

**Genetische Modifikation der Disposition zum Retinoblastom:  
Aufklärung der Rolle allelspezifischer Unterschiede der  
Expression mutierter und normaler *RB1*-Allele.**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Tobias Schopen

aus Münster

Juni 2010

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. M. Ehrmann

3. Gutachter: Prof. Dr. D. Lohmann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Regulation der Initiation der Transkription	1
1.2 Der Promotor	1
1.3 <i>Cis</i> -Regulative Elemente	3
1.3.1 Genetische Variation in proximalen <i>cis</i> -regulativen Elementen	4
1.3.2 Genetische Variationen in distalen <i>cis</i> -regulativen Elementen	5
1.4 Allelspezifische Expression	6
1.5 Identifikation von regulativen Elementen durch evolutionäre Konservierung	7
1.6 Das Retinoblastom	8
1.6.1 Die Genetik des Retinoblastoms	9
1.6.2 Das Retinoblastom-Gen	11
1.6.3 Genotyp-Phänotyp Korrelationen	13
1.6.4 Der <i>RBI</i> -Promotor	14
1.6.5 Mögliche <i>cis</i> -modifizierende Faktoren in der <i>RBI</i> -Region	15
1.7 Ziel der Arbeit	16
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Standardlösungen	17
2.1.3 Grössenstandards	18
2.1.4 Medien	18
2.1.4.1 Medien für die Kultur von Bakterien	18
2.1.4.2 Medien für die Kultur von Zellen	18
2.1.5 Bakterienstämme und Zelllinien	19
2.1.5.1 Bakterienstamm	19
2.1.5.2 Zelllinien	19
2.1.6 Plasmide	19
2.1.7 Enzyme	20
2.1.8 Oligonukleotide	20
2.1.9 Genetische Variation in der <i>RBI</i> -Promotorregion	20
2.1.9.1 Funktionelle Analyse genetischer Variation in der <i>RBI</i> -Promotorregion	21
2.1.9.2 Patientenkollektiv der Assoziationsstudie	24
2.1.9.3 Patientenauswahl für die Untersuchung nach Mutationen in 5'-stromaufwärts gelegenen ECRs	24
2.1.10 Online Datenbanken und Browser	24
2.2 Methoden:	25
2.2.1 Arbeiten mit DNA	25
2.2.1.1 Präparation von DNA aus peripherem Blut	25
2.2.1.2 GenomiPhi <sup>TM</sup> -DNA Amplifikation	26
2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA	26
2.2.1.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen	27
2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese (nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	28

---

2.2.1.7 Elution von DNA aus Agarosegelen	28
2.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA	28
2.2.1.9 Restriktionsendonukleaseverdau	29
2.2.1.10 <i>In Vitro</i> Synthese von spezifischen Mutationen	29
2.2.1.11 Klonierung	30
2.2.1.11.1 Vektor-DNA	30
2.2.1.11.2 Insert-DNA	30
2.2.1.11.3 Ligation	30
2.2.1.12 Sequenzierung von DNA	30
2.2.1.13 TaqMan SNP Genotyping-Assays	31
2.2.2 Arbeiten mit RNA	32
2.2.2.1 Isolierung von heteronukleärer hnRNA (hnRNA) aus Fibroblasten	32
2.2.2.2 Präparation von RNA mit dem PAXgene RNA Blood Kit (QIAgen)	32
2.2.2.3 Reverse Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)	33
2.2.2.4 Quantitative Analyse des allelischen hnRNA-Transkriptverhältnisses (SNaPshot-Analysen)	34
2.2.3 Bakterien	35
2.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien (modifiziert nach Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	35
2.2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien	36
2.2.4 Zellkultur	36
2.2.4.1 Kultivierung der Zellen	36
2.2.4.2 Passagieren von Zellen	36
2.2.4.3 Transiente Transfektion von Zellen	37
2.2.4.4 Luziferase-Reportergen Assay	37
2.2.5 Protein-DNA-Interaktionen	38
2.2.5.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	38
2.2.5.1.1 Annealing der Oligonukleotide	38
2.2.5.1.2 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide	38
2.2.5.1.3 Protein-DNA Bindereaktion	39
2.2.5.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.2.6 Assoziationsstudie	40
2.2.6.1 Statistische Analysen	40
2.2.6.2 Transmission Disequilibrium Test (TDT)	40
2.2.6.3 Haplotypbestimmung	40
2.2.7 Evolutionäre Analysen: ECR Browser	41
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1 Charakterisierung des <i>RBI</i> -Promotors	42
3.1.1 Funktionelle Analyse von <i>RBI</i> -Promotorvarianten mit dem pGL3-Enhancer-Vektor	43
3.1.2 Funktionelle Analyse von <i>RB</i> -Promotorvarianten mit dem pGL3-Basic Vektor	46
3.1.2.1 Funktionelle Analyse der PRED ( <i>Predisposing to retinoblastoma</i> )-Varianten	48
3.1.2.2 Funktionelle Analyse in CHO-K1-Zellen	48
3.1.2.3 Funktionelle Analyse in HeLa-Zellen	49
3.1.2.4 Funktionelle Analyse in HEK-293 Zellen	50
3.1.2.5 Funktionelle Analyse in Y79-Zellen	51

