendete Hefestamm AH109 ist auxotroph für Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin (Abschnitt 2.1.12). Für die Transformationen wurden jeweils Midipräparationen der einzelnen Plasmide (pGBKT7 (Köder)- und pGADT7 (Beute) -Vektor) angefertigt. Die Transformation der Hefen erfolgte, wie in 2.2.1.6. beschrieben. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf -2 SD-Agarplatten (Mangelmedium – siehe 2.1.14.3.) ausgestrichen und über mehrere Tage, bis Hefeklonen sichtbar waren, bei 30 °C inkubiert. Da nur co-transformierte Hefeklonen die Nährstoffe Leucin und Tryptophan selbstständig synthetisieren konnten, sollten nur diese ein Wachstum auf den Selektionsplatten zeigen. Diese Kolonien wurden dann auf -4 SD-Agarplatten (siehe 2.1.14.3.) ausgestrichen. Fand eine Interaktion der beiden zu analysierenden Proteine statt, erfolgte ein Wachstum auf diesen Selektionsplatten, da durch die Wechselwirkung die Expression der zusätzlichen Reportergene Adenin und Histidin aktiviert wurde.

Quantitativer β -Galaktosidase Test

Für eine erste quantitative Analyse der im Yeast-Two-Hybrid Assay gezeigten Protein-Protein-Interaktionen wurde die Expression des ebenfalls im Genom des Hefestammes

AH109 inserierten Reportergens *lacZ* genutzt, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym hydrolysiert das Substrat o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu o-Nitrophenyl- β -D-galaktose in einer Farbreaktion, so dass es möglich war, die β -Galaktosidase in Hefeextrakten nachzuweisen. Im β -Galaktosidase-Assay kann damit die relative Stärke der Protein-Protein-Interaktion dargestellt werden. Dabei gilt, dass je stärker die Interaktionsintensität, desto höher die Promotoraktivität des β -Galaktosidase-Reportergens und somit die mit der Farbtintensität einhergehende Substratreaktion. Daher ist dies eine semi-quantitative Methode zur Darstellung der Interaktion zwischen zwei Proteinen. Für den Assay wurden einzelne Hefeklone in 2 ml -2-SD-Flüssigmedium mit einer sterilen Impföse inokuliert und bei 30°C und 220 rpm für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte das Animpfen von 1 ml Vorkultur in 4 ml vorgewärmtem YPD-Vollmedium und Inkubation bei 30 °C, 220 rpm für 5 h. Betrug die optische Dichte bei 600 nm 0,5 bis 0,8 wurden je Klon 1,5 ml der Kultur in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec bei 14 000 rpm zentrifugiert. Gleichzeitig wurde für jede Kultur die exakte OD₆₀₀ bestimmt. Das Hefepellet wurde dann in 1,5 ml Z-Puffer (siehe 2.1.14.6.) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 300 μ l Z-Puffer resuspendiert. Jeweils 100 μ l davon wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss daran erfolgte der mechanische Zellaufschluss mittels Gefrier-Tau-Technik (siehe 2.2.4.2.) in Flüssigstickstoff und im 37 °C warmen Wasserbad. Zu den lysierten Hefezellen wurden dann 700 μ l Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol (0,27 %) und 160 μ l ONPG-Substrat pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C für maximal 24 h. Bei einem Farbumschlag wurden sofort 400 μ l einer 1 M Natriumcarbonatlösung zugegeben und anschließend bei 14 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in eine Einmal-Küvette überführt und die Absorption bei 420 nm photometrisch bestimmt. Nach Miller *et al.* (1972) entspricht eine Unit β -Galaktosidase der Menge an Enzym, die 1 μ mol ONPG-Substrat pro Minute hydrolysiert⁶⁹. Die Berechnung der β -Galaktosidase-Einheiten (β -Gal-Units) erfolgte in Microsoft-Excel nach der folgenden Formel:

$$\underline{\beta\text{-Galaktosidase Units} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})}$$

t = Inkubationszeit (min) bis zum Abstoppen der Farbreaktion

V = 0,1 ml x Konzentrationsfaktor

OD₆₀₀ = A₆₀₀ von 1 ml Kultur

Mammalian-Two-Hybrid-Assay

Der Mammalian-two-Hybrid Assay wurde angewandt, um Protein-Protein-Interaktionen im humanen System quantifizieren und analysieren zu können. Dazu wurde, wie auch im Luciferase-Reportergen-Assay, die Aktivierung der Luciferase-Reportergen-Expression detektiert. Das Prinzip dieses Assays ist dem der Yeast-two-Hybrid-Methode ähnlich. Dabei werden Gene, die für interagierende Proteine kodieren, jeweils als Fusion mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (pCMV-BD), bzw. Aktivierenden Domäne NF-kappaB (pCMV-AD) exprimiert.

Durch die Wechselwirkung der beiden Interaktionspartner werden die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne in sterische Nähe gebracht und dadurch die Expression des Reportergens Luciferase über die Gal4-Bindungssequenzen aktiviert. Über die Intensität der Biolumineszenz wird eine Quantifizierung der Proteininteraktion möglich. Für die Transfektion wurden 24 h zuvor $3 \cdot 10^4$ Zellen pro well in einer 24-well-Platte ausgesät. Zur Ausbildung der Lipid-DNA-Komplexe wurden je 150 ng des bait (BD)- und prey (AD)-Plasmids, 250 ng des Luciferase-Plasmids (pFR-Luc), 25 ng *hRluc*-Plasmid und 1 μ l Transfektionsreagenz (FuGENE, Promega oder X-treme Gene, Roche) in insgesamt 100 μ l DMEM ohne Serum oder Antibiotikum zusammen gegeben und 25-30 min bei RT inkubiert. Vor der Zugabe des Transfektionsansatzes wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach dem anschließenden Zugeben der Lipid-DNA-Komplexe, erfolgte eine Inkubation von 24 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator. Die Lyse der Zellen erfolgte dann mit 100 μ l passiven Lysepuffer von Promega für 15 min bei RT auf einem Schüttler. Zur Quantifizierung der Luciferase-Aktivität wurden dann 20 μ l des Zelllysates in 96-well Mikrotiterplatten überführt und die Lumineszenz wie in Abschnitt 2.2.4.7. beschrieben gemessen und ausgewertet. Auch hier erfolgte eine Normierung der *Firefly*-Messwerte bzw. die Kontrolle der Transfektionseffizienz, über die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase. Alle Ansätze wurden in Triplets durchgeführt.

2.2.5. Statistik

In quantitativen Analysen wurden die Standardabweichung (STABWN) und der dreiseitige T-Test zur Berechnung der Signifikanz mit dem Microsoft Excel-Programm durchgeführt. Die Standardabweichung ist in den jeweiligen Diagrammen als Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanz wurde durch Sterne (*) angegeben. Dabei galt: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ und *** - $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Regulative Elemente des *NIPBL*-Gens

3.1.1 Identifizierung des *NIPBL*-Promotors

Zur Identifizierung und Charakterisierung des *NIPBL*-Promotors wurden zunächst *in-silico*-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die genomische Region auf Chromosom 5 36.910.000-36.915.000 näher betrachtet. Dabei zeigte sich eine hohe Konservierung ab dem Bereich von einem kb *upstream* des ersten Exons von *NIPBL*. Zusätzlich konnten mit Hilfe der ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*)-Datenbank spezifische post-translationale Modifikationen des Histon-Proteins 3 (H3K4me3) in einem 5 kb überspannenden Bereich nachgewiesen werden, die eine charakteristische epigenetische Markierung für einen aktiven Promoter darstellen⁵⁵ (rotes Kästchen Abb. 3.1). Ferner sind viele DNase I-hypersensitive Regionen in diesem Bereich gezeigt, die ebenfalls auf eine regulatorische Funktion dieses Bereiches 5' des Transkriptionsstarts von *NIPBL* schließen lassen. Weitere Analysen dieser Region mit den Programmen *Promotor prediction* (*Centre for biological Sequence Analysis*, Technical University Denmark) und *AliBaba* (*Gene regulation.com*, Biobase) deuteten ebenfalls auf eine Promotor-Funktion 5' des Exon1 hin (Daten nicht gezeigt)

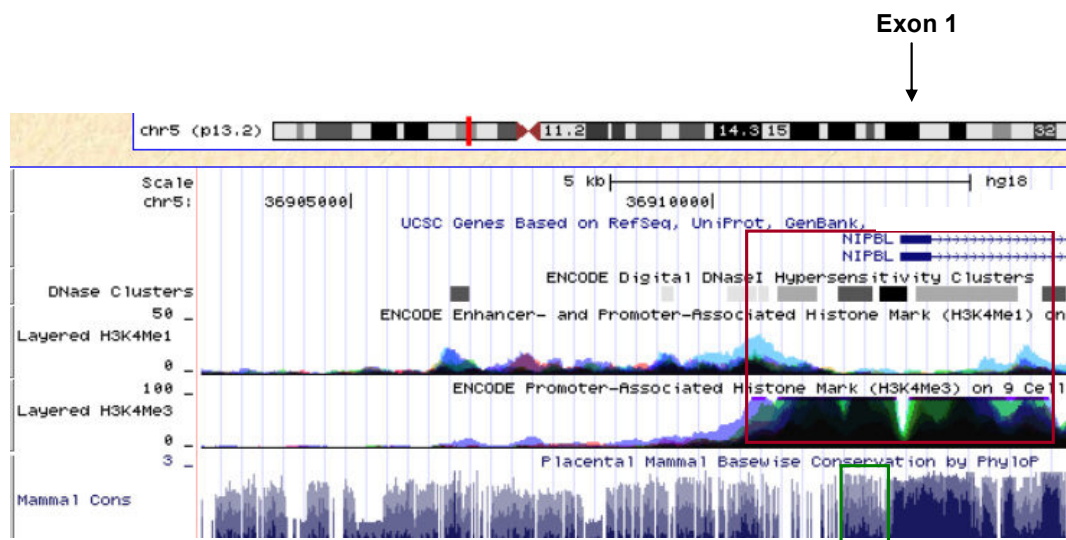


Abb.3.1: *In-silico*-Analyse der potentiellen Promotorregion des *NIPBL*-Gens

Die Histonmodifikation H3K4Me3 ist assoziiert mit aktiven Promotoren. In dieser Abbildung aus dem UCSC-Genome Browser, ist u.a. die Trimethylierung des H3K4 für die Region um Exon1 im *NIPBL*-Gen gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass diese epigenetische Markierung 5' und 3' vom Exon1 deutlich erhöht ist (ca. 5 kb-Region rot umrandet), was ein eindeutiger Hinweis auf einen Promotor ist. Gleichzeitig weist die hohe Konservierung in verschiedenen Spezies in der Region des vorhergesagten Promotorelementes auf ein funktionelles Element hin (grün umrandet) Zusätzlich sind die Histonmodifikation H3K4me1, die mit Enhancern assoziiert ist und die DNase I-hypersensitiven Regionen (DNase I Hypersensitivity Clusters - graue Balken) für diesen genomischen Bereich dargestellt.

Für die Analyse des potentiellen Promotorbereiches wurden verschiedene Fragmente (Abb 3.2.) konstruiert, die insgesamt einen Bereich von circa 5 kb umfassten. Darin enthalten waren neben dem im Programm *Promoter prediction* vorhergesagten Promotorelement (PP-predicted promoter) und der 5'UTR (2 kb), auch das Exon1 und circa 1 kb des 3' angrenzenden Intron1 des *NIPBL*-Gens (ENSGENSG00000164190). Die an genomischer DNA amplifizierten und anschließend sequenzierten Fragmente wurden in den Reporter Gen-Vektor pGL4.10 [*luc2*] inseriert, so dass die zu untersuchenden Fragmente *upstream* des Luciferase-Gens positioniert waren (siehe Abb. 3.2.).

Der Luciferase-Assay wurde, wie in Abschnitt 2.2.4.7. beschrieben, in HeLa-Zellen ($2 \cdot 10^4$ Zellen/ well) durchgeführt und in neun unabhängigen Experimenten verifiziert. Die Aktivitätsmessung erfolgte 24 h nach Transfektion der Zellen (siehe 2.2.2.5.). Dabei konnte in den Proben für Fragment 2 und 5 zunächst die höchste Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb.3.3). Diese beiden Fragmente enthielten jeweils das vorhergesagte Promotorelement, aber weder Exon1, noch den 3' angrenzenden Bereich des Intron1. Die gleichen Versuchsansätze wurden in drei weiteren Zelllinien, wie U2OS, Hep3b und HepG2 wiederholt. Dabei konnten die Ergebnisse aus den mit HeLa-Zellen durchgeführten Experimenten für alle weiteren getesteten Zelltypen verifiziert werden. Um den so ermittelten Promotorbereich von circa 1 kb weiter einzugrenzen, wurden weitere Sub-Fragmente des Fragmentes F2 (F2.1-3) generiert und analysiert. Dabei war zu erkennen, dass der Kernpromotor von *NIPBL* innerhalb eines 143 bp-langen (in F2.2) Sequenzbereiches *upstream* des Exons 1 (c.-642 – (-499)) liegt (Abb. 3.3).

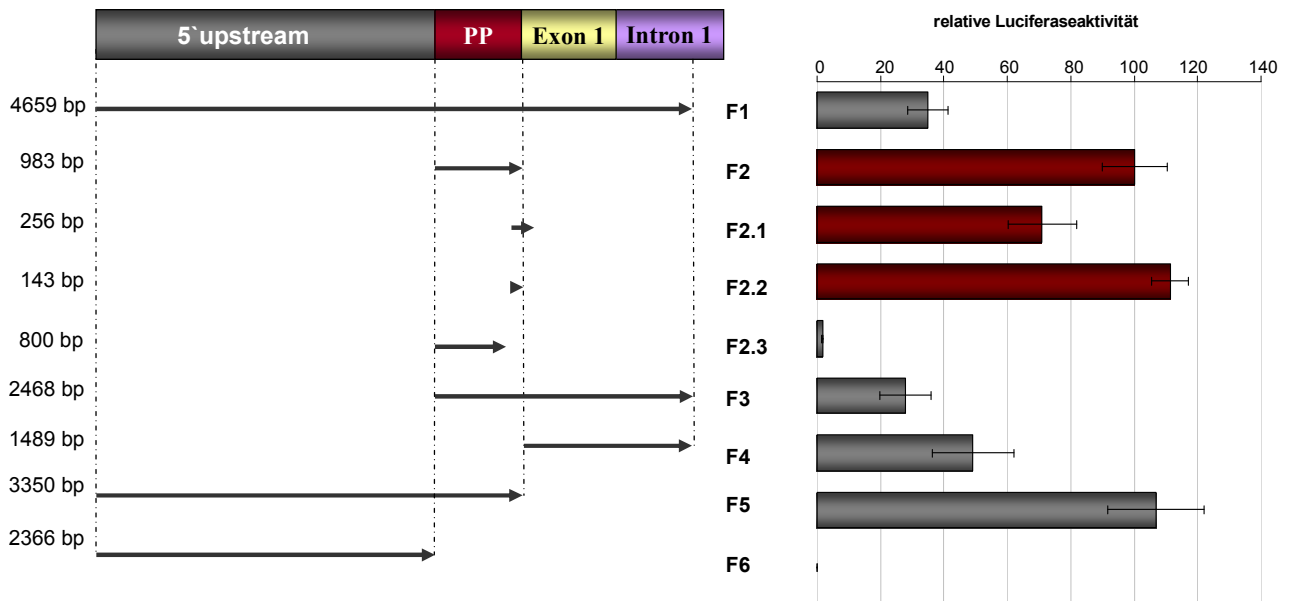


Abb.3.2: Charakterisierung des *NIPBL*-Promotors mittels Luciferase-Reportergen-Analysen

Der Luciferase Assay wurde für alle Fragmente in neun unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Analyse in HeLa-Zellen. Die Promotoraktivität ist hier in der normierten Einheit relative Luciferase-Aktivität angegeben. Die roten Balken zeigen dabei die deutliche Eingrenzung des Promotorelementes, wobei für diese Fragmente gleichzeitig die höchste Promotoraktivität nachgewiesen wurde. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Kernpromotor innerhalb eines 143 bp langen Bereiches 5' des Exons 1 im *NIPBL*-Gen lokalisiert ist.

3.1.2. Sequenzierung des *NIPBL*-Promotors bei Patienten mit CdLS

Nach der erfolgreichen Identifizierung des *NIPBL*-Kernpromotors wurden Mutationsanalysen des genomischen Abschnittes entsprechend dem Fragment 2 von zunächst 13 Patienten mit klinisch unzweifelhafter Diagnose eines CdLS, bei denen zuvor keine Mutation in einem der bekannten CdLS-assoziierten Gene gefunden werden konnte, durchgeführt. Zur Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten wurde die Software SeqScape von Applied Biosystems verwendet. Dabei wurden drei Sequenzvariationen identifiziert, die in weiteren Analysen auch bei den Eltern nachgewiesen wurden (Tabelle 1). Diese drei Varianten oder auch *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) sind bereits in der SNP-Datenbank von NCBI als Polymorphismen aufgeführt. Während die Sequenzvariation c.-1027G>C in insgesamt 4 der 13 Patienten und eine Insertion an Position 1077 (c.-1077insC), in 8 von 13 Patienten identifiziert wurden, konnte nur in einem Patienten der Polymorphismus c.-576T>C nachgewiesen werden. Dieser Eintrag zum Polymorphismus c.-576T>C wurde aus nicht bekannten Gründen im Jahr 2011 aus der SNP-Datenbank von NCBI entfernt.

Tabelle 1: Sequenzierung des *NIPBL*-Promotors in 13 Patienten mit CdLS

Die entsprechenden SNP-Identifikationsnummern und Häufigkeiten der nachgewiesenen Polymorphismen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

	Sequenzvariation	bekannter Polymorphismus	<i>de novo</i>	Häufigkeit [%] Total	Häufigkeit in Kontrollen [%]
1	c.-576T>C	(rs115673890)	nein	8 (n=13)	<1
2	c.-1027G>C	rs896477	nein	31 (n=13)	<1
3	c.-1077insC	rs35917987	nein	61 (n=13)	<1
4	c.-255-(-249) delGGAGGA	-	nein	4 (n=25)	< 1
5	c.-82 + (229-264) delinsCCCTGCTGG	-	Ja	1 (n=96)	0

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff in Philadelphia (Division of Human Genetics, The Children's Hospital of Philadelphia Research Institute, Philadelphia, PA, USA) wurden zusätzliche Analysen in nicht-kodierenden Regionen von *NIPBL* in 96 Patienten mit CdLS durchgeführt. Dabei wurde eine weitere Sequenzvariante in Intron1 identifiziert. Hierbei handelte es sich um eine *de novo* Deletion/Insertion im Intron1 (c.-82+(229_264)delinsCCCTGCTGG-Mutation1). In unserem Institut erfolgten im Zuge der Diagnostik zusätzlich Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification- (MLPA)-Analysen in insgesamt 25 weiteren Patienten, bei denen keine Mutation in einem der bekannten CdLS-Gene nachgewiesen wurde. Dabei konnte eine Deletion im Exon1 (c.-255-(-249)delGGAGGA-Mutation2) des *NIPBL*-Gens identifiziert werden. In späteren Analysen wurde diese Sequenzänderung auch beim Vater des Patienten nachgewiesen.

Um Auswirkungen der beiden identifizierten Sequenzvarianten auf die Promotoraktivität des *NIPBL*-Gens zu untersuchen, wurden erneut Luciferase-Reporter-Gen-Assays in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Das bereits bei der Identifizierung des *NIPBL*-Promotors verwendete Fragment 4 (2,5 kb) wurde dabei für die Analysen eingesetzt. Dieses Fragment enthält sowohl das Kern-Promotorelement als auch Exon1 und 1kb des 3' angrenzenden Intron1. Somit konnte der Einfluss auf die Promotoraktivität von *NIPBL* für beide Sequenzvariationen analysiert werden. Mittels Mutagenese-PCR (siehe 2.2.3.1.) und der Verwendung von spezifischen Mutageneseprimern wurden die in den CdLS-Patienten identifizierten Mutationen jeweils in das Plasmid pGL4.10-F4 eingeführt und deren Promotoraktivität im Luciferase-Assay (siehe 2.2.4.7.) im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid (WT) bestimmt. Die Ergebnisse der Reporter-Gen-Analysen zeigten, dass beide Mutationen

einen signifikanten Effekt auf die Promotoraktivität und damit auch einen Einfluss auf die Expression des *NIPBL*-Gens haben könnten.

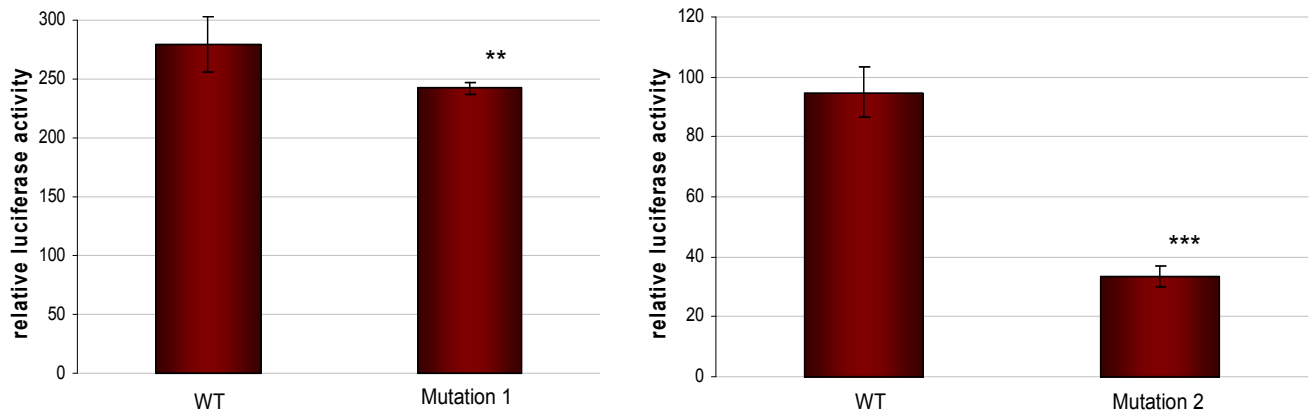


Abb.3.4: Luciferase-Reporter-Gen-Assay zur funktionellen Analyse der Promotor- Mutationen im *NIPBL*-Gen

Für die funktionelle Analyse der Mutationen wurde das Plasmid pGL4-F4 eingesetzt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität jeweils für den Wildtyp (WT) und die entsprechende Mutation in neun unabhängigen Experimenten. Die Promotoraktivität ist in genomter, relativer Luciferase-Aktivität angegeben. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität des Promotors für Mutation 1 um circa 20 % und für Mutation 2 sogar über 64 % reduziert wurde. Die Signifikanz betrug $p = 0,0047$ für die Deletion-Insertion im Intron1 (Mutation 1) und $p = 0,0003$ für die Deletion im Exon1 (Mutation 2)-Signifikanz (siehe Material und Methoden).

Für die erste Mutation konnte eine Abnahme der Promotoraktivität von circa 20 % festgestellt werden. Die zweite Mutation bewirkte sogar eine Reduktion um über 60 %.

Da die hier in einem *in vitro* System analysierte Deletion von sechs Basenpaaren im ersten Exon von *NIPBL* eine deutliche Reduktion der Promotoraktivität bewirkte, sollten weitere *in vivo*-Analysen die patho-physiologische Relevanz dieser Mutation klären. Hierzu wurde mittels quantitativer PCR (TaqMan-Analyse) die Expression von *NIPBL* in Blutproben der Patienten und Kontroll-Personen untersucht. Dazu wurden Sonden von Applied Biosystems verwendet (Hs01122291_m1) - (AGTCTCACAGACCTCCTGAACCAGC), die Exon-übergreifend an das Exon 2 und ~ 3 im *NIPBL*-Gen hybridisieren. Für die TaqMan-Analysen wurden RNA-Proben von drei verschiedenen „gesunden“ Kontrollpersonen (K1-3) und die RNA des nicht betroffenen Vaters mitgeführt. Vor der Real-Time-PCR wurde eine cDNA-Synthese mit dem SuperScript II First-Strand Synthesis Kit in einem separaten Schritt nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt (2.2.3.9.). Die quantitative PCR erfolgte, nach dem in 2.2.3.10. beschriebenen Protokoll, mit dem 7300 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems. Für die Normalisierung der Messwerte wurde die *MAPK1*-Sonde (Hs01046830_m1) im TaqMan-Assay mitgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte nach der Δc_t -Methode mit der Herstellersoftware und Microsoft Excel. Die relative Expression des *NIPBL*-Gens bei dem Patienten im Vergleich zu den Kontrollen zeigt, dass

die *NIPBL*-Expression nur noch 76 % der bei den Kontrollen gemessenen Expression betrug (Abb.3.5.). Die dargestellten Ergebnisse konnten in insgesamt sechs unabhängigen Experimenten verifiziert werden.

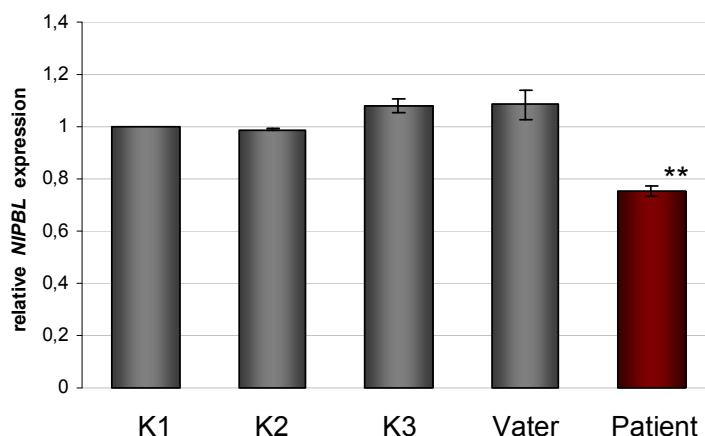


Abb.3.5: TaqMan-Assay zur Analyse der *NIPBL*-Expression im Patienten im Vergleich zu Kontrollen

In der Abbildung ist die relative Expression des *NIPBL*-Gens für die drei Kontrollen (K1-3), den Vater und für den Patienten (rot) dargestellt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte nach der Δc_t -Methode und wurde mit der Software von Applied Biosystems und Excel durchgeführt. Die Expression im Patienten ist über 24 % vermindert und unterscheidet sich signifikant von den Kontrollen ($p=0,005$).

3.1.3. Alternativer Promotor im *NIPBL*-Gen

Um weitere regulative Elemente im *NIPBL*-Gen identifizieren zu können, wurden erneut *in-silico*-Analysen durchgeführt. Unter Verwendung der CAGE-Datenbank konnte eine potentielle alternative Transkriptionsstartstelle (TSS) im Exon 10 des *NIPBL*-Gens gefunden werden (Abb. 3.6. A). Auch das *in silico*-Programm *Promotor-Prediction* (nicht gezeigt) sagte eine mögliche Promotorregion im Exon 10 vorher (*highly predicted*). Mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde dieser Bereich des *NIPBL*-Gens auf eine Promotoraktivität hin überprüft. Dazu wurde das Exon 10 (ENSG00000164190) mit einer Länge von circa 1600 bp an genomischer DNA mittels PCR amplifiziert, sequenziert und in den Luciferase-Vektor pGL4.10 inseriert. Der Luciferase-Assay wurde nach Protokoll durchgeführt und die Genexpression nach 24 h in verschiedenen Zelllinien (HeLa, HepG2, U2OS, Hep3b, HEK293) gemessen. Die Ergebnisse ergaben, dass in den verwendeten Zellen, für das in Exon10 vorhergesagte Element, keine Promotoraktivität nachweisbar war (Abb.3.6. B).

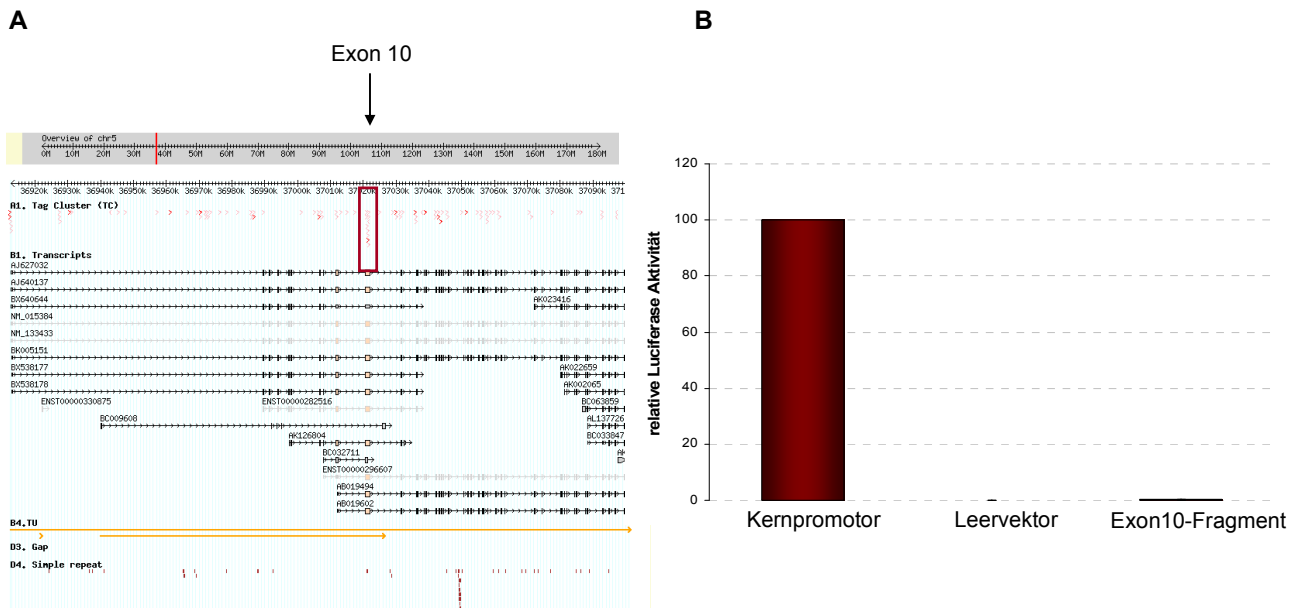


Abb.3.6: *In silico*- und funktionelle Analysen zum Nachweis eines alternativen *NIPBL*-Promotors

A) In der CAGE-Datenbank konnte eine potentielle Transkriptionsstartstelle (rot markiert) im Exon10 gezeigt werden.

In B) ist die relative Luciferase-Aktivität für den *NIPBL*-Kernpromotor, den Leervektor (pGL4.10) und das Exon10-Fragment in HeLa-Zellen gezeigt. Der Assay wurde in vier weiteren Zelllinien (U2OS, HepG2, Hepb3 und HEK293) durchgeführt und die Ergebnisse in neun unabhängigen Experimenten bestätigt. In allen untersuchten Zelllinien war im Vergleich zum *NIPBL*-Kernpromotor keine signifikante Promotoraktivität für Exon 10 nachzuweisen.

3.1.4 Identifizierung weiterer regulativer Elemente im *NIPBL*-Gen

Weitere Analysen des gesamten *NIPBL*-Gens mit Hilfe der ENCODE-Datenbank zeigten in mehreren Zelllinien eine Anreicherung der Histonmodifikation H3K4me1 innerhalb eines Bereiches im Intron 9. Diese Art der post-translationalen Modifikation des Histon-Proteins 3 ist epigenetisch mit einem Enhancer-Element assoziiert. Zusätzlich zeigte sich eine DNaseI-hypersensitive Stelle in diesem Bereich des Gens, was ebenfalls auf eine regulative Funktion dieser Region hinweist (Abb. 3.7.).

