

Funktion und Evolution des geprägten Gens *C15orf2/NPAP1*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Lisa Neumann
aus Düsseldorf
April 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Meyer
3. Gutachter: ---

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Iliakis

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2013

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Neumann LC, Markaki Y, Mladenov E, Hoffmann D, Buiting K und Horsthemke B

The imprinted *NPAPI/C15orf2* gene in the Prader-Willi syndrome region encodes a nuclear pore complex associated protein.

Human Molecular Genetics, 2012, Vol. 21, No. 18 4038-4048

Inhalt

1.	Einleitung	9
1.1	Genomische Prägung.....	9
1.1.1	Entdeckung der genomischen Prägung	9
1.1.2	Regulationsmechanismen der genomischen Prägung	11
1.1.3	Evolutionärer Ursprung der genomischen Prägung	15
1.2	Die geprägte humane Genregion 15q11q13	17
1.2.1	Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom	17
1.2.2	Geprägte Gene in der chromosomalen Region 15q11q13.....	20
1.2.3	Das geprägte Gen <i>C15orf2</i>	24
1.3	Aufbau und Funktion der Zellkernhülle	26
1.3.1	Die Kernlamina	27
1.3.2	Der Kernporenkomplex (NPC)	28
1.4	Retrotransposition	31
2.	Zielsetzung der Arbeit	35
3.	Material, Methoden	36
3.1	Material	36
3.1.1	Chemikalien	36
3.1.2	Standardlösungen und Medien	36
3.1.3	Bakterienstämme und Zelllinien	37
3.1.4	Plasmide	38
3.1.5	Größenstandards	38
3.1.6	Oligonukleotide	38
3.1.7	Antikörper	39
3.1.8	Gewebe.....	40
3.1.9	DNA und cDNA.....	40

3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Allgemeine DNA und RNA Methoden.....	40
3.2.2 Allgemeine Protein Methoden	48
3.2.3 Zellkultur.....	50
3.2.4 Bioinformatische Methoden.....	52
3.2.5 Fragmentlängenanalyse.....	53
3.2.6 Methylierungsanalyse.....	53
3.2.7 Methoden zur Generierung einer <i>C15orf2</i> -Expressionszelllinie.....	55
3.2.8 Immunfluoreszenz.....	59
3.2.9 Zentrifugale Gegenfluss-Elutrierung.....	63
3.2.10 Fraktionierung von Zellkernhüllen.....	64
3.2.11 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung zur mRNA-Detektion.....	66
3.2.12 Genexpressionsanalyse per Microarray	67
4. Ergebnisse	68
4.1 Regulation des geprägten <i>C15orf2</i> -Gens	68
4.1.1 Monoallelische Expression von <i>C15orf2</i> im adulten Gehirn	68
4.1.2 Detaillierte Methylierungsanalyse des <i>C15orf2</i> -Promotor-CpG-Islands	69
4.1.3 Suche nach alternativen Genregulationsmechanismen für <i>C15orf2</i>	73
4.2 Funktion des C15orf2-Proteins	74
4.2.1 Bioinformatische Analyse der C15orf2-Proteinsequenz.....	74
4.2.2 Suche nach humanen Zelllinien mit endogener C15orf2-Expression.....	76
4.2.3 Immunfluoreszenzanalysen in einer C15orf2-Expressionszelllinie.....	77
4.2.4 Verteilung von C15orf2 in Fraktionen der Zellkernhülle	85
4.2.5 Einfluss der C15orf2-Überexpression auf den mRNA-Export	86
4.2.6 Einfluss der C15orf2-Überexpression auf die Genexpression	87
4.3 Evolutionärer Ursprung des <i>C15orf2</i> -Gens.....	87
4.3.1 Evolutionäre Konservierung von <i>C15orf2</i> -Orthologen in Primaten und Analyse des	

Weißbüschelaffen-Orthologs	87
4.3.2 Analyse einer neuen, <i>C15orf2</i> -homologen Genfamilie in den Eutheria	90
4.3.4 Expressionsanalyse von <i>NPAP1L</i> im Rind	92
4.3.3 Phylogenetische Analyse der <i>C15orf2</i> -, <i>NPAP1L</i> - und <i>POM121</i> -Proteinfamilien	94
5. Diskussion	97
5.1 Die monoallelische Expression von <i>C15orf2</i> wird vermutlich nicht durch sein Promotor-assoziiertes CpG-Island reguliert	97
5.2 <i>C15orf2</i> codiert für ein NPC-assoziiertes Protein	98
5.3 <i>C15orf2</i> gehört zu einer <i>POM121</i> -verwandten Familie von Retrogenen	103
5.4 Allgemeine Diskussion und Ausblick	106
6. Zusammenfassung	109
7. Literaturverzeichnis	111
8. Anhang	I

Abkürzungsverzeichnis:

3C	<i>Chromosome conformation capture</i>
A	Adenin
A	Anhang
Abb	Abbildung
AS	Angelman-Syndrom
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
CCE	<i>Counterflow centrifugal elutriation</i> ; zentrifugale Gegenfluss-Elutriation
cen	centromerisch
CpG	Basenabfolge: Cytosin, (Phosphatgruppe,) Guanin
CTCF	<i>CCCTC binding factor</i>
DMR	differenziell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>Expressed sequence tag</i> ; Teilsequenz
FG	Phenylalanin-Glycin
FKS	fetales Kälberserum
fw	<i>forward</i> ; vorwärts
G	Guanin
Gbp	Gigabasenpaar
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IC	Imprinting-Center
INM	<i>Inner nuclear membrane</i> ; innere Kernmembran
I-Puffer	Immunfluoreszenzpuffer
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LINE	<i>Long interspersed element</i>
Mbp	Megabasenpaar
MDa	Megadalton
miRNA	Mikro-RNA

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
ncRNA	nicht-codierende RNA
NPC	<i>Nuclear pore complex</i> ; Kernporenkomplex
NUP	Nukleoporin
ONM	<i>Outer nuclear membrane</i> ; äußere Kernmembran
ORF	<i>Open reading frame</i> ; offener Leserahmen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
piRNA	PIWI-interagierende RNA
PWS	Prader-Willi-Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
rev	<i>reverse</i> ; rückwärts
SIM	Strukturierte Illuminationsmikroskopie
SINE	<i>Short interspersed element</i>
sno-lncRNA	lncRNA mit snoRNA-Enden
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i> ; kleine nukleolare RNA
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelnukleotidpolymorphismus
SRO	<i>Shortest region of deletion overlap</i> ; kleinster überlappender Deletionsbereich
SRS	Silver-Russell-Syndrom
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tel	telomerisch
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U	<i>Unit</i> ; Enzymeinheit
UPD	uniparentale Disomie
UTR	untranslatierte Region
WCE	<i>Whole cell extract</i> ; Gesamtzellextrakt

1. Einleitung

1.1 Genomische Prägung

Die genomische Prägung, auch genomisches Imprinting genannt, ist ein epigenetisch regulierter Prozess, der dazu führt, dass in diploiden Zellen von Säugetieren etwa 1 – 2 % der Gene monoallelisch, also entweder nur vom maternalen oder nur vom paternalen Chromosom, exprimiert werden (Bartolomei 2009; Barlow 2011; Ferguson-Smith 2011). Dadurch werden bestimmte Genloci funktionell hemizygot. Die Erforschung der so regulierten Gene hat zum Verständnis verschiedener sogenannter Imprinting-Erkrankungen beigetragen, die auftreten, wenn die einzige funktionelle Kopie eines oder mehrerer geprägter Gene seine Funktion verliert. Zudem ist die genomische Prägung ein wichtiges Modellsystem für die molekulare Analyse epigenetischer Regulationsmechanismen während der Ontogenese (Barlow 2011).

1.1.1 Entdeckung der genomischen Prägung

Die genomische Prägung bei Säugetieren wurde in den 1980er Jahren entdeckt. Besondere Bedeutung kam dabei einer Reihe von Experimenten am Mausmodell zu:

In Pronukleus-Transplantationsexperimenten sollten Mäuse generiert werden, die nur einen der zwei elterlichen Chromosomensätze in doppelter Ausführung besaßen (uniparentale Embryonen). Überraschenderweise waren die so erzeugten Embryonen aber nicht lebensfähig und starben nach etwa der Hälfte der normalen Tragzeit ab (McGrath und Solter 1984; Surani *et al.* 1984; Surani *et al.* 1986). Parthenoten (mit zwei maternalen Genomen) entwickelten überwiegend embryonales Gewebe, zeigten aber Defekte in der Ausbildung extraembryonaler Strukturen (Surani *et al.* 1984). Dagegen bildeten Androgenoten (mit zwei paternalen Genomen) überwiegend extraembryonale Strukturen aus, während embryonale Komponenten fehlten oder stark unterentwickelt waren (Surani *et al.* 1986). Dies führte zu der Hypothese, dass die beiden elterlichen Genome während der frühen Embryonalentwicklung komplementäre Funktionen erfüllten und dass das Fehlen oder die Überexpression von geprägten Genen die Entwicklungsstörungen verursachten (Ferguson-Smith 2011).

In komplexen Kreuzungsexperimenten an Mauslinien mit verschiedenen Translokationen wurden außerdem Embryonen erzeugt, die bestimmte Chromosomen oder Teile von Chromosomen zwar genetisch ausbalanciert, jedoch nur von einem Elternteil (als uniparentale Disomie) erbten (Cattanach und Kirk 1985; Cattanach 1986). Auf diese Art konnten elternspezifische Effekte (*Parent-of-origin*-Effekte) auf die Entwicklung bestimmten genomischen Regionen zugeordnet werden (Cattanach und Kirk 1985; Cattanach 1986).

Dabei wurden subchromosomale Regionen identifiziert, in denen man geprägte Gene vermutete. Einige Jahre später wurden mit *Igf2r*, *Igf2* und *H19* die ersten geprägten Gene identifiziert (Barlow *et al.* 1991; Bartolomei *et al.* 1991; DeChiara *et al.* 1991). Durch genetische Manipulation der Dosis geprägter Gene wurde inzwischen gezeigt, dass eine fehlerhafte genomische Prägung das entscheidende Hindernis zur erfolgreichen Entwicklung parthenogenetischer Mäuse ist (Kono *et al.* 2004).

Neben den erwähnten Mausexperimenten trugen auch Untersuchungen an Patienten und Patientenfamilien entscheidend zum Verständnis der genomischen Prägung bei. Schon 1974 war in familiären Fällen des Beckwith-Wiedemann-Syndroms (BWS) aufgefallen, dass es nur nach maternaler Transmission zur phänotypischen Ausprägung des Phänotyps kam (Lubinsky *et al.* 1974). Allerdings gab es zu dieser Zeit noch keine Erklärungsansätze, die auf genomische Prägung hindeuteten. Ein typischer Stammbaum einer familiären Imprinting-Erkrankung ist in Abbildung 1 dargestellt. Die chromosomalen Regionen, in denen der Funktionsverlust von geprägten Genen zu BWS und dem Silver-Russell-Syndrom (SRS) (Chr. 11p15.5) bzw. zum Prader-Willi-Syndrom (PWS) oder Angelman-Syndrom (AS) führten (Chr. 15q11q13) waren schließlich die ersten Cluster geprägter Gene, die im Menschen charakterisiert wurden (Soejima und Wagstaff 2005). Die Analyse kleiner Deletionen führte zu einem besseren Verständnis der Struktur geprägter Regionen und ermöglichte die Kartierung regionaler Imprinting-Center (ICs), die die genomische Prägung einer Region *in cis* regulieren (Buiting *et al.* 1995; Kagami *et al.* 2010; Ferguson-Smith 2011).

Aktuelle Listen der bisher bekannten geprägten Gene enthalten etwa 150 Einträge für die Maus (<http://www.mousebook.org/>) und etwa 80 für den Menschen (<http://igc.otago.ac.nz/>). Der zahlenmäßige Unterschied kommt auch dadurch zustande, dass die Gene in den beiden Datenbanken unterschiedlich gruppiert werden. Tatsächlich hat sich für den überwiegenden Teil der murinen geprägten Gene auch das humane Ortholog als geprägt erwiesen (und umgekehrt). Obwohl die Suche nach neuen geprägten Genen weiterhin fortgeführt wird, wurden in neueren Screenings vor allem bekannte Loci bestätigt und nur wenige neue Gene identifiziert (Babak *et al.* 2008; Pollard *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Nakabayashi *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011). Es ist daher davon auszugehen, dass der Anteil geprägter Gene in den Säugergenomen nicht wesentlich mehr als 1 – 2 % beträgt.

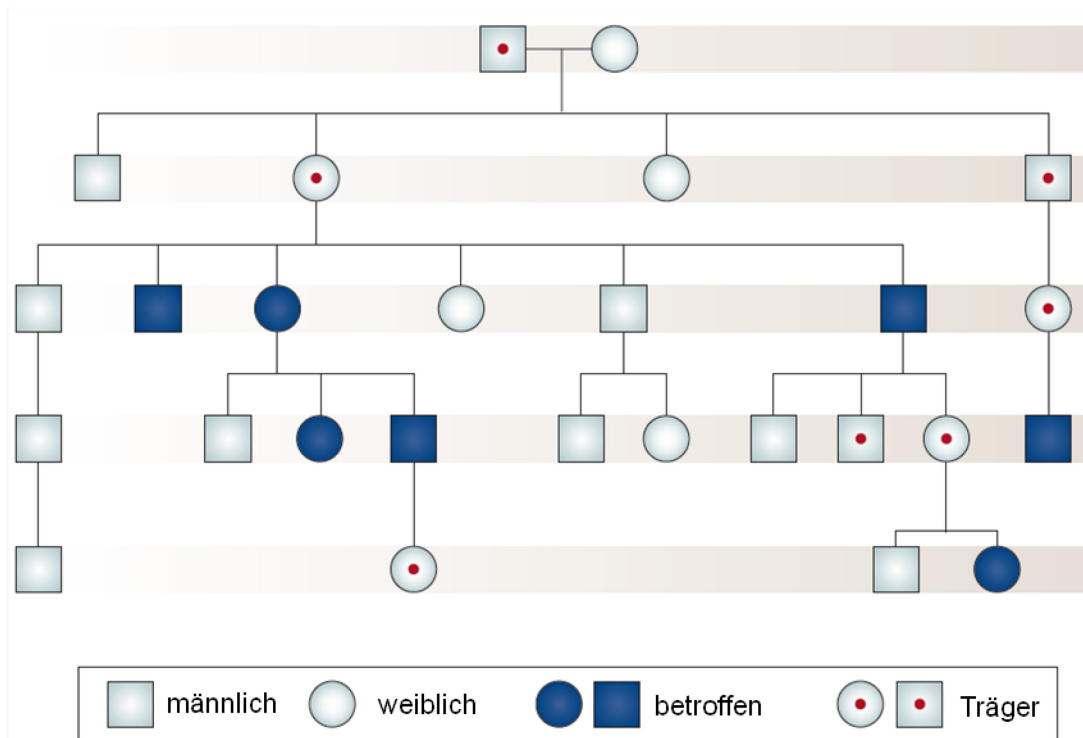


Abbildung 1: Hypothetischer Stammbaum einer familiär vererbten Imprinting-Erkrankung. Eine Erkrankung, die auf den Funktionsverlust eines maternal exprimierten geprägten Gens zurückgeht, kommt nur dann zum Ausbruch, wenn sie von der Mutter vererbt wird. Individuen, die die Mutation von ihrem Vater erben, sind dennoch Träger der Mutation und können diese an nachfolgende Generationen weitergeben. Äquivalent würde der Funktionsverlust paternal exprimierter Gene nur nach Vererbung über den Vater zu einem Phänotyp führen. Abbildung geändert aus Ferguson-Smith (2011).

1.1.2 Regulationsmechanismen der genomischen Prägung

Bei der Regulation der allelspezifischen Expression geprägter Gene spielt eine Reihe von epigenetischen Modifikationen eine Rolle. Wohl am besten charakterisiert ist die Methylierung von Cytosinbasen an CpG-Positionen der DNA (DNA-Methylierung). Regionen, in denen deutliche Methylierungsunterschiede zwischen den elterlichen Allelen bestehen, werden als differenziell methylierte Regionen (DMRs) bezeichnet und sind häufig, aber nicht immer, in CpG-Islands zu finden (Reik und Walter 2001). CpG-Islands sind genomische Regionen, in denen die Basenabfolge CpG gegenüber dem restlichen Genom deutlich überrepräsentiert ist (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Sie kommen häufig in den Promotorregionen nicht-geprägter Haushaltsgene vor und sind dort normalerweise unmethyliert, während der Großteil aller CpG-Positionen genomweit üblicherweise methyliert vorliegt (Gardiner-Garden und Frommer 1987; Cedar und Bergman 2009). Eine CpG-Island-Methylierung am Promotor führt in der Regel zur Repression der Genexpression (Jones und Takai 2001; Bird 2002). DNA-Methylierungsmuster werden mithilfe der Erhaltungs-

Methyltransferase DNMT1 bei der Zellteilung semikonservativ vererbt (Bestor und Ingram 1983; Pradhan *et al.* 1999). Neumethylierung wird durch die *de novo*-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B vermittelt (Okano *et al.* 1999), während Demethylierung entweder passiv über mehrere Zellteilungen erfolgen kann, oder durch bisher nur teilweise verstandene aktive Mechanismen. Bei der aktiven Demethylierung scheint die Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin durch die TET-Enzyme eine wichtige Rolle zu spielen (Tahiliani *et al.* 2009; Ficz *et al.* 2011). Neben der DNA-Methylierung sind auch posttranslationale Modifikationen der Histonproteine, wie z. B. Histonacetylierung und Histonmethylierung, an der epigenetischen Markierung aktiver und inaktiver Gene beteiligt. Die Genregulation durch Histonmodifikationen wird über Änderungen in der Chromatinstruktur und/oder durch die Rekrutierung chromatinbindender Proteine vermittelt (Berger 2002). Vermutlich spielen auch solche Chromatinmodifikationen bei der Regulation der genomischen Prägung eine Rolle. So wurden beispielsweise am *SNRPN*-Promotor auf dem methylierten maternalen Allel Histon3-Lysin9-Methylierung und Histon4-Lysin20-Methylierung gefunden, während das aktive paternale Allel durch Histon3-Lysin4-Methylierung und Acetylierung der Histone 3 und 4 gekennzeichnet ist (Saitoh und Wada 2000; Xin *et al.* 2001; Fournier *et al.* 2002; Horsthemke und Wagstaff 2008).

Die meisten (> 80 %) aller bekannten geprägten Gene sind in einer von 16 bekannten genomischen Regionen lokalisiert und als geprägte Gencluster organisiert (Wan und Bartolomei 2008; Barlow 2011). Es gibt aber auch einzeln liegende und paarweise organisierte geprägte Gene (Cowley und Oakey 2010). Geprägte Gencluster werden von ICs reguliert, die meistens schon in der Keimbahn differenzielle Methylierung aufweisen. Wenn eine Deletion in einer geprägten Region das IC einschließt, führt dies zum Verlust der geprägten Regulation im gesamten Cluster (Wutz *et al.* 1997; Thorvaldsen *et al.* 1998; Yang *et al.* 1998; Horsthemke und Buiting 2006; Buiting 2010). ICs können Gene mit gegenteiliger elterlicher Expression regulieren und tatsächlich enthalten die meisten geprägten Regionen sowohl paternal exprimierte als auch maternal exprimierte Gene. Viele der geprägten Gencluster zeigen eine entwicklungs- und/oder gewebsspezifische Regulierung der genomischen Prägung, was zeigt, dass nicht allein die strukturellen Eigenschaften des IC für die geprägte Regulation eines Clusters maßgeblich sein können (Santoro und Barlow 2011). Zusätzliche Faktoren, die notwendig sind, um die Prägung abzulesen (*Imprint-Readers*) könnten in diesen Fällen entwicklungs- oder gewebsspezifisch reguliert sein (Santoro und Barlow 2011). Die Mechanismen, über die die ICs ihre regulatorischen Funktionen erfüllen,

unterscheiden sich von Region zu Region. Dennoch lassen sich bestimmte Regulationsmodelle erkennen, die in mehreren der sieben gut erforschten geprägten Gencluster eine Rolle spielen. Zum einen gibt es das *Insulator*-Modell, bei dem das IC reguliert, auf welche der geprägten Gene im Cluster eine gemeinsame Enhancer-Region wirken kann (Bartolomei 2009). Ein Beispiel für diese Art der Regulation ist der *Igf2-H19*-Locus, wo das IC auf dem unmethylierten Allel den CCCTC *binding factor* (CTCF) bindet, der die Transkription von *Igf2* blockiert (Leighton *et al.* 1995; Thorvaldsen *et al.* 1998; Bell und Felsenfeld 2000; Hark *et al.* 2000; Kanduri *et al.* 2000). Ein weiteres verbreitetes Regulationsmodell beinhaltet nicht-codierende RNAs (ncRNAs), die andere Gene *in cis* stilllegen. Dabei scheint in einigen Fällen, wie dem der *Airn*-ncRNA im *Igf2r*-Cluster, transkriptionelle Interferenz eine Rolle zu spielen, während in anderen Fällen, wie am *Gnas*-Locus, noch nicht zwischen dieser Möglichkeit und der Möglichkeit einer direkten Rolle der transkribierten ncRNA unterschieden werden kann (Pauler *et al.* 2007; Williamson *et al.* 2011; Latos *et al.* 2012). Eine dritte Möglichkeit ist die methylierungsabhängige Interaktion der ICs mit den Promotoren geprägter Gene. Shemer und Kollegen fanden mit Transgenexperimenten und 3C-Interaktionsanalysen Hinweise auf eine Interaktion des PWS-IC am *SNRPN*-Promotor mit einem Bereich zwischen den entfernt liegenden paternal exprimierten Genen *MKRN3* und *MAGEL2* (Rabinovitz *et al.* 2012).

Die primäre Markierung, die die elterlichen Allele an den ICs unterscheidet, wird gesetzt, wenn die elterlichen Genome noch räumlich getrennt sind. Dies geschieht an vielen Loci während der Keimzellentwicklung, könnte aber theoretisch auch noch unmittelbar nach der Befruchtung in den noch getrennten Pronuklei stattfinden (Reik und Walter 2001; Ferguson-Smith 2011). Man geht davon aus, dass DNA-Methylierung am IC die primäre Markierung in der Keimbahn darstellt, da diese stabil mitotisch vererbt wird und weil an vielen ICs schon in den Keimzellen Methylierungsunterschiede gefunden wurden (Davis *et al.* 1999; Lucifero *et al.* 2004; Ferguson-Smith 2011). Dass die Identität der primären epigenetischen Markierung aber nicht ganz eindeutig ist, zeigt das Beispiel des IC der geprägten Region 15q11q13 am *SNRPN*-Promotor. An diesem Locus konnte im Mausmodell nach *Knock-out* des *Zfp57*-Gens die Methylierung in Eizellen nicht etabliert werden, zeigte aber dennoch normale differenzielle Methylierung ab Tag 3,5 der Embryonalentwicklung, wenn *Zfp57* nach der Befruchtung im Embryo exprimiert wurde (Li *et al.* 2008).

Die genomische Prägung durchläuft mit jeder Generation einen Lebenszyklus von Auslöschung, Etablierung und Aufrechterhaltung (Reik und Walter 2001). Die Auslöschung

der elterlichen Prägung geschieht während einer globalen Demethylierung des gesamten Genoms, die in einer frühen Phase der Keimzellentwicklung stattfindet (Reik und Walter 2001). Anschließend wird die neue Prägung keimbahnspezifisch etabliert. An der Prägungsetablierung sind die *de novo*-Methyltransferasen und das verwandte Enzym DNMT3L beteiligt (Bourc'his *et al.* 2001; Hata *et al.* 2002). Wie dabei die richtigen Sequenzen erkannt werden, ist bisher aber nicht bekannt. In Regionen mit maternal methylierten ICs spielt möglicherweise Oozyten-spezifische Transkription über zukünftige DMRs eine Rolle (Chotalia *et al.* 2009). Die in den Keimzellen etablierten Keimbahn-Prägungsmarken müssen anschließend vor erneuter Auslöschung geschützt werden. Dies ist besonders unmittelbar nach der Befruchtung essentiell, wenn in der Zygote der paternale Pronukleus in aktiver Weise demethyliert wird und anschließend auch das maternale Genom einer passiven globalen Demethylierung unterzogen wird (Reik und Walter 2001). Die Mechanismen, die zur Prägungsaufrechterhaltung beitragen, sind bisher nur teilweise verstanden. Auch scheinen diese Mechanismen zwischen den einzelnen geprägten Loci nicht ganz einheitlich zu sein. Das Protein DPPA3/STELLA ist notwendig, um die Demethylierung von einigen aber nicht allen geprägten Genen auf dem maternalen Genom des Embryos zu verhindern (Nakamura *et al.* 2007). Das Protein MBD3 scheint dagegen eine Rolle bei der Prägungsaufrechterhaltung am paternal methylierten *H19*-Locus zu spielen (Reese *et al.* 2007). Für andere paternal methylierte Loci spielt MBD3 dagegen wohl keine Rolle. Die Proteine Arid4a und Arid4b scheinen zusammen mit Rb1 für die Stabilität der maternalen Prägung an der *SNRPN*-DMR wichtig zu sein (Wu *et al.* 2006; Bartolomei 2009). Ein weiterer Kandidat ist das KRAB-Zinkfingerprotein ZFP57, das zu einer Klasse von Transkriptions-faktoren gehört, die durch die Rekrutierung des KAP1/TIF1b Co-Repressorkomplexes die Transkription inhibieren (Friedman *et al.* 1996; Abrink *et al.* 2001). In der Maus führte der *Knock-out* von *Zfp57* bei einigen, aber nicht allen, untersuchten geprägten Genen zum Verlust der Methylierung und zu erhöhter Expression und war letal, wenn das Protein sowohl in der Oozyte als auch im Embryo fehlte (Li *et al.* 2008). Am *Snrpn*-Locus, aber an keinem weiteren untersuchten Locus zeigte sich, dass *Zfp57* auch für die Etablierung der differenziellen Methylierung notwendig ist.

Die Schwierigkeiten, gemeinsame Regulationsmechanismen für alle geprägten Gene und Regionen zu finden, könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die einzelnen Gen-Cluster unabhängig voneinander, wenn auch durch gemeinsame evolutionäre Ursachen, entwickelt haben und eine Vielzahl epigenetischer Mechanismen zu Verfügung standen, um ähnliche

Ergebnisse zu erreichen. Gerade aufgrund dieser Vielfalt wird die Erforschung der genomischen Prägung als Modellsystem für die Entdeckung epigenetischer Mechanismen gesehen (Barlow 2011).

1.1.3 Evolutionärer Ursprung der genomischen Prägung

Genomische Prägung ist in Pflanzen und Säugetieren bekannt und hat sich dort unabhängig entwickelt (Feil und Berger 2007). Daneben gibt es auch in Insekten ähnliche Effekte des elterlichen Ursprungs (Anaka *et al.* 2009). Unter Säugetieren ist die genomische Prägung in den Plazentatieren (Eutheria) und Beuteltieren (Metatheria) konserviert, wurde dagegen in den eierlegenden Monotremata bisher nicht gefunden (Renfree *et al.* 2009). Ebenso scheint es keine genomische Prägung in Nicht-Säugetier-Vertebraten zu geben.

Die genomische Prägung führt zum funktionellen Verlust der Heterozygotität an den durch sie regulierten Genen und sollte daher eigentlich einen selektiven Nachteil darstellen (Bartolomei 2009). Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, weshalb sich die genomische Prägung in Säugetieren trotzdem entwickeln konnte. Beispielsweise wurde überlegt, ob es sich um einen Mechanismus handelt, der die Parthenogenese, also die Entwicklung von Föten ohne väterlichen Chromosomensatz, verhindern soll, die in Säugetieren möglicherweise nachteilige Auswirkungen hat (Hall 1990). Die genomische Prägung könnte sich auch als zusätzliche Möglichkeit zur Dosiskompensation und Genregulation entwickelt haben (Hall 1990). Die bekannteste Theorie ist die *Kinship*-Theorie (auch als Geschlechterkonflikt-Hypothese bezeichnet), die die Selektion geprägter Gene mit der Besonderheit höherer Säugetiere, ungeborene Nachkommen über eine Plazenta zu versorgen und Neugeborene zu säugen, in Zusammenhang bringt (Moore und Haig 1991; Haig 2004). Nach dieser Theorie gibt es einen Interessenskonflikt der Eltern bezüglich einiger Eigenschaften der gemeinsamen Nachkommen (unter der Bedingung von Promiskuität). Während der Vater daran interessiert ist, dass seinen Nachkommen möglichst viele Ressourcen zukommen, ist die Mutter daran interessiert, ihre Ressourcen auf möglichst viele Nachkommen zu verteilen. Dieser Konflikt kann sich nicht nur auf die Ressourcen der Mutter (z.B. über die Plazenta oder Muttermilch) und die Konkurrenz mit Halbgeschwistern beziehen, sondern theoretisch auf jeden Konkurrenten, der mehr Gene mit der Mutter als mit dem Vater teilt (deshalb *Kinship*-Theorie) (Haig 2004). Durch einen Effekt, der als "loudest voice prevails"-Prinzip beschrieben wird, werden durch diese Konkurrenz letztlich die für ein Geschlecht positiven Gene in optimaler Dosis exprimiert, während dieselben Gene auf den vom anderen Geschlecht vererbten Allel vollständig unterdrückt werden (Wilkins und Haig 2003).

Geprägte Gene, deren Funktionen die *Kinship*-Hypothese unterstützen, sind z.B. das paternal exprimierte Wachstumsfaktor-Gen *Insulin-like growth factor (Igf2)* und das reziprok geprägte Gen für einen Igf2-Rezeptor (*Igf2r*), der als molekulare Senke für Igf2 dient, also dessen Konzentration verringert (Haig und Graham 1991). Die *Kinship*-Hypothese kann dahin erweitert werden, dass unterschiedliche Interessen der elterlichen Genome an die Eigenschaften der Nachkommen auch nach Ende der direkten Abhängigkeit von der Mutter bestehen können. So sagt die *Social Brain*-Hypothese voraus, dass geprägte Gene auch egoistisches und altruistisches Verhalten Jugendlicher und Erwachsener beeinflussen könnten (Ubeda und Gardner 2010). Dies wäre in Gesellschaften der Fall, in denen ein Geschlecht vor der Fortpflanzung mit größerer Wahrscheinlichkeit den Lebensraum wechselt und dadurch mit geringerer Wahrscheinlichkeit mit den Mitgliedern der Gesellschaft, in denen sein Nachkomme aufwächst, verwandt ist. Geprägte Gene, die vom Allel des ortwechselnden Elternteils exprimiert werden, würden demnach eher Egoismus fördern, während Altruismus-fördernde Gene vom Allel des ortstabilen Elternteils exprimiert würden. Diese Theorie könnte möglicherweise Erklärungen für die neuronale Expression vieler geprägter Gene und für die psychiatrischen Phänotypen einiger Imprinting-Erkrankungen liefern (Ubeda und Gardner 2010).

Die Konservierung der Cluster-Organisation und der genomischen Prägung in Säugetieren wurde bereits in einigen geprägten Regionen analysiert und hat Einblicke in die evolutionäre Entwicklung geprägter Gencluster ermöglicht. Offenbar hat sich die genomische Prägung in verschiedenen geprägten Domänen zu unterschiedlichen Zeiten entwickelt.

Der *H19-IGF2*-Locus wird für einen der ältesten geprägten Loci gehalten, da ein orthologer Locus mit ähnlicher räumlicher Organisation und konservierten CTCF-Bindestellen auch in Beuteltieren gefunden wurde und auch dort der genomischen Prägung unterliegt (Smits *et al.* 2008). Auch die Prägung der Gene *IGF2R* und *PEG10* ist in Beuteltieren konserviert (Killian *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2007). Dagegen zeigt die *DLK1-DIO3*-Region in Beuteltieren zwar eine hohe Konservierung der Gen-Struktur, wird dort aber nicht wie in Mensch und Maus über genomische Prägung reguliert (Edwards *et al.* 2008). Vergleiche zeigten, dass das Genom in Plazentatieren bestimmte intergenische Bereiche, wie die intergenische DMR zwischen den Genen *Dlk1* und *Gtl2* aber auch miRNAs und CD-Box-snoRNAs, hinzugewonnen hat (Edwards *et al.* 2008). Ein verringertes Vorkommen von SINE-Repeat-Elementen und ein erhöhter GC-Gehalt in Plazentatieren gegenüber Beuteltieren wiesen darauf hin, dass nach der Entwicklung der genomischen Prägung in der Region auch die

intergenischen Regionen einer starken reinigenden Selektion (*purifying selection*) unterlagen (Edwards *et al.* 2008).

Die geprägte *SNRPN-UBE3A* Region (im Menschen auf dem chromosomalen Abschnitt 15q11q13) hat sich erst vor relativ kurzer Zeit während der Säugetier-Evolution aus unverbundenen und nicht-geprägten Komponenten gebildet (Rapkins *et al.* 2006). Die geprägte Regulation trat vermutlich erstmals auf, nachdem vor 105 bis 180 Millionen Jahren in einem Vorfahren der Plazentatiere zwei geprägte Regionen fusioniert waren, die jeweils *SNRPN* und *UBE3A* enthielten. Andere Gene wie *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN* erhielten ihren geprägten Status nachdem sie sukzessive in die Genregion integrierten. Dabei spielte vermutlich Retrotransposition eine Rolle (Chai *et al.* 2001; Rapkins *et al.* 2006). Auf ähnliche Weise integrierten wohl auch die *SNORD*-Gene und die langen nicht-codierenden RNAs in die Region, nachdem diese bereits der genomischen Prägung unterlag (Rapkins *et al.* 2006). In der murinen orthologen Region wurden zwei Gene, *Frat3/Peg12* und *Atp5l-ps1*, beschrieben, die geprägt und Nagetier-spezifisch zu sein scheinen (Chai *et al.* 2001). Dies legt nahe, dass der Prozess der Genakquirierung in die geprägte Region 15q11q13 in Plazentatieren noch nicht abgeschlossen ist.

1.2 Die geprägte humane Genregion 15q11q13

1.2.1 Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom

Prader-Willi-Syndrom (PWS) und Angelman-Syndrom (AS) sind phänotypisch unterschiedliche neurogenetische Erkrankungen, die beide auf Veränderungen in der geprägten chromosomalen Region 15q11q13 zurückzuführen sind. Charakteristische Merkmale des Prader-Willi-Syndroms, das nach seinen Erstbeschreibern Andrea Prader und Heinrich Willi benannt wurde, sind ein niedriges Geburtsgewicht, neonatale muskuläre Hypotonie mit Schwierigkeiten beim Trinken sowie eine im Kleinkindalter einsetzende Hyperphagie und Adipositas (Prader 1956; Buiting 2010). Zudem gibt es körperliche Merkmale wie Kleinwuchs, kleine Hände und Füße sowie faziale Auffälligkeiten mit dreieckigem Mund und mandelförmigen Augen. Häufig sind außerdem Hypogonadismus, unvollständige Pubertät und Infertilität zu beobachten. Zu den neurologischen Problemen beim PWS gehören Verhaltensauffälligkeiten, eine erhöhte Anfälligkeit für einige psychiatrische Erkrankungen und eine meist moderate mentale Retardierung. Viele der PWS-Symptome legen eine Störung im Hypothalamus als neurologische Ursache nahe (Swaab

1997). Das PWS tritt mit einer Inzidenz von 1:15.000 – 1:25.000 Geburten auf. Einige Symptome wie der Kleinwuchs und das Übergewicht können durch die Behandlung mit Wachstumshormonen positiv beeinflusst werden (Angulo *et al.* 1996; Carrel *et al.* 1999).

Das nach dem britischen Kinderarzt Harry Angelman benannte Angelman-Syndrom (AS) hat als typische Merkmale schwere mentale Retardierung mit fehlender oder stark eingeschränkter Sprachentwicklung und Ataxie (Williams *et al.* 2006; Buiting 2010). Weitere Merkmale sind Mikrozephalie, Kleinwuchs, Krämpfe und typische Elektroenzephalogramm-(EEG-) Veränderungen. Als charakteristische Verhaltensmerkmale werden ein freundliches Wesen und häufige, unbegründete Lachanfalle beschrieben. Das AS hat in etwa dieselbe Inzidenz wie das PWS.

Beide Syndrome werden durch Funktionsverluste geprägter Gene in 15q11q13 verursacht (Buiting 2010). Der Nachweis von Punktmutationen im *UBE3A*-Gen bei etwa 5 - 10 % der Patienten mit AS hat zu der Erkenntnis geführt, dass *UBE3A* das AS-verursachende Gen ist (Kishino *et al.* 1997; Matsuura *et al.* 1997). Obwohl das PWS offenbar durch den Funktionsverlust paternal exprimierter Gene entsteht, konnte es bisher nicht eindeutig einem bestimmten Gen in der Region 15q11q13 zugeordnet werden und es sind bisher keine Fälle bekannt, in denen das PWS durch Mutationen in einem einzelnen Gen verursacht wird. Bei beiden Erkrankungen können eine große Deletion, eine uniparentale Disomie oder ein Imprinting-Defekt die molekulare Ursache sein. Im Großteil der Fälle (ca. 70 % bei AS und PWS) wird der Verlust eines elterlichen Beitrags durch eine ca. 6 Mbp große Deletion verursacht, die immer *de novo* auftritt (Butler und Palmer 1983; Buiting 2010). Die Deletion, die alle geprägten Gene und einige centromerisch und telomerisch gelegene biallelisch exprimierte Gene in 15q11q13 einschließt, betrifft in PWS-Patienten das paternale und in AS-Patienten das maternale Allel (Knoll *et al.* 1989; Buiting 2010).

Eine weitere mögliche Ursache für PWS und AS ist eine uniparentale Disomie (UPD) 15. Etwa 25 – 30 % der PWS-Patienten besitzen zwei maternale aber kein paternales Chromosom 15 (upd(15)mat), wodurch die paternal exprimierten Gene auf keinem Chromosom funktional sind (Nicholls *et al.* 1989; Buiting 2010). Bei AS-Patienten macht eine entsprechende upd(15)pat nur etwa 1 - 2 % der Fälle aus. AS-Patienten besitzen dann nur zwei paternale Chromosomen, wodurch das maternal exprimierte *UBE3A*-Gen nicht funktional ist (Malcolm *et al.* 1991). UPDs können durch Chromosomen-Fehlverteilungen in der Meiose entstehen, wenn Eizellen entstehen, die entweder zwei oder gar kein Chromosom 15 besitzen. Dadurch entstehen nach der Befruchtung Zygoten mit einer Trisomie 15 oder einer Monosomie 15, die

beide zum intrauterinen Fruchttod führen würden, in seltenen Fällen aber durch Verlust oder Verdopplung eines Chromosoms korrigiert werden können. Die Korrektur einer Monosomie durch Verdopplung des paternalen Chromosoms führt dann zum AS, während die Korrektur der Trisomie bei Verlust des einzigen paternalen Chromosoms zum PWS führen kann.

In einer kleinen Gruppe von Patienten (ca. 1 - 3 % beim PWS und 2 - 4 % beim AS), die weder eine große Deletion noch eine UPD oder, bei AS, eine *UBE3A*-Mutation aufweisen, kann auch eine Störung der genomischen Prägung, ein sogenannter Imprinting-Defekt, in der 15q11q13-Region vorliegen, welche sich in einer fehlerhaften Methylierung der DMRs in 15q11q13 äußert (Buiting 2010). Bei PWS-Patienten mit einem Imprinting-Defekt hat das paternale Chromosom eine maternale Prägung, bei AS-Patienten mit einem Imprinting-Defekt hat das maternale Chromosom eine paternale Prägung. Im Großteil dieser Fälle ist dafür keine Mutation in der DNA-Sequenz als Ursache auszumachen und es wird deshalb von einem primären, sporadischen Fehler in der Auslöschung, Etablierung oder Erhaltung der Prägung am IC ausgegangen (primäre Epimutation) (Horsthemke und Buiting 2006). Beim PWS gibt es Hinweise darauf, dass hier ein Fehler in der Auslöschung der großmütterlichen Prägung in der väterlichen Keimbahn verantwortlich ist, während man beim AS von einem Fehler in der Etablierung oder Erhaltung der Prägung ausgeht (Buiting *et al.* 1998) (Abb. 2). Prägungserhaltungsfehler, die erst im Soma des Kindes entstehen, führen zu somatischen Mosaiken und einem milderem AS-Phänotyp (Nazlican *et al.* 2004).

In seltenen Fällen, in denen kleine, IC-überspannende Deletionen als Ursache ausgemacht wurden, spricht man von einer sekundären Epimutation (Horsthemke und Buiting 2006). Solche seltenen kleinen Deletionen wurden genutzt, um kleinste überlappende Bereiche (*smallest regions of deletion overlap*, SROs) für AS und PWS zu kartieren (Buiting *et al.* 1995; Saitoh *et al.* 1996; Ohta *et al.* 1999; Horsthemke und Buiting 2008). Der PWS-SRO umfasst ca. 4,1 kbp und schließt den Promotor-Bereich sowie Exon1 des *SNURF-SNRPN*-Gens ein (Horsthemke und Buiting 2008). Der AS-SRO konnte auf nur 880 bp eingegrenzt werden und liegt ca. 35 kbp centromerisch des *SNURF-SNRPN*-Exon1 (Horsthemke und Buiting 2008). Die beiden SROs werden zusammengefasst als zweiteiliges IC der geprägten Region 15q11q13 beschrieben. In der Maus wurde bisher keine Region gefunden, die dem AS-SRO entspricht (Horsthemke und Wagstaff 2008), was darauf hinweist, dass diese orthologe Region möglicherweise anders reguliert wird. Deletionen des IC kommen sowohl sporadisch als auch familiär vor. In familiären Fällen führen AS-SRO-Deletionen nur zu AS, wenn sie von der Mutter vererbt werden, dagegen führen Deletionen des PWS-SRO oder

beider SROs zum PWS, wenn sie vom Vater vererbt werden (El-Maarri *et al.* 2001; Horsthemke und Buiting 2008).

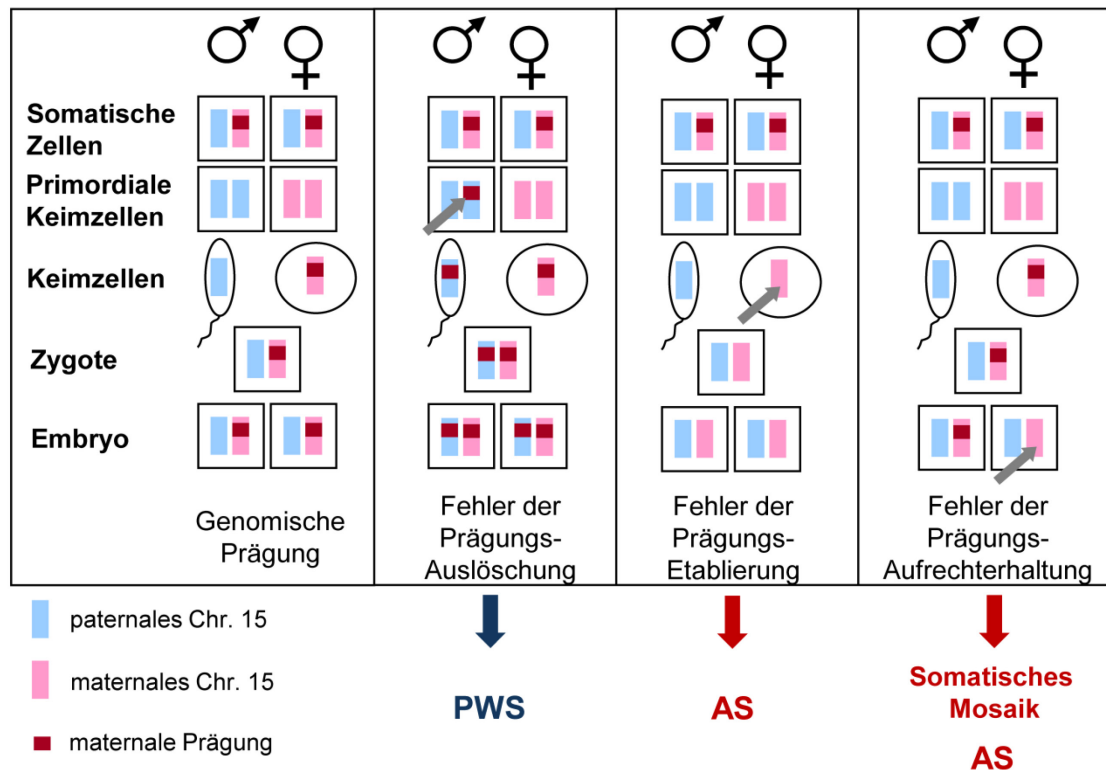


Abbildung 2: Entstehung des AS und des PWS durch primäre Epimutationen. Schematisch sind jeweils die väterliche und mütterliche Keimbahn sowie die Zellen des Kindes abgebildet. Aus Gründen der Vereinfachung ist in jeder Zelle nur ein Chromosomenpaar dargestellt. Die Pfeile markieren jeweils den Zeitpunkt des Prägungsfehlers. Abbildung verändert aus Horsthemke und Buiting (2006).

1.2.2 Geprägte Gene in der chromosomalen Region 15q11q13

Die geprägte Region 15q11q13 enthält eine Reihe von paternal exprimierten geprägten Genen sowie ein maternal exprimiertes geprägtes Gen (Abb. 3). Die Gene, die entweder in allen oder nur in bestimmten Geweben ausschließlich vom paternalen Chromosom exprimiert werden, sind von centromerisch zu telomerisch *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *PWRN1*, *C15orf2*, *SNURF-SNRPN* und etwa 80 *SNORD*-Gene. Solche paternal exprimierten Gene könnten zum Phänotyp von PWS beitragen (Buiting 2010). Telomerisch der *SNORD*-Gene ist das maternal exprimierte AS-Gen *UBE3A* lokalisiert.

In den Promotorbereichen einiger paternal exprimierter Gene wurden DMRs gefunden, die auf dem maternalen Allel methyliert sind und dadurch die monoallelische Expression des paternalen Allels steuern (Abb. 3). Zu diesen Genen gehören *MKRN3*, *NDN* und *SNURF-*

SNRPN (Glenn *et al.* 1993; Jay *et al.* 1997; Zeschnick *et al.* 1997). Außerdem wurden DMRs auch im *PWRN1*-Promotor und in den *SNRPN-upstream*-Promotoren u1A und u1B gefunden (Bielinska *et al.* 2000; Buiting *et al.* 2007). Die DMR im *SNURF-SNRPN* Promotor ist Teil des ICs und ist zumindest in der Maus schon in Oozyten methyliert (Lucifero *et al.* 2004). Dagegen sind die Daten zur Keimbahnmethylierung im Menschen widersprüchlich (El-Maarri *et al.* 2001; Geuns *et al.* 2003). Das maternal exprimierte *UBE3A* besitzt keine DMR und wird wahrscheinlich über ein *UBE3A-antisense*-Transkript reguliert, welches wie die *SNORD*-Gene Teil der *SNURF/SNRPN*-Transkriptionseinheit ist (Rougeulle *et al.* 1998; Chamberlain und Brannan 2001; Runte *et al.* 2001).