3.1.3 NED ( <i>No effect on risk of retinoblastoma detected</i> ) <i>RBI</i> -Promotorvarianten	52
3.1.3.1 Funktionelle Analyse der NED Varianten in CHO-K1-, HeLa-, HEK- 293- und Y79-Zellen	52
3.1.4 VUC ( <i>Variant of uncertain consequence</i> ) <i>RBI</i> -Promotorvarianten	56
3.1.4.1 Funktionelle Analyse der VUC Mutationen in CHO-K1-, HeLa-, HEK-293- und Y79-Zellen	57
3.2 DNA-Protein-Interaktionsnachweise durch <i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>	62
3.2.1 EMSA für PRED-Mutationen	62
3.2.2 EMSA für NED-Mutationen	66
3.2.3 EMSA für VUC-Mutationen	70
3.3 Analyse polymorpher Loci (SNPs) und Haplotypvarianten bei Patienten mit isoliert-unilateralem Retinoblastom (Familienbasierte Assoziationsstudie)	73
3.3.1 Auswahl des Markersatzes für die Genotypisierung in der <i>RBI</i> -Region	73
3.3.2 Assoziationsstudie der <i>RBI</i> -Varianten	74
3.3.3 Analyse der Haplotypstruktur des <i>RBI</i> -Gens mit den neun Markern	75
3.3.3.1 Haplotypen der Trios	75
3.3.3.2 Haplotypen der Eltern- und Kinder-Subgruppe	77
3.3.3.3 Alter bei Diagnose - Haplotypverteilung	79
3.4 Allelspezifische Expression des <i>RBI</i> -Gens	80
3.4.1 RT-PCR-Analyse an isolierter hnRNA und an PAXgene-RNA	81
3.4.2 RT-PCR an intragenen <i>RBI</i> -Regionen (A)	81
3.4.3 RT-PCR an intragenen <i>RBI</i> -Regionen (B)	82
3.4.4 Quantitative Analyse des allelischen hnRNA-Transkriptverhältnisses	84
3.5 Identifizierung evolutionär konservierter Regionen ( <i>evolutionary conserved regions</i> , ECRs) in der 5'-stromaufwärts Region des <i>RBI</i> -Gens	84
3.5.1 Mutationsanalyse der ECR_NGs stromaufwärts des <i>RBI</i> -Gens	85
3.5.2 Analyse der ECR mit SNPs stromaufwärts des <i>RBI</i> -Gens	86
<b>4. Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1 <i>RBI</i> -Promotoranalysen	88
4.2 Modifikation der Retinoblastomentstehung durch nicht-krankheitsursächliche genetische Variation im Bereich des <i>RBI</i> -Gens	97
4.3 Allelspezifische Expression	101
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>115</b>
7.1 Oligonukleotide	115
7.2 Sonden für die SNP-Genotypisierung durch TaqMan Genotyping Assays (Applied Biosystems)	116
7.3 Oligonukleotide für die EMSA	117
7.4 Primer für die <i>in vitro</i> Mutagenese	119
7.5 Primer für die Pyrosequenzierungen der ECR mit SNPs	119