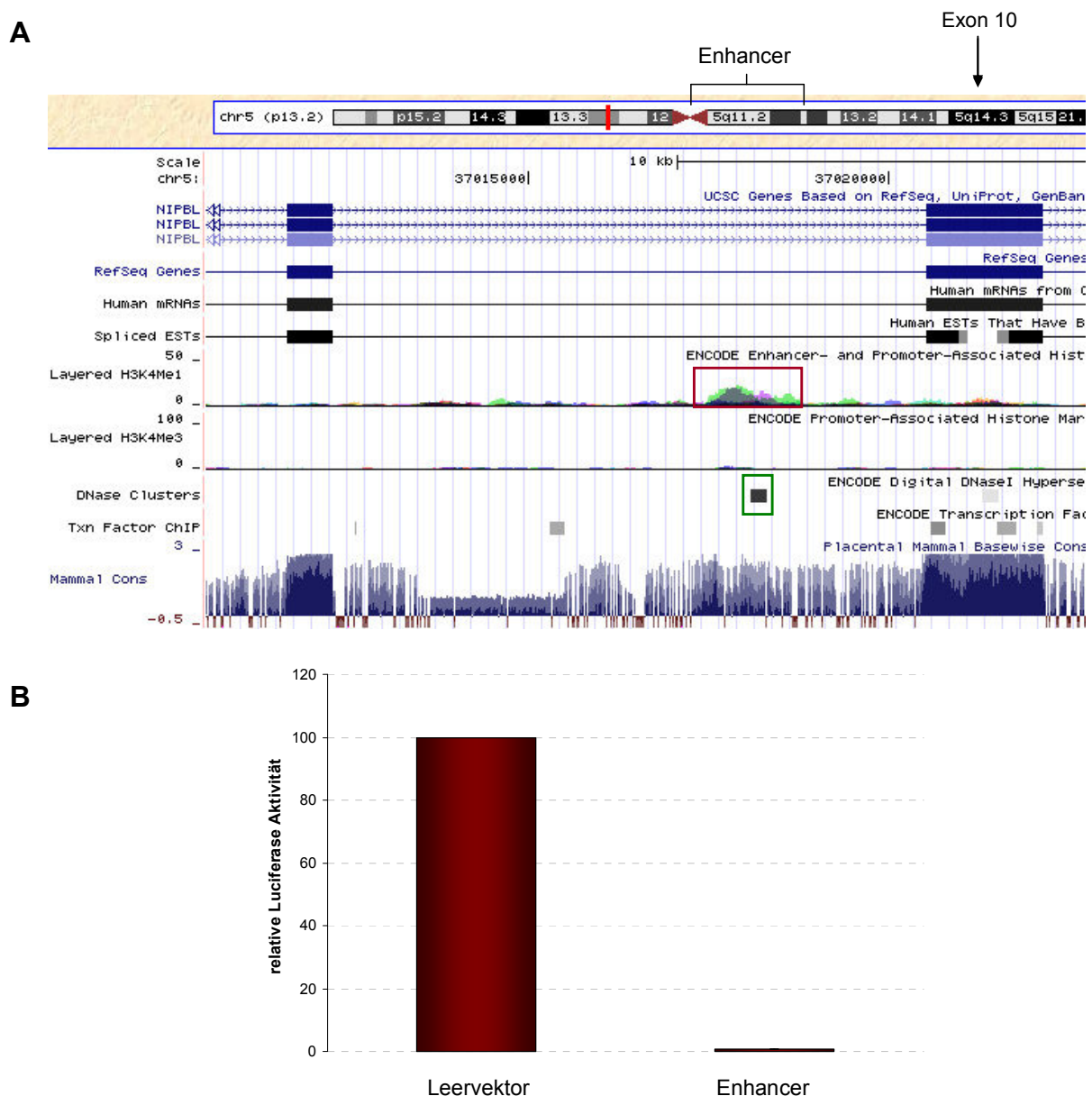


Abb.3.7: *In Silico*- und Funktionelle Analysen zum potentiell regulativen Element in Intron9

In (A) ist die Histonmodifikation und DNaseII-Hypersensitive Stellen circa 2 kb *upstream* des Exons10 aus der ENCODE-Datenbank dargestellt, bei der eine verstärkte Monomethylierung des H3K4 zu erkennen ist (rot-markiert). Weiterhin zeigt die grün-markierte Region eine DNaseII-hypersensitive Stelle innerhalb dieses Bereiches, die ebenfalls ein Indiz für ein regulatives Element ist. Das 1,5 kb-Fragment, welches im Luciferase-Assay eingesetzt wurde, ist als Enhancer markiert. In (B) ist die relative Luciferase-Aktivität für den Leervektor pGL4.23 mit integriertem Minimalpromotor und für das Enhancer-Fragment dargestellt. Die Aktivität nimmt durch das Inserieren des Enhancer sehr stark ab, was auf eine regulative Funktion dieses Bereiches hindeutet. Die Ergebnisse wurden in insgesamt sechs unabhängigen Experimenten verifiziert.

Zur funktionellen Charakterisierung dieses potentiellen Enhancers wurde ein spezifisches 1,5 kb großes Fragment (Enhancer-Abb.3.7.A) an genomischer Kontroll-DNA amplifiziert, sequenziert und anschließend in den Luciferase-Reporter-gen-Vektor pGL4.23 5' inseriert. Durch diese Insertion kann ein regulativer Effekt des inserierten Fragmentes auf einen in

diesem Plasmid inserierten Minimalpromotor untersucht werden. Der Luciferase-Assay wurde, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, durchgeführt. Nach 24 h Expression erfolgte die Lyse der transfizierten Zellen und anschließend die Messung der Luciferase-Aktivität. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zur Leerkontrolle (pGL4.23-Vektor ohne Insertion), das Enhancer-Fragment einen fast vollständigen Verlust der relativen Luciferase-Aktivität aufwies, was auf eine regulative Funktion des untersuchten Fragmentes hindeutet (Abb. 3.7.B).

Um die Funktion dieses potentiellen Enhancers näher zu charakterisieren, wurde dieses in Plasmide 3' vom Luciferase-Gen inseriert, in denen der Minimalpromotor durch den zuvor identifizierten *NIPBL*-Promotor pGL4.10-F2 bzw. den Kern-Promotor pGL4.10-F2.1 ersetzt wurde (Abb. 3.10.A). Dabei unterscheiden sich die beiden Plasmide in der Länge des Promotors. Aus ChIP-Seq-Analysen (ENCODE-Datenbank) ist bekannt, dass sowohl das *NIPBL*-Kernpromotorfragment F2, als auch das regulative Element in Intron9 eine CTCF-Bindestelle aufweisen (Abb. 3.8.), wobei anzufügen ist, dass die ChIP-Seq-Signale für das Fragment F2 deutlich vermindert gegenüber denen des Intron9-Fragmentes sind. Im Vergleich zu dem Promotorfragment F2 (1 kb) besitzt das Fragment F2.1 (250 bp) keine CTCF-Bindestelle. Zusätzlich sind mehrere DNase I-hypersensitiven Stellen (Abb. 3.8.) in den untersuchten Bereichen, dabei vor allem im *NIPBL*-Kernpromotor vorhanden.

Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde wie in Abschnitt 2.2.4.7. beschrieben in HeLa-Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Insertion des Enhancers in die Luciferase-Plasmide pGL4-F2/ F2.1 eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität von *NIPBL* hervorgerufen wurde (Abb. 3.9.B). Dabei waren deutliche Unterschiede zwischen dem F2- und F2.1-Plasmid zu verzeichnen. Die Promotoraktivität des Plasmides mit der internen CTCF-Bindestelle (F2) wurde komplett aufgehoben, während das Plasmid ohne CTCF-Bindestelle (F2.1) eine Reduktion von circa 40 % aufwies. Als Kontrolle wurde ein anderer Promotor eingesetzt, der ebenfalls eine CTCF-Bindestelle enthielt und eine Länge von circa 1 kb besaß. Des Weiteren wurde eine nicht relevante DNA-Sequenz (1 kb) an Stelle des Enhancer-Fragmentes in das Plasmid inseriert, um experimentell bedingte Artefakte weitestgehend auszuschließen. Für beide Kontrollen konnte kein signifikanter Unterschied in der Promotoraktivität nach Insertion des Enhancer-Fragmentes nachgewiesen werden. Eine Durchführung dieser Versuche in HEK293-Zellen zeigte gleiche Ergebnisse.

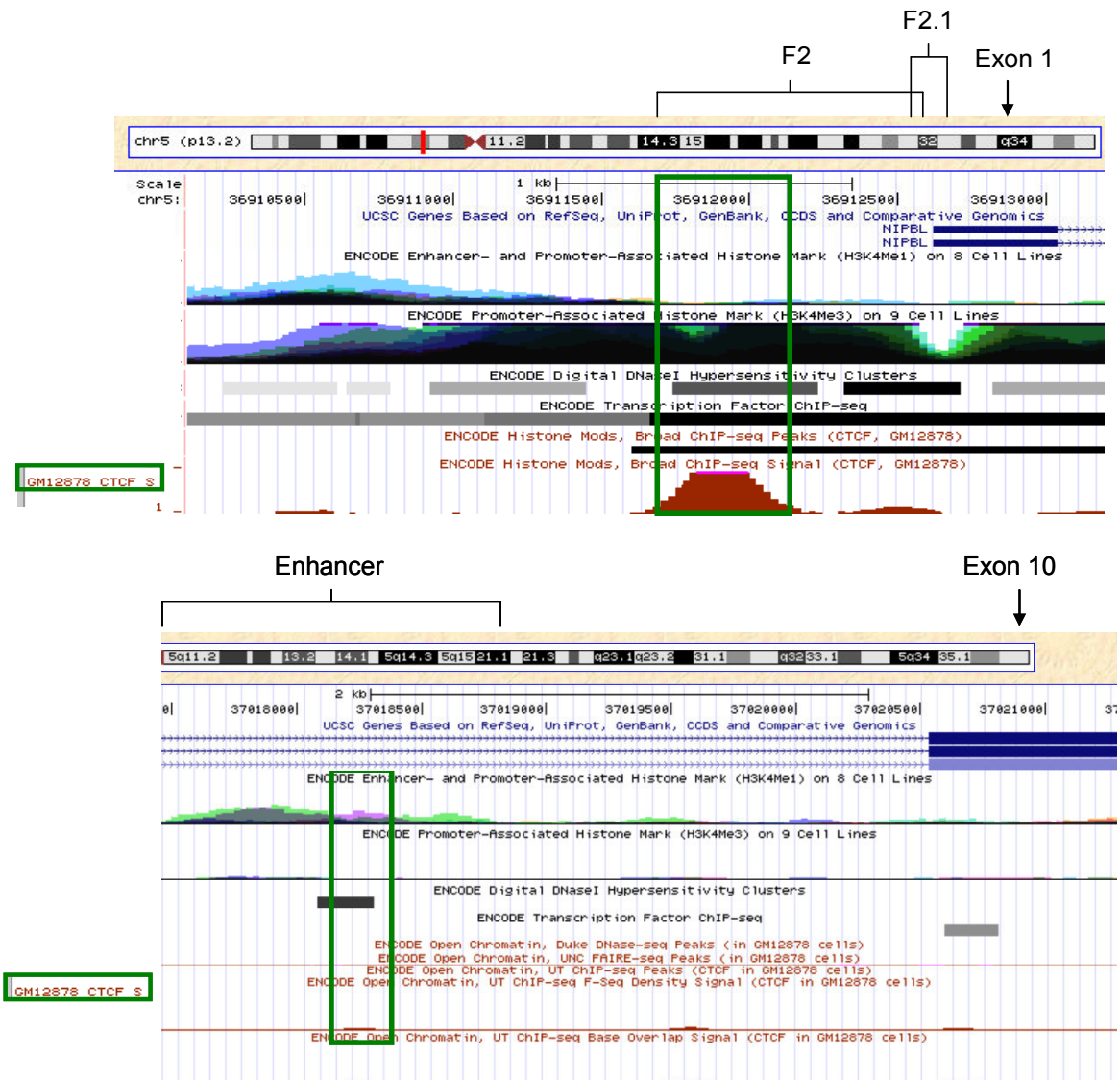


Abb.3.8.: Darstellung der CTCF-Bindestellen für die Promotorfragmente und den Enhancer

Der Auszug aus der ENCODE-Datenbank zeigt nachgewiesene CTCF-Bindestellen (grün markiert) sowohl im *NIPBL*-Promotorfragment F2 (A), als auch im Enhancer-Konstrukt (B). Dabei fällt auf, dass die ChIP-Seq-Signale für den Kernpromotorbereich gegenüber dem regulativen Element niedriger sind. Weiterhin zeigen die verschiedenen grauen Balken DNase I-hypersensitive Stellen in beiden Regionen an. Die in die Plasmide inserierten Fragmente sind mit entsprechenden Klammern versehen.

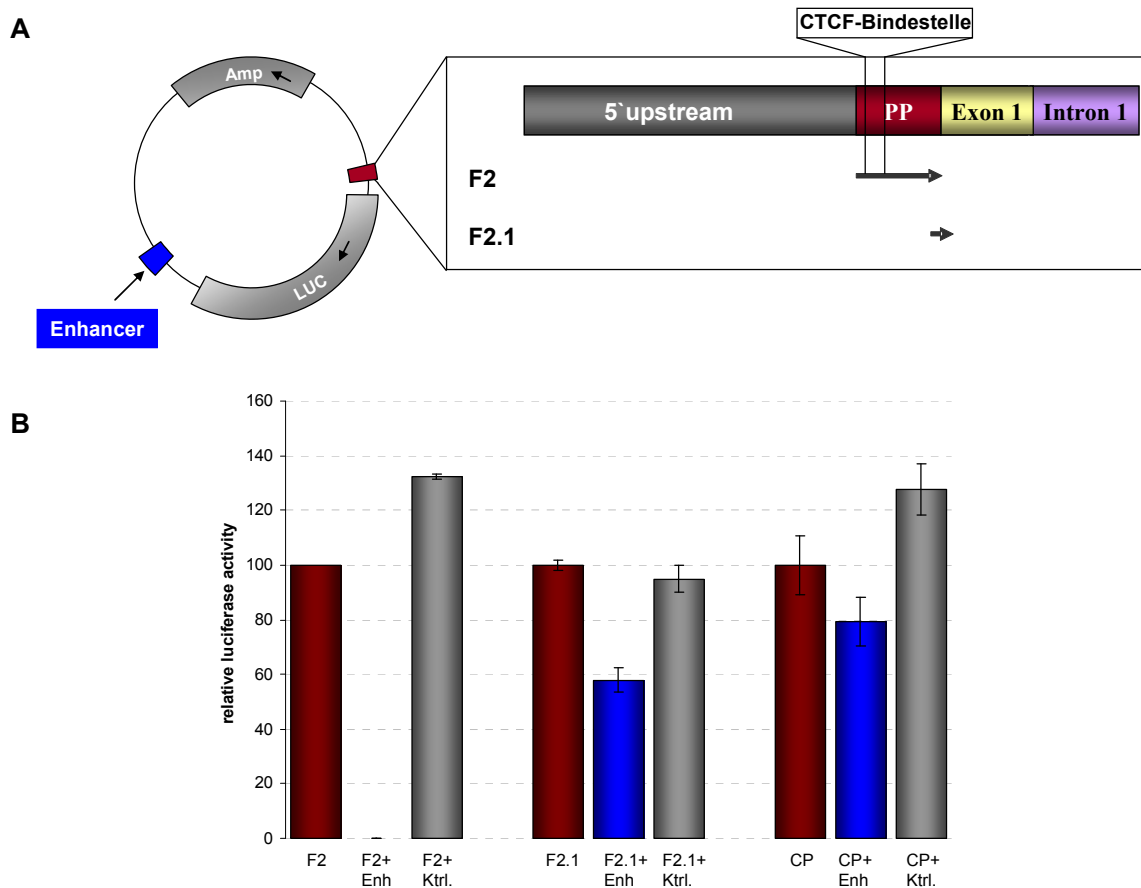
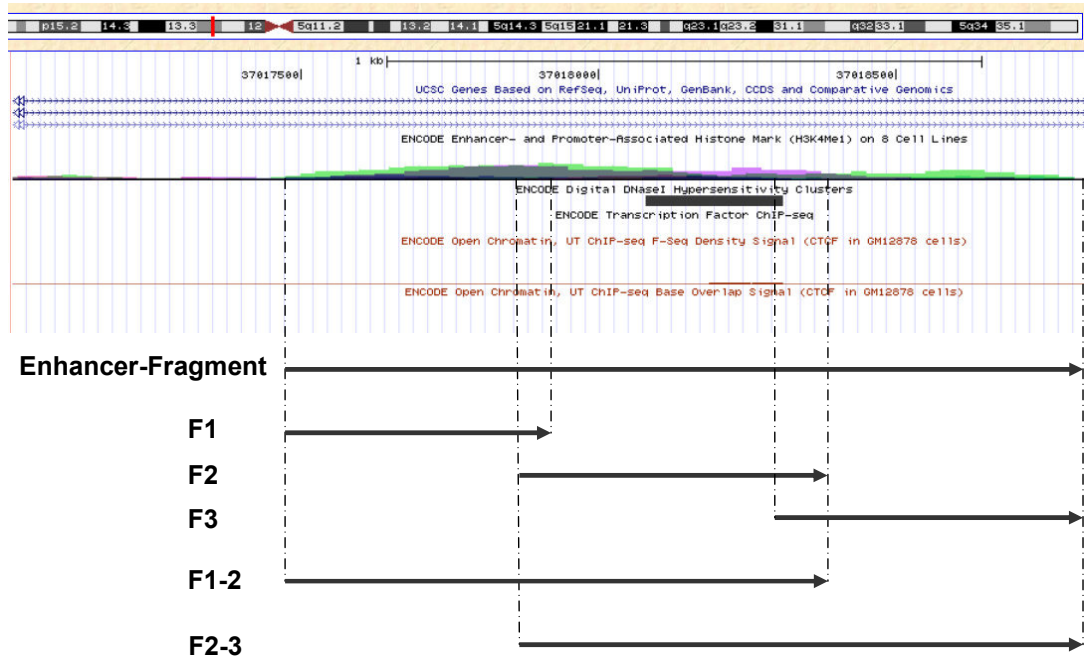


Abb.3.9.: Luciferase-Reportergen-Assay zur Analyse des potentiellen Enhancers

(A) In das Plasmid pGL4.10 mit dem 5'positionierten (rot markiert) *NIPBL*-Kernpromotorregionen F2 (1 kb, mit CTCF-Bindestelle) und F2.1 (250 bp, ohne CTCF-Bindestelle) wurde zusätzlich der potentielle Enhancer 3' zum Luciferase-Reportergen inseriert (blau markiert). (B) Im Luciferase-Assay führte die Insertion des „Enhancer-Fragmentes“ (blaue Balken) zu einer fast vollständigen Repression der Promotoraktivität von F2 (mit CTCF-Bindestelle), während die Aktivität des Promotorfragmentes 2.1 (ohne CTCF-Bindestelle) auf lediglich circa 40 % reduziert werden konnte. Die Kontrollen (nicht-funktionelles DNA-Fragment gleicher Größe, anderer Promotor) zeigten keine signifikanten Änderungen in der Promotoraktivität (graue Balken).

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung dieses regulativen Elementes wurden zusätzliche Fragmente konstruiert. Dabei wurde das Enhancer-Fragment zunächst in drei überlappende 500 bp geteilt und diese jeweils auf ihre regulative Funktion getestet (Abb.3.10. A). Da keines dieser Fragmente einen reprimierenden Effekt aufwies (Daten nicht gezeigt), wurden zwei überlappende 1 kb-Fragmente des Enhancers hergestellt und untersucht (Abb. 3.10. B). Dabei konnte für beide Konstrukte eine Repression der Promotoraktivität nachgewiesen werden. Auch hier war ein deutlicher Unterschied zwischen dem Promotorfragment mit, bzw. ohne CTCF-Bindestelle (F2/ F2.1) zu erkennen. Während das F2-Promotorfragment vollständig durch die Enhancer-Konstrukte reprimiert wurde, weist das F2.1-Promotorfragment nur eine geringe Reduktion der Aktivität auf.

A



B

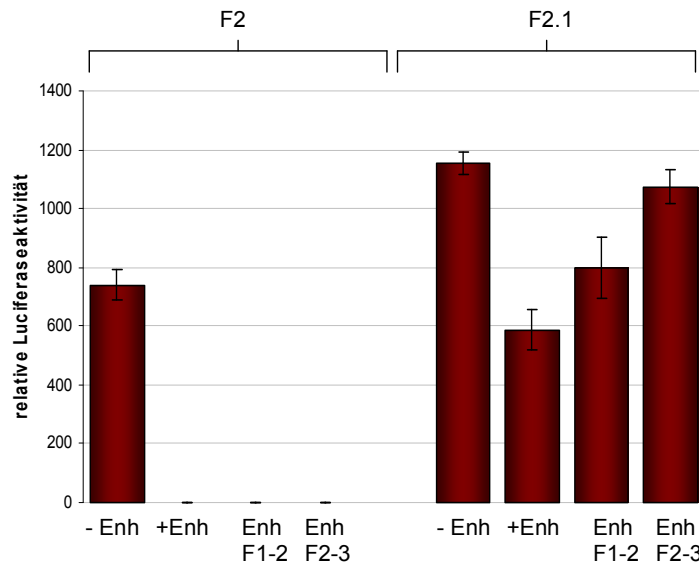


Abb.3.10: Eingrenzung des potentiellen Enhancers mittels Luciferase-Reportergen-Assay

Zur Darstellung der analysierten Fragmente ist ein Auszug aus dem UCSC-Genome Browser gezeigt. (A) Die Fragmente überspannen dabei sowohl die Bereiche mit erhöhter Histonmodifikation (H3K4me1), als auch die DNase I-hypersensitiven Stellen und die nachgewiesene CTCF-Bindestelle. In (B) sind die Ergebnisse des Luciferase-Assays in HeLa-Zellen aufgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass sowohl das Enhancer-Fragment F1-2, als auch F2-3 eine komplette Repression des *NIPBL*-Promotorfragmentes F2 (mit CTCF-Bindestelle) bewirkt. Dagegen weisen die beiden Enhancer-Fragmente nur geringfügig reprimierende Eigenschaften beim kleineren *NIPBL*-Promotorfragment F2.1 (ohne CTCF-Bindestelle) auf. Diese Ergebnisse wurden in insgesamt sechs unabhängigen Experimenten verifiziert.

3.2. NIPBL und Cohesin-assoziierte Proteine

3.2.1. NIPBL interagiert mit MAU2

3.2.1.1. Identifizierung der Interaktionsdomänen im NIPBL- und MAU2-Protein

Die bereits bekannte Interaktion von NIPBL mit MAU2 sollte in dieser Arbeit detaillierter charakterisiert werden. Dazu wurden zunächst verschiedene Fragmente von MAU2 (ENST00000392313) und NIPBL (ENST00000282516) an cDNA aus humanem, fetalem Gehirn (Clontech) amplifiziert, sequenziert und in die Hefe-Plasmide pGADT7 und pGBKT7 inseriert, um die entsprechenden Protein-Protein-Interaktionen in einem *Yeast-two-Hybrid*-Assay zu analysieren. Die NIPBL-Proteinfragmente sollten dabei mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (pGBKT7) und die MAU2-Proteinfragmente mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (pGADT7) fusioniert werden (Abb.3.11 und 3.12.). Als Leerkontrolle wurde der Vektor pGBKT7 ohne Insertion im Assay mitgeführt. Die Co-Transformation der Hefen erfolgte nach dem in Abschnitt 2.2.1.6. beschriebenen Protokoll. Hefekolonien, die auf -2-SD-Mediumplatten (-Trp/-Leu siehe 2.1.14.3.) wuchsen, wurden unter Verwendung von stringenteren Selektionsplatten (-4-SD-Medium; -Trp/-Leu/-His/-Ade) auf Interaktion von NIPBL mit MAU2 getestet. Die Eingrenzung der NIPBL-Interaktionsdomäne wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff in Philadelphia durchgeführt. Für diesen Assay wurde das MAU2-Protein zunächst in voller Länge eingesetzt. Anhand des Hefewachstums auf -4-SD-Selektionsplatten konnte die Interaktion für die N-terminalen NIPBL-Fragmente (F1, F3, F8, F9, F10, siehe Abb.3.12.) mit MAU2 nachgewiesen werden. Fragment 3 stellt dabei die bereits identifizierte MAU2-Interaktionsdomäne im NIPBL-Protein (AA 1-289) dar. Mit den NIPBL-Fragmenten 8-10 konnte die mit MAU2 interagierende Domäne auf einen Bereich von 38 Aminosäuren im N-Terminus des NIPBL-Proteins eingegrenzt werden. Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen den beiden Proteinen in ihrer vollen Länge als Kontrolle getestet. Die Expression aller Proteinfragmente wurde mittels Western Blot nachgewiesen (nicht gezeigt). Für die Eingrenzung der MAU2-Interaktionsdomäne wurde ein NIPBL-Fragment konstruiert, welches die ersten 300 Aminosäuren des Proteins umfasst, da in unserem Labor eine Expression des vollen NIPBL-Proteins in Hefen nicht möglich war. Nach erfolgreicher Klonierung und Expression der einzelnen Fragmente wurden die jeweiligen Protein-Protein-Interaktionen im beschriebenen Hefe-System durchgeführt. Dabei konnte, anhand des Wachstums der Hefekolonien auf den stringenteren -4-SD-Selektionsplatten, der Interaktionsbereich im MAU2-Protein auf die Aminosäuren 32 bis 71 eingegrenzt werden (Abb. 3.12. Hefepplatten beispielhaft für F1.1, F1.2 und F1.3).

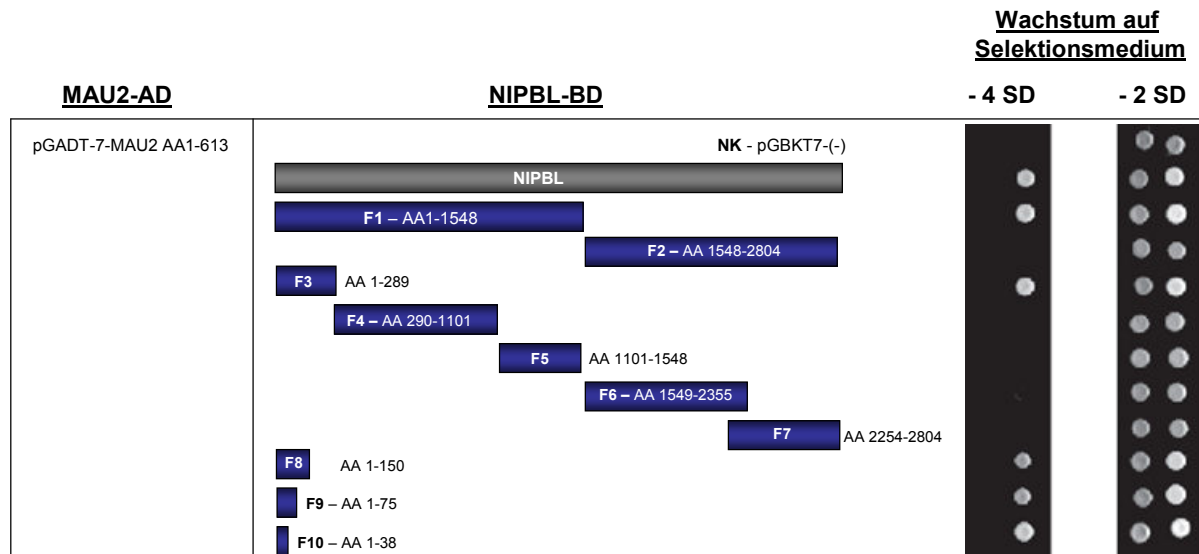


Abb.3.11: Eingrenzung der MAU2-Interaktionsdomäne in NIPBL

Diese Abbildung zeigt die unterschiedlichen NIPBL-Fragmente, die zur Eingrenzung der MAU2-Interaktionsdomäne im *Yeast-two-Hybrid*-Assay eingesetzt wurden (pGBKT7-Vektor ohne Insertion als Negativkontrolle-NK). Anhand des Wachstums auf dem stringenten -4SD-Selektionsmedium wurde die Wechselwirkung mit MAU2 für die Fragmente im N-terminalen Bereich des Proteins nachgewiesen. Für das kleinste NIPBL-Fragment (F10) konnte eine Interaktion gezeigt werden, so dass der für diese Interaktion relevante Bereich auf die ersten 38 Aminosäuren eingrenzt werden konnte.

Zusätzlich wurde die „Stärke der Interaktion“ von NIPBL mit MAU2 unter Verwendung des β -Galaktosidase-Liquid-Assays (siehe 2.2.4.8.) quantitativ analysiert (Abb. 3.12.A). Dabei konnte eine eindeutige Interaktion für die Fragmente F1, sowie F1.2 und dem volle Länge MAU2-Protein (rote Balken) und NIPBL nachgewiesen werden. Die Fragmente F1.1 und F1.3 zeigen gegenüber F1.2. eine sehr schwache β -Galaktosidase-Aktivität und zusätzlich kein Wachstum auf den Hefe-Selektionsplatten (-4-SD). Somit ließ sich die NIPBL-Interaktionsdomäne im MAU2-Protein auf einen Bereich von 39 Aminosäuren eingrenzen.

Agarosebeads gebunden. Dieser Antikörper erkennt das NIPBL-Protein im Bereich der Aminosäuren 1025 bis 1075. Für den Präzipitationsschritt wurden Lysate aus HeLa-Zellen ($20 \cdot 10^6$ -Zellen) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Immunpräzipitation mit dem Antikörper anti-IgG (Abcam). Für das NIPBL-Protein wurde ein Molekulargewicht von 306 kDa und 67 kDa für das MAU2-Protein berechnet. Die Western Blot-Analysen zeigen, dass MAU2 mit NIPBL co-präzipitiert wurde. In den Kontroll-Präzipitationen konnte weder eine unspezifische Bindung von NIPBL, noch MAU2 durch den anti-IgG-Antikörper gezeigt werden (Abb. 3.14.). Als Expressionskontrolle wurden die eingesetzten Lysate der nicht-transfizierten HeLa-Zellen aufgetragen (Input).

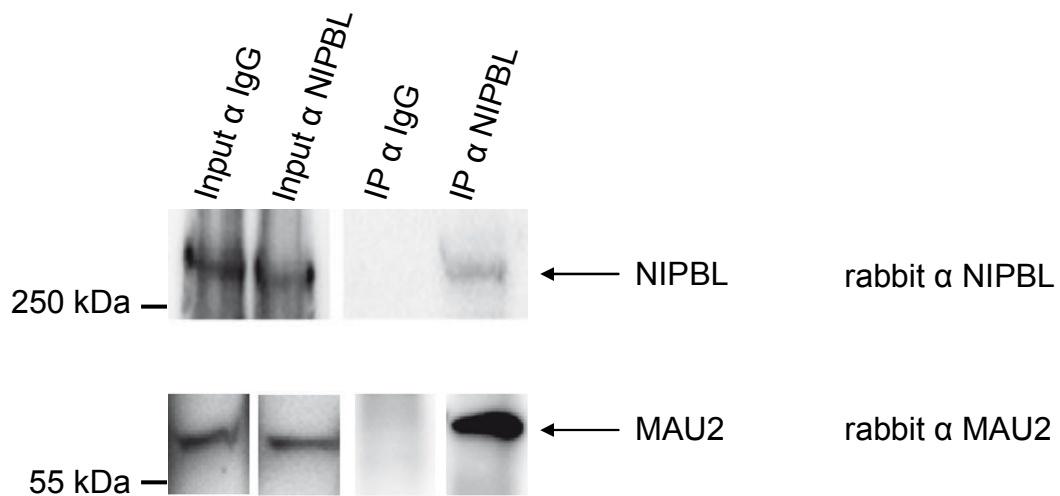


Abb. 3.13.: Co-Immunpräzipitation von NIPBL und MAU2 in HeLa-Zellen

Zur Analyse der Interaktion der endogenen Genprodukte NIPBL und MAU2 in humanen Zellen wurden Agarosebeads mit anti-NIPBL Antikörper beladen und über Nacht mit Zellextrakt aus HeLa-Zellen inkubiert. Im Western Blot wurden die präzipitierten Proteine (IP) mit den Antikörpern anti-NIPBL (Bethyl Laboratories) und anti-Scc4/MAU2 (Abcam) spezifisch nachgewiesen. Der Input diente als Expressionskontrolle für die eingesetzten Zelllysate, die sowohl für das Experiment, als auch für die Kontrolle eine vergleichbare Menge an NIPBL und MAU2 aufwies. Die Ergebnisse zeigen, dass MAU2 mit NIPBL co-präzipitiert wurde, während die Negativkontrolle mit dem anti-IgG-Antikörper kein MAU2-Protein im Eluat (IP) aufwies.

3.2.1.3. Identifizierung neuer Mutationen im NIPBL- und MAU2-Gen bei Patienten mit CdLS

Bei Sequenzanalysen von CdLS-Patienten im Children`s Hospital in Philadelphia (Matthew Deardorff) und im Institut für Humangenetik Lübeck wurden insgesamt sechs neue Mutationen identifiziert, die innerhalb der bisher bekannten, für die MAU2-Interaktionsdomäne (AA 1-289) kodierenden Region im NIPBL-Protein liegen. Zusätzlich sind zwei weitere bekannte Mutationen aus der Literatur in Tabelle 2 aufgeführt, die sich in diesem Bereich befinden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff wurde im MAU2-Gen neben vier bekannten Polymorphismen eine 15 bp Deletion im Exon 1 identifiziert, die zu einem Verlust von 5 Aminosäuren (QAAAA) führt (*in-frame*-Deletion). Die

entsprechenden Basen- und Aminosäure-Austausche, sowie die betroffenen Exone sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt. Zur ersten Einschätzung der funktionellen Relevanz dieser Mutationen wurden verschiedene *in-silico*-Analysen mit den Online-Programmen *Mutation Taster* und *PolyPhen*, sowie *ClustalW Alignments* durchgeführt. Die Programme *Mutation Taster* und *PolyPhen* dienten dabei zur Vorhersage der möglichen Auswirkungen für die jeweilige Missense Mutation im *NIPBL*-Gen (Tabelle 2). Dies erfolgt auf Grundlage verschiedener struktureller und positioneller Abgleiche der Aminosäurevarianten. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass vor allem die Aminosäureaustausche im eingegrenzten Interaktionsbereich (G15R, P29Q) und an Position P192L, sowie D246G und L254V als pathogene Mutationen vorhergesagt wurden. Eine Vorhersage für die Deletion im *MAU2*-Gen konnte nicht getroffen werden, da mit den verwendeten Programmen ausschließlich der Effekt von Einzelbasen-Substitutionen vorhergesagt werden kann. Die Analyse mit dem Programm *ClustalW Alignments* diente zur Darstellung der Sequenzkonservierung für die einzelnen Mutationspositionen im *MAU2*-Interaktionsbereich von *NIPBL* in verschiedenen Spezies (Abbildung 3.14.). Dabei ist zu sehen, dass sich die Aminosäureaustausche im N-terminalen Bereich in einer hochkonservierten Region befinden.