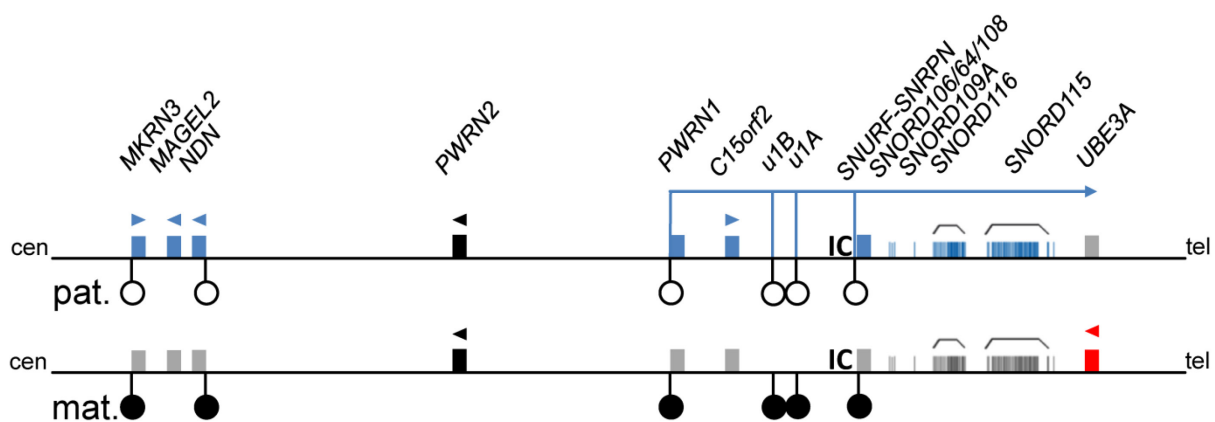


Abbildung 3: Schematische Darstellung der geprägten Gene in der chromosomalen Region 15q11q13. cen – centromerisch; tel – telomerisch; mat – maternales Chromosom; pat – paternales Chromosom. Die Genexpression ist wie folgt dargestellt: blau – Expression vom paternalen Allel; rot – Expression vom maternalen Allel; schwarz – biallelische Expression. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Nicht exprimierte Gene sind auf dem unterdrückten Allel grau dargestellt. Die Lollipops zeigen die allelspezifische Methylierung in DMRs: Gefüllter Kreis – methyliert; leerer Kreis – unmethyliert. Dieses Schema bezieht sich auf die Situation im fetalen Gehirn.

Bis auf *C15orf2* wurden alle proteincodierenden geprägten Gene der Region bereits funktionell charakterisiert. Das intronlose Gen *MKRN3* wird ubiquitär monoallelisch exprimiert und codiert für das RING-Zinkfinger Protein Makorin 3 mit drei C3H-Zinkfingermotiven (Jong *et al.* 1999a; Jong *et al.* 1999b). *MAGEL2* (*melanoma antigene gene expression like 2*) ist ebenfalls intronlos (Lee *et al.* 2000) und codiert für ein Protein aus der MAGE-Gruppe, das an der Steuerung des circadianen Rhythmus im suprachiasmatischen Nucleus beteiligt ist (Kozlov *et al.* 2007). Mausmodelle weisen daraufhin, dass *Magel2* an der Entstehung des PWS beteiligt sein könnte, denn *Magel2-Knock-out*-Mäuse zeigen neonatale Wachstumsverzögerung, starke Gewichtszunahme nach der Säugephase und als erwachsene

Tiere eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Übergewicht mit Stoffwechselveränderungen (Bischof *et al.* 2007). Sie zeigen zudem eine reduzierte Fertilität, weshalb vermutet wurde, dass der Funktionsverlust von *MAGEL2* zu den reproduktiven Defiziten des PWS beitragen könnte (Mercer und Wevrick 2009). Das 41 kbp telomerisch von *MAGEL2* lokalisierte Gen *NDN* codiert für das nukleäre Protein Necdin mit hoher Sequenzähnlichkeit zu *MAGEL2* (Maruyama *et al.* 1991; Jay *et al.* 1997; Lee *et al.* 2000). Das Fehlen von Necdin scheint zu dem hypogonadalen Phänotyp des PWS beizutragen und könnte auch beim Übergewicht eine Rolle spielen (Miller *et al.* 2009; Beneduzzi *et al.* 2011; Fujiwara *et al.* 2012). Einige Patientendaten stehen allerdings im Widerspruch mit einer größeren Rolle von *MAGEL2* und *NDN* bei der Entstehung des PWS. Beispielsweise zeigte ein Patient mit einer atypischen Deletion auf seinem paternalen Chromosom 15, die *MAGEL2* und *NDN* aber nicht den *SNRPN*-Locus einschloss, zwar Übergewicht und mentale Retardierung, jedoch nicht den vollen PWS-Phänotyp (Buiting *et al.* 1993). Dagegen hatten drei andere Patienten mit atypischen Deletionen, die *MAGEL2* und *NDN* nicht umfassten, alle Merkmale des PWS (Buiting *et al.* 1993; Kanber *et al.* 2009).

Am komplexen *SNRPN*-Locus ist nur ein Teil der möglichen alternativen Transkripte proteincodierend, während andere Transkripte, die nichtcodierende *Upstream*- und *Downstream*-Exons einschließen, andere Funktionen besitzen und weiter unten beschrieben werden. Der proteincodierende Teil des *SNRPN*-Locus wird als das bicistronische Gen *SNURF-SNRPN* exprimiert, das für zwei Proteine codiert. Die ersten drei Exons von *SNURF-SNRPN* codieren für das kleine Polypeptid SNURF, für das eine nukleäre Lokalisation und RNA-bindende Eigenschaften beschrieben wurden (Gray *et al.* 1999). Das zweite Protein, SmN, mit 240 AS wird von den Exons 4 – 10 codiert und hat eine Funktion als spleißosomales Protein im Gehirn (Schmauss *et al.* 1989; Ozcelik *et al.* 1992). Das *UBE3A*-Gen liegt telomerisch von *SNURF-SNRPN* und den *SNORD*-Genen. Es wird in einigen Hirnregionen ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert und codiert für die E6-AP-Ubiquitin-Ligase 3A, die Proteine mit Ubiquitin markiert und so deren Degradierung durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse bewirkt (Huibregtse *et al.* 1993; Scheffner *et al.* 1995; Matsuura *et al.* 1997).

In der geprägten Region 15q11q13 wurden außerdem eine Reihe nicht-proteincodierender Gene beschrieben. Mit Ausnahme des Gens *Prader-willi region non-protein coding RNA 2* (*PWRN 2*), das biallelisch exprimiert wird, scheinen alle diese Gene an die komplexe *SNRPN*-Transkriptionseinheit angebunden zu sein (Dittrich *et al.* 1996; Runte *et al.* 2001; Buiting *et*

al. 2007; Wawrzik *et al.* 2009). Zum einen gibt es alternative *Upstream*-Transkripte mit drei bisher beschriebenen Transkriptionsstarts. Zunächst wurden *SNRPN-upstream*-Exons beschrieben, die auf Exon2 von *SNURF-SNRPN* gespleißt werden (Dittrich *et al.* 1996; Färber *et al.* 1999). Die beiden alternativen Startexons dieser Transkripte, u1A und u1B, weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander auf und die *upstream*-Exons u5 und u6 liegen im Bereich des AS-SRO. Das centromerisch von *SNURF-SNRPN* liegende *PWRNI* wurde zunächst als eigenständiges, nicht-codierendes Gen beschrieben, das im fetalen Gehirn monoallelisch aber in Testis biallelisch exprimiert ist (Buiting *et al.* 2007). Vor Kurzem wurde jedoch gezeigt, dass *PWRNI* an die *SNRPN-upstream*-Transkripte angebunden werden kann (Wawrzik *et al.* 2009). Daher besitzt wohl auch *PWRNI* eine Funktion als *Upstream*-Teil des *SNRPN*-Locus. Es wurde vorgeschlagen, dass die *SNRPN-upstream*-Transkripte bei der Prägungsetablierung am IC in Oozyten eine Rolle spielen könnten (Dittrich *et al.* 1996; Mapendano *et al.* 2006). Neben den nicht-codierenden *Upstream*-Exons existieren auch nicht-codierende *Downstream*-Exons im *SNRPN*-Locus (Buiting *et al.* 1997). Diese sind Teil alternativer *SNRPN*-Transkripte, welche die *SNORD*-Gene enthalten, die sich in den Introns der Transkripte befinden und nach dem Spleißen zu kleinen nukleolaren RNAs (*small nucleolar RNAs*, snoRNAs) prozessiert werden (Cavaille *et al.* 2000; Runte *et al.* 2001). Die *SNORD*-Gene *SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD108*, *SNORD109A* und *SNORD109B* stellen einzelne Gene dar, während *SNORD116* als 29-Kopien-Gencluster und *SNORD115* als 48-Kopien-Gencluster vorliegt. Alternative Transkripte, die die am weitesten *downstream* liegenden Gene *SNORD115* und *SNORD116* enthalten, werden ausschließlich im Gehirn exprimiert (Cavaille *et al.* 2000). Die in der 15q11q13-Region codierten snoRNAs gehören zur Klasse der C/D-Box-snoRNAs, die normalerweise an der Methylierung von ribosomalen RNAs (rRNAs) beteiligt sind (Watkins und Bohnsack 2012). Allerdings konnte im Fall der 15q11q13-snoRNAs keine Komplementarität zu rRNA-Sequenzen gefunden werden. Es wurde vermutet, dass sie stattdessen an der Modifikation von mRNAs und am alternativen Spleißen beteiligt sind (Buiting 2010). Vor Kurzem wurde für das *SNORD116*-Cluster außerdem gezeigt, dass neben den snoRNAs auch lange, nicht-codierende RNAs mit snoRNA-Enden (sno-lncRNAs) aus einigen der *SNORD116*-Gene prozessiert werden (Yin *et al.* 2012). Diese bestehen aus jeweils zwei benachbarten snoRNAs und dem dazwischenliegenden Bereich, der Erkennungssequenzen für den Spleißfaktor FOX2 enthält. Yin und Kollegen zeigten, dass die sno-lncRNAs das alternative Spleißen beeinflussen, möglicherweise, indem sie als molekulare Senke für FOX2 dienen. Das *SNORD116*-Cluster

scheint eine bedeutende Rolle beim PWS zu spielen, da bisher drei Patienten beschrieben wurden, die kleine Deletionen im Bereich des *SNORD116*-Clusters aufwiesen und das klinische Vollbild des PWS oder einen PWS-ähnlichen Phänotyp hatten (Sahoo *et al.* 2008; de Smith *et al.* 2009; Duker *et al.* 2010). Der meist-3'-gelegene Bereich der *SNRPN-downstream*-Transkripte überspannt das *UBE3A*-Gen als *UBE3A-antisense*-Transkript (*UBE3A-AS*), dass die geprägte Expression von *UBE3A* reguliert.

Wie oben beschrieben gibt es zur Rolle der einzelnen paternal exprimierten Gene in der PWS-Ontologie zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Zurzeit geht man davon aus, dass das PWS hauptsächlich durch den Funktionsverlust des *SNORD116*-Clusters verursacht wird, aber dass andere paternal exprimierte Gene ebenfalls zum Phänotyp beitragen oder diesen modifizieren können.

1.2.3 Das geprägte Gen *C15orf2*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion des humanen Gens *C15orf2*. Dieses intronlose Gen wurde im Jahr 2000 aufgrund eines CpG-Islands identifiziert, das auf den Promotor eines Gens hinwies, und konnte damals als ca. 7,5 kbp großes Transkript über Northern-Blot-Analysen in Testis-RNA nachgewiesen werden (Färber *et al.* 2000). *C15orf2* besitzt einen 3,5 kbp großen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der für ein 1156 AS großes Protein codiert. Vor Kurzem wurde die Expression des vorhergesagten Proteins per Western-Blot nachgewiesen und dabei gezeigt, dass *C15orf2* in verschiedenen humanen Hirnregionen exprimiert wird (Wawrzik *et al.* 2010). Dabei wurde das Protein unter anderem im Neokortex und im Hypothalamus detektiert, welcher für die meisten der neurologischen Symptome des PWS verantwortlich gemacht wird (Swaab 1997). *C15orf2* ist das einzige proteincodierende Gen in der PWS/AS-Region, zu dessen Funktion bisher noch nichts bekannt ist. Es wurde allerdings gezeigt, dass *C15orf2* nach transientser Überexpression in humanen Zelllinien im Zellkern lokalisiert ist (Wawrzik *et al.* 2010).

Im Gegensatz zu allen anderen paternal exprimierten Genen in der Region konnte in der ebenfalls gut beschriebenen murinen orthologen Region kein *C15orf2* identifiziert werden. Bisher war nicht bekannt, ob das Gen in Rodentia sekundär verloren gegangen ist, oder ob es erst nach der evolutionären Trennung von Maus und Mensch neu entstanden ist. Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass *C15orf2* während der Primatenevolution einer starken positiven Selektion unterlag (Nielsen *et al.* 2005; Kosiol *et al.* 2008; Wawrzik *et al.* 2010). In der Studie von Nielsen und Kollegen, die anhand des Quotienten von nicht-synonymen SNPs zu synonymen SNPs die positive Selektion in 13.731 Genen von Menschen und Schimpansen

untersucht hat, erreichte *C15orf2* den sechsthöchsten Wert (Nielsen *et al.* 2005). In einer größeren Studie von 2008 befand sich *C15orf2* im Vergleich von ca. 16.500 Genen in sechs Säugergenomen auf dem 106. Platz (Kosiol *et al.* 2008). Vor Kurzem wurde die Möglichkeit einer positiven Selektion von *C15orf2* noch einmal mit einem anderen Ansatz untersucht (Wawrzik *et al.* 2010). Dabei wurden an Material von PWS- und AS-Deletionspatienten experimentelle Haplotypen dreier Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) im ORF und zweier Sequenzlängenpolymorphismen (*short tandem repeats*, STRs) in der 3'UTR von *C15orf2* ermittelt. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, dass der mit 50 % häufigste SNP-Haplotyp (T-G-C) in 92 % der Fälle einen einzigen STR-Haplotypen besaß, obwohl STRs eine um fünf Größenordnungen höhere Mutationsrate besitzen als SNPs. Diese Häufung eines einzigen Haplotyps wurde als weiterer Hinweis für eine fortdauernde positive Selektion gewertet (Wawrzik *et al.* 2010). Die positive Selektion von *C15orf2* weist darauf hin, dass das codierte Protein wichtige Funktionen in der Biologie von Primaten besitzen könnte.

Aufgrund seiner Position in der geprägten Region 15q11q13 ist *C15orf2* ein guter Kandidat für eine Genregulation durch genomische Prägung und tatsächlich wurde vor Kurzem gezeigt, dass *C15orf2* im humanen fetalen Gehirn monoallelisch und ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert wird (Buiting *et al.* 2007; Wawrzik *et al.* 2010). Neben seiner proteincodierenden Funktion enthält *C15orf2* auch ein kleines Cluster von 17 PIWI-interagierenden RNAs (piRNAs), die vor allem im ORF, aber auch in der 3'UTR lokalisiert sind (Girard *et al.* 2006; Royo und Cavaille 2008). Diese Klasse von kleinen, nicht-codierenden RNAs ist Teil eines Abwehrmechanismus, der sich gegen Transposons in der Keimbahn richtet, da diese eine Gefahr für die Integrität des Wirtsgenoms darstellen (Aravin *et al.* 2007; Siomi *et al.* 2011; Ishizu *et al.* 2012). Dabei werden Transposons vermutlich posttranskriptionell durch einen Protein-piRNA-Komplex herunterreguliert. Für die Auswahl der Zielgene kann aber nicht alleine Sequenzkomplementarität verantwortlich sein, da sonst auch die meisten proteincodierenden Gene des Wirtes zum Ziel würden (Ishizu *et al.* 2012). Es wird daher angenommen, dass proteincodierende Gene über einen zusätzlichen Schutzmechanismus verfügen (Ishizu *et al.* 2012). Neben diesem Mechanismus gibt es auch Hinweise, dass piRNAs andere Gene durch Promotormethylierung transkriptionell regulieren können (Rajasethupathy *et al.* 2012). Interessanterweise wies eine Studie darauf hin, dass piRNAs *in trans* an der Etablierung der genomischen Prägung am murinen *Rasgrfl*-Locus beteiligt sind (Watanabe *et al.* 2011). Die Funktion des *C15orf2*-piRNA-Clusters ist dagegen

völlig unbekannt. Royo und Cavaille haben spekuliert, dass die *C15orf2*-piRNAs die Expression des *C15orf2*-Transkripts selbst, entweder transkriptionell oder posttranskriptionell, regulieren könnten. Dies wurde jedoch nicht experimentell belegt (Royo und Cavaille 2008).

1.3 Aufbau und Funktion der Zellkernhülle

Die Zellkernhülle (*Nuclear envelope*) trennt das Innere des Zellkerns, das Nukleoplasma, vom zytoplasmatischen Raum. Obwohl sie manchmal auch als Kernmembran bezeichnet wird, ist dies irreführend, da der Begriff eigentlich zwei Membranen, die innere und die äußere Kernmembran, sowie die Kernporenkomplexe und die auf der nuklearen Seite angelagerte Kernlamina umfasst (Hetzer *et al.* 2005) (Abb. 4).

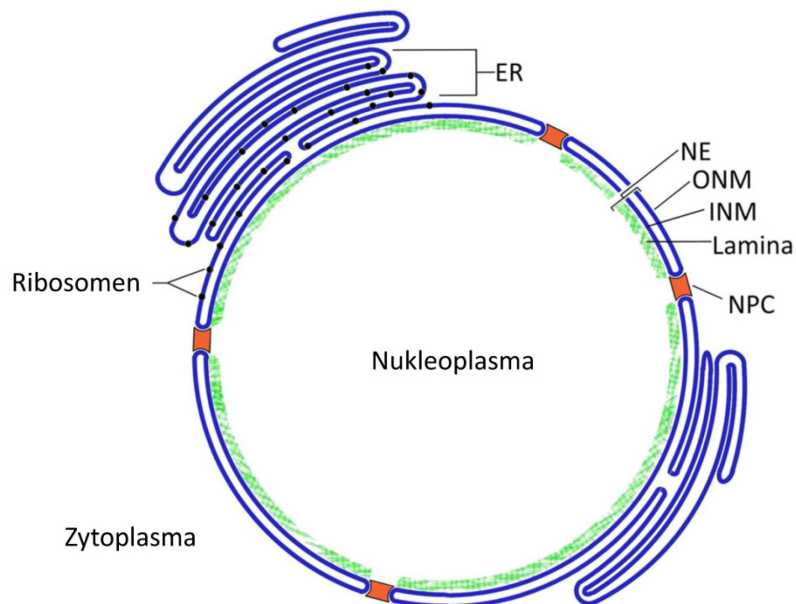


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellkernhülle. NE: Zellkernhülle (*Nuclear envelope*); ONM: Äußere Kernmembran (*Outer nuclear membrane*); INM: Innere Kernmembran (*Inner nuclear membrane*); NPC: Kernporenkomplex (*Nuclear pore complex*); ER: Endoplasmatisches Retikulum. Verändert aus Huber und Gerace (2007).

Die äußere Kernmembran (*Outer nuclear membrane*; ONM) bildet eine Einheit mit dem endoplasmatischen Retikulum und ist diesem in ihrer Zusammensetzung ähnlich (Burke und Stewart 2013). Dagegen besitzt die innere Kernmembran (*Inner nuclear membrane*; INM) eine spezielle Zusammensetzung integrierter Proteine, von denen bisher mehr als 60 bekannt sind (Schirmer *et al.* 2003; Burke und Stewart 2013). Zwischen den beiden Membranen befindet sich ein etwa 40 - 50 nm großer Zwischenraum, der als perinukleärer Raum

bezeichnet wird. Für den Molekültransport zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma besitzt der Zellkern Kernporen, in denen ONM und INM fusioniert sind. In den Fusionsstellen sind Kernporenkomplexe (*Nuclear pore complexes*; NPCs) durch integrale Membranproteine in der Kernhülle verankert (Hallberg *et al.* 1993). NPCs sorgen für den selektiven Transport von Makromolekülen, erfüllen aber auch eine Vielzahl weiterer Funktionen (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010). Die dritte wichtige Komponente der Zellkernhülle ist die Kernlamina, ein Proteingeflecht von nur etwa 15 - 20 nm Dicke, das die innere Oberfläche des Zellkerns auskleidet (Burke und Stewart 2013).

Bei höheren Eukaryoten führt die offene Mitose zu der Notwendigkeit, die Kernhülle während jeder Zellteilung aufzulösen und neu zu generieren (Burke und Ellenberg 2002; Hetzer *et al.* 2005). Beim Kernhüllenzusammenbruch (*Nuclear envelope breakdown*) werden die Kernmembranen aufgebrochen und vermutlich in das endoplasmatische Retikulum absorbiert (Mattaj 2004). Während dieses Vorgangs löst sich die Kernlamina vollständig auf und NPCs werden in kleinere Subkomplexe und lösliche NPC-Proteine zerlegt, die zum Teil selbst in der Mitoseregulation eine Rolle spielen (Hetzer *et al.* 2005). Während der späten Anaphase und Telophase der Mitose reformiert sich die Kernhülle um die Chromosomen. Dabei stellen Interaktionen bestimmter NPC-Subkomplexe mit dem Chromatin und die Rekrutierung von Kernmembran-Vesikeln frühe Prozesse dar, während die Bestandteile der Kernlamina wohl erst nachträglich in die geschlossene Kernhülle importiert werden (Hetzer *et al.* 2005).

1.3.1 Die Kernlamina

Die Lamina besteht in somatischen Zellen von Säugetieren vor allem aus den A-Typ-Laminen Lamin A und Lamin C, die im Menschen durch das *LMNA*-Gen codiert werden, und aus den B-Typ-Laminen Lamin B1 (*LMNB1*-codiert) und Lamin B2 (*LMNB2*-codiert). Die B-Typ-Lamine und Lamin A erhalten als posttranslationale Modifikation eine Farnesylierung, die wohl ihre Affinität zur INM erhöht (Burke und Stewart 2013). Durch proteolytische Spaltung geht diese Modifikation bei Lamin A jedoch rasch wieder verloren. Während A-Typ-Lamine entwicklungspezifisch reguliert sind und in manchen Zelltypen gar nicht vorkommen, sind B-Typ-Lamine ubiquitär exprimiert (Burke und Stewart 2013). Als Typ V-Intermediärfilamente ohne enzymatische Aktivität wurde den Lamin-Proteinen lange hauptsächlich eine stabilisierende Funktion als „Nukleoskelett“ zugesprochen. Mittlerweile ist aber bekannt, dass sie außerdem Auswirkungen auf andere Kernprozesse wie die Chromatinorganisation, die Transkription und die Replikation haben. Diese Funktionen

beruhen auf Interaktionen der Lamine mit anderen Proteinen der Zellkernperipherie und Membranproteinen der INM (Burke und Stewart 2013). Vermutlich entstehen durch unterschiedliche Proteininteraktionen in verschiedenen Zelltypen auch gewebsspezifische Funktionen von Laminen. Dies würde auch den Umstand erklären, dass Mutationen in *LMNA* zu sehr unterschiedlichen humangenetischen Erkrankungen führen können, darunter Hutchinson-Gilford-Progeria-Syndrom, Charcot-Marie-Tooth-Disorder 2B und verschiedenen muskulären Distrophien (Bonne *et al.* 1999; De Sandre-Giovannoli *et al.* 2002; Eriksson *et al.* 2003; Worman und Bonne 2007). In mehreren dieser Syndrome fallen strukturell abnorme Zellkerne auf, in denen die Kernhülle Einstülpungen und Blasen ausbildet (Abb. 5).

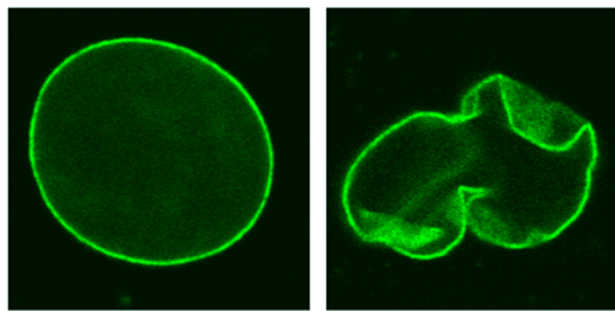


Abbildung 5: Morphologie der Zellkernhülle in gesunden Zellen und in HGPS-Zellen. Links ist die runde Form einer normalen Zellkernhülle gezeigt, rechts die deformierte Kernform von Zellen eines Hutchinson-Gilford-Progerie-Patienten. Die in Grün angefärbte Struktur ist vermutlich die Kernlamina, auch wenn dies in der Quelle nicht eindeutig angegeben ist. Abbildung aus Scaffidi *et al.* (2005).

1.3.2 Der Kernporenkomplex (NPC)

Die NPCs von Vertebraten sind große Protein-Komplexe von ca. 90 - 120 MDa, die an den Kernporen in die Doppelmembran der Zellkerne eingelagert sind (Raices und D'Angelo 2012) (Abb. 6). NPC-Proteine werden als Nukleoporine (NUPs) bezeichnet und normalerweise mit ihrem berechneten Molekulargewicht benannt (Hetzer *et al.* 2005). Die etwa 30 unterschiedlichen NUPs in einem NPC kommen jeweils in mehreren Kopien vor, sodass der Komplex aus einer wesentlich größeren Zahl einzelner Proteine besteht (Cronshaw *et al.* 2002). Da NPCs eine achtzählige Symmetrie aufweisen, kommen die Nukleoporine in Vielfachen von acht vor (Cronshaw *et al.* 2002). Nur ein kleiner Teil der Nukleoporine, darunter das „Pore membrane protein“ von 121 kDa (POM121), sind integrale Membranproteine, während der Großteil des Proteinkomplexes über Protein-Protein-Interaktionen mit anderen NUPs oder der Kernlamina verbunden ist (Hallberg *et al.* 1993; Walther *et al.* 2001). Die augenscheinlichste Funktion des NPCs ist die Regulation des

Molekültransports in beiden Richtungen zwischen Zellkern und Zytoplasma. Hierfür bildet der Proteinkomplex einen zentralen Kanal aus, der kleine Moleküle bis etwa 60 kDa frei diffundieren lässt (Raices und D'Angelo 2012). Makromoleküle wie die meisten Proteine und RNA müssen jedoch über Transportrezeptoren aktiv transportiert werden (Raices und D'Angelo 2012). Dabei wird die Direktionalität über die kleine GTPase Ran hergestellt, die in ihrer GTP-gebundenen Form vor allem im Zellkern vorliegt, in ihrer GDP-gebundenen Form aber im Zytoplasma. Dieser Verteilung liegt wiederum zugrunde, dass der GTP-Austauschfaktor RCC1 ein Bestandteil von Chromatin ist, wohingegen GTPase-aktivierende Proteine wie NUP358/RANBP2 auf der zytoplasmatischen Seite des NPCs vorliegen (Hetzer *et al.* 2005). Viele Einzelheiten des genauen Mechanismus des NPC-Transports sind noch nicht geklärt. Es wurde aber gezeigt, dass FG-Repeat-NUPs für den Transport notwendig sind (Terry und Wente 2007). Ein Netzwerk aus FG-Repeat-reichen, intrinsisch unstrukturierten Protein-Domänen, das den zentralen Kanal ausfüllt, scheint die Diffusion von Makromolekülen sterisch zu verhindern (Hetzer *et al.* 2005; Raices und D'Angelo 2012). Vermutlich kommt es beim Transport zu Konformationsänderungen dieser Domänen, wenn Cargo-beladene Transportrezeptoren an die FG-Repeats binden, so dass der Transport möglich wird (Lim *et al.* 2007).

Jeweils auf der äußeren und inneren Kernseite besitzen NPCs lange Erweiterungen, die sich in das Zytoplasma oder in das Nukleoplasma erstrecken (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010). Diese Erweiterungen werden auf der zytoplasmatischen Seite als zytoplasmische Filamente und auf der Kerninnenseite als nukleärer Korb (*Nuclear basket*) bezeichnet und erfüllen auf beiden Seiten der Kernhülle eine Reihe von Funktionen, die über den Transport von Makromolekülen hinausgehen (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010). Der nukleäre Korb erstreckt sich ca. 60 bis 80 nm in das Nukleoplasma und scheint unter anderem dafür zu sorgen, dass Heterochromatin, welches ansonsten in der Kernperipherie vorherrscht, nicht bis zu den Poren vordringt und den effizienten Molekültransport behindert (Krull *et al.* 2010; Strambio-De-Castillia *et al.* 2010). Dabei erfüllt das Korb-NUP TPR vermutlich eine Barrierefunktion bei der Ausbreitung von Heterochromatin in NPC-assoziierte Regionen der DNA und moduliert dadurch auch die Genexpression von NPC-assoziierten Genen (Krull *et al.* 2010; Vaquerizas *et al.* 2010; Raices und D'Angelo 2012). NUPs des nukleären Korbs sind außerdem an der mRNA-Biogenese und an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010).

Nukleoporene besitzen nur wenige typische Proteinfaltungen. Neben den

Transmembranhelices der membranständigen NUPs sind dies in erster Linie die alpha-Solinoid-Faltung, die aus alpha-Helices besteht, und der beta-Propeller, der mehrere Propellerblätter aus antiparallelen beta-Faltblättern beinhaltet (Devos *et al.* 2006). Eine dritte wichtige Struktur von NUPs sind intrinsisch unstrukturierte Bereiche, die häufig FG-*Repeats* enthalten (Yang 2011). Der NPC ist eine evolutionär alte Struktur, die mindestens seit dem letzten gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten konserviert ist (Baptiste *et al.* 2005). Die Studie von Baptiste und Kollegen zeigte aber, dass nur die strukturell wichtigen Domänen der NUPs hochkonserviert sind, während andere Proteinbereiche sich zum Teil sehr schnell verändern. Dabei unterschied sich die evolutionäre Distanz stark, sowohl zwischen den NUPs als auch innerhalb der orthologen Gruppen zwischen den eukaryotischen Linien. Zudem scheint es auch eine relativ große Anzahl NUPs zu geben, die nicht in allen Eukaryoten konserviert sind. Unter den humanen Membran-NUPs ist GP210 beispielsweise nur in Metazoa und POM121 sogar nur in Vertebraten konserviert (Neumann *et al.* 2010). POM121 scheint außerdem während der Entwicklung des Menschen Funktionen hinzugewonnen zu haben, denn es wird in der Maus von nur einem Gen codiert, kommt aber im Menschen in drei Kopien auf Chromosom 7 vor, die durch komplexe segmentale Duplikationen während der humanen Evolution entstanden sind (Funakoshi *et al.* 2007). Funakoshi und Kollegen zeigten, dass zwei der Kopien, *POM121A* und *POM121C*, exprimiert werden und beide Proteine für die Integrität des NPCs in HeLa-Zellen relevant sind. *POM121* stellt also ein Beispiel für humanspezifische NPC-Evolution dar.

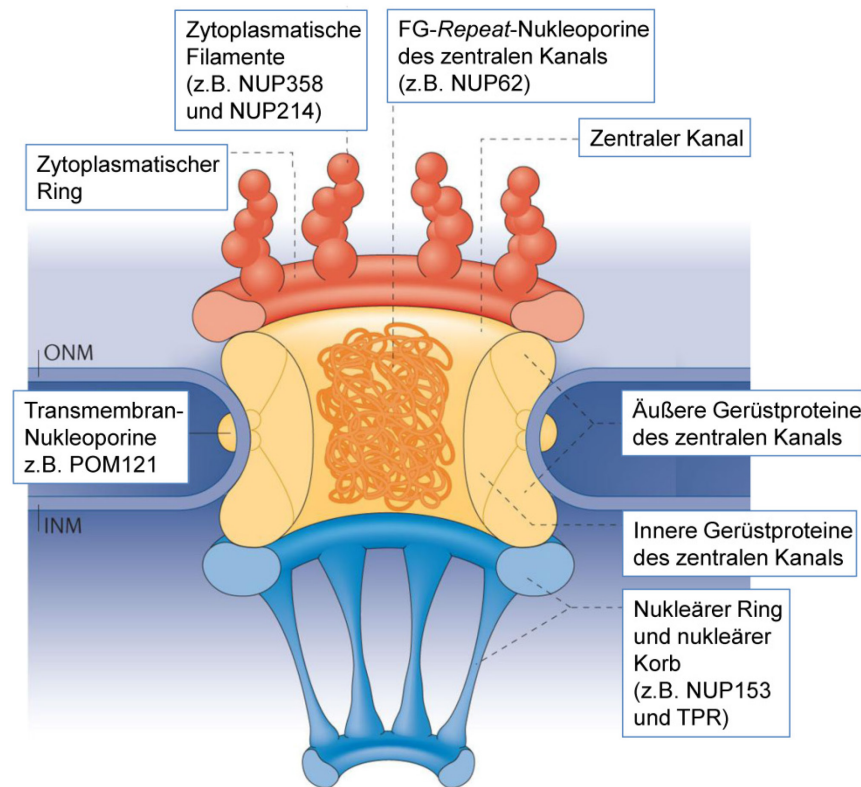


Abbildung 6: Strukturelle Organisation des Kernporenkomplexes. Die Schemazeichnung zeigt die Struktur des Kernporenkomplexes (NPC) im zur Kernhülle senkrechten Querschnitt. Zytoplasmatische Strukturen sind in Rot, nukleäre Strukturen in Blau und der zentrale Transportkanal in Gelb dargestellt. Das gelb-orange Knäuel im zentralen Kanal stellt die intrinsisch unstrukturierten *FG-Repeat*-reichen Domänen der *FG-Repeat*-NUPs dar, die die Selektivität des Molekültransports durch den NPC vermitteln. INM: innere Kernmembran; NUP: Nukleoporin; ONM: äußere Kernmembran; POM121: *Pore membrane protein 121* kDa; TPR: *Translocated promoter region*. Die Abbildung wurde nach Raices und D'Angelo (2012) verändert.

1.4 Retrotransposition

Neue Gene entstehen am häufigsten durch Genduplikation (Kaessmann 2010). Hierfür gibt es neben der segmentalen Genduplikation noch einen weiteren wichtigen Mechanismus, der als Retrotransposition bezeichnet wird. Prozessierte mRNAs können mithilfe eines Systems, das eigentlich der Vermehrung von parasitierenden Retrotransposons im Genom dient, revers transkribiert und dann wieder in das Genom integriert werden (Hollis *et al.* 1982; Karin und Richards 1982; Kaessmann *et al.* 2009). Da den so entstehenden „Retrokopien“ an der Integrationsstelle in der Regel Promotoren und regulatorische Elemente fehlen, werden sie in der überwiegenden Mehrheit der Fälle zu prozessierten Pseudogenen, die nicht exprimiert werden und schließlich Mutationen ansammeln (Abb. 7) (Jeffs und Ashburner 1991; Mighell *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2004). Obwohl Retrogene deshalb mit viel geringerer Wahrscheinlichkeit zu neuen funktionellen Genen werden als segmentale Genkopien, sind sie,

wenn sie doch transkribiert werden, eher prädestiniert, neue Expressionsmuster und Funktionen zu entwickeln (Kaessmann *et al.* 2009). Retrogene liegen häufig auf anderen Chromosomen als ihre ancestralen Gene, während durch segmentale Duplikation entstandene Kopien häufiger direkt benachbart liegen (Kaessmann 2010).

In Säugetieren wird die Retrotransposition von Genen durch *Long interspersed nuclear elements* (LINEs) der L1-Familie ermöglicht, die für eine reverse Transkriptase mit endonucleolytischer Aktivität codieren, welche alternativ zur eigenen RNA auch polyadenylierte mRNA binden kann (Esnault *et al.* 2000). Wegen der hohen Aktivität dieser Elemente kommen Retrotranspositionen in Säugetieren besonders häufig vor (Torrents *et al.* 2003; Vinckenbosch *et al.* 2006; Kaessmann *et al.* 2009). In Vögeln findet dagegen kaum Retrotransposition statt, weil die Enzymmaschinerie des in ihrem Genom häufige LINEs CR1 aufgrund einer anderen Erkennungssequenz keine mRNA erkennt (Kaessmann *et al.* 2009). Auch in der Säugetier-Evolution gab es, vermutlich aufgrund fluktuierender L1-Aktivität, Phasen mit hoher und niedriger Retrotranspositionsrate (Ohshima *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004).

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, wie aus Retrokopien funktionelle Gene werden können. Beispielsweise können Regulationselemente anderer Gene genutzt werden, wenn Retrokopien im Intron eines Wirtsgens integrieren und dann als Fusionstranskript zusammen mit dem Wirtsgen exprimiert werden (Long und Langley 1993; Wang *et al.* 2002). In Abwandlung dieses Mechanismus werden in Säugetieren häufig alternative Transkripte des Wirtsgens beobachtet, die nur nicht-codierende 5'-Exons des Wirtsgens und das Retrogen enthalten (Vinckenbosch *et al.* 2006). So kann die Expression der beiden Gene durch alternative Spleißregulation entkoppelt werden.

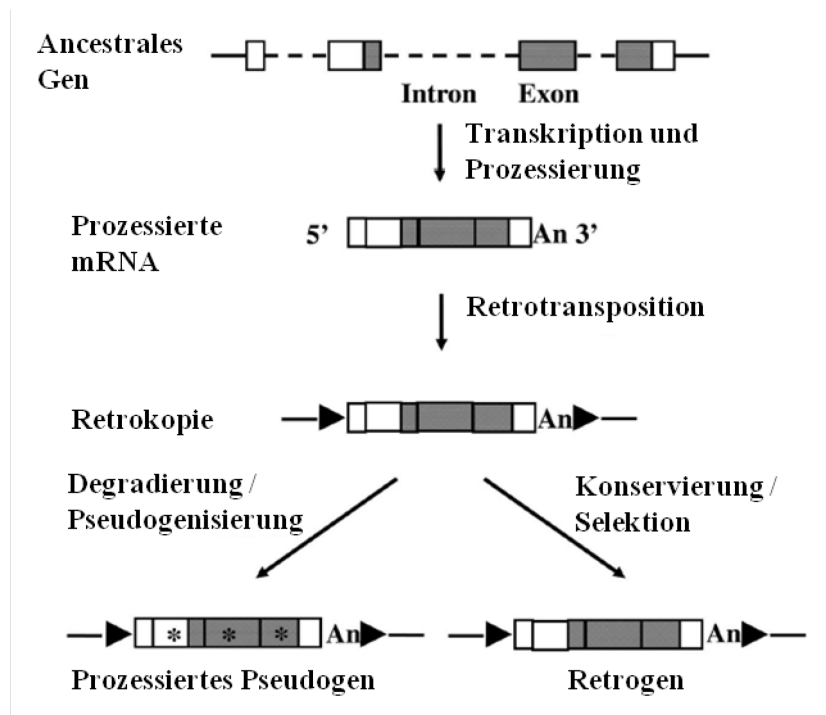


Abbildung 7: Entstehung von Retrogenen und prozessierten Pseudogenen. Die Retrotransposition von mRNAs wird durch die Enzymmaschinerie von Retrotransposons wie LINEs ermöglicht. Die prozessierte mRNA wird nach reverser Transkription zu einem intronlosen Retrogen oder, bei fehlender Expression und Selektion, zu einem prozessierten Pseudogen mit Ähnlichkeit zu den exonischen Bereichen des ancestralen Gens. Abbildung verändert nach Ding *et al.* (2006)

Wenn Retrokopien in der Nähe CpG-reicher Strukturen integrieren, können diese als „Proto-Promotoren“ dienen, da sie häufig die Fähigkeit besitzen, Transkription zu ermöglichen, auch wenn sie vorher nicht mit Genen assoziiert waren (Kaessmann *et al.* 2009). Aus solchen „Proto-Promotoren“ können durch natürliche Selektion vollwertige Promotorelemente entstehen. In Einzelfällen können Retrogene auch Promotoren ihrer ancestralen Gene mitbringen, nämlich dann, wenn das Ursprungsgen alternative Transkriptionsstarts (TSS) besessen hat und das zur Retrotransposition führende Transkript weit genug *upstream* eines alternativen TSS beginnt, um auch grundlegende Promotorelemente zu beinhalten (Kaessmann *et al.* 2009). Im Allgemeinen sind funktionelle Retrogene häufig in der Nähe anderer Gene zu finden, was die Vermutung zulässt, dass auch eine offene Chromatinkonformation und/oder regulatorische Elemente in der Nähe von Genen die Transkription von Retrogenen erleichtern (Vinckenbosch *et al.* 2006).

Sowohl in Säugetieren als auch in *Drosophila* scheint ein großer Anteil der funktionellen Retrogene in Testis exprimiert zu sein (Betran *et al.* 2002; Vinckenbosch *et al.* 2006). Ein Erklärungsansatz hierfür schlägt vor, dass Retrokopien infolge einer Hypertranskription in

Testis auch ohne guten Promotor transkribiert werden und daraufhin gelegentlich vorteilige testisspezifische Funktionen entwickeln, die ihre Evolution zu echten Genen vorantreiben (Kaessmann *et al.* 2009). Der Grund könnte aber auch darin liegen, dass Retrogene bevorzugt in offenes Chromatin integrieren (Fontanillas *et al.* 2007). Da evolutionsrelevante Retrotransposition in der Keimbahn stattfinden muss, wären dadurch Regionen, die in Testis transkriptionell aktiv sind, besonders von Retrotransposition betroffen.

Retrotransposition scheint bemerkenswert oft in geprägten Genen zu resultieren. Die centromerisch lokalisierten intronlosen Gene des humanen 15q11q13-Clusters, *MKRN3*, *MAGEL2* und *NDN*, wurden bereits als Beispiele genannt. Ebenso ist vermutlich das Gen *Frat3/Peg12* durch Retrotransposition in die murine orthologe Region integriert (Chai *et al.* 2001; Cowley und Oakey 2010). Es wurde außerdem eine kleine Gruppe geprägter Gene beschrieben, die von Intron-besitzenden Genen auf dem X-Chromosom abstammen und in Introns von Wirtsgenen integriert sind (Cowley und Oakey 2010). Obwohl die differenzielle Methylierung in diesen Fällen an CpG-Islands im Promotor der Retrogene zu finden ist, wird häufig auch das Wirtsgen allelspezifisch exprimiert. Ein Beispiel für diese Art paarweise regulierter geprägter Gene sind *H13* und das intronlose *Mcts2* im Intron 4 des *H13*-Gens auf dem murinen Chromosom 2 (Wood *et al.* 2007). In diesem Fall werden lange Transkriptformen von *H13* ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert, während auf dem paternalen Allel, auf dem *Mcts2* aktiv ist, alternative Polyadenylierungssignale *upstream* von *Mcts2* genutzt werden (Cowley und Oakey 2013).

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Regulation und evolutionäre Entstehung des *C15orf2*-Gens in der geprägten genomischen Region 15q11q13 zu analysieren und das codierte Protein funktionell zu charakterisieren.

Obwohl die paternale Expression des Gens im fetalen Gehirn bekannt ist, bestehen Unklarheiten bezüglich der differenziellen Methylierung des Promotor-assoziierten CpG-Islands. Da durch die technischen Fortschritte der *Next-Generation*-Sequenzierungstechnologie inzwischen hochauflösende Methylierungsanalysen möglich sind, soll die Methylierung des *C15orf2*-CpG-Islands hier noch einmal in einem unabhängigen Ansatz analysiert werden.

C15orf2 codiert für ein Protein, das bereits in einigen Regionen des zentralen Nervensystems beim Menschen nachgewiesen wurde. Die Funktion dieses Proteins ist allerdings bisher vollständig unbekannt. Da das Gen kein Ortholog in der Maus besitzt, ist es leider nicht möglich, der Genfunktion durch die Generierung einer *Knock-out*-Maus näher zu kommen. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit nach Möglichkeit vergleichende Überexpressions- und *Knock-down*-Experimente in einer humanen *C15orf2*-exprimierenden Zelllinie durchgeführt werden. Die Funktion des Proteins soll außerdem mithilfe bioinformatischer, zellbiologischer und biochemischer Methoden ermittelt werden.

Als Einziges der proteincodierenden, geprägten Gene in der chromosomalen Region 15q11q13 fehlt *C15orf2* in der orthologen Region der Maus. Es wurden allerdings in einigen anderen Säugetieren homologe Sequenzen gefunden, die eventuell *C15orf2*-Orthologe darstellen könnten. Daher soll die evolutionäre Herkunft von *C15orf2* im Rahmen dieser Arbeit analysiert und die Identität der homologen Sequenzen geklärt werden.

3. Material, Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht besonders vermerkt, von den folgenden Firmen in *pro analysis* Qualität bezogen:

Clontech (Heidelberg), Life Technologies (Darmstadt), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (NEB, Frankfurt), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Heidelberg), Thermo Fisher Scientific (Schwerte), Peqlab (Erlangen), BD (Heidelberg), Roche Diagnostics (Mannheim)

3.1.2 Standardlösungen und Medien

TAE:	40 mM	Tris
	0,114%	Essigsäure
	1 mM	EDTA, pH 8,0
DPBS:	Gibco DPBS, no Calcium, no Magnesium (Life Technologies)	
10 x PBS:	1,37 M	NaCl,
	27 mM	KCl,
	18 mM	KH ₂ PO ₄ ,
	101 mM	Na ₂ HPO ₄
		pH 7,4 mit NaOH
20 x SSC:	Invitrogen UltraPure 20 x SSC (Life Technologies)	

Medien für die Kultur von Bakterien

LB-Medium:	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
		pH 7,5 mit NaOH
LB-Agar:		LB-Medium
	1,2 %	Agar
Antibiotika	100 µg/ml Ampicillin	

Medien für die Kultur von Zellen

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	
	2 g/l D-Glukose, 2 g/l NaHCO ₃	

MEM Eagle	Minimum Essential Medium (MEM) Eagle Earle's Salts, 0,292 g/l L-Glutamin, 2,2 g/l NaHCO ₃
Gibco D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4,5 g/l D-Glukose, 0,58 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO ₃
ATCC D-MEM	DMEM mit reduziertem NaHCO ₃ -Gehalt von 1,5 g/l
Opti-MEM [®] I	serumreduziertes Medium
GlutaMAX	besonders stabiler L-Glutamin-Medienzusatz
FKS	fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
Trypsin/EDTA	Verdauungsenzym zum Ablösen adhärenter Zellen
Antibiotika	Penicillin / Streptomycin Zeocin (Invivogen, Toulouse, Frankreich) Blasticidin (Invivogen, Toulouse, Frankreich) Hygromycin (Invivogen, Toulouse, Frankreich) Doxycyclin (Sigma Aldrich)

3.1.3 Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstämme

E. coli DH5 α : F', endA1, hsdR17, (r_k⁻m_k⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal^r), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (Φ 80dlacD(lacZ)M15)

Zelllinien

HeLa	Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms ATCC Number CCL-2, adhären
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie ATCC-Number CRL-1573, adhären
Flp-In [™] -T-REx [™] -293	Zelllinie für die Generierung stabiler Expressionszelllinien Life Technologies Katalog-Nr. R780-07, adhären Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. G. Ryffel
HCN-1A	humane Zelllinie mit Ursprung kortikale Neuronen ATCC-Nummer CRL-10442, adhären
HCN-2	humane Zelllinie mit Ursprung kortikale Neuronen ATCC-Nummer CRL-10742, adhären
LAN-1	Neuroblastomzelllinie; adhären

IMR-5	Neuroblastomzelllinie; adhären
SH-SY5Y	Neuroblastomzelllinie; adhären
D283	Medulloblastomzelllinie; adhären
DAOY	Medulloblastomzelllinie; adhären

Die Neuroblastom und Medulloblastomzelllinien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Schramm (Kinderklinik des Universitätsklinikums Essen). Material der SHEP Neuroblastomzelllinie wurde ebenfalls von Dr. A. Schramm zur Verfügung gestellt und sofort präpariert.