---

7.6 Primer für die Pyrosequenzierungen der ECR ohne genetische Variation (ECR_NGs)	120
7.7 Plasmidkarten	123
7.7.1 pGL3-Basic Vektor	123
7.7.2 pGL3-Enhancer Vektor	124
7.8 Genotyp Daten der Familien Trios	125

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
aa	<i>amino acid</i> ; Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Angelman-Syndrom
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
cpm	counts per minute; Impulse pro Minute
ds	doppelsträngig
cen	Centromer
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERR	Essentielle Regulatorische Region
ESMA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FCS	<i>Fetal-Calf-Serum</i> ; fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
h	Stunde
hnRNA	heteronukleare RNA
ht	Haplotyp
Imprinting	Prägung (elternspezifische Genexpression)
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Broth Base-Medium
Leu	Leucin
M	mol/l
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
Mb	Megabasenpaar
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
n x g	n-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
ng	Nanogramm
NaOH	Natronlauge
NED	<i>No effect on risc of retinoblastoma detected</i>

---

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)</i>
NP	Normalperson
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
p	<i>petit</i> ; kurzer Arm eines Chromosoms
P	<i>probability</i> ; Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
pGL3-B	pGL3-Basic
pGL3-E	pGL3-Enhancer
PRED	<i>Predisposing to retinoblastoma</i>
Pro	Prolin
PS	Primer-System
q	<i>queue</i> ; langer Arm eines Chromosoms
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunde
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelbasenaustausch
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TDT	Transmission Disequilibrium Test
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
TFBS	Transkriptions Faktor Bindestelle
tel	Telomer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRRD	Transcription Regulatory Region Database
U	Unit
V	Volt
v/v	Volume in Volume; Volumen in Volumen
VUC	<i>Variant of uncertain consequence</i>
wt	Wildtyp
w/v	Weight in Volume; Masse in Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Ø	Querschnitt



## 1. Einleitung

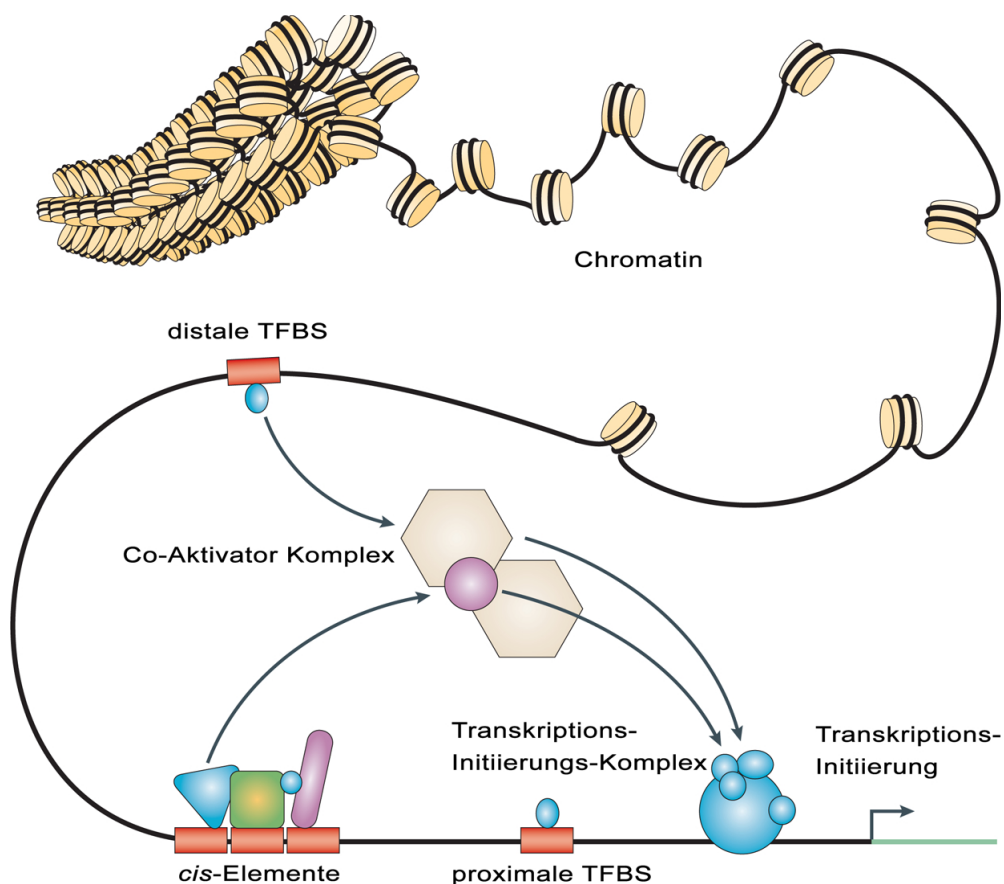
### 1.1 Regulation der Initiation der Transkription