Tabelle 2: Bekannte und neu identifizierte NIPBL- und MAU2-Mutationen in CdLS-Patienten

MT= PP= Differenz der Profil-Berechnungen von beiden Aminosäurevarianten

Basenaustausch	AA-Austausch	Exon	<i>in-silico</i> -Mutationsanalyse	Polymorphismus
<u>NIPBL</u>				
c.43G>A	p.G15R	2	Pathogen; 0,99 (MT); 2,031 (PP)	
c.86C>A Bhuyan <i>et al.</i> 2006	p.P29Q	3	Pathogen; 0,72 (MT); 2,100 (PP)	
c.332G>C	p.S111T	4	SNP; 0,83 (MT); 1,098 (PP)	
c.535G>A	p.A179T	6	SNP; 0,71 (MT); 1,227 (PP)	rs116399820
c.575C>T	p.P192L	6	Pathogen; 0,94 (MT); 2,55 (PP)	
c.737 A>G Yan <i>et al.</i> 2006	p.D246G	7	Pathogen; 0,99 (MT); 1,899 (PP)	
c.760C>G	p.L254V	7	Pathogen; 0,95 (MT); 1,017 (PP)	
c.781T>G	p.S262A	8	SNP; 0,98 - (MT); 0,368 (PP)	
<u>MAU2</u>				
c.9_23del	p.Q4_A8del	1		

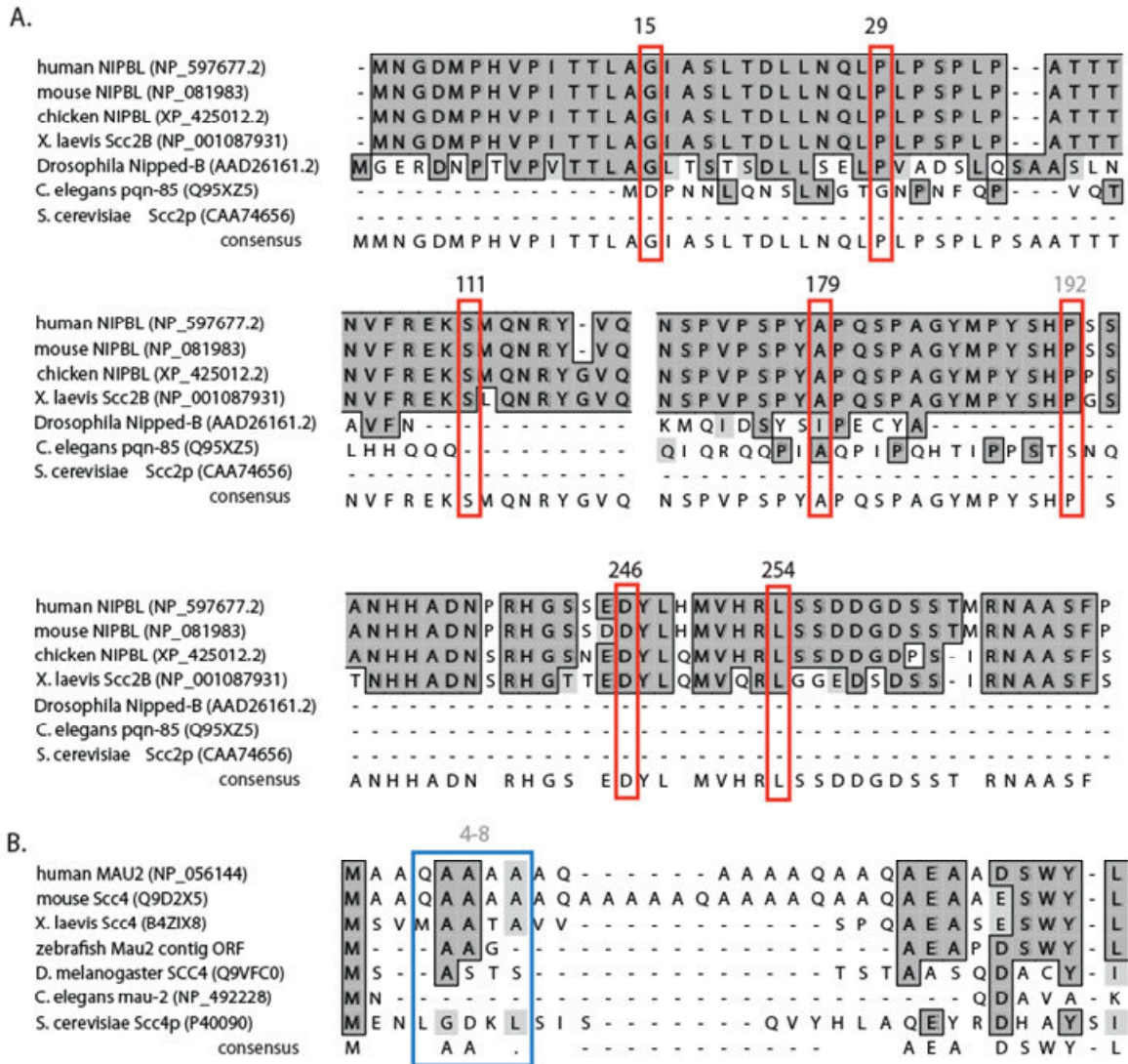


Abb.3.14.: Lokalisation und Konservierung der einzelnen Mutationen im NIPBL- und MAU2-Protein

In-silico-Analysen mit dem Programm *ClustalW Alignments* zur Darstellung der Positionen und der Konservierung der einzelnen Mutationen in NIPBL und MAU2 für die angegebenen Spezies (mit entsprechender Accessionnummer in der linken Spalte). Die grau unterlegten Kästchen zeigen dabei die Übereinstimmung mit der humanen Proteinsequenz. Die hellgrauen Kästchen verweisen auf ähnliche Aminosäuren. Die einzelnen Positionen der Mutationen sind in roten Boxen für NIPBL und in blauen Boxen für MAU2 dargestellt. Die hellgrauen Positionen (AA 192) bezeichnen Sequenzvarianten, die wahrscheinlich nicht pathogen sind.

3.2.1.4. Funktionelle Charakterisierung der identifizierten *NIPBL*-Mutationen

Zur Darstellung der funktionellen Relevanz dieser identifizierten Mutationen für die Interaktion von NIPBL mit MAU2, sollte der Protein-Interaktions-Assay *Mammalian-two-Hybrid* (M2H) im humanen Zelllinien angewendet werden. Dafür wurden die in den Patienten identifizierten Mutationen mittels Mutagenese-PCR (2.2.3.1.) in die entsprechenden *NIPBL*-Fragmente (AA 1-300) eingeführt. Die Fragmente des NIPBL-Proteins wurden als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (pCMV-BD) und des MAU2-Proteins als Fusion mit der Aktivierungsdomäne NFκB (pCMV-AD) exprimiert. Mittels Western Blot wurden gleiche

Expressionslevel für die eingesetzten Fusionsproteine unter Verwendung des anti-NF κ B (AD)- und des anti Gal4-BD-Antikörpers (Santa Cruz) nachgewiesen, um Effekte im Assay durch verminderte, bzw. erhöhte Expressionen oder Stabilitätseffekte einzelner Mutationen auszuschließen (Abb. 3.15.). Dabei betrug das Molekulargewicht der BD-Fusionsproteine 60 kDa und der AD-Fusionsproteine 72 kDa. Der M2H-Assay wurde in HeLa-Zellen, wie in Abschnitt 2.2.4.8. beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden mittels FuGENE transfiziert und 24 h später zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität lysiert. Die relative Luciferase-Aktivität ist dabei ein Maß für die Stärke der Interaktion zwischen NIPBL und MAU2 und somit für die Bildung des Adherin-Komplexes (Abb.3.15.). Als Negativkontrollen wurden die Vektoren pCMV-BD und pCMV-AD eingesetzt. Die Bildung des Adherin-Komplexes ist für die Mutationen G15R und P29Q nahezu komplett aufgehoben, während für die anderen untersuchten Mutationen keine signifikante Veränderung der Bindeeigenschaften nachgewiesen wurde. Dies geht einher mit den hier im Hefe-System durchgeführten Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, dass sich die Interaktionsdomäne im NIPBL-Protein innerhalb der ersten 39 Aminosäuren befindet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse in weiteren Zelllinien (HEK293, U2OS) bestätigt.

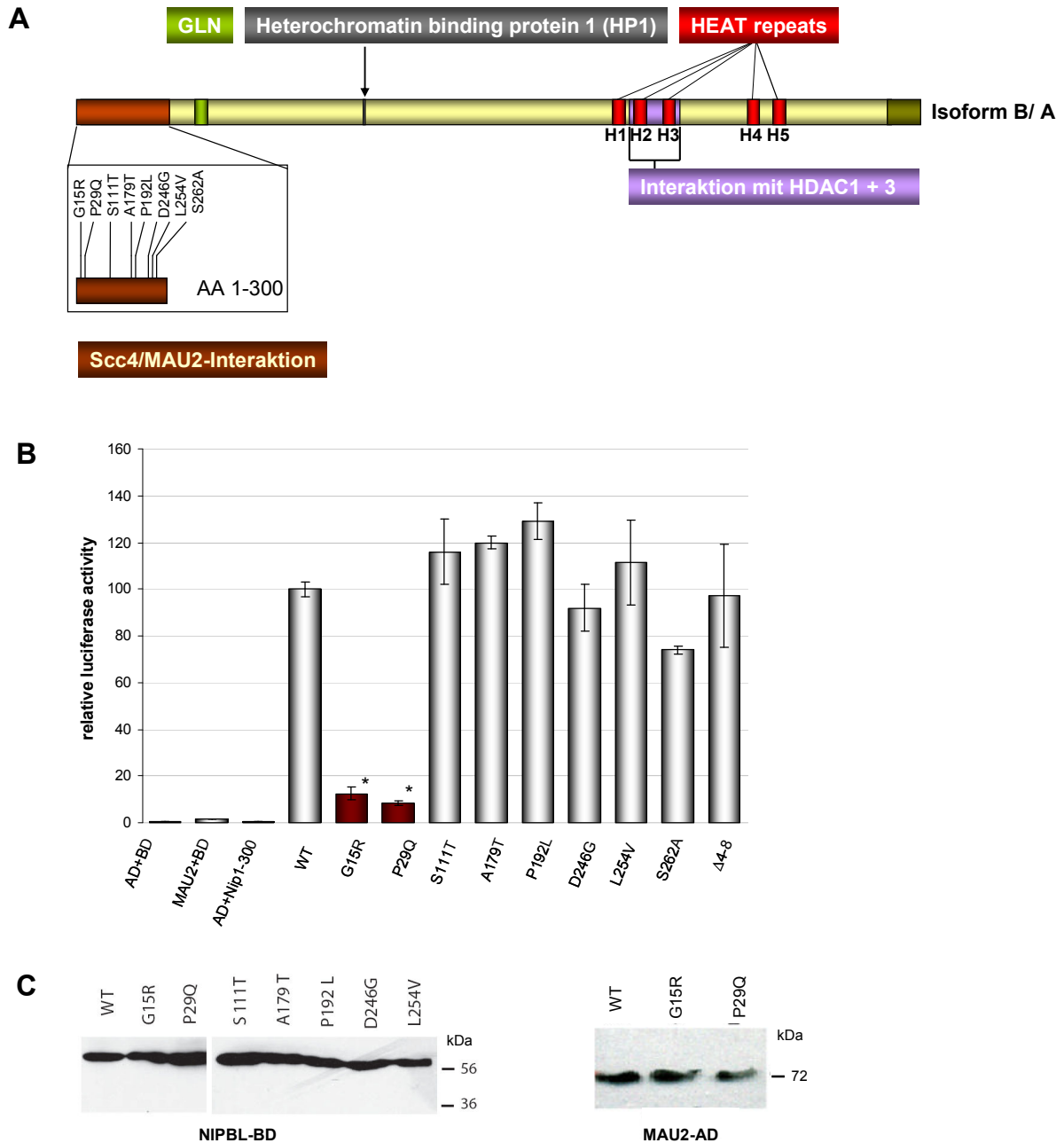


Abb. 3.15.: Untersuchung der funktionellen Relevanz der identifizierten Mutationen in *NIPBL*

In (A) sind sowohl die bisher nachgewiesenen Interaktionen von NIPBL und anderen Proteinen, als auch die Positionen der analysierten Mutationen innerhalb der bisher bekannten MAU2-Interaktionsdomäne im NIPBL-Protein dargestellt. In (B) sind die relativen Luciferase-Aktivitäten für die einzelnen *NIPBL*-Mutationen und den Wildtyp gezeigt. Die Ergebnisse wurden in neun unabhängigen Versuchen verifiziert. Während die meisten Aminosäureaustausche keine signifikante Änderung in der Interaktionsstärke von NIPBL und MAU2 aufwiesen, verursachten die Mutationen G15R und P29Q einen fast vollständigen Verlust der Interaktion ($p=0,02$). (C) Für die Expressionskontrollen wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen (HeLa) ausgesät und mit den jeweiligen AD und BD-Plasmiden co-transfiziert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem anti-Gal4-BD-(Santa Cruz), bzw. anti-NF κ B-Antikörper nach Protokoll. Für die Mutationen G15R und P29Q ist hier die AD-Expressionskontrolle zusätzlich dargestellt.

3.2.1.5. Co-Lokalisierung von NIPBL und MAU2 in lymphoblastoiden Zellen

Um einen möglichen Effekt der G15R-Mutation auf die intrazelluläre Lokalisierung von NIPBL und MAU2 zu untersuchen, wurde eine immunocytochemische Färbung mit Antikörpern gegen das endogene NIPBL (Bethyl Laboratories) und MAU2 (Abcam) in lymphoblastoiden des Patienten durchgeführt. Im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin wurde die lymphoblastoide Zelllinie aus dem Patienten mit der Mutation G15R unter der Leitung von Professor Heidemarie Neitzel generiert. Die Sekundärantikörper anti-rat, gekoppelt mit Alexa Fluor 488 und anti-rabbit, gekoppelt mit Alexa Fluor 555 (beide von Invitrogen), wurden für die Fluoreszenzmarkierung verwendet. Die Färbung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.6. beschrieben in lymphoblastoiden Zellen des CdLS-Patienten mit der Mutation G15R und einer Kontrolle. Die Auswertung der Immunfluoreszenz wurde in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie am konfokalen Laserscanning Mikroskop von Leica unter Anleitung von Dr. Olaf Jöhren und Dr. Andreas Dendorfer mit der Software des Herstellers durchgeführt. Dabei konnten beide Proteine im Zellkern nachgewiesen werden (Abb.3.16.). Die Immunfärbung zeigte somit, dass die intrazelluläre Lokalisierung der beiden Proteine NIPBL und MAU2 durch die Mutation G15R nicht verändert wurde.

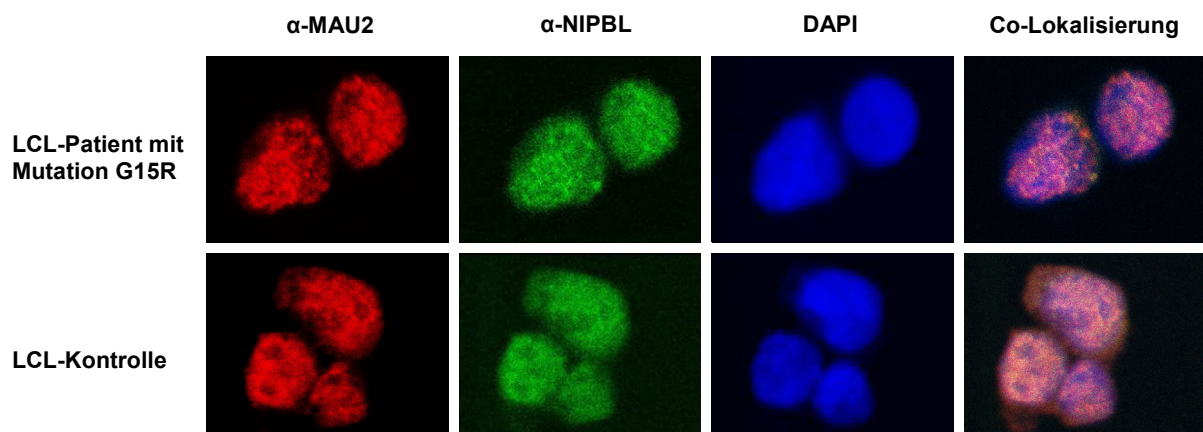


Abb. 3.16.: Co-Lokalisierung von NIPBL und MAU2 in lymphoblastoiden Zelllinien

Für die Immunfärbung wurden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen (LCL) des Patienten mit der Mutation G15R und der Kontrolle direkt aus der Kultur entnommen und die Proteine NIPBL und MAU2 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zusätzlich erfolgte eine Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau). In der Co-Lokalisierung ist zu erkennen, dass in beiden Proben sowohl NIPBL (grün), als auch MAU2 (rot) im Nukleus lokalisiert sind. Damit konnte gezeigt werden, dass trotz der stark verminderten Interaktion von NIPBL mit MAU2, durch die Mutation G15R, die Lokalisierung der beiden Proteine nicht verändert war.

3.2.1.6. Die Mutation G15R hat keinen Effekt auf die Schwesterchromatidpaarung

Zum Nachweis der intakten Schwesterchromatidenpaarung (Kohäsion) wurde der *Precocious sister chromatid-separation* (PSCS) - Assay (2.2.2.6.) in lymphoblastoiden Zellen durchgeführt. Die normale Trennung der Schwesterchromatiden findet in der Anaphase im Verlauf der Mitose statt. Bei der Durchführung des PSCS-Assays erfolgte zunächst eine Arretierung der Zellen in der Metaphase durch Zugabe von Colchicin. Nach der Fixierung folgte dann die Färbung mit Wright's Stain (Thermo Fisher) zur Markierung der Chromosomen. Durch diese Anfärbung sollte die Paarung der Schwesterchromatide gezeigt werden. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine lymphoblastoide Zelllinie einer Kontrollperson untersucht. Es wurden dabei jeweils 15 Mitosen ausgezählt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Paarung der Chromatiden durch die Mutation G15R in NIPBL nicht nachweislich beeinträchtigt wird (Abb. 3.17.). Alle Chromatiden sind in der Metaphase miteinander verbunden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation G15R keinen detektierbaren Effekt auf die Schwesterchromatidpaarung hatte.

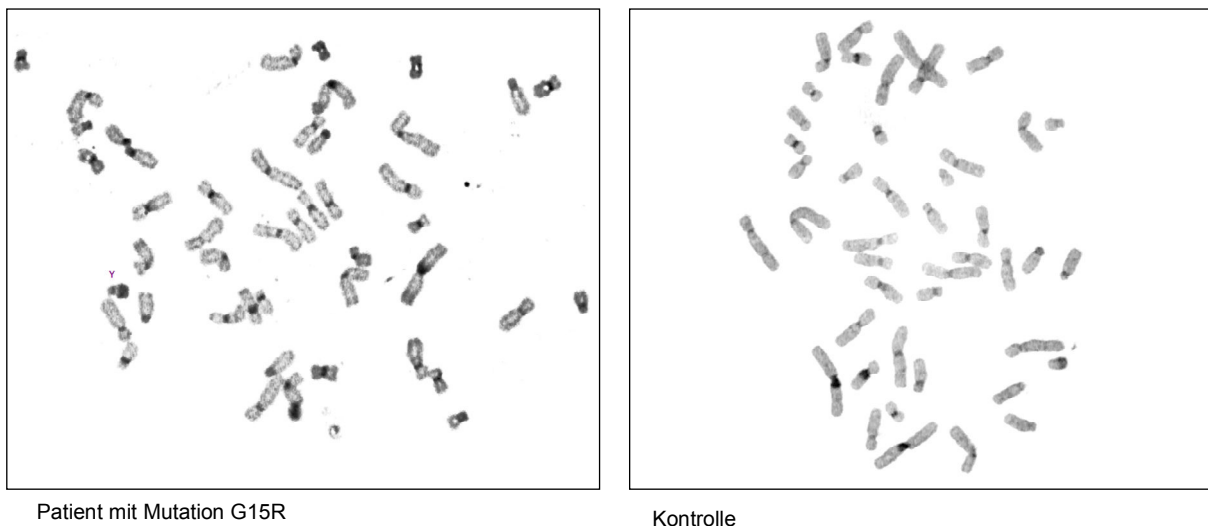


Abb. 3.17.: Untersuchung der Schwesterchromatidpaarung

Mit dem PSCS-Assay (*Precocious sister chromatid separation*) wurde die Schwesterchromatidpaarung in der lymphoblastoiden Zelllinie aus dem Patienten mit der Mutation G15R analysiert. Dabei ist zu erkennen, dass alle Chromosomen in der Metaphase gepaart auftreten. Somit hat der Aminosäureaustausch keinen Effekt auf die Kohäsion der Chromatiden.

3.2.1.7. Klinische Merkmale der Patienten mit NIPBL-Mutationen und MAU2-Varianten

Um eine physiologische Relevanz der Mutationen G15R und P29Q im Cornelia-de-Lange-Syndrom zu untersuchen, wurden die klinischen Daten beider Patienten detailliert analysiert und mit denen anderer Patienten mit CdLS verglichen. Eine ausführliche Darstellung der klinischen Daten ist im Anhang an diese Arbeit angefügt. Beide Patienten zeigen die für CdLS charakteristischen Gesichtszüge und kleine Hände (Abb. 3.18.). Zusätzlich weisen

beide Patienten eine verzögerte geistige Entwicklung und mentale Retardierung auf, wobei diese beim Patienten mit der Mutation G15R stärker ausgeprägt ist. Dieser Patient spricht z.B. im Alter von elf Jahren nur wenige Wörter. Es bleibt aber festzuhalten, dass Vergleiche der klinischen Manifestation keine signifikanten Unterschiede zu anderen Patienten mit Missense-Mutationen außerhalb der für die MAU2-Interaktion kritischen Region im *NIPBL*-Gen aufzeigen konnten.



Abb. 3.18.: Faziale Merkmale und Hand-Fehlbildungen der Patienten mit *NIPBL*-Mutationen/ *MAU2*-Varianten

In dieser Abbildung sind die Gesichter und teilweise Hände der einzelnen Patienten mit den analysierten Mutationen aufgeführt. Sehr charakteristisch sind die Synophrys, sowie das lange Philtrum und die dünne Oberlippe der Patienten. Die Veränderungen an den Händen sind eher mild: proximal angesetzter Daumen, Verkürzung des 4. und 5. Strahls.

3.2.2. Identifizierung des *NIPBL*-Interaktionspartners *HDAC8*

In der Einleitung wurde *HDAC8* bereits als ein neues CdLS-assoziiertes Gen beschrieben. In Mutationsanalysen wurden bisher über zehn Missense-Mutationen unter anderem im Institut für Humangenetik (Lübeck) identifiziert (Manuskript in Vorbereitung). Diese Mutationen führen zu einer verminderten aber sehr unterschiedlich stark ausgeprägten Deacetylase-Funktion von *HDAC8*. Während einige dieser Mutationen einen fast vollständigen Deacetylase-Funktionsverlust von *HDAC8* bewirken, zeigten andere Mutationen nur moderate Veränderungen der Enzymaktivität (Restaktivität von 85-90%, hier nicht gezeigt). Da die entsprechenden Patienten klinisch nicht wirklich differenziert werden können, ist eine

andere bzw. zusätzliche pathophysiologische Ursache dieser Mutationen naheliegend. In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits die ebenfalls zur Klasse I der HDACs gehörenden HDAC1 und HDAC3 als Interaktionspartner von NIPBL beschrieben werden ⁶⁸. Daher sollte geprüft werden, ob HDAC8 ein weiterer Interaktionspartner des NIPBL-Proteins darstellt. Mittels *in-silico*-Analysen mit dem Programm PRSS3 von EMBnet (Schweiz) wurden zunächst die Proteinsequenzen der bereits beschriebenen NIPBL-Interaktionspartner HDAC1 (NM_004964.2, NP_004955.2) und HDAC3 (NM_003883.3, NP_003874.2) mit HDAC8 (NM_001166418.1, NP_001159890.1) auf konservierte Regionen untersucht. Die drei Histondeacetylasen weisen viele Übereinstimmungen (43 %) in der Aminosäuresequenz auf (Abb.3.19.). Dabei handelt es sich um Proteinregionen, die auch im Vergleich zwischen HDAC1 und 3 große Ähnlichkeiten zeigen (rote Kästchen). Die Analyse mit HDAC6, für das keine Interaktion mit NIPBL nachgewiesen wurde, ⁶⁸ wies hingegen deutliche Unterschiede in der Proteinstruktur im Vergleich zu den Klasse-I-Histondeacetylasen 1, 3 und 8 auf (Übereinstimmung der Aminosäuresequenz circa 27 %).

Ergebnisse

43.1% identity in 341 residues overlap; Score: 811.0; Gap frequency: 0.6%

```

HDAC1, 32 PHRIRMTHNLLNLYGLYRKMIEYRPHKANAEEMTKYHSDDYIKFLRSIRPDNMSEYSKQM
HDAC8, 35 PKRASMVHSLIEAYALHKQMRIVKPKVASMEEMATPHDAYLQHLQKVSQEGDDHPDSI
    * * * * *
HDAC1, 92 QRFNVGEDCPVFDGLFEFCQLSTGGSVASAVKLNKQQTDAVNWAGGLHHAKKSEASGFC
HDAC8, 95 E-YGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDGHCKVAINWSGGWHHAKKDEASGFC
    * * * * *
HDAC1, 152 YVNDIVLAILLELLKYHORVLYIDIIHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFHKYGE-YFPGTGD
HDAC8, 154 YLNDAVLGILRLRRKFERILYVDLILHHGDGVEDAFSFTSKVMTVSLHKFSPGFFPGTGD
    * * * * *
HDAC1, 211 LRDIGAGKGYAVNYPVLRDGIIDESYEAIFKPVMSKVMEMFQPSAVVLQCGSDSLSGDR
HDAC8, 214 VSDVGLGKGYVSNVPIQDGIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQGLGADTIAGDP
    * * * * *
HDAC1, 271 LGCFNLTIKGHAKCVEFKSFNPLMLLGGGGYTI RNVARCWTYETAVALDTEIPNELPY
HDAC8, 274 MCSFNMTFVIGKCLKYILQWLATLILGGGGYNLANTARCWTYLTGVILGKTLSSSEIPD
    * * * * *
HDAC1, 331 NDYFEYFGPDFKLHISPSNMTNQNTNEYLEKIKQRLFENLR
HDAC8, 334 HEFFTAYGPDYVLEITPSCRPNRNEPHRIQQILNYIKGNLK
    * * * * *
    
```

HDAC1 vs. HDAC8

43.0% identity in 342 residues overlap; Score: 786.0; Gap frequency: 0.6%

```

HDAC3, 26 PHRLALTHSLVLYHYGLYKKMIVFKPYQASQHDRCRFHSEYIDFLQRVSPTNMQGFTKSL
HDAC8, 35 PKRASMVHSLIEAYALHKQMRIVKPKVASMEEMATPHDAYLQHLQKVSQEGDDHPDSI
    * * * * *
HDAC3, 86 NAFNVGDDCPVFPGLFEFCRYTGASLQGATQLNKKICDAINWAGGLHHAKKFEASGFC
HDAC8, 95 E-YGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDGHCKVAINWSGGWHHAKKDEASGFC
    * * * * *
HDAC3, 146 YVNDIVIGILELLKYHPRVLYIDIIHHGDGVQEAFLYTTDRVMTVSFHKYGNVYFPGTGD
HDAC8, 154 YLNDAVLGILRLRRKFERILYVDLILHHGDGVEDAFSFTSKVMTVSLHKFSPGFFPGTGD
    * * * * *
HDAC3, 206 MYEVAESGRYYCLNVPLRDGIDDSYKHLFQPVINQVDFYQPTCIVLQCGADSLGCDR
HDAC8, 214 VSDVGLGKGYVSNVPIQDGIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQGLGADTIAGDP
    * * * * *
HDAC3, 266 LGCFNLSIRGHGECVEYKSFNIPMLLGGGGYTVRNVARCWTYETSLLVEEAISEELPY
HDAC8, 274 MCSFNMTFVIGKCLKYILQWLATLILGGGGYNLANTARCWTYLTGVILGKTLSSSEIPD
    * * * * *
HDAC3, 326 SEYFEYFAPDFTLHPDVSTRIENQNSRQYLDQIRQTIENLK
HDAC8, 334 HEFFTAYGPDYVLEITPSCR-PDRNEPHRIQQILNYIKGNLK
    * * * * *
    
```

HDAC3 vs. HDAC8

62.3% identity in 390 residues overlap; Score: 1407.0; Gap frequency: 0.5%

```

HDAC3, 3 KTVAYFYDFDVGNFHYGAGHPMKPHRLALTHSLVLYHYGLYKKMIVFKPYQASQHDRCRFH
HDAC1, 9 RVCYYYDGDVGNYYGQGHPMKPHRIRMTNLLNLYGLYRKMIEYRPHKANAEEMTKYH
    * * * * *
HDAC3, 63 SEDYIDFLQRVSPTNMQGFTKSLNAFNVGDDCPVFPGLFEFCRYTGASLQGATQLNKKI
HDAC1, 69 SDDYIKFLRSIRPDNMSEYSKQMQRNFNVGEDCPVFDGLFEFCQLSTGGSVASAVKLNKQQ
    * * * * *
HDAC3, 123 CDAINWAGGLHHAKKFEASGFCYVNDIVIGILELLKYHPRVLYIDIIHHGDGVQEAFLY
HDAC1, 129 TDAINWAGGLHHAKKSEASGFCYVNDIVLAILLELLKYHORVLYIDIIHHGDGVEEAFY
    * * * * *
HDAC3, 183 LTDRVMTVSFHKYGNVYFPGTGLMYEVAESGRYYCLNVPLRDGIDDSYKHLFQPVINQ
HDAC1, 185 TTDRVMTVSFHKYGEYF-PGTGLLRDYGAGKGYAVNYPVLRDGIIDESYEAIFKPVMSK
    * * * * *
HDAC3, 243 VDFYQPTCIVLQCGADSLGCDRLGCFNLSIRGHGECVEYKSFNIPMLLGGGGYTVRN
HDAC1, 248 VMEMFQPSAVVLQCGSDSLSGDRLGCFNLTIKGHAKCVEFKSFNIPMLLGGGGYTI RN
    * * * * *
HDAC3, 303 VARCWTYETSLLVEEAISEELPYSEYFEYFAPDFTLHPDVSTRIENQNSRQYLDQIRQTI
HDAC1, 308 VARCWTYETAVALDTEIPNELPYNDYFEYFGPDFKLHISPSN-MTNQNTNEYLEKIKQRL
    * * * * *
HDAC3, 363 FENLKMNLHAPSVQIHDVADLLTYDRTDE
HDAC1, 367 FENLRMLPHAPGVQMAIPEDAIPEESGDE
    * * * * *
    
```

HDAC3 vs. HDAC1

Abb. 3.19.: Sequenzvergleich von HDAC8 und HDAC1, sowie HDAC3 mit dem *in-silico*-Programm PRSS3

Der Vergleich der Proteinstrukturen zeigt, dass die NIPBL-Interaktionspartner HDAC1 und HDAC3 große Homologien zu HDAC8 aufweisen. Im blauen Kästchen ist die jeweilige Übereinstimmungsrate und in den roten Kästchen die Regionen mit großer Ähnlichkeit markiert. HDAC1 und 3 zeigen 62%, HDAC8 und HDAC1, bzw. HDAC3 jeweils 43 % Gemeinsamkeiten in ihrer Proteinsequenz.

3.2.2.1. NIPBL interagiert mit HDAC8 in humanen Zellen

Die Ergebnisse der *in-silico*-Analysen unterstützten die Annahme, dass auch HDAC8 ein Interaktionspartner des NIPBL-Proteins sein könnte. Dies sollte zunächst durch eine Co-Immunpräzipitation in transfizierten humanen Zell-Systemen untersucht werden. Dazu wurde zunächst der proteinkodierende Bereich von HDAC8 mittels PCR an cDNA aus humanem, fetalen Gehirn (Clontech) amplifiziert, sequenziert und anschließend in den Expressionsvektor pFLAG (Clontech, basierend auf pGFP-N3) inseriert, so dass ein HDAC8-FLAG-Fusionskonstrukt generiert wurde. Das Molekulargewicht des HDAC8-FLAG-Proteins betrug insgesamt 45 kDa. Nach durchgeführter Expressionskontrolle von HDAC8-Flag über einen Western Blot mit einem anti-FLAG-Antikörper (Sigma Aldrich) wurden circa $5,0 \cdot 10^6$ HEK293-Zellen für die Transfektion mittels FuGENE (Promega), bzw. X-treme Gene (Roche) ausgesät. Diese wurde 24 Stunden später, wie in Abschnitt 2.2.2.5. beschrieben, durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation, erfolgten der Zellaufschluss mit RIPA-Puffer und anschließend die Bindung an die mit anti-NIPBL (KT55)-Antikörper-gekoppelte Agarosematrix (siehe 2.2.4.8.) Nach zwei Waschschritten mit RIPA-Puffer erfolgte die Elution der gebundenen Proteine im SDS-Probenpuffer.

Der Western Blot mit den Antikörpern anti-FLAG und anti-NIPBL (KT55) zur spezifischen Detektion der beiden Proteine, zeigte die Co-Präzipitation von HDAC8 und NIPBL (Abb. 3.20.). Der gleiche Ansatz wurde mit einem nicht-relevanten Antikörper (α -GFP-Abcam) wiederholt, um die Spezifität der Co-Immunpräzipitation nachzuweisen. In dieser Kontrolle fand keine Bindung von HDAC8-FLAG statt. Somit zeigten die Ergebnisse eine spezifische Interaktion zwischen NIPBL und HDAC8.

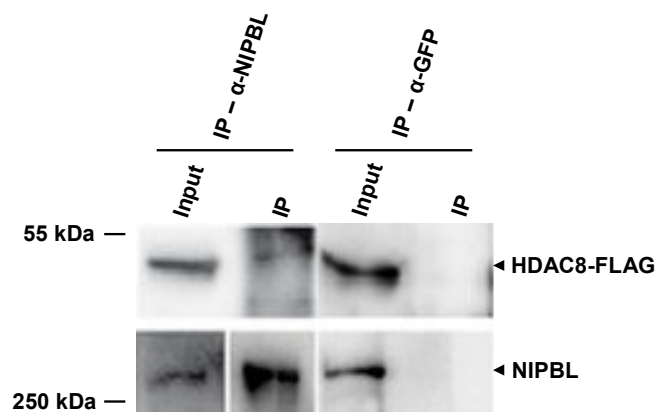


Abb. 3.20.: Co-Immunpräzipitation von NIPBL und HDAC8

Die Experimente wurden in HDAC8-FLAG-überexprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Der Input stellt die Expressionskontrolle in den Zellextrakten dar. Mit dem Antikörper α -NIPBL (KT55) wurde NIPBL präzipitiert (IP). Die Bindung des überexprimierten HDAC8-FLAG wurde mit dem anti-FLAG-Antikörper spezifisch nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz mit dem für diese IP nicht-relevanten Antikörper anti-GFP (Grünfluoreszierendes Protein) analysiert. Dabei erfolgte keine Bindung der beiden Proteine.