3.1.4 Plasmide

pCMV6-Entry_C15orf2	Expressionsvektor für die Überexpression von <i>C15orf2</i> (OriGene, Cat.No. RC224310)
pcDNA5/FRT/TO [®]	Vektor für die Integration von Genen in Flp-In [™] -T-REx [™] -Zellen (Life Technologies, Cat. No. V6520-20)
FRT-GFP2	pcDNA5/FRT/TO-Kontrollvektor mit integriertem GFP (Lucas <i>et al.</i> 2005), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Ryffel
pCSFLPe	Vektor für die Expression der Flp-Rekombinase (Senkel <i>et al.</i> 2009), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Ryffel

3.1.5 Größenstandards

DNA-Größenmarker:	1 kb DNA Ladder (Life Technologies) pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker (Thermo Fisher Scientific) MassRuler [™] Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) MassRuler [™] DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) Applied Biosystems GeneScan [™] LIZ [™] 500 Size Standard (Life Technologies)
Protein-Größenmarker:	PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) PageRuler Prestained Plus Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

3.1.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer und Sonden, die zum Teil mithilfe der Programme Primer3Plus (<http://primer3plus.com>), Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) und dem Assay-

Design-Center des Roche UPL-Systems (https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=uplct_030000) erstellt wurden, sind im Anhang in Tabelle A1 aufgeführt.

3.1.7 Antikörper

Die Verdünnungen der Antikörper waren anwendungsspezifisch und sind in den Abschnitten 3.2.2.3 und 3.2.8.3 aufgeführt.

3.1.7.3 Primärantikörper

Auftragsanfertigungen der Firma Eurogentec (Köln) durch Immunisierung von Kaninchen

Rabbit-anti-C15orf2 polyclonal antibody Peptidnummer EP073421
Epitop TPQPKFEAPDGQPQK (AS 644-658) des C15orf2 Proteins
Rabbit-anti-C15orf2 polyclonal antibody Peptidnummer EP093563
Epitop KSPEYKRNSRILEDKC (AS 371-386) des C15orf2 Proteins
Rabbit-anti-C15orf2 polyclonal antibody Peptidnummer EP093564
Epitop IPLMSGKRMPDEKPFC (AS 294-309) des C15orf2 Proteins

Andere Primärantikörper

Rabbit-anti-C15orf2 polyclonal antibody, Katalog-Nr. AP8982c (Abgent, San Diego, CA, USA)
Stratagene Mouse-anti-FLAG M2 monoclonal antibody, Katalog-Nr. 200471 (Agilent, Waldbronn)
Mouse-anti-NPC monoclonal antibody Mab414, Katalog-Nr. ab24609 (Abcam, Cambridge, UK)
Mouse-anti-Lamin A/C monoclonal antibody, Katalog-Nr. sc-7292 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)
Mouse-anti-Lamin B₁ monoclonal antibody, Katalog-Nr. 33-2000 (Life Technologies)
Goat-anti-Lamin B₁ polyclonal antibody, Katalog-Nr. sc-6217 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)
Rabbit-anti-GAPDH monoclonal antibody, Katalog-Nr. 2118 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)

3.1.7.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper für die Detektion auf Western-Blots

Goat-anti-Rabbit HRP Conjugated Katalog-Nr. 1858415 (Thermo Fisher Scientific)
Goat-anti-Mouse HRP Conjugated Katalog-Nr. 1858413 (Thermo Fisher Scientific)

Sekundärantikörper für die Detektion in Immunfluoreszenzfärbungen

Goat-anti-Rabbit Cy3, Katalog-Nr. 111-165-003 (Dianova, Hamburg)
Molecular Probes[®] Goat-anti-mouse Alexa Fluor[®] 488 Katalog-Nr. A-11001 (Life Technologies)
Molecular Probes[®] Donkey-anti-mouse Alexa Fluor[®] 594 Katalog-Nr. A-21203 (Life Technologies)
Molecular Probes[®] Donkey-anti-goat Alexa Fluor[®] 488 Katalog-Nr. A-11055 (Life

Technologies)

3.1.8 Gewebe

Post mortem Nervengewebsproben aus dem präfrontalen und temporalen Neokortex von drei Personen stammen aus der Netherlands Brain Bank (NBB; Koordinator: Dr. I. Huitinga) und wurden freundlicherweise von Dr. Johannes van de Nes am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Die NBB hatte Erlaubnis, die Gehirnautopsie durchzuführen und Proben für Forschungszwecke zu entnehmen. Die Proben stammen von Personen im Alter von 62 bis 92 Jahren und wurden bis zu 7 h nach Eintritt des Todes entnommen und anschließend bei -80°C gelagert.

Blutproben für die Präparation von DNA stammen von anonymisierten Blutspendern am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen.

3.1.9 DNA und cDNA

Die für die *Exon-Connection-PCR* verwendete cDNA wurde freundlicherweise von Danuta Galetzka (Institut für Humangenetik, Universitätsklinik Mainz) zur Verfügung gestellt.

Für die Expressionsanalysen am Rind wurde das cDNA Panel BD-010 der Firma Zyagen (San Diego, CA, USA) verwendet, zusammengestellt aus den Proben BD-242 Bovine Brain Caudate Nucleus cDNA, BD-202 Bovine Brain Cerebellum cDNA, BD-210 Bovine Brain Cerebral Cortex cDNA, BD-203, Bovine Brain Hippocampus cDNA, BD-204 Bovine Brain Hypothalamus cDNA, BD-901 Bovine Kidney cDNA, BD-314 Bovine Liver cDNA, BD-413 Bovine Placenta cDNA, BD-102 Bovine Skeletal Muscles cDNA, BD-401 Bovine Testis cDNA sowie genomischer Kontroll-DNA aus Testis.

DNA aus der Milz eines Weißbüschelaffen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Gromoll aus dem Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie der Universität Münster zur Verfügung gestellt. DNA aus fetalem Gehirn wurde von Dr. Danuta Galetzka am Universitätsklinikum Mainz zu Verfügung gestellt (Buiting *et al.* 2007). DNA aus Spermien von PD. Dr. Osman El-Maarii vom Universitätsklinikum Bonn zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine DNA und RNA Methoden

Hier sind DNA- und RNA-Methoden aufgeführt, die häufig verwendet wurden und deshalb in den unten aufgeführten speziellen Methoden nicht genau beschrieben werden.

3.2.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab erfolgte aus 1,5 ml Übernachtskultur einzelner klonaler Bakterienkolonien mit dem „Plasmid Mini Kit“ (Qiagen, Hilden). Eine Kolonie wurde zu 3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum gegeben und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden 4 min bei 2655 x g abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und 4 min Inkubation wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden durch Zugabe von 300 µl Puffer P3 die Zellproteine gefällt. Proteine und Zelltrümmer wurden 15 min bei 20817 x g und 4 °C abzentrifugiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit 500 µl Ethanol absolut versetzt und 20 min bei 17949 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für Plasmid-Präparationen im größeren Maßstab wurde das „Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Hierfür wurde eine Vorkultur in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum für 8 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, 250 ml LB-Medium mit 0,5 ml der Vorkultur inokuliert und diese über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 4424 x g abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 und 4 min Inkubation wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 und 20-minütige Inkubation auf Eis die Zellproteine gefällt. Proteine und Zelltrümmer wurden 30 min bei 17696 x g abzentrifugiert, danach wurde der Überstand noch einmal 10 min bei 6076 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Plasmide wurden über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Dann wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand an die Säule gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei 6076 x g und 4°C zentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst.

Isolation von genomischer DNA mit dem Flexigene-Kit (Qiagen, Hilden)

Für die Präparation von DNA aus Blut wurde das Flexigene-Kit von Qiagen nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Dabei wurden 3 ml EDTA-Blut zu 7,5 ml FG1-

Puffer gegeben und fünfmal invertiert. Die Zellkerne wurden 5 min bei 2000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 1,5 ml FG2-Puffer mit Proteinase K homogenisiert. Nach zehnmütiger Inkubation im 65 °C Wasserbad wurde die DNA durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol gefällt. Die DNA wurde für 3 min bei 2000 x g zentrifugiert und das Pellet in 1,5 ml 70 % Ethanol gewaschen (3 min 2000 x g). Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 300 µl FG3-Puffer aufgenommen. Zum Lösen wurde die DNA 1 h bei 65 °C im Heizblock inkubiert und anschließend über Nacht auf einem Taumel-Rollenmischer bewegt.

Isolation von genomischer DNA mit der BioRobot EZ1 Workstation (Qiagen, Hilden)

Für die Isolation von genomischer DNA aus Zellkulturen wurde das Tissue Kit der BioRobot EZ1 Workstation nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, dann mithilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS aufgenommen und im Roboter platziert. Die Aufreinigung funktionierte vollautomatisch durch magnetische Perlen, welche DNA in Anwesenheit chaotroper Salze an ihre Oberfläche binden. Die an die Magnetperlen gebundene DNA wurde in Waschschritten von den übrigen Zellbestandteilen getrennt und anschließend in 50 µl Elutionspuffer von den Perlen gelöst.

Isolation von RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden)

Die Präparation der RNA aus Zellkultur erfolgte mit dem RNeasy Kit. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mithilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS aufgenommen und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700 µl Puffer RLT mit 1 % Beta-Mercaptoethanol resuspendiert, in eine QIAshredder Säule überführt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde das homogenisierte Lysat mit einem Volumen 70 % Ethanol gemischt, in eine RNeasy Spin Säule pipettiert und 1 min bei 8000 x g an die Säule gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen (15 sec, 8000 x g). An dieser Stelle wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen. Dazu wurden 3 U DNaseI in 70 µl Puffer RDD auf die Säule gegeben und bei 25 °C für 15 min inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurde die Säule wieder mit 350 µl Puffer RW1 und anschließend mit 500 µl Puffer RPE gewaschen (jeweils 15 sec 8000 x g). Anschließend wurde die Säule nochmals mit 500 µl Puffer RPE für 2 min bei 8000 x g gewaschen und Ethanolrückstände durch einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit entfernt. Die RNA wurde in 30 - 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert, sofort auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Isolation von genomischer DNA und RNA mit dem Allprep Kit (Qiagen, Hilden)

Die DNA- und RNA-Präparation aus Hirngewebe wurde mit dem Allprep Kit nach den Empfehlungen des Herstellers, jedoch mit leichten Abänderungen, durchgeführt. Mit dieser Methode konnte sichergestellt werden, dass DNA und RNA aus demselben Gewebestück stammten, was für die vergleichende Analyse von DNA-Methylierung und RNA-Expression sinnvoll war. Hierzu wurden zunächst 20 - 30 mg des Gewebestücks auf Trockeneis abgeschnitten und in gefrorenem Zustand in ein Lysing Matrix D Gefäß (MP Biomedicals Eschwege) überführt. Das Gewebestück wurde mit 600 µl Puffer RLT / 1% Beta-Mercaptoethanol überschichtet und 45 sec auf der höchsten Stufe in einem Savant FastPrep FP 120 Cell Disruptor (Thermo Fisher Scientific) mechanisch aufgebrochen. Das homogenisierte Gewebe wurde in eine QiaShredder Säule überführt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wurde noch einmal 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um noch verbliebene unlösliche Komponenten abzutrennen, und der Überstand wurde in eine AllPrep DNA Spin Säule pipettiert. Durch 30-sekündige Zentrifugation bei 8000 x g wurde die DNA an die Säule gebunden. Diese wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C verwahrt. Aus dem Durchfluss wurde die RNA aufgereinigt. Dazu wurde das Lysat mit 430 µl Ethanol absolut gemischt, in eine RNeasy Spin Säule pipettiert und 25 sec bei 8000 x g an die Säule gebunden. Ein DNase-Verdau sowie die weitere Aufreinigung der RNA erfolgten wie für das RNeasy-Kit beschrieben (s.o.). Für die Aufreinigung der genomischen DNA wurde die DNA-Säule für 15 sec bei 8000 x g mit 500 µl Puffer AW1 gewaschen und anschließend für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit mit 500 µl Puffer AW2 gewaschen. Um Pufferreste zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Die DNA wurde mit 100 µl auf 70 °C erhitztem Puffer EB für 2 Minuten inkubiert und bei 8000 x g für 1 min eluiert.

3.2.1.2 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte normalerweise mit Random-Hexameren als Primer, für den Nachweis des Poly-A-Schwanzes von *C15orf2* jedoch mit Oligo-dT Primern. Da *C15orf2* ein intronloses Gen ist und DNA-Kontaminationen deshalb besonders kritisch wären, wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau mit dem RQ1 Kit (Promega) unmittelbar vor der reversen Transkription durchgeführt. Die RNA wurde hierzu mit 1 U/µg RQ1 RNase-Free DNase und 1 x RQ1 Reaktionspuffer in 10 µl Endvolumen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 µl RQ1 DNase Stop Solution zu jedem Ansatz pipettiert und die Reaktion für 10 Minuten bei 65 °C terminiert. Für die reverse Transkription

wurde die RNA (typischerweise 0,2 – 1 µg) unaufgereinigt aus der RQ1-Reaktion verwendet. Es wurde das Applied Biosystems® GeneAmp® RNA PCR Kit (Life Technologies) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt neben der RNA 1 U RNase Inhibitor, je 1 mM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 3 mM MgCl₂, 2,5 µM Random-Hexamere/Oligo-dT und 2,5 U Reverse Transkriptase (MuLV) in einem Endvolumen von 20 µl. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler durch 10 min Annealing bei 21 °C, 15 min reverse Transkription bei 42 °C und 5 min Denaturierung bei 99 °C. Kontrollreaktionen ohne reverse Transkriptase wurden standardmäßig mitgeführt. Um die RNA auf DNA-Kontaminationen zu überprüfen, wurde zudem standardmäßig eine Kontroll-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1.3) mit intronüberspannenden Primern für das Haushaltsgen *ACTB* durchgeführt, die von DNA ein größeres Produkt als von RNA ergibt (Tabelle A1 Primer 1-2).

3.2.1.3 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation bestimmter Sequenzen von DNA oder cDNA erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis *et al.* (1986). Im Normalfall wurde dafür die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Roche) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt dabei *Template*-DNA (typischerweise bei genomischer DNA 50 - 100 ng und bei cDNA bis zu 1 µg), 3 mM MgCl₂, jeweils 150 µM dNTPs, 0,4 µM je Primer, 1 x PCR-Puffer und 1 - 2 U Polymerase in einem Endvolumen von 25 - 50 µl. In der Regel wurden 35 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 sec, Primer-Annealing (mit Primer-spezifischer Temperatur) für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 1 min durchgeführt. Da die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase eine Aktivierungsphase benötigt, wurde vor dem ersten Zyklus eine Denaturierungsphase von 10 min bei 95 °C eingefügt. Nach dem letzten Zyklus folgte eine finale Elongationsphase von 7 min bei 72 °C. Für GC-reiche Sequenzen, die in der Standard-PCR Probleme verursachten, wurde eine PCR mit Betain und 7-deaza-dGTP durchgeführt. Betain gleicht den Schmelztemperatur-Unterschied zwischen AT und GC Basenpaaren an (Rees *et al.* 1993). 7-deaza-dGTP reduziert nach Einbau die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Bindungen zu Cytosin. Der Reaktionsansatz enthielt 200 ng *Template*-DNA, 0,5 M Betain (Fluka), 0,5 µl dNTPs mit 60% (v/v) 7-deaza-dGTP (2,4 mM 7-deaza-dGTP (Roche), 1,6 mM dGTP, 4 mM dCTP, 4 mM dATP, 4 mM dTTP (Fischer 2006)), 3 mM MgCl₂, 0,4 µM je Primer, 1 x PCR-Puffer und 5 U Polymerase in einem Endvolumen von 25 µl. Für besonders lange Sequenzen (ab etwa 2,5 kb) wurde das Expand Long Range dNTPack Kit (Roche) nach Anweisungen des Herstellers (Startprotokoll) verwendet.

3.2.1.4 Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-Time PCR werden die generierten PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Amplifikation gemessen. Dadurch kann die relative Ausgangsmenge einer Zielsequenz ermittelt werden. Für die benötigten fluoreszenzmarkierten Sonden wurde auf die Universal Probe Library (UPL) (Roche) zurückgegriffen, wobei zielgenspezifische Assays (Primer und Sonde) mit dem Assay-Design-Center des Roche UPL-Systems (www.roche-applied-science.com) entworfen wurden. Die Sonden sind jeweils mit einem Reporter- und einem Quencher-Farbstoff markiert, wobei die Fluoreszenz des Reporters im Spektrum der Absorption des Quenchers liegt. Durch den Abbau der Sonden während der PCR steigt das Fluoreszenz-Signal proportional zum generierten PCR Produkt. Der PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz einen gesetzten Schwellenwert übersteigt, wird als Threshold Cycle (Ct)-Wert angegeben. Ein Realtime-PCR Ansatz enthielt 0,3125 μM UPL-Sonde, je 1 μM Primer und 1x TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 μl . PCR und Fluoreszenzmessung erfolgten in einem LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche). Die Datenanalyse wurde nach der Delta-Delta-Ct-Methode („Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR“ von Applied Biosystems (Foster City, USA, http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf) durchgeführt. Dabei wurde nach der Expression des Haushaltsgens *GAPDH* (Delta-Ct) und einem Standardwert (Delta-Delta-Ct) normalisiert.

3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von negativ geladenen DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Minigele aus 1 - 2 % Agarose in 1 x Puffer TAE und 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der zu unterscheidenden DNA-Fragmente, wobei kleine Fragmente (um 100 bp) über 2 %, mittlere Fragmente (um 500 bp) über 1,5 % und große Fragmente (um 1 kbp) über 1 % Agarose aufgetrennt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 1 x DNA-Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 – 120 Volt in TAE-Laufpuffer mit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid. Das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid ermöglichte es, die DNA auf einem Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) sichtbar zu machen. Die absolute Größe der DNA-Fragmente wurde mithilfe von Größenstandards (siehe 3.1.5) abgeschätzt.

3.2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Elution aus Agarosegelen

Wenn eine PCR-Reaktion schwache Nebenprodukte lieferte, die beim weiteren Arbeiten mit dem Hauptprodukt stören würden, wurde das Hauptprodukt über eine Gelelution mit dem „MinElute Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers, jedoch mit leichten Änderungen. DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Das Agarosegelstück wurde im dreifachen Gelvolumen Puffer QC für 10 min bei 50 °C aufgelöst. Anschließend wurde die DNA mit einem Gelvolumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation von 1 min bei 10.000 x g an eine MinElute-Säule gebunden. Die Säule wurde 1 min bei 10.000 x g mit 500 µl Puffer QC gewaschen. Dann wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und 2 min stehen lassen, um störende Salze zu binden. Die Säule wurde für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert und anschließend noch einmal in einem neuen Auffanggefäß leer zentrifugiert (2 min, 10.000 x g). Danach wurden Ethanol-Rückstände vorsichtig vom unteren Rand der Säule abpipettiert, ohne die Membran zu berühren, und die Säule für 15 min offen stehen gelassen, um Ethanolrückstände auf der Membran verdunsten zu lassen. Die DNA wurde in zwei Elutionsschritten von je 10 µl H₂O eluiert (20 µl Elutionsendvolumen). Dabei wurde auf 50 °C erwärmtes Wasser jeweils eine Minute mit der Membran inkubiert und dann 1 min bei 10.000 x g in ein sauberes Reaktionsgefäß abzentrifugiert.

Aufreinigung mit dem „High pure PCR Purification Kit“ (Roche)

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten oder Restriktionendonuklease-Verdaus mit dem „High Pure Purification Kit“ nach den Angaben des Herstellers wurde die Reaktion auf 100 µl Volumen gebracht, mit 500 µl Binding Puffer gemischt und in eine High Pure Filter-Säule pipettiert. Die Säule wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend erst mit 500 µl, dann mit 200 µl Wash Puffer gewaschen (1 min, maximale Geschwindigkeit). Dann wurde die DNA in 50 µl Elution Puffer für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit eluiert. Unmittelbar vor der Konzentrationsbestimmung der DNA (siehe 3.2.1.7) wurde die Lösung noch einmal für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Glasfasern aus dem Filter zu pelletieren, und der Überstand für die Messung verwendet.

Aufreinigung durch ExoSAP

Wenn die Spezifität der PCR ausreichend war, wurden PCR-Produkte mit USB[®] ExoSAP-IT[®] PCR Product Cleanup[®] (Affimetrix) nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei werden Primer und Nukleotide degradiert, es kommt aber zu keinerlei Verlust an doppelsträngigen PCR-Produkten. Ein Reaktionsansatz mit 5 µl PCR-Produkt wurde mit 2 µl ExoSAP-Reagenz 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das ExoSAP-Reagenz 15 min bei 80 °C inaktiviert. Für die direkte Sequenzierung nach Sanger (siehe 3.2.1.8) wurden spezifische PCR-Produkte ohne jede Aufreinigung eingesetzt.

3.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch mit einem NanoDrop[®] ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte (OD) gemessen. Bei DNA entspricht eine OD bei 260 nm (OD_{260}) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Bei reiner DNA sollte der Quotient OD_{260} / OD_{280} etwa 1,8 betragen. Bei RNA entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml. Bei reiner RNA sollte der Quotient OD_{260} / OD_{280} zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.2.1.8 Sanger-Sequenzierung

Normalerweise erfolgte die Sequenzierung von DNA nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode (Sanger *et al.* 1977). Dabei wird ein einzelner sequenzspezifischer Primer nichtzyklisch verlängert bis durch den Einbau von Didesoxynukleotiden ein Kettenabbruch erfolgt. Die basenspezifisch fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide sind in einer solchen Konzentration beigemischt, dass der Kettenabbruch während der Reaktion an jeder Position des zu sequenzierenden Fragments auftreten wird. Durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente und gleichzeitige Fluoreszenzmessung kann die DNA-Sequenz anschließend in einem automatischen Sequenziergerät ermittelt werden. Für die Sequenzreaktion wurde das Applied Biosystems BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus bis zu 500 ng DNA, 0,5 µM Primer und 2 - 4 µl BigDye[®] in einem Endvolumen von 10 µl. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler in 25 Zyklen von Denaturierung (10 s bei 96 °C), Annealing (5 s mit Primer-spezifischer Temperatur) und Elongation (4 min bei 60 °C). Die Produkte wurden über eine Sephadex Gelfiltration (GE Healthcare, München) aufgereinigt, um freie Didesoxynukleotide zu entfernen. Vor der elektrophoretischen Auftrennung mit einem ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) wurde die DNA mit Formamid versetzt. Die Analyse der

Sequenzen erfolgte mit den Programmen Applied Biosystems Sequencing Analysis 5.3.1 (Life Technologies) und Geneious (Biomatters, Auckland, Neuseeland).

3.2.2 Allgemeine Protein Methoden

Hier sind Methoden aufgeführt, die für die Arbeit mit Proteinen häufig verwendet wurden und in den unten aufgeführten speziellen Methoden nicht genauer beschrieben sind.

3.2.2.1 Proteinaufreinigung aus kultivierten Zellen

Zur Präparation von Gesamtzell-Proteinen aus Zellkulturen wurden adhärent gewachsene Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mithilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert und das Pellet in Gesamtzellextrakt- (*Whole-Cell-Extract*-, WCE-) Puffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Danach wurde das Lysat bei allen Schritten auf Eis gekühlt. Zur vollständigen Lyse der Zellen und zur Fragmentierung der DNA wurden die Zellen mit einem Branson Sonifier[®] Ultraschall Cell Disruptor mit 3 mm Mikrospritze für 10 s bei 50 % Einschaltdauer und 30 % Ausgangsleistung homogenisiert. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 3,3 µl des Überstandes wurden zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford mit 1 ml „Coomassie Plus Protein Assay Reagent“ (Thermo Fisher Scientific) versetzt, invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde mit einem Pharmacia Ultraspec 2000 UV/VIS Spectrophotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer auf gleiche Weise erstellten BSA-Eichkurve berechnet.

WCE Puffer	30 mM Tris-HCL, pH 8 0,42 M NaCl 0,5 mM EDTA 20 % Glycerol 1x Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific)
------------	--

3.2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte über diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Denaturierende 7,5 % Polyacrylamidgelle wurden in Mini-Gel-Apparaturen (BIO-RAD, München) gegossen. Pro Spur wurden 10 - 40 µg Protein mit 1 x SDS-Probenpuffer in 10 - 20

µl Volumen für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel.

Tabelle 1: 7,5 % SDS-Polyacrylamid Gel (für 2 Mini-Gele)

	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese [®] Gel 30 (Roth)	0,65 ml	2 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	-
ddH ₂ O	3,1 ml	4 ml
20 % SDS	25 µl	40 µl
10 % Ammoniumpersulfat	25 µl	40 µl
TEMED	10 µl	20 µl

SDS-Laufpuffer:	0,125 M	Tris
	0,2 M	Glyzin
	0,1 %	SDS
4x SDS-Probenpuffer:	250 mM	Tris-HCl pH 6,8
	8 %	SDS
	40 %	Glycerin
	0,4 M	DTT
		Bromphenolblau

3.2.2.3 Western-Blot

Für die Antikörperdetektion wurden Proteine per Western-Blot aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte nach dem Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Firma BIO-RAD, München). Dazu wurden auf der Graphit-Anode der Reihe nach ein Stück Whatman-Papier (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD, München), ein Stück Amersham Hybond-C Extra Membran (GE Healthcare, München), das Protein-Minigel und ein weiteres Stück Whatman-Papier aufgeschichtet. Alle Komponenten wurden im Vorhinein mit Transfer-Puffer durchtränkt und während des Schichtens luftblasenfrei gehalten. Der Transfer erfolgte bei 20 Volt für 1 h. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend in TBST Puffer überführt und zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau-Lösung gefärbt. Wenn Teile der Membran mit mehreren unterschiedlichen Antikörpern

gefärbt werden sollten, wurde die Membran an dieser Stelle entsprechend geteilt. Anschließend wurde die Membran mit TBST wieder entfärbt und mit Blocklösung für 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert, um Bindungsstellen für Proteine auf der Membran abzusättigen. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf einer Teflonplatte mit dem Primärantikörper inkubiert. Dabei wurden die Antikörper in Blockpuffer folgendermaßen verdünnt: Rabbit-anti-C15orf2-EP073421 1:5000, Rabbit-anti-C15orf2-AP8982c 1:1000, Mouse-anti-FLAG 1:2500, Mouse anti-NPC-Mab414 1:1000, Mouse anti-Lamin B₁ 1:100 und Rabbit anti-GAPDH 1:5000. Die Membran wurde dreimal mit TBST gewaschen und für 1 h bei RT auf einer Teflonplatte mit dem Meerrettich-Peroxidase- (HRP-) konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Dabei wurden die Antikörper in Blockpuffer 1:1000 verdünnt. Die Membran wurde wieder dreimal mit TBST gewaschen und dann mit dem „Super Signal West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Fisher Scientific) für 5 min entwickelt. Die Detektion erfolgte entweder mit Super RX Röntgenfilmen (Fujifilm, Düsseldorf) und Entwicklerlösungen (AGFA Healthcare) oder mit einem Intas Chemilumineszenz-Imager und dem Programm Chemostar Professional (Intas, Göttingen). Die Expositionszeiten variierten von 5 sec bis 20 min. Wenn Western-Blot-Bandenintensitäten quantifiziert wurden, wurde die Quantity One[®] Software (BioRad) verwendet.

Transfer-Puffer:	48 mM	Tris
	39 mM	Glyzin
	0,035 %	SDS
	15 %	Methanol
TBST:	10 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,05 %	Tween-20
Blockpuffer:	5 %	Magermilchpulver in TBST

3.2.3 Zellkultur

Die humanen Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor Gebrauch sterilisiert.

3.2.3.1 Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden auf Trockeneis transportiert und im 37 °C Wasserbad zügig aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Zellen in ein 15

ml-Kulturröhrchen überführt und mit 9 ml vorgewärmten Kulturmedium versetzt.

Die Zellen wurden für 5 min bei 150 x g sedimentiert, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und je nach Zellzahl in eine 25 cm² oder 75 cm² Kulturflasche überführt. HEK293-, HeLa- und Flp-In-T-REx293-Zelllinien wurden in Gibco-DMEM mit 10 % FKS und Penicillin-Streptomycin kultiviert. Flp-In-T-REx293-Zelllinien wurden zudem mit den Selektionsantikörpern Zeocin (100 µg/ml) und Blasticidin (15 µg/ml) kultiviert. Flp-In-T-REx293 Zelllinien mit integriertem Transgen (siehe Abschnitt 3.2.7.3) wurden mit Hygromycin (100 µg/ml) und Blasticidin kultiviert. HCN-1A und HCN-2 wurden mit ATCC-DMEM mit 10 % FKS und Penicillin-Streptomycin kultiviert. Neuroblastomzelllinien und die Medulloblastomzelllinie DAOY wurden mit RPMI-Medium mit GlutaMAX Medienzusatz, 10 % FKS und Penicillin-Streptomycin kultiviert. Die Medulloblastomzelllinie D293 wurde in MEM-Eagle Medium mit 10 % FKS und Penicillin-Streptomycin kultiviert.

3.2.3.2 Kultivierung der Zellen

Das Zellkulturmedium wurde alle 2 – 3 Tage erneuert, indem es von den adhären Zellen abgesaugt und frisches, vorgewärmtes Medium hinzugegeben wurde. Die Zelllinien wurden grundsätzlich bei Erreichen von Konfluenz passagiert, wobei sich die Höhe einer Passage nach Erfahrungswerten mit dem Wachstum der Zelllinie richtete. HEK293 und Flp-In-T-REx293-Zelllinien wurden bei einer Zelldichte von etwa 1×10^7 Zellen pro 75 cm² Zellkulturflasche (Nunc) 1:10 bis 1:20 passagiert. Die kortikalen Zelllinien HCN-1A und HCN-2 wuchsen extrem langsam und wurden maximal 1:3 passagiert. Das Kulturmedium wurde hierfür von den adhären Zellen abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und zum Ablösen etwa 5 min bei 37 °C mit 1 - 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden die abgelösten Zellen in mindestens dem vierfachen Volumen FKS-haltigem Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 150 x g sedimentiert, das Pellet in frischem Kulturmedium gründlich resuspendiert und auf Zellkulturflaschen verteilt. Für die neuronale Differenzierung von SH-SY5Y wurden die Zellen 14 Tage lang mit 25 µM Retinsäure in DMSO behandelt. Dabei wurde das Kulturmedium täglich gewechselt. Kontrollzellen wurden parallel mit DMSO behandelt.

3.2.3.3 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie zum Passagieren trypsinisiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 6 ml frisch angesetztem Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde

zünftig auf sechs Nunc CryotubeTM Röhren (Thermo Fisher Scientific) verteilt und über Nacht in einem Isopropanolbad langsam auf – 80 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

3.2.4 Bioinformatische Methoden

Datenbanksuchen

Für die Proteinsequenzanalyse wurde eine Signaturerkennungssuche mit der InterProScan-Software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>, (Quevillon *et al.* 2005) gemacht. Diese Analyse wurde von Prof. Dr. Daniel Hoffmann, Abteilung für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die Ähnlichkeit zu anderen Proteinfamilien wurde außerdem mit NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) analysiert. Dabei wurde der BLASTp Algorithmus unter Einbezug aller humanen Proteinsequenzen verwendet.

Für die evolutionären Analysen wurden die NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit dem megaBLAST-Algorithmus und die UCSC-Genombrowser-Datenbank (genome.ucsc.edu) mit dem BLAT-Algorithmus durchsucht. Wenn die *C15orf2*-Gensequenz als Suchanfrage verwendet wurde, wurde der LTR am 3'Ende abgeschnitten, um unspezifische Treffer zu vermeiden.

Strukturvorhersagen

Für die Vorhersage von Transmembrandomänen wurde die Website SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) (Hirokawa *et al.* 1998) verwendet. Die Wahrscheinlichkeit für intrinsisch ungeordnete Regionen innerhalb der *C15orf2* Proteinsequenz wurde mithilfe des Programms Disopred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/>) und die Sekundärstruktur mit dem Programm Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) vorhergesagt (Ward *et al.* 2004).

Alignments

Alle Sequenzalignments wurden mit der Geneious Pro Software (Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland), Versionen 5.6 - 6.2 erstellt.

Das Protein-Alignment von *C15orf2* und POM121 wurde mit dem ClustalW-Alignment-Tool mit Standardeinstellungen für Aminosäuresequenzen erstellt. Hierfür wurden alle Isoformen der beiden humanen POM121 Proteine (POM121A und POM121C) mit *C15orf2 aligned*. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden in Abbildung 11 nur die jeweils längsten Isoformen dargestellt.

Paarweise und multiple DNA-Alignments wurden mit dem Geneious-Alignment-Tool oder dem ClustalW-Alignment-Tool in Geneious mit Standardeinstellungen für DNA-Alignments erstellt.

ORF-Analysen

Intronlose ORFs wurden mit der „Find ORFs“-Option in der Geneious Pro Software, Versionen 5.6 - 6.2 (Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland), mit Standard genetischem Code und Startcodon ATG gefunden. Vorhersagen intronenthaltender Gene wurden mit der GENSCAN-Software (genes.mit.edu/GENSCAN.html) mit Standardeinstellungen gemacht.

Generierung des phylogenetischen Baumes

Der *Maximum-Likelihood* phylogenetische Baum wurde von Nathalie Feiner aus der Abteilung für Evolutionsbiologie der Universität Konstanz mit dem Programm MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) unter Verwendung der eingebetteten Alignment-Software MUSCLE (Edgar 2004) und dem Aminosäuresubstitutionsmodell JTT + Γ_4 generiert.

3.2.5 Fragmentlängenanalyse

Um die basenpaargenaue Länge von PCR-Produkten zu ermitteln, wurde eine GeneScan™ Analyse durchgeführt. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion (3.1.2.3) durchgeführt, in der einer der verwendeten Primer an seinem 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM™) fluoreszenzmarkiert war. Die markierten PCR-Produkte wurden mit einem ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer und der GeneScan™ Analyse-Software analysiert und mit dem Programm GeneMarker V1.95 (Soft Genetics, State College, PA, USA) dargestellt.

3.2.6 Methylierungsanalyse

3.2.6.1 Bisulfitbehandlung von DNA

Eine Bisulfitbehandlung von DNA bewirkt, dass alle nicht-methylierten Cytosine an der C4-Position desaminiert und so in die RNA-Base Uracil umgewandelt werden. 5-Methylcytosine sind durch ihre Methylgruppe vor dieser Reaktion geschützt und werden nicht umgewandelt. Wird anschließend eine PCR mit der Bisulfit-behandelten DNA als *Template* durchgeführt, so wird dabei Uracil durch Thymin ersetzt. Die entstehenden C/T-Ambivalenzen zwischen methylierten und nicht-methylierten DNA-Sequenzen können zur Analyse des Methylierungsstatus genutzt werden. Für die Bisulfitbehandlung mit anschließender Sequenzierung auf dem 454 GS Junior-System (Roche) wurde das EZ DNA Methylation-

Gold™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Dieses hatte sich in Etablierungsarbeiten bei der Analyse von differenziell methylierten Regionen als am zuverlässigsten erwiesen (Jasmin Beygo, persönliche Kommunikation). Für jede Reaktion wurde CT Conversion Reagent frisch hergestellt, indem das Konzentrat mit 900 µl ddH₂O, 300 µl M-Dilution Puffer und 50 µl M-Dissolving Puffer für 10 min auf einem Roller gelöst wurde. Je 500 ng genomische DNA in 20 µl Volumen wurden mit 130 µl CT Conversion Reagenz gemischt und im Thermocycler für 10 min bei 98 °C und dann für 2,5 h bei 64 °C inkubiert. Anschließend wurden auf einer Zymo-Spin IC Säule 600 µl M-Binding Puffer vorgelegt, mit der Probe gemischt und für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde die Säule mit 100 µl M-Wash Puffer gewaschen (30 sec, maximale Geschwindigkeit). Um verbliebene Sulfonsäuregruppen an Cytosinen zu entfernen, wurden 200 µl M-Desulphonation Puffer auf die Säule gegeben, diese 15 min bei RT inkubiert und für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde noch zweimal mit 200 µl M-Wash Puffer gewaschen und anschließend mit 10 µl M-Elution Puffer eluiert.

3.2.6.2 Bisulfit PCR für das hochauflösende Sequenzieren

PCRs für die 454 GS Junior-Sequenzierung wurden mit dem HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt wie in Beygo *et al.* (2013) beschrieben. Dafür wurden Bisulfit-spezifische Primer mit 5'-Tag-Sequenzen verwendet, welche in fw- und rev-Primern jeweils unterschiedlich waren (Tabelle A1, Primer 14-19). Ein Reaktionsansatz enthielt 1 µl Bisulfit DNA, 0,2 µM von jedem Primer und 1 x Hotstar Master Mix in 25 µl Gesamtvolumen. Nach 15 min initialer Denaturierung wurden 35 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 sec, Primer-Annealing (mit Primer-spezifischer Temperatur) für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 1 min durchgeführt, gefolgt von einer abschließenden Elongation für 10 min bei 72 °C. Im Anschluss wurde mit den spezifischen Produkten eine Re-PCR durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer (Roche) waren spezifisch für die Tag-Sequenzen der primären Primer und besaßen außerdem probenspezifische Barcode-Sequenzen (Multiplex identifiers, MIDs) und universale Linker-Sequenzen des 454-Systems. Der Reaktionsansatz enthielt 3 - 5 µl PCR-Produkt, 0,2 µM von jedem Primer und 1x Hotstar Master Mix in 25 µl Gesamtvolumen und wurde nach 15 min initialer Denaturierung bei 95 °C in 35 Zyklen bei 95°C für 30 sec und 72 °C für 1 min und einer finalen Elongation für 7 min bei 72 °C im Thermocycler inkubiert. Die Spezifität der Re-PCR wurde anschließend per Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.1.5) kontrolliert. Wenn Primerdimere oder schwache unspezifische Banden von

mehr als 100 bp vorhanden waren, wurde eine Gelelektion des spezifischen Produktes vorgenommen (siehe Abschnitt 3.2.1.6).

3.2.6.3 Probenvorbereitung für den 454 GS Junior

Die Probenvorbereitung wurde durch Melanie Heitmann am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Für die GS Junior-Sequenzierung wurden PCR-Produkte mit dem Agencourt[®] AMPure[®] XP System (Beckman Coulter, Krefeld) nach den Empfehlungen von Roche aufgereinigt (Roche Amplicon Library Preparation Method Manual). Für die Sequenzanalyse wurden die an ihren MIDs zu unterscheidenden Amplikons verdünnt, vereinigt und in einer Emulsions-PCR nach den Vorgaben des Herstellers clonal amplifiziert (Roche emPCR Amplification Method Manual - Lib-A). Diese Produkte wurden auf dem GS Junior-System nach Angaben des Herstellers analysiert.

3.2.6.4 Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde das von Prof. Dr. Sven Rahmann (Lehrstuhl für Genominformatik des Universitätsklinikums Essen) entwickelte Programm Amplikyzer verwendet. Diese Software befindet sich im Beta-Stadium und wurde bisher noch nicht in einer Veröffentlichung ausführlich beschrieben. Der Quellcode der Software ist auf der Google Code-Homepage verfügbar (amplikyzer.googlecode.com). Das Programm sortiert die im GS Junior-System generierten Sequenzen nach ihren MIDs, generiert Sequenz-Alignments und filtert diese nach Qualitätsmaßstäben, wie z.B. Sequenzanzahl pro Alignment. Aus diesen Daten wurden mit demselben Programm auch Darstellungen der Methylierungsmuster generiert und diese, wo möglich, anhand von SNPs nach Allelen sortiert.

3.2.7 Methoden zur Generierung einer *C15orf2*-Expressionszelllinie

Eine mit Doxycyclin induzierbare *C15orf2*-Expressionszelllinie wurde mithilfe des Flp-In[™] T-REx[™] Core Kits (Invitrogen) gemäß den Empfehlungen des Herstellers generiert. Die dabei verwendete Flp-In[™] 293 T-REx-Zelllinie leitet sich von der HEK293 Zelllinie ab (Ward *et al.* 2011).

3.2.7.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Um Bakterien für die Vermehrung von Plasmid-DNA nutzen zu können, mussten sie zunächst chemisch kompetent gemacht werden. Die Herstellung kompetenter Zellen wurde durch Dr. Stephanie Gkalympoudis am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Hierzu wurden *E. coli* Bakterien auf LB-Agar ohne Antibiotika ausgestrichen

und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Mit einer Einzelkolonie wurden dann 10 ml b-Medium inokuliert und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm inkubiert bis eine OD₅₅₀ von 0,3 erreicht war. Aus dieser Vorkultur wurden 5 ml in 100 ml b-Medium überführt und dieses wieder im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm kultiviert bis eine OD₅₅₀ von 0,48 erreicht war. Die Zellen wurden zu je 25 ml aliquotiert und bei 4 °C und 3000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde jedes Pellet in 10 ml TfbI-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder bei 4°C und 3000 rpm für 15 min abzentrifugiert und jedes Pellet in 1 ml TfbII-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

b-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 0,5 % MgSO ₄ pH 7,6 mit KOH
TfbI Puffer	0,9 mM Kaliumacetat 10 mM RbCl 0,1 mM CaCl ₂ 2,5 mM MnCl ₂ 2,25 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure
TfbII Puffer	0,1 mM MOPS 5,625 mM CaCl ₂ 0,1 mM RbCl 2,25 % (v/v) Glycerin pH 7,6 mit KOH

3.2.7.2 Klonierung des pcDNA5/FRT/TO-C15orf2-Vektors

Klonierungsstrategie

Für die Klonierung des *C15orf2*-Integrationsvektors wurde der FLAG-markierte offene Leserahmen von *C15orf2* aus dem Expressionsvektor pCMV6_entry_C15orf2 (OriGene Cat. No. RC224310 (Wawrzik *et al.* 2010) ausgeschnitten, indem das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *PmeI* verdaut wurde. Dadurch blieben die Ribosomenbindestelle und die Kozak-Sequenz aus pCMV6_entry_C15orf2 erhalten. Das Insert wurde *blunt-end* zwischen die beiden *PmeI* Schnittstellen des pcDNA5/FRT/TO Vektors kloniert, um das unmittelbar *downstream* des FLAG-Tags liegende Stopp-Codon in der *PmeI*-Schnittstelle funktional zu erhalten. Da der Verdau mit *KpnI* einen 3' Überhang generiert, musste dieser vor der Ligation mit Mungbohnen-Nuklease, die einzelsträngige

DNA verdaut, entfernt werden.

Restriktionsendonukleaseverdau

Für den Restriktionsendonukleaseverdau wurden 5 - 30 µg Plasmid-DNA mit 2 U/µg Enzym und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Für die Gewinnung des Inserts wurden 20 µg pCMV6_entry_C15orf2 zunächst mit *KpnI* verdaut und der gesamte Ansatz anschließend mit 20 U Mungbean Nuclease (NEB) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das geöffnete Plasmid mit dem High Pure PCR Purification Kit aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.1.1) und dann mit *PmeI* verdaut und per Gelelektion aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.1.6). Um den pcDNA5/FRT/TO-Vektor zu öffnen, wurden 5 µg des Vektors mit *PmeI* verdaut. Dann wurde der Vektor per Gelelektion aufgereinigt und mit 5 U Fermentas FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert.

Ligation

Die Ligation wurde mit der T4 DNA Ligase (Promega, Mannheim) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 3 U Ligase, 1 x Ligationspuffer sowie Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:10 in einem Gesamtvolumen von 10 µl und wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Transformation und Überprüfung der Klone

Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente Bakterienzellen transformiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde zu 50 µl Bakterien gegeben, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock von 2 min bei 42 °C ausgesetzt. Nach 2 min auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 450 µl LB-Medium gemischt und 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Erhaltene Kolonien wurden auf das korrekte Konstrukt hin getestet, indem ihre DNA mit einer Minipräparation (siehe Abschnitt 3.2.1.1) isoliert und mit Restriktionsendonukleaseverdau und Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.1.5) überprüft wurde. Positive Klone wurden zusätzlich mit den Primern p1en47 und pen21 sequenziert (siehe Abschnitt 3.2.1.8 und Anhang Tabelle A1 Nr. 3-4). Der fertige Vektor pcDNA5/FRT/TO_C15orf2 wurde anschließend durch eine Maxipräparation (siehe Abschnitt 3.2.1.1) des positiven Klons in ausreichender Menge gewonnen.

3.2.7.3 Herstellung der T-REx293-C15orf2-Zelllinie

Transfektion

Zur Herstellung der induzierbaren Expressionszelllinie wurden $1,2 \times 10^5$ FlpIn-T-REx293 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und zwei Tage in DMEM ohne Selektionsantibiotika kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Flp-Rekombinase-Vektor pCSFLPe und entweder pcDNA5/FRT/TO_C15orf2 oder dem GFP-Konstrukt FRT-GFP2 als Positivkontrolle oder pCMV6_entry_C15orf2 als Negativkontrolle in einem Verhältnis von 9:1 transfiziert (je 2 Wells). Für die Transfektion wurde das Reagenz Fugene HD (Roche) nach Empfehlungen des Herstellers verwendet. Insgesamt 1 µg DNA wurde mit der dreifachen Menge Fugene HD in 100 µl Optimem verdünnt und in das Kulturmedium gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen trypsinisiert und jedes Well auf zwei 10 cm Schalen mit DMEM ohne Selektionsantibiotika verteilt, so dass die Zellen bis zum Beginn der Selektion nicht mehr als 25 % Konfluenz erreichten.

Selektion

Nach weiteren 24 h wurde das Medium gegen frisches DMEM mit 100 µg/ml Hygromycin und 15 µg/ml Blasticidin gewechselt. Die Zellen wurden mit 2 - 3 Medienwechseln pro Woche unter konstanter Selektion kultiviert bis auf den Hygromycin-sensitiven Kontrollplatten keine Zellen mehr vorhanden waren. Positive Klone wurden anschließend zusammengeführt und die Zelllinien (T-REx293-C15orf2 und T-REx293-GFP) unter beständiger Hygromycin- und Blasticidin-Selektion kultiviert.