Die Expression eukaryotischer, protein-codierender Gene wird durch unterschiedliche Schritte reguliert, wie Transkriptions-Initiation und -Elongation, mRNA-Prozessierung und -Transport, und Translation sowie Stabilität des Genproduktes (Maston *et al.*, 2006). Der größte Teil der Regulation der Expression findet aber auf Ebene der Transkriptions-Initiation statt, und führt zu großen Unterschieden in der Expression zwischen verschiedenen Genen. Gene, die ständig exprimiert werden, heißen *housekeeping* Gene (Butte *et al.*, 2001). Ihre Genprodukte, werden in allen Zellen benötigt, um deren generelle Funktionen aufrechtzuerhalten (Eisenberg, 2003). Andere Gene zeigen ein räumlich oder zeitlich eingeschränktes Expressionsverhalten, da sie nur in bestimmten Geweben oder Zellentypen oder nur während eines definierten Zeitraumes aktiv sind. Dies ist auch für die Gene der RNA Polymerase II der Fall. Die Transkription von RNA Polymerase II Genen wird dabei von nahen (proximalen) und fernen (distalen) regulativen Elementen gesteuert (Wassermann und Sandelin, 2004).

### 1.2 Der Promotor

Ein proximales regulatives Element ist der Promotor, eine kurze DNA-Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. Der Start der Genexpression wird durch die Aggregation des Transkriptions-Initiations-Komplexes, welcher sich aus der RNA Polymerase II und basalen Transkriptionsfaktoren (TF) zusammensetzt, eingeleitet (Smale, 2003). Dieser Multi-Transkriptions-Komplex bindet an den Promotor. Das Binden des Transkriptionskomplexes und der RNA Polymerase II ist hinreichend, um die basale Transkription eines Gens zu initiieren (Abbildung 2). Promotoren liegen 5'-stromaufwärts relativ zum regulierten Gen, haben meistens eine Länge von mehreren hundert Basenpaaren (bp) und bestimmen die Position, an der die Transkription der DNA beginnt sowie deren Richtung. Innerhalb der Promotorregion der meisten Gene sind Sequenzelemente wie TATA-, CAAT- und GC-Boxen zu finden (Smale, 2003). Die TATA-Box befindet sich 25 bis 30 bp 5'-stromaufwärts relativ zum Transkriptionsstart und wird durch das TATA-Box-Bindeprotein erkannt, eine Unterheit des allgemeinen TF TFIID. Die TATA-Box ist durch eine 7 bis 8 bp Konsensussequenz definiert, die in den meisten Genen hochkonserviert ist (Wong