3.2.2.2. Eingrenzung der HDAC8-Interaktionsdomäne in NIPBL

Zur Verifizierung und näheren Charakterisierung der identifizierten Wechselwirkung von NIPBL und HDAC8, sollte die Interaktionsdomäne im NIPBL-Protein mittels *Yeast-two-Hybrid*-Analysen untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Fragmente von NIPBL und der vollständige kodierende Bereich von HDAC8 mittels PCR jeweils an Plasmid-DNA amplifiziert, sequenziert und anschließend in die Hefevektoren inseriert (Abb. 3.21.). Die NIPBL-Fragmente wurden dabei als Fusionsproteine mit der GAL4-DNA-Bindedomäne und die des HDAC8-Proteins als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf der NIPBL-Region, für die bereits die Interaktion mit HDAC1 und 3 gezeigt werden konnte. In diesem Bereich wurden kleinere Fragmente mit einer Länge von 300 (F3a-c), bzw. 102 (NipHeat) Aminosäuren konstruiert und in den Hefevektor pGBKT7 inseriert. Nach Co-Transformaton der Hefen mit den jeweiligen NIPBL-Konstrukten und HDAC8 in voller Länge, wurden die transformierten Klone auf -4-SD-Platten ausgestrichen. Da für alle NIPBL-Fragmente kein Wachstum der Hefen auf diesen Platten zu verzeichnen war und auch der quantitative Assay (Abb. 3.21.) keine Aktivität des β -Galaktosidase-Enzyms aufwies, ist es wahrscheinlich, dass keines der untersuchten NIPBL-Fragmente direkt mit HDAC8 interagiert. Als Expressionskontrolle wurden Western Blot Analysen für alle Konstrukte durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Darstellung der Interaktion mit MAU2 in voller Länge für das NIPBL-F1-Fragment.

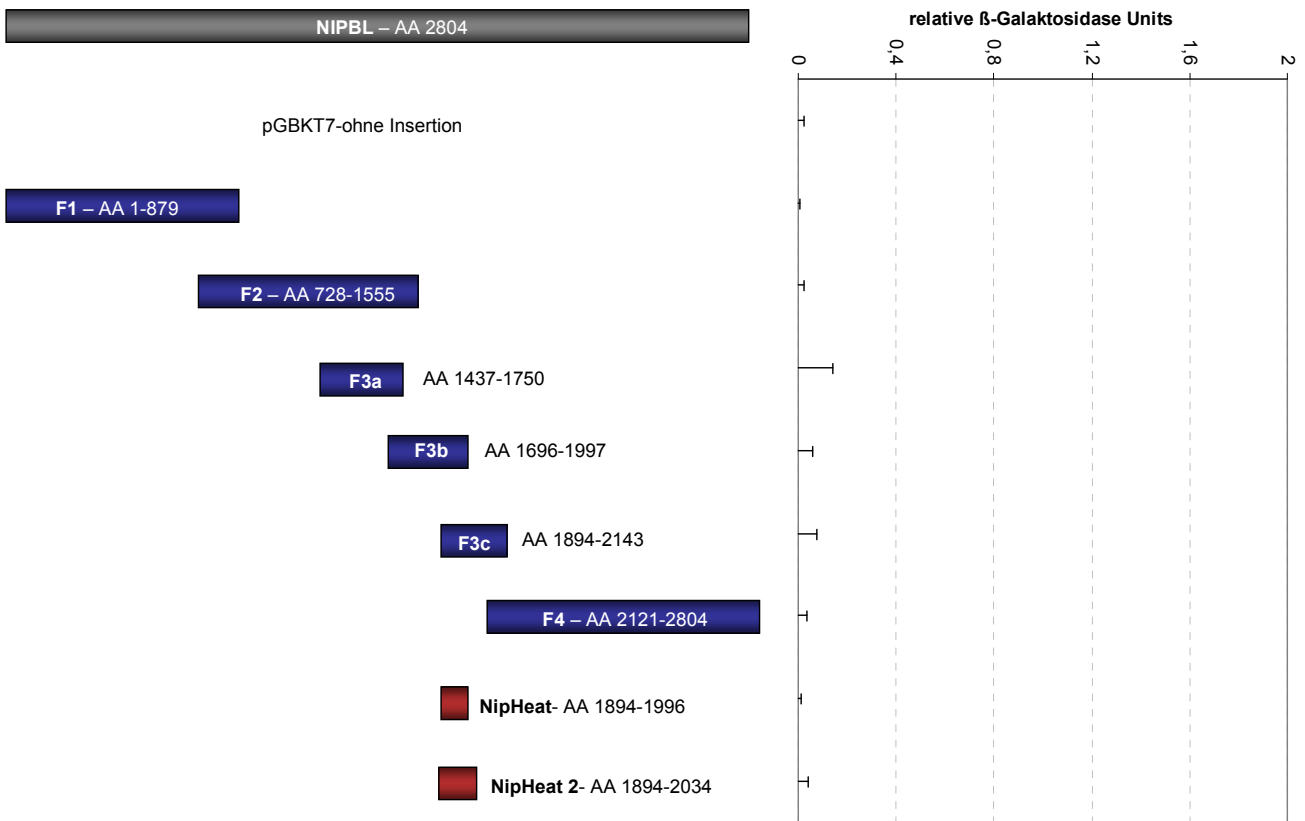


Abb. 3.21.: Yeast-two-Hybrid-Assay zur Identifizierung der HDAC8-Interaktionsdomäne

In dieser Abbildung sind auf der linken Seite die untersuchten NIPBL-Fragmente und deren Position im Protein dargestellt. Nach der Hefetransformation mit den einzelnen NIPBL-Fragmenten im BD-Vektor und HDAC8 im AD-Vektor wurde das Wachstum auf den -4-SD-Selektionsplatten (-Trp, -His, -Ade, -Leu) untersucht. Für keines der NIPBL-Fragmente konnte eine Interaktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden mit dem β-Galaktosidase-Assay quantifiziert. Die β-Galaktosidase-Units sind im rechten Teil der Abbildung für die jeweiligen Fragmente gezeigt. Als Negativkontrolle wurde der pGBKT7 (BD)-Vektor ohne Insertion eingesetzt. Die Expression aller Fragmente wurde mittels Western Blot Analysen nachgewiesen.

3.2.3. Interaktion von NIPBL mit dem Co-Repressor SIN3A

In vorherigen Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe und unabhängig dazu in der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff (Philadelphia) konnte in *Yeast-two-Hybrid*-Experimenten ein weiterer potentieller Interaktionspartner von NIPBL, der Co-Repressor SIN3A, identifiziert werden (Daten in Bearbeitung). Dieses Protein enthält mehrere sogenannte *paired amphipathic helix repeats* (PAH repeats), die bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen. Neben diesen PAH repeats ist eine weitere, funktionelle Proteinregion, die *HDAC interacting domain*, in der NCBI-Datenbank – konservierte Domänen - (NM_001145358.1, NP_001138830.1) dokumentiert (Abb. 3.22.). Diese mit Histondeacetylasen interagierende Domäne (rot markiert) ist bei der Bindung von

HDACs der Klasse I von Bedeutung, wie es bereits in einigen Arbeiten^{5,38} dokumentiert wurde.

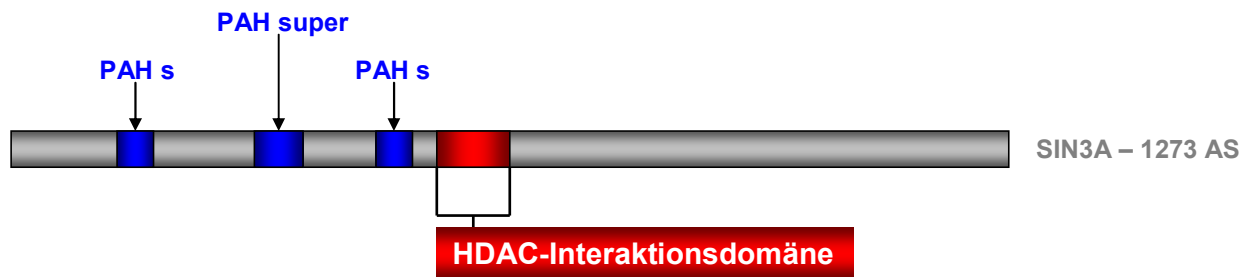


Abb. 3.22.: Konservierte Domänen im SIN3A-Protein

Diese Abbildung zeigt die konservierten Domänen von SIN3A (NP_056292), die in der NCBI-Datenbank dokumentiert sind. Dabei treten besonders die PAH (*paired amphipathic helix repeats*)-Regionen (blau), für Protein-Protein-Interaktionen, sowie die HDAC-interagierende Domäne (rot) hervor.

In dieser Arbeit sollte die erstmalig in der Hefe gefundene Interaktion zwischen NIPBL und SIN3A mittels Co-Immunpräzipitation in einem humanen Zell-System bestätigt werden. Da NIPBL in voller Länge auch unter Verwendung verschiedener Tags, Fusionsproteine und humanen Zelllinien nicht nachweisbar überexprimiert werden konnte und für beide Proteine spezifische Antikörper erhältlich sind, erfolgten die im weiteren Verlauf dargestellten Experimente in nicht transfizierten nativen HeLa-Zellen. Für die Versuche wurden jeweils $20 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt und diese in RIPA-PIC-Lösung lysiert. Der anti-SIN3A-Antikörper (10 μ l; Santa Cruz) wurde wie in Abschnitt 2.2.4.8. beschrieben an die Agarosematrix gekoppelt und anschließend mit dem HeLa-Zellextrakt inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit RIPA-Puffer, erfolgte die Elution im SDS-Laemmli-Puffer. Im Western Blot (siehe 2.2.4.5.) wurden die Proteine dann mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern (α -NIPBL (Bethyl) und α -SIN3A (SantaCruz)) detektiert. Als Negativkontrolle wurde die Immunpräzipitation (IP) mit einem nicht-relevanten Kontroll-Antikörper (α -IgG; Abcam) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Als Expressionskontrolle wurden dabei die eingesetzten Lysate (Input) aufgetragen. Es ist zu sehen, dass bei der IP gegen SIN3A der Co-Repressor (145 kDa) spezifisch vom Antikörper gebunden und NIPBL (306 kDa) co-präzipitiert wurde, während in der Negativkontrolle keine Wechselwirkung mit NIPBL auftrat (Abb. 3.23.). Im Eluat der IgG-Kontrolle wurde jedoch eine schwache Bande für SIN3A im Western Blot sichtbar, die auf unspezifische Wechselwirkungen mit dem anti-IgG-Antikörper zurückzuführen war. Die Ergebnisse dieses *in-vivo*-Versuches bestätigten, die ursprünglich in einem Hefe-System gefundene Interaktion von NIPBL und SIN3A für das humane System.

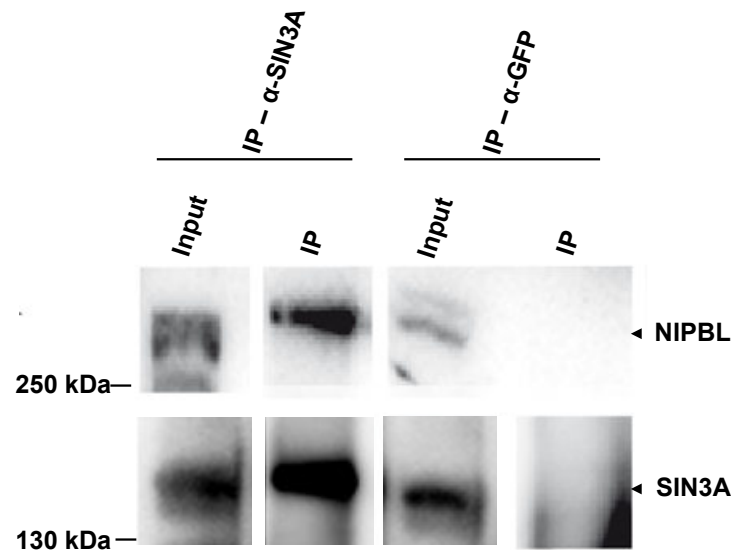


Abb. 3.23.: Co-Immunpräzipitation von SIN3A und NIPBL aus HeLa-Extrakten

In dieser Abbildung ist die Co-Immunpräzipitation von SIN3A und NIPBL dargestellt. Als Expressionskontrolle (Input) sind beide Proteine mit den jeweiligen Antikörpern in HeLa-Extrakten spezifisch nachgewiesen worden. Die Proben nach der Elution (IP) zeigen die Bindung von SIN3A und die Copräzipitation von NIPBL. In der Negativkontrolle wurde weder eine Präzipitation von NIPBL noch SIN3A nachgewiesen.

3.2.4. Interaktion von HDAC8 mit SIN3A

Wie schon in Abschnitt 3.2.3. erwähnt, konnte innerhalb des SIN3A-Proteins bereits ein HDAC-Klasse-I-Interaktionsmotiv beschrieben werden. Aufgrund der in meiner Arbeit nachgewiesenen Interaktionen von NIPBL mit SIN3A und HDAC8, stellte sich die Frage, ob HDAC8 ebenfalls direkt mit dem SIN3A-Protein interagiert. Für den Versuch wurden, wie in Abschnitt 3.2.2.1. beschrieben, HEK293-Zellen mit HDAC8-FLAG transfiziert. Die Immunpräzipitation von SIN3A wurde wie in Abschnitt 3.2.3. dargestellt, mit dem anti-SIN3A-Antikörper durchgeführt. Im Western Blot konnten sowohl SIN3A, als auch HDAC8-FLAG spezifisch in den Eluaten (IP) nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit dem leeren FLAG-Vektor transfiziert und entsprechende Zellextrakte in die anti-SIN3A-Immunpräzipitation eingesetzt.

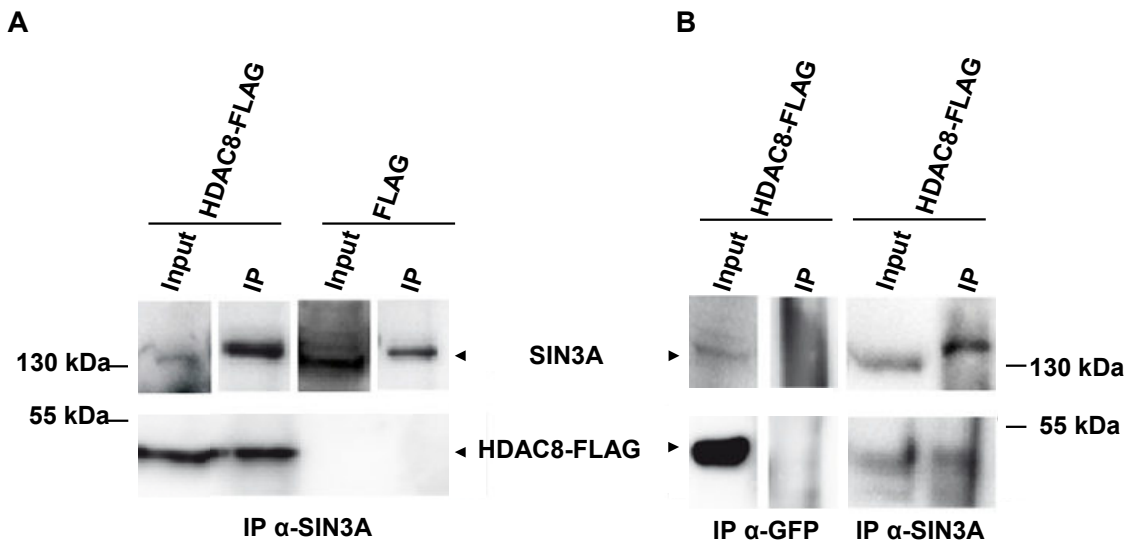


Abb. 3.24.: Co-Immünpräzipitation von SIN3A und HDAC8 in HEK293-Zellen

In der Grafik ist die Co-Immünpräzipitation von HDAC8 und SIN3A dargestellt. Dafür wurden HEK293-Zellen zur Überexpression von HDAC8-FLAG transfiziert. Aus dem Extrakt wurde das SIN3A-Protein präzipitiert und die gereinigten Proteinkomplexe auf HDAC8-FLAG untersucht. In A) ist die Präzipitation von SIN3A und HDAC8-FLAG in HDAC8-FLAG- und in FLAG-Tag-überexprimierenden Zellen dargestellt. In (B) sind die Immunpräzipitationen unter Verwendung des anti-GFP-Antikörpers (Kontrolle) und des anti-SIN3A-Antikörpers gezeigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass HDAC8 und SIN3A copräzipitiert werden. Im Western Blot der Kontrolle (IP-anti-GFP) konnte keine Bindung von SIN3A oder HDAC8 nachgewiesen werden. Die Expressionskontrollen für die Zellextrakte sind als Input gezeigt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass HDAC8 mit SIN3A co-präzipitiert. Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation des Zellextraktes transfizierter HEK293-Zellen mit der anti-GFP-gekoppelten Agarosematrix. In diesen Analysen konnte eine unspezifische Bindung des SIN3A-Proteins an die anti-GFP gekoppelte Sepharose-Matrix ausgeschlossen werden. Damit wurde die Spezifität der Co-Präzipitation von HDAC8 und SIN3A nachgewiesen. (Abb.3.24.B)

3.2.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von NIPBL

Aufgrund der Vielzahl an Funktionen von NIPBL, die mit dem Cohesin-Komplex assoziiert sind, ist es wahrscheinlich, dass neben den bereits bekannten und in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartnern von NIPBL, weitere physiologisch wichtige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auftreten. Da eine detektierbare Überexpression des vollständigen NIPBL-Proteins nicht möglich war, wurde diese Technik mit nicht-transfizierten nativen HeLa-Zellen durchgeführt. Zur Isolierung der endogenen NIPBL Protein-Komplexe erfolgte die Immunpräzipitation mit dem anti-NIPBL-Antikörper von Bethyl-Laboratories. Dieser wurde bereits erfolgreich zur Co-Präzipitation des NIPBL mit MAU2, sowie mit den Untereinheiten des Mediatorkomplexes⁷¹ verwendet. (siehe 3.2.1.4.) Hierfür wurden Extrakte aus nicht-transfizierten HeLa-Zellen mit einer anti-NIPBL-beladenen

Agarosematrix inkubiert. Für eine möglichst effiziente Co-Präzipitation, wurden zunächst unterschiedliche Waschbedingungen der immobilisierten Proteinkomplexe ausgetestet. Dazu wurden Waschpuffer mit unterschiedlichen Salz-, bzw. Detergenz-Konzentrationen verwendet, wobei sehr hohe Salzkonzentrationen, bzw. Detergenz-Konzentrationen die Proteininteraktionen einschränken und daher als stringent bezeichnet werden. Für die Waschschrte wurden daher sowohl PBS, Tris-NaCl-Tween20-Puffer (Tris-HCl 10 mM - pH 7,5; 300/ 200 mM NaCl, 0,05 % Tween 20), als auch RIPA-Puffer (siehe Material und Methoden) eingesetzt. Die isolierten Proteinkomplexe wurden durch Denaturierung mit SDS-Laemmli-Puffer und Erhitzen bei 95°C dissoziiert und für erste Analysen in einem 1D-SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels kolloidaler Coomassie-Färbung, welche gegenüber der normalen Coomassie-Färbung eine deutlich erniedrigte Nachweisgrenze für Proteine und somit erhöhte Detektionssensibilität besitzt (1 ng/Bande)²⁰. Bei den Waschschrten mit PBS waren sehr viele Proteinbanden im Gel zu erkennen, was auf unspezifische Bindungen hinwies. Unter den stringentesten Waschbedingungen (RIPA-Puffer) konnten fast keine potentiellen Bindeproteine isoliert werden. Im direkten Vergleich der unterschiedlichen Waschbedingungen, zeigte die Probe 2 (Waschpuffer 2: Tris-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 200 mM) ein definiertes Bandenmuster, mit einer Proteinmenge, die für später folgende Analysen notwendig ist. (Abb.3.25) Daher wurde dieser Waschpuffer in den anschließenden Co-Präzipitationen verwendet.

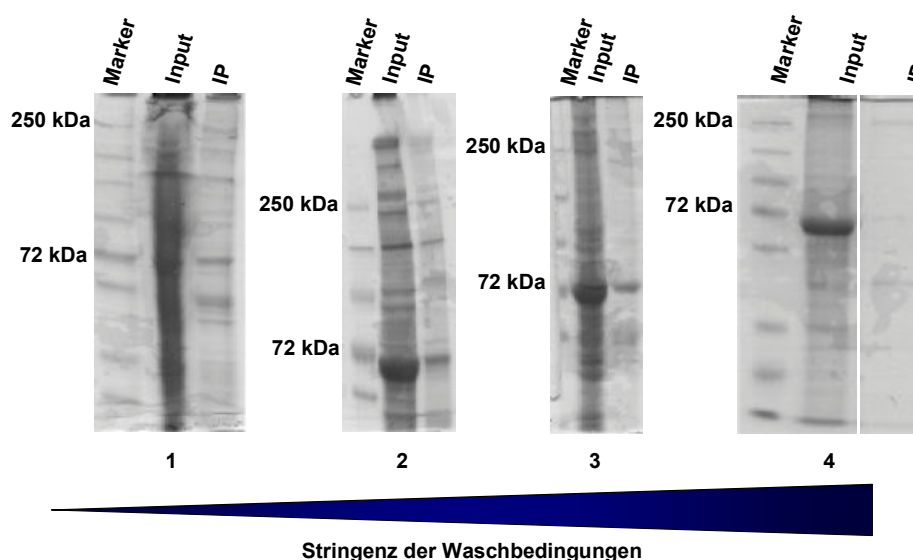


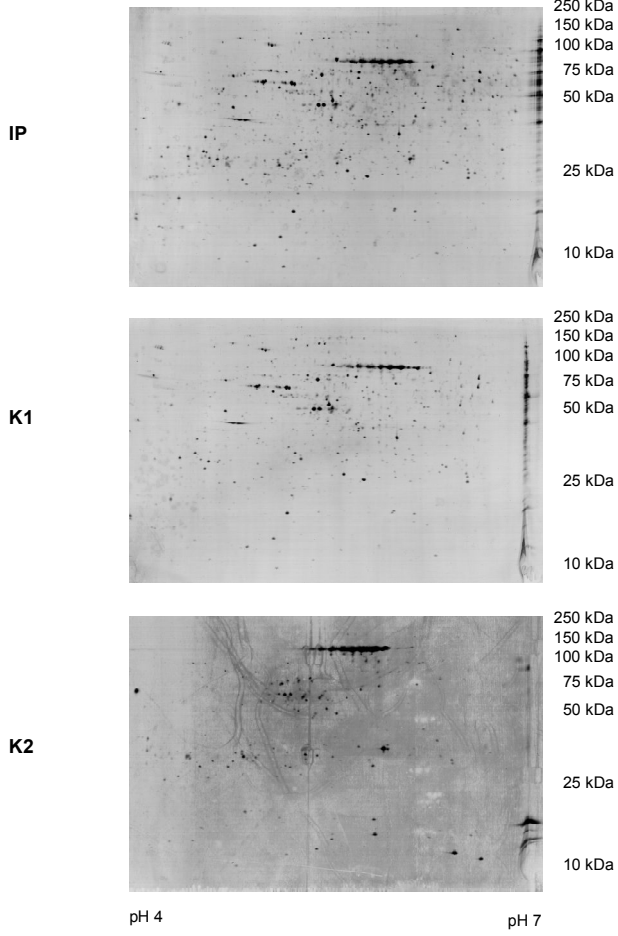
Abb. 3.25.: Optimierung der Waschschrirte für die Immunpräzipitation von NIPBL

Zur Optimierung der Immunpräzipitation von NIPBL für die anschließende massenspektroskopische Analyse, wurden verschiedene Waschbedingungen mit steigender Salz- und Detergenz-Konzentration getestet. Dabei wurde der Rohextrakt (Input) dem Eluat (IP) für die jeweiligen Waschbedingungen (1-PBS; 2-Tris-HCl-200 nM NaCl; 3- Tris-HCl-200 nM NaCl; 4-RIPA-Puffer) gegenüber gestellt. Die SDS-PAGE wurde mit einem 10 %-igem SDS-Polyacrylamid-Gel durchgeführt und die Proteine anschließend mittels kolloidalen Coomassie-Färbung markiert. Während mit dem Tris-HCl-Puffer (300 mM NaCl) und dem RIPA-Puffer nur sehr wenige Proteinbanden mit einer sehr geringen Proteinmenge im Eluat (IP) nachgewiesen wurden, waren nach den Waschschrirten mit PBS viele Proteinbanden im SDS-Gel zu sehen, die eher auf unspezifische Wechselwirkungen hinwiesen. Die Waschbedingung „2“ zeigte hier das optimalste Ergebnis und wurde daher für die anschließenden Co-Präzipitationen eingesetzt.

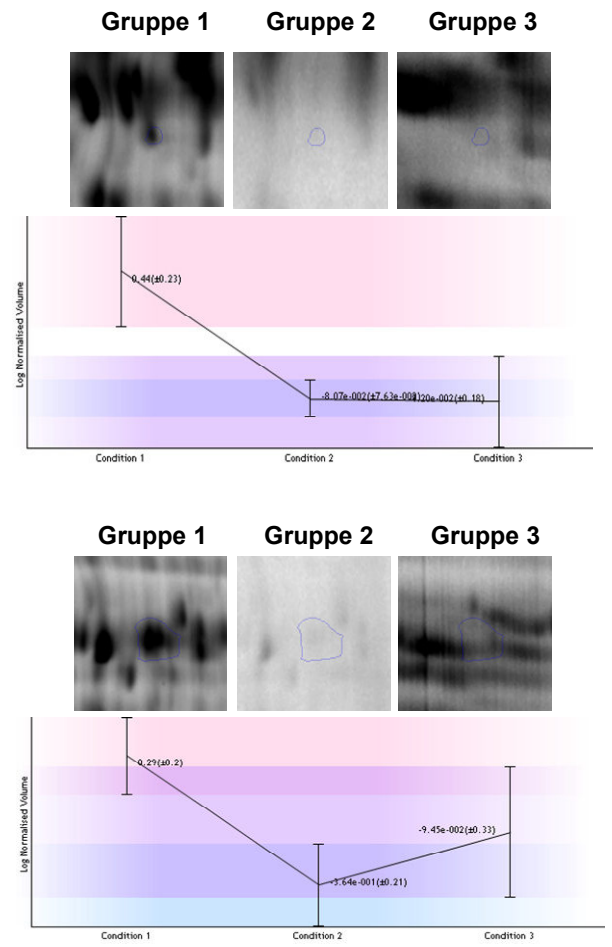
Nach der Optimierung der Waschbedingungen erfolgte eine effizientere Proteinauftrennung unter Verwendung einer 2D-Gelelektrophorese. Diese wurde in Kooperation mit Dr. Jens Habermann von Dr. Timo Gemoll in der chirurgischen Forschung in Lübeck durchgeführt. Zur Diskriminierung zwischen NIPBL-Interaktionspartnern und experimentell bedingten „falsch positiven“ Bindekandidaten wurden zusätzlich zur Immunpräzipitation zwei weitere Kontrollen mitgeführt. Dazu wurde als erste Kontrolle „nicht mit anti-NIPBL-Antikörper beladene Agarose-Beads“ eingesetzt (K1). In einer zweiten Kontrolle erfolgten die gleichen Präzipitationsschrirte mit einer Agarosematrix, die lediglich mit Antikörper beladen und nicht mit Zellextrakt inkubiert wurde. (K2) Mit diesen beiden Kontrollen wurden unspezifische Bindungen, sowie Proteinspots, die durch den Antikörper oder die Agarosematrix selbst verursacht werden, ausgeschlossen. Die Proteinkomplexe aller Versuchsansätze wurden zunächst mit dem Readyprep Clean-up Kit von BioRad aufgereinigt und anschließend mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff von NH Dyeagnostics markiert (je Experiment entweder G-Dye100-IP; 200 K1 oder 300 K2). Diese hoch sensitive Methode kann Proteinmengen bis zu 0,1 ng nachweisen. Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.4. beschrieben. Um möglichst gleiche physikalische, bzw. experimentelle Bedingungen

für die einzelnen Proben zu haben, wurden die aufgereinigten Proteinlösungen der IP und einer Kontrolle vereinigt und gemeinsam aufgetrennt. In den analysierten Gelen (10 % Acrylamid) sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 200 kDa separiert worden. Die Auswertung der Versuche und Auswahl der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels Typhoon FLA900 (GE Healthcare) und der Software Progenesis Same Spots (Nonlinear Dynamics). Im Pilotexperiment erfolgte eine Silberfärbung der Proteine. (Abb.3.27.) Es konnte dabei gezeigt werden, dass vor allem in der Kontrolle K1 viele Proteine unspezifisch an die Matrix gebunden haben und somit viele unspezifische Proteine auch im eigentlichen Experiment auftraten. Zusätzlich wurden einige Proteine, die durch den Antikörper verursacht wurden, im 2D-Gel nachgewiesen. Um statistisch signifikante Unterschiede zu erhalten, wurde jedes einzelne Experiment (IP), bzw. die Kontrollen (K1 und K2), in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt und in Gruppen zusammengefasst. Gruppe1 stellt dabei die IP gegen NIPBL, Gruppe2 die „Beads + Zellextrakt“ und Gruppe3 die IP ohne Zellextrakt dar. Für die Analyse der einzelnen 2D-Gele, wurden sowohl die Intensität der Proteinspots, als auch die quantifizierten Intensitäten der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. (Beispiel Abb. 3.26.) Die zur weiteren Untersuchung ausgewählten Proteine besitzen unterschiedliche molekulare Eigenschaften (Abb. 3.26.). Diese wurden im sauren und im neutralen pH-Bereich des 2D-Gels nachgewiesen und besaßen sowohl ein niedriges (15 kDa), als auch ein höheres (150 kDa) Molekulargewicht. Die ausgewählten Spots wurden mit dem Etton Spot Picker (GE Healthcare) ausgestanzt und anschließend zur massenspektroskopischen Analyse in das Ludwig Cancer Institute for Cancer Research, University of Uppsala, geschickt.

A



B



C

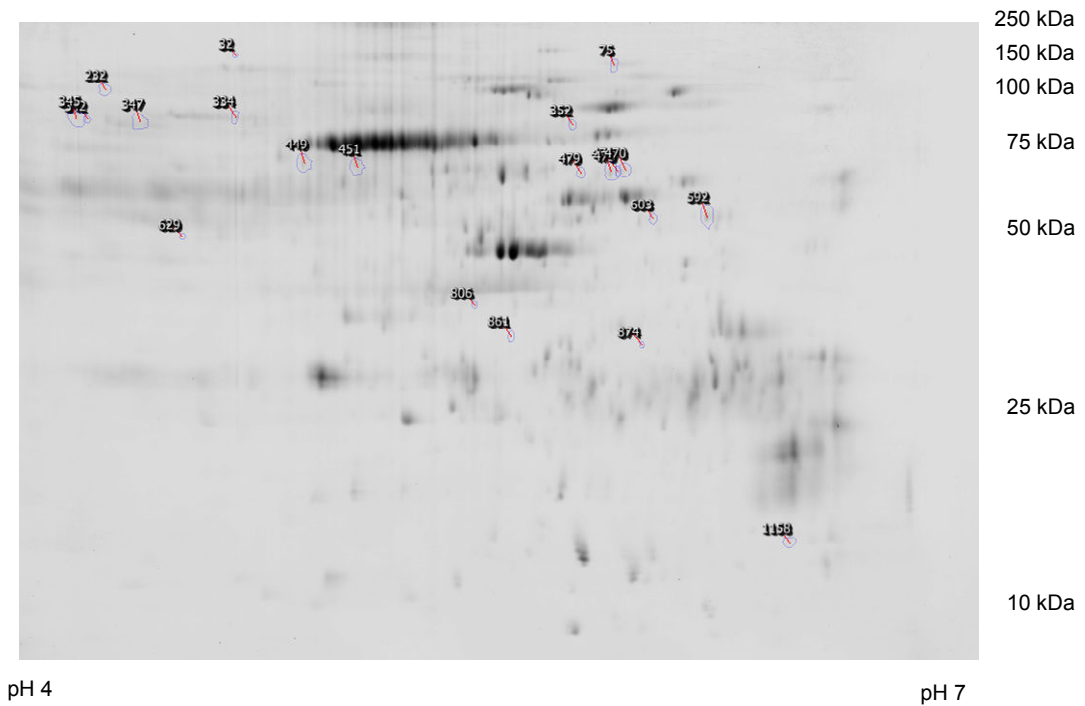


Abb. 3.27.: 2D-Gelelektrophorese – Analyse der isolierten Proteine

In (A) sind die silbergefärbten 2D-Gele aus dem Pilotexperiment für die IP und die beiden Kontrollen K1 und K2 gezeigt. Die Proteine wurden nach der elektrischen Fokussierung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Kontrollen zeigen, dass trotz der stringenten Waschschriffe viele Proteine unspezifisch an die Agarosematrix gebunden haben und auch in K2 viele falschpositive Bindungen auftraten. (B) Nach der Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese wurden die zu analysierenden Proteine mit der Software Progenesis Same Spots ausgewertet. Sowohl die Intensität der einzelnen Spots, als auch die quantitativ gemessenen Intensitäten der Proteine wurden für die einzelnen Gruppen zur Selektion einbezogen. Dies ist beispielhaft für zwei der 21 ausgewählten Proteine gezeigt. Für die Spots aus jeder Gruppe ist jeweils einer von drei Versuchen photographisch dargestellt. Im unteren Diagramm sind die drei Messwerte je Versuchsgruppe logarithmisch aufgetragen. In (C) ist die gesamte Auswahl der 21 Proteine, die anschließend zur massenspektroskopischen Analyse eingesetzt wurden, im überlagerten 2D-Gel dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die ausgewählten Proteine unterschiedliche molekulare Eigenschaften (pH, Molekulargewicht) besaßen.