Qualitätskontrolle

Die fertigen Zelllinien wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers auf Zeocin-Sensitivität und auf das Fehlen von beta-Galactosidase-Aktivität hin überprüft. Für den Zeocin-Test wurden die Zellen mit 100 µg/ml Zeocin kultiviert bis alle Zellen auf der Platte abgestorben waren. Als Kontrolle wurden die Zeocin-resistenten Flp-In-T-REx293 Zellen mitgeführt. Für den beta-Galactosidase-Test wurden 3×10^5 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 h kultiviert (ca. 70 % Konfluenz). Dabei wurde als Kontrolle auch die Flp-In-T-REx293 Zelllinie mitgeführt, in der 100 % der Zellen beta-Galactosidase-Aktivität besitzen. Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 500 µl Fixierlösung für 10 min inkubiert und wieder mit PBS gewaschen. Dann wurden die fixierten Zellen mit 1 ml Färbelösung für 2,5 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Blau-gefärbte Zellen wurden unter

einem Invers-Mikroskop ausgezählt und nur solche Zelllinien wurden ausgewählt, die weniger als 5 % blaue Zellen aufwiesen. Die ausgewählte C15orf2-Expressionszelllinie T-REx293-C15orf2 hatte weniger als 1 % blaue Zellen.

Zur Expression der Transgene wurden T-REx293-C15orf2- und T-REx293-GFP-Zellen mit 1 µg/ml Doxycyclin für 24 - 48 Stunden induziert. Die GFP-Kontrollzelllinie wurde mit einem Invers-Fluoreszenzmikroskop auf Expression des GFP-Proteins hin überprüft. Im Anschluss wurde die C15orf2-Überexpression per quantitativer Realtime-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1.4) und Western-Blot (siehe Abschnitt 3.2.2.3) kontrolliert.

Fixierlösung	1 x	PBS
	1 %	Formaldehyd
	0,2 %	Glutaraldehyd
Färbelösung	1 x	PBS
	5 mM	Kaliumferricyanid $K_3(Fe\ CN_6)$
	5 mM	Kaliumferrocyanid $K_4(Fe\ CN_6)$
	2 µM	MgCl ₂
	1 mg/ml	X-Gal in Dimethylformamid

3.2.8 Immunfluoreszenz

3.2.8.1 Fluoreszenzmikroskopie / Konfokale Mikroskopie

Aussäen von Zellen

Für die Immunfluoreszenz mit konfokaler Mikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie wurden autoklavierte runde Deckgläschen (Ø 18 mm, Thermo Scientific) auf eine 12-Well-Platte verteilt und 1×10^5 T-REx293-C15orf2-Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 µg/µl Doxycyclin (oder Wasser als Kontrolle) induziert und 48 h kultiviert.

Für die Antikörperfärbung wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet:

Immunfluoreszenz mit Methanol-Fixierung

Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit Immunfluoreszenz-Puffer (I-Puffer) geblockt. Die Primärantikörper wurden in I-Puffer verdünnt. Die Zellen wurden mit 200 µl Primärantikörperverdünnung überschichtet und mindestens 1 h inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit I-Puffer gewaschen und im Dunkeln für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen zur DNA-Färbung mit 1 µg/ml DAPI in I-Puffer für 30 min im Dunkeln

inkubiert. Anschließend wurden die Präparate zur Konservierung auf 15 µl Molecular Probes[®] ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Life Technologies) invertiert und über Nacht im Dunkeln erhärten lassen.

I-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7
	100 mM	NaCl
	0,05 %	Tween 20
	0,5 %	BSA (Fraktion V)

Immunfluoreszenz mit Paraformaldehyd-Fixierung

Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit 0,5 % Triton-X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert, wieder gewaschen und mit PBG für mindestens 1 h geblockt. Primärantikörper wurden in PBG verdünnt und als 100 µl Tropfen auf Parafilm vorgelegt. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden auf die jeweiligen Antikörpertropfen invertiert und 1 – 1,5 h in einer befeuchteten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in 6-Well-Platten mit PBS dreimal gewaschen und auf die gleiche Weise im Dunkeln für 1 h mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Nach dreimal Waschen wurde die DNA auf die gleiche Weise mit 1 µg/ml DAPI in PBG gefärbt. Die Deckgläschen wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und dann auf 15 µl Molecular Probes[®] ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Life Technologies) invertiert und über Nacht im Dunkeln aushärten lassen.

PBG	2%	Gelatine
	0,5%	BSA (Fraktion V) in PBS

Mikroskopie

Die Präparate wurden auf einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan) analysiert oder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP5) mit einem 63x/1.4 Öl-Immersion Objektiv von Leica gescannt. Die Co-Lokalisation von C15orf2 und Komponenten der Zellkernhülle wurden mit der ImarisColoc Software (Bitplane) analysiert. Dabei wurde der Mander's Koeffizient mit 100 multipliziert als prozentuale Co-Lokalisation eines Kanals mit dem anderen gewertet (Imaris V 6.4 Reference Manual).

3.2.8.2 3D-strukturierte Illuminationsmikroskopie

3D-strukturierte Illuminationsmikroskopie (3D-SIM) ist eine Methode, um mit

fluoreszenzmikroskopischen Mitteln das Abbe-Limit des sichtbaren Lichts zu umgehen, welches zu einer grundsätzlichen Auflösungsgrenze von 200 - 400 nm führt. Dies wird erreicht, indem das anregende Licht auf unterschiedliche Weise strukturiert wird und dadurch unterschiedliche Interferenzmuster mit dem Objekt bildet. Durch die Rekonstruktion mehrerer nacheinander aufgenommener Einzelbilder kann so eine laterale Auflösung von etwa 100 nm erreicht werden. Methodisch bedingt sind schwimmende, bewegliche Teile in den Mikroskopiepräparaten bei der 3D-SIM besonders kritisch. Um Verunreinigungen oder Mikroorganismen in den Präparaten zu vermeiden, wurden deshalb alle für die Fixierung und Antikörperfärbung verwendeten Lösungen sterilfiltriert und nur unter einer Sterilbank geöffnet. Das steril bezogene DPBS wurde am Versuchstag frisch geöffnet. Antikörper, die hoch verdünnt werden sollten, wurden aus ökonomischen Gründen nicht sterilfiltriert, sondern stattdessen für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, um Aggregate zu sedimentieren. Die Antikörperverdünnung wurde dann vom Überstand in sterilfiltriertem SIM-Blockpuffer angesetzt. Bei der Probenvorbereitung für die 3D-SIM wurde nach Schermelleh *et al.* (2008) verfahren. Änderungen zum ursprünglichen Protokoll stammen zum Großteil aus der Laborerfahrung der Arbeitsgruppe Cremer an der Universität München (Yolanda Markaki und Marion Cremer, persönliche Kommunikation). 5×10^4 T-REx293-C15orf2-Zellen wurden auf Ethanol-sterilisierten LH22.1 Präzisionsdeckgläschen (Roth) in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Doxycyclin oder Wasser (Kontrolle) behandelt und weitere 48 h kultiviert. Am Versuchstag, bei einer Konfluenz von maximal 50 – 70 %, wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen, 15 min lang mit 2 % Paraformaldehyd in DPBS fixiert und anschließend dreimal mit 0,05 % Tween-20 in DPBS (PBST) gewaschen. Um die Autofluoreszenz des Präparats zu reduzieren, wurden die fixierten Zellen für 5 min mit 20 mM Glycin in DPBS behandelt (*Quenching*). Dann wurde wieder zweimal in PBST gewaschen und anschließend mit 0,5 % Triton X-100 in DPBS für 10 min permeabilisiert. Vor der Antikörperfärbung wurden die fixierten Zellen mit SIM-Blockpuffer für 1,5 h geblockt. Die Immunfärbung mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte für 1 h in SIM-Blockpuffer durch Invertieren auf 100 μ l Tropfen Antikörperverdünnung auf Parafilm. Zwischen den Inkubationen wurden die Präparate viermal mit SIM-Blockpuffer gewaschen. Ein Spezialfall war die Co-Immunfärbung mit dem direkt fluoreszenzmarkierten Mab-414-Antikörper (siehe Abschnitt 3.2.8.4). In diesem Fall musste die Antikörperfärbung in drei Schritten erfolgen. Erst wurde mit dem Mouse-anti-FLAG Antikörper inkubiert, dann, nach viermaligem Waschen, mit dem Goat-anti-mouse

Alexa Fluor 594 Sekundärantikörper inkubiert und anschließend, nach sechsmaligem Waschen, mit dem Alexa Fluor 488-markierten Mouse-anti-NPC-Mab414 Antikörper inkubiert. Nach der Antikörperfärbung wurden die Präparate sechsmal mit SIM-Blockpuffer und zweimal mit PBST gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in DPBS für 10 min nachfixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBST wurden die Präparate zur DNA-Färbung mit 5 µg/ml DAPI in PBST für 12 min inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend noch fünfmal mit DPBS gewaschen und dann auf VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK) mittig auf gereinigte Objektträger invertiert. Da VECTASHIELD® Mounting Medium nicht aushärtet, wurden die Deckgläschen mit Nagellack fixiert und abgedichtet. Die 3D-SIM wurde an einem DeltaVision OMX V3 Prototyp (Applied Precision) in München von Dr. Yolanda Markaki, Abteilung Biologie II, Universität München durchgeführt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Fiji (<http://fiji.sc/>).

SIM-Blockpuffer :	2 %	BSA (Fraktion V)
	0,5 %	Fischhautgelatine
	0,01 %	Tween-20
		in DPBS

3.2.8.3 Antikörperverdünnungen

Für die Co-Immunfluoreszenz von C15orf2 und dem NPC wurden der Rabbit-anti-C15orf2 - AP8982c Antikörper (1:100) und der Mouse-anti-NPC-Mab414 Antikörper (1:500) oder der Mouse-anti-FLAG-M2 Antikörper (1:750) und der direkt Alexa Fluor 488-markierte Mouse-anti-NPC-Mab414 Antikörper (1:25) verwendet (siehe 3.2.8.4). Für die Co-Immunfluoreszenz von C15orf2 und der Kernlamina wurden der Rabbit-anti-C15orf2-AP8982c Antikörper (1:100) und der Mouse-anti-Lamin A/C Antikörper (1:100) oder der Mouse-anti-FLAG-M2 Antikörper (1:750) und der Goat-anti-Lamin B₁ Antikörper (1:100) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden für die Fluoreszenzmikroskopie und die konfokale Mikroskopie Goat-anti-rabbit-Cy3 (1:200) und Goat-anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:400) verwendet. Für die 3D-SIM wurden Goat-anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:1000), Donkey-anti-mouse Alexa Fluor 594 (1:300) und Donkey anti-goat Alexa Fluor 488 (1:300) verwendet.

3.2.8.4 Direkte Fluoreszenzmarkierung des Mab-414-Antikörpers

Da die verfügbaren hochaffinen Antikörper gegen den FLAG-Tag und gegen den NPC beide aus der Maus stammten und deshalb nicht für die Co-Immunfluoreszenz mit Sekundärantikörpern geeignet waren, wurde für die 3D-SIM-Analyse der Mouse-anti-NPC-

Mab414 Antikörper mit einer direkten Fluoreszenzmarkierung versehen. Dafür wurde das Molecular Probes[®] Alexa Fluor[®] 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Life Technologies) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Es wurden 10 µg Mouse-anti-NPC-Mab414 in 100 µl Volumen mit 10 µl 0,1 M Bicarbonat gemischt und zu dem reaktiven Fluoreszenzfarbstoff gegeben. Durch einstündige Inkubation bei RT mit gelegentlichem Invertieren wurde der Farbstoff gelöst und an die Antikörper gebunden. Für die Aufreinigung wurde eine mitgelieferte Säule vorbereitet, indem ca. 1,5 ml Component C (Aufreinigungs-Granulatlösung) hineinpipettiert wurden und die Flüssigkeit, zuerst durch Gravitation und Druck (mit einer Spritze), dann durch Zentrifugation für 3 min bei 1100 x g, entfernt wurde. Danach wurde die Antikörperlösung auf die Säule gegeben und für 5 min bei 1100 x g eluiert. Da die Fluoreszenz nach der ersten Markierungsprozedur noch nicht ausreichend war, wurde der Antikörper in einer zweiten Runde ein weiteres Mal fluoreszenzmarkiert.

3.2.9 Zentrifugale Gegenfluss-Elutriation

Zentrifugale Gegenfluss-Elutriation (*counterflow centrifugal elutriation*, CCE) ist eine Methode, um Zellen auf Basis ihrer Sedimentationseigenschaften, die in erster Linie von der Zellgröße abhängen, aufzutrennen (Kauffman *et al.* 1990). Die Größe der Zellen ist während der logarithmischen Wachstumsphase proportional zum DNA-Gehalt. Dadurch sedimentieren in einer Zentrifugationskammer, in der Sedimentationskraft und Gegenfluss im Gleichgewicht gehalten werden, solche Zellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden, eher unten. Zellen in der S-Phase befinden sich in der Mitte und G1-Zellen eher oben. Durch schrittweises Verringern der Drehzahl wird der Gegenfluss erhöht und die Zellen in Fraktionen, beginnend mit den kleinsten Zellen, aus der Kammer gespült (<http://www.science.uva.nl/research/mc/web%20protocollen/2-3-2.htm>). Da die metabolischen Funktionen der Zellen mit dieser Methode nur minimal beeinträchtigt werden, eignet sich die Methode gut für die Isolation von Zellzyklus-synchronen Zellen (Kauffman *et al.* 1990). Um synchronisierte Populationen Doxycyclin-induzierter T-REx293-C15orf2-Zellen zu gewinnen, wurden $1 - 2 \times 10^8$ Zellen durch Trypsin-Behandlung geerntet und in 100 ml Zellkulturmedium (DMEM) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die Trennungskammer der Elutriationszentrifuge (Beckman Coulter, Avanti-J-20XP) geladen, in der eine konstante Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt wurde, während die Drehzahl von 2500 rpm auf 1800 rpm reduziert wurde. Auf diese Art wurden die Zellen nach ihrer Größe sortiert und in Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend per Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting,

FACS) durch Tamara Mußfeld und Dr. Emil Mladenov aus dem Institut für Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Essen analysiert. Fraktionen mit überwiegenden Anteilen von Zellen in der G1-, S- oder G2- Phase des Zellzyklus wurden jeweils zur Analyse ausgewählt. Von den Zellfraktionen wurden Proteine isoliert und die C15orf2-Expression per Western-Blot (siehe Abschnitt 3.2.2.3) analysiert. Die Bandenintensitäten wurden mit dem Programm Quantity One[®] (BioRad) quantifiziert. Für Immunfluoreszenzanalysen (siehe Abschnitt 3.2.8.1) wurden die synchronisierten Zellen außerdem auf poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und eine Stunde zum Adhärenieren inkubiert.

3.2.10 Fraktionierung von Zellkernhüllen

3.2.10.1 Isolation von Zellkernen

Für die Fraktionierung der Kernhülle wurden Zellkerne benötigt, deren innere und äußere Kernmembran intakt waren. Daher konnten für die Zellyse keine Detergenzien verwendet werden. Für die Zellkernisolierung wurden 1×10^6 T-REx293-C15orf2-Zellen pro 150 mm Schale in 20 Zellkulturschalen ausgesät, nach 48 h mit 1 µg/ml Doxycyclin behandelt und für weitere 48 h inkubiert. Die Isolierung intakter Zellkerne erfolgte per Ultrazentrifugation durch ein Saccharose-Kissen (Matunis 2006). Die Zellen wurden hierfür in 90 ml eiskalten Puffer A aufgenommen und mit 30 Stößen in einem Dounce Homogenisierer geschert. Dabei wurde ein Pistill mit so geringem Abstand zur Gefäßwand verwendet, dass die Zellkerne gerade noch unbeschädigt bleiben. Die Zellkernsuspension wurde auf sechs Zentrifugengefäße aufgeteilt und bei 800 x g für 20 min zentrifugiert. Jedes Pellet wurde dann in 10 ml eiskaltem Puffer A resuspendiert und mit 20 ml eiskaltem Puffer B durch Invertieren gemischt. In sechs Beckman SW28 Rotor Gefäße wurden je 5 ml Puffer B vorgelegt und mit der Zellkernsuspension überschichtet. Durch einstündige Zentrifugation bei 27.000 rpm in einem Beckman SW28 Rotor (ca. 141.000 x g) und 4°C wurden die Zellkerne von Zellmembranresten und Cytoplasmabestandteilen, sowie dem mit der äußeren Kernmembran verbundenen endoplasmatischen Retikulum abgetrennt. Das Zellkernpellet wurde in Puffer A resuspendiert, gezählt und mikroskopisch auf die Abwesenheit von Zellkernaggregaten hin kontrolliert. Anschließend wurden die Zellkerne in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Puffer A	0,25 M	Saccharose
	50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	25 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
	1x	cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)
Puffer B	2,3 M	Saccharose
	50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	25 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
	1x	cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)

3.2.10.2 Isolation und Subfraktionierung der Kernhüllen

Für die Kernhüllenfraktionierung wurde ein Protokoll von Cronshaw und Kollegen angewandt (Cronshaw *et al.* 2002; Matunis 2006). Die T-REx293-C15orf2-Zellkerne wurden zügig in einem 30° C Wasserbad aufgetaut und für 1 min bei 800 x g und 4°C pelletiert. Unter Vortexen wurde das Pellet in 1 ml frisch angesetztem Lysepuffer resuspendiert und dann sofort tropfenweise unter Vortexen mit 4 ml Extraktionspuffer 8,5 versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellkerne mikroskopisch kontrolliert und sollten als durchsichtige große Schemen (*Nuclear Ghosts*) vorliegen. Die Suspension wurde mit 4 ml eiskaltem Saccharose-Kissen unterlegt und 15 min bei 4000 x g und 4°C mit einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer 7,5 unter Vortexen resuspendiert und sofort mit 0,5 ml eiskaltem Extraktionspuffer 7,5 mit 0,3 mg/ml Heparin (Sigma, H3393) versetzt. Die Suspension wurde mit 4 ml eiskaltem Saccharose-Kissen unterlegt und wie vorher zentrifugiert. Das Pellet, das jetzt aus angereicherten Kernhüllen bestand, wurde in 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer 7,5 unter Vortexen resuspendiert und sofort mit 0,5 ml eiskaltem Extraktionspuffer 7,5 mit 3 % TNX-100 (Sigma, T9284) und 0,075 % SDS versetzt. Die Suspension wurde mit 4 ml eiskaltem Saccharose-Kissen unterlegt und wie vorher zentrifugiert. Das Pellet, das jetzt der Lamina-NPC-Fraktion entsprach, wurde in 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer 7,5 mit 0,3% Empigen BB (Calbiochem, 324690) gründlich resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 15.000 x g und 4°C wurde die Lamina sedimentiert, während NPC-Komponenten im Überstand verblieben. Für die SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.3.2) wurde das Pellet in 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und der Überstand mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt. Pro Spur wurde eine Proteinmenge aufgetragen, die 3 U (9×10^6) Zellkernen entsprach.

Lysepuffer	0,1 mM 1 mM 1 x 5 µg/ml 5 µg/ml	MgCl ₂ DTT cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche) DNase I (Sigma, DN-EP) RNase A (Sigma, R5125)
Extraktionspuffer 7,5	10 % 20 mM 0,1 mM 1 mM 1 x	Saccharose Triethanolamin (pH 7,5) MgCl ₂ DTT cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)
Extraktionspuffer 8,5	10 % 20 mM 0,1 mM 1 mM 1 x	Saccharose Triethanolamin (pH 8,5) MgCl ₂ DTT cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)
Saccharose-Kissen	30 % 20 mM 0,1 mM 1 mM 1 x	Saccharose Triethanolamin (pH 7,5) MgCl ₂ DTT cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)

3.2.11 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur mRNA-Detektion

Die mRNA-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (mRNA-FISH) wurde wie in Herold *et al.* (2001) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden Cy3-markierte (dT)₅₀-Oligonukleotide (Genelink, Hawthorne, NY, USA) als Sonden verwendet. T-REx293-C15orf2-Zellen wurden in 12-Well-Platten mit Deckgläschen ausgesät, induziert und Paraformaldehyd-fixiert wie in Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben. Für die mRNA-FISH wurden die Deckgläschen auf 100 µl Tropfen Hybridisierungspuffer auf Parafilm invertiert und über Nacht bei 37 °C in einer befeuchteten Kammer inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd in PBS refixiert und eine Immunfluoreszenz-Färbung mit Paraformaldehydfixierung angeschlossen wie in Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben.

Hybridisierungspuffer	2 x 20 % 10 % 0,2 % 1 mg/ml 5 mM 0,1 pmol/ml	SSC Formamide Dextransulfat BSA Total Yeast tRNA Ribonucleoside-Vanadyl-Komplex (New England Biolabs) Oligo(dT) ₅₀
-----------------------	--	---

3.2.12 Genexpressionsanalyse per Microarray

Für die Genexpressionsanalyse wurden jeweils drei technische Replikate von T-REx293-C15orf2-Zellen mit Doxycyclin oder Wasser behandelt. Je 6×10^5 Zellen wurden in 100 mm Schalen ausgesät, nach 72 h mit 1 µg/ml Doxycyclin oder Wasser behandelt und weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen) isoliert (siehe Abschnitt 3.2.1.1). 200 ng Gesamtzell-RNA wurde für die Arrayanalyse mit dem Ambion® WT Expression Kit (Life Technologies) in biotinylierte cDNA konvertiert, aufgereinigt und fragmentiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit Human Gene ST 1.0 Microarrays (Affymetrix, High Wycombe, UK). Die Microarrays wurden nach den Empfehlungen des Herstellers gewaschen und angefärbt und dann mit einem GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix) mit G7 Upgrade analysiert. Die Microarray-Analyse und die statistische Auswertung mit dem ANOVA-Test in Partek GS wurden von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Regulation des geprägten *C15orf2*-Gens

4.1.1 Monoallelische Expression von *C15orf2* im adulten Gehirn

In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass *C15orf2* im fetalen Gehirn monoallelisch vom paternalen Allel und in Testis biallelisch exprimiert wird (Buiting *et al.* 2007; Wawrzik *et al.* 2010). Da die Expression des C15orf2-Proteins in mehreren adulten Gehirnregionen nachgewiesen wurde (Wawrzik *et al.* 2010), war die Frage interessant, ob die monoallelische neuronale Expression auch postnatal erhalten bleibt. Daher wurde die allelische Expression in Neokortexproben von drei erwachsenen Spendern analysiert (Primer 3 und 5-11, Tab. A1). Die DNA-Proben wurden nach informativen Sequenzlängenpolymorphismen (*short tandem repeats*, STRs) in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) von *C15orf2* durchsucht. STRs zeigen eine hohe Sequenzvariation, da sie im Vergleich zu Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) sehr schnell mutieren. Für die Längenanalyse wurden die Bereiche mit fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert und anschließend in einer GeneScan™-Analyse basenpaargenau aufgetrennt. Zwei der drei Proben wiesen informative STRs auf und konnten zur Analyse der allelischen Expression verwendet werden (Abb. 8). Dabei war die Probe „Adultes Gehirn 1“ in allen vier untersuchten Loci (nt4099 (GTTT_n), nt4726 (GT_n), nt5508 (GATA_n) und nt5898 (GATA_n)) heterozygot, Probe „Adultes Gehirn 2“ war nur in nt4099 heterozygot und die Probe „Adultes Gehirn 3“ war in allen Loci homozygot, also nicht informativ. Die Nummerierung der STRs bezieht sich auf Basenpaare in der *C15orf2*-Referenzsequenz AF179681, beginnend mit dem Startcodon (Färber *et al.* 2000). Für alle informativen STRs wurden die PCR und der GeneScan mit cDNA derselben Neokortexproben wiederholt. In allen fünf Fällen konnte auf cDNA-Ebene nur ein Allel amplifiziert werden (Abb. 8). *C15orf2* wird somit auch im adulten Gehirn monoallelisch exprimiert.

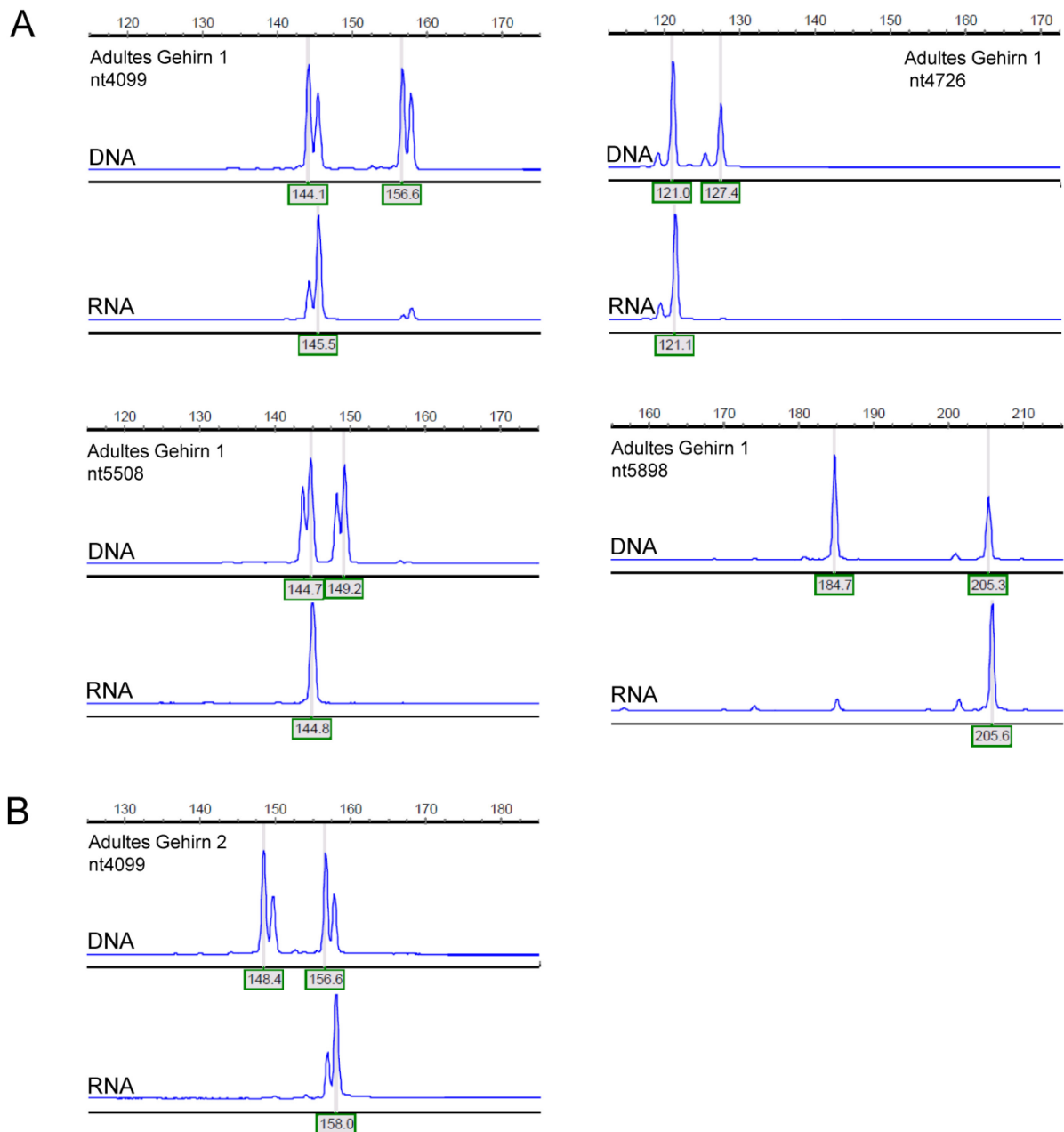


Abbildung 8: Allelische Expression im adulten Gehirn. (A) In Probe „Adultes Gehirn 1“ zeigte die GeneScan-Analyse der RNA an allen vier untersuchten Polymorphismen die Expression von nur einem Allel. **(B)** Der einzige informative Polymorphismus in Probe „Adultes Gehirn 2“ zeigte ebenfalls eine monoallelische Expression der RNA.

4.1.2 Detaillierte Methylierungsanalyse des *C15orf2*-Promotor-CpG-Islands

Um herauszufinden, ob die monoallelische Expression von *C15orf2* durch eine differenzielle, elternspezifische Methylierung reguliert wird, wurde die Methylierung eines 639 bp großen CpG-Island (CGI) in der 5'UTR des Gens untersucht. Erste Methylierungsanalysen dieses CGIs waren bereits 2000 veröffentlicht worden (Färber *et al.* 2000). Damals wurde die Methylierung unter Verwendung methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen (*NotI*

und *SacII*) und Southern-Blot-Analysen ermittelt und eine vollständige Methylierung der untersuchten *NotI*- und *SacII*-Schnittstellen innerhalb des CGIs in Blut, Gehirn und Amniongewebe gefunden. In Spermien waren beide Schnittstellen vollständig unmethyliert. In fetalem Ovar und Testis war die *NotI*-Schnittstelle überwiegend und *SacII*-Schnittstelle vollständig methyliert. Später, nachdem die monoallelische Expression von *C15orf2* in fetalem Gehirn bekannt war, wurde die Methylierung des CGI noch einmal detaillierter und auch in fetalem Gehirn untersucht (Wawrzik 2009). Während der Doktorarbeit von Michaela Wawrzik (2009) wurden zwei Bereiche von 6 und 9 CpG-Positionen mittels Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten Bisulfit-behandelter DNA analysiert. Für den Bereich nahe dem Transkriptionsstart wurden ausschließlich Klone erhalten, die von methylierten Sequenzen abstammen. Für den anderen untersuchten Bereich, der die *SacII*-Schnittstelle enthielt, wurden Klone erhalten, die an sechs von neun analysierten CpGs sowohl von methylierten als auch von unmethylierten Sequenzen abstammten. Das traf auch für die CpGs der *SacII*-Schnittstelle zu, obwohl diese in der Southern-Blot-Analyse vollständig methyliert gewesen waren (Färber *et al.* 2000; Wawrzik 2009). Um diesen diskrepanten Befund zu klären, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine umfassende Methylierungsanalyse des *C15orf2*-CGIs mit *Next-Generation-Sequencing*-Technologie in Blut, Spermien, fetalem Gehirn und adultem Gehirn durchgeführt. Nach Möglichkeit sollten dabei, anders als in den vorangegangenen Studien, zwischen paternalen und maternalen Allelen unterschieden werden. Daher wurden zunächst PCRs mit genomischer DNA von allen Proben durchgeführt, die das gesamte CGI sowie 319 bp der umliegenden Sequenz abdeckten (Primer 12-13, Tab. A1). Die Produkte wurden per Sanger-Sequenzierung nach informativen SNPs durchsucht. Eine Blutprobe (Blut 2) und eine Probe aus adultem Gehirn (Adultes Gehirn 3) waren für die SNPs rs2602618 (A/G) *upstream* des CGIs, rs112214851 (G/A) und rs35022251 (C/A) im CGI und rs35870568 (C/T) *downstream* des CGIs heterozygot. In keiner der anderen Proben konnten informative SNPs gefunden werden. Daher wurden zwei überlappende PCRs für die Amplifizierung Bisulfit-behandelter DNA so geplant, dass sie das gesamte CGI abdecken, wobei Amplikon A die SNPs rs2602618 und rs112214851 umfasst und Amplikon B den SNP rs35022251 umfasst (Abb.2A) (Primer 14-15, 18-19, Tab. A1). Der vierte SNP rs35870568 (C/T) wäre nach Bisulfit-Behandlung und Amplifizierung des DNA-Plusstranges nicht mehr informativ. Da die PCR zur Generierung von Amplikon A für die fetalen und adulten Gehirn-Proben nicht gut funktionierte, wurde ein alternatives Amplikon A' entworfen (Primer 16-17 in Tabelle A1, Abb. 9A), das allerdings keine informativen SNPs abdeckt.

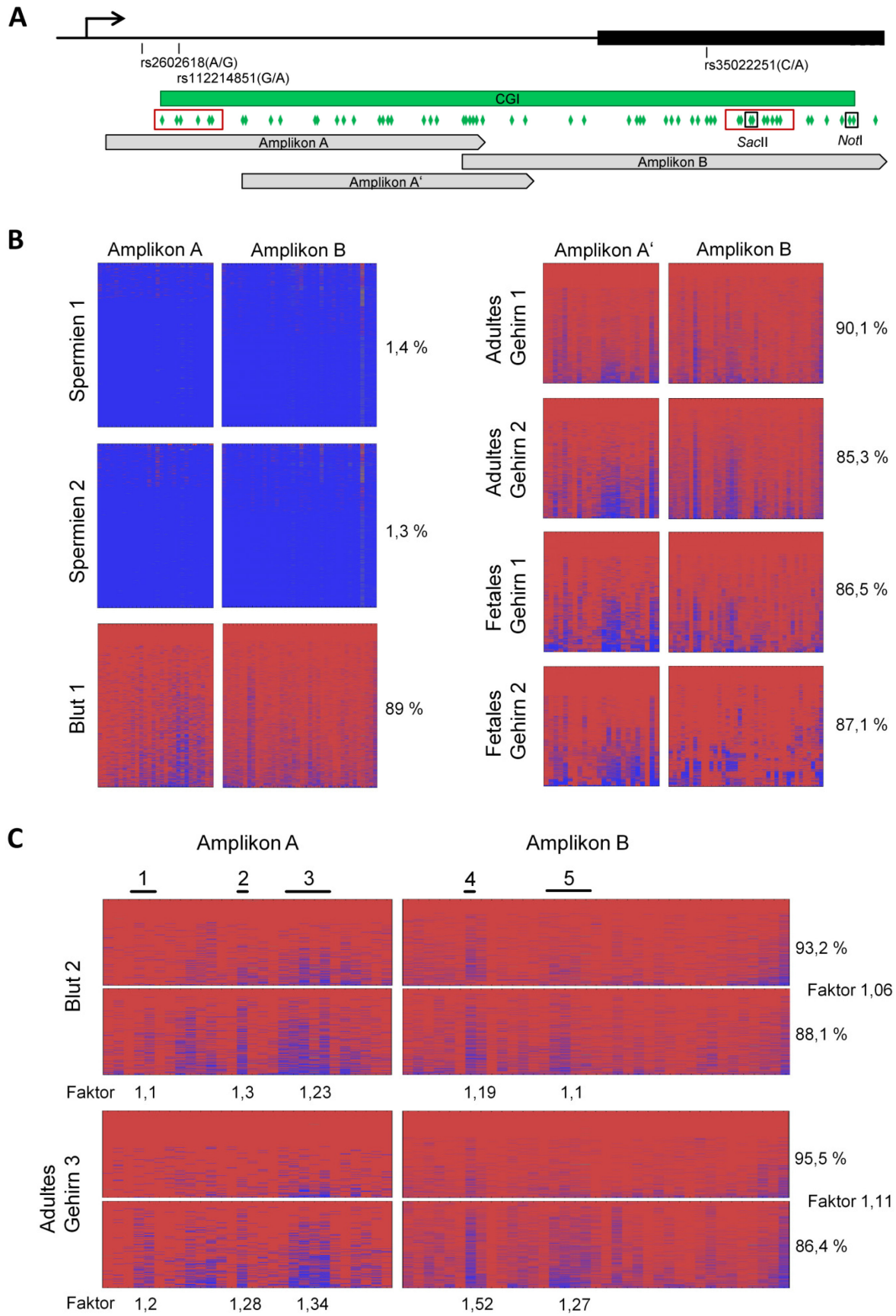


Abbildung 9: Hochauflösende Methylierungsanalyse des CpG-Islands im *C15orf2*-

Promotor. (A) Schematische Übersicht der Promotorregion von *C15orf2*. Der Transkriptionsstart (Pfeil) und der Anfang des ORFs (schwarzer Balken) sowie die drei verwendeten informativen SNPs sind eingezeichnet. Unter dem CGI (grün) sind die einzelnen analysierten CpG-Positionen abgebildet (grüne Rauten). Die CpGs, die bereits in der Doktorarbeit von Michaela Wawrzik (rote Kästchen) und in Färber *et al.* (2000) (schwarze Kästchen) analysiert wurden, sind markiert. (B + C) Graphische Darstellung der DNA-Methylierung. Nicht-methylierte CpGs sind in blau, methylierte CpGs in rot dargestellt. Dabei repräsentiert jede Zeile (*Read*) ein in der PCR erzeugtes DNA-Molekül und jede Spalte eine analysierte CpG-Position. Die Anzahl der *Reads*, die je Probe generiert wurden, ist in Tabelle A2 im Anhang aufgelistet. (B) Graphische Darstellung der Methylierung in nicht-informativen Proben. Rechts von jeder Probe ist die durchschnittliche Methylierung der gesamten Region angegeben. (C) Graphische Darstellung der Methylierung in einer Blutprobe und einer adulten Gehirnprobe, die informativ für drei SNPs in der untersuchten Region waren. Da die SNPs zweimal gekoppelt und niemals einzeln beobachtet wurden, wurden unter der Annahme, dass sich die seltenen Allele in Phase befinden, die beiden Amplikons jeweils einem gemeinsamen Allel zugeordnet (oben, unten). Rechts ist die durchschnittliche Methylierung für jedes Allel über die gesamte Region angegeben. Aufgrund des geringen Gesamtunterschiedes wurden die Subregionen 1 – 5, die jeweils ein bis vier CpG-Positionen umfassen, analysiert.

Wegen ihrer besseren Effizienz wurde diese PCR für die nicht-informativen Gehirn-Proben ausgewählt, während informative Probe „Adultes Gehirn 3“ erfolgreich mit der PCR zur Generierung von Amplikon A analysiert werden konnte. Die Bisulfit-PCR-Produkte wurden mithilfe eines 454 GS Junior Next-Generation-Sequencers (Roche) hochauflösend analysiert und die erhaltenen Daten mit der Analysesoftware Amplifyer ausgewertet (Abb. 9B+C). Die Analyse zeigte, dass das CGI im *C15orf2*-Promotor in Spermien fast vollständig unmethyliert ist (1,3 -1,4 % Methylierung). In Blut, adultem Gehirn und fetalem Gehirn ist das CGI dagegen überwiegend methyliert (85,3- 90,5 %), wobei der Grad der Methylierung über die einzelnen CpG-Positionen hinweg unterschiedlich war und in den verschiedenen Proben wiedererkennbare, aber nicht identische Muster bildete (Abb.9B). In den beiden informativen Proben wurden über das gesamte CGI hinweg nur geringe Methylierungsunterschiede zwischen den Allelen gefunden (Faktor 1,06 Unterschied in Blut, Faktor 1,11 im adulten Gehirn, Abb. 9C). Es machte allerdings den Anschein, dass in einigen der weniger stark methylierten Bereichen des CGIs etwas größere Unterschiede zwischen den Allelen bestanden. Daher wurde die allelspezifische Methylierung in fünf Subregionen des CGIs manuell nachanalysiert (Abb. 9C). Tatsächlich fanden sich im adulten Gehirn in zwei der Subregionen relativ deutliche Unterschiede zwischen den Allelen (Faktor 1,52 und 1,34). Im Blut war der Unterschied in denselben Subregionen etwas kleiner (Faktor 1,19 und 1,23). Da die gefundenen Unterschiede zwischen den Allelen aber insgesamt eher gering sind, bleibt es fraglich, ob die monoallelische Expression von *C15orf2* durch die CGI-Methylierung reguliert

wird.

4.1.3 Suche nach alternativen Genregulationsmechanismen für *C15orf2*

Da trotz der genannten Tendenzen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Genexpression und CGI-Methylierung hergestellt werden konnte, wurde nach alternativen Möglichkeiten für die Genregulation von *C15orf2* gesucht. In der genomischen Region 15q11q13 waren zuvor mehrere lange, nicht-codierende Transkripte entdeckt worden, die in *PWRN1* beginnen und sich bis *SNRPN* erstrecken (Wawrzik *et al.* 2009). *C15orf2* liegt im intronischen Bereich dieser Transkripte und es wäre denkbar, dass *PWRN1* auch als alternativer *upstream*-Teil von *C15orf2* fungiert. Daher wurde untersucht, ob sich *C15orf2* an die ca. 50 kbp centromerisch gelegenen *PWRN1*-Exons anschließen lässt. Mit einer *Exon-Connection-PCR* wurde versucht, cDNA aus fetalem Gehirn mit einem Primer in Exon 23 von *PWRN1* und einem Primer in der 5'UTR von *C15orf2* zu amplifizieren (Primer 20-22, Tab. A1). Als Positivkontrolle diente eine PCR mit demselben Forward-Primer, die zuvor zur Entdeckung von mehreren *C15orf2*-überspannenden Transkripten geführt hatte (Wawrzik *et al.* 2009). Während in der Kontroll-PCR das erwartete Bandenmuster erhalten wurde, führte die *Exon-Connection-PCR* mit *C15orf2* zu keinem Produkt (Daten nicht gezeigt). Da *C15orf2* zudem keine gute 5' *Splice Site* besitzt, kann eine Regulation von *C15orf2* als Teil der *PWRN1-SNRPN*-Transkriptionseinheit als unwahrscheinlich eingestuft werden.

Um sicherzugehen, dass die detektierte monoallelische Expression von *C15orf2* im Gehirn tatsächlich auf eine eigenständige mRNA zurückgeht und nicht etwa von einer ungespleißten Prä-mRNA der *SNRPN*-Transkriptionseinheit herrührt, sollte die Existenz eines poly-A-Schwanzes an der *C15orf2*-3'UTR nachgewiesen werden. Hierzu wurde eine reverse Transkription von RNA aus fetalem Gehirn parallel mit poly(dT)-Oligonukleotiden und Random-Hexameren als Primer durchgeführt. Da eine anschließende PCR von der *C15orf2*-3'UTR in beiden Ansätzen identische Produkte lieferte, konnte die Existenz eines *C15orf2*-Poly-A-Schwanzes bestätigt werden (Abb. 10) (Primer 10-11, Tab. A1). Die Identität der erhaltenen Produkte wurde zusätzlich per Sanger-Sequenzierung verifiziert.

Die Versuchsergebnisse legen nahe, dass *C15orf2* gemäß früherer Annahmen ein eigenes Transkript repräsentiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression im Gehirn von einem bisher unbekanntem, alternativen *Upstream*-Promotor reguliert wird.

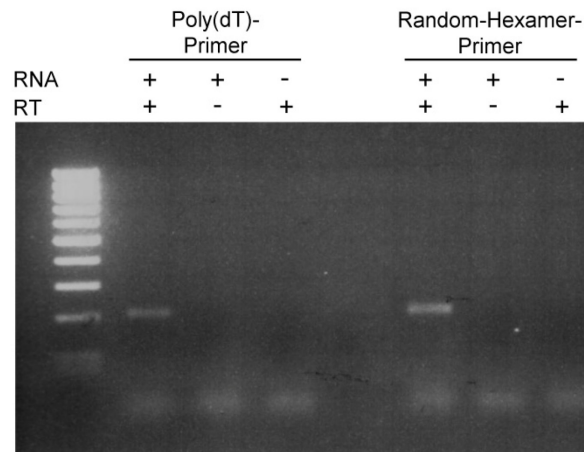


Abbildung 10: Nachweis des *C15orf2*-Poly-A-Schwanzes. Die PCR-Produkte, die von Poly(dT)-geprimter und Random-Hexamer-geprimter cDNA generiert wurden, haben die korrekte Größe von ca. 200 bp. In den Negativkontrollen (minus reverse Transkriptase (RT) und minus RNA) wurden keine Produkte erhalten. Als Größenstandard wurde MassRuler™ Low Range verwendet.

4.2 Funktion des *C15orf2*-Proteins

4.2.1 Bioinformatische Analyse der *C15orf2*-Proteinsequenz

C15orf2 codiert für ein 1156 Aminosäuren (AS) großes Protein mit sechs Zellkern-Lokalisationssignalen. Nach transients Überexpression in HeLa- und HEK293-Zellen war das Protein dementsprechend im Zellkern lokalisiert vorgefunden worden (Wawrzik *et al.* 2010). Um einen ersten Einblick in die Proteinfunktion zu erhalten, wurde nach Sequenzhomologien von *C15orf2* zu anderen Proteinen gesucht. Eine initiale Analyse mit der InterProScan-Software wurde von Prof. Daniel Hoffmann in der Abteilung für Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. InterProScan führt eine Signaturerkennungssuche in programmintegrierten Datenbanken aus, um Proteine in Familien einzuordnen. Mithilfe dieser Software konnte *C15orf2* in eine namenlose Familie (PTHR23193) innerhalb der Panther-Datenbank eingeordnet werden. Diese Proteinfamilie bestand aus den sieben Mitgliedern *C15orf2*, *NUP153*, *NUP214*, *POM121A*, *B* und *C* sowie *POM121 like protein 2* (*POM121L2*). *POM121B* ist vermutlich kein translatiertes Protein (Funakoshi *et al.* 2007) und die Funktion von *POM121L2* ist bisher nicht bekannt. Die Proteine *NUP153*, *NUP214*, *POM121A* und *POM121C* haben dagegen etablierte Funktionen im humanen NPC (Hase und Cordes 2003; Bernad *et al.* 2006; Funakoshi *et al.* 2007). Anschließend wurde eine BLASTp-Suche gegen humane Proteine durchgeführt. Die Ergebnisse der BLASTp-Suche ließen sich in mehrere Ergebnisgruppen unterteilen. Die

Ergebnisgruppe, die nach den C15orf2-Datenbankeinträgen die höchsten Signifikanzen besaß, bestand aus mehreren redundanten Datenbankeinträgen für das Protein UPF0607. Recherchen ergaben, dass es sich hierbei um ein 341 AS großes Protein mit unbekannter Funktion und subzellulärer Lokalisation im Zytoplasma handelt (<http://www.proteinatlas.org>). Dieses Protein besitzt über seine gesamte Länge hinweg Sequenzhomologie zu dem N-terminalen Teil von C15orf2 (AS 1 - 366). Die zweitsignifikanteste Gruppe von Ergebnissen (Signifikanzen von $E = 4 \times 10^{-8}$ bis $E = 2 \times 10^{-9}$) waren POM121-Sequenzen. Innerhalb dieser Gruppe stellte der Eintrag für POM121C den Datenbanktreffer mit der höchsten Sequenzabdeckung (61 %) dar.

Da es sich bei UPF0607 um ein Protein mit unbekannter Funktion handelt, war diese Sequenzhomologie bei der Suche nach der C15orf2-Proteinfunktion wenig hilfreich. Dagegen war mit der zweiten Treffergruppe die Ähnlichkeit zur POM121-Proteinfamilie mit einer zweiten Methode bestätigt worden. Es wurde daher ein Protein-Alignment von C15orf2, POM121A und POM121C nach dem ClustalW-Algorithmus erstellt (Abb. 11). Die längsten Isoformen von POM121 A und POM121C besitzen am N-terminalen Ende jeweils eine Transmembrandomäne, welche die Nukleoporine in der inneren Kernmembran verankert. Dagegen erreichten Transmembrandomänen-Vorhersagen für die C15orf2-Proteinsequenz keine Signifikanz. In guter Übereinstimmung mit dem Fehlen einer Transmembrandomäne beginnt die Homologie mit C15orf2 auch erst C-terminal der POM121-Transmembrandomäne (Abb. 11).