Aus den massenspektroskopischen Analysen konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die mit NIPBL co-präzipitiert wurden. Dabei fiel auf, dass sehr viele Proteine mit einer vorhergesagten Lokalisation im Zytoplasma und nur ein einziges Protein aus dem Zellkern isoliert werden konnten (Tabelle 3). Eine *in silico*-Analyse mit dem Programm IPA (Ingenuity Systems) ermöglichte es, funktionelle Zusammenhänge zwischen bereits bekannten Interaktionen und neu identifizierten Wechselwirkungen aufzuzeigen. Bei dieser sogenannten *Pathway*-Analyse konnte gezeigt werden, dass das in den massenspektroskopischen Analysen identifizierte RBBP4-Protein sowohl mit den bereits bekannten HP1, HDAC1 und HDAC3, als auch mit dem in dieser Arbeit erstmals als NIPBL-Interaktionspartner nachgewiesenen SIN3A-Protein, funktionell assoziiert ist. (Abb. 3.28.)

**Tabelle 3: Identifizierung von potentiellen NIPBL-Interaktionspartnern –
Ergebnisse der Massenspektroskopischen Analysen**

pl	Molekular- gewicht [kDA]	Identifiziertes Protein	Accession Number	Lokalisation
4,9	89,5	neurabin-2 (prot phosphatase)	NP_115984	Cytoplasma
5,9	66,7	moesin + GEF EAX09148	EAX05399	Cytoplasma
5	66	phosphatase 2A regulatory subunit	AAA36399	Cytoplasma
5,1	48,5	sequestosome-1 isoform 1	NP_003891	Cytoplasma
4,7	50,1	Tubulin beta	AAH20946	Cytoplasma
4,8	43,8	histone-binding protein RBBP4	NP_001128728	Nukleus
5,4	23,6	glutathione S-transferase	CAA30894	Cytoplasma
5,6	40,5	ACTB protein - beta actin	AAH12854	Cytoplasma
		protein phosphatase type 2A catalytic subunit	AAL35904	Cytoplasma
5,2	36,2			
5,3	15	galectin-1	NP_002296	Cytoplasma

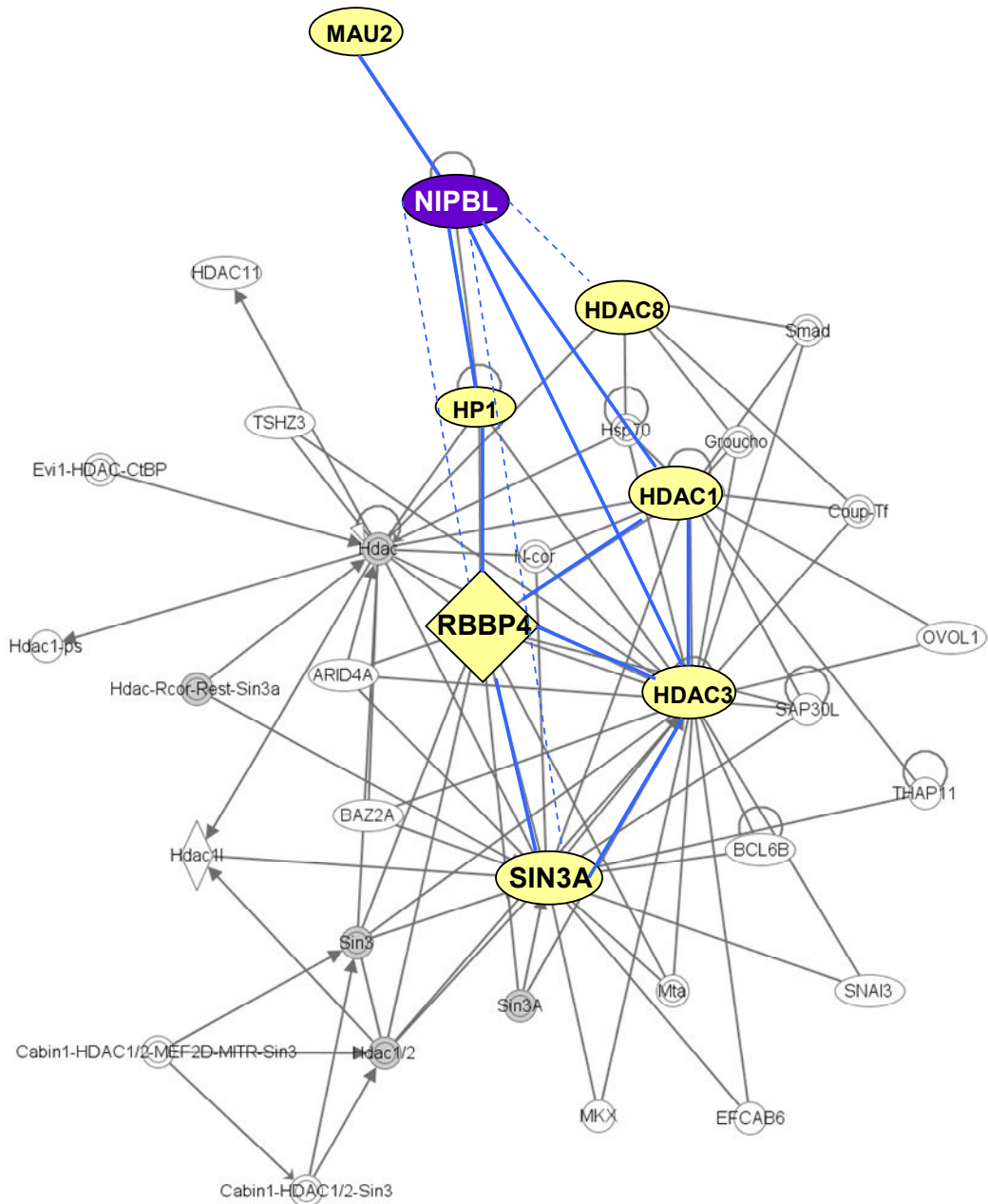


Abb. 3.28.: IPA-Pathway-Analyse zur Darstellung der Interaktionen von RBBP4 und NIPBL

Für die IPA-Analyse wurden die bereits bekannten NIPBL Interaktionspartner, wie MAU2, HP1, HDAC1 und HDAC3 mit den neu identifizierten Interaktionspartner SIN3A und RBBP4 für die Berechnungen eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass RBBP4 sowohl mit den bereits als NIPBL-Interaktionspartner identifizierten HP1-, HDAC1- und 3-, als auch mit dem SIN3A-Protein in Wechselwirkung steht. Die durchgezogenen, blauen Linien zeigen bereits bekannte Interaktionen, die blauen, gestrichelten Linien neu identifizierte Wechselwirkungen.

3.3. Analyse weiterer CdLS-Kandidaten-Gene

3.3.1. Sororin

Das Protein *Sororin*, auch *CDCA5* (cell division cycle associated 5) genannt, spielt eine essentielle Rolle bei der Stabilisierung der Cohesin-DNA-Interaktion, was zu der Annahme führt, dass dieses Gen ein mögliches CdLS-assoziiertes Gen sein könnte. Daher wurden Mutationsanalysen bei zunächst 47 CdLS-Patienten, die negativ für Mutationen in allen fünf bekannten CdLS-assoziierten Genen (*NIPBL*, *SMC1*, *SMC3*, *RAD21*, *HDAC8*) waren, durchgeführt. Für die Sequenzierung nach Sanger wurden spezifische Primer konstruiert, so dass die sechs kodierenden Exons und die Exon-Intron-Grenzen auf Mutationen überprüft werden konnten. Die Sequenzanalyse wurde an genomischer DNA aus den jeweiligen Patienten nach dem in Abschnitt 2.2.3.2. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm SeqPilot (JSI Medical Systems). Dabei wurden verschiedene bekannte und in Datenbank bereits dokumentierte Polymorphismen (Tabelle 4), jedoch keine putativ pathogenen Mutationen nachgewiesen.

Tabelle 4: Sequenzierung von Sororin (CDCA5) in 47 Patienten mit CdLS

Die entsprechenden SNP-Identifikationsnummern und Häufigkeiten der nachgewiesenen Polymorphismen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Sequenzvariation	Polymorphismus	Häufigkeit [%] – Total 47	Häufigkeit in Kontrollen [%]
c.-4delA(homozygot)	rs35819335	87 %	unbekannt
c.-4delA (heterozygot)	rs35819335	13 %	unbekannt
c.*10G>A	rs117649318	4 %	0,017

3.3.2. RAD21

3.3.2.1. Mutations-Analysen bei Patienten mit CdLS und CdLS-ähnlichem Phänotyp

Bei diesem Projekt handelt es sich um eine große Studie, bei der viele Kooperationspartner beteiligt waren. Aufgrund der sehr umfangreichen zellbiologischen, genetischen Untersuchungen und den in Tiermodellen generierten Methoden, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur der von mir durchgeführte Teil näher erläutert. In Kooperation mit Matthew Deardorff aus dem Children`s Hospital in Philadelphia wurden CNV-Analysen (*Copy number variation*) bei insgesamt 300 Patienten mit Verdacht auf ein Cornelia-de-Lange-Syndrom durchgeführt. Alle Patienten waren negativ für Mutationen in den bis dato CdLS-assoziierten Genen, *NIPBL*, *SMC1* oder *SMC3*. Dabei konnten insgesamt zwei interstitielle Mikrodeletionen auf dem Chromosom 8q24 identifiziert werden (Abb.3.29.), die auch das

RAD21-Gen (grün markiert) betrafen. In der Literatur waren zwei weitere Patienten mit Mikrodeletionen beschrieben. *RAD21* kodiert für eine der drei Grundbausteine des Cohesinringes (siehe Einleitung). Das *RAD21*-Protein bindet sowohl SMC1 und SMC3, als auch die STAG-Proteine (Scc3). Im Laufe der Mitose wird *RAD21* durch das Enzym Separase gespalten. Dies bewirkt die Öffnung des Cohesinringes und damit den Eintritt in die Anaphase, in der die Schwesterchromatiden getrennt werden. Die Patienten mit einer Deletion auf dem Chromosom 8q24 wiesen typische CdLS-Merkmale auf, z.B. eine Synophrys mit gewölbten Augenbrauen und Minderwuchs. Im Vergleich zu anderen Cornelia-de-Lange Patienten fielen jedoch einige Unterschiede auf. Hier ist besonders die nur gering verzögerte bis hin zur normalen kognitiven Entwicklung aufzuführen. Um die Relevanz des *RAD21*-Gens im Cornelia-de-Lange Syndrom näher zu untersuchen, wurden die kodierende Region von *RAD21* in 258 bisher mutationsnegativen Patienten mit der klinische Diagnose CdLS sequenziert. Dabei konnten zwei heterozygote Missense-Mutationen (p.P376R, p.C585R) identifiziert werden. Beide Mutationen waren *de novo* und konnten in 600 Kontrollen mit gleichem ethnischen Ursprung ausgeschlossen werden. Beide Patienten zeigten große Überlappungen mit CdLS, wobei vor allem die Kleinwüchsigkeit, als auch die geschwungenen Augenbrauen und die Synophrys hervorzuheben sind. Es waren aber auch Unterschiede zum typischen CdLS-Phänotyp zu erkennen, wobei ganz besonders die deutlich geringere Behaarung und eine sehr milde kognitive Entwicklungsstörung auffielen.

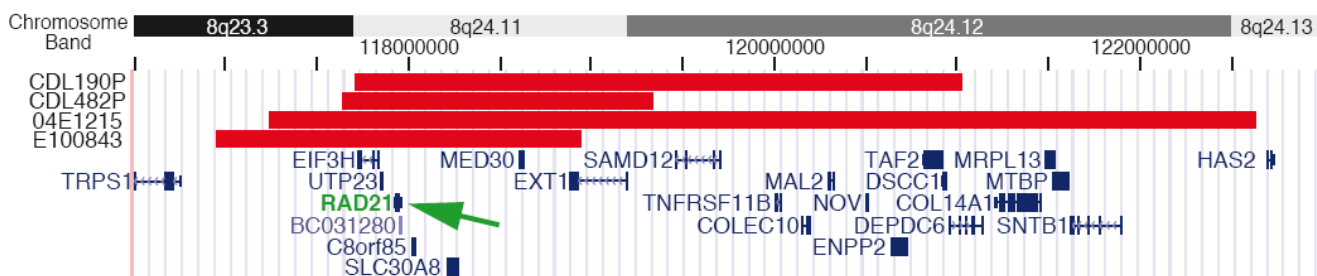


Abb. 3.29.: Darstellung der identifizierten Mikrodeletionen auf dem Chromosom 8q24

In dieser Abbildung ist ein Auszug aus der UCSC-Datenbank zur Darstellung der über 1,5 Mb großen Deletionen auf dem Chromosom 8q24 gezeigt. Grün markiert ist das Gen für *RAD21*, das in allen 4 identifizierten Mutationen deletiert ist³².

3.3.2.2. Funktionelle Analysen der identifizierten Mutationen

Zur Untersuchung der pathogenen Effekte, die durch die Mutationen in *RAD21* ausgelöst werden, wurden in der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff zunächst die Expression, sowie die Proteinlevel von *RAD21* in lymphoblastoiden Zelllinien des Patienten mit einer

Mikrodeletion (CDL190P) und des Patienten mit der Missense Mutation P376R getestet. Die quantitativen Analysen zeigten, dass der Patient mit der Mikrodeletion (CDL190P) nur noch 50 % des Wildtyp-Expressions- und Proteinlevels aufwies, während die Ergebnisse für den Patienten mit der Mutation P376R eine erhöhte Expression und eine normale Proteinkonzentration von RAD21 zeigten.³²

Der Aminosäureaustausch P376R befindet sich innerhalb einer konservierten Region (AA 372-392) von RAD21, die essentiell für die Interaktion mit den Stromalin- oder STAG-Proteinen (STAG1, -2, -3) ist. Daher wurde im Rahmen meiner Arbeit ein *Mammalian-two-Hybrid* Assay, zur quantitativen Analyse der Interaktion von RAD21 mit STAG1, -2 und -3, für den Wildtyp und die Mutationen P376R und C585R durchgeführt. Dazu wurden die proteinkodierenden Bereiche von *RAD21* (NM_006265), *STAG1*, -2 und -3 (BC 064699, BX 640970, BC 047490) mit spezifischen Primern an cDNA amplifiziert und die Sequenz auf Varianten überprüft. Mittels Mutagenese-PCR (siehe 2.2.3.1.) wurden die entsprechenden Mutationen P376R und C585R in das Konstrukt von RAD21 eingeführt und anschließend sequenziert. Im Anschluss daran erfolgte die Insertion in die Expressionsvektoren pCMV-BD und – AD, so dass RAD21 als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindedomäne und die STAG-Konstrukte als Fusion mit NF κ B (AD) exprimiert wurden. Die Durchführung des Assays erfolgte nach dem in Abschnitt 2.2.4.8. beschriebenen Protokoll. Dazu wurden HeLa-Zellen in 24-well Platten cotransfiziert und die Luciferase-Aktivität nach 24 Stunden Inkubation gemessen (Abb 3.30.). Eine Normalisierung der *Firefly*-Werte erfolgte durch die Messung der *Renilla*-Aktivität. Aus den Luciferase-Aktivitäten ging hervor, dass die Interaktion von RAD21 mit STAG1 und 2 für die Mutation P376R im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (120 % und 125 %) ist. Die Wechselwirkung mit STAG3 hingegen wird durch die Mutation nicht verändert. Die Luciferasewerte für die Mutation C585R weisen auf keine Änderung der Bindungsaffinität zu STAG-1, -2, -3 hin. In weiteren Analysen durch unsere Kooperationspartner konnte gezeigt werden, dass die hier analysierten Mutationen sämtliche bekannte Funktionen des Cohesin-Komplexes, sowohl bei der Reparatur von DNA, der Paarung der Schwesterchromatiden in der Mitose, als auch bei der Regulation der Transkription verändern.³²

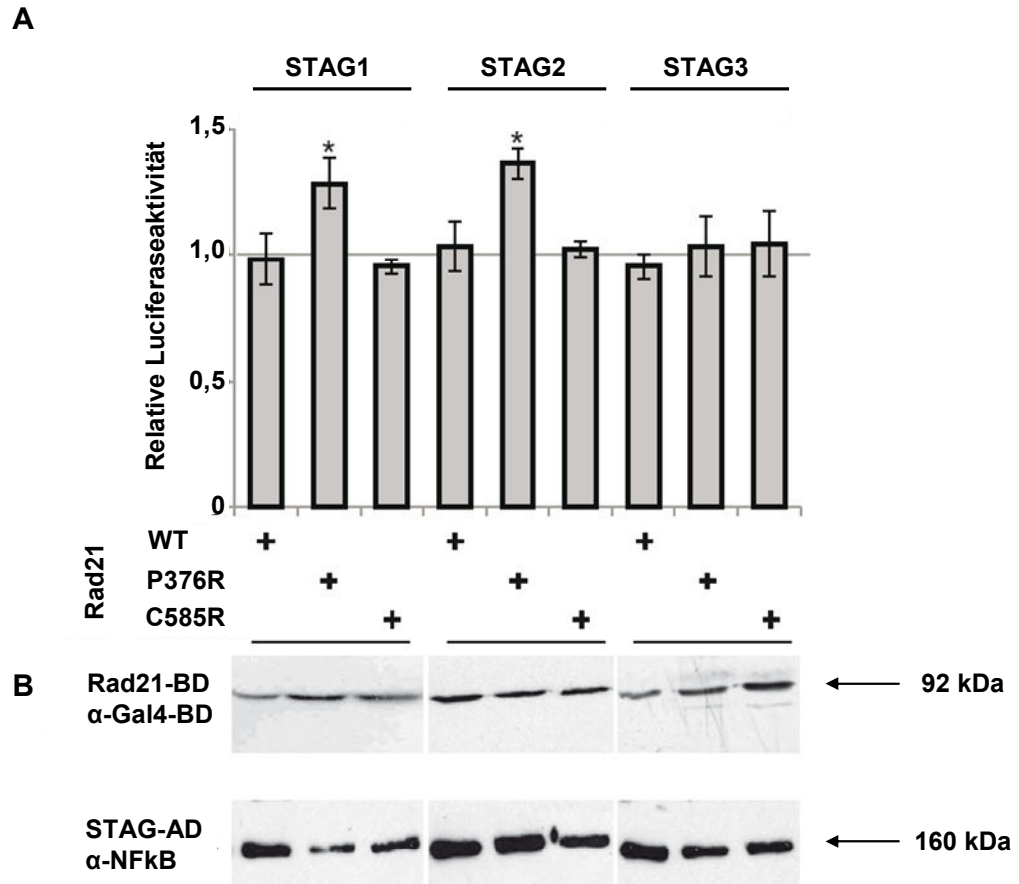


Abb. 3.30.: M2H-Assay zur Analyse der Interaktion von RAD21 mit den STAG-Proteinen 1-3.

Zur funktionellen Analyse des Effektes der im *RAD21*-Gen identifizierten Missense-Mutationen auf die Bindeeigenschaften des RAD21-Proteins, wurden *Mammalian-two-Hybrid* (M2H) Analysen durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden STAG-BD- und RAD21-AD-Fusions-Konstrukten co-transfiziert, inkubiert und nach 24 h die Luciferase-Aktivität ermittelt. (A) Die normalisierten Messwerte weisen eine erhöhte Luciferase-Aktivität für die Mutation P376R bei der Interaktion mit STAG-1 und -2 auf. Die Mutation C585R hingegen zeigt keine veränderten Messwerte. Alle Ergebnisse wurden in mindestens sechs unabhängigen Experimenten verifiziert. (B) Zusätzlich wurden Expressionskontrollen mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern (α-Gal4-BD, α-NFkB – Santa Cruz) durchgeführt.

4. Diskussion

4.1 Regulative Elemente des *NIPBL* Gens

Im Cornelia de Lange-Syndrom sind bisher fünf Gene (*NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *HDAC8*, *RAD21*) nachgewiesen, in denen 60-65 % der betroffenen Patienten eine Mutation aufweisen. Die Hälfte der Patienten, insbesondere Patienten mit einem „klassischen“ CdLS-Phänotyp, zeigt dabei eine Mutation im *NIPBL*-Gen. Bei 35-40 % der Patienten ist die genetische Ursache bislang ungeklärt, obwohl bei einigen dieser Patienten, aufgrund charakteristischer phänotypischer Merkmale, der klinische Verdacht auf eine Mutation im *NIPBL*-Gen bestand.

Bisherige molekulare Analysen des *NIPBL*-Gens beschränken sich derzeit ausschließlich auf die exonischen Bereiche. Aufgrund der nachgewiesenen Dosisabhängigkeit für *NIPBL* (Haploinsuffizienz) bei der Entstehung eines CdLS, sollten weitere Bereiche, welche die Expression von *NIPBL* regulieren, identifiziert, charakterisiert und in die molekulare Diagnostik integriert werden. So war bereits bekannt, dass eine Basensubstitution innerhalb des ersten nicht-kodierenden Exons von *NIPBL* die Expression des *NIPBL*-Gens beeinflusst und somit als krankheitsursächlich anzunehmen ist.¹⁴ Allerdings wurden bisher keine funktionellen Elemente im *NIPBL*-Gen, die die Transkription regulieren, wie z.B. Promotoren, identifiziert oder funktionell charakterisiert. Sequenzvariationen bzw. Mutationen innerhalb dieser Elemente können die Expression beeinflussen und somit in der Pathogenese des CdLS eine Rolle spielen. Für die Identifizierung des *NIPBL*-Promotors wurden zunächst *in-silico*-Analysen durchgeführt, um potentielle Promotorelemente zu finden. Mit der Internetsoftware *Promoter prediction V2* konnte im Bereich um 200 bp upstream von Exon 1 eine wahrscheinliche (*marginal predicted*) Promotorregion vorhergesagt werden. Durch die in der ENCODE-Datenbank dokumentierten, promotor-assoziierten Histonmodifikationen wurde diese Annahme bestätigt. Diese Daten der ENCODE-Datenbank zeigen die Ergebnisse von Chromatin-Analysen (u.a. mittels ChIP-Sequenzierung), die in verschiedenen humanen Zelllinien durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich über einen Bereich von circa 2,5 kb, 5' flankierend zum Exon1 des *NIPBL*-Gens, eine starke Anreicherung einer tri-Methylierung des Lysins 4 am Histon-Protein 3 (H3K4me3). Diese Art der post-translationalen Modifikationen des Histon-Proteins 3 ist die charakteristischste epigenetische Markierung eines Promotors.⁶³ Für weitere funktionelle Analysen dieses regulativen Elementes wurden Fragmente unterschiedlicher Größe und Lokalisation konstruiert. Diese Fragmente umfassten einen Bereich von insgesamt 5 kb der 5'-Region des *NIPBL*-Gens, so dass der Einfluss von flankierenden Elementen, z.B. als mögliche Bindestelle für weitere Co-Faktoren, auf die Promotoraktivität berücksichtigt werden konnten. Mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assays, (siehe Abschnitt 3.1.1.) konnte die Region des *NIPBL*-Kernpromotors auf 143 bp

upstream von Exon 1 nachgewiesen werden (c.-642 bis -499). Konstrukte, die den vorhergesagten Promotorbereich und die Sequenz bis zu 2,5 kb *upstream* (F1, F2, F2.1, F2.2, F5) davon enthielten, wiesen trotz ihrer unterschiedlichen Fragmentlänge sehr ähnliche Promotoraktivitäten auf. Damit konnten Artefakte des *in vitro*-Assays ausgeschlossen werden, die durch unterschiedliche DNA-Fragmentlängen hervorgerufen werden können.¹⁵¹ Diese Ergebnisse konnten in verschiedenen Zelllinien aus der Niere (HEK293), Leber (HepG2) und Osteosarkom (U2OS) bestätigt werden. Die Aktivität des identifizierten *NIPBL*-Kern-Promotors in verschiedenen Zelllinien lässt sich gut mit der als nahezu ubiquitär beschriebenen Expression von *NIPBL* vereinbaren. In weiteren *in silico*-Analysen wurden innerhalb der Sequenz der identifizierten Promotorregion circa 18 % CpG-Dinukleotide berechnet, was neben der allgemeinen Expressionsregulation ein weiteres Merkmal eines Kernpromotors ist.⁵⁶

In folgenden Untersuchungen wurden zunächst 13 Patienten mit CdLS, bei denen bisher keine Mutation in einem der bekannten CdLS-Gene nachgewiesen wurde, innerhalb dieser funktionellen Region sequenziert. Dabei konnten drei Sequenzvarianten identifiziert werden, die bereits als bekannte Polymorphismen in den SNP-Datenbanken (NCBI-*dbSNP short genetic variations*) dokumentiert sind. Alle drei Sequenzvarianten konnten ebenfalls in den nicht betroffenen Eltern gezeigt werden. Dennoch ist es nicht vollständig auszuschließen, dass diese Sequenzvariationen einen krankheitsursächlichen Effekt bei den Patienten haben könnten. So zeigen beispielsweise bei der Variation rs896477 in über 500 Kontrollen eine Homozygotie für das „Wildtyp-Allel“. Um jedoch eine eindeutige Aussage über diesen SNP als Risikofaktor treffen zu können, steht keine ausreichend große Patientengruppe zur Verfügung. Zusätzliche *in vivo*-Analysen zur Untersuchung des funktionellen Einfluss dieser Sequenzvarianten auf die Expression von *NIPBL* wären ebenfalls hilfreich, konnten jedoch aufgrund fehlenden Probenmaterials von den Patienten nicht durchgeführt werden. Ferner könnten diese Varianten gewebespezifische Änderungen der Genexpression verursachen, die bei RNA-Analysen im Blut nicht nachzuweisen sind. Geringe Schwankungen im Expressionslevel vieler Gene sind ein natürliches Phänomen und allgemein bekannt. Allerdings können geringere Expressionslevel in Kombination mit anderen Sequenzvarianten, die die Expression zusätzlich reduzieren oder die Transkription anderer Gene beeinflussen, zum Phänotyp führen, obwohl eine Sequenzänderung allein keine pathogene Wirkung hat.

In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff (Children's Hospital of Philadelphia) wurden Mutationsanalysen von weiteren 96 Patienten, in denen eine größere, nicht-translatierte Region 5' des *NIPBL*-Gens (entsprechend Fragment F4 der Promotoranalysen) untersucht. Dabei konnten zwei bisher nicht bekannte Sequenzvarianten innerhalb des Exon 1 (Deletion c.-255-(-249) delGGAGGA-Mut. 2) und dem 3' angrenzenden

intronischen Bereich des *NIPBL*-Gens (Deletion/Insertion c.-82 + (229-264) delinsCCCTGCTGG-Mut. 1) identifiziert werden. Funktionelle Analysen (Luciferase-Reporter-Gen-Assays) zeigten, dass beide Sequenzvarianten einen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität haben. Da die Analysen *in vitro* durchgeführt wurden, erfolgten zusätzliche Untersuchungen zur Expression des *NIPBL*-Gens im Blut der Patienten. Hier zeigten RNA-Analysen in dem Patienten mit der Mutation 1 eine Reduktion der Expression von über 30 %. RNA-Analysen der mir zur Verfügung stehende Probe des Patienten mit der Deletion in Exon 1 (Mutation 2) zeigte eine Reduktion der Expression im Blut von circa 24 % gegenüber den Kontrollen. Neben den fast vergleichbar hohen Expressionslevel weisen beide Patienten sehr ähnliche phänotypische, CdLS-spezifische Merkmale auf. In Folgeanalysen wurde die Deletion im Exon 1 auch beim nicht betroffenen Vater des Patienten nachgewiesen, während die Mutation des amerikanischen Patienten (Mut. 1) nicht in den Eltern nachgewiesen werden konnte und somit höchstwahrscheinlich ein *de novo* Ereignis darstellt. Die durchgeführten RNA-Analysen beim nicht betroffenen Vater zeigten, trotz der vorhandenen Deletion im Exon 1, eine normale Expression. Diese Ergebnisse könnten auf einen eventuellen kompensatorischen Effekt hinweisen, der im Patienten nicht zum Tragen kommt. So zeigt das Modell der unvollständigen Penetranz die Möglichkeit auf, dass der Vater zwar die Mutation trägt, jedoch durch eine genetische Kompensation, der pathogene Effekt reduziert wird.¹⁹ Des Weiteren ist es möglich, dass diese Sequenzvariante erst in Kombination mit einer anderen, bisher nicht bekannten Sequenzveränderung pathogene Auswirkungen hat.¹⁴⁵

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein kompletter Verlust eines Allels eine Reduktion der *NIPBL*-Expression von 25-30 % bewirkt.⁷⁴ Bei den hier untersuchten Patienten sind ähnlich erniedrigte Expressionslevel nachgewiesen worden, obwohl die identifizierten Mutationen nicht auf einen Allelverlust hindeuten und die Patienten einen milden Phänotyp zeigen. Diese Tatsache könnte darin begründet liegen, dass die Veränderung innerhalb des Exons 1, bzw. Introns 1, den weiter 5' liegenden *NIPBL*-Kernpromotor (circa 200 bp) nicht direkt betreffen. Somit wäre ein variierender Effekt der Mutationen auf die *NIPBL*-Expression in den unterschiedlichen Geweben, bzw. zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung möglich. Alle Expressionsanalysen von *NIPBL* in den Patienten wurden an Blutproben durchgeführt, so dass hier nur eine Aussage über den Mutations-Effekt auf die *NIPBL*-Expression im Blut getroffen werden konnte. Des Weiteren wäre, aufgrund der Dosis-Sensibilität von *NIPBL*, bei einer generell (alle Gewebe betreffend) starken Reduktion der *NIPBL*-Expression eine wesentlich stärkere Ausprägung der für das CdLS charakteristischen phänotypischen Merkmale zu erwarten.⁷⁴ Beide Patienten wiesen jedoch einen eher milden CdLS-Phänotyp auf. Eine weitere Erklärung hierfür, wäre das Vorhandensein alternativer Transkriptions-Startpunkten (TSS), bzw. Promotoren innerhalb des *NIPBL*-Gens, die in den

durchgeführten TaqMan-Analysen nicht untersucht wurden bzw. werden konnten. Die für die hier vorgestellten Analysen verwendete Sonde überspannt den Bereich von Exon 2 zu Exon 3, somit wären Transkripte mit einem Startpunkt 5' des Exons 3 nicht detektierbar. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass Patienten mit einer Nonsense-Mutation innerhalb der ersten Exons oftmals einen eher milden CdLS-Phänotyp aufweisen, wobei Patienten mit einer *Nonsense*-Mutation im *NIPBL*-Gen eigentlich „schwer betroffen“ sind, da das mutierte Allel als ein Nullallel definiert wird. Eine Mutation, welche zu einem vorzeitigen Stopp im Leserahmen der mRNA führt, wird oftmals über einen *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut. Dieser Kontrollmechanismus verhindert somit eine Expression des verkürzten Genproduktes bzw. Proteins.⁹¹ Dass einige Patienten mit einer *Nonsense*-Mutation innerhalb der ersten Exons einen eher milden Phänotyp aufweisen, deutet daher klar auf das Vorhandensein kompensatorischer Mechanismen, wie z.B. alternative TSS oder Promotoren innerhalb des *NIPBL*-Gens hin. Somit könnten alternative Isoformen des *NIPBL*-Proteins exprimiert werden, die bisher nicht nachgewiesen wurden. Neben den bekannten Isoformen A und B sind bisher bereits zwei weitere kleinere *NIPBL*-Proteinisoformen, welche lediglich die C-terminalen 275 Aminosäuren des vollständigen *NIPBL*-Proteins beinhalten im Ensembl-Genome Browser aufgeführt. Zusätzlich deuten eigene Arbeiten und Arbeiten kollaborierender Arbeitsgruppen (Universidad de Zaragoza und Childrens Hospital, Philadelphia, persönliche Mitteilungen) auf das Vorhandensein weiterer, kürzerer Isoformen von *NIPBL* hin. Mutationen innerhalb der ersten Exons würden somit die Expression und auch das Protein bestimmter Isoform nicht zwangsläufig beeinträchtigen. Ein Verschiebung zu einer stärkeren Expression alternativer Transkripte, die bestimmte funktionelle Elemente beinhalten, wie z.B. die C-terminalen *HEAT repeats*, könnte dabei ein möglicher kompensatorischer Mechanismus sein. Neben den zahlreichen Mutationen (> 320), die im gesamten *NIPBL*-Gen nachzuweisen sind, befinden sich viele identifizierte *NIPBL*-Mutationen (> 100, LOVD) innerhalb dieser *HEAT repeats*. Diese Mutationen würden auch die verkürzten Isoformen betreffen und somit wahrscheinlich eine starke pathophysiologische Relevanz haben.

Zur Identifizierung alternativer Promotoren, bzw. TSS und regulatorischer Elemente, die die Expression zusätzlicher Isoformen regulieren, wurden *in-silico*-Analysen durchgeführt. In der CAGE-Datenbank ist im Bereich von Exon 10 eine deutliche Anreicherung von alternativen TSS dokumentiert. Daher wurde diese Region im Rahmen meiner Arbeit detaillierter untersucht. Zusätzlich konnte mittels der ENCODE-Datenbank die Histonmodifikation H3K4me1 (Enhancer), eine DNA-hypersensitive Region und eine CTCF-Bindestelle für den Bereich *upstream* von Exon 10 identifiziert werden. Für den genomischen Bereich des *NIPBL*-Exons 10 wurde eine Anreicherung der Histonmodifikation H3K4me3 (meist Promotoren) nachgewiesen. In der hier vorgestellten funktionellen Analyse konnte allerdings

keine Promotoraktivität für diese Region nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass alternative intragenische Promotoren primär die gewebespezifische Transkription regulieren.^{21,56} Daher ist es möglich, dass der untersuchte alternative *NIPBL*-Promotor in der Vielzahl der verwendeten Zelllinien (u.a. Zervix, Niere, Neurolastom, Osteosarcom) inaktiv bleibt. Die in der CAGE-Datenbank aufgeführten TSS beziehen sich zu dem hauptsächlich auf Zellen des Dünn- und Dickdarmes, Gewebe, die in unseren Analysen nicht berücksichtigt werden konnten. Weiterhin stellt der Luciferase-Reporter-Gen-Assay ein artifizielles System dar, in dem nur kurze DNA-Fragmente in einem Plasmid untersucht werden können. Es ist also nicht auszuschließen, dass wichtige flankierende Bindestellen essentieller Co-Faktoren fehlen und auch Positionseffekte, bzw. Einflüsse der Chromatinstruktur nicht ausreichend berücksichtigt werden können und somit die fehlende Promotoraktivität erklären würden. Dagegen zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen des vorhergesagten 1,5 kb überspannenden Enhancer-Region im Intron 9 des *NIPBL*-Gens, einen stark reprimierenden Effekt auf den *NIPBL*-Promotor. Eine Eingrenzung dieses regulativen Elementes durch die Verwendung von kleineren, circa 500 bp überspannenden Fragmenten schlugen fehl, obwohl sämtliche vorhergesagte funktionelle Elemente, wie eine CTCF-Bindestelle und eine DNaseI-hypersensitive Region in einem dieser Fragmente enthalten waren. Zusätzliche Analysen mit jeweils zwei überlappenden 1 kb-Fragmenten zeigten einen vollständigen reprimierenden Effekt auf den *NIPBL*-Promotor für beide verwendeten Konstrukte (siehe Ergebnisse Abb.3.12). Diese Daten deuten klar auf das Vorhandensein weiterer funktioneller Elemente in diesem Bereich hin, die sich für eine intakte Repressor- bzw. Silencer-Funktion in unmittelbarer Nähe und in der richtigen Orientierung befinden müssen. In den durchgeführten Reporter-Gen-Assays wurden sowohl die Wechselwirkung des identifizierten *Silencer*-Elementes mit dem 2 kb-, als auch mit dem circa 400 bp langen Kernpromotorfragment von *NIPBL* untersucht. Dabei zeigte sich nur bei der Verwendung des längeren Promotor-Konstrukts eine fast vollständige Repression der Promotoraktivität. Experimentell bedingte Artefakte konnten durch das Mitführen zahlreicher Kontrollen (nicht-funktionelles Fragment, verschiedene Promotoren) ausgeschlossen werden. Die beiden analysierten *NIPBL*-Promotor-Fragmente unterscheiden sich unter anderem durch das Vorhandensein einer CTCF-Bindestelle, welche sich ausschließlich innerhalb des 2 kb-Konstrukts befindet. Ein möglicher Mechanismus wäre somit ein durch CTCF vermittelter reprimierender Effekt. CTCF ist ein bedeutender Cofaktor, der eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung zwischen Enhancern bzw. regulativen Elementen und Promotoren (beispielsweise beim *Chromatin-looping*) einnimmt (Abb. 4.1).¹²⁶ Dabei kann das auch als Insulatorprotein bezeichnete CTCF sowohl einen aktivierenden als auch einen reprimierenden Effekt auf den jeweiligen Promotor haben.

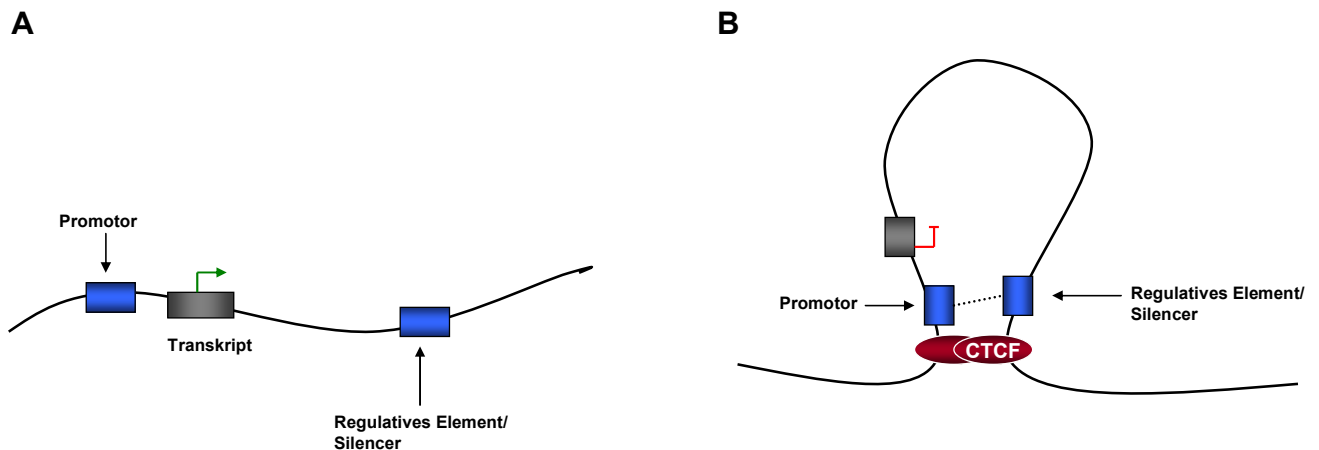


Abb.4.1.: Modell zur CTCF-vermittelten Repression des *NIPBL*-Promotors durch –DNA-Loop-Bildung

(A) Modell der Chromatinkonformation ohne die Bindung von CTCF: Die beiden regulatorischen Elemente (blau) befinden sich nicht in sterischer Nähe zu einander, so dass keine Repression erfolgt. (B) Modell der Chromatinkonformation mit CTCF-Bindung: Durch die DNA-Loop-Bildung können die beiden regulatorischen Elemente miteinander interagieren und somit die Transkription reprimieren.

In Folgeuntersuchungen zur weiteren Charakterisierung einer CTCF-abhängigen Interaktion des identifizierten regulatorischen Elementes und dem *NIPBL*-Promotor, planen wir eine siRNA-vermittelte Reduktion der CTCF-Expression. Zusätzlich ist eine gezielte Mutagenese der CTCF-Bindestelle im regulatorischen Element des Intron 9 (*Silencer*) geplant, um eine mögliche Bindung von CTCF zu verhindern. Es muss allerdings beachtet werden, dass diese Mechanismen auch gewebespezifisch sein können. Des Weiteren sind Analysen in Plasmiden nur bedingt aussagekräftig, da beispielsweise die Konformation der Plasmid-DNA die komplexe Faltung des Chromatins in der Zelle nur bedingt nachbilden kann. So sind beispielsweise Analysen zum Einfluss bestimmter Chromatin-Konformationen (Heterochromatin, Euchromatin) in einem Plasmid-System nur unzureichend darstellbar. Zudem ist Plasmid-DNA weitestgehend zugänglich für die Bindung verschiedenster Transkriptionsfaktoren, während auf chromosomaler Ebene bestimmte Areale, aufgrund der sehr dicht gepackten Struktur (Heterochromatin), für diese Faktoren nicht erreichbar sind. Eine geeignete Methode zur Darstellung der CTCF-abhängigen Interaktion zwischen *Silencer* und Promotor wäre beispielsweise die 3C-Methode (Chromatin Conformation Capture). Bei dieser Methode kann in entsprechenden Zellen die Interaktion bzw. sterische Nähe zwischen zwei bekannten DNA-Abschnitten untersucht werden. Eine Weiterentwicklung der 3C-Technik ist die 4C-Methode (Circularized Chromosome Conformation Capture). Diese Art Technik ermöglicht die Identifizierung unbekannter DNA-Abschnitte, welche mit einer bekannten DNA-Region wechselwirken. Somit ermöglicht die Anwendung der 4C-Methode die Identifizierung weiterer möglicher *Long-range*-Interaktionen

des Silencer-Elementes in Intron 9 des *NIPBL*-Gens zu weiteren unbekanntem chromosomalen Regionen. Es ist also nicht auszuschließen, dass die für dieses funktionelle Element nachgewiesene reprimierende Funktion auch die Expression anderer Gene reguliert.⁴⁹

Da Mutationen innerhalb dieses Elementes einen Einfluss auf die Expression des *NIPBL*-Gens und somit eine Änderung der *NIPBL*-Konzentration zur Folge hätten, wurden in einem Pilotprojekt CdLS-Patienten auf Sequenzvariationen innerhalb dieses Elementes untersucht. Die Auswertungen von derzeit 50 Patienten zeigten allerdings keine Veränderungen innerhalb dieser Region. Da bisher nicht bekannt ist, ob weitere Gene durch dieses Silencer-Element reguliert werden oder ob Mutationen lediglich eine sehr gewebespezifische Veränderung der Expressionslevel bewirken, sind die pathophysiologischen Auswirkungen völlig unbekannt. Somit ist es gemäß dem derzeitigen Stand der Kenntnis nicht auszuschließen, dass Mutationen innerhalb dieses Bereiches keinerlei phänotypische Veränderungen verursachen. Ferner könnten besondere, vom klassischen CdLS-Phänotyp abweichende, oder auch sehr milde Ausprägungen auftreten. Da besonders in der Gruppe der Patienten mit „milderem CdLS-Phänotypen“ die genetische Ursache ungeklärt ist, wären Sequenzänderungen in diesem regulativen Element denkbar. Mit insgesamt 50 Personen wurde bisher nur ein kleines Kollektiv von Patienten untersucht. Durch eine Vielzahl von internationalen Kooperationen wird uns in Kürze ein größeres Kollektiv für diese Mutationsanalysen zu Verfügung stehen.

4.2 NIPBL und Cohesin-assoziierte Proteine

4.2.1. NIPBL interagiert mit MAU2

Die Protein-Protein-Interaktion des dem humanen *NIPBL* orthologen Hefe-Proteins *Scs2* und *Scs4*, welches dem humanen *MAU2*-Protein entspricht, wurde erstmals von Ciosk *et al.* in der Hefe beschrieben.²⁶ Zusammen bilden beide Proteine einen heterodimeren Komplex, der auch als Adherin-Komplex bezeichnet wird und für die Beladung von Cohesin an Chromatin essentiell ist.⁴³ Während für *Scs2* zahlreiche orthologe Proteine in unterschiedlichen Organismen beschrieben wurden, war für *Scs4* zunächst kein Ortholog in höheren Organismen bekannt. Spätere Analysen in verschiedenen Organismen (*C. elegans*, *Homo sapiens*) identifizierten *MAU2* als *Scs4*- orthologes Protein und Interaktionspartner von *NIPBL*.^{9,122,147} Dabei konnte gezeigt werden, dass *MAU2* eine wichtige Rolle bei der Axon- und Zellmigration in *C. elegans* einnimmt und im N-terminalen Bereich eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz aufweist. Der heterodimere Adherin-Komplex aus *NIPBL* und *MAU2* ist wichtig für die Etablierung der Schwesterchromatidpaarung (SCC - ,*sister chromatid cohesion*), sowie für die Beladung von Cohesin an Chromatin, wobei die

molekularen Mechanismen nach wie vor ungeklärt sind. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion beider Proteine genauer analysiert werden, um die Bedeutung des Adherin-Komplexes bzw. dessen Funktion in der Pathogenese des CdLS zu untersuchen. Dazu wurden die Interaktionsdomänen in NIPBL und in MAU2 zunächst mittels *Yeast-two-Hybrid*-Experimenten auf die N-terminalen 38 (NIPBL) und 39 (MAU2) Aminosäuren eingegrenzt. Hier ist darauf hinzuweisen, dass es bei der Arbeit mit Proteinfragmenten zu einer veränderten Faltung bzw. Konformation der entsprechenden Proteine kommen kann, so dass funktionelle Domänen nicht ihre native Struktur aufweisen und somit keine oder stark veränderte funktionelle Eigenschaften aufzeigen. Daher wäre es möglich, dass die Bindeeigenschaften der stark verkürzten NIPBL- bzw. MAU2-Proteine nicht denen der vollständigen Proteine entsprechen. Deshalb wurde die Interaktion beider Proteine zusätzlich unter Verwendung vollständiger Proteine untersucht. Im quantitativen Assay konnten dabei nahezu identische Bindeeigenschaften sowohl für die trunkierten Fragmente, als auch für die vollständigen Proteine nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die als wichtiges Protein-Interaktionsmotiv beschriebene HEAT-Repeat-Region im C-Terminus des NIPBL-Proteins, keinen Einfluss auf die N-terminale Interaktion mit MAU2 besitzt. Daher ist davon auszugehen, dass eine Assoziation anderer NIPBL-Bindeproteine innerhalb des C-terminalen HEAT-Motivs keinen unmittelbaren Einfluss auf die Bindung des MAU2-Proteins im N-Terminus hat.

Ferner können bei der Verwendung des *Yeast-two-Hybrid*-Systems zur Analyse von Interaktionen humaner Proteine weitere experimentell bedingte Probleme auftreten. So ist es bei der Überexpression von Proteinen möglich, dass die veränderten stöchiometrischen Verhältnisse der jeweiligen Proteine zu veränderten Bedingungen in der Zelle führen. Zusätzlich kann eine andere Proteinfaltung, möglicherweise sogar eine funktionell inaktive Konformation durch das Anhängen von großen Fusionstags, wie z.B. die GAL4-Domänen, auftreten. Auch der eventuelle Verlust spezifischer post-translationaler Modifikationen kann zu einer veränderten Proteinstruktur- oder -stabilität führen. In Hefezellen sind viele Bindepartner, die in humanen Zellen mit den zu exprimierenden Proteinen interagieren, bzw. stabilisierende Funktionen übernehmen, nicht vorhanden. Somit kann es sowohl zur Identifizierung falsch-positiver Interaktionen, als auch zum Verlust real existierender Protein-Protein-Interaktionen kommen. Daher erfolgte der finale Nachweis der Interaktion des humanen NIPBL-Proteins mit MAU2 mittels Co-Immunopräzipitation aus Extrakten verschiedener humaner Zellen unter endogenen Expressionsbedingungen.

Nachdem die Interaktion von NIPBL und MAU2 nachgewiesen und detailliert analysiert wurde, konnte die funktionelle Relevanz von acht in CdLS-Patienten identifizierten Missense-Mutationen im *NIPBL*-Gen bei der Bildung des Adherin-Komplexes untersucht werden. Sechs dieser Mutationen wurden in Sequenzanalysen von Patienten mit CdLS in unserem

Institut, sowie im Childrens Hospital of Philadelphia neu identifiziert, zwei waren bereits bekannt und in der Literatur als genetische Ursache für ein CdLS dokumentiert.^{12,150} Die funktionellen Analysen wurde mit dem *Mammalian-two-Hybrid* (M2H)-Assay durchgeführt. Diese Methode bietet gegenüber dem Y2H-Assay zahlreiche Vorteile. So erfolgt die Expression der Proteine in humanen Zellen, womit spezifische post-translationale Modifikationen ermöglicht und spezifische potentielle Hilfsproteine potentiell verfügbar wären. Ferner bietet eine Verwendung humaner Zellen auch die Möglichkeit zur Überexpression des, mit einem kalkulierten Molekulargewicht von über 300 kDa, sehr großen NIPBL-Proteins.⁵³ Weiterhin ist die Quantifizierung durch Messung der Luciferase-Aktivität wesentlich sensitiver und ermöglicht eine genauere quantitative Differenzierung der einzelnen Mutationen, als die in den Hefesystemen zur Verfügung stehenden Methoden. Parallel durchgeführte *in silico* Analysen sagten für fünf der acht getesteten Mutationen eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen pathogenen Effekt vorher. Abgleiche mit verschiedenen Datenbanken ergaben, dass alle fünf durch diese Mutationen bedingten Aminosäuresubstitutionen innerhalb hochkonservierter Regionen lokalisiert sind. Proteindomänen mit hoher Konservierung sind häufig essentiell zur Ausbildung bestimmter Strukturen bzw. Funktionen eines Proteins. Veränderungen innerhalb dieser wichtigen Protein-Regionen haben oftmals erhebliche Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften des Proteins. Unsere funktionellen Analysen aller acht Mutationen zeigten für zwei dieser Substitutionen (G15R, P29Q) einen fast vollständigen Verlust der Adherin-Komplexbildung in allen verwendeten Zelltypen, während keine signifikanten Veränderungen der Bindeeigenschaften durch die anderen sechs Mutationen gezeigt werden konnten.

So wurde nachgewiesen, dass ausschließlich die beiden Mutationen (G15R und P29Q) die Wechselwirkung zwischen NIPBL und MAU2 beeinflussen, die innerhalb der in der hier vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionsdomäne (AS 1-38) lokalisiert sind. Alle fünf Aminosäureaustausche außerhalb dieser analysierten Region zeigten im M2H-Assay keinen Effekt auf die Interaktion mit MAU2. Obwohl die Ergebnisse keine Bedeutung dieser einzelnen Aminosäuresubstitutionen für die Interaktion mit MAU2 zeigen, sind alle fünf Mutationen *de novo* aufgetreten und damit höchst wahrscheinlich krankheitsursächlich. Da alle fünf Aminosäuren innerhalb einer konservierten Region liegen, könnten diese Mutationen andere nicht bekannte bzw. hier nicht analysierte Funktionen des NIPBL-Proteins verändern.

In weiteren funktionellen Analysen sollte untersucht werden, inwieweit sich die Mutation G15R und der damit verbundene Verlust der Adherin-Komplex-Formierung auf die Schwesterchromatidpaarung (SCC) auswirkt. Für diese Untersuchungen stand uns eine lymphoblastoide Zelllinie des entsprechenden Patienten zur Verfügung. Mittels Färbung der Chromosomen in der Metaphase konnte gezeigt werden, dass keine signifikante Änderung

des SCC, im Vergleich zu Kontroll-Zelllinien ohne Mutationen, auftrat. Dieses Ergebnis korreliert mit der in der Literatur bereits beschriebenen Beobachtung, dass bei Patienten mit CdLS die eine Mutation im *NIPBL*-Gen tragen, keine Änderung der SCC nachzuweisen ist.^{73,143} Die Mutation im *NIPBL*-Gen ist heterozygot, somit liegt ein weiteres, nicht mutiertes Wildtyp (wt) Allel vor. Das von diesem wt-Allel kodierte und exprimierte Genprodukt reicht demnach noch aus, um eine ausreichende Menge an funktionsfähigen Adherin-Komplexen mit MAU2 auszubilden. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass Patienten mit einer heterozygoten Mutation im *RAD21*-Gen eine veränderte SCC aufweisen.³² Dieser patho-physiologische Unterschied kann dabei als eine molekulare Ursache für die deutlich unterschiedlichen phänotypischen Auswirkungen gesehen werden, obwohl beide Genprodukte als Cohesin-Proteine bezeichnet werden und Teil eines gemeinsamen Multi-Protein-Komplexes sind.

Des Weiteren zeigen Patienten mit Roberts-Syndrom ebenfalls sehr auffällige Veränderungen bei der Schwesternchromatidpaarung.¹³⁸ Diese Erkrankung wird, im Gegensatz zum CdLS, rezessiv vererbt. Die Patienten zeigen dabei homozygote, bzw. hemizygoten Mutationen im *ESCO2*-Gen.¹⁴⁰

Ein weiterer Hinweis, dass die noch vorhandene Menge von NIPBL ausreicht, zeigt sich durch eine unveränderte intrazelluläre Lokalisierung und Konzentration von NIPBL und MAU2 in der Zelllinie des Patienten mit der Mutation G15R. Während ähnliche Analysen von Watrin *et al.* zeigten, dass bei Verlust des NIPBL-Proteins eine Destabilisierung des dem humanen MAU2-Protein orthologen Scc4-Proteins im Zellkern bewirkte.¹⁴⁷

Insgesamt zeigen die Ergebnisse unserer *in-vivo*-Analysen keine signifikanten Veränderungen der Schwesterchromatidpaarung oder der Proteinstabilität, bzw. -Verteilung, wodurch davon auszugehen ist, dass die reduzierte Menge an NIPBL ausreicht bzw. weitere kompensatorische Mechanismen vorhanden sein müssen. Hierbei könnten beispielsweise Regionen C-terminal der ersten 30 Aminosäuren von NIPBL für eine Stabilisierung des MAU2-Proteins verantwortlich sein oder weitere NIPBL-unabhängige Funktionen von MAU2 in humanen Zellen zur Stabilisierung von MAU2 beitragen.

Interessanterweise konnte in einer kürzlich erschienenen Arbeit erstmalig eine MAU2-unabhängige Assoziation von NIPBL an Chromatin nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass NIPBL an DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) über die sogenannten *DNA Damage response proteins* (MDC1, RNF168), sowie HP1 γ bindet. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Interaktionsdomäne zu MAU2 zur Akkumulation an den DSBs nicht notwendig ist.¹⁰⁶ Daher stellt sich die Frage, ob Adherin, als NIPBL-MAU2-Heterodimer allein, die spezifische Rekrutierung des Cohesinringes an DNA bewirkt.

Obwohl die hier analysierten acht Mutationen unterschiedliche Effekte auf die Adherin-Komplexbildung zeigten, weisen die Patienten sehr ähnliche phänotypische Merkmale auf.

Alle Patienten besitzen CdLS-typische Gesichtszüge und auch weitere charakteristische Merkmale, wie gastrointestinale Störungen oder Hörschäden, die Patienten mit *Missense*-Mutationen in nahezu allen Bereichen des *NIPBL*-Gens aufweisen. Obwohl diese Mutationen unterschiedliche funktionelle Bereiche des NIPBL-Proteins verändern, zeigen die betroffenen Patienten sehr ähnliche klinische Auffälligkeiten bzw. ähnliche Phänotypen. Es ist daher davon auszugehen, dass NIPBL an zahlreichen Mechanismen beteiligt ist und dabei wahrscheinlich eine zentrale Rolle spielt. Durch Mutationen im *NIPBL*-Gen würde es zur Fehlregulation vieler Mechanismen kommen, die wiederum eine wichtige zentrale Schaltstelle beeinflussen, so dass die Patienten letztendlich sehr ähnliche Phänotypen aufweisen.

Während zahlreiche Mutationen im *NIPBL*-Gen beschrieben wurden, konnten im Gen für dessen Interaktionspartner MAU2 bisher keine Mutationen nachgewiesen werden. In Mutationsanalysen konnten wir neben einigen bekannten Polymorphismen, eine Sequenzvariante innerhalb des Gens nachweisen. Dabei handelt es sich um eine Deletion von fünf Aminosäuren (QAAAA) im hoch konservierten N-terminalen Bereich von MAU2, die sowohl beim Patienten, als auch bei der nicht-betroffenen Mutter nachgewiesen wurde. Ferner konnte in unseren Interaktionsstudien ein signifikanter Effekt dieser Mutation auf die Adherin-Komplexbildung ausgeschlossen werden. Somit wurde ein krankheitsursächlicher Effekt dieser Mutation ausgeschlossen. Zusätzliche Mutationsanalysen in alle anderen fünf bekannten CdLS-Genen zeigten keine Auffälligkeiten. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass 35 % der CdLS-Fälle ungeklärt sind, dass noch unbekannte Gene oder Variationen vorhanden sind, die in den bisherigen diagnostischen Verfahren noch nicht berücksichtigt werden. Möglicherweise besitzt der Patient eine weitere Sequenzvariation, die in Kombination mit der QAAAA-Deletion eine pathogene Wirkung hat. Im Fall des zweiten Patienten mit der gleichen MAU2-Deletion (QAAAA) konnte eine weitere Deletion von 5 Mb auf dem Chromosome 2q23 identifiziert werden. Diese Deletion betrifft das Gen *MBD5*, welches mit mentaler Retardierung und Mikrozephalie assoziiert ist.¹³¹ Dieser Patient unterscheidet sich deutlich von dem anderen Patienten mit der gleichen Deletion und weist eine schwere mentale Retardierung auf, was höchst wahrscheinlich auf den Verlust eines *MBD5*-Allels zurückzuführen ist.

4.2.2. NIPBL und HDAC8

Mutationen im *HDAC8*-Gen wurden in diesem Jahr als eine weitere häufige genetische Ursache für das CdLS identifiziert.³¹ *HDAC8* kodiert für eine Deacetylase, die zur Gruppe der Klasse I Histondeacetylasen (HDACs) gehört. HDAC-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung spezifischer Chromatinstrukturen und bei epigenetischen Mechanismen zur

Regulation der Transkription.¹⁸ Analysen im Mausmodell zeigten, dass HDAC8 eine wichtige Rolle in der Schädelentwicklung einnimmt.⁵⁷ Neueste funktionelle Studien identifizierten eine weitere Funktion von HDAC8 in der Zellzyklus-abhängigen Regulation der Acetylierung des Cohesin-Komplexes. Eine Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Analysen zeigten eine durch HDAC8 vermittelte Deacetylierung des Cohesin-Proteins SMC3.³¹ Vorherige Studien in unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine funktionelle Assoziation des CdLS mit Proteinen der Klasse I Histondeacetylasen aufzeigen. Mittels *Yeast-two-Hybrid* Analysen und Immunpräzipitationen konnte die direkte Protein-Protein-Interaktion der HDAC Proteine 1 und 3 mit dem NIPBL-Protein nachgewiesen werden.⁶⁸ Vergleiche der Klasse I HDAC-Proteine, HDAC 1,-2,-3 und -8 mittels verschiedener Datenbank-Tools (PRSS3 von EMBnet) ergab eine hohe Übereinstimmung (43 %) der Aminosäuresequenzen. HDAC6, das zur Klasse IIB der Histondeacetylasen gehört und keine Interaktion mit NIPBL aufwies, besitzt hingegen nur wenige Sequenzübereinstimmungen (27 %). Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte Co-Immunpräzipitation von NIPBL und HDAC8 konnte beweisen, dass auch HDAC8 mit NIPBL interagiert bzw. in denselben Proteinkomplexen zu finden ist. Diese Interaktion zeigt somit erstmalig eine direkte funktionelle Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen und dem Cohesin-Komplex. Denn neben einer Co-Lokalisation von NIPBL, bzw. Scc2 mit Cohesin konnte bisher keine Wechselwirkung mit den Cohesin-Untereinheiten SMC1, SMC3 und RAD21 nachgewiesen werden. Mit der Interaktion zwischen NIPBL und HDAC8, welches wiederum mit der Cohesin-Komponente SMC3 interagiert, ist somit eine direkte Verbindung des NIPBL-Proteins zum Cohesin-Komplex nachgewiesen.^{71,80}

Um die NIPBL-HDAC8-Interaktion detaillierter charakterisieren zu können, wurden Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefen durchgeführt. Hierbei konnte allerdings für keines der eingesetzten NIPBL-Fragmente eine direkte Interaktion mit HDAC8 nachgewiesen werden. Eine mögliche Begründung könnte darin liegen, dass die Expression in Hefen durch z.B. veränderte post-translationale Modifikationen der einzelnen Proteine, zu einer Änderung der Proteinfaltung führt und damit spezifische Binderegionen von Interaktionspartnern oder Co-Faktoren oder auch die Proteinstabilität modifiziert sind. Eine weitere Ursache könnte in der Verwendung von Proteinfragmenten liegen. Es wurden zwar bewusst möglichst große NIPBL-Fragmente verwendet (teilweise bis zu 90 kDa), um eine möglichst native Faltung der verwendeten Konstrukte zu ermöglichen, doch repräsentieren diese Fragmente nur Teilstücke des NIPBL-Proteins. Die Expression noch größerer Proteinfragmente in Hefen war leider nicht möglich, wodurch Fehlfaltungen beispielsweise durch stabilisierende, flankierende Regionen nicht ausgeschlossen werden können. Interessanterweise konnte mit dieser Art von Analysen und der Verwendung von NIPBL-Protein-Fragmenten eine direkte Interaktion von NIPBL mit HDAC1 und HDAC3 nachgewiesen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Interaktion der beiden humanen Proteine NIPBL und HDAC8 nicht

direkt erfolgt, diese aber über weitere Co-Faktoren in einen gemeinsamen Komplex eingebunden sind, der in der Hefe, aufgrund von fehlenden Komponenten nicht ausgebildet werden kann. In diesem Zusammenhang ist aufzuführen, dass in sehr umfangreichen *Yeast-two-Hybrid*-Analysen unserer Arbeitsgruppe mit verschiedenen cDNA-Bibliotheken, die auch HDAC8 enthielten, lediglich eine direkte Interaktion mit HDAC-1 und -3, jedoch nicht mit HDAC8 gezeigt werden konnte. Mittels Co-Immunpräzipitation konnte aber die Interaktion der endogenen Genprodukte NIPBL und HDAC8 in humanen Zellen nachgewiesen werden. Diese Methode ist ein sehr spezifischer Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion, da beide Proteine in einer physiologischen Umgebung, in „voller Länge“, sowie in ihrer physiologischen Konzentrationen und in nativer Konformation vorliegen. Ob die Interaktion direkt erfolgt oder ob beide Proteine „nur“ Teil eines größeren Multi-Protein-Komplexes sind, wobei die Interaktion durch essentielle Co-Faktoren erfolgt, kann mit dieser Methode nicht differenziert werden. HDAC-Proteine gelten im Allgemeinen als sogenannte „Brückenproteine“ (*bridging proteins*), die verschiedene Protein-Komplexe zusammenführen können. Diese Komplexe sind vor allem in der Transkriptionsrepression involviert.^{104,128} In weiteren geplanten Experimenten sollen sogenannte *GST-pulldown*-Assays angewendet werden, um die direkte Interaktion von HDAC8 mit NIPBL in einem alternativen System zu überprüfen. Diese Methode bietet gegenüber den Experimenten in Hefen den Vorteil, dass NIPBL als vollständiges Protein mittels *in-vitro*-Transkription-Translation exprimiert werden kann und HDAC8 als gereinigtes, rekombinantes Protein eingesetzt wird. Sollte mit Hilfe dieses Systems eine direkte Interaktion beider Proteine nachzuweisen sein, bietet diese Methode die Möglichkeit den Einfluss identifizierter *Missense*-Mutationen in *NIPBL* oder *HDAC8* auf die Interaktion beider Proteine quantitativ zu analysieren. Besonderes Interesse liegt dabei auf den kürzlich in Patienten mit CdLS identifizierten *Missense*-Mutationen im *HDAC8*-Gen, welche zwar keinerlei Einfluss auf die Deacetylase-Funktion des HDAC8-Proteins zeigen, aber vielleicht die Interaktion mit dem NIPBL-Protein beeinflussen.

4.2.3. NIPBL und SIN3A, HDAC8 und SIN3A

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion von NIPBL mit einem weiteren Protein, SIN3A, in humanen Zellen gezeigt werden. SIN3A war ursprünglich ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe mittels *Yeast-two-Hybrid*-Analysen als potentiell NIPBL-Bindeprotein identifiziert worden. SIN3A und das sehr ähnliche SIN3B-Protein sind wichtige Co-Faktoren, die in heteromeren Multiproteinkomplexen vorkommen und die Transkription spezifischer Gene regulieren. SIN3A bildet mit HDAC1, bzw. 2 und dem Retinoblastoma-assoziierten Protein RbAp48 einen Proteinkomplex^{38,62,100,125} der Strukturänderungen im Chromatin bewirkt und so die Repression spezifischer Zielgene bewirkt.^{7,87,146} Ferner ist SIN3A als Mad-interagierendes Protein beschrieben. Proteine der Mad-Familie haben eine

wichtige Bedeutung in der Zellproliferation und – differenzierung.^{3,7,10} In der Literatur sind zahlreiche Proteine bekannt, die mit dem SIN3A/HDAC-Repressorkomplex assoziiert sein können. Dazu gehören u.a. MeCP2^{23,25}, p53²⁹, N-CoR und SMRT.¹²⁵ Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion von NIPBL mit SIN3A, der bereits aufgeführten Interaktion zwischen NIPBL und HDAC8, und der zusätzlich in der Literatur beschriebenen Interaktion von SIN3A mit HDAC-Proteinen der Klasse I, wurde in weiteren Analysen eine Wechselwirkung zwischen SIN3A und HDAC8 untersucht. Mittels Co-Immunpräzipitation wurde auch hier die spezifische Interaktion von SIN3A und HDAC8 in humanen Zellen nachgewiesen. Diese Interaktion zwischen SIN3A und HDAC8 könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass HDAC8, aber auch HDAC1 und HDAC3 als „Brückenproteine“ zwischen verschiedenen NIPBL-Komplexen fungieren. Möglicherweise übernimmt NIPBL die Rekrutierung dieses Multiproteinkomplexes an DNA, ähnlich der Beladung von Cohesin an Chromatin. Dies könnte sowohl über die Interaktion mit HDACs, als auch über die Wechselwirkung mit SIN3A erfolgen.

Wie bereits erwähnt, konnte in der Literatur gezeigt werden, dass in Patienten mit CdLS die Expressionsprofile spezifischer Gene gegenüber Kontrollen deutlich verändert sind.⁸⁹ Daher könnten Defekte sowohl bei der Cohesinbeladung, als auch bei der Rekrutierung von anderen Multiproteinkomplexen zur Regulation der Transkription, Auswirkungen auf die Expression CdLS-spezifischer Gene haben. Eine andere Hypothese wäre, dass NIPBL die lokale Konformation des Chromatins über die Rekrutierung von verschiedenen Faktoren wie HDACs oder SIN3A reguliert. Die so rekrutierten Proteine führen zu einer Veränderung bzw. einer Reprogrammierung der Histon-Proteine, welche wiederum lokale Strukturveränderungen des Chromatins bewirken. Diese spezifischen Chromatinstrukturen könnten dann eine Art Erkennungssequenz zur NIPBL-vermittelten Beladung der DNA mit dem Cohesin-Komplex sein. Nach diesem Modell wäre der Multiproteinkomplex mit SIN3A und den HDACs, über die Regulation der Cohesin-Beladung der DNA, indirekt an der Genregulation beteiligt.

4.2.4. NIPBL und potentielle Bindepartner (Hypothesenfreier Ansatz)

Neben den spezifischen NIPBL-Protein-Interaktionen, die in dieser Arbeit intensiv bearbeitet wurden, erfolgte zusätzlich die Identifizierung bisher unbekannter Interaktionspartner des NIPBL-Proteins. Die Entdeckung von neuen Interaktionspartnern könnte dabei neue Aspekte in der Funktion des NIPBL-Proteins aufzeigen. Zusätzlich stellen Gene, die für die Interaktionspartner kodieren, potentielle CdLS-Kandidatengene dar. Somit könnte für Patienten, bei denen bisher keine Mutationen identifiziert wurden (circa 35-40 %), die Frage der genetischen Ursache für deren Erkrankung geklärt werden. Eine geeignete Methode zum Nachweis dieser Interaktionen ist der GFP-Trap,^{114,115} bei dem das zu analysierende Protein

als Fusion mit GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) überexprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie, unter Verwendung eines GFP-bindenden Proteins, aufgereinigt wird. Die vorhandenen Interaktionspartner werden dabei co-präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss daran durch massenspektroskopische Analysen identifiziert.