Als weitere Möglichkeit, Aufschluss über die Funktion von C15orf2 zu gewinnen, wurde eine Sekundärstrukturanalyse durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die C15orf2-Proteinsequenz keine längeren Bereiche mit hohen Wahrscheinlichkeiten für Alpha-Helices oder Beta-Faltblätter besitzt, sondern größtenteils als intrinsisch unstrukturiert vorhergesagt wird. Interessanterweise ähnelt C15orf2 darin einer Gruppe von NUPs, zu denen POM121 und NUP153 gehören (Denning *et al.* 2003). Im Gegensatz zu NUPs mit intrinsisch unstrukturierten Bereichen besitzt C15orf2 allerdings keine *FG-Repeats*. Dennoch bestehen insgesamt viele Ähnlichkeiten zu NUPs und insbesondere zu der POM121-Proteinfamilie, was einen funktionalen Zusammenhang mit dem humanen NPC nahelegt.

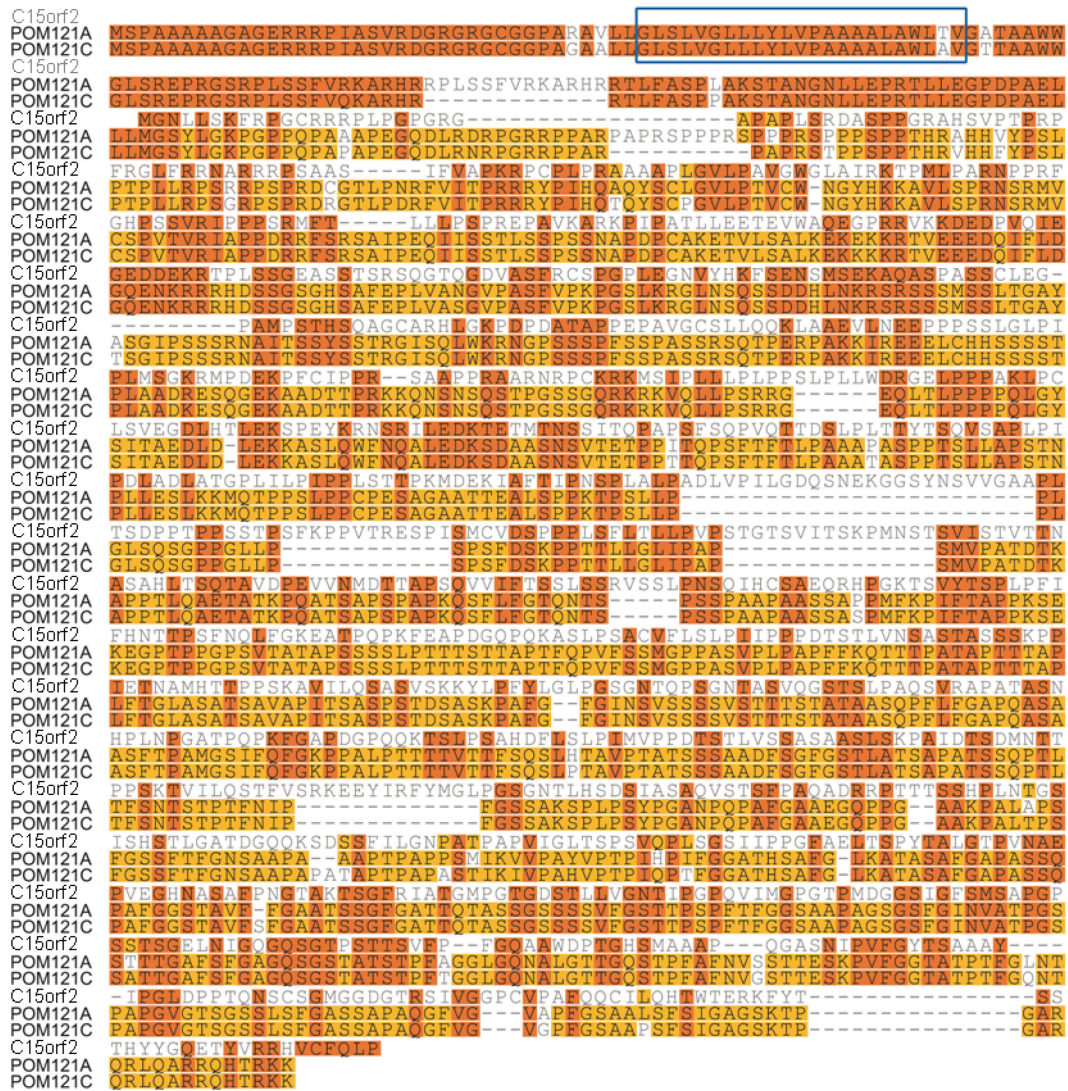


Abbildung 11: ClustalW-Alignment von C15orf2 und POM121. Das dargestellte Sequenz-Alignment von C15orf2 (UniProtKB: Q9NZP6) und den Transmembran-NUPs POM121A (UniProtKB: Q96HA1) und POM121C (UniProtKB: A8CG34) wurde nach dem ClustalW-Algorithmus erstellt. Bei Ähnlichkeit aller Aminosäuren in einer Spalte nach der Blossum62-Matrix ist eine Position im Alignment orange hinterlegt. Bei Ähnlichkeit von zwei der drei Aminosäuren, ist die Position gelb hinterlegt. Der blaue Rahmen markiert die Position der Transmembranregion in POM121A und C, die C15orf2 nicht besitzt. Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012).

4.2.2 Suche nach humanen Zelllinien mit endogener C15orf2-Expression

Wegen der Ähnlichkeit zu POM121 und anderen Nukleoporinen sollte die subzelluläre Lokalisation von C15orf2 genauer untersucht werden. Auf der Suche nach humanen Zelllinien mit endogener C15orf2-Expression wurden die beiden Tumor-Zelllinien HEK293 und HeLa sowie zwei Fibroblasten-Primärkulturen aus einer humanen Unterarmbiopsie und aus humaner Vorhaut (Fischer *et al.* 2006) per Western-Blot untersucht. Keine dieser Zelllinien zeigte eine endogene Expression des Proteins. Da die neuronale Expression von

C15orf2 bekannt war (Wawrzik *et al.* 2010), wurden außerdem vier Neuroblastomzelllinien (LAN-1, SHEP, IMR-5 und SH-SY5Y), zwei Medulloblastomzelllinien (D283 und DAOY) und zwei kortikale Zelllinien (HCN-1A und HCN-2) analysiert. Auch in diesen Zelllinien war C15orf2 entweder gar nicht oder nur unzuverlässig detektierbar.

Eine der Zelllinien, in denen C15orf2-Expression unzuverlässig und schwach detektierbar war, war die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Neuroblastomzelllinien stammen von Vorläuferzellen für Neurone und Gliazellen ab und es wurde gezeigt, dass SH-SY5Y-Zellen nach Differenzierung mit Retinsäure neuronale Marker exprimieren (Kito *et al.* 1997). In der Hoffnung, die C15orf2-Expression verstärken zu können, wurden daher Zellen mit Retinsäure neuronal differenziert. Nach 14 Tagen Behandlung zeigten deutlich sichtbare, neuritenartige Verbindungen zwischen den Zellen, dass die Differenzierung grundsätzlich funktioniert hatte (Abb. 12). Dennoch war per Western-Blot keine Zunahme der C15orf2-Expression detektierbar.

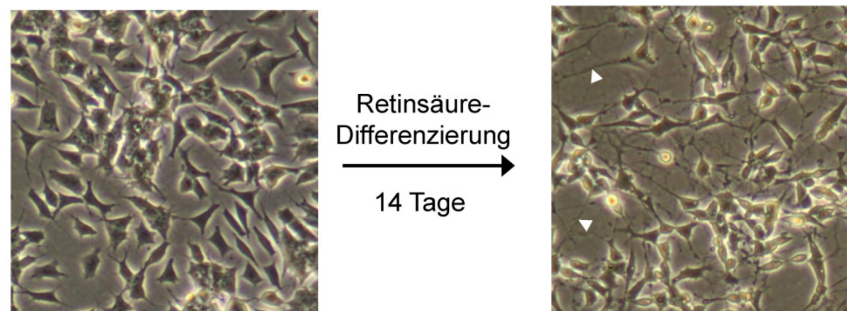


Abbildung 12: Neuronale Differenzierung der SH-SY5Y-Neuroblastomzelllinie. Nach 14 Tagen Retinsäurebehandlung war eine deutliche Zunahme an langen neuritenartigen Zell-Zell-Verbindungen zu beobachten (Pfeilspitzen).

4.2.3 Immunfluoreszenzanalysen in einer C15orf2-Expressionszelllinie

4.2.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von C15orf2 in einer stabilen Expressionszelllinie

Da keine Zelllinie mit zufriedenstellender C15orf2-Expression gefunden werden konnte, wurde alternativ das Flp-In™ T-REx™-293 Zellsystem der Firma Invitrogen genutzt, um eine stabile Zelllinie zu generieren, die FLAG-markiertes C15orf2 unter einem Doxycyclin-induzierbaren Promotor exprimiert (siehe Material und Methoden 3.2.7). Diese Zelllinie (T-REx293-C15orf2) zeigte nach Induktion eine 9,4-fache Überexpression von C15orf2 auf mRNA-Ebene sowie per Western-Blot nachweisbare Proteinexpression (Abbildung 13A). Immunfärbungen in diesen Zellen mit Antikörpern gegen C15orf2 oder gegen die FLAG-Markierung zeigten eine überwiegende Lokalisation in der Zellkernperipherie. Co-

Lokalisationsstudien mit Kernhüllenkomponenten zeigten außerdem, dass C15orf2 mit NPC-Proteinen und mit den Lamina-Komponenten Lamin A und C co-lokalisiert ist (Abbildung 13B). Der Grad der Co-Lokalisation wurde mit der Software ImarisColoc analysiert und die Berechnungen ergaben 79,6 % Co-Lokalisation von C15orf2 mit NPCs und 59,7 % Co-Lokalisation von NPCs mit C15orf2. Für die Immunfluoreszenzfärbung mit Lamin A/C berechnete die Software 83,8 % Co-Lokalisation von C15orf2 mit Lamin und 70,7 % Co-Lokalisation von Lamin mit C15orf2. Diese Beobachtungen unterstützten die Vermutung einer NPC-Assoziation von C15orf2, wären jedoch auch mit einer Lokalisation an anderen Strukturen der Zellkernhülle vereinbar.

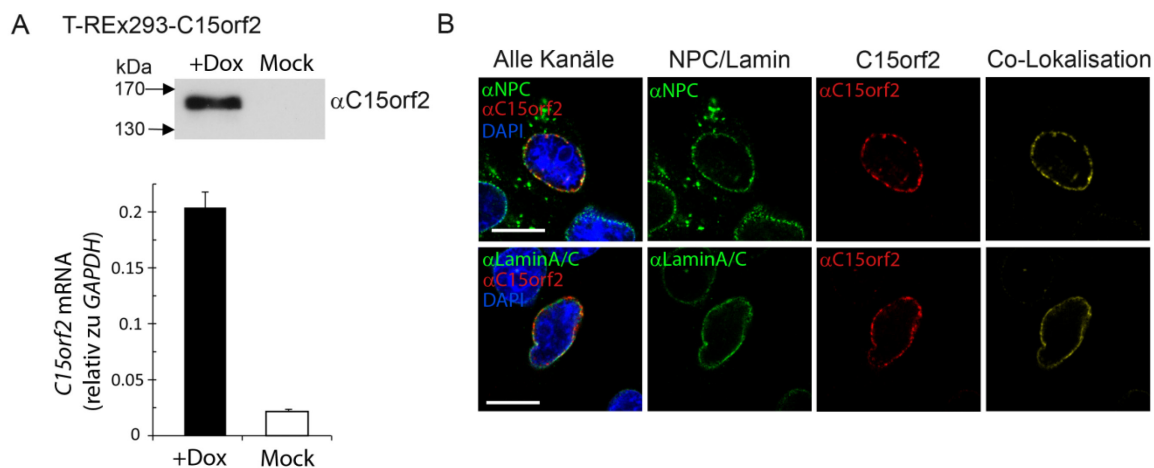


Abbildung 13: Subnukleäre Lokalisation von C15orf2 in einer induzierbaren C15orf2-FLAG-Zelllinie. (A) Der Western-Blot zeigt die Expression von C15orf2 in T-REx293-C15orf2-Zellen nach der Induktion der Transgenexpression mit Doxycyclin (+Dox) aber nicht nach Behandlung mit Wasser (Mock). Mit einer quantitativen Real-Time-PCR (Primer 23-24, Tab. A1) wurde eine 9,4-fache Zunahme der *C15orf2*-mRNA-Expression gemessen. Die Balken geben jeweils den Durchschnitt dreier technischer Replikate Doxycyclin-induzierter (+Dox, schwarz) und Mock-behandelter Zellen (Mock, weiß) wieder. (B) Immunfluoreszenzfärbung induzierter T-REx293-C15orf2-Zellen. C15orf2-FLAG (rot) ist in der Zellkernperipherie lokalisiert und mit NPCs (grün, oben) und Lamin A/C (grün, unten) co-lokalisiert. Von der Imaris-Software generierte Co-Lokalisations-Kanäle, welche nur die co-lokalisierten Pixel enthalten, sind jeweils ganz rechts abgebildet. Die Zellkerne sind durch DAPI-Färbung (blau) markiert. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen einzelne Schnittebenen aus Scans mit einem konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsleisten entsprechen 10 μm . Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012).

4.2.3.2 Heterogenität der C15orf2-Expression in der stabilen Zelllinie

Das Flp-In™ T-REx™-293 Zellsystem stellt die genetische Homogenität der Zelllinie sicher, indem es die Integration des Transgens an nur einer Position im Genom erlaubt und indem die Reinheit der Linie durch fortwährende Selektion und anhand von verschiedenen Testkriterien

sichergestellt wird (siehe Material und Methoden, 3.2.8.4). Überraschenderweise zeigten die einzelnen Zellen der T-REx293-C15orf2-Zelllinie dennoch Unterschiede in der Stärke der Antikörperfärbung von C15orf2 (Abb. 14A). Diese Unterschiede wurden mit zwei verschiedenen Anti-C15orf2-Antikörpern sowie einem Anti-FLAG-Antikörper in mehreren unabhängigen Versuchen bestätigt. Eine sehr kleine Minderheit der T-REx293-C15orf2-Zellen ($< 0,01\%$) zeigte extrem hohe Werte innerhalb des beobachteten Spektrums der C15orf2-Expression. In diesen Zellen war ein Überexpressionsphänotyp mit abnormer Zellkernmorphologie und Invaginationen der Kernhülle zu beobachten (Abb. 14B). Dies deutet auf einen Einfluss der C15orf2-Überexpression auf die Integrität der Kernhülle hin.

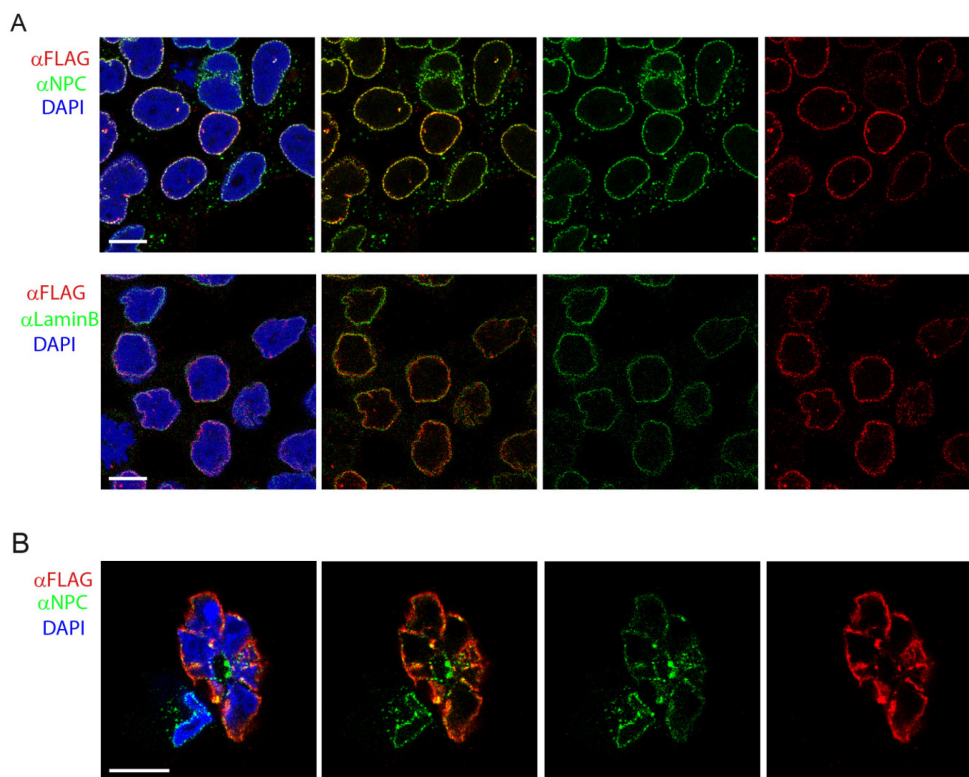


Abbildung 14: Expressionsheterogenität in der C15orf2-FLAG-Zelllinie. (A) Immunfluoreszenzfärbung induzierter T-REx293-C15orf2-Zellen mit C15orf2-FLAG (rot), anti-NPC-Färbung (grün, obere Zeile) oder anti-Lamin B₁-Färbung (grün, untere Zeile) und DAPI-Färbung (blau) der DNA. Die einzelnen Zellkerne weisen Unterschiede in der Signalstärke des anti-FLAG-Antikörpers auf, die sich in den Lamin- und NPC-Färbungen nicht widerspiegeln. (B) Ein sehr kleiner Prozentsatz der induzierten T-REx-C15orf2-Zellen ($< 0,01\%$) zeigte extrem hohe C15orf2-Signalstärken. In solchen Zellen waren Fehlbildungen der Kernhülle mit auffälligen Einstülpungen der Lamina und Verklumpungen der NPCs zu beobachten. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen einzelne Schnittebenen aus Scans mit einem konfokalen Lasermikroskop. Die Maßstabsleisten entsprechen 10 μm . Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012).

4.2.3.3 Ursachen der Heterogenität der stabilen Zelllinie

Für die beobachtete Heterogenität kamen unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten in Betracht. Eine ungenügende Zugänglichkeit für die Antikörper konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da andere Komponenten der Zellkernperipherie, wie die Kernlamina, nicht dasselbe Muster der Signalstärke zeigten. Der beobachtete Phänotyp in Zellen mit besonders hoher Signalstärke sprach außerdem dafür, dass es sich tatsächlich um Expressionsunterschiede handelt. Um eine genetische Heterogenität der Zelllinie als Ursache vollends auszuschließen, wurden klonale Linien aus einzelnen Zellen der T-REx293-C15orf2-Linie gezogen und die Immunfluoreszenzanalysen an sechs Klonen wiederholt. Die Variation in der Proteinexpression war jedoch in den Klonen noch immer zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Eine weitere interessante Erklärungsmöglichkeit wäre eine Zellzyklus-spezifische Regulation von C15orf2. Um dies zu untersuchen, wurden synchrone Zellpopulationen gewonnen, indem mit der Methode der zentrifugalen Gegenfluss-Elutriation Zellen aus unterschiedlichen Stadien der Interphase (G1, S und G2) isoliert und für Immunfluoreszenzfärbungen ausgesät wurden (Abb. 15). Die zentrifugale Gegenfluss-Elutriation hat gegenüber anderen Synchronisationsmethoden den Vorteil, dass der Stoffwechsel der Zellen kaum gestört wird und verschiedene Phasen des Zellzyklus analysiert werden können (Kauffman *et al.* 1990). Während die per Western-Blot analysierte Gesamtexpression von C15orf2 in zwei unabhängigen Experimenten in allen untersuchten Stadien in etwa gleich war, wurden in jeder der Phasen wiederum Unterschiede in den C15orf2-Leveln zwischen den einzelnen Zellen festgestellt. Eine Zellzyklus-spezifische Regulation von C15orf2 wurde somit ebenfalls als Ursache ausgeschlossen. Der Anteil an Zellen mit Invaginationen der Kernhülle konnte in diesem Experiment allerdings nicht verglichen werden, da alle Zellkerne durch die Trypsinisierung und die kurze Ruhephase eine unregelmäßige Form hatten. Ein solcher Trypsinisierungseffekt war auch in nicht-induzierten Kontrollzellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

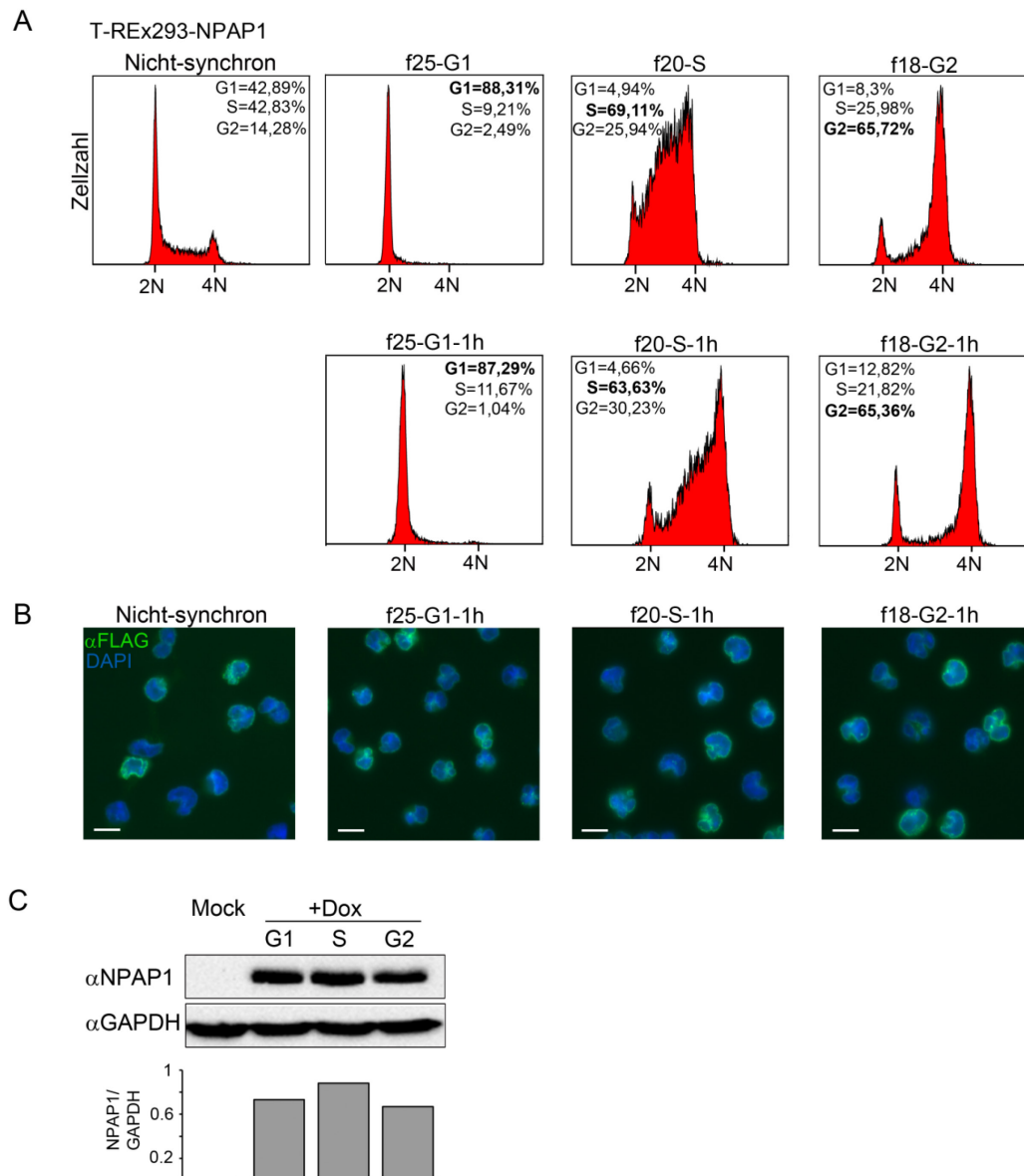


Abbildung 15: C15orf2-Expression in Zellzyklus-Fractionen der T-REx293-C15orf2-Zelllinie. (A) Zellzyklus-Fractionen von induzierten T-REx293-C15orf2-Zellen wurden durch zentrifugale Gegenfluss-Elutriation (CCE) gewonnen. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen von E. Mladenov und T. Mußfeld per FACS-Analyse untersucht. Die Graphen zeigen den DNA-Gehalt von Zellen vor der CCE sowie von denjenigen Zellfractionen, die als angereichert in G1- (Fraction 25, f25), S-Phase- (f20) und G2-Zellen (f18) ausgewählt wurden (obere Zeile). Zellen aus diesen Fractionen wurden für die Immunfluoreszenz ausgesät und eine Stunde zum Adhärenz inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Teil dieser Zellen nach einer Stunde geerntet und erneut per FACS analysiert (untere Spalte). Der Prozentsatz der Zellen, die sich im angereicherten Stadium befanden (fett gedruckt) hatte sich während der Inkubation nicht wesentlich verändert. (B) Immunfluoreszenzfärbungen eine Stunde nach der CCE zeigten, dass die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zellen in allen drei isolierten Zellzyklus-Stadien mit denen in nicht-synchronen Zellen vergleichbar sind. Die Maßstabsleisten entsprechen 10 μ m. (C) Western-Blot-Analyse der Zellzyklusfractionen. Abbildung verändert aus Neumann et al. (2012).

4.2.3.4 Analyse der NPC-Assoziation mit 3D-strukturierter Illuminationsmikroskopie

Obwohl die NPCs von Vertebraten mit etwa 125 nm Durchmesser zu den größten bekannten Proteinkomplexen gehören (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010), ist es mit konventioneller Lichtmikroskopie nicht möglich, einzelne Kernporen aufzulösen. Das liegt daran, dass die physikalische Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen bei der Hälfte der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes (je nach Fluorophor also 200 - 350 nm) liegt, was als Abbe-Limit bezeichnet wird (Abbe 1873; Schermelleh *et al.* 2010). Eine von mehreren auf Lichtmikroskopie basierenden Methoden, die in der Lage sind, das Abbe-Limit zu umgehen, ist die strukturierte Illuminationsmikroskopie (SIM) (Hell 2009; Huang *et al.* 2009). In der dreidimensional verbesserten Variante (3D-SIM) erreicht diese Methode eine laterale (x, y) Auflösung von 100 - 130 nm und eine axiale Auflösung (x, z) von ca. 250 nm und hat damit eine etwa achtfach verbesserte volumetrische Auflösung gegenüber konfokaler Lasermikroskopie (Markaki *et al.* 2012). Schermelleh und Kollegen konnten zeigen, dass mit dieser Methode einzelne Kernporen aufgelöst und von der Kernlamina visuell unterschieden werden können (Schermelleh *et al.* 2008). Um zu entscheiden, ob C15orf2 am NPC oder an anderen Strukturen der Kernhülle lokalisiert ist, wurden speziell angefertigte Immunfluoreszenzpräparate von induzierten T-REx-293-C15orf2-Zellen mit einem 3D-SIM-Mikroskop analysiert (Abb. 16, 17). Eine Co-Immunfärbung mit dem NPC zeigte, dass C15orf2 in der unmittelbaren Nachbarschaft von NPCs lokalisiert ist und eindeutig der nuklearen Seite einzelner Kernporen zugeordnet werden kann (Abb. 16). Da der verwendete Antikörper Mab414, der für die Anfärbung von NPCs verwendet wurde, mehrere Nukleoporine erkennt (NUP358, NUP214, NUP153 und NUP62), die sich auf der nukleären Seite, zentral und auf der cytoplasmischen Seite des Komplexes befinden, ist davon auszugehen, dass das NPC-Signal in etwa das gesamte Volumen des Komplexes wiedergibt. Demnach zeigt die Position der C15orf2-Signale im Verhältnis zu den NPC-Signalen, dass C15orf2 auf der nukleoplasmatischen Seite der NPCs lokalisiert ist und dabei relativ weit in den Zellkern hineinreicht. Entsprechend zeigt die Co-Immunfärbung mit Lamin B₁, dass C15orf2 sich etwa auf einer Höhe mit der Kernlamina befindet und Lamin B₁ und C15orf2 ein alternierendes Verteilungsmuster aufweisen (Abb. 17).

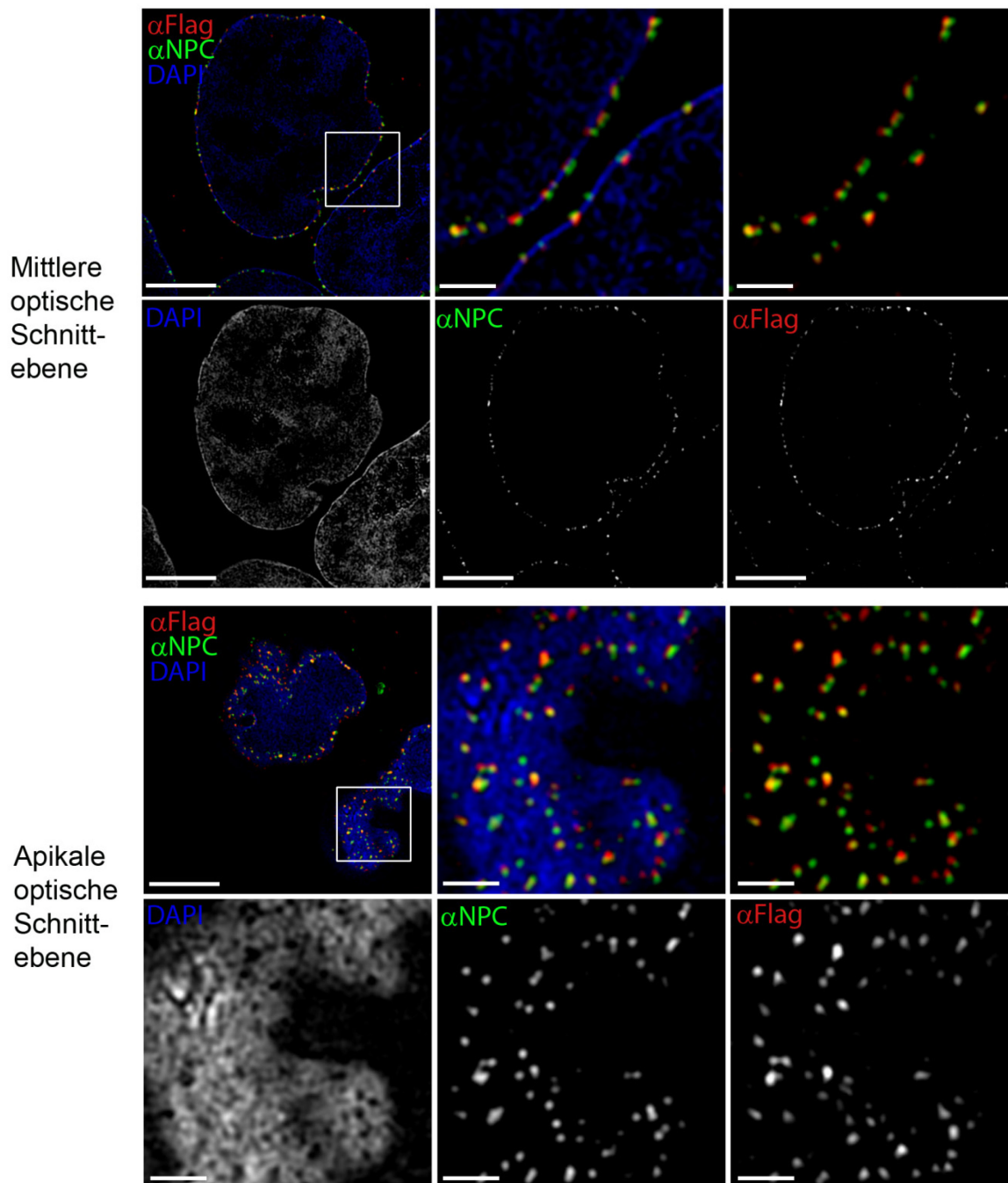


Abbildung 16: Hochauflösende Analyse der NPC-Assoziation von C15orf2 mit 3D-SIM. Die mittlere optische Schnittebene durch einen Zellkern zeigt, dass sowohl der NPC als auch C15orf2-FLAG ein ähnliches punkartiges Muster entlang des Chromatinaußenrandes (DAPI) aufweisen. Die Vergrößerung (4x) zeigt einen Ausschnitt der Kernhüllen zweier benachbarter Zellkerne. Hier ist deutlich erkennbar, dass C15orf2 (rot) in beiden Zellen auf der nukleoplasmatischen Seite der NPCs (grün) lokalisiert ist. Die apikale optische Schnittebene zeigt ebenfalls, dass C15orf2 eng mit dem NPC assoziiert ist. Die Maßstabsleisten entsprechen 5 μ m in den Übersichten und 1 μ m in den Vergrößerungen. Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012). Die zugrunde liegenden SIM-Aufnahmen wurden von Y. Markaki generiert.

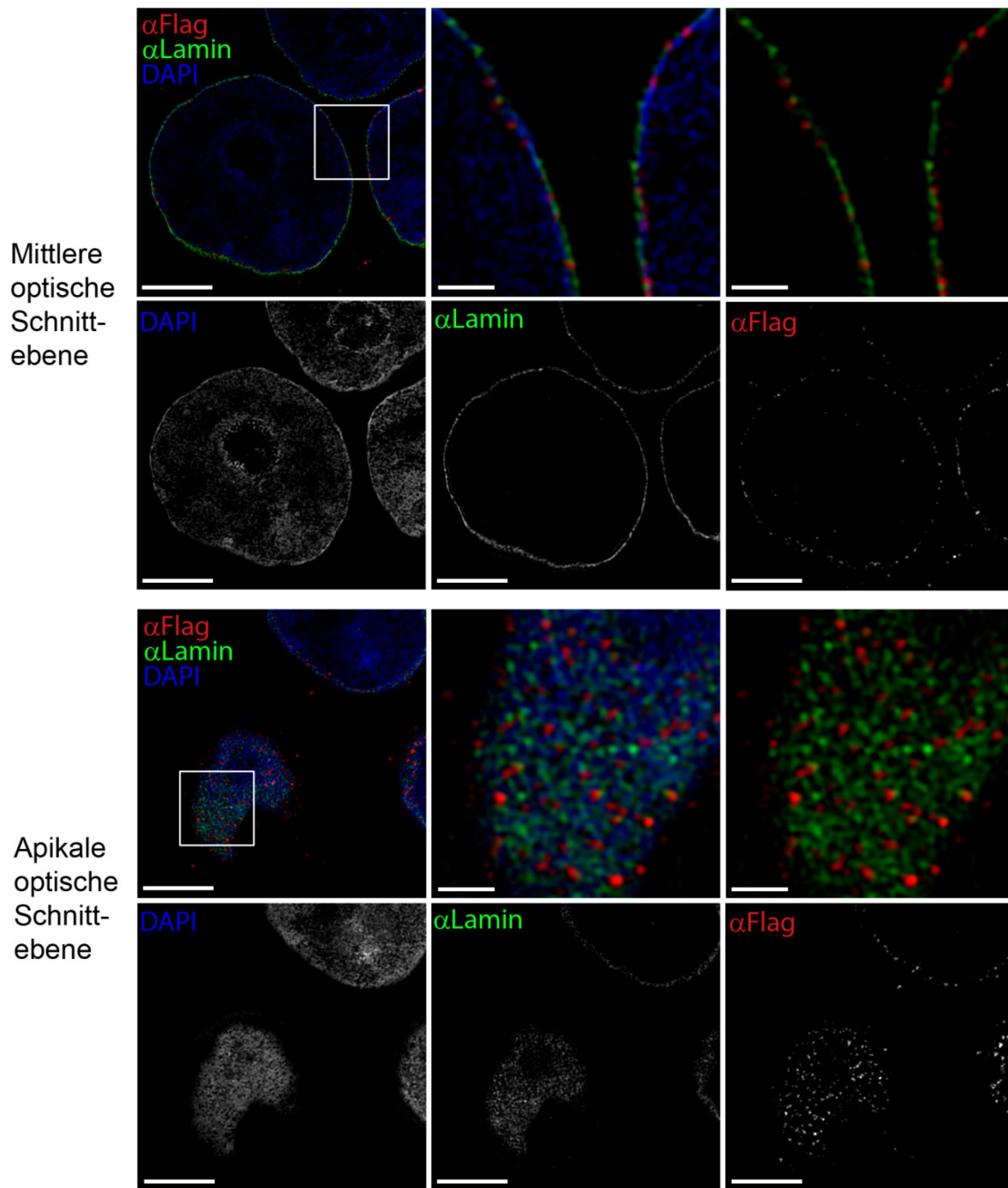


Abbildung 17: Hochauflösende Analyse der Lamina-Assoziation von C15orf2 mit 3D-SIM. In der mittleren optischen Schnittebene durch einen Zellkern sind deutliche Unterschiede zwischen der kontinuierlichen, linearen Struktur der Kernlamina und dem punkartigen Muster von C15orf2-FLAG zu erkennen. Ein ähnlich deutlicher Strukturunterschied ist auch in der apikalen optischen Schnittebene sichtbar. In den Vergrößerungen (4x) der mittleren und apikalen optischen Schnittebene wird deutlich, dass C15orf2-FLAG (rot) sich etwa in einer Ebene mit der Kernlamina (grün) befindet. Die beiden Signale wechseln sich jedoch ab und zeigen nur wenig Überlappung. Die Maßstabsleisten entsprechen 5 µm in den Übersichten und 1 µm in den Vergrößerungen. Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012). Die zugrunde liegenden SIM-Aufnahmen wurden von Y. Markaki generiert.

4.2.4 Verteilung von C15orf2 in Fraktionen der Zellkernhülle

Um die beobachtete NPC-Assoziation von C15orf2 mit einem biochemischen Ansatz zu verifizieren, wurde eine Kernhüllen-Isolations- und -Fraktionierungsmethode von Cronshaw und Kollegen angewandt (Cronshaw *et al.* 2002). Hierzu mussten zunächst intakte Zellkerne von induzierten T-REx-293-C15orf2-Zellen isoliert werden, die noch beide Kernmembranen besaßen. Die Kernhüllen wurden anschließend isoliert und schrittweise fraktioniert, sodass im vorletzten Schritt nur noch die weitgehend intakte Lamina mit den NPCs, die über Proteininteraktionen in ihr verankert sind, vorlag. Die Proteininteraktionen der NUPs miteinander und mit der Lamina wurden im letzten Schritt durch den Einsatz eines zwitterionischen Detergenz selektiv gelöst, während die Interaktionen der Lamine bestehen blieben. Die unlösliche Lamina konnte daher pelletiert werden, während die NUPs in Lösung gingen. Im Ergebnis dreier unabhängiger Fraktionierungsversuche mit Zellkernen induzierter T-REx-293-C15orf2-Zellen wurde Lamin B₁ nur in der Pellet-Fraktion des letzten Schrittes detektiert (Abb. 18).

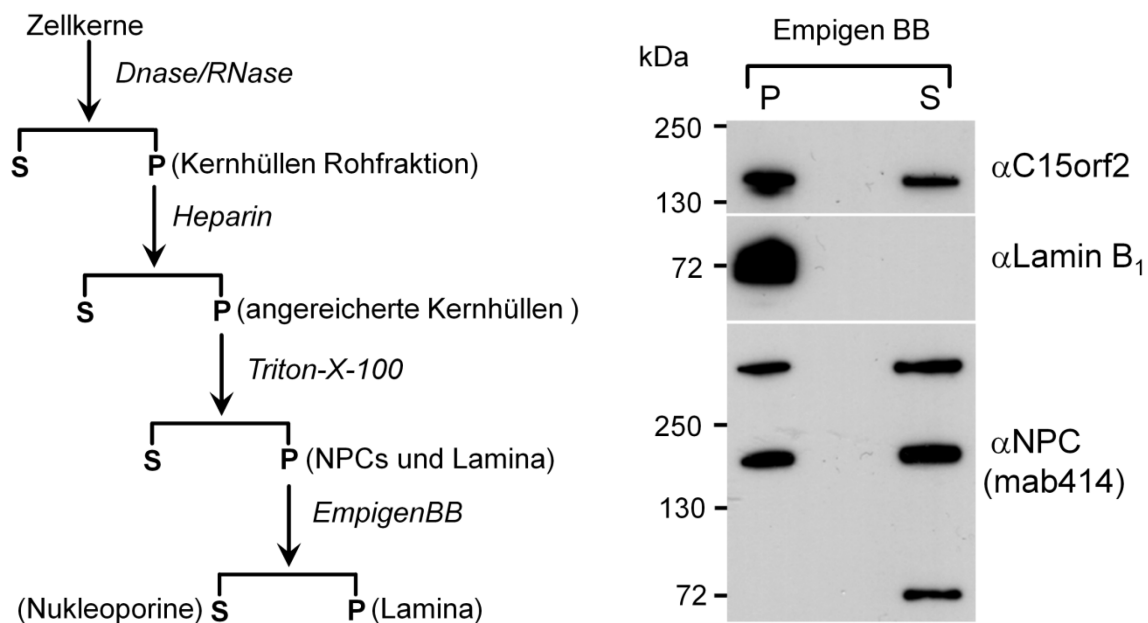


Abbildung 18: Subfraktionierung der Kernhülle. Links: Schema des Zellkernfraktionierungsprotokolls. Verändert nach Matunis (2006). Rechts: Western-Blot. P: Lamina-Pellet; S: NUP-angereicherter Überstand (*supernatant*). Der verwendete anti-NPC-Antikörper "Mab414" bindet FG-Repeat-Nukleoporine. Die drei detektierten Banden repräsentieren vermutlich NUP358, NUP153 und NUP62 (Cronshaw *et al.* 2002). Nach längeren Belichtungszeiten wurde auch NUP62 in der Pelletfraktion detektiert. Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012).

Die NUPs, die mit dem Mab414 Antikörper detektiert wurden, waren sowohl im Pellet als auch im Überstand detektierbar. Ebenso war C15orf2 sowohl im Pellet als auch im Überstand nachweisbar. Verglichen mit den NUPs schien jedoch prozentual mehr C15orf2 in der Pellet-Fraktion zu verbleiben, was eine stärkere Bindung von C15orf2 an die Kernlamina nahelegt und in guter Übereinstimmung mit der 3D-SIM Lokalisation ist.

4.2.5 Einfluss der C15orf2-Überexpression auf den mRNA-Export

Für einige NUPs und NPC-assoziierte Proteine, z.B. für das Korb-NUP NUP153, wurden Funktionen in der Regulation des mRNA-Exportes nachgewiesen (Bastos *et al.* 1996; Hawryluk-Gara *et al.* 2005; Wickramasinghe *et al.* 2010). Um zu überprüfen, ob die Überexpression von C15orf2 den mRNA-Export beeinflusst, wurde eine mRNA-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (mRNA-FISH) durchgeführt. Würde C15orf2-Überexpression den mRNA-Export negativ beeinflussen, wäre in induzierten Zellen verglichen mit Kontrollzellen eine Anreicherung der mRNA im Zellkern zu erwarten. Eine positive Beeinflussung würde das Gegenteil bewirken. Der Vergleich von induzierten und nicht-induzierten T-REx293-C15orf2-Zellen zeigte jedoch keinen Unterschied in der Verteilung der mRNA (Abb. 19).

Auch solche Zellen, die extreme hohe C15orf2-Level und einen Kernhüllenphänotyp aufwiesen (vergleiche Abschnitt 4.2.3.2), zeigten keine Veränderung in der mRNA-Verteilung (Daten nicht gezeigt).

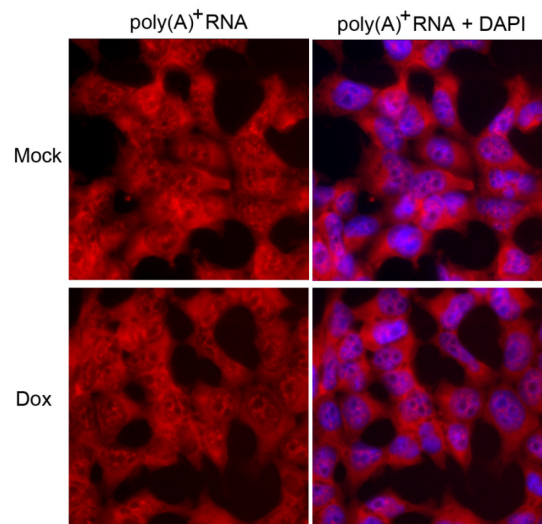


Abbildung 19: Poly(A)⁺-RNA Verteilung in T-REx293-C15orf2-Zellen. Poly(A)⁺-mRNA wurde mit einer Cy3-markierten poly-dT₅₀-Sonde (rot) detektiert und war größtenteils im Zytoplasma, aber auch im Zellkern (DAPI, blau), lokalisiert. Es konnte kein Unterschied zwischen induzierten (Dox) und H₂O-behandelten (Mock) T-REx293-C15orf2-Zellen gefunden werden. Abbildung verändert aus Neumann *et al.* (2012).

4.2.6 Einfluss der C15orf2-Überexpression auf die Genexpression

Einige NPC-Proteine können die Zugänglichkeit des Chromatins beeinflussen und sind an der Regulation der Genexpression beteiligt (Vaquerizas *et al.* 2010). Daher wurde eine Affymetrix Gene St 1.0 Array-Analyse durchgeführt, um Unterschiede in der Genexpression von induzierten und nicht-induzierten T-REx293-C15orf2-Zellen zu messen. In drei technischen Replikaten fanden sich jedoch nach Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Expressionsunterschiede, abgesehen von einer etwa zehnfachen Überexpression von *C15orf2* selbst. Die auf dem Array detektierte Überexpression ist in guter Übereinstimmung mit den in Abschnitt 4.2.3.1 beschriebenen Real-Time-PCR-Ergebnissen. Die Originaldaten der Arrayanalyse können in der Datenbank des Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) unter der Nummer GSE36575 eingesehen werden.

Auch wenn die genaue Funktion des C15orf2-Proteins bisher nicht geklärt werden konnte, zeigen die Ergebnisse der Proteinanalyse, dass C15orf2 mit NPCs in der Zellkernperipherie assoziiert ist. Nach Absprache mit dem “HUGO Gene Nomenclature Committee” (HGNC) wurde daher der neue Name “*Nuclear pore associated protein 1*” (*NPAP1*) für *C15orf2* festgelegt. Der Übersichtlichkeit halber wird dennoch im Folgenden der Name *C15orf2* beibehalten.

4.3 Evolutionärer Ursprung des C15orf2-Gens

Das *C15orf2*-Gen gehört zu den geprägten Genen der chromosomalen Region 15q11q13 beim Menschen, fehlt aber in der ebenfalls geprägten orthologen Region der Maus. Um die Entstehung der Region 15q11q13 besser zu verstehen, wurde daher die evolutionäre Herkunft des Gens untersucht.