1,17,26,44

Vorteil dieser Methode ist vor allem, dass zunächst die Proteinexpression transfizierter Zellen durch die GFP-Fusion mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden kann. Ein weiterer Vorteil des gut etablierten GFP-Trap-Systems, ist die sehr hohe Spezifität des GFP-bindenden Antikörperfragmentes (GBP), so dass die Identifizierung falsch-positiver Bindepartner bei geeigneten Präzipitationsbedingungen nahezu ausgeschlossen werden kann. Da mit NIPBL-GFP transient transfizierte Zellen jedoch keine Expression des NIPBL-GFP-Fusionsproteins zeigten und auch andere Fusionsproteine von NIPBL (myc-Tag, FLAG-Tag) in verschiedenen humanen Zellen nicht ausreichend exprimierbar waren, erfolgten alle weiteren Analysen mit endogenem NIPBL-Protein. Mittels Immunpräzipitation wurde das endogene NIPBL-Protein aus humanen Zellextrakten isoliert und die Präzipitate unter Verwendung von massenspektrometrischen Methoden (MALDI-TOF) analysiert. Durch den Einsatz von endogenen Genprodukten aus dem humanen System bietet diese Analyse viele Vorteile gegenüber dem *Yeast-two-Hybrid*-System. So weisen die Proteine entsprechende post-translationale Modifikationen auf und liegen in der nativen Konzentration in der Zelle vor, was beispielsweise wichtig für die Stöchiometrie bei der Ausbildung von Protein-Komplexen sein kann.³⁹ Des Weiteren ist die Verwendung vollständiger bzw. nativer Proteine gegenüber dem Einsatz von Fragmenten vorteilhaft, da die natürliche Proteinstruktur ausgebildet werden kann und stabilisierende bzw. destabilisierende Effekte flankierender Proteinregionen berücksichtigt werden. Die Verwendung nativer Zellsysteme zur Identifizierung von Interaktionspartnern reduziert somit die Anzahl der falsch-positiven Bindekandidaten. Nachteile dieser Methode sind allerdings die Verwendung einer bestimmten Zelllinie, die z.B. die Anzahl der Bindepartner auf diesen Zelltyp beschränkt, sowie die Limitierung der Sensitivität aufgrund einer meist oftmals eher schwachen Expressionen des Zielproteins. Gerade eine geringe Menge des zu analysierenden Proteins, wie NIPBL, erschwert die Detektion von Bindepartnern, deren Bindung an NIPBL sehr instabil bzw. schwach sein kann.

Zusätzlich kann es, durch die Anlagerung eines Bindepartners an das Zielprotein, zu einer Maskierung der vom Antikörper erkannten antigenen Determinante kommen, was eine Erkennung und Präzipitation ausschließen würde. Die Hauptproblematik liegt in den allermeisten Fällen allerdings in der Nicht-Verfügbarkeit eines ausreichend spezifischen Antikörpers zur Präzipitation des Zielproteins in seinen natürlichen Proteinkomplexen.

Um versuchsbedingte Artefakte in Form von unspezifischen Bindungen von Zellproteinen an die Agarosematrix und Fragmenten oder Multimeren des Antikörpers weitestgehend auszuschließen, wurden parallel zwei Kontroll-Experimente durchgeführt und analysiert. Dabei erfolgte zum einen die Inkubation der Agarosebeads nur mit dem Antikörper und zum anderen wurden die Agarosebeads nur mit dem Zellextrakt inkubiert.

Nach Auswertung aller Ansätze konnten folgende zehn potentielle NIPBL-Bindeproteine identifiziert werden: neurabin-2 (prot phosphatase), moesin + GEF EAX09148, phosphatase 2A regulatory subunit, sequestosome-1 isoform 1, Tubulin beta, **histone-binding protein RBBP4**, glutathione S-transferase, ACTB protein - beta actin, protein phosphatase type 2A catalytic subunit, galectin-1.

Obwohl es sich bei NIPBL um ein ausschließlich im Zellkern nachzuweisendes Protein handelt, wurden hauptsächlich zytoplasmatische Proteine als potentielle Bindepartner identifiziert. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Verwendung von kompletten Zellextrakten für diese Analysen, bei denen es nach der Zell-Lyse zu einer Vermengung der Proteine aller Zellkompartimente kommt. Dabei können versuchsbedingte Interaktionen von Proteinen auftreten, deren Wechselwirkung, bedingt durch ihre räumliche Trennung, in einer intakten Zelle nicht möglich ist. Eine spezifische Anreicherung von Zellkernen, bzw. den daraus gewonnenen Extrakten, mit denen anschließend die Immunpräzipitation erfolgt, wäre eine Möglichkeit zum bestmöglichen Ausschluss zytoplasmatischer Proteine. Leider ist der Materialverlust und die finale Menge an Gesamtprotein nach einer solchen Anreicherung der Zellkerne sehr gering, so dass die Versuche mit kompletten Zellextrakten durchgeführt wurden.

Aufgrund der oben aufgeführten Funktionen des NIPBL-Proteins und der bereits verifizierten Protein-Interaktionen, ist das Histon-Bindeprotein RBBP4, bzw. das Rb-assoziierte Protein RbAp48, ein funktionell sehr interessantes und bisher unbekanntes NIPBL-Bindeprotein. Das im Nukleus lokalisierte RBBP4 interagiert mit zahlreichen Proteinen, die in der Transkriptionsrepression essentielle Funktionen einnehmen. Dazu gehören u.a. SIN3A, die Rb-Familie, HP1, sowie Suv39H1.^{104,142,153} Weiterhin ist dieses Protein, neben den Histondeacetylasen HDAC1-3, eine wichtige Komponente im sogenannten *core histone deacetylase complex*, der bei der Bildung und Stabilisierung von Heterochromatin eine wichtige Rolle spielt.¹³⁹ Für alle aufgeführten Proteine wurde in bisherigen Arbeiten unserer Gruppe und in dieser Arbeit auch eine Interaktion mit dem NIPBL-Protein gezeigt. Der Nachweis der Interaktion von NIPBL mit RBBP4 deutet somit erneut darauf hin, dass NIPBL mit größeren Multiproteinkomplexen assoziiert ist, welche wichtige Funktionen bei der Formation der Chromatin-Struktur und in der Regulation der Transkription ausüben.

In weiteren Untersuchungen soll nun vor allem die Interaktion von NIPBL mit RBBP4 charakterisiert werden. Dabei können verschiedene Protein-Protein-Interaktionsassays, wie

z.B. Co-Immunpräzipitation und *Yeast-two-Hybrid*-Analysen, Aufschluss darüber geben, ob die Interaktion z.B. direkt oder indirekt auftritt. Ferner könnten zusätzliche Interaktionspartner identifiziert werden, in dem die Immunpräzipitation des NIPBL-Proteins aus angereicherten Zellkernextrakten durchgeführt wird. Darüber hinaus sind Mutationsanalysen des *RBBP4*-Gens bei Patienten mit CdLS in Vorbereitung.

4.2.5. Mutationsanalysen von *RAD21*

Bei Mutationsanalysen und CNV-Analysen mittels Array-CGH (*comparative genomic hybridization*) durchgeführt in einer Kooperation mit der Arbeitgruppe von Matthew Deardorff, Children's Hospital of Philadelphia und unsere Arbeitsgruppe, wurden sowohl zwei interstitielle Mikrodeletionen, als auch zwei *Missense*-Mutationen (C585R, P376R), die das *RAD21*-Gen betreffen, identifiziert. Protein-Modellierungs-Analysen auf Grundlage von existierenden Proteinkomplex-Strukturen der Interaktion von *RAD21* mit *SMC1*, zeigten für die C585R-Mutation eine veränderte Wasserstoffbrückenbindung und somit eine Destabilisierung des Cohesin-Komplexes. In funktionellen Analysen konnte jedoch weder in Co-Immunpräzipitationen, noch im M2H-Assay ein signifikanter Effekt dieser Mutation auf die Interaktion zwischen *SMC1* und *RAD21* nachgewiesen werden, da die Fusionstags die Interaktion der beiden Proteine verhinderten. Die zweite Mutation P376R befindet sich innerhalb der bereits beschriebenen STAG-Interaktionsdomäne von *RAD21*.¹²⁴ Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten M2H-Assays zeigten, dass diese Mutation im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verstärkte Bindung zu den Proteinen *STAG1* und *STAG2* bewirkt. Diese Verstärkung der Interaktion könnte zum einen eine vorzeitige Assoziation zwischen *RAD21* und *STAG* während der Anaphase verursachen, was eine verfrühte Kohäsion vor der S-Phase bewirken würde.^{97,144} Zum anderen könnte eine erschwerte Dissoziation des Cohesin-Ringes zu einer verzögerten Schwesterchromatid-Separation während der Prophase führen oder eine veränderte Expression verschiedenster Gene zur Folge haben.^{36,89,144} Um dies zu untersuchen, wurden Metaphasenchromosomen auf Kohäsionsdefekte geprüft. Dabei konnte in einer Zelllinie des Patienten mit der P376R Mutation, eine gestörte Trennung der Schwesterchromatiden während der Metaphase gezeigt werden. Zusätzlich konnte für die Zelllinien aus den Patienten mit *RAD21*-Deletionen eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigender Substanzen oder Strahlung nachgewiesen werden (in Kooperation mit Matthew Deardorff). Auch dies wurde bereits als allgemeine Charakteristik bei Patienten mit CdLS beschrieben.^{111,143} Da sich der Phänotyp der Patienten mit einer *RAD21*-Mutation vor allem in kognitiven Merkmalen von denen des klassischen CdLS unterscheidet, repräsentiert diese Gruppe von Patienten das sehr milde Spektrum des CdLS. Derzeit besteht daher die Diskussion über eine neue Definition des CdLS, in der Patienten beschrieben werden, die klassische Merkmale dieser Erkrankung

aufweisen. Mildere Varianten sollen eher unter dem Begriff der „Cohesinopathien“ eingeordnet werden. Dabei sollen Erkrankungen zusammengefasst werden, deren genetische Ursache eine Mutation in einem Cohesin- oder einem damit assoziierten Gen ist.

4.2.6. Mutationsanalysen von *CDCA5*, bzw. *Sororin*

Um ein weiteres mit dem Cornelia de Lange-Syndrom assoziiertes Gen zu identifizieren, wurde ein Gen für Sequenzanalysen gewählt, dessen Genprodukt eng mit der bekannten Funktion des NIPBL-Proteins verknüpft ist. Wie NIPBL ist Sororin, bzw. CDCA5 mit dem Cohesin-Komplex assoziiert und ist essentiell für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen während der G2-Phase. Durch die Funktion von Sororin wird eine korrekte Schwesterchromatidpaarung gewährleistet, in dem dieses Protein mit an Chromatin gebundenem Cohesin interagiert und damit dessen stabile Bindung während der Interphase (G2) reguliert.¹²⁰ Zusammen mit dem Cohesin-assoziierten Protein Eco2, der Acetyltransferase für SMC3, sorgt Sororin dafür, dass die Kohäsion nur in Zellen mit repliziertem Chromatin erfolgt.⁸⁴ Dabei ist zu erwähnen, dass HDAC8 der Antagonist zu Esco2 ist, dem humanen Ortholog von Eco2. Somit könnte auch hier, durch die funktionellen Verknüpfungen der einzelnen Proteine, eine Verbindung zum CdLS bestehen. Des Weiteren ist aufzuführen, dass Sororin ein Antagonist des Kohäsion-assoziierten Faktors WAPL ist, der im Gegensatz zu seinem Gegenspieler, die Dissoziation von Cohesin vom Chromatin während der Interphase und Prophase reguliert.^{47,105} Bei den hier durchgeführten Mutationsanalysen in 47 Patienten wurden neben wenigen Polymorphismen keine Sequenzauffälligkeiten im *Sororin*-Gen (*CDCA5*) identifiziert. Möglicherweise könnten nur wenige Patienten Mutationen in diesem Gen aufweisen, ähnlich, wie in *SMC3*. Weiterhin könnte es sein, dass Mutationen in diesem Gen einen sehr milden oder veränderten Phänotyp verursachen, der unerkant bleibt oder der, aufgrund seiner speziellen Ausprägung, nicht in unserem Kollektiv erfasst wurde. Zu dem zeigen funktionelle Analysen eine sehr essentielle Funktion des Sororin-Proteins bei der Regulation der Schwesterchromatidpaarung, welche nur bei einem Teil der Patienten mit CdLS milde Defekte aufweist.⁷³

4.3. Ausblick

Obwohl in der heutigen Zeit die Verfahren zur Sequenzanalyse mit Genom- und Exom-Sequenzierung hoch entwickelt sind (NGS, *next generation sequencing*), verbleiben viele Fälle (35-40 %) im CdLS hinsichtlich ihrer genetischen Ursache ungeklärt. Da es bei dieser Erkrankung nur wenige familiäre Fälle gibt, Mutationen also eher *de novo* Ereignisse darstellen, wurden beispielsweise, unter Verwendung der *Next-Generation-Sequencing*-

Technik, bisher 20 Trio-Analysen (Mutter-Vater-betroffenes Kind) in verschiedenen Forschergruppen, u.a. in unserem Institut, durchgeführt, um weitere Kandidatengene zu identifizieren. Diese Art der Analyse bietet den Vorteil Mutationen aller Cohesin- oder Cohesin-assoziierten Genen gleichzeitig analysieren zu können. In diesen Untersuchungen wurden bisher jedoch keine weiteren Mutationen gefunden, sondern nur Varianten, die auch in einem gesunden Elternteil nachgewiesen werden konnten. Dies korreliert mit eigenen Sequenzanalysen und auch mit den Informationen im Austausch mit anderen Arbeitsgruppen, bei denen verschiedene Sequenzvarianten innerhalb von Cohesin-Genen identifiziert wurden, die ebenfalls bei einem nicht-betroffenen Elternteil auftraten. Daher wäre eine weitere Hypothese, dass bestimmte Sequenzänderungen allein keine pathogenen Auswirkungen haben, jedoch zusammen mit einer oder mehreren anderen Varianten zum Phänotyp führen. Für dieses „*Second-Hit*“-Modell liegen derzeit jedoch keine Beweise vor, ist aber Gegenstand derzeit angedachter Kooperationsprojekte. Interessanterweise, konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit gezeigt werden, dass genetische Interaktionen zwischen den Genen der Cohesin-Untereinheiten und Genen, die die Replikationsgabel (z.B. PARP) stabilisieren besteht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Zellen durch Mutationen in den Cohesin-Genen eine erhöhte Sensibilität für Defekte bzw. Mutationen in Genen der Replikationsgabel aufweisen.⁹⁴

Die bisherigen Sequenzanalysen bei den Patienten mit CdLS zeigen ausschließlich Mutationen in Genen, deren Genprodukte funktionell mit dem Cohesin-Komplex assoziiert sind. Daher wird in derzeitigen Analysen ein besonderes Augenmerk auf Mutationen in Cohesin-Genen gelegt. Problematisch ist dabei, dass solche Mutationen sehr selten auftreten können, wie es für *RAD21* gezeigt wurde oder sich sogar auf Einzelfälle beschränken.^{34,99} Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass die funktionelle Assoziation vieler Gene bzw. derer Genprodukte mit dem Cohesin-Komplex bisher nicht bekannt ist. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass HDAC8, neben seiner vorhergesagten Funktion als Deacetylase von Histon-Proteinen, die Deacetylierung des SMC3-Proteins katalysiert und somit die Zellzyklus-spezifische Assoziation des Cohesins an das Chromatin reguliert. Es ist anzunehmen, dass die genetische Ursache der verbleibenden 35-40 % der Patienten mit CdLS durch Mutationen in vielen einzelnen Genen zu begründen ist. Dabei werden ganz besonders funktionelle Analysen zum Nachweis der patho-physiologischen Relevanz dieser Mutationen eine große Herausforderung darstellen und nur durch Kooperationen verschiedener Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Schwerpunkten und Expertisen realisierbar sein.

Des Weiteren sind solche Kooperationen bzw. internationale Zusammenschlüsse verschiedener Arbeitsgruppen (EU-Initiative - E-RARE) essentiell, um ausreichend große Kollektive von Patienten zu generieren. Solche Kollektive ermöglichen eine Identifizierung

weiterer Mutationen in neu identifizierten CdLS-assoziierten Genen, die, wie beispielsweise das *SMC3*- oder *RAD21*-Gen nur in sehr weniger Patienten mutiert vorliegen.

Möglicherweise können durch diese Analysen zusätzlich, aufgrund von phänotypischen Unterschieden bei den untersuchten Patienten, zu einer besseren Korrelationen eines spezifischen Genotyps mit dem jeweiligen Phänotyp aufgezeigt werden und damit zu einer verbesserten Klassifikation, bzw. zu einer besseren Definition des CdLS beitragen.

5. Zusammenfassung

Das Cornelia de Lange-Syndrom (CdLS) ist ein angeborenes und in seiner Ausprägung sehr heterogenes Dysmorphiesyndrom. Patienten mit CdLS zeigen sehr charakteristische Gesichtszüge mit dichten, zusammengewachsenen Augenbrauen, einem langen Philtrum, sowie einer schmalen Oberlippe. Die stark variable Ausprägung der phänotypischen Merkmale wird vor allem bei den Fehlbildungen der oberen Extremitäten deutlich. Diese Malformationen reichen von sehr milden Veränderungen wie Brachydaktylie, bis hin zu schweren Fehlbildungen, bei denen sowohl Oligodaktylien wie auch eine vollständig einstrahlige obere Extremität (Monodactylie) auftreten können. Die kognitive Entwicklung der Patienten ist meistens verzögert oder gestört, wobei aber auch hier eine starke Variabilität besteht. Über die Hälfte der Patienten mit diesem seltenen Syndrom weist eine Mutation im *NIPBL*-Gen auf. Diese Gruppe von Patienten zeigt oftmals einen sehr schweren CdLS-Phänotyp mit Reduktionsfehlbildungen der oberen Extremitäten. Neben Mutationen im *NIPBL*-Gen können bei circa 15-20 % der Patienten Mutationen in einem von vier weiteren Genen als genetische Ursache eines CdLS identifiziert werden. Patienten mit Mutationen innerhalb dieser Gene weisen gegenüber den Patienten mit einer *NIPBL*-Mutation einen eher moderaten (*SMC1A*, *HDAC8*) bis milden (*SMC3*, *RAD21*) Phänotyp auf. Bisher bleibt die genetische Ursache des CdLS bei circa 35 % der Patienten ungeklärt. In der hier vorliegenden Arbeit sollten daher neue Ansätze zur Erweiterung bisheriger diagnostischer Verfahren erarbeitet und die für ein CdLS-ursächlichen pathophysiologischen Mechanismen besser charakterisiert werden. Aufgrund einer dem CdLS zugrundeliegenden Haploinsuffizienz, also einer Dosisabhängigkeit des *NIPBL*-Genproduktes, wurden Elemente im nicht-kodierenden Bereich des *NIPBL*-Gens, welche die *NIPBL*-Expression regulieren, identifiziert und charakterisiert. Dabei konnte der *NIPBL*-Kernpromotor ermittelt und auf eine Region von 143 bp eingrenzt werden. Zusätzlich wurde ein *Silencer*-Element innerhalb des Intron 9 identifiziert, welches eine stark reprimierende Funktion auf die Aktivität des *NIPBL*-Kernpromotors ausübt. In sich anschließenden Mutationsanalysen des *NIPBL*-Kernpromotors in einem Kollektiv von mehr als 100 Patienten wurden zwei Sequenzänderung im angrenzenden Bereich des Promotors festgestellt, die sowohl in *in vitro*-Analysen, als auch in Untersuchungen an Patientenmaterial eine Reduktion der *NIPBL*-Expression zur Folge hatten.

In weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen des *NIPBL*-Genproduktes und deren Relevanz in der Pathophysiologie des CdLS, konnte die bereits bekannte Wechselwirkung zwischen *NIPBL* und *MAU2* auf einen Bereich von 39 (*MAU2*) bzw. 38 Aminosäuren (*NIPBL*) eingegrenzt werden. Zudem wurde erstmalig die Interaktion beider Proteine in humanen Zellen mittels Co-Immünpräzipitation gezeigt. Funktionelle Analysen von acht CdLS-relevanten *Missense*-Mutationen im N-Terminus von

NIPBL, konnten für zwei dieser Mutationen (G15R, P29Q) einen fast vollständigen Verlust der NIPBL-MAU2-Interaktion nachweisen. *In vivo*-Untersuchungen an lymphoblastoiden Zellen des Patienten mit der Mutation G15R ergaben jedoch keine Auffälligkeiten in der Schwesterchromatidpaarung oder der Co-Lokalisation von NIPBL und MAU2.

Zur weiteren Analyse der zentralen Funktion des NIPBL-Proteins in verschiedenen Regulationskaskaden, konnten mit dem Repressor SIN3A, der Histondeacetylase HDAC8 sowie mit dem Histonbindeprotein RBBP4 neue NIPBL-Interaktionspartner identifiziert werden. Durch diese nachgewiesene, direkte Assoziation bzw. Interaktion von NIPBL mit Multi-Proteinkomplexen, konnten die als sehr vielseitig postulierten Funktionen von NIPBL bestätigt bzw. untermauert werden. Interessanterweise sind für alle hier aufgeführten und auch für die bereits bekannten NIPBL-Bindeproteine Funktionen in der Regulation der Transkription beschrieben, wodurch erneut funktionelle Hinweise für eine zentrale Rolle von NIPBL in der Transkriptionsregulation aufgezeigt werden konnten.

Da alle bisher mit dem CdLS assoziierten Gene für Proteine des Cohesin-Komplexes oder für funktionell assoziierte (Co-) Faktoren kodieren, wurde das dem NIPBL-Protein funktionell ähnliche Sororin bzw. das für Sororin kodierende *CDCA5*-Gen in unserem Patientenkollektiv auf Mutationen hin untersucht. Allerdings konnten dabei, neben wenigen bekannten Polymorphismen, keine putativ krankheitsursächlichen Sequenzänderungen nachgewiesen werden.

In einem parallel durchgeführten Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Matthew Deardorff aus dem Children`s Hospital aus Philadelphia (USA) wurden sowohl zwei interstitielle Mikrodeletionen, als auch zwei Missense Mutationen (P376R, C585R) im *RAD21*-Gen identifiziert. Funktionelle Untersuchungen beider Aminosäureaustausche ergaben eine deutlich verstärkte Bindung von RAD21 an die Cohesin-Proteine STAG1 und STAG2 *in-vitro*, sowie eine gestörte Trennung der Schwesterchromatiden während der Metaphase *in-vivo* für die Mutation P376R. Patienten mit *RAD21*-Mutationen wiesen einen eher mild ausgeprägten CdLS-Phänotyp auf, wobei vor allem die nahezu normale kognitive Entwicklung bei fast allen Patienten als besonderes Merkmal herauszustellen gilt.

Durch die Identifizierung und molekulare Charakterisierung regulatorischer Regionen innerhalb des *NIPBL*-Gens kann diese Arbeit zu einer Erweiterung und somit Verbesserung der bisherigen molekularen Diagnostik des CdLS beitragen. Ferner ermöglicht sowohl die Identifizierung neuer Bindepartner des NIPBL-Proteins als auch funktionelle Untersuchungen spezifischer CdLS-relevanter Mutationen auf diese Protein-Protein-Interaktionen, die Generierung neuer Erkenntnisse für die molekularen Grundlagen bzw. die pathophysiologischen Mechanismen des CdLS.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abu-Farha, M., F. Elisma, and D. Figeys.** 2008. Identification of Protein–Protein Interactions by Mass Spectrometry Coupled Techniques
Protein–Protein Interaction, p. 67-80. *In*: M. Werther and H. Seitz (eds.), Springer Berlin / Heidelberg.
2. **Aden DP., A. Fogel, Plotkin S, I. Damjanov, and B. B. Knowles.** 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**:615-616.
3. **Amati B and Land H.** Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *4*(1), 102-108. 1994.
Ref Type: Generic
4. **Amon, A.** 2001. Together until separin do us part. *Nat Cell Biol* **3**:E12-E14.
5. **Anderson, D. M., B. J. Beres, J. Wilson-Rawls, and A. Rawls.** 2009. The homeobox gene Mohawk represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev.Dyn.* **238**:572-580.
6. **Arumugam, P., S. Gruber, K. Tanaka, C. H. Haering, K. Mechtler, and K. Nasmyth.** 2003. ATP Hydrolysis Is Required for Cohesin's Association with Chromosomes. *Current Biology* **13**:1941-1953.
7. **Ayer, D. E., Q. A. Lawrence, and R. N. Eisenman.** 1995. Mad-max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* **80**:767-776.
8. **Beck B.** 1987. Psycho-social assessment of 36 de Lange patients. *J Ment Defic Res.* (**Pt 3**):251-257.
9. **Bénard, C. Y., H. K+@bir, S. Takagi, and S. Hekimi.** 2004. mau-2 acts cell-autonomously to guide axonal migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **131**:5947-5958.
10. **Bernards, R.** 1995. Transcriptional Regulation: Flipping the Myc switch. *Current Biology* **5**:859-861.
11. **Berney, T. P., M. Ireland, and J. Burn.** 1999. Behavioural phenotype of Cornelia de Lange syndrome. *Archives of Disease in Childhood* **81**:333-336.
12. **Bhuiyan, Z. A., H. Stewart, E. J. Redeker, M. M. A. M. Mannens, and R. C. M. Hennekam.** 2007. Large genomic rearrangements in NIPBL are infrequent in Cornelia de Lange Syndrome. *Eur J Hum Genet* **15**:505-508.
13. **Biedler JL., L. Helson, and B. A. Spengler.** 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **33**:2643-2652.
14. **Borck, G., M. Zarhrate, C. +. Cluzeau, E. Bal, J. P. Bonnefont, A. Munnich, V. r. Cormier-Daire, and L. Colleaux.** 2006. Father-to-daughter transmission of Cornelia de Lange syndrome caused by a mutation in the 5' untranslated region of the NIPBL Gene. *Hum.Mutat.* **27**:731-735.
15. **Borges, V., C. Lehane, L. Lopez-Serra, H. Flynn, M. Skehel, T. R. Ben-Shahar, and F. Uhlmann.** 2010. Hos1 Deacetylates Smc3 to Close the Cohesin Acetylation Cycle. *Molecular Cell* **39**:677-688.
16. **Brachmann, W. R. C.** 1916. Ein Fall von symmetrischer Monodaktylie durch Ulnadefekt, mit symmetrischer Flughautbildung in den Ellenbeugen, sowie anderen Abnormitaeten (Zwerghaftigkeit, Halsrippen, Behaarung) (A case of symmetrical monodactyly, representing ulnar deficiency, with symmetrical antecubital webbing and other abnormalities, (dwarfism, cervical ribs, hirsutism)). *Jahrbuch fuer Kinderheilkunde und physische Erziehung* **84**:225-235.
17. **Brymora, A., V. A. Valova, and P. J. Robinson.** 2001. Protein-Protein Interactions Identified by Pull-Down Experiments and Mass Spectrometry, *In*: *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc..
18. **Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, and Clark JM.** 2000. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J.* **350 Pt 1**:199-205.
19. **Burga, A., M. O. Casanueva, and B. Lehner.** 2011. Predicting mutation outcome from early stochastic variation in genetic interaction partners. *Nature* **480**:250-253.
20. **Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P. G. Righetti.** 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *ELECTROPHORESIS* **25**:1327-1333.
21. **Carninci, P., A. Sandelin, B. Lenhard, S. Katayama, K. Shimokawa, J. Ponjavic, C. A. M. Semple, M. S. Taylor, P. G. Engstrom, M. C. Frith, A. R. R. Forrest, W. B. Alkema, S. L. Tan, C. Plessy, R. Kodzius, T. Ravasi, T. Kasukawa, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama,**

- Y. Kitazume, H. Kawaji, C. Kai, M. Nakamura, H. Konno, K. Nakano, S. Mottagui-Tabar, P. Arner, A. Chesi, S. Gustincich, F. Persichetti, H. Suzuki, S. M. Grimmond, C. A. Wells, V. Orlando, C. Wahlestedt, E. T. Liu, M. Harbers, J. Kawai, V. B. Bajic, D. A. Hume, and Y. Hayashizaki. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* **38**:626-635.
22. **Cates M, Billmire DF, Bull MJ, and Grosfeld JL.** 1989. Gastroesophageal dysfunction in Cornelia de Lange syndrome. *J Pediatr Surg.* **24**:248-250.
23. **Cheng, P. Y., Y. P. Lin, Y. L. Chen, Y. C. Lee, C. C. Tai, Y. T. Wang, Y. J. Chen, C. F. Kao, and J. Yu.** 2011. Interplay between SIN3A and STAT3 Mediates Chromatin Conformational Changes and GFAP Expression during Cellular Differentiation. *PLoS ONE* **6**:e22018.
24. **Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields.** 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**:9578-9582.
25. **Ching, G. Y. and R. K. H. Liem.** 2009. RE1 silencing transcription factor is involved in regulating neuron-specific expression of alpha-internexin and neurofilament genes. *Journal of Neurochemistry* **109**:1610-1623.
26. **Ciosk, R., M. Shirayama, A. Shevchenko, T. Tanaka, A. Toth, A. Shevchenko, and K. Nasmyth.** 2000. Cohesin's Binding to Chromosomes Depends on a Separate Complex Consisting of Scc2 and Scc4 Proteins. *Molecular Cell* **5**:243-254.
27. **Cohen SN., Chang AC., and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**:2110-2114.
28. **Dale, D.** 2004. Adherin: Key to the Cohesin Ring and Cornelia de Lange Syndrome. *Current Biology* **14**:R834-R836.
29. **De Amicis, F., F. Giordano, A. Vivacqua, M. Pellegrino, M. L. Panno, D. Tramontano, S. A. W. Fuqua, and S. And+[†].** 2011. Resveratrol, through NF- κ B/p53/Sin3/HDAC1 complex phosphorylation, inhibits estrogen receptor +[†] gene expression via p38MAPK/CK2 signaling in human breast cancer cells. *The FASEB Journal* **25**:3695-3707.
30. **de Lange, C.** 1933. Sur un type nouveau de degenerescence (typus Amstelodamensis). *Arch.Med.Enfants* **36**:713-719.
31. **Deardorff M.** Unpublished data. 2012.
32. **Deardorff M, Jonathan J.Wilde, Melanie Albrecht, Emma Dickinson, Stephanie Tennstedt, Diana Braunholz, Maren Mönlich, Yuqian Yan, Weizhen Xu, María Concepcion Gil-Rodriguez, Dinah Clark, Hakon Hakonarson, Sara Halbach, Laura Daniela Michelis, Abhinav Rampuria, Eva Rossier, Stephanie Spranger, Lionel Van Maldergem, Sally Ann Lynch, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Hermann-Josef Ludecke, Robert G.Ramsay, Robert G.Ramsay, Michael J.McKay, Ian D.Krantz, Huiling Xu, Julia A.Horsfield, and Frank J.Kaiser.** Unpublished data. 2012.
33. **Deardorff MA, D. Clark, and I. D. Krantz.** 2005. Cornelia de Lange Syndrome BTI - GeneReviews, *In: Gene Reviews.* University of Washington, Seattle.
34. **Deardorff, M. A., M. Kaur, D. Yaeger, A. Rampuria, S. Korolev, J. Pie, C. Gil-Rodr+iguez, M. a. Arnedo, B. Loeys, A. D. Kline, M. Wilson, K. Lillquist, V. Siu, F. J. Ramos, A. Musio, L. S. Jackson, D. Dorsett, and I. D. Krantz.** 2007. Mutations in Cohesin Complex Members SMC3 and SMC1A Cause a Mild Variant of Cornelia de Lange Syndrome with Predominant Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics* **80**:485-494.
35. **den Dunnen, J. d. D. and S. A. Antonarakis.** 2001. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human Genetics* **109**:121-124.
36. **Dorsett, D.** 2009. Cohesin, gene expression and development: Lessons from *Drosophila*. *Chromosome Research* **17**:185-200.
37. **Dossetor DR, Couryer S., and A. R. Nicol.** 1991. Massage for very severe self-injurious behaviour in a girl with Cornelia de Lange syndrome. *Dev Med Child Neurol.*
38. **Dufau, M. L., M. Liao, and Y. Zhang.** 2010. Participation of signaling pathways in the derepression of luteinizing hormone receptor transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology* **314**:221-227.
39. **Ehlert, F.** 2008. On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **377**:549-577.
40. **Elçin Ünal, Ayelet Arbel-Eden, U. Sattler, R. Shroff, M. Lichten, J. E. Haber, and D. Koshland.** 2004. DNA Damage Response Pathway Uses Histone Modification to Assemble a Double-Strand Break-Specific Cohesin Domain. *Molecular Cell* **16**:991-1002.

41. **Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen.** 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**:7413-7417.
42. **Fields, S. and O. k. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
43. **Furuya, K., K. Takahashi, and M. Yanagida.** 1998. Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes & Development* **12**:3408-3418.
44. **Galan, J., L. Paris, H. j. Zhang, J. Adler, R. Geahlen, and W. Tao.** 2011. Proteomic Studies of Syk-Interacting Proteins Using a Novel Amine-Specific Isotope Tag and GFP Nanotrap. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **22**:319-328.
45. **Gandhi, R., P. J. Gillespie, and T. Hirano.** 2006. Human Wapl Is a Cohesin-Binding Protein that Promotes Sister-Chromatid Resolution in Mitotic Prophase. *Current Biology* **16**:2406-2417.
46. **Gaszner, M. and G. Felsenfeld.** 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* **7**:703-713.
47. **Gause, M., Z. Misulovin, A. Bilyeu, and D. Dorsett.** 2010. Dosage-Sensitive Regulation of Cohesin Chromosome Binding and Dynamics by Nipped-B, Pds5, and Wapl. *Molecular and Cellular Biology* **30**:4940-4951.
48. **Gause, M., C. A. Schaaf, and D. Dorsett.** 2008. Cohesin and CTCF: cooperating to control chromosome conformation? *BioEssays* **30**:715-718.
49. **Gheldof, N., M. Leleu, D. Noordermeer, J. Rougemont, and A. Reymond.** 2012. Detecting long-range chromatin interactions using the chromosome conformation capture sequencing (4C-seq) method. *Methods Mol Biol.*
50. **Gillis, L. A., J. McCallum, M. Kaur, C. DeScipio, D. Yaeger, A. Mariani, A. D. Kline, H. h. Li, M. Devoto, L. G. Jackson, and I. D. Krantz.** 2004. NIPBL Mutational Analysis in 120 Individuals with Cornelia de Lange Syndrome and Evaluation of Genotype-Phenotype Correlations. *The American Journal of Human Genetics* **75**:610-623.
51. **Graham FL, J. Smiley, Russell WC, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* **36**:59-74.
52. **Graham FL and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* **52**:456-467.
53. **Gray, D. and S. Subramanian.** 2001. Choice of Cellular Protein Expression System, *In: Current Protocols in Protein Science.* John Wiley & Sons, Inc..
54. **Gruber, S., C. H. Haering, and K. Nasmyth.** 2003. Chromosomal Cohesin Forms a Ring. *Cell* **112**:765-777.
55. **Guenther, M. G., S. S. Levine, L. A. Boyer, R. Jaenisch, and R. A. Young.** 2007. A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* **130**:77-88.
56. **Gustincich, S., A. Sandelin, C. Plessy, S. Katayama, R. Simone, D. Lazarevic, Y. Hayashizaki, and P. Carninci.** 2006. The complexity of the mammalian transcriptome. *The Journal of Physiology* **575**:321-332.
57. **Haberland, M., M. H. Mokalled, R. L. Montgomery, and E. N. Olson.** 2009. Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes & Development* **23**:1625-1630.
58. **Haering, C. H., J. L+Åwe, A. Hochwagen, and K. Nasmyth.** 2002. Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. *Molecular Cell* **9**:773-788.
59. **Haering, C. H., D. Schoffnegger, T. Nishino, W. Helmhart, K. Nasmyth, and J. L+Åwe.** 2004. Structure and Stability of Cohesin's Smc1-Kleisin Interaction. *Molecular Cell* **15**:951-964.
60. **Hagstrom, K. A. and B. J. Meyer.** 2003. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat Rev Genet* **4**:520-534.
61. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**:557-580.
62. **Hassig, C. A., T. C. Fleischer, A. N. Billin, S. L. Schreiber, and D. E. Ayer.** 1997. Histone Deacetylase Activity Is Required for Full Transcriptional Repression by mSin3A. *Cell* **89**:341-347.
63. **Heintzman, N. D., R. K. Stuart, G. Hon, Y. Fu, C. W. Ching, R. D. Hawkins, L. O. Barrera, S. Van Calcar, C. Qu, K. A. Ching, W. Wang, Z. Weng, R. D. Green, G. E. Crawford, and B. Ren.** 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* **39**:311-318.

64. **Heldin, C. H., A. Johnsson, S. Wennergren, C. Wernstedt, C. Betsholtz, and B. Westermark.** 1986. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* **319**:511-514.
65. **Hirano, M. and T. Hirano.** 2002. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J.*
66. **Hou, F. and H. Zou.** 2005. Two Human Orthologues of Eco1/Ctf7 Acetyltransferases Are Both Required for Proper Sister-Chromatid Cohesion. *Molecular Biology of the Cell* **16**:3908-3918.
67. **Huang, J., J. m. Hsu, and B. C. Laurent.** 2004. The RSC Nucleosome-Remodeling Complex Is Required for Cohesin's Association With Chromosome Arms. *Molecular Cell* **13**:739-750.
68. **Jahnke, P., W. Xu, M. W++Iling, M. Albrecht, H. Gabriel, G. Gillessen-Kaesbach, and F. J. Kaiser.** 2008. The Cohesin loading factor NIPBL recruits histone deacetylases to mediate local chromatin modifications. *Nucleic Acids Research* **36**:6450-6458.
69. **Jeffrey H.Miller.** 1972. Experiments in molecular genetics, *In*: [Cold Spring Harbor, N.Y.] Cold Spring Harbor Laboratory, 1972..
70. **Jessberger, R.** 2003. SMC Proteins at the Crossroads of Diverse Chromosomal Processes. *IUBMB Life* **55**:643-652.
71. **Kagey, M. H., J. J. Newman, S. Bilodeau, Y. Zhan, D. A. Orlando, N. L. van Berkum, C. C. Ebmeier, J. Goossens, P. B. Rahl, S. S. Levine, D. J. Taatjes, J. Dekker, and R. A. Young.** 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **467**:430-435.
72. **Kang, D., S. G. Gho, M. Suh, and C. & Kang.** 2002. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium DodecylSulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull.Korean Chem.Soc.* **11**:1511-1512.
73. **Kaur, M., C. DeScipio, J. McCallum, D. Yaeger, M. Devoto, L. G. Jackson, N. B. Spinner, and I. D. Krantz.** 2005. Precocious sister chromatid separation (PSCS) in Cornelia de Lange syndrome. *Am.J.Med.Genet.* **138A**:27-31.
74. **Kawauchi, S., A. L. Calof, R. Santos, M. E. Lopez-Burks, C. M. Young, M. P. Hoang, A. Chua, T. Lao, M. S. Lechner, J. A. Daniel, A. Nussenzweig, L. Kitzes, K. Yokomori, B. Hallgrimsson, and A. D. Lander.** 2009. Multiple Organ System Defects and Transcriptional Dysregulation in the Nipbl+/-Mouse, a Model of Cornelia de Lange Syndrome. *PLoS Genet* **5**:e1000650.
75. **Kim, T. H., Z. K. Abdullaev, A. D. Smith, K. A. Ching, D. I. Loukinov, R. Green, M. Q. Zhang, V. V. Lobanenkov, and B. Ren.** 2007. Analysis of the Vertebrate Insulator Protein CTCF-Binding Sites in the Human Genome. *Cell* **128**:1231-1245.
76. **Kitajima, T. S., Y. Miyazaki, M. Yamamoto, and Y. Watanabe.** 2003. Rec8 cleavage by separate is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *EMBO J* **22**:5643-5653.
77. **Kline AD, C. Stanley, J. Belevich, K. Brodsky, M. Barr, and L. G. Jackson.** 1993. Developmental data on individuals with the Brachmann-de Lange syndrome. *Am J Med Genet.*
78. **Kline, A. D., I. D. Krantz, A. Sommer, M. Kliever, L. G. Jackson, D. R. FitzPatrick, A. V. Levin, and A. Selicorni.** 2007. Cornelia de Lange syndrome: Clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *Am.J.Med.Genet.* **143A**:1287-1296.
79. **Koch, C. M., R. M. Andrews, P. Flicek, S. C. Dillon, U. Kara+Âz, G. K. Clelland, S. Wilcox, D. M. Beare, J. C. Fowler, P. Couttet, K. D. James, G. C. Lefebvre, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, P. Dhami, C. F. Langford, Z. Weng, E. Birney, N. P. Carter, D. Vetrie, and I. Dunham.** 2007. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Research* **17**:691-707.
80. **Kogut, I., J. Wang, V. Guacci, R. K. Mistry, and P. C. Megee.** 2009. The Scc2/Scc4 cohesin loader determines the distribution of cohesin on budding yeast chromosomes. *Genes & Development* **23**:2345-2357.
81. **Krantz, I. D., J. McCallum, C. DeScipio, M. Kaur, L. A. Gillis, D. Yaeger, L. Jukofsky, N. Wasserman, A. Bottani, C. A. Morris, M. J. M. Nowaczyk, H. Toriello, M. J. Bamshad, J. C. Carey, E. Rappaport, S. Kawauchi, A. D. Lander, A. L. Calof, H. h. Li, M. Devoto, and L. G. Jackson.** 2004. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet* **36**:631-635.
82. **Kueng, S., B. Hegemann, B. H. Peters, J. J. Lipp, A. Schleiffer, K. Mechtler, and J. M. Peters.** 2006. Wapl Controls the Dynamic Association of Cohesin with Chromatin. *Cell* **127**:955-967.
83. **Lachman, R., J. Funamura, and G. Szalay.** 1981. Gastrointestinal abnormalities in the Cornelia de Lange syndrome. *Mt Sinai J Med.*

84. **Lafont, A. L., J. Song, and S. Rankin.** 2010. Sororin cooperates with the acetyltransferase Eco2 to ensure DNA replication-dependent sister chromatid cohesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:20364-20369.
85. **Lechner, M. S., D. C. Schultz, D. Negorev, G. G. Maul, and F. J. Rauscher III.** 2005. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**:929-937.
86. **Lengronne, A., Y. Katou, S. Mori, S. Yokobayashi, G. P. Kelly, T. Itoh, Y. Watanabe, K. Shirahige, and F. Uhlmann.** 2004. Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* **430**:573-578.
87. **Li, B., M. Gogol, M. Carey, D. Lee, C. Seidel, and J. L. Workman.** 2007. Combined Action of PHD and Chromo Domains Directs the Rpd3S HDAC to Transcribed Chromatin. *Science* **316**:1050-1054.
88. **Liu, J. and I. D. Krantz.** 2009. Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clinical Genetics* **76**:303-314.
89. **Liu, J., Z. Zhang, M. Bando, T. Itoh, M. A. Deardorff, D. Clark, M. Kaur, S. Tandy, T. Kondoh, E. Rappaport, N. B. Spinner, H. Vega, L. G. Jackson, K. Shirahige, and I. D. Krantz.** 2009. Transcriptional Dysregulation in *NIPBL* and *Cohesin* Mutant Human Cells. *PLoS Biol* **7**:e1000119.
90. **Losada, A., M. Hirano, and T. Hirano.** 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid-cohesion. *Genes & Development* **12**:1986-1997.
91. **Maquat, L. E.** 1995. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* **1**:453-465.
92. **Maston, G. A., S. K. Evans, and M. R. Green.** 2006. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu.Rev.Genom.Human Genet.* **7**:29-59.
93. **Mc Intyre, J., E. G. Muller, S. Weitzer, B. E. Snynsman, T. N. Davis, and F. Uhlmann.** 2007. In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **26**:3783-3793.
94. **McLellan, J. L., N. J. O'Neil, I. Barrett, E. Ferree, D. M. van Pel, K. Ushey, P. Sipahimalani, J. Bryan, A. M. Rose, and P. Hieter.** 2012. Synthetic Lethality of Cohesins with PARPs and Replication Fork Mediators. *PLoS Genet* **8**:e1002574.
95. **Melby, T. E., C. N. Ciampaglio, G. Briscoe, and H. P. Erickson.** 1998. The Symmetrical Structure of Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) and MukB Proteins: Long, Antiparallel Coiled Coils, Folded at a Flexible Hinge. *The Journal of Cell Biology* **142**:1595-1604.
96. **Menolascino FJ, Gee JJ, and D. A. Swanson.** 1982. Behavioural dimensions of the de Lange syndrome. *J Ment Defic Res.*
97. **Michaelis, C., R. Ciosk, and K. Nasmyth.** 1997. Cohesins: Chromosomal Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids. *Cell* **91**:35-45.
98. **Misulovin, Z., Y. Schwartz, X. Y. Li, T. Kahn, M. Gause, S. MacArthur, J. Fay, M. Eisen, V. Pirrotta, M. Biggin, and D. Dorsett.** 2008. Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma* **117**:89-102.
99. **Musio, A., A. Selicorni, M. L. Focarelli, C. Gervasini, D. Milani, S. Russo, P. Vezzoni, and L. Larizza.** 2006. X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nat Genet* **38**:528-530.
100. **Nagy, L., H. Y. Kao, D. Chakravarti, R. J. Lin, C. A. Hassig, D. E. Ayer, S. L. Schreiber, and R. M. Evans.** 1997. Nuclear Receptor Repression Mediated by a Complex Containing SMRT, mSin3A, and Histone Deacetylase. *Cell* **89**:373-380.
101. **Nasmyth, K.** 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet.* **35**:673-745.
102. **Nasmyth, K. and C. H. Haering.** 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet.*
103. **Neumann E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider.** 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**:841-845.
104. **Nicolas, E., S. it-Si-Ali, and D. Trouche.** 2001. The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Research* **29**:3131-3136.
105. **Nishiyama, T., R. Ladurner, J. Schmitz, E. Kreidl, A. Schleiffer, V. Bhaskara, M. Bando, K. Shirahige, A. A. Hyman, K. Mechtler, and J. M. Peters.** 2010. Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl. *Cell* **143**:737-749.
106. **Oka, Y., K. Suzuki, M. Yamauchi, N. Mitsutake, and S. Yamashita.** 2011. Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168

- and HP1+¹ in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **411**:762-767.
107. **Oliveira, J., C. Dias, E. Redeker, E. Costa, J. Silva, M. Reis Lima, J. T. den Dunnen, and R. Santos.** 2010. Development of NIPBL Locus-Specific Database Using LOVD: From Novel Mutations to Further Genotype-Phenotype Correlations in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum.Mutat.* **31**:1216-1222.
 108. **Onn, I., Heidinger-Pauli JM, V. Guacci, Unal E, and D. E. Koshland.** 2008. Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu Rev Cell Dev Biol.*
 109. **Parelho, V., S. Hadjur, M. Spivakov, M. Leleu, S. Sauer, H. C. Gregson, A. Jarmuz, C. Canzonetta, Z. Webster, T. Nesterova, B. S. Cobb, K. Yokomori, N. Dillon, L. Aragon, A. G. Fisher, and M. Merkenschlager.** 2008. Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* **132**:422-433.
 110. **Rankin, S., N. G. Ayad, and M. W. Kirschner.** 2005. Sororin, a Substrate of the Anaphase-Promoting Complex, Is Required for Sister Chromatid Cohesion in Vertebrates. *Molecular Cell* **18**:185-200.
 111. **Revenkova, E., M. L. Focarelli, L. Susani, M. Paulis, M. T. Bassi, L. Mannini, A. Frattini, D. Delia, I. Krantz, P. Vezzoni, R. Jessberger, and A. Musio.** 2009. Cornelia de Lange syndrome mutations in SMC1A or SMC3 affect binding to DNA. *Human Molecular Genetics* **18**:418-427.
 112. **Robinson LK, Wolfsberg E., and K. L. Jones.** 1985. Brachmann-de Lange syndrome: evidence for autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet.*
 113. **Rosenbach Y, Z. I. D. G.** 1992. Gastroesophageal dysfunction in Brachmann-de Lange syndrome. *Am J Med Genet.* **42**:379-380.
 114. **Rothbauer, U., K. Zolghadr, Tillib S, D. F. Nowak, L. F. Schermelleh, A. F. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, Muyldermans S., Cardoso MC, and H. Leonhardt.** 2006. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods.*
 115. **Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M. C. Cardoso, and H. Leonhardt.** 2008. A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**:282-289.
 116. **Sandelin, A., P. Carninci, B. Lenhard, J. Ponjavic, Y. Hayashizaki, and D. A. Hume.** 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet.*
 117. **Sanger, F., Nicklen S., and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.*1992 **24**:104-108.
 118. **SCHERER WF, SYVERTON JT, and G. O. GEY.** 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* **97**:695-710.
 119. **Schiestl RH. and R. D. Gietz.** 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* **16**:339-346.
 120. **Schmitz, J., E. Watrin, P. Lénárt, K. Mechtler, and J. M. Peters.** 2007. Sororin Is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase. *Current Biology* **17**:630-636.
 121. **Schüle, B., A. Oviedo, K. Johnston, S. Pai, and U. Francke.** 2005. Inactivating Mutations in ESCO2 Cause SC Phocomelia and Roberts Syndrome: No Phenotype-Genotype Correlation. *The American Journal of Human Genetics* **77**:1117-1128.
 122. **Seitan, V. C., P. Banks, S. Laval, N. A. Majid, D. Dorsett, A. Rana, J. Smith, A. Bateman, S. Krpic, A. Hostert, R. A. Rollins, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. Y. Benard, S. Hekimi, S. F. Newbury, and T. Strachan.** 2006. Metazoan Scc4 Homologs Link Sister Chromatid Cohesion to Cell and Axon Migration Guidance. *PLoS Biol* **4**:e242.
 123. **Seitz, L. C., K. Tang, W. J. Cummings, and M. E. Zolan.** 1996. The rad9 Gene of *Coprinus cinereus* Encodes a Proline-Rich Protein Required for Meiotic Chromosome Condensation and Synapsis. *Genetics* **142**:1105-1117.
 124. **Shintomi, K. and T. Hirano.** 2009. Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes & Development* **23**:2224-2236.
 125. **Silverstein, R. A. and K. Ekwall.** 2005. Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Current Genetics* **47**:1-17.
 126. **Splinter, E., H. Heath, J. Kooren, R. J. Palstra, P. Klous, F. Grosveld, N. Galjart, and W. de Laat.** 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes & Development* **20**:2349-2354.

127. **Sumara, I., E. Vorlauffer, C. Gieffers, B. H. Peters, and J. M. Peters.** 2000. Characterization of Vertebrate Cohesin Complexes and Their Regulation in Prophase. *The Journal of Cell Biology* **151**:749-762.
128. **Suryadinata, R., M. Sadowski, R. Steel, and B. Sarcevic.** 2011. Cyclin-dependent Kinase-mediated Phosphorylation of RBP1 and pRb Promotes Their Dissociation to Mediate Release of the SAP30-mSin3-HDAC Transcriptional Repressor Complex. *Journal of Biological Chemistry* **286**:5108-5118.
129. **Takahashi, H. F., M. Kato S FAU - Murata, M. F. Murata, and P. Carninci.** 2012. CAGE (cap analysis of gene expression): a protocol for the detection of promoter and transcriptional networks. *Methods Mol Biol.*
130. Takahashi, Hazuki, Sachi Kato, Mitsuyoshi Murata, and and Piero Carninci. RIKEN-CAGE Database. <http://gerg02.gsc.riken.jp/gev-promoter/gbrowse/hg17/?ref=chr5;start=36923587;stop=37114616;nav4=1;plugin=> . 2011. Ref Type: Electronic Citation
131. **Talkowski, M., S. Mullegama, J. Rosenfeld, B. van-áBon, Y. Shen, E. Repnikova, J. Gastier-Foster, D. Thrush, S. Kathiresan, D. Ruderfer, C. Chiang, C. Hanscom, C. Ernst, A. Lindgren, C. Morton, Y. An, C. Astbury, L. Brueton, K. Lichtenbelt, L. Ades, M. Fichera, C. Romano, J. Innis, C. Williams, D. Bartholomew, M. Van-áAllen, A. Parikh, L. Zhang, B. L. Wu, R. Pyatt, S. Schwartz, L. Shaffer, B. de-áVries, J. Gusella, and S. Elsea.** 2011. Assessment of 2q23.1 Microdeletion Syndrome Implicates MBD5 as a Single Causal Locus of Intellectual Disability, Epilepsy, and Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics* **89**:551-563.
132. **Tang, X., Y. Nakata, H. O. Li, M. Zhang, H. Gao, A. Fujita, O. Sakatsume, T. Ohta, and K. Yokoyama.** 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **22**:2857-2858.
133. **Tom, S.** 2005. Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**:258-264.
134. **Tonkin, E. T., T. J. Wang, S. Lisgo, M. J. Bamshad, and T. Strachan.** 2004. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet* **36**:636-641.
135. Uhlen M. Human Protein Atlas. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164190/gene> . 2011. Ref Type: Electronic Citation
136. **Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth.** 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**:37-42.
137. **Valenzuela, L. and R. T. Kamakaka.** 2006. Chromatin Insulators*. *Annu.Rev.Genet.* **40**:107-138.
138. **Van Den Berg DJ and U. Francke.** 1993. Roberts syndrome: a review of 100 cases and a new rating system for severity. *Am J Med Genet.*
139. **Vaute, O., E. Nicolas, L. Vandel, and D. Trouche.** 2002. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Research* **30**:475-481.
140. **Vega, H., Q. Waisfisz, M. Gordillo, N. Sakai, I. Yanagihara, M. Yamada, D. van Gosliga, H. Kayserili, C. Xu, K. Ozono, E. Wang Jabs, K. Inui, and H. Joenje.** 2005. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* **37**:468-470.
141. **Verma RP and C. Hansch.** 2006. Chemical Toxicity on HeLa Cells. *Curr Med Chem.* **13**:423-448.
142. **Vermaak, D., P. A. Wade, P. L. Jones, Y. B. Shi, and A. P. Wolffe.** 1999. Functional Analysis of the SIN3-Histone Deacetylase RPD3-RbAp48-Histone H4 Connection in the *Xenopus* Oocyte. *Molecular and Cellular Biology* **19**:5847-5860.
143. **Vrouwe, M. G., E. Elghalbzouri-Maghrani, M. Meijers, P. Schouten, B. C. Godthelp, Z. A. Bhuiyan, E. J. Redeker, M. M. Mannens, L. H. F. Mullenders, A. Pastink, and F. Darroudi.** 2007. Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair. *Human Molecular Genetics* **16**:1478-1487.
144. **Waizenegger, I. C., S. Hauf, A. Meinke, and J. M. Peters.** 2000. Two Distinct Pathways Remove Mammalian Cohesin from Chromosome Arms in Prophase and from Centromeres in Anaphase. *Cell* **103**:399-410.
145. **Wallace AS and R. B. Anderson.** 2011. Genetic interactions and modifier genes in Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol.*
146. **Wang, L., M. Ferrari, and V. A. Iloomfield.** 1990. Large-scale preparation of mononucleosomal DNA from calf thymus for biophysical studies. *Biotechniques.*

147. **Watrin, E., A. Schleiffer, K. Tanaka, F. Eisenhaber, K. Nasmyth, and J. M. Peters.** 2006. Human Scc4 Is Required for Cohesin Binding to Chromatin, Sister-Chromatid Cohesion, and Mitotic Progression. *Current Biology* **16**:863-874.
148. **Wilmink FA, Papatsonis DN, Grijseels EW, and M. W. Wessels.** 2009. Cornelia de lange syndrome: a recognizable fetal phenotype. *Fetal Diagn Ther.*
149. **Xi, H., H. P. Shulha, J. M. Lin, T. R. Vales, Y. Fu, D. M. Bodine, R. D. G. McKay, J. G. Chenoweth, P. J. Tesar, T. S. Furey, B. Ren, Z. Weng, and G. E. Crawford.** 2007. Identification and Characterization of Cell Type-Specific and Ubiquitous Chromatin Regulatory Structures in the Human Genome. *PLoS Genet* **3**:e136.
150. **Yan, J., Saifi GM, Wierzba TH, M. Withers, Bien-Willner GA, J. Limon, P. Stankiewicz, upski JR, and J. ierzba.** 2006. Mutational and genotype-phenotype correlation analyses in 28 Polish patients with Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A.* **140**:1531-1541.
151. **Yin, W., P. Xiang, and Q. Li.** 2005. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Analytical Biochemistry* **346**:289-294.
152. **Yoshinori, W.** 2005. Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Current Opinion in Cell Biology* **17**:590-595.
153. **Zhang, Y., H. H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg.** 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development* **13**:1924-1935.

8. Anhang

Tabelle 5: Klinische Daten von Patienten mit Mutationen und seltenen Varianten innerhalb der NIPBL- und MAU2-Interaktionsdomänen

Patienten-Information	Patienten-Nummer	CDL LU1	CDLAD6	CDL252P	CDLP737	CDL225P	CDL424P	CDLP52	CDL181P	CDL046P	CDL383P
Geschlecht		M	M	F	M	M	M	F	M	F	F
Gen		NIPBL	NIPBL	NIPBL	NIPBL	NIPBL	NIPBL	NIPBL	NIPBL	MAU2	MAU2
Mutationsart		missense	missense	missense	missense	missense	missense	missense	missense	in-frame deletion	in-frame deletion
cDNA-Level		c.43G>A	c.86C>A	c.332G>C	c.535G>T	c.535G>A	c.535G>A	c.737A>G	c.760C>G	c.9_23del	c.9_23del
Protein-Level		p.Gly15Arg	p.Pro29Gln	p.Ser111Thr	p.Ala179Ser	p.Ala179Thr	p.Ala179Thr	p.Asp246Gly	p.Leu254Val	p.del5	p.del5
Mutation Anmerkungen										In nicht-betroffener Mutter	zusätzlich 5.1MB Deletion auf Chr. 2q23
Kopf	Brachycephalie	micro brachial		1	microcephal	+	-	microcephal	-	+	-
	Niedriger vorderer Haaransatz		+	1	+	+	-	+	+	+	+
Gesicht		typisch	mild	klassisch	typisch	typisch	klassisch	klassisch	mild	klassisch	atypisch
Augen	Geschwungene Augenbrauen	+		+	+	+	+	+	+	+	voll
	Synophrys		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lange Wimpern	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Ptosis			-	-	+	+	-	+		-
Nase	Flache Nasenwurzel	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Antevertierte Nasenlöcher	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Langes Philtrum	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Mund	Dünne Oberlippe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Herunter-gezogene Mundwinkel	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Hoher Gaumenbogen	-	-	+	+	-		+	+		+
	Gaumenspalte	-		-	-	+		-	-		-
	Zähne (klein, weitständig)	+	+	Weitständig	+	Hypertrophie des Gaumens	-	+	+	+	-

Anhang

	Microgenie	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Haut	Cutis marmorata	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	Hirsutismus	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Hände	Kleine Hände	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	Proximal versetzte Daumen	+		+	-	+	+	-	+	+	+
	Klinodactylie des 5. Fingers	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	Vierfingerfurche	-	+	+	-			+	+ L	-	
Füße	Kleine Füße		+	+	+		Tintenlösch- füße	+	+	+	+
	Syndaktylie der 2. + 3. Zehe	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
Arme	Einschränkung des Ellenbogens	-	+	+	+			+	-	+	+
Herz	Herzdefekte	-	-	Aorten- isthmus- stenose	-	Atrium- septumdefekt, Mitralklappen- insuffizienz, Pulmonalsten- ose	Fallot- Tetralogie	Persistier- ender Ductus arteriosus (PDA)	-	Atrium- septumdefekt, schließt spontan	-
Genitalien	Genitalfehl- bildungen	Kryptorchis- mus, Hypospadie	-	-	-	-	-	-	+	-	Spina bifida
Gastroenter- ologie	Gastroeso- phagealer Reflux		-	+	+	+	+	+	+	+	-
	Fütterungs-probleme in der Kindheit	+		-	+	+	Pylorus- stenose	+	+	+	Malrotation
Otolaryngol- ogie	Hörverlust	+, Choanal- atresie	-	-	-			-	+, 3-fache Anlage von Pauken- röhrchen	+	Hyperakusis
Ophthalmol- ogie	Augenprobleme	Hyperopia	+	-	-			-	+	Ptosis	Astigmatismus
	Myopie	-	+	-	+			+	+, Stenose d. Ableitenden Tränenwege	+	
ZNS	Anomalien des ZNS	-	-	-	-			-	-	-	-
	Krampfanfälle	-	-	-	-	im Kindesalter		-	moderat	fiebrig	+
Kognitiv	Mentale Retardierung	schwer	mild	sehr mild	mild		moderat	schwer	Sehr aktiv und neugierig, sehr ruhig bei Untersuchung	moderat	moderat- schwer
	Verhalten			normal	hyperaktiv		Selbst- verletzung	hyperaktiv, autistisch,		Temper- tantrums (launen-)	Milde Selbst- verletz., ag- gressiv, hohe

Anhang

										abhängige Wutanfälle	Schmerz- grenze, ängstlich
Entwicklung	Verbale Entwicklung	Wenige Worte		fast normal	mild, einzelne Sätze		Deutliche Verzöger-ung	Minimale Sprache nutzt Silben unspezifisc h	Minimale Sprache ab 17m nutzt "Mama" - unpezifisch	Wenige Worte ab 9 a	
	Motorische Entwicklung	läuft seit dem 7. m		fast normal	mild		läuft seit dem 4.5 a	moderat	läuft seit dem 2. a	läuft seit dem 40. m	läuft seit dem 5. a
Messwerte	Gestationsalter (Wochen)	36	41	40	38	31	40	39	40	38	40
Geburts- daten	Körpergewicht (g)	1760	3100	2784	1700	1984	2840	1700	3543	2700	2600
	Perzentile Gewicht	<10%	40%	15%	<5%	90%	25%	<<10%	75%	75%	10%
	Körperlänge	42 cm	48 cm	45.7 cm	46 cm	44 cm	45.72cm	46 cm	19.25 in	45.7 cm	48cm
	Perzentile Länge	<10%	40%	10%	20%	75-90%	10%	10%	50%	75%	25%
	Kopfumfang				29 cm	30.7 cm		31 cm	13.25 in	31 cm	30.5 cm
	Perzentile Kopfumfang				<10%	75-90%		<<10%	25-50%	50%	<<10%
	Apgar Score (1min/5min)	?		9/9	10	5/7		10/10	6/9		
Spätere Messungen	Alter des Patienten bei Erfassung	7.5 a	14 a	9 a	14 a	5 m	9 a	28 a	3 a	9 a	23 a
	Gewicht (kg)	12		20.8	42	4.6	19.8	36.4	10.45		68.6
	Perzentile Gewicht	<5%		<5%	10%	<5%, 50% für 1 m	<5%	<5; 50% for 11 a	<5%, 50% for 12 m		80%
	Perzentile Gewicht (CdLS)			95%	95%	50-95%	60%	60%	~ 95%		>95%
	Körperlänge (cm)	98	150.1	119	146		116.4	142	82.5		144.5
	Perzentile Länge	<5%		<5%	<5%		<5%	<5; 50% für 10a	<5%, 50% für18 m		<5%, 50% für 11 a
	Perzentile Länge (CdLS)	40%	90%	80%	95%		70%	5%	70%		75%
	Kopfumfang	43.5	50.8	48.25	49			51	46.75		48.5
	Perzentile Kopfumfang	< 3%		<5%	<3%			<3; 50% für 4 a	<5%, 50% für 13 m		<2%
	Perzentile Kopfumfang (CdLS)		60%	98%	60%			90%	75%		

Wenn keine Angaben für Patienten aufgeführt sind, waren die klinischen Daten nicht vorhanden. Die Nummerierung der *NIPBL* und *MAU2* Sequenzen erfolgte nach den jeweiligen Accession-Nummern (RefSeq NM_015384; bzw. NM_015329). Die Nomenklatur der Sequenzvariationen erfolgte nach den Dunnen.¹

Danksagung

Als Erstes möchte ich meinem Betreuer Dr. Frank Kaiser für das Projekt und die zahlreichen Ratschläge danken, vor allem aber für seine Unterstützung und das mir entgegen gebrachte Vertrauen, eigene Ideen zu verwirklichen.

Ein besonderer Dank gilt auch unserer Institutsdirektorin Prof. Dr. Gillessen-Kaesbach für die Möglichkeit im Institut für Humangenetik zu promovieren und vor allem für ihr Interesse an meiner Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für die Bereitstellung von Patientenmaterial und ihre Unterstützung in klinischen Fragen danken.

Weiterhin möchte ich meinen lieben Kollegen aus dem Institut für Humangenetik danken, mit denen ich jeden Tag viel Spaß im Labor hatte und bei denen ich mir immer Ratschläge bei der praktischen Durchführung einholen konnte.

Conny Zuther danke ich für die Durchführung der PCSC-Assays und die guten Ratschläge für die Zellkultur.

Andreas Dalski möchte ich für die Analysedaten eines Patienten danken, die für die Promotor-Versuche sehr wichtig waren.

Irina Stefanova möchte ich für den tollen Austausch danken, der mir auch Einblicke in die klinischen Aspekte meiner Arbeit verschafft hat.

Insbesondere sind aber meine direkten Kollegen Alev Erogullari, Juliane Eckhold, María Concepcion Gil-Rodriguez und Ulf Edener zu nennen, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und mit denen ich sehr gern zusammen gearbeitet habe.

Im Besonderen möchte ich dabei auch Melanie Albrecht danken, deren Unterstützung und Ratschläge sehr wertvoll für mich waren und die über das Fachliche hinaus gingen.

Weiterhin möchte ich unseren Kooperationspartnern Matthew Deardorff und Ian Krantz aus dem Children's Hospital in Philadelphia, USA danken, mit denen der Austausch von Ergebnissen immer sehr gut funktioniert hat und unser Projekt dadurch viele neue Perspektiven erhalten hat.

Jens Habermann und Timo Gemoll aus der Klinischen Chirurgie möchte ich für die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und die Unterstützung bei der Auswertung der Analysen danken.

Aus dem Institut für Physiologie möchte ich Reinhard Depping für die Bereitstellung des Luminometers und die damit verbundenen Ratschläge danken. Dabei ist auch Susan Schindler zu nennen, die mir stets Hilfestellungen gegeben hat, wenn ich sie brauchte.

Für die Möglichkeit das Konfokale Laserscanning Mikroskop im Institut für Pharmakologie nutzen zu dürfen, möchte ich mich herzlich bei Andreas Dehdorfer und Olaf Jöhren bedanken, die mir vor allem bei der Bedienung stets zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Ralf Werner für die Möglichkeit seinen Imager für die Entwicklung meiner Western Blots nutzen zu dürfen. Dabei ist auch Dr. Helga Grötsch zu nennen, die bei Fragen immer für mich da war.

Weiterhin möchte ich Professor Dr. Heidemarie Neitzel und ihren Mitarbeitern im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik an der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Herstellung der lymphoblastoiden Zelllinien aus Patientenmaterial danken.

Dr. Andreas Tzschach möchte ich für die vielen Informationen zu einem wichtigen Patienten dieser Arbeit und für die Bereitstellung des Patientenmaterials danken.

Im Besonderen möchte ich auch meiner Familie danken, die mich immer unterstützt und die geduldig zugehört hat, wenn die Versuche mal wieder nicht funktioniert haben.