4.3.1 Evolutionäre Konservierung von C15orf2-Orthologen in Primaten und Analyse des Weißbüschelaffen-Orthologs

In der Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org>) waren *C15orf2*-Orthologe für die Primatenspezies Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan und Rhesusaffe eingetragen. Um Orthologe in weiteren Primaten zu finden, wurde eine UCSC-Datenbanksuche (<http://genome.ucsc.edu>) mit dem BLAT-Algorithmus durchgeführt. Als Suchanfrage wurde die humane *C15orf2*-Gensequenz verwendet. Auf diese Weise konnten auch in Gibbon, Totenkopffaffen (*Saimiri boliviensis*) und Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) *C15orf2*-

Orthologe in der 15q11q13-orthologen Region identifiziert werden. Dagegen wurde im Buschbaby (*Otolemur garnettii*), einem Vertreter der weiter vom Menschen entfernten Unterordnung Strepsirrhini (Abb. 20A), kein solches Ortholog gefunden. Da die Region 15q11q13 in dieser Spezies ausreichend gut assembliert ist und keine großen Sequenzlücken aufweist, ist davon auszugehen, dass das Buschbaby kein *C15orf2*-Ortholog besitzt.

Die Genome von Pavian, Koboldmaki (*Tarsius syrichta*) und Mauslemur (*Microcebus murinus*) wurden ebenfalls analysiert, allerdings war die Assemblierung dieser Genome zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht vollständig genug, um erhaltene Datenbanktreffer bestimmten genomischen Regionen zuzuordnen.

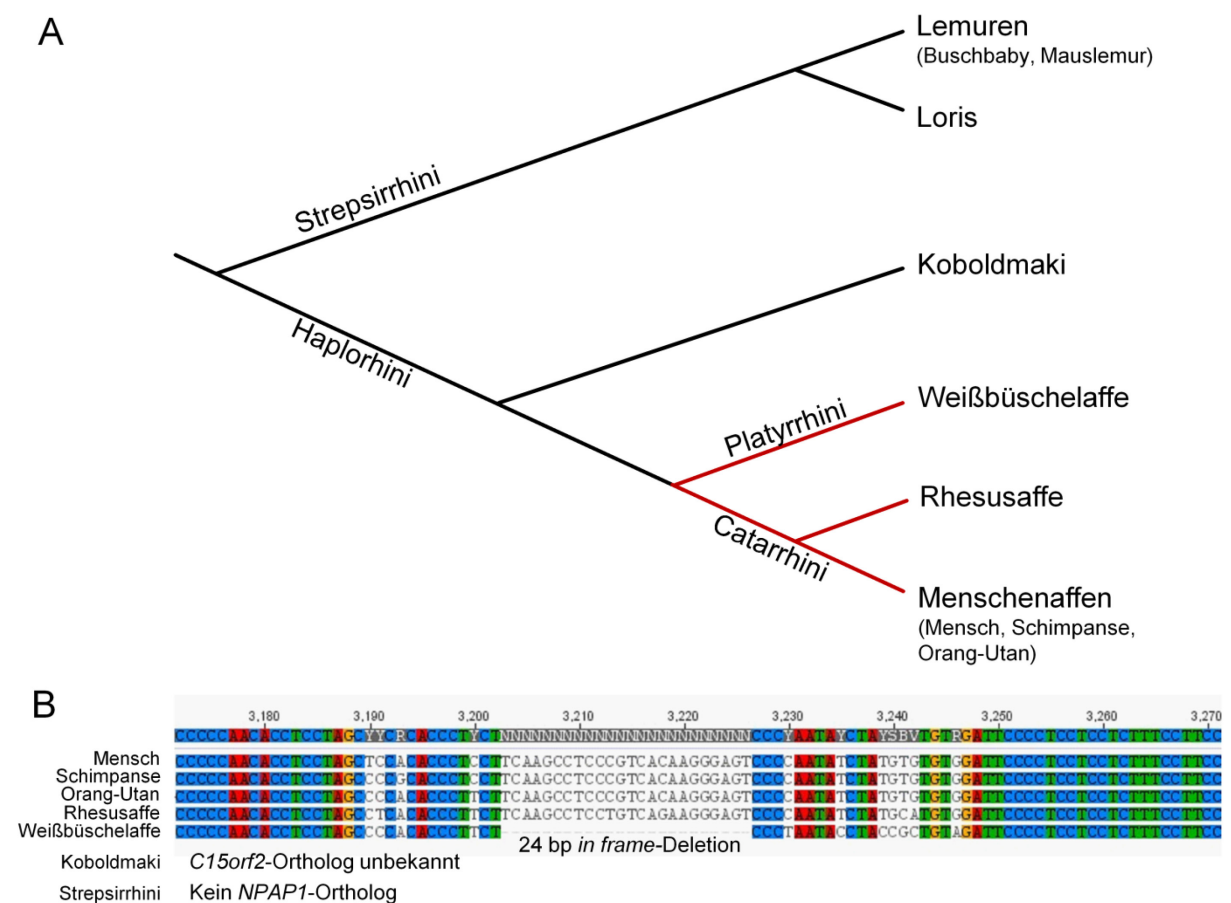


Abbildung 20: Konservierung von *C15orf2* in Primaten. (A) Der schematische phylogenetische Baum zeigt vereinfacht die Familienstruktur der Ordnung Primaten. *C15orf2*-Orthologe wurden in allen untersuchten Mitgliedern der Parvordnungen Platyrrhini und Catarrhini (rote Zweige) gefunden. (B) Der Ausschnitt aus einem Gen-Alignment von *C15orf2*-Orthologen zeigt zwei gut konservierte Genabschnitte sowie einen Abschnitt, in dem die Weißbüschelaffen-Sequenz gegenüber den anderen Primaten eine 24 bp- (8 AS-) Deletion enthält.

Unter den Primatenspezies, deren Genome vollständig genug sequenziert und assembliert waren und die *C15orf2*-Orthologe besaßen, waren der Weißbüschelaffe und das Totenkopffäffchen, als Vertreter der Parvordnung Platyrrhini innerhalb der Unterordnung Haplorrhini, die entferntesten Verwandten des Menschen (Abb. 20A). Die Sequenz des Weißbüschelaffen-Orthologs enthielt eine etwa 2,5 kbp große Sequenzlücke. Da ein Alignment mit dem humanen Gen zeigte, dass diese Sequenzlücke im Bereich des mutmaßlichen ORFs liegt, wurde der fehlende Teil des Gens sequenziert (Primer 25-30, Tab. A1). Die vollständige Sequenz (Tab. A3) war zu 69,9 % mit dem humanen Gen identisch.

Im Unterschied zu allen anderen Primaten mit *C15orf2*-Orthologen konnte im Weißbüschelaffen kein durchgehender orthologer ORF gefunden werden, dessen Länge der des humanen ORFs entspricht. Es bestehen dennoch unterschiedliche Möglichkeiten einer proteincodierenden Funktion des Gens (Abb. 21). Eine Möglichkeit wäre ein verkürzter ORF von 1755 bp, der für ein 584 AS großes Protein mit hoher Sequenzhomologie zum mittleren Teil des *C15orf2*-Proteins (AS 297-865) codieren würde (58,6 % Gesamthomologie). Diesem Protein würden allerdings große Teile des N- und C-Terminus von *C15orf2* fehlen (Abb. 21A). Deshalb wurde das Programm GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) verwendet, um die Exon-Intron-Struktur des Weißbüschelaffen-Orthologs vorherzusagen. Die GENSCAN-Vorhersage entspricht einem 3060 bp langem ORF mit zwei kleinen Introns, welcher 164 bp *downstream* des humanen ORFs beginnt und synchron mit ihm endet (Abb. 21B). Das codierte Protein hätte ebenfalls eine hohe Sequenzhomologie (66 %) mit dem humanen *C15orf2* und besäße zudem die größere Sequenzabdeckung. *Upstream* des kurzen intronlosen ORFs, aber überlappend mit dem ersten Exon der GENSCAN-Vorhersage, besitzt die Weißbüschelaffen-Sequenz mehrere kurze Insertionen/Deletionen (Indels) verglichen mit den Sequenzen des Menschen und anderer Primaten, die nicht Vielfache von 3 bp sind und daher den *frame* eines hier lokalisierten intronlosen ORFs gegenüber dem humanen Ortholog verschieben würden (Abb. 21). Dagegen existieren im *downstream* liegenden Genbereich, vor allem im zweiten Exon der GENSCAN-Vorhersage, eine Reihe von Deletionen in der Weißbüschelaffen-Sequenz gegenüber anderen Primaten-Sequenzen, die große Vielfache von 3 bp (bis zu 39 bp) sind (Abb. 20B, Abb. 21). Diese Serie von *in frame* Indels beginnt bemerkenswerterweise schon *upstream* des kurzen intronlosen ORFs. Das Indel-Muster weist auf ein proteincodierendes Potenzial im 3'-Teil des Gens hin, das durch selektiven Druck aufrechterhalten wurde.

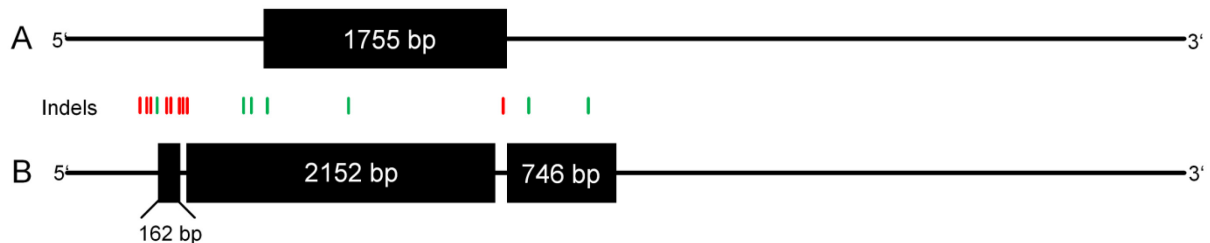
Humanes *C15orf2*Weißbüschelaffen-*C15orf2*

Abbildung 21: Vergleich der ORF-Vorhersagen für das Weißbüschelaffen-Ortholog. Die schematische Darstellung ist ungefähr maßstabsgetreu; dabei orientieren sich die Längen von 5'UTR und 3'UTR an denen des humanen *C15orf2*. Protein codierende Exons sind als schwarze Kästchen, Introns und UTRs als schwarze Linien dargestellt. **(A)** Kurzer intronloser ORF in der Weißbüschelaffen *C15orf2*-Sequenz, der mithilfe der Geneious-Software identifiziert wurde. **(B)** Genvorhersage des Programms GENSCAN mit drei Exons. Indels von 1 oder 2 bp Länge sind als rote senkrechte Linien dargestellt; Indels, die Vielfache von 3 sind, sind als grüne senkrechte Linien dargestellt. Die Längen der *in frame* Indels sind von 5' nach 3': 3 bp, 18 bp, 36 bp, 15 bp, 24 bp, 39 bp, 6 bp.

4.3.2 Analyse einer neuen, *C15orf2*-homologen Genfamilie in den Eutheria

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Primatengenomen befanden sich in der Ensembl-Datenbank auch Gene von Hund (ENSCAFG00000014649 und ENSCAFG00000023307), Rind (ENSBTAG00000046462), Schwein (ENSSSCG00000022532) und Elefant (ENSLAFG00000014287 und ENSLAFG00000031777), die als *C15orf2*-Orthologe annotiert waren. In Anbetracht der bereits bekannten Abwesenheit des Gens aus der murinen orthologen Region, schien dieses Muster zunächst dem traditionellen Verständnis von der Säugetierevolution zu widersprechen, da dieses die Nagetiere den Primaten näher stellt als Wiederkäuer und Fleischfresser. Daher wurde die Konservierung der Syntanie dieser Gene genauer analysiert (Tab. 2). Mithilfe des UCSC-Genom-Browsers konnte ermittelt werden, dass nur die Primaten-Orthologe Syntanie mit *NDN*- und *SNRPN*-Orthologen aufwies, während die als *C15orf2*-Orthologe bezeichneten Gene anderer Säugetiere zwischen den jeweiligen Orthologen von *Transducin-like enhancer of split (TLE) 1* und *TLE4* liegen. *TLE1* und *4* gehören zu einer größeren Region mit konservierter Syntanie, die Orthologe der humanen Gene *GNAI4*, *GNAQ*, *PSAT1*, *TLE4*, *TLE1*, *RASEF* und *FRMD3* (centromerisch nach telomerisch auf Chr9q21) enthält und auch im Huhn so zu finden ist.

Tabelle 2: Konservierung der zwei Sytäniegruppen in Säugetieren. Die Pfeile zeigen die Orientierung des *NPAPIL*-Gens von 5' nach 3' an.

	Chr. 15 (orthologe Region)	Chr. 9 (orthologe Region)
Primaten: Mensch Schimpanse Gorilla Orang-Utan Rhesusaffe Weißbüschelaffe	<i>NDN</i> – <i>C15orf2</i> – <i>SNRPN</i>	<i>TLE4</i> \xrightarrow{NPAPIL} \xleftarrow{NPAPIL} <i>TLE1</i>
Hund Elefant	<i>NDN</i> – <i>SNRPN</i> (kein <i>C15orf2</i>)	<i>TLE4</i> \xleftarrow{NPAPIL} \xrightarrow{NPAPIL} <i>TLE1</i>
Kuh Pferd Schwein Kaninchen	<i>NDN</i> – <i>SNRPN</i> (kein <i>C15orf2</i>)	<i>TLE4</i> \xleftarrow{NPAPIL} <i>TLE1</i>
Rodentia: Maus Ratte	<i>NDN</i> – <i>SNRPN</i> (kein <i>C15orf2</i>)	Keine konservierte Syntänie von <i>TLE4</i> und <i>TLE1</i> kein <i>NPAPIL</i>

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Säugerspezies enthielt die Ensembl-Datenbank auch Gene von Katze, Spitzhörnchen und Frettchen, die als *C15orf2*-Orthologe annotiert waren. Die Genome dieser Spezies waren zum Zeitpunkt der Analyse allerdings für Syntänieanalysen noch nicht gut genug assembliert. Der Katzen-*Scaffold* GL897178.1 enthielt neben dem als *C15orf2*-Ortholog annotierten Gen (ENSFCAG00000010320) auch eine *TLE1*-homologe Sequenz und machte es deshalb wahrscheinlich, dass ENSFCAG00000010320 zu der oben beschriebenen Familie von *C15orf2*-Homologen mit Lokalisation zwischen *TLE1* und *TLE4* gehört. Für alle Gene dieser Familie sagte die Ensembl-Pipeline (Potter *et al.* 2004) proteincodierende Funktionen voraus. Mitglieder dieser neuen Familie orthologer Gene erhielten den vorläufigen Namen *Nuclear pore-associated protein 1-like* (*NPAPIL*), der sich von dem neuen Namen für *C15orf2*, *NPAP1*, ableitet.

Über eine UCSC-Datenbanksuche mit dem BLAT-Algorithmus und der humanen *C15orf2*-Sequenz als Suchanfrage wurden weitere Genome nach *NPAPIL*-Orthologen durchsucht. Die Suche ergab weitere *NPAPIL*-Sequenzen, unter anderem in Pferd und Kaninchen aber in keinem Nagetier. In Maus und Ratte lag, anders als in allen anderen analysierten Säugertieren,

außerdem keine Syntanie der Gene *TLE1* und *TLE4* vor. Mit der Datenbanksuche wurden keine *C15orf2*-homologen Sequenzen in Beuteltieren oder außerhalb der Säugetiere gefunden. Im humanen Genom ergab die UCSC-Datenbanksuche mit dem BLAT-Algorithmus und der humanen *C15orf2*-Sequenz als Suchanfrage neben *C15orf2* eine Reihe von Suchergebnissen auf den Chromosomen 9 und 10. Die beiden signifikantesten Ergebnisse liegen nur ca. 500 kb voneinander entfernt und in gegensätzlicher Orientierung auf Chromosom 9. Beide Treffer überlappen mit je einem Ensembl-annotierten Pseudogen (ENSG00000238002 auf dem Plusstrang und ENSG00000236521 auf dem Minusstrang). Da diese Sequenzen zwischen den humanen Orthologen von *TLE1* und *TLE4* liegen, scheint es sich um zwei Kopien von *NPAPIL* zu handeln (Tab. 2). Die beiden *NPAPIL*-Kopien enthalten nur sehr kurze ORFs, deren theoretische Proteinprodukte wenig Homologie zu *C15orf2* oder *NPAPIL* aufweisen. Allerdings beinhaltet die Plusstrang-Kopie wie *C15orf2* ein piRNA-Cluster und könnte möglicherweise als nicht-proteincodierendes Wirtsgen dieser kleinen RNAs exprimiert werden.

Auch in den Genomen von Hund und Elefant existiert *NPAPIL* in zwei hochähnlichen Kopien gegensätzlicher Orientierung. Allerdings sind die humanen Kopien, die sich auch in anderen Primatenspezies finden, in einer 3' zu 3' Orientierung lokalisiert, während die Kopien in Hund und Elefant 5' zu 5'-orientiert sind (Tab. 2).

4.3.4 Expressionsanalyse von *NPAPIL* im Rind

Während die meisten *NPAPIL*-Gene ausschließlich in der Ensembl-Datenbank annotiert sind, gibt es für das Ortholog des Rindes auch einen Eintrag in NCBI (GI:296484724). Deshalb wurde diese Spezies für eine *NPAPIL*-Expressionsanalyse ausgewählt. Hierzu wurde cDNA aus unterschiedlichen bovinen Geweben mit Primern amplifiziert, die die von Ensembl vorhergesagten Introns überspannen und deshalb in einer PCR mit genomischer DNA als *Template* zu größeren Produkten führen sollten als mit cDNA als *Template* (Primer 31-34, Tab. A1). Dabei überspannte Assay 1 das größere der beiden vorhergesagten Introns (1067 bp) und sollte von cDNA ein 509 bp großes Produkt und von genomischer DNA ein 1576 bp großes Produkt generieren. Assay 2 überspannte das kleinere vorhergesagte Intron (17 bp) und sollte von cDNA ein 210 bp und von genomischer DNA ein 227 bp großes Produkt amplifizieren. Mit beiden Assays wurde eine schwache Expression von *NPAPIL* in einigen Regionen des zentralen Nervensystems (Nucleus caudatus, Cerebellum, Hippocampus und Hypothalamus) nachgewiesen (Abb. 22). In Leber, Plazenta und Skelettmuskel konnte keine Expression nachgewiesen werden. Mit Assay 2 wurden außerdem extrem schwache Produkte

für cerebralen Cortex, Niere und Testis erhalten. Vermutlich war die Expression in diesen Geweben so gering, dass sie sich unterhalb der Detektionsgrenze des weniger effizienten Assay 1 befand.

Überraschenderweise hatten die Produkte, die mit Assay 1 generiert wurden, nicht die erwartete Größe für die Amplifikation von cDNA, sondern liefen auf einer Höhe mit dem Produkt von genomischer DNA. Eine mögliche Kontamination der kommerziell erworbenen cDNA mit genomischer DNA wurde durch eine intronüberspannende PCR des *ACTB*-Gens ausgeschlossen (Primer 35-36, Tab. A1). Die Sequenzierung einzelner *NPAPIL*-Produkte bestätigte, dass die vorhergesagten Introns sowohl in den cDNA-Produkten als auch in den Produkten von genomischer DNA enthalten waren. Dies war auch in den mit Assay 2 generierten PCR-Produkten der Fall, deren erwarteter Größenunterschied zu gering war, um ihn auf dem Gelbild zu erkennen.

Die Expressionsanalysen zeigen, dass das bovine *NPAPIL*-Ortholog zwar in einigen Geweben, insbesondere im Gehirn, exprimiert wird, diese Expression aber co-linear mit der DNA erfolgt und nicht das von Ensembl vorhergesagte Spleißmuster aufweist. Dies stellt die durch die Ensembl-Pipeline vorhergesagte proteincodierende Funktion des Gens infrage.

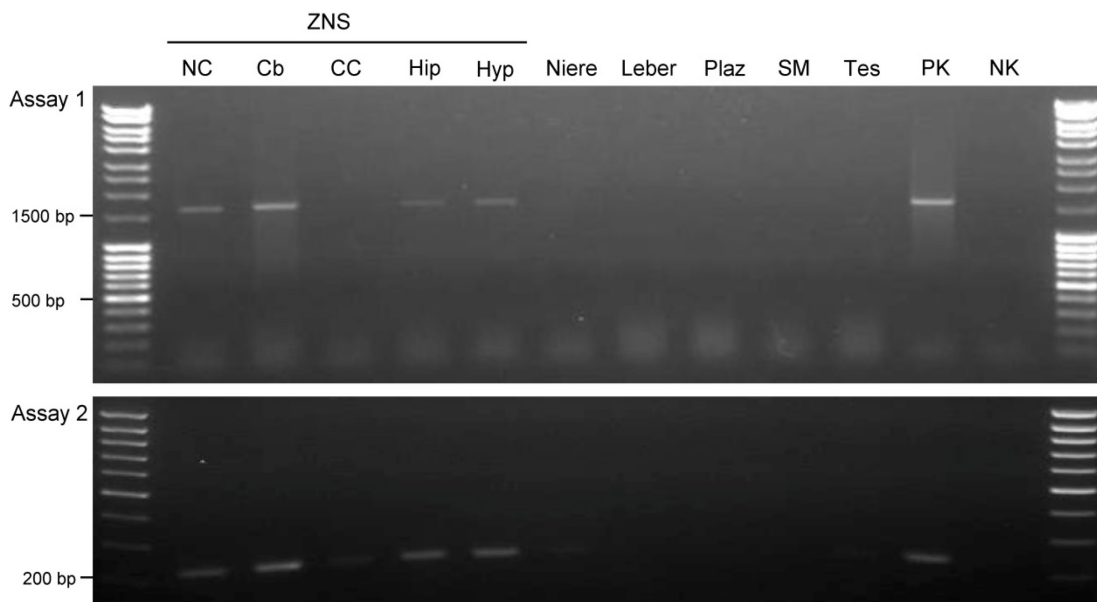


Abbildung 22: *NPAPIL*-Expressionsanalyse im Rind. ZNS: zentrales Nervensystem; NC: Nucleus caudatus; CC: cerebraler Cortex; Hip: Hippocampus; Hyp: Hypothalamus; Plaz: Plazenta; SM: Skelettmuskel; Tes: Testis; PK: Positivkontrolle (bovine DNA aus Testis); NK: Negativkontrolle (Wasser). Als Größenstandard wurde für Assay 1 MassRuler™ DNA Ladder Mix und für Assay 2 MassRuler™ Low Range verwendet.

4.3.3 Phylogenetische Analyse der C15orf2-, NPAP1L- und POM121-Proteinfamilien

Die Beobachtung, dass in einigen Säugetieren *NPAP1L*-Sequenzen mit proteincodierendem Potenzial vorhanden sind, während *C15orf2* nur in Primaten zu finden ist, legte die Annahme nahe, dass *NPAP1L* anzestral zu *C15orf2* sein könnte. Um diesem Sachverhalt in unvoreingenommener Weise zu begegnen, wurde ein phylogenetischer Stammbaum generiert (Abb. 23). Dieses *in silico* Experiment wurde von Nathalie Feiner aus der evolutionsbiologischen Arbeitsgruppe von Prof. Axel Meyer in Konstanz durchgeführt. Die dem Stammbaum zugrunde liegenden Sequenzen wurden aus einer NCBI-Datenbanksuche mit dem BLASTp-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) und der humanen C15orf2-Proteinsequenz als Suchanfrage entnommen. Zusätzlich wurden auch einige der in Ensembl vorhergesagten NPAP1L-Proteinsequenzen mit in die Analyse einbezogen, da diese mit Ausnahme der bovinen Sequenz nicht in der NCBI-Datenbank eingetragen waren. Das Datenset enthielt C15orf2 von unterschiedlichen Primaten, eine Gruppe von Sequenzen, die mit UPF0607 bezeichnet sind, NPAP1L von Elefant, Hund, Katze, Schwein und Rind, sowie POM121 und POM121-like Proteine. Aus diesen Sequenzen wurde ein *Maximum-Likelihood-Tree* generiert (Abb. 23). Die Topologie des Baumes legt nahe, dass das *POM121*-Gen der gemeinsame Vorfahre von *C15orf2*, *NPAP1L* und *UPF0607* ist. *NPAP1L* wiederum scheint der Vorfahre der primatenspezifischen Schwestergene *C15orf2* und *UPF0607* zu sein. Während der Ast, der POM121 und POM121-ähnliche Proteine enthält, Sequenzen unterschiedlicher Vertebraten beinhaltet, enthält der Ast mit NPAP1L-Sequenzen ausschließlich Säugetierproteine und die beiden Geschwisteräste mit C15orf2 und UPF0607 sind primatenspezifisch. Anhand des Baumes ist außerdem zu erkennen, dass die *NPAP1L*-Gene in Elefant (ENSLAFG00000014287 und ENSLAFG00000031777) und Hund (ENSCAFG00000014649 und ENSCAFG00000023307) das Ergebnis zweier unabhängiger Duplikationsereignisse sind, da die Sequenzen innerhalb einer Spezies miteinander näher verwandt sind, als zwischen den Spezies.

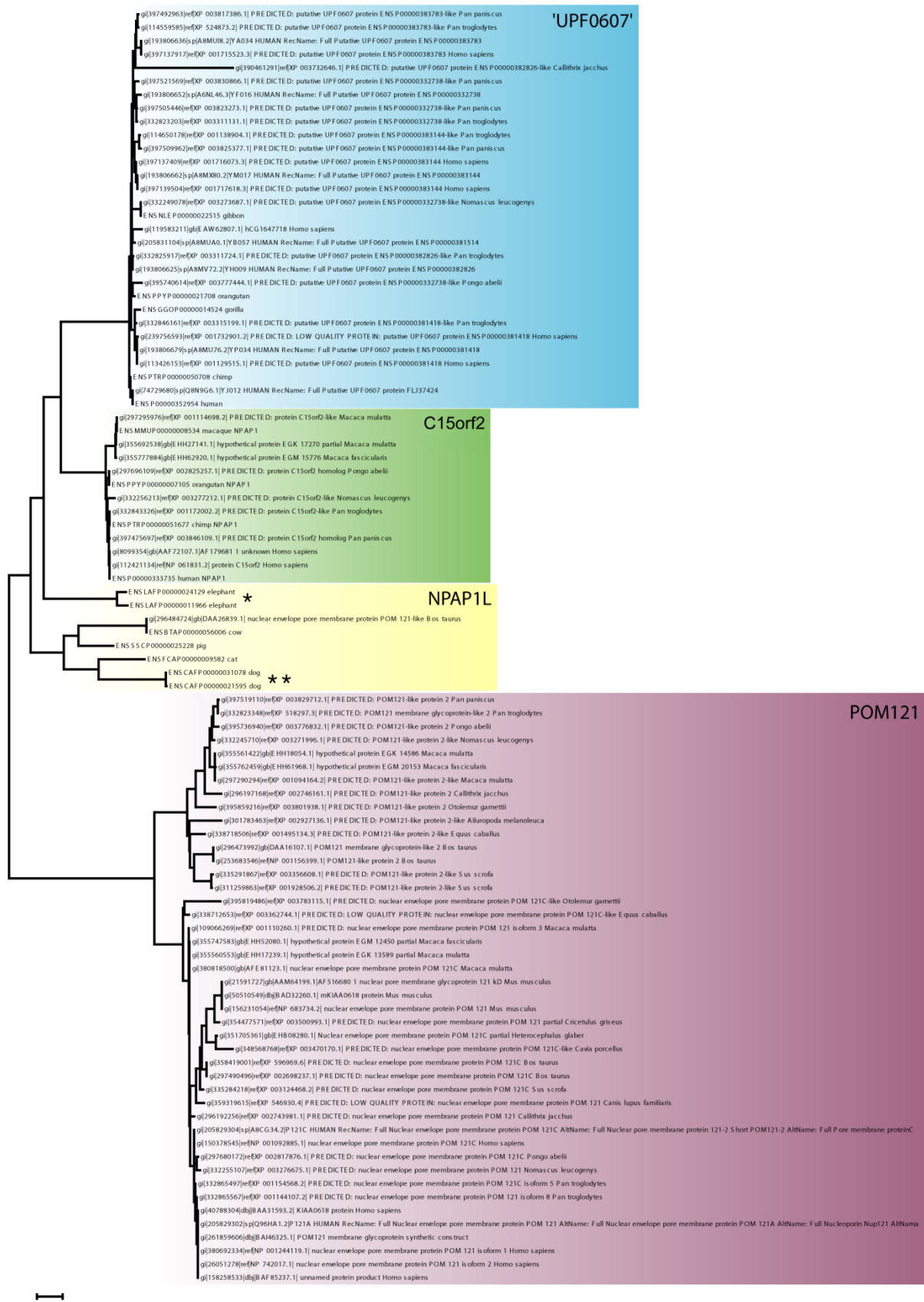


Abbildung 23: Phylogenetischer Baum der C15orf2-verwandten Proteinfamilien. Der Baum wurde mithilfe der *Maximum-Likelihood*-Methode aus allen erhaltenen Proteinsequenzen einer BLASTp-Suche sowie Ensembl-annotierten C15orf2-Homologen

erstellt. Die Topologie weist darauf hin, dass die NPAP1L-Sequenzen aus POM121 hervorgingen und die Primaten-spezifischen Proteine C15orf2 und UPF0607 von NPAP1L abstammen. Die Position der Elefanten-NPAP1L-Sequenzen (*) entspricht nicht der Position der Afrotheria innerhalb der akzeptierten Phylogenie der Säugetiere, was aber zum Teil auf die geringe Größe des Datensets zurückzuführen sein könnte (Nathalie Feiner, persönliche Kommunikation). Anhand der Zweiglängen wird deutlich, dass NPAP1L sich in Elefant (*) und Hund (***) unabhängig dupliziert hat. Der Maßstabsbalken entspricht 0,2 Substitutionen pro Position. Die Abbildung wurde von N. Feiner zur Verfügung gestellt.

5. Diskussion

5.1 Die monoallelische Expression von *C15orf2* wird vermutlich nicht durch sein Promotor-assoziiertes CpG-Island reguliert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die monoallelische Expression des *C15orf2*-Gens, die für das fetale Gehirn bereits bekannt war, auch im adulten Gehirn nachgewiesen. An insgesamt fünf informativen Polymorphismen in zwei Individuen wurde jeweils nur eines der Allele in der mRNA detektiert. Da kein Material von den Eltern der Spender vorhanden war, konnte die elterliche Herkunft des exprimierten Allels hier nicht bestimmt werden. Die Position des Gens innerhalb der genomischen Region 15q11q13 und der Nachweis einer paternalen Expression im fetalen Gehirn legen aber die Vermutung nahe, dass *C15orf2* vom paternalen Allel exprimiert wird (Wawrzik *et al.* 2010).

Die Methylierungsanalyse des Promotor-CpG-Islands von *C15orf2* zeigte eine überwiegende Methylierung in Blut und Gehirn. Im Hinblick auf die monoallelische Expression des Gens im Gehirn war dieses Ergebnis überraschend, da geprägte Gene häufig von DMRs in Promotor-CpG-Islands reguliert werden, die dann auf dem exprimierten Allel unmethyliert sind (Reik und Walter 2001). In der informativen Gehirnprobe wurden geringe Unterschiede in der Gesamtmethylierung der Allele gefunden, sowie etwas stärkere Unterschiede in kleinen, wenige CpG-Positionen umfassenden Subregionen. Auch an diesen Positionen wurden auf dem stärker methylierten Allel höchstens 1,5-mal mehr methylierte CpGs detektiert. Auffallend war, dass sowohl die Methylierungsmuster als auch die allelspezifischen Methylierungsunterschiede große Ähnlichkeit zwischen Gehirn und Blut aufwiesen, obwohl in Blut als einzigem untersuchten Gewebe keine Expression der *C15orf2*-mRNA nachgewiesen werden konnte (Wawrzik 2009). Es ist daher fraglich, ob die Expression von *C15orf2* durch die CpG-Island-Methylierung reguliert wird. Da das CpG-Island erst 50 bp *downstream* des Transkriptionsstartpunktes von *C15orf2* beginnt, entspricht es auch nicht dem typischen Bild eines CpG-reichen Promotors, bei dem das CpG-Island üblicherweise *upstream* eines Gens liegt oder den Transkriptionsstart überspannt (Gardiner-Garden und Frommer 1987; Reik und Walter 2001).

Die Frage ist daher, welcher andere Mechanismus die monoallelische Expression von *C15orf2* im Gehirn reguliert. Da die Existenz eines Poly-A-Schwanzes am 3'-Ende der *C15orf2*-mRNA in dieser Arbeit verifiziert wurde, ist nicht davon auszugehen, dass die Detektion der monoallelischen Expression auf eine ungespleißte Prä-mRNA der *SNRPN*-

Transkriptionseinheit zurückgeht. Es kann auch nicht als wahrscheinlich angesehen werden, dass *C15orf2* Teil einer weiteren Transkriptvariante des *SNRPN*-Locus ist, da es erstens nicht gelungen ist, das *C15orf2*-Transkript an ein *PWRN1*-Exon anzuschließen, für das alternatives Spleißen auf *SNRPN-upstream*-Exons nachgewiesen wurde (Wawrzik *et al.* 2009), zweitens keine überzeugende Spleiß-Akzeptorsequenz in oder *upstream* der *C15orf2*-5'UTR identifiziert werden konnte und drittens keine Teilsequenzen (*expressed sequence tags*, ESTs) dieser Art in den Datenbanken vorhanden sind. Trotzdem kann diese Möglichkeit derzeit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Auch wenn *C15orf2* nicht Teil des *SNRPN*-Locus ist, könnte zwischen der monoallelischen Expression von *C15orf2* und der monoallelischen Expression der überspannenden *SNRPN-upstream*-Transkripte dennoch ein Zusammenhang bestehen. Für einen solchen Zusammenhang sprechen die ähnlichen Expressionsmuster von *PWRN1* und *C15orf2* mit biallelischer Expression in Testis und monoallelischer Expression im fetalen Gehirn (Buiting *et al.* 2007). Da im Gehirn, wo *PWRN1*-enthaltende *SNRPN-upstream*-Transkripte detektiert wurden (Wawrzik *et al.* 2009), das Chromatin im Bereich von *C15orf2* auf einem Allel geöffnet vorliegt, wäre es vorstellbar, dass dies den *C15orf2*-Promotor für *trans*- oder *cis*-agierende Faktoren zugänglich macht, die die Transkription ermöglichen, ohne dass die DNA-Methylierung beeinflusst wird. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die Transkription im Gehirn von einem bisher unentdeckten alternativen Promotor reguliert wird. In der Arbeit von Färber und Kollegen, in der *C15orf2* identifiziert wurde, wurde ein *C15orf2*-Trankript per Northern-Blot detektiert, dessen Länge von ca. 3,5 kbp mit den dort publizierten Start- und Endpunkten des Gens übereinstimmt (Färber *et al.* 2000). Da in dieser Arbeit die Expression aber nur in Testis nachgewiesen wurde, muss die dort detektierte Transkriptgröße nicht zwangsläufig mit der im Gehirn übereinstimmen. In den Daten des ENCODE-Projektes (Dunham *et al.* 2012) sind in der *C15orf2-upstream*-Region keine promotortypischen Histonmodifikationen wie Histon3-Acetylierung oder Histon3-Lysin4-Methylierung zu finden. Allerdings gibt es auch am bisher angenommenen Promotor keine solchen Modifikationen in der Datenbank.

5.2 *C15orf2* codiert für ein NPC-assoziiertes Protein

Die Ergebnisse aus *in silico*-Analysen, hochauflösender Mikroskopie und der Fraktionierung der Zellkernhülle legen insgesamt nahe, dass es sich bei *C15orf2* um ein NPC-assoziiertes Protein handelt. C-terminal der Transmembranregion von POM121 zeigt *C15orf2* eine hohe Sequenzähnlichkeit zu diesem Membran-NUP. Bei der Erstbeschreibung von POM121,

wurde dieser Teil des Proteins als „nucleoporin-like“ (Nukleoporin-ähnlich) beschrieben, da er *FG-Repeats* enthält, die bereits von NUPs des zentralen Kanals des NPC bekannt waren (Hallberg *et al.* 1993). Es wird angenommen, dass Transportrezeptoren mit den *FG-Repeat*-Motiven der intrinsisch unstrukturierten NUPs im zentralen Kanal interagieren, um den Transport von Makromolekülen zu ermöglichen (Lim *et al.* 2007; Strambio-De-Castillia *et al.* 2010; Yang 2011). C15orf2 ist zwar ebenfalls intrinsisch unstrukturiert, enthält aber keine *FG-Repeats*. Daher ist eine Funktion beim selektiven Transport im zentralen Kanal eher nicht wahrscheinlich. Die genaue Funktion von C15orf2 am NPC ist mit bioinformatischen Methoden schwer vorherzusagen, da es keine vorhersagbare Sekundärstruktur besitzt. Proteine, die in ihrer gesamten Länge intrinsisch unstrukturiert sind, besitzen von sich aus keine definierte 3-dimensionale Struktur. Trotzdem sind spezifische Interaktionen mit anderen Proteinen möglich und einige intrinsisch unstrukturierte Proteine bilden bindungsabhängige Tertiärstrukturen aus (Dyson und Wright 2005).

Trotz intensiver Bemühungen konnte keine Zelllinie gefunden werden, die das C15orf2-Protein in zuverlässig detektierbarer Weise endogen exprimiert. Eine mögliche Erklärung für die Schwierigkeiten, eine geeignete Zelllinie zu finden, könnte die mangelnde Sensitivität der zur Verfügung stehenden Antikörper sein. In der T-REx-293-C15orf2-Zelllinie waren die Antikörpersignale mit dem Anti-FLAG-Antikörper auch im direkten Vergleich deutlich stärker als die Signale der anti-C15orf2-Antikörper (Daten nicht gezeigt). Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass das C15orf2-Protein nur in postmitotischen Zellen exprimiert wird und deshalb in keiner Zelllinie zu finden ist. In diesem Fall könnte das Protein möglicherweise nach neuronaler Differenzierung humaner iPSCs in postmitotischen Zellen detektiert werden.

Wie nach den *in silico*-Ergebnissen zu erwarten, wurde C15orf2 nach ektoptischer Expression in der nukleären Peripherie humaner Zellen detektiert und zeigte dort Co-Lokalisation mit Komponenten der Zellkernhülle. Diese Beobachtung stand im Widerspruch zu Ergebnissen von Wawrzik und Kollegen, die eine nukleoplasmische Lokalisation von C15orf2 in HEK- und HeLa-Zellen beobachtet hatten (Wawrzik *et al.* 2010). Diese Ergebnisse wurden allerdings nach transients Transfektion der Zellen erzielt, wodurch die Transgen-Expression sehr viel höher war, als in der hier beschriebenen stabilen Zelllinie, die C15orf2 von nur einer Kopie im Genom exprimiert. Der Expressionsunterschied wurde durch Western-Blot-Vergleiche der Proteinlysate transient transfizierter Zellen und induzierter T-REx-293-C15orf2-Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte eine erneute

Auswertung der C15orf2-Immunfluoreszenzanalysen von Wawrzik und Kollegen, dass auch einige der transient transfizierten Zellen eine randbetonte Färbung des Zellkerns aufwiesen (Daten nicht gezeigt). In derselben Arbeit wurden auch immunhistochemische Färbungen von Hirnschnitten gezeigt, in denen C15orf2 im Cytoplasma von Neuronen detektiert wurde. Diese Beobachtung steht jedoch nicht nur zu den hier vorgestellten Ergebnissen im Widerspruch, sondern auch zu den Immunfluoreszenzfärbungen derselben Arbeit, sowie zu der *in silico*-Vorhersage der Zellkernlokalisation von C15orf2. Es könnte sich möglicherweise um ein Artefakt der *post mortem*-Lagerung der Proben von 4-96 h im Vorfeld der Immunhistochemie handeln (Wawrzik *et al.* 2010).

Das Flp-InTM T-RExTM-System, das zur Generierung der stabilen Expressionszelllinie verwendet wurde, ermöglicht eine gezielte Genintegration und stellt durch konstante Selektion sicher, dass alle Zellen der Linie genetisch identisch sind (Ward *et al.* 2011). Da in den induzierten T-REx293-C15orf2-Zellen trotzdem deutliche Expressionsunterschiede zu erkennen waren, wurde eine genetische Heterogenität der Zelllinie zusätzlich durch das Subklonieren einzelner Zellen ausgeschlossen. Auch für eine Zellzyklus-abhängige Regulation von *C15orf2* konnten keine Hinweise gefunden werden. Als weitere mögliche Ursache käme eine posttranskriptionelle oder posttranslationelle Genregulation als Mechanismus infrage, die durch positive oder negative *Feedbackloops* zu erheblichen Unterschieden der Proteinkonzentration trotz gleichbleibender Transkription führen könnte. Die Frage bliebe aber, ob und warum diese hypothetischen *Feedbackloops* in einzelnen Zellen unterschiedlich reguliert wären oder ob stochastische Effekte für die Unterschiede verantwortlich sein könnten.

Die beobachteten Kernhüllen-Einstülpungen bei hohen C15orf2-Konzentrationen ähneln den Zellen von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progerie, einem Syndrom, das durch Lamin-A-Mutationen hervorgerufen wird (Eriksson *et al.* 2003; Shumaker *et al.* 2006) (vergl. Abb 5 und Abb. 14B). Interessanterweise wurden ähnliche Formen der Zellkernhülle auch nach *Knock-down* beider humaner *POM121*-Gene in HeLa-Zellen sowie nach Überexpression einer verkürzten Form von NUP153 in BHK-Zellen beobachtet (Bastos *et al.* 1996; Funakoshi *et al.* 2007). Möglicherweise stört C15orf2 die Integrität der Zellkernhülle wenn es in sehr großen Mengen in der Zelle vorliegt. Da solche oder ähnliche Effekte nach Überexpression eines anderen nukleären Proteins (FTO) mit dem Flp-InTM T-RExTM-System niemals beobachtet wurden (Berulava *et al.* 2013 und Tea Berulava, persönliche Kommunikation), handelt es sich vermutlich nicht um einen generellen zytotoxischen Effekt der Überexpression eines

nukleären Proteins, sondern um einen spezifischen Effekt von C15orf2.

Die hochauflösende Mikroskopie mit der 3D-SIM-Methode hat gezeigt, dass C15orf2 in der unmittelbaren Nähe der NPCs auf der nukleoplasmatischen Seite der Zellkernhülle lokalisiert ist. Es scheint zudem mit der Kernlamina in einer Ebene zu liegen und dabei mit den Laminen zu alternieren. Die Antikörpersignale für C15orf2 haben klar definierte Formen, die in ihren Dimensionen denen des NPCs ähneln, während die Antikörpersignale für Lamine, welche ein filamentöses Netzwerk bilden, transparenter erscheinen und nicht klar räumlich definiert sind (vergl. Abb. 16 und 17). Die Ähnlichkeit von C15orf2-Signalen und den NPCs könnte möglicherweise auf die Existenz von C15orf2-Aggregaten hinweisen, die NPC-Erweiterungen in den nukleoplasmatischen Raum bilden. Derartige Interpretationen sind allerdings mit Vorsicht zu behandeln, da zum einen die ektopische Expression von C15orf2 den Eindruck verfälschen könnte und zum anderen die Antikörperdetektionsmethoden bei C15orf2 und dem NPC unterschiedlich waren (siehe Material und Methoden 3.2.8).

Nach Anwendung einer publizierten Kernhüllen-Fraktionierungsmethode (Cronshaw *et al.* 2002; Matunis 2006), wurde C15orf2 sowohl in der NUP-angereicherten Fraktion als auch in der Lamin-angereicherten Fraktion detektiert. Die Detektion bestimmter NUPs in beiden Fraktionen des Cronshaw-Protokolls wurde bereits von einer anderen Gruppe berichtet und im Falle der NUPs NUP153 und NUP53 als Indiz für deren Interaktion mit der Kernlamina gewertet (Hawryluk-Gara *et al.* 2005). Cronshaw und Kollegen hatten gezeigt, dass die NUP-angereicherte Fraktion größtenteils aus NUPs und NPC-assoziierten Proteinen besteht. Auf Basis seiner Detektion in dieser Fraktion, in Kombination mit NPC-Co-Lokalisationsstudien, wurde beispielsweise das NUP ALADIN identifiziert (Cronshaw *et al.* 2002). Daher kann die Detektion von C15orf2 in der NUP-angereicherten Kernhüllenfraktion gemeinsam mit den Ergebnissen der 3D-SIM-Analysen als starkes Indiz für eine enge Assoziation mit dem NPC gewertet werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte NPC-Assoziation von C15orf2 ist auch im Hinblick auf seine positive Selektion in Primaten interessant, da bei einem Genprodukt der positiv selektierten „Morpheus“-Genfamilie ebenfalls Co-Lokalisation mit dem NPC beobachtet wurde, woraufhin dieses Protein „NPC-interacting protein“ (NPIP) genannt wurde (Johnson *et al.* 2001). Die Gene der „Morpheus“-Familie durchliefen während der Evolution von Menschen und Menschenaffen eine Reihe von segmentalen Duplikationen auf dem humanen Chromosom 16 und erlangten dabei innerhalb kurzer Zeit eine bemerkenswerte Variabilität durch positive Selektion. Die Proteine NPIP und C15orf2 besitzen jedoch keine signifikante

Sequenzhomologie.

Der NPC und NPC-assoziierte Proteine haben eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen, beispielsweise beim nukleo-zytoplasmatischen Transport von Proteinen und mRNA, in der Zellzyklusregulation, bei der RNA-Biogenese sowie bei der transkriptionellen Regulation. Die letzten drei genannten Punkte wurden vor allem den Komponenten des nukleären Korbs zugeschrieben (Strambio-De-Castilla *et al.* 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen nicht für Funktionen von C15orf2 in der transkriptionellen Regulation oder beim mRNA-Transport. Die genaue Funktion von C15orf2 am NPC wäre von großem Interesse, vor allem wenn man über seine mögliche Rolle in der Entwicklung des PWS spekulieren möchte. In der Literatur sind eine Reihe humaner Erbkrankheiten beschrieben, deren Verbindungen zu Nukleoporinen nachgewiesen wurde. Dazu gehört das Achalasia-Addisonianism-Alacrima (AAA- oder „Triple-A“-) Syndrom, das durch autosomal rezessive Mutationen in dem Nukleoporin ALADIN verursacht wird (Cronshaw und Matunis 2003; Huebner *et al.* 2004; Vallet *et al.* 2012). Weitere Beispiele sind die autosomal rezessive Form der infantilen bilateralen striatalen Nekrose, die durch *missense*-Mutationen in *NUP62* verursacht wird, eine Form von atrialer Fibrillation, die mit *NUP155* in Verbindung gebracht wird, sowie eine unvollständig penetrante, dominante Suszeptibilität für akute nekrotisierende Enzephalopathie, verursacht durch *NUP358*-Mutationen (Basel-Vanagaite *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2008; Neilson *et al.* 2009). Auffällig ist, dass trotz der offensichtlichen Bedeutung des NPC in allen Zellen des Körpers drei der vier genannten Erkrankungen auch neurologische Merkmale aufweisen. Möglicherweise besitzen neuronale Zellen also eine erhöhte Anfälligkeit für Störungen des NPC. Bezogen auf das NPC-assoziierte C15orf2 würde dies sowohl mit den Ergebnissen von Wawrzik und Kollegen zusammenpassen, die die Expression des C15orf2-Proteins in unterschiedlichen Hirnregionen nachgewiesen haben, als auch mit dem vermuteten neurologischen Ursprung vieler PWS-Symptome (Swaab 1997; Wawrzik *et al.* 2010).

Die Ergebnisse der Proteinanalysen zeigen insgesamt, dass C15orf2 mit NPCs oder mit NPC-verbundenen molekularen Netzwerken assoziiert ist. Die genaue Funktion von C15orf2 am NPC ist ein interessantes, wenn auch schwieriges Thema für zukünftige Forschung.

5.3 *C15orf2* gehört zu einer *POM121*-verwandten Familie von Retrogenen

Im evolutionären Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *C15orf2* in höheren Primaten konserviert ist und zu einer Genfamilie gehört, die auf das Membrannukleoporin-Gen *POM121* zurückgeht.

C15orf2-Orthologe in der 15q11q13-orthologen Syntäniegruppe wurden in allen untersuchten Mitgliedern der Primaten-Parvordnungen Plathyrrhini und Catarrhini gefunden und sind vermutlich nach der Trennung der Unterordnungen Haplorhini und Strepsirrhini in diese Genregion integriert. Die im Rahmen dieser Arbeit vervollständigte Sequenz des Weißbüschelaffen-Orthologs wies mit ca. 70 % eine geringere Sequenzübereinstimmung mit dem humanen Gen auf als die Orthologe der Catharrhini (84 - 98 %). Die geringere Übereinstimmung war aber aufgrund der größeren evolutionären Distanz zu erwarten und ist vergleichbar mit der Sequenzübereinstimmung von Mensch- und Totenkopffäffchen-*C15orf2* (ca. 72 %). In der Weißbüschelaffen-Gensequenz konnte kein orthologer, intronloser ORF gefunden werden, dessen Umfang mit den Catharrhini-ORFs vergleichbar wäre. Dennoch sprechen die zahlreichen Indels, die über einen langen Abschnitt des Gens hinweg Vielfache von 3 bp sind, sehr dafür, dass das Weißbüschelaffen-*C15orf2* proteincodierendes Potenzial besitzt. Dieses Muster weist auf eine negative Selektion gegen *Frameshifts* in der codierenden Sequenz hin, da 1bp-Indels etwa zehnmals häufiger entstehen als 3bp-Indels (de la Chaux *et al.* 2007). Für die Vorhersage des Weißbüschelaffen-ORFs wurden zwei alternative Methoden, eine Geneious-ORF-Vorhersage und eine GENSCAN-Genvorhersage, angewandt. Beide ORF-Vorhersagemethoden führten zu ähnlich glaubwürdigen Ergebnissen. Welche der Vorhersagen zutrifft, könnte durch Expressionsanalysen mit RT-PCRs, die Introns aus der GENSCAN-Vorhersage überspannen, geklärt werden. Leider konnte ein solches Experiment im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da kein geeignetes Probenmaterial von Weißbüschelaffen vorhanden war. Für die GENSCAN-Vorhersage spricht, dass das vorhergesagte Protein die größere Sequenzabdeckung des humanen Proteins aufweist, wodurch größere funktionelle Übereinstimmung zu erwarten wäre. Dagegen spricht aber, dass diese Vorhersage zwei kleine Introns enthält, die vermutlich nicht aus dem ancestralen Gen stammen (siehe unten). Die *de novo* Entstehung von Introns wird als ein eher seltenes Ereignis im Vergleich zum Intronverlust angesehen (Kaessmann *et al.* 2009). Daher stellt ein verkürzter intronloser ORF im Weißbüschelaffen möglicherweise die wahrscheinlichere Vorhersage dar.

Das mutmaßliche *C15orf2*-anzestrale Gen, das hier *NPAPIL* genannt wird, wurde in allen untersuchten Plazentatieren außer Nagetieren in einer oder zwei Kopien in der 9q21-orthologen Region gefunden und ist vermutlich nach der Trennung von Beuteltieren und Plazentatieren durch Retrotransposition von *POM121* entstanden. Auf Grundlage der Position der Nagetiere innerhalb des Säugetierstammbaumes ist davon auszugehen, dass *NPAPIL* dort sekundär verloren gegangen ist (Abb. 24). In Maus und Ratte ist die Syntanie der 9q21-orthologen Region unterbrochen. Da die Teilung zwischen den Genen *TLE4* (murines Chr.19) und *TLE1* (murines Chr. 4) vorliegt, könnte ein dort lokalisiertes *NPAPIL* bei chromosomalen Veränderungen verloren gegangen sein. Dagegen spricht allerdings die Situation im Meerschweinchen, welches ebenfalls kein *NPAPIL* besitzt, jedoch konservierte Syntanie der Region aufweist. Vermutlich führten unbekannte Mechanismen demnach schon im Vorfeld der chromosomalen Veränderungen zum Verlust von *NPAPIL*.

Die *NPAPIL*-Expressionsanalyse am Rind zeigte eine Expression der mRNA überwiegend im zentralen Nervensystem. Allerdings war die mRNA nicht der Vorhersage entsprechend gespleißt, sondern wurde co-linear mit der DNA exprimiert. Dies ist mit der Proteinvorhersage in der Ensembl-Datenbank (1045 AS) nicht vereinbar, jedoch besteht die Möglichkeit, dass stattdessen ein 895 AS langes Protein von einem 2688 bp intronlosen ORF in der Gensequenz exprimiert wird. Selbst wenn das bovine Ortholog keine proteincodierende Funktion besitzt, könnten die *NPAPIL*-Gene anderer Säugetiere für Proteine codieren. Auffällig ist jedoch, dass die Zweige des *Maximum-Likelihood*-Baumes im Ast der *NPAPIL*-Orthologe deutlich länger sind, als in den Ästen von *POM121*, *C15orf2* und *UPF0607* (vergl. Abb. 23). Die Proteine auf den anderen Ästen scheinen demnach stärker evolutionär konserviert zu sein.

Der phylogenetische Baum aus *C15orf2*-homologen Proteinsequenzen in NCBI und Ensembl zeigt eine Verwandtschaft der Gene *C15orf2*, *UPF0607*, *NPAPIL* und *POM121*. *POM121* ist ein Vertebraten-spezifisches Nukleoporin-Gen mit langen hochkonservierten Introns (Neumann *et al.* 2010). Während die meisten Vertreter der Genfamilien *C15orf2* und *UPF0607* intronlos sind, besitzen die *NPAPIL*-Genvorhersagen aus der Ensembl-Datenbank kleine Introns. Allerdings sind Länge und Position dieser Introns weder zwischen den einzelnen *NPAPIL*-Orthologen konserviert noch stimmen sie mit den *POM121*-Introns überein. Diese Introns müssten sich also sekundär gebildet haben. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen am bovinen *NPAPIL* stellen die Existenz der kleinen Introns zudem grundsätzlich infrage. Da man die Genfamilie mit *NPAPIL*, *C15orf2* und *UPF0607* somit als

primär intronlos bezeichnen kann, ist davon auszugehen, dass die Introns von *POM121* während einer Genduplikation durch Retrotransposition verlorengegangen sind. Aus diesem Retrotranspositionsereignis ging nach der Aufspaltung der Beutel- und Plazentatiere der gemeinsame Vorläufer von *C15orf2*, *NPAP1L* und *UPF0607* hervor (Abb. 24).

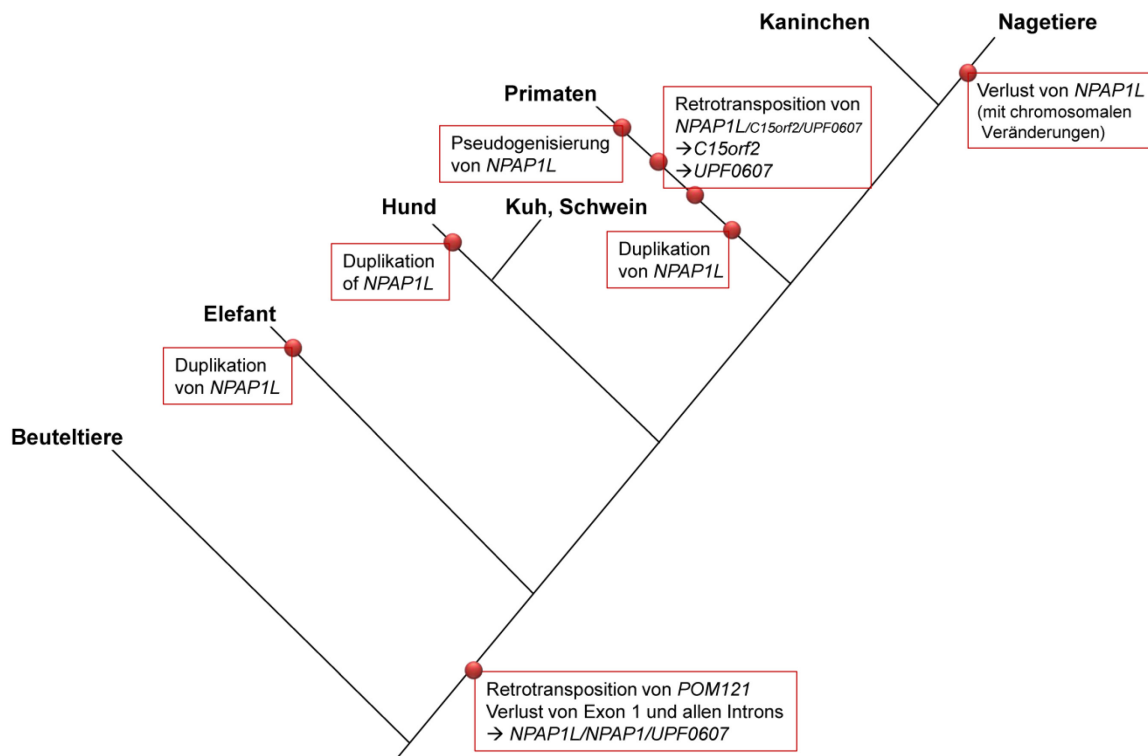


Abbildung 24: Evolutionärer Ablauf der Ereignisse, die zu der Entstehung der *C15orf2*-Genfamilie führten. Der schematische phylogenetische Baum zeigt die Säugetier-Evolution sowie die ungefähren evolutionären Zeitpunkte (rote Punkte) der Retrotranspositionen, segmentalen Duplikationen und Genverluste, die minimal angenommen werden müssen, um die beobachtete Verteilung der *C15orf2*-verwandten Gene in Säugetieren zu erklären. Im Zweig der Primaten müssen die eingezeichneten vier Ereignisse stattgefunden haben, die genaue Reihenfolge kann jedoch nach den bisherigen Erkenntnissen nicht definiert werden.

Zusätzlich zu den *POM121*-Introns ging während dieses Retrotranspositionsereignisses wohl auch das erste Exon, das die Transmembrandomäne beinhaltet, verloren, denn keines der Tochtergene codiert für ein Membranprotein. Der Verlust von 5'-Genabschnitten ist typisch für Retrotranspositionsereignisse, da die reverse Transkription am 3'Ende der mRNA beginnt (Ding *et al.* 2006). Während der Vermehrung des L1-Retrotransposons, dessen Enzymmaschinerie für Retrotranspositionsereignisse in Säugetieren verantwortlich ist, im Genom werden deshalb nur etwa 5 % der Kopien zu neuen aktiven Retrotransposons (Kusakabe *et al.* 2001). Während der frühen Primatenevolution, nach der Trennung von

Strepsirrhini und Haplorrhini, kam es vermutlich zu zwei weiteren (unabhängigen) Retrotranspositionen des *NPAPIL*-Gens, die zu den Schwestergenen *C15orf2* und *UPF0607* führten (Abb. 24). Obwohl in diesen Fällen die Retrotransposition nicht durch Intronverluste belegt ist, ist dieser Mechanismus dennoch wahrscheinlich, da die Kopien sich in beiden Fällen auf anderen Chromosomen befinden. Zudem sind keine Hinweise auf eine Duplikation der chromosomalen Umgebung der Gene zu finden, wie es bei einer segmentalen Genduplikation zu erwarten wäre.

5.4 Allgemeine Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *C15orf2* für ein NPC-assoziiertes Protein codiert und auf ein biologisch wichtiges Nukleoporin-Gen der Vertebraten zurückgeht. Es könnte somit wichtige primatenspezifische Funktionen am NPC besitzen, die in guter Übereinstimmung mit der positiven Selektion des Gens in der Primatenlinie wären. Aus den neuen Erkenntnissen ergeben sich eine Reihe von interessanten Fragen und Anregungen für weiterführende Experimente:

1. Wie wird die monoallelische Expression von *C15orf2* reguliert?

Als mögliche Regulationsmechanismen für die monoallelische Expression von *C15orf2* im Gehirn wurden eine Kopplung an die *PWRNI*-Expression oder ein bisher unbekannter alternativer *Upstream*-Promotor diskutiert. Für die unvoreingenommene Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes von *C15orf2* im Gehirn wäre ein 5'RACE-Experiment sinnvoll, mit dem ein Transkript in 5'-Richtung verlängert und der Transkriptbeginn per PCR und Sequenzierung ermittelt werden kann. Dieses Experiment wurde bereits begonnen, konnte aber bisher noch nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

2. Welche Funktion hat das Protein am NPC?

Es wurde gezeigt, dass *C15orf2* von *POM121* abstammt. Die primäre Aufgabe von *POM121* ist die Verankerung des NPCs in der nukleären Doppelmembran, es besitzt aber auch *FG-Repeats* im C-terminalen Teil und könnte an der Permeabilitätsbarrierefunktion des NPC beteiligt sein (Hallberg *et al.* 1993; Antonin *et al.* 2005; Stavru *et al.* 2006). Beide Funktionen scheiden für *C15orf2* aus, da die Transmembrandomäne nicht in der neu-beschriebenen Genfamilie konserviert ist und die *FG-Repeats* bei *C15orf2* fehlen. Retrotranspositionen führen häufig zu neuen Genfunktionen und es sind Beispiele für junge Retrogene bekannt, die in der zum Menschen führenden Primatenlinie entstanden sind und in denen positiv selektierte Aminosäureaustausche zu funktionellen Veränderungen geführt haben (Burki und Kaessmann

2004; Rosso *et al.* 2008a; Rosso *et al.* 2008b; Kaessmann *et al.* 2009).

Da die Überexpression des Proteins keine Hinweise auf die genaue Funktion von *C15orf2* geliefert hat, sollte die Suche nach Zelllinien mit endogener *C15orf2*-Expression fortgesetzt werden, um Konsequenzen des Gen-*Knock-downs* analysieren zu können. Eventuell könnten auch *C15orf2-Knock-outs* einer positiven Primatenspezies (z.B. Weißbüschelaffe) sinnvoll sein. Die Funktion von *C15orf2* ist möglicherweise neuronenspezifisch, da das Protein bisher nur im Gehirn nachgewiesen wurde und immunhistochemische Färbungen die spezifische Expression in Neuronen suggerieren (Wawrzik *et al.* 2010). Allerdings wurden bisher außer Testis noch keine weiteren Gewebe auf die Expression des Proteins untersucht.

3. Welche Funktion haben die im Gen enthaltenen piRNAs?

Es ist nicht auszuschließen, dass auch das in *C15orf2* enthaltene piRNA-Cluster eine Funktion im Gehirn besitzt. Für einige piRNAs wurden Funktionen bei der Informations-speicherung im Nervensystem der Meeresschnecke *Aplysia californica* nachgewiesen (Rajasethupathy *et al.* 2012). Allerdings ist die Funktion von piRNAs in der Keimbahn besser etabliert und mit mehr Beispielen belegt (Girard *et al.* 2006; Aravin *et al.* 2007; Siomi *et al.* 2011; Ishizu *et al.* 2012). Schon in der ersten Arbeit, die *C15orf2* beschrieb, wurde eine hohe mRNA-Expression in Testis gezeigt (Färber *et al.* 2000), obwohl kein Protein der korrekten Größe in diesem Gewebe exprimiert wird (Wawrzik 2009). Möglicherweise ist der primäre Zweck des Gens in Keimzellen daher die Expression der piRNAs, während das *C15orf2*-Protein eine neuronenspezifische Funktion besitzt.

4. Ist NPAPIL in der 9q21-orthologen Region ebenfalls geprägt?

Dies ist besonders im Hinblick auf die ungeklärte Regulation der *C15orf2*-Prägung interessant, da in diesem Fall davon auszugehen wäre, dass auch die zuständigen regulatorischen Elemente während der Genduplikation weitergegeben wurden. Keine der beiden humanen *NPAPIL*-Kopien auf Chromosom 9 besitzt ein Promotor-CpG-Island. Dieses hat sich also vermutlich nach der Entstehung von *C15orf2* gebildet oder war dort bereits vorhanden. Bisher konnte die allelische Expression von *NPAPIL* in der Kuh aus zeitlichen und materialökonomischen Gründen noch nicht analysiert werden. Die derzeitige Sicht auf die Entstehung geprägter Gencluster spricht allerdings eher dafür, dass *C15orf2* diese Art der Regulierung als Konsequenz seiner Integration in die geprägte Region 15q11q13 erworben hat.

5. Welche Relevanz hat der Funktionsverlust von *C15orf2* für die Symptomatik des PWS?

Diese entscheidende Frage ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht zu beantworten, da sowohl über die genaue Funktion des NPC-assoziierten Proteins als auch über die Funktion des piRNA-Clusters nur spekuliert werden kann. Während das *SNORD116*-snoRNA-Cluster für den Großteil des PWS-Phänotyps verantwortlich zu sein scheint, könnten andere paternal exprimierte Gene wie *C15orf2* durchaus zu einzelnen Symptomen beitragen. Bisher waren alle Bemühungen, den vollen PWS-Phänotyp im Mausmodell zu erzeugen, erfolglos. Vor allem zeigt keines der bisher generierten Mausmodelle den Adipositas-Phänotyp (Gabriel *et al.* 1999; Chamberlain *et al.* 2004; Skryabin *et al.* 2007; Ding *et al.* 2008; Bervini und Herzog 2013). Man könnte daher vorsichtig spekulieren, dass das Fehlen von *C15orf2* in der Maus einer der Faktoren sein könnte, die zu diesen Unterschieden beitragen. Eine PWS-relevante Funktion von *C15orf2* ist also nicht auszuschließen und sollte deshalb zur weiteren Charakterisierung des Gens und Proteins Anlass geben.

6. Zusammenfassung

Die chromosomale Region 15q11q13 enthält ein Cluster geprägter Gene, die entweder nur vom paternalen oder nur vom maternalen Chromosom exprimiert werden. Der Funktionsverlust paternal exprimierter Gene führt zum Prader-Willi-Syndrom. Obwohl der Funktionsverlust der *SNORD116*-Gene für die meisten Symptome des PWS verantwortlich zu sein scheint, könnten auch andere paternal exprimierte Gene eine Rolle spielen. Eines der geprägten Gene in der Region ist *C15orf2*, das im fetalen Gehirn ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert wird und dessen monoallelische Expression im Rahmen dieser Arbeit auch im adulten Gehirn nachgewiesen wurde. Im Promotorbereich von *C15orf2* befindet sich ein großes CpG-Insel, von dem vermutet wurde, dass es an der Regulation der genomischen Prägung und Genexpression von *C15orf2* beteiligt sei. Wie hier jedoch gezeigt wurde, ist das CpG-Insel im Gehirn überwiegend methyliert und spielt für die Regulation der Expression vermutlich keine große Rolle.

C15orf2 codiert für ein 1156 AS großes Protein mit sechs Kernlokalisierungssignalen. Eine Protein-BLAST-Analyse sowie eine Analyse mit dem Signaturerkennungsprogramm InterProScan wiesen auf Sequenzhomologie mit dem Membrannukleoporin POM121 hin. Um herauszufinden, ob das *C15orf2*-Protein an den Kernporen lokalisiert ist, wurde eine stabile Zelllinie generiert, die FLAG-markiertes *C15orf2* induzierbar exprimiert. In Immunfluoreszenzstudien an dieser Zelllinie wurde *C15orf2* in der Zellkernperipherie detektiert, wo es mit NPCs und der Kernlamina co-lokalisiert war. Sehr hohe ektopische Expression führte in einigen Zellen zu einem Phänotyp mit Invaginationen der Zellkernhülle, die auf eine Störung der Kernhüllenintegrität bei unphysiologisch hohen *C15orf2*-Konzentrationen hinwies. Mit drei-dimensionaler strukturierte Illuminationsmikroskopie wurde die Kernhülle lichtmikroskopisch noch besser aufgelöst und eine spezifische Lokalisation von *C15orf2* auf der nukleären Seite der NPCs beobachtet. Die NPC-Assoziation wurde zusätzlich mit einer Kernhüllen-Fraktionierungs-Methode biochemisch bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass *C15orf2* Teil des NPCs oder der NPC-assoziierten molekularen Netzwerke ist. Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde vom „HUGO Gene Nomenclature Committee“ der neue Name „Nuclear pore associated protein 1“ (NPAP1) für *C15orf2* festgelegt.

Das *C15orf2*-Gen besitzt kein murines Ortholog, war aber während der Primatenevolution einer starken positiven Selektion unterlegen und könnte daher wichtige primatenspezifische Funktionen besitzen. Im evolutionsbiologischen Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass

C15orf2 erst während der Primatenevolution in die chromosomale Region 15q11q13 integriert ist. In anderen Säugetieren, aber nicht in Nagetieren, wurden dagegen *C15orf2*-homologe Sequenzen gefunden, die hier *NPAPIL* genannt werden. Die *NPAPIL*-Gene in Säugetieren teilen Syntanie mit zwei humanen Pseudogenen auf Chromosom 9. Eine phylogenetische Analyse offenbarte die Existenz einer Genfamilie, die von dem vertebratenspezifischen Membrannukleoporin-Gen *POM121* abstammt. Anders als *POM121* sind die anderen Mitglieder der Familie, *NPAPIL*, *NPAP1* und *UPF0607*, intronlos oder besitzen kleine, sekundär gebildete Introns. Daher ist ihr gemeinsamer Vorfahre vermutlich durch Retrotransposition von *POM121* während einer frühen Phase der Säugetierevolution entstanden. *NPAPIL* unterlief in einigen Säugetierlinien segmentalen Duplikationen und ist in Nagetieren sekundär verloren gegangen. In der Primatenlinie führten vermutlich zwei weitere Retrotranspositionereignisse zu den Schwestergenen *C15orf2* und *UPF0607*, während *NPAPIL* hier zu einem Pseudogen wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass *C15orf2* von dem Nukleoporin-Gen *POM121* abstammt und zu einer Familie von säuger- und primatenspezifischen Retrogenen gehört.

7. Literaturverzeichnis

- Abbe E (1873) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **9**(1), 413-418.
- Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P und Losson R (2001) Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(4), 1422-6.
- Anaka M, Lynn A, McGinn P und Lloyd VK (2009) Genomic imprinting in Drosophila has properties of both mammalian and insect imprinting. *Development Genes and Evolution* **219**(2), 59-66.
- Angulo M, Castro-Magana M, Mazur B, Canas JA, Vitollo PM und Sarrantonio M (1996) Growth hormone secretion and effects of growth hormone therapy on growth velocity and weight gain in children with Prader-Willi syndrome. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* **9**(3), 393-400.
- Antonin W, Franz C, Haselmann U, Antony C und Mattaj IW (2005) The integral membrane nucleoporin pom121 functionally links nuclear pore complex assembly and nuclear envelope formation. *Molecular Cell* **17**(1), 83-92.
- Aravin AA, Hannon GJ und Brennecke J (2007) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* **318**(5851), 761-4.
- Babak T, Deveale B, Armour C, Raymond C, Cleary MA, van der Kooy D, Johnson JM und Lim LP (2008) Global survey of genomic imprinting by transcriptome sequencing. *Current biology : CB* **18**(22), 1735-41.
- Baptiste E, Charlebois RL, MacLeod D und Brochier C (2005) The two tempos of nuclear pore complex evolution: highly adapting proteins in an ancient frozen structure. *Genome biology* **6**(10), R85.
- Barlow DP (2011) Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annual Review of Genetics* **45**, 379-403.
- Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K und Schweifer N (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* **349**(6304), 84-7.
- Bartolomei MS (2009) Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes & Development* **23**(18), 2124-33.
- Bartolomei MS, Zemel S und Tilghman SM (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* **351**(6322), 153-5.
- Basel-Vanagaite L, Muncher L, Straussberg R, Pasmanik-Chor M, Yahav M, Rainshtein L, Walsh CA, Magal N, Taub E, Drasinover V, *et al.* (2006) Mutated nup62 causes autosomal recessive infantile bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* **60**(2), 214-22.

- Bastos R, Lin A, Enarson M und Burke B (1996) Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153. *J Cell Biol* **134**(5), 1141-56.
- Bell AC und Felsenfeld G (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**(6785), 482-5.
- Beneduzzi D, Iyer AK, Trarbach EB, Silveira-Neto AP, Silveira LG, Tusset C, Yip K, Mendonca BB, Mellon PL und Latronico AC (2011) Mutational analysis of the necdin gene in patients with congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* **165**(1), 145-50.
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**(2), 142-8.
- Bernad R, Engelsma D, Sanderson H, Pickersgill H und Fornerod M (2006) Nup214-Nup88 nucleoporin subcomplex is required for CRM1-mediated 60 S preribosomal nuclear export. *J Biol Chem* **281**(28), 19378-86.
- Berulava T, Ziehe M, Klein-Hitpass L, Mladenov E, Thomale J, Ruther U und Horsthemke B (2013) FTO levels affect RNA modification and the transcriptome. *European journal of human genetics : EJHG* **21**(3), 317-23.
- Bervini S und Herzog H (2013) Mouse models of Prader-Willi Syndrome: A systematic review. *Frontiers in Neuroendocrinology*.
- Bestor TH und Ingram VM (1983) Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(18), 5559-63.
- Betran E, Thornton K und Long M (2002) Retroposed new genes out of the X in Drosophila. *Genome Research* **12**(12), 1854-9.
- Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, Rademacher K, Guala A, Enklaar T, Anichini C, *et al.* (2013) The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Human Molecular Genetics* **22**(3), 544-57.
- Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B und Brannan CI (2000) De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nature Genetics* **25**(1), 74-8.
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**(1), 6-21.
- Bischof JM, Stewart CL und Wevrick R (2007) Inactivation of the mouse Magel2 gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **16**(22), 2713-9.

- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, *et al.* (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics* **21**(3), 285-8.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B und Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**(5551), 2536-9.
- Buiting K (2010) Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* **154C**(3), 365-76.
- Buiting K, Dittrich B, Ende S und Horsthemke B (1997) Identification of novel exons 3' to the human SNRPN gene. *Genomics* **40**(1), 132-7.
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Greger V, Lalande M, Robinson W, Mutirangura A, Ledbetter D und Horsthemke B (1993) Molecular definition of the Prader-Willi syndrome chromosome region and orientation of the SNRPN gene. *Hum Mol Genet* **2**(12), 1991-4.
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Burger J, Nothen MM, *et al.* (1998) Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *American Journal of Human Genetics* **63**(1), 170-80.
- Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, Wawrzik M, Gross S und Horsthemke B (2007) C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* **89**(5), 588-95.
- Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD und Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature Genetics* **9**(4), 395-400.
- Burke B und Ellenberg J (2002) Remodelling the walls of the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**(7), 487-97.
- Burke B und Stewart CL (2013) The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**(1), 13-24.
- Burki F und Kaessmann H (2004) Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nature Genetics* **36**(10), 1061-3.
- Butler MG und Palmer CG (1983) Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **1**(8336), 1285-6.
- Carrel AL, Myers SE, Whitman BY und Allen DB (1999) Growth hormone improves body composition, fat utilization, physical strength and agility, and growth in Prader-Willi syndrome: A controlled study. *The Journal of pediatrics* **134**(2), 215-21.
- Cattanach BM (1986) Parental origin effects in mice. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **97 Suppl**, 137-50.

- Cattanach BM und Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**(6019), 496-8.
- Cavaille J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J und Huttenhofer A (2000) Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(26), 14311-6.
- Cedar H und Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics* **10**(5), 295-304.
- Chai J-H, Locke DP, Ohta T, Greally JM und Nicholls RD (2001) Retrotransposed genes such as *Frat3* in the mouse Chromosome 7C Prader-Willi syndrome region acquire the imprinted status of their insertion site. *Mammalian Genome* **12**(11), 813-821.
- Chamberlain SJ und Brannan CI (2001) The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine *Ube3a* antisense transcript but represses paternal *Ube3a*. *Genomics* **73**(3), 316-22.
- Chamberlain SJ, Johnstone KA, DuBose AJ, Simon TA, Bartolomei MS, Resnick JL und Brannan CI (2004) Evidence for genetic modifiers of postnatal lethality in PWS-IC deletion mice. *Hum Mol Genet* **13**(23), 2971-7.
- Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N, Dawson C, Lucifero D, Frontera M, James K, Dean W und Kelsey G (2009) Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes & Development* **23**(1), 105-17.
- Cowley M und Oakey RJ (2010) Retrotransposition and genomic imprinting. *Briefings in functional genomics* **9**(4), 340-6.
- Cowley M und Oakey RJ (2013) Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome. *PLoS Genetics* **9**(1), e1003234.
- Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT und Matunis MJ (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**(5), 915-27.
- Cronshaw JM und Matunis MJ (2003) The nuclear pore complex protein ALADIN is mislocalized in triple A syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 5823-7.
- Davis TL, Trasler JM, Moss SB, Yang GJ und Bartolomei MS (1999) Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* **58**(1), 18-28.
- de la Chaux N, Messer PW und Arndt PF (2007) DNA indels in coding regions reveal selective constraints on protein evolution in the human lineage. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 191.

- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepetowski P, Hammadouche T, Vandenberghe A, Stewart CL, *et al.* (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *American Journal of Human Genetics* **70**(3), 726-36.
- de Smith AJ, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Van Haelst MM, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, *et al.* (2009) A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet* **18**(17), 3257-65.
- DeChiara TM, Robertson EJ und Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**(4), 849-59.
- Denning DP, Patel SS, Uversky V, Fink AL und Rexach M (2003) Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5), 2450-5.
- Devos D, Dokudovskaya S, Williams R, Alber F, Eswar N, Chait BT, Rout MP und Sali A (2006) Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(7), 2172-7.
- Ding F, Li HH, Zhang S, Solomon NM, Camper SA, Cohen P und Francke U (2008) SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PLoS One* **3**(3), e1709.
- Ding W, Lin L, Chen B und Dai J (2006) L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *IUBMB life* **58**(12), 677-85.
- Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, *et al.* (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nature Genetics* **14**(2), 163-70.
- Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, *et al.* (2010) Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* **18**(11), 1196-201.
- Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, Epstein CB, Frietze S, Harrow J, Kaul R, *et al.* (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**(7414), 57-74.
- Dyson HJ und Wright PE (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3), 197-208.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**(5), 1792-7.

- Edwards CA, Mungall AJ, Matthews L, Ryder E, Gray DJ, Pask AJ, Shaw G, Graves JA, Rogers J, Dunham I, *et al.* (2008) The evolution of the DLK1-DIO3 imprinted domain in mammals. *PLoS Biology* **6**(6), e135.
- El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, *et al.* (2001) Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nature Genetics* **27**(3), 341-4.
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, *et al.* (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**(6937), 293-8.
- Esnault C, Maestre J und Heidmann T (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics* **24**(4), 363-7.
- Färber C, Dittrich B, Buiting K und Horsthemke B (1999) The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Human Molecular Genetics* **8**(2), 337-43.
- Färber C, Gross S, Neesen J, Buiting K und Horsthemke B (2000) Identification of a testis-specific gene (C15orf2) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* **65**(2), 174-83.
- Feil R und Berger F (2007) Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends in genetics : TIG* **23**(4), 192-9.
- Ferguson-Smith AC (2011) Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nature reviews. Genetics* **12**(8), 565-75.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S und Reik W (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**(7347), 398-402.
- Fischer S (2006) Molekulargenetische Untersuchung des Okulo-Aurikulo-Vertebralen Spektrums (OAVS). Inaugural Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Essen
- Fischer S, Ludecke HJ, Wiczorek D, Bohringer S, Gillessen-Kaesbach G und Horsthemke B (2006) Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of BAPX1 in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet* **15**(4), 581-7.
- Fontanillas P, Hartl DL und Reuter M (2007) Genome organization and gene expression shape the transposable element distribution in the *Drosophila melanogaster* euchromatin. *PLoS Genetics* **3**(11), e210.
- Fournier C, Goto Y, Ballestar E, Delaval K, Hever AM, Esteller M und Feil R (2002) Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *The EMBO journal* **21**(23), 6560-70.

- Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG und Rauscher FJ, 3rd (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & Development* **10**(16), 2067-78.
- Fujiwara K, Hasegawa K, Ohkumo T, Miyoshi H, Tseng YH und Yoshikawa K (2012) Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells. *PLoS One* **7**(1), e30948.
- Funakoshi T, Maeshima K, Yahata K, Sugano S, Imamoto F und Imamoto N (2007) Two distinct human POM121 genes: requirement for the formation of nuclear pore complexes. *FEBS Lett* **581**(25), 4910-6.
- Gabriel JM, Merchant M, Ohta T, Ji Y, Caldwell RG, Ramsey MJ, Tucker JD, Longnecker R und Nicholls RD (1999) A transgene insertion creating a heritable chromosome deletion mouse model of Prader-Willi and angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 9258-63.
- Gardiner-Garden M und Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* **196**(2), 261-82.
- Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A und Liebaers I (2003) Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Human Molecular Genetics* **12**(22), 2873-9.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ und Carmell MA (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **442**(7099), 199-202.
- Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, Saitoh S, Niikawa N, Schinzel A, Horsthemke B und Driscoll DJ (1993) Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Human Molecular Genetics* **2**(9), 1377-82.
- Gray TA, Saitoh S und Nicholls RD (1999) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(10), 5616-21.
- Haig D (2004) Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annual Review of Genetics* **38**, 553-85.
- Haig D und Graham C (1991) Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell* **64**(6), 1045-6.
- Hall JG (1990) Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *American Journal of Human Genetics* **46**(5), 857-73.
- Hallberg E, Wozniak RW und Blobel G (1993) An integral membrane protein of the pore membrane domain of the nuclear envelope contains a nucleoporin-like region. *J Cell Biol* **122**(3), 513-21.

- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM und Tilghman SM (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**(6785), 486-9.
- Hase ME und Cordes VC (2003) Direct interaction with nup153 mediates binding of Tpr to the periphery of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* **14**(5), 1923-40.
- Hata K, Okano M, Lei H und Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**(8), 1983-93.
- Hawryluk-Gara LA, Shibuya EK und Wozniak RW (2005) Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex. *Mol Biol Cell* **16**(5), 2382-94.
- Hell SW (2009) Microscopy and its focal switch. *Nat Methods* **6**(1), 24-32.
- Herold A, Klymenko T und Izaurralde E (2001) NXF1/p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in Drosophila. *RNA* **7**(12), 1768-80.
- Hetzer MW, Walther TC und Mattaj IW (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 347-80.
- Hirokawa T, Boon-Chieng S und Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**(4), 378-9.
- Hollis GF, Hieter PA, McBride OW, Swan D und Leder P (1982) Processed genes: a dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing. *Nature* **296**(5855), 321-5.
- Horsthemke B und Buiting K (2006) Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenetic and Genome Research* **113**(1-4), 292-9.
- Horsthemke B und Buiting K (2008) Genomic imprinting and imprinting defects in humans. *Advances in Genetics* **61**, 225-46.
- Horsthemke B und Wagstaff J (2008) Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *American journal of medical genetics. Part A* **146A**(16), 2041-52.
- Huang B, Bates M und Zhuang X (2009) Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem* **78**, 993-1016.
- Huber MD und Gerace L (2007) The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. *The Journal of cell biology* **179**(4), 583-4.
- Huebner A, Kaindl AM, Knobloch KP, Petzold H, Mann P und Koehler K (2004) The triple A syndrome is due to mutations in ALADIN, a novel member of the nuclear pore complex. *Endocr Res* **30**(4), 891-9.

- Huibregtse JM, Scheffner M und Howley PM (1993) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and Cellular Biology* **13**(2), 775-84.
- Ishizu H, Siomi H und Siomi MC (2012) Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development* **26**(21), 2361-73.
- Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc JL, Cau P, *et al.* (1997) The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nature Genetics* **17**(3), 357-61.
- Jeffs P und Ashburner M (1991) Processed pseudogenes in *Drosophila*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **244**(1310), 151-9.
- Johnson ME, Viggiano L, Bailey JA, Abdul-Rauf M, Goodwin G, Rocchi M und Eichler EE (2001) Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature* **413**(6855), 514-9.
- Jones PA und Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**(5532), 1068-70.
- Jong MT, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM und Nicholls RD (1999a) Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. *Human Molecular Genetics* **8**(5), 795-803.
- Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ und Nicholls RD (1999b) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Human Molecular Genetics* **8**(5), 783-93.
- Kaessmann H (2010) Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome Research* **20**(10), 1313-26.
- Kaessmann H, Vinckenbosch N und Long M (2009) RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nature reviews. Genetics* **10**(1), 19-31.
- Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, *et al.* (2010) The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genetics* **6**(6), e1000992.
- Kanber D, Giltay J, Wiczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B und Buiting K (2009) A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* **17**(5), 582-90.

- Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, Ohlsson R und Lobanenkov VV (2000) Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Current biology : CB* **10**(14), 853-6.
- Karin M und Richards RI (1982) Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature* **299**(5886), 797-802.
- Kauffman MG, Noga SJ, Kelly TJ und Donnenberg AD (1990) Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation. *Analytical Biochemistry* **191**(1), 41-6.
- Killian JK, Byrd JC, Jirtle JV, Munday BL, Stoskopf MK, MacDonald RG und Jirtle RL (2000) M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. *Molecular Cell* **5**(4), 707-16.
- Kishino T, Lalonde M und Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genetics* **15**(1), 70-3.
- Kito K, Ito T und Sakaki Y (1997) Fluorescent differential display analysis of gene expression in differentiating neuroblastoma cells. *Gene* **184**(1), 73-81.
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Jr., Lalonde M und Latt SA (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *American Journal of Medical Genetics* **32**(2), 285-90.
- Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS und Ogawa H (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* **428**(6985), 860-4.
- Kosiol C, Vinar T, da Fonseca RR, Hubisz MJ, Bustamante CD, Nielsen R und Siepel A (2008) Patterns of positive selection in six Mammalian genomes. *PLoS Genet* **4**(8), e1000144.
- Kozlov SV, Bogenpohl JW, Howell MP, Wevrick R, Panda S, Hogenesch JB, Muglia LJ, Van Gelder RN, Herzog ED und Stewart CL (2007) The imprinted gene Magel2 regulates normal circadian output. *Nature Genetics* **39**(10), 1266-72.
- Krull S, Dorries J, Boysen B, Reidenbach S, Magnusius L, Norder H, Thyberg J und Cordes VC (2010) Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *The EMBO journal* **29**(10), 1659-73.
- Kusakabe T, Sugimoto Y, Maeda T, Nakajima Y, Miyano M, Nishikawa J, Tone S, Kawaguchi Y, Koga K und Ohyama T (2001) Linearization and integration of DNA into cells preferentially occurs at intrinsically curved regions from human LINE-1 repetitive element. *Gene* **274**(1-2), 271-81.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.

- Latos PA, Pauler FM, Koerner MV, Senergin HB, Hudson QJ, Stocsits RR, Allhoff W, Stricker SH, Klement RM, Warczok KE, *et al.* (2012) Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing. *Science* **338**(6113), 1469-72.
- Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL und Wevrick R (2000) Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Human Molecular Genetics* **9**(12), 1813-9.
- Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL und Tilghman SM (1995) An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes & Development* **9**(17), 2079-89.
- Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P und Ferguson-Smith AC (2008) A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Developmental Cell* **15**(4), 547-57.
- Lim RY, Fahrenkrog B, Koser J, Schwarz-Herion K, Deng J und Aebi U (2007) Nanomechanical basis of selective gating by the nuclear pore complex. *Science* **318**(5850), 640-3.
- Long M und Langley CH (1993) Natural selection and the origin of jingwei, a chimeric processed functional gene in Drosophila. *Science* **260**(5104), 91-5.
- Lubinsky M, Herrmann J, Koseff AL und Opitz JM (1974) Letter: Autosomal-dominant sex-dependent transmission of the Wiedemann-Beckwith syndrome. *Lancet* **1**(7863), 932.
- Lucas B, Grigo K, Erdmann S, Lausen J, Klein-Hitpass L und Ryffel GU (2005) HNF4alpha reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene* **24**(42), 6418-31.
- Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS und Trasler JM (2004) Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Human Molecular Genetics* **13**(8), 839-49.
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JA, Jeffreys AJ und Pembrey ME (1991) Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* **337**(8743), 694-7.
- Mapendano CK, Kishino T, Miyazaki K, Kondo S, Yoshiura K, Hishikawa Y, Koji T, Niikawa N und Ohta T (2006) Expression of the Snurf-Snrpn IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *Journal of Human Genetics* **51**(3), 236-43.
- Markaki Y, Smeets D, Fiedler S, Schmid VJ, Schermelleh L, Cremer T und Cremer M (2012) The potential of 3D-FISH and super-resolution structured illumination microscopy for studies of 3D nuclear architecture: 3D structured illumination microscopy of defined chromosomal structures visualized by 3D (immuno)-FISH opens new perspectives for studies of nuclear architecture. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**(5), 412-26.

- Maruyama K, Usami M, Aizawa T und Yoshikawa K (1991) A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **178**(1), 291-6.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM und Beaudet AL (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nature Genetics* **15**(1), 74-7.
- Mattaj IW (2004) Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**(1), 65-9.
- Matunis MJ (2006) Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes. *Methods* **39**(4), 277-83.
- McGrath J und Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**(1), 179-83.
- Mercer RE und Wevrick R (2009) Loss of magel2, a candidate gene for features of Prader-Willi syndrome, impairs reproductive function in mice. *PLoS One* **4**(1), e4291.
- Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA und Markham AF (2000) Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters* **468**(2-3), 109-14.
- Miller NL, Wevrick R und Mellon PL (2009) Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development. *Hum Mol Genet* **18**(2), 248-60.
- Moore T und Haig D (1991) Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in genetics : TIG* **7**(2), 45-9.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51 Pt 1**, 263-73.
- Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, *et al.* (2011) Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Human Molecular Genetics* **20**(16), 3188-97.
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, *et al.* (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biology* **9**(1), 64-71.
- Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K und Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Human Molecular Genetics* **13**(21), 2547-55.

- Neilson DE, Adams MD, Orr CM, Schelling DK, Eiben RM, Kerr DS, Anderson J, Bassuk AG, Bye AM, Childs AM, *et al.* (2009) Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. *Am J Hum Genet* **84**(1), 44-51.
- Neumann LC, Markaki Y, Mladenov E, Hoffmann D, Buiting K und Horsthemke B (2012) The imprinted NPAP1/C15orf2 gene in the Prader-Willi syndrome region encodes a nuclear pore complex associated protein. *Human Molecular Genetics* **21**(18), 4038-48.
- Neumann N, Lundin D und Poole AM (2010) Comparative genomic evidence for a complete nuclear pore complex in the last eukaryotic common ancestor. *PLoS One* **5**(10), e13241.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S und Lalande M (1989) Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**(6247), 281-5.
- Nielsen R, Bustamante C, Clark AG, Glanowski S, Sackton TB, Hubisz MJ, Fledel-Alon A, Tanenbaum DM, Civello D, White TJ, *et al.* (2005) A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. *PLoS Biol* **3**(6), e170.
- Ohshima K, Hattori M, Yada T, Gojobori T, Sakaki Y und Okada N (2003) Whole-genome screening indicates a possible burst of formation of processed pseudogenes and Alu repeats by particular L1 subfamilies in ancestral primates. *Genome biology* **4**(11), R74.
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, *et al.* (1999) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *American Journal of Human Genetics* **64**(2), 397-413.
- Okano M, Bell DW, Haber DA und Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3), 247-57.
- Ozcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A und Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nature Genetics* **2**(4), 265-9.
- Pauler FM, Koerner MV und Barlow DP (2007) Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? *Trends in genetics : TIG* **23**(6), 284-92.
- Pollard KS, Serre D, Wang X, Tao H, Grundberg E, Hudson TJ, Clark AG und Frazer K (2008) A genome-wide approach to identifying novel-imprinted genes. *Human Genetics* **122**(6), 625-34.
- Potter SC, Clarke L, Curwen V, Keenan S, Mongin E, Searle SM, Stabenau A, Storey R und Clamp M (2004) The Ensembl analysis pipeline. *Genome Research* **14**(5), 934-41.

- Prader A (1956) Ein syndrome von adipositas, kleinwuchs, kryptorchismus und oligophreniee nach myatonieartigerm zustand im Neugeborenenalter. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift. Journal Suisse de Medecine* **86**, 1260-1261.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD und Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *The Journal of biological chemistry* **274**(46), 33002-10.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R und Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* **33**(Web Server issue), W116-20.
- Rabinovitz S, Kaufman Y, Ludwig G, Razin A und Shemer R (2012) Mechanisms of activation of the paternally expressed genes by the Prader-Willi imprinting center in the Prader-Willi/Angelman syndromes domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(19), 7403-8.
- Raices M und D'Angelo MA (2012) Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**(11), 687-99.
- Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T und Kandel ER (2012) A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* **149**(3), 693-707.
- Rapkins RW, Hore T, Smithwick M, Ager E, Pask AJ, Renfree MB, Kohn M, Hameister H, Nicholls RD, Deakin JE, *et al.* (2006) Recent assembly of an imprinted domain from non-imprinted components. *PLoS Genetics* **2**(10), e182.
- Rees WA, Yager TD, Korte J und von Hippel PH (1993) Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* **32**(1), 137-44.
- Reese KJ, Lin S, Verona RI, Schultz RM und Bartolomei MS (2007) Maintenance of paternal methylation and repression of the imprinted H19 gene requires MBD3. *PLoS Genetics* **3**(8), e137.
- Reik W und Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature reviews. Genetics* **2**(1), 21-32.
- Renfree MB, Hore TA, Shaw G, Graves JA und Pask AJ (2009) Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes. *Annual review of genomics and human genetics* **10**, 241-62.
- Rosso L, Marques AC, Reichert AS und Kaessmann H (2008a) Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. *PLoS Genetics* **4**(8), e1000150.
- Rosso L, Marques AC, Weier M, Lambert N, Lambot MA, Vanderhaeghen P und Kaessmann H (2008b) Birth and rapid subcellular adaptation of a hominoid-specific CDC14 protein. *PLoS Biology* **6**(6), e140.

- Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L und Lalande M (1998) An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nature Genetics* **19**(1), 15-6.
- Royo H und Cavaille J (2008) Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **100**(3), 149-66.
- Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B und Buiting K (2001) The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Human Molecular Genetics* **10**(23), 2687-700.
- Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW und Beaudet AL (2008) Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* **40**(6), 719-21.
- Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, König R, Malcolm S, Horsthemke B und Nicholls RD (1996) Minimal definition of the imprinting center and fixation of chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(15), 7811-5.
- Saitoh S und Wada T (2000) Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *American Journal of Human Genetics* **66**(6), 1958-62.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**(12), 5463-7.
- Santoro F und Barlow DP (2011) Developmental control of imprinted expression by macro non-coding RNAs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**(4), 328-35.
- Scaffidi P, Gordon L und Misteli T (2005) The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biology* **3**(11), e395.
- Scheffner M, Nuber U und Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**(6509), 81-3.
- Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MG, *et al.* (2008) Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science* **320**(5881), 1332-6.
- Schermelleh L, Heintzmann R und Leonhardt H (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **190**(2), 165-75.
- Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, 3rd und Gerace L (2003) Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* **301**(5638), 1380-2.

- Schmauss C, McAllister G, Ohosone Y, Hardin JA und Lerner MR (1989) A comparison of snRNP-associated Sm-autoantigens: human N, rat N and human B/B'. *Nucleic Acids Research* **17**(4), 1733-43.
- Senkel S, Waldner C, Ryffel GU und Thomas H (2009) Improved conditional expression systems resulting in physiological level of HNF4alpha expression confirm HNF4alpha induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *BMC Res Notes* **2**, 210.
- Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS, *et al.* (2006) Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(23), 8703-8.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D und Aravin AA (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**(4), 246-58.
- Skryabin BV, Gubar LV, Seeger B, Pfeiffer J, Handel S, Robeck T, Karpova E, Rozhdestvensky TS und Brosius J (2007) Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation. *PLoS Genet* **3**(12), e235.
- Smits G, Mungall AJ, Griffiths-Jones S, Smith P, Beury D, Matthews L, Rogers J, Pask AJ, Shaw G, VandeBerg JL, *et al.* (2008) Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians. *Nature Genetics* **40**(8), 971-6.
- Soejima H und Wagstaff J (2005) Imprinting centers, chromatin structure, and disease. *Journal of Cellular Biochemistry* **95**(2), 226-33.
- Stavru F, Nautrup-Pedersen G, Cordes VC und Gorlich D (2006) Nuclear pore complex assembly and maintenance in POM121- and gp210-deficient cells. *The Journal of cell biology* **173**(4), 477-83.
- Strambio-De-Castillia C, Niepel M und Rout MP (2010) The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(7), 490-501.
- Surani MA, Barton SC und Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**(5959), 548-50.
- Surani MA, Barton SC und Norris ML (1986) Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* **45**(1), 127-36.
- Suzuki S, Ono R, Narita T, Pask AJ, Shaw G, Wang C, Kohda T, Alsop AE, Marshall Graves JA, Kohara Y, *et al.* (2007) Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genomic imprinting. *PLoS Genetics* **3**(4), e55.
- Swaab DF (1997) Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr Suppl* **423**, 50-4.

- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, *et al.* (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**(5929), 930-5.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M und Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**(10), 2731-9.
- Terry LJ und Wentz SR (2007) Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology* **178**(7), 1121-32.
- Thorvaldsen JL, Duran KL und Bartolomei MS (1998) Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes & Development* **12**(23), 3693-702.
- Torrents D, Suyama M, Zdobnov E und Bork P (2003) A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Research* **13**(12), 2559-67.
- Ubeda F und Gardner A (2010) A model for genomic imprinting in the social brain: juveniles. *Evolution; international journal of organic evolution* **64**(9), 2587-600.
- Vallet AE, Verschueren A, Petiot P, Vandenberghe N, Nicolino M, Roman S, Pouget J und Vial C (2012) Neurological features in adult Triple-A (Allgrove) syndrome. *J Neurol* **259**(1), 39-46.
- Vaquerizas JM, Suyama R, Kind J, Miura K, Luscombe NM und Akhtar A (2010) Nuclear pore proteins nup153 and megator define transcriptionally active regions in the *Drosophila* genome. *PLoS Genet* **6**(2), e1000846.
- Vinckenbosch N, Dupanloup I und Kaessmann H (2006) Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(9), 3220-5.
- Walther TC, Fornerod M, Pickersgill H, Goldberg M, Allen TD und Mattaj IW (2001) The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *The EMBO journal* **20**(20), 5703-14.
- Wan LB und Bartolomei MS (2008) Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. *Advances in Genetics* **61**, 207-23.
- Wang W, Brunet FG, Nevo E und Long M (2002) Origin of sphinx, a young chimeric RNA gene in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(7), 4448-53.
- Wang X, Soloway PD und Clark AG (2011) A survey for novel imprinted genes in the mouse placenta by mRNA-seq. *Genetics* **189**(1), 109-22.

- Wang X, Sun Q, McGrath SD, Mardis ER, Soloway PD und Clark AG (2008) Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain. *PLoS One* **3**(12), e3839.
- Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, Buxton BF und Jones DT (2004) The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* **20**(13), 2138-9.
- Ward RJ, Alvarez-Curto E und Milligan G (2011) Using the Flp-In T-Rex system to regulate GPCR expression. *Methods Mol Biol* **746**, 21-37.
- Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, *et al.* (2011) Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. *Science* **332**(6031), 848-52.
- Watkins NJ und Bohnsack MT (2012) The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **3**(3), 397-414.
- Wawrzik M (2009) Expressionsanalysen geprägter Gene in der Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Region. Inaugural Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Essen
- Wawrzik M, Spiess AN, Herrmann R, Buiting K und Horsthemke B (2009) Expression of SNURF-SNRPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *European journal of human genetics : EJHG* **17**(11), 1463-70.
- Wawrzik M, Unmehopa UA, Swaab DF, van de Nes J, Buiting K und Horsthemke B (2010) The C15orf2 gene in the Prader-Willi syndrome region is subject to genomic imprinting and positive selection. *Neurogenetics* **11**(2), 153-61.
- Wickramasinghe VO, McMurtrie PI, Mills AD, Takei Y, Penrhyn-Lowe S, Amagase Y, Main S, Marr J, Stewart M und Laskey RA (2010) mRNA export from mammalian cell nuclei is dependent on GANP. *Curr Biol* **20**(1), 25-31.
- Wilkins JF und Haig D (2003) What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature reviews. Genetics* **4**(5), 359-68.
- Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, Magenis RE, Moncla A, Schinzel AA, Summers JA, *et al.* (2006) Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *American journal of medical genetics. Part A* **140**(5), 413-8.
- Williamson CM, Ball ST, Dawson C, Mehta S, Beechey CV, Fray M, Teboul L, Dear TN, Kelsey G und Peters J (2011) Uncoupling antisense-mediated silencing and DNA methylation in the imprinted Gnas cluster. *PLoS Genetics* **7**(3), e1001347.
- Wood AJ, Roberts RG, Monk D, Moore GE, Schulz R und Oakey RJ (2007) A screen for retrotransposed imprinted genes reveals an association between X chromosome homology and maternal germ-line methylation. *PLoS Genetics* **3**(2), e20.

- Worman HJ und Bonne G (2007) "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Experimental Cell Research* **313**(10), 2121-33.
- Wu MY, Tsai TF und Beaudet AL (2006) Deficiency of Rbbp1/Arid4a and Rbbp111/Arid4b alters epigenetic modifications and suppresses an imprinting defect in the PWS/AS domain. *Genes & Development* **20**(20), 2859-70.
- Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF und Barlow DP (1997) Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* **389**(6652), 745-9.
- Xin Z, Allis CD und Wagstaff J (2001) Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at the Prader-Willi syndrome imprinting center. *American Journal of Human Genetics* **69**(6), 1389-94.
- Yang T, Adamson TE, Resnick JL, Leff S, Wevrick R, Francke U, Jenkins NA, Copeland NG und Brannan CI (1998) A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nature Genetics* **19**(1), 25-31.
- Yang W (2011) 'Natively unfolded' nucleoporins in nucleocytoplasmic transport: clustered or evenly distributed? *Nucleus* **2**(1), 10-6.
- Yin QF, Yang L, Zhang Y, Xiang JF, Wu YW, Carmichael GG und Chen LL (2012) Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Molecular Cell* **48**(2), 219-30.
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B und Doerfler W (1997) Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Human Molecular Genetics* **6**(3), 387-95.
- Zhang X, Chen S, Yoo S, Chakrabarti S, Zhang T, Ke T, Oberti C, Yong SL, Fang F, Li L, *et al.* (2008) Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death. *Cell* **135**(6), 1017-27.
- Zhang Z, Carriero N und Gerstein M (2004) Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes. *Trends in genetics : TIG* **20**(2), 62-7.

8. Anhang

Tabelle A1: Synthetische Oligonukleotide. Die nicht-sequenzspezifischen Tag-Sequenzen der Roche-454-Junior-Bisulfit-Primer sind fett gedruckt.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung (Abschnitt)
1	Beta-Aktin-Exon-4-5-F	TTGCTATCCAGTGCTA	3.2.1.2
2	Beta-Aktin-Exon-4-5-R	AGCACTGTGTGTACAG	3.2.1.2
3	plen47	TAGGGAGAAACCTCTAGTCTC	3.2.7.2/ 4.1.1/ 4.1.3
4	pen21	GCAGCAGGAGAGTGAACAT	3.2.7.2
5	pGTRr2	CTGGGCTAAGGCTCCGTC	4.1.1/ 4.1.3
6	plen49c	TTAACCTGCTCTCTTCCTAC	4.1.1
7	plen49cr	GTTCTGACTGGGCTCATC	4.1.1
8	plen56b	TATACATAGGGATGGATAGAC	4.1.1
9	plen56br	CTCACCTCCTAATACCATC	4.1.1
10	pc313b	ATGTTGTTTAAGCTACCAGTC	4.1.1
11	pc314r	GCACCATTGCCTAAGGAA	4.1.1
12	CGI59-SNP-fw3	AAGGTCCTAGAGGAGGCTGG	4.1.2
13	CGI59-SNP-rev4	TCGTCATCCTCCCTTCGAT	4.1.2
14	NPAP1-CG59-Bis-fw1	CTTGCTTCCTGGCACGAGTTTTTTGG TTTTGTGAGGAATT	4.1.2
15	NPAP1_CG59_Bis-rev1	CAGGAAACAGCTATGACATCTTCCTA ATAACCAACCCCAAC	4.1.2
16	NPAP1_CG59_Bis_fw3	CTTGCTTCCTGGCACGAGGGTTAGGG TTAAGGAATAGGTAGAGT	4.1.2
17	NPAP1_CG59_Bis_rev3	CAGGAAACAGCTATGACAATCAACA ATAAACTCAACTCTCCTCAA	4.1.2
18	NPAP1_CG59_Bis_fw4	CTTGCTTCCTGGCACGAGTTAAGGTT TTAGAGGAGGTTGGTAG	4.1.2
19	NPAP1_CG59_Bis_rev4	CAGGAAACAGCTATGACACCAAACA CAAATAACTAACTCTAC	4.1.2
20	SNRPN_Exon23	TCCTAACAACCACTATAAGCTTGG	4.1.3
21	SNRPN_4_rw	GATGCTTCACGGTTTTTACA	4.1.3
22	NPAP1_connect_rev1	GCCAGAGCTCTTGTCACCT	4.1.3
23	C15orf2-UPLprobe22-left	GTGACAGCATTGCCTCAGC	4.2.3.1
24	C15orf2-UPLprobe22-right	GGTCTCCTATCTGCCTGTGC	4.2.3.1
25	Marmoset_NPAP1_fw1	AAACACCCAGCTCCGTGAGGA	4.3.1
26	Marmoset_NPAP1_rev1	GGATGGGCTGGGAAGTTGTGGC	4.3.1
27	Marmoset_NPAP1_fw2	CACAACAGGCCCTGCAAAGGA	4.3.1
28	Marmoset_NPAP1_rev2	CCCCATGTAAAACGGGAGGCAC	4.3.1
29	Marmoset_NPAP1_fw3	ATCCAATTCTGGGGCTTTG	4.3.1
30	Marmoset_NPAP1_rev4	TCCAAGGTGCCAGGTCTC	4.3.1
31	Kuh-POM121L-In1-fw2	TAACTATCCCTTTGACTCCCGA	4.3.4
32	Kuh-POM121L-In1-rev2	CTGGAGCATAGATAACTGCCAA	4.3.4
33	Kuh-POM121L-In2-fw	CAAGCCTCAACTATTTGCCTG	4.3.4
34	Kuh-POM121L-In2-rev	TGGCAAACCTGAATCCATTTG	4.3.4
35	Fw2-beta-Actin-Kuh	GGCACCCAGCACAAATGAAGA	4.3.4
36	Rev2-beta-Actin-Kuh	CGACTGCTGTCACCTTACCG	4.3.4

Tabelle A2: Read-Zahlen der hochauflösenden Methylierungsanalyse mit dem Roche-454-Junior-System.

Probe	Amplikon	Allel	Anzahl analysierter Reads
Spermien 1	A	-	1251
	B	-	3205
Spermien2	A	-	1483
	B	-	2708
Blut 1	A	-	1266
	B	-	3667
Blut 2	A	Oben	590
		Unten	581
	B	Oben	1101
		Unten	1095
Adultes Gehirn 1	A'	-	4108
	B	-	3860
Adultes Gehirn 2	A'	-	1987
	B	-	3922
Adultes Gehirn 3	A	Oben	347
		Unten	381
	B	Oben	1350
		Unten	1751
Fetales Gehirn 1	A'	-	1370
	B	-	4347
Fetales Gehirn 2	A'	-	2294
	B	-	1208

Tabelle A3: Vervollständigte Sequenz des Weißbüschelaffen-C15orf2-Orthologs mit alternativen ORF-Möglichkeiten. Anfang und Ende der Sequenz orientieren sich an dem Eintrag im UCSC-Genom-Browser.

Weißbüschelaffen-C15orf2-Sequenz mit Position des GENSCAN ORFs (fett)
<p>TGCGCTCTCTGTGAACCCAGGGACACGGCCGGCCGACACAGGGCCACTGCGTGCACAGCGCTGGGCCAGGGCTGAGCTGCA GGCAGAGCTGGCGCCCGGGCGGGAAGAACTCTGGCGGATGGGACCGCGGCACTGCCACGTAGCGGCCAAGCGGGCAACA GCAGCCACCAGCCGACAGCTTCCGGGGCCGGAAGGCCGCGGGGGCTGATGGGGCCTTGACCTTGCCCTCTGACGCCGGCG TTGACGCCTACGCTGCCTCGTGAGGAACCTCGTGGAGGCGCCGAGGCCAGGCCCGTCAGACTTTGCTCGGTGCCAGAG GAGGCGGTGGCTGAGGAGAGCTGCGTCCGCTGCCGACCCCTGTCGTACGGTAGGAGCCAGAGCTACCTCGAAATGGGCAGTTT ACTGAGCAAATTTAGACCCAGTGCCTGCGGCCCTGCGGGGCCAGGGCGTGAAGCCCCGCTCCTGGCTCCGGGAC GTCTGCCCGCCCGGCCGGGCTCACTCTGCGCCACCCCGCGCCCTTCCGCGCCCTGTTCTGCCGGGAATGGGCCGTCGG <u>AGGCTCTCTCCAGCCAGCGTCTTCGTGCGCCCTGAGCGGCTGTGTCTCTCCTCGAGGGCTGCTGCCGACGCCGGTG</u> <u>GGCGTCTGCTGGCCCGGGCTGGGGGCCCCCGAGGAGACCCCTCGTGTGCTGCTCGGAACCCCCGAGGTTT</u> CAAACACCCCAGCTCCGTGAGGATTCCCTGCTCCCTAGCCGGCGCGTTCCGCCCTTGCGGCTGCCGTACCCCCCTGAGCGT <u>GCGGTCCGGGGCCCGGACGCCGTCCTCCGGCCACTGTCCCGGAGGAGACGGCGGTGCGGGCCCGAGGAGGGCCAGAG</u> <u>GAGTGAGGAAGGATGAGGCTGCGGCGCAGACGGAAGCGCCGCTGACGAGAGGAGGGCCGCCGTTCCGACCCATGA</u> <u>CGGGCATCCGCACCCGGGGCCAGGGCAGCCCGGGGACCTTCCCCCTGCAGATGCAGCGCGGAGCCTCCGGGG</u> <u>GGGACGCTGCCACGAGTGCCTCCCGGAAAACGACTTGCTGACACGGCCAGGCGTCCCGAGCGAGTCTCTGCCGGGA</u> <u>GGGTCTTCCCGAGCCAGAGCACGCAGCCAGGCCAGCCGCGCTGCATCCTGGGAAGCCCGGTCCCGACGCAGCC</u> <u>GGGGCCGCTCCCTGCTGCCGCGGAAGTCGCCGACAGAACTGCCAGGCCCGGATGTCCGCAGACCGGGTGCCCGA</u> <u>CGGAAAGCCTTCAGGTGTCCCCAAAGGAGCTGCCACAACAGGCCCTGCAAAAGGAAAATGTCGATTCCAATGC</u> <u>TGCTGCGGCTGCCCGTCACTGCCCTTGCTGTGGGATCGAGGGAGCTTCCCCACCTGCCAAGTCCCTGCCTGT</u> <u>CTGTTGAGGGAGACTGGGCACCTTGAGAAAGAGCCCGGTATAAAAGGAATCGAGAATCTTGGAGGATGAAACG</u> <u>GAGGCCATGACAGACAGCAGCGTCACCAGCCTGCCCTTCTTTCTCCCACCAGTGGAGACGACAGACTCCCTGCC</u> <u>CTGGCCACTGCCACTTCCATGTGCGAGGTCACGCTCCTCCACCATCCCTGACTTGGCTGACCTGGCTACCAGACCC</u> <u>CCCATCCTTCTGTCCCTCCACTTCCACCACACAAAGATGGGTGAGAAAATAACTCACAAATCCCTAACTCTCCTC</u></p>

TGGCTCTTCTGCTGACCTTGTTCCCGTTTTGGGGTGTCAGTCTAATGAGAAAGGAGGCTCTGTTCATTCCGGTTGAG
GTGCAGCACCTCTGCTTCTAACCCCAACACCTCTAGCCCCACACCTTCTCCCTAATACCTACCGCTGTAGATT
CCCTCCCTCTTCTCCAGTCCCTCTTCCAGTCCCTCTACCGTGACCTCAGTTATCCACAGCAAGCTGTGAAT
TCCACAACAGTCATTTCACATACACAGCAAACATCTGCCACTTAACCTCACAGACTGCAGTACACCATGAAGCA
GTTAACATGAATACTATCACCCCTTCTCAGGCTGTGTCTTCCATCTTCTCCAAGCTCTAGGGTGAGCTCTCTCCAG
TTTCCAAATACATTGCAGTACAGAGCAGAGGCCACCCAGAAAGACATCAGTCTACATAACATCCCTTACATTATATT
CAGCAGCAGAAAGCTTCTCTCCAGTGCCTGTGTCTTCCAAGCCTTCCCATCATGTCTCCACCAGACACTCCGCTT
TAGTGAACAGTGCCTCTGCACCATCATTATCCAGGCCTGCCATTGACACCAATGCTGTGAATACCACTCTCTTCCAA
GTCTGCCACCTGCACTGCCTCTGTCTCCAGGAAGAAGTGCCCTCCGCTTTTACATGGGGCTTCTGGTTCTGAGAA
CATACTGCCCATGGCAATGTGCCTCAGCCAGGCTCCACCAGCTGCCTGCACATGCAGACGGGAGACCAGCCA
CAACTTCCAATCCTTTAAATCCAGGACCCAGGCTCAGCCCCAATTTGGGGCCCCGAGGGGAGCCAGCAGAAAG
CCTCTCTCCCAAGTGCCTATGATTTTCCAAGCCTTCCCATCATGGTTCCCTCCAGACACCTCCACGTTAGTGAGCAATGC
CTCTGCAGCATCGTTATCCAAGCCTGCCATTGACACCAATGCTGTGAATACCAACCCCTCTTCCAAAATGTCTCTTG
CAGTCTACTTTGTCTCCAGGAAGGAGTACATCCGATTTATGTTGGGCCTTCTGGTTCTGAGAACACACTGCCAGT
GACAGAAAGTGCTCAGCCCCAAGTCTCCACAGTTTGCCTGCACATGGAGACGGGAGACCAGCCACAACCTCCAGCCCCATC
TTAAATACAGGAGCCATCTCTCATTTCCACTTGGGACCCTGATGAGCAGCAGAAATCTGACAGTTCTTATATTTCTG
GGAAATCCAGCAACCCAGCACCAAGTTACAGACTTGCCTCCCTTCCAGCAGAGTCAACATCACCATATTCTACATTC
GGCACACCTGTTAATGGCCAGCCAGCCAAGGCTCAACAAGCAAGTGCCTTCCCAAGTGGCATTGCAAAAGACTTCTGAA
TTTAGACTAGCCACTGGGATGCCCATCTGGGACAGTACTCAGTGGTTGGAATACTATTCTGAGCCAGCCAGCAAGAA
ATTATGGGACCAGGAACCCCTATGGATGGTGGGAGCATTGGGTTCCAGCATGCTCTCCCGGGCCCCAGTTCCACATCA
GAAGAACTCAACACTGGACAACAACAAAATGGGATACCAGCACCACTTCTGTTCCTCCCAATTTGGTCAGGGAACCTGG
GACTCAGCTGGCCACAGCATGGCTGCCTGCACCAAGGCACTAGCAACATTCCTGTATATCTTCTGCTGCCACCTAC
GTTCTGGCTTCGAGCCACTACTCAGCATTAGAGTGGGTTGATGGGAGGCGATGGCACCAACCACTAGTTGGGAG
ACCTTGTGTCTGCTTTTTCAACAGTGCATCCTGCAGCATACATGGACAGAGAAAAAGTCTACTACTTCCGGCACCCTAC
CACTATGGACAAGAAACATATGTTAAGAGACATATCTGTTACCAATTTCCATAAAGACACTGTGATTACGTCAGCCACA
CCACATCTGTGTGGTGGTAAACACCAGCATTATCCCTGTGAATGGTTTTGTTTACCTTCCATGCCAAGTGCCTGCCATGTACT
CTCCAGAACTCAGGTCATGCACCAGGAGAGGCCAACAACATCCCTGTGGTTCAAGCCCTTATGCTCCCTTCTCCATCAGTA
CACATGGGACCCACCTGAAAAAACACACGTTGTTCATCTGCAGTGAATGCCAACATACCTTTAATGGGAGCCCTGTATAT
CCACATCAACAAAGTATCTAAGGCCACCTGGACAAAACACAGATGGTACATCTCCAGGAGTGCAGTATTCACCTGTATG
GGAGGCCCTCATGTGCCATGTATCAGCAAAGCACCTGGGGTCACTGGACAAAAGCACAACCATGCAATGGGGGTGAGCA
ACATAACGGTGTGACTGGTATCCTTATGGTCTCCATTACACAAGGACACCTGAGGACCCTGGCTAAACACAGGGGGTG
CAATAGGGGATAGCCCCAGCAATTTGAGGGAGCAACCTAGTTTCCCTTCCAGTAAAAATACTATGGCAGCCACCAAA
GGTGTCTCTTTGACTTTAGAGGAACACATTGTTTTCTTTTGTGTTTTGTTTCTTGTTTTTGAGGTTGGAGTCTTGTCTCCGTA
GCTTTGCTGGAGTGCACTGGCACAATCTGTCTCCTGCACCTCCATCTCCCTGGTTCAAGCAGTCTCTCTGTCTCCCTCC
TGAGTAGCTGGACTGCAGGCACATGGCACCACCCAGTGAATTTTTGTTTATTTTAGTAGAGAGGAGTTTCTATCTTATGGT
CAGGCTGGTCTCAACACTGACCTCAAGTTATCCACCTGGCCTGCCCTCCAAAGTGCTGGAATACATTTGTGAGCCACTG
TGCTGGCCTAGAGGATCCAGCATTGTTAATTAATACTTGTGATTGGATGTCTGGTCAGAGCAACTTGGCTGTGATGGAA
AGCAGCCACTAGTGACACTTGTACCTGCCAAGGCCTTCATAGGAGCCGCCAGACCTTCTACTCCTGTAAAGGATCTCAAG
AAATAAGAACAACATCTCTTCCACATAACAGTTCTCATAAATGGATGTGTTCCAGGAAGAATGGGCTCAGTCCCTCAAGTTA
AATTAACCTTTCTCTCCACAGAGCTGGAGGCCAAAAACCGAAGAGAGAGAGAGAGTGTGTGTATGTATGTTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTTTATTGGTACTGGGGAGCAGATGAGCCCAGTCGGAACCTGCACCTGTATTGAGTGGTCTTCTACACTGTGA
GGGTAGAGGAAACCTGTATGCATCATCAGCTGCCTCTCTGACTTACTGTTAACTTGGCTGACCCTACCTCTGGCCAGT
TCTCTAGTCTTGGACAGAAAGGCAAAATTTCTGACTTTTTGGACCCTACATTTACTTGAAGGGGAGAAAAAGGAACA
AACATGTAATCATCTGATAAATAAGCCAGTAAACAATGTCTATGGAAAAATAAAGAAGTACATGGAGGATTGAGATGTAG
ATAGAAGCAGGAGTTTTTCAGACATGCCTCACTGGAAAGGTAATTTAAACAAGTCTAGAGAGAAGCAGTGGACCCAGATA
TGTGAGCAAAGATCATCCAGATCATTGCAAAAGGCTCAGAGGAAAGGATGCCTGGTGTCTCAGGAGCAGTTAGTAAGGGAA
ATGTGGGCCGGTCGCGGTGGTTCAAGCCTGTAATCCCAGCCTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGATCATGAGGTCAAGAGAT
CAAGACCCTCGTCAACAAGGTGAAACCCGCTCTACTAAAAATAAAAAAAATAGCTGGCCATGGTGGCGCTGCCTGTAATCCCAGATAATTTGGGAGGCTG
TGTAAATCCAGCTATTTGGGAGGCTGAGGTGGTGGATCAGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCTGGTCAACAAGGTGAAA
CCCTGTCTACTAAAAATAAAAAAAATAGCTGGGCATGGTGGCGCTGCCTGTAATCCCAGATAATTTGGGAGGCTG
AGGTGGGTGGATCACGAGGTCAACAGATCGAGACCCTCTGGTCAACAGGTGAAACCCCTGTCTACTAAAAATAATTTAA
AAATAGCTGGCATGGTGGCGCTGCCTGTACTCAGGAAGTGCAGGAGGAGAAATGGCTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTG
CAGTGAAGCCGAGACTCGACCTGCACCTCAGACTGGGTAATAAGAGCAGAACTCCATCTCAGAAAAAGAAAAAGTAAG
GAAATGTGGCTGGAATGGAGTCAAGCAGTGGGAGGAAAGGATAGAGAAAAAGGAGGACAGAGAAGATGTAAGTGTACTTCT
TGCTCCACTCTTACTAGTTGTAATAACAACAGTTGATTCACCTTCCAGGAATCTAGTGAATCAGTACTTTACTATGG
CCTGTGATCTCACAAGATTTTTGAAAAGGATGAAATGAAATATTACAGGGAATGACTTATAAACCATTTGTTGTAATTTGTT
TATAGATAGAGATGATAGCAGGATGGATGGATAGACTTGTATAGATAGATAGAGATAATGGACTAATGTTGTTGTCTCCAA
AAAGTTCACATTTGAAAGCCCTAACTCCTAATGCGATGGTATTAGGAGGTGGGACTTTGGGGAGGTGATTAGGTTTAGATGAG
ATCATGAGGATGAAACCCCATGATGGGATTTGTGCCTATAAGAAGAAACACCAGTCTTCCCTGTAATGCCATGTGAAGGT
GTACCAAGAATGTAGCTGCCTGTAAGCAAGGAAAAGAGGCCCTACAAGAAACAGAATTTGCCCTTACCTTGGACTCCCAAC
CTTTAGAATTATAGAAAATAAATGTATGTTGTTGAAGTATTGGTCTATGGCATTTTGTAGCAATCAGAAGTACTAATAAA
GATAGATCGATTGATAGATAGGAATATACATATATGATAGTATAGTAAAGCAAGTGAAGTTCCTTGGGCAATTTGCCTGATTG
CTTCTAGACAATCAAATAGAAGAACCCCTTTTTAGGAACATAACAAGTACTTCTTTTTATGAAGCAAACTGTAAAAATA
TGATAACTGGGACCAAACTTTAATAAGATTAGGCCTGAAAGAAAACCATTTGCAGAGAGACTACTGGATTCTCTGGTAAAC
CTGGGGCTGATTTACTACTAAGTGTGTTAGTACAGTCCAGGAGGATCAAAGCTCTGTCTCTGGCCAGATAGTACCTAC
CTTTTGAATCAGACCCTGCTTCAAGAGCAGAGTGGAAATCAGTTTCTTCTAATAGTCCACTACCCCTGCAATATTACCAG
GGACATATTTTTTTTTTTTTTTACCAGGGGCATTTTTTAAATTCATACTTCTTAACATTTTTTTTAAAAAGGCTCAAGCTAA
ATATAAATGCTATGATCCTGATAAGACAACTTTAAATAAATGTTTGAAGATATAAAGATAATTTGGTTTTCATGTTTTGAT
GTACTTACACAACGAAACTATAAACAATAGAAATATTGTTTTTTTATTAATAATAAATGAACATGATATCAATTT
GAATAAAATCAACCCTTACCATGTTCCCTCCCCAGTACGAGGTTTTTAGTACTTTAATGATATCCCATGATTTCTGAATT
TGCTTTTTACTTCAACTACTGTATTTCTACAGATTTCTATTGTTTTTCTAAATTTGAAGTGCCTTCCCTTTTTTTCTTGA
CTTTTACATAAAAAGTGTCTTGGTTTTTTTAACTTTCAAATAGTATTGTTATTGACTGAATCCCATCTTTTCCAGA
AAACTCGAGCCTCCTCACTGGTTTTGGGAGCTGTAAGACCAAAAACAG

Weißbüschelaffen-*C15orf2*-Sequenz mit Position des kurzen, intronlosen ORFs (fett, unterstrichen)

TGCGCTCTCTGTGAACCCAGGGACACGGCCGGCCGACACAGGGCCACTGCGTGCGACAGCGCTGGGCCAGGGCTGAGCTGCA
GGCAGAGCTGGCGCCCGGGCGGGAAGAACTCTGGCGGATGGGACC GGCCACTGCCACGTAGCGGCCAAGCGGGCAACA
GCAGCCACCAGCCGCAGAGCTTCCGGGGCCGAAGGCCGCGGGGGCTGATGGGGCTTGACCTTTGCCCTCTGACGCCGGCG
TTTGACGCTACGCTGCCTCGTGAGGAACCTCGTGGAGGCCGCGCAGGCCAGGCCCGTACAGCTTTGCTCGGTCGCCAGAG
GAGGCGGTGGCTGAGGAGAGCTGCGTCCGCTGCCGACCTGTCGTACGGTAGGAGCCAGAGCTACCTCGAAATGGGCAGTTT
ACTGAGCAAATTTAGACCAGTGCCGTCGTCGGCCCTGCCGGGGCCAGGGCGTGAAGCCCCGCTCTCTGGCTCCGGGAC
GTCTGCCCGCCGGCCGGGCTCACTTGCGCCACC CGCGCCCTTTCCGCGCCCTGTTCTGCCGGGAATGGGCCGTCCGA
GGTCTTCTCCAGCCAGCGTCTTCGTCGCCCTGAGCGGTGTGTCTCTCTCGAGGGCTGCTGCCGACGCCGGTGGGCGTCTT
GCTGGCCGCGGTGGGGCCCGGCCCGAGGAGACCCCTCGTGTGCTGCTGCTCGGAACCCCCGAGGTTCAAACACCCCGCAG
TCCGTGAGGATTCCTGTCCCTAGCCGGCGGTTCCGCTTGGGGTCCCGTACCCCTGAGCGTGCGGGTCGGGGCCCGGC
AGCCCGTCCCGCCACTGTCCCGGAGGAGACGGCGGTGCGGGCCCGAGGAGGCCAGAGGAGTGAGGAAGGATGAGGCTG
CGGCGCAGACGGAAGCGCCGCTGACGAGAGAGGGCCGGCTTCCGAGCCATGACGCGGCATCCGACCCCGGGGCCAGG
GCAGCCCGGGGACCTTCCCGCTGCAGATGCAGCGCGGAGCCTCCGGGGGGAGCGTGCGCCACGAGTGCCCGGAAAACG
ACTTGCCTGACACGGCCAGGCTCCCAAGCTCCCAAGCTGCTGCTGCGGAGGAGCTTCCCGAGCCAGAGCAGCAGCAGCCAG
ACGCGCGCTGCATCCTGGGAAGCCGGTCCCGACGACGCCGGGGCCGCTCCCTGCTGCCGCGGAAGTCGCCGGCAGAAGT
CCCAGGCCGCCATGTCCGCAGACCGGGTGGCCGACGGGAAGCCTTCAAGTGTTCCCCCAAGGAGCGCTGCCACAAC
AGGCCCTGCAAAAGGAAATGTCGATTCCAATGCTGCTGCCGCTGCCCCCGTCACTGCCCTTGCTGTGGGATCGAGG
GGAGCTTCCCAAACCTGCCAAGCTCCCTGCCTGCTGTTGAGGGAGACCTGGGCACCTTGGGAAGAGCCAGCCGGGT
ATAAAAGGAATCGCAGAATCTTGGAGGATGAAAACGGAGGCCATGACAGACAGCAGCGTCAACCAGCCTGCCCTTCT
TTCTCCCAACAGTGGAGCAGACAGACTCCCTGCCCTGGCCACTGCCACTTCCATGTGCGAGGTCCAGCTCCTCCA
CCCATCCCTGACTTGGCTGACCTGCTACAGACACCCCACTCTCTCTGCTCCCTCCACTTTCCACCACCAAAAGAT
GCTCAGAAAATAACACTCAATCCCTAACCTCTCTTGGCTCTTCTGCTGACTTGTTCGGTATTGGGGTCCAGT
CTAATGAGAAAGGAGGCTCTTGTCAATCGGTTGATGGTGCAGCACCCTCTGCTTCTAACCCCCAACACCTCTAGCC
CCACACCCTTCTCCCTAATACCTACCGCTGTAGATTCCCTCTCTCTTCTTCCAGCTCCTCTTCCAGTCCCTTCT
ACCGTGACCTCAGTTATCCAGCAAGCCTGTGAATTCACAACAGTCATTTCCACTATCACAGCAAACACATCTGCC
ACTTAACCTCACAGACTGCAGTAGACTGAAGCAGTTAACTGAATGAATACTATCACCCTTCTCAGGTGTGTGTTTTAC
ATCTTCTCAAGCTTAGGGTGAGCTCTCTCCAGTTCCTCAAAATACATTGCAGTACAGAGCAGGACCCAGGAA
GACATCAGTCTACATACATCCCTTACATTTATTTCCACAACACCACCCCAAGTTTAAACCAACTCTTTAGCAAAGAA
GCCATCTCAATCAATTTCTGGGGCTCTTGTGTTGATGGTGCAGCAGCAAAGGCTTCTCTCCCAAGTGCCTGTGTTTTCCA
GCCTTCCCATATTGTCCACAGACACCTCCGCTTAGTGAACAGTGCCTCTGCACCACATTATCCAGGCCTGCCAT
TGACACCAATGCTGTGAATAACACTCTCTTCCAAAGTTCAGCAGCTTGCAGTCTGCCTCTGCTCCAGGAAGAAGT
CCTCCCGTTTTACATGGGGTCTCTGTTTCTGAGAACATACTGCCCATGGCAATGTTGCCTCAGCCCAGGGTCCAC
CAGCTTGCCTGCACATGCAGAGGGGAGACCAGCAACTTCCAATATCCTTTAAATCCAGGAGCCACCGCTCAGCC
CCAATTTGGGGCCCCCGAGGGGACAGCAGCAAAGCCCTCTCTCCCAAGTGCCTATGTTTTCCAAGCCTTCCCAT
GTCTTCTCAGACACTCCACGTTAGTGAAGCAATGCTCTGCAGCATCGTTATCCAAGCCTGCCATTGACACCAATG
TGTGAATAACACCCCTCTTCCAAAAGTGTCACTTGTGAGTCTACTTTTTGCTCCAGGAAGGAGTACATCCGATTTTTAT
GTTGGGCCTTCTGGTTCTGAGAACACACTGCCAGTGACAGAAGTGCCTCAGCCCAAGTCTCCACAGTTTGCCTGCA
CATGGAGACGGGAGCCAGCCACAACCTTCCAGCCCATCTTAAATACAGGAGCCATCTCTCATTCCACACTTGGGACC
ACTGATGAGCAGCAGAAATCTGACAGTTCTTATATTCTGGGGAATCCAGCAACCCAGCAGGTTACAGACTTGCCAACTC
TTCAGCAGAGTCAACATCACCATAATTCTACATTCGGCACACCTGTTAATGGCCAGCCAGCCAAAGGGTCAACAACGCAAGTGC
TCCCCAGTGGCATTGCAAAGACTTCTGAATTTAGAGTAGCCACTGGGATGCCATCACTGGGGACAGTACCTCACTGGTTGGA
AATACTATTCTAGCCACAGGTGATTTAGGGACCAGGAACCCCTATGGATGGTGGGAGCATTGGGTTCAGCATGTCTCTCC
GGCCCCAGTTGGCCATCAGAAGAACTCAACACTGGACAACAACAAAATGGGATACCCAGCACCATTCTGCTGCTGCTGCT
GGTACGGAACTGGGACTCAGCTGGCCACAGCTGGCTGCTGCACCACAAGGCACTAGCAACACTTCTGTATATCCTTCTGC
TGCCACCTACGTTCTGGCTTCGAGCCACCTACTCAGATTAGGCAAGTGGTATGGGAGGCGATGGCACAAACCCATAGTTG
GAGGACCTTGTGTTCTGTTTTCAACAGTGCATCTGCAGCATACATGGACAGAGAAAAAGTTCTACACTTCGGGACACTAC
CACTATGGACAAGAAAACATGTTAAGAGACATATGTTACAAATTTCCATAAAGAGCACCTGTGATTCACGTCAGCCACCA
CATCTGTGTGGTTGTAACACACAGCTTATCCCTGTGATGTTTTGTTTCACTTCACTGCAAGTGCCTGCCATGACTCTC
CAGAACTCAGGTCATGCACCAGGAGAGGCCAAACAACATCCCTGTGGTTCAAGGCCCTTATGCTCCCTTCTCCATCAGTACAC
ATGGGACCCACCTGGAAAAACACACGTGGTTATCTGCAGTGAATGCCAACATACCTTTAATGGGAGGCCCTTGTATATCCA
CCTACCAACAAAGTATCTAAGGCCACCTGGACAAAACACAGATGGTACATCTCCAGGAGTGTGAGTATCACTTGTATGGG
AGGCCCTCATGTGCCATGTATCAGCAAAGCACCTGGGGTCACTGGACAAGCACAACACCAATGCAATGGGGGTCAGCAAC
ATAACGGTTGTGACTGGTTATCCTTATGGTCTCCATTACACAAGCACCTGAGGACCACCTGGCTAAACACAGGGGGTGCA
ATAGGGGATAGCCCAGACATTTGAGGGAGGAACCTTAGTTTCCCTTTCAGTAAAAATACTATGGACCTGCCAACCAAG
GTGCTCCTTTGACTTTAGAGGAACCAATGTTTTCTTTGTTTGTCTTTGTTCTTGTTTTGGAGTGGAGTCTTGTCCGTA
CTTTGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTGCTCACTGCACCTCCATCTCCCTGGTTCAAGCAGTTCCTGCTCTCCCCTCT
GAGTAGCTGGGACTGCAGGCACATGGCACACACCAGTGAATTTTTGATTTTTAGTAGAGAGGAGTTTCATCTTATTGGT
AGGCTGTCTCAAACACTGACCTCAAGTTATCCACCCGCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGAATFACATTTGTGAGCCACTGT
GCCTGGCCTAGAGGATCCAGCATTTGTAATTAATAACTTGTGATTGGATGTCCTGGTCCAGAGCAACTTTGGCCTGTGATGGAAA
GCAGCCACTAGTGACACTTGTACTTGCAGCCAGGCTTCAAGGAGGAGGCTTCACTCTCTGTTAAGGATCTCAAGA
AATAAGAACCAATCTCCTTTACATACAGTTCTCAAAATGGATGTTGTTCAGGAAGAAATGGGCTCAGTTCCCTCAAGTTAA
ATTTAACCTTTCTCTCCCTACAGAAGCTGGAGGCCAAAACCGCAAAGAGAGAGAGAGTGTGTGTATGTATGTGTGTTGTT
GTGTGTGTTTATTGGTACTGGGGAGCAGATGAGCCAGTGGAAACTGCACTGTATTTGAGTGGTCTTACACTGTGGAG
GGTAGAGGAAAACCTGTATGCATCATAGCTGCGCCCTCTGACTTACTGTTAACTTGGCTGACCTACTCTGGCCAGTTC
TCTTAGCTTGGACAGAAAGGCAAAAATTTGACTTTTTGGACCCTACATTTACTTGAAGGGGAGAAAAGAAAGAAACAA
ACATGTAATCATCTGATAAATAAGCCAGTAAACAAATGTGCTATGGAAAATAAAGAAGTACATGGAGGATTGAGATTGTAGA
TAGAAGCAGGAGTTTTTCAGACATGCCTCACTGGAAAGGTAATTTAAACAAAAGTCTAGAGAGAAGCAGTTGAGCCAGATAT
GTGAGCAAAGATCATTCCAGATCATTGCAAAGGCTCAGAGGAAAGGATGGCTGGTGTCTCAGGAGCAGTTAGTAAGGGAAA
TGTGGCCGGTCCGGTTCAGCTTCAAGCCTGTAATCCGACCTTTGGAGGCCAGGCGGGTGGATCATGAGGTCAGAGATC
AAGACCATCTGGTCAACAAGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATAAAAAAATAGCTGGGCATGGTGGCGCATGCT

GTAATCCCAGCTATTTGGGAGGCTGAGGTGGGTGGATCACGAGGTCAAGAGATCGAGACCATCCTGGTCAACAAGGTGAAAC
CCTGTCTCTACTAAAAATATAAAAAAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCGCGTGCCTGTAATCCCAGATATTTGGGAGGCTGA
GGTGGGTGGATCACGAGGTCAACAGATCGAGACCATCCTGGTCAACAAGGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATATTTTAAA
AATTAGCTGGGCATGGTGGCGCGTGCCTGTACTCAGGAAGCTGAGGCAGGAGAATTGCCTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTGC
AGTGAGCCGAGATCGCACCATTTGCACTTCAGACTGGGTAATAAGAGCGAAACTCCATCTCAGAAAAAGAAAAAAGTAAG
AAATGTGGCTGGAATGGAGTCAGCACGTGGGAGGAAGGGATAGAGAAAAAGGAGGACAGAGAAGATGTAAGTGTACTTCCTT
GCTCCACTCTTTACTAGTTGTATAATAACAAACAGTTGATTCAACCTTCAGGAATCTTAGTGAAATCAGTACTTTTACTATGGC
CTGTGTATCTCACAAAGATTTTGAAGGATGAAATGAAATATTACAGGGAAATGACTTATAAACCATTTGTTGTAATTTGTCT
ATAGATAGAGATGGATAGACGGATGGATGGATAGACTTGATAGATAGATAGAGATAATGGACTAAATGTTTGTGTTCCTAAA
AAGTTCACATTTTGAAGCCCTAACTCCTAATGCGATGGTATTAGGAGGTGGGACTTTGGGGAGGTGATTAGGTTTAGATGAGA
TCATGAGGATGAAACCCCATGATGGGATTTGTGCCTATAAGAAGAAACACCAGTGCTTCCTGTAATTGCCATGTGAAGGTGT
ACCAAGAAATGTAGCTGCCTGTAAGCAAGGAAAAGAGGCCTCACAAAGAAACAGAAATTTGCCTTACCTTGGACTTCCAACCT
TTAGAATTATAGAAAATAAATGTATGTTGTTGAAGCTATTGGTCTATGGCATTTTTGTAGCAATCAGAACTGACTAATAAAGA
TAGATCGATTGATAGATATGGAATATACATATATATGTATAGCTAACGAGTGAGTTCCCTGGGCAATTGTGCCTGATTGCCT
TTCCTAGACAATTCAAATAGAAGAACCCCTTTTTAGGAACATACAAGTACTTCTTTTTATGAAGCAAACACTGTAAAAATATG
ATAACTGGGACCAAAACATTTATAAGATTAGGCCTGAAAGAAAACCATTCAGAGAGAGACTACTGGATTCTCCTGGTAACCT
GGGGCCTGATTTATTCACTCTAAGTGTTTAGTACAGTTCCAGAGGATCAAAGCTCCTGCTTCCTGGCCAGATAGTCACCTACCT
TTTGTAATCAGACCTGCCTTTCAGAAGCAGAGTGGAATTCAGTTTTCTTCTAATAGTCTACACCCCTGCAATATTACCAGGG
ACATATTTTTTTTTTTTTTTTACCAGGGGCATATTTTAAAAATTCATACTTCTTAAACATTTTTTTAAAAAGGCCTCAAGCTAAAT
ATAAATGCTATGATCCTGATAAGACAACTTTAAATAAATGTTTGAGAGATATAAAGATAATTTGGTTTTCATGTTTTGATGT
ACTTACACAACCTGAAACTATAAAACAAATAGAAATATTCTTTAATTTTTTATTTAAAAATAATAAATGAACATGATATCAATTTGA
ATAAATTC AACCTCCTACCATAGTCCCTCCCCAGAGAGAGTTTTTGTACTTTAATGTTATCCCATAGTCTGAATTTG
CTTTTTACTTCAACTACTGTATTCTCACAGATTTTATTGATTTTTCTAAATTTGAAGTGCCTTCCTCTTTTTTTTCTTGAACCTCT
TTTCACATAAAAAGTTGTTTCTTTGGTTTTTTTTAACTTCAAATAGTATTGTTTATTGACTGAATCCCATCCTTTTCCAGAAA
ACTCGAGCCTCCTCCACTGGTTTGGGAGCTGTAAGACCAAAACAAG

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vor allem danke ich:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für das interessante Forschungsprojekt, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und für die Förderung und Unterstützung auch über den Promotionszeitraum hinaus.

Frau Dr. Karin Buiting für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, für ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld, für ihren kritischen Blick und für die vielen guten Ratschläge.

allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die wirklich schöne Arbeitsatmosphäre und für die gute Zusammenarbeit. Ganz besonders danke ich meinen beiden Labormitbewohnern Jasmin Beygo und Christian Grosser für die vielen spannenden Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung.

Herrn Dr. Emil Mladenov für die technische Unterstützung bei Mikroskopie und Elutriation sowie für gute Ratschläge und Protokolle.

Frau Dr. Yolanda Markaki, Frau Dr. Marion Cremer und Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer für die gute Zusammenarbeit während der 3D-SIM-Experimente

Herrn Prof. Dr. Daniel Hoffmann für die bioinformatische Expertise und die Beantwortung meiner Fragen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Ryffel und Frau Sabine Senkel für die technische Unterstützung bei der T-REx-Zelllinien-Generierung.

Nathalie Feiner und Herrn Prof. Dr. Axel Meyer für die gute und hoffentlich weiterhin bestehende Zusammenarbeit im Evolutionsprojekt.

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung.

Mama, Papa, Eva und Moritz für eure bedingungslose Unterstützung und euer Vertrauen in mich.

Philipp für alles mögliche.

Lebenslauf

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

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Funktion und Evolution des geprägten Gens *C15orf2/NPAPI*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Lisa Neumann befürworte.

Essen, den _____ Prof. Dr. Bernhard Horsthemke _____

Name des wissenschaftl.
Betreuers / Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen

Unterschrift d. wissenschaftl.
Betreuers / Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift der Doktorandin
(Lisa Neumann)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift der Doktorandin
(Lisa Neumann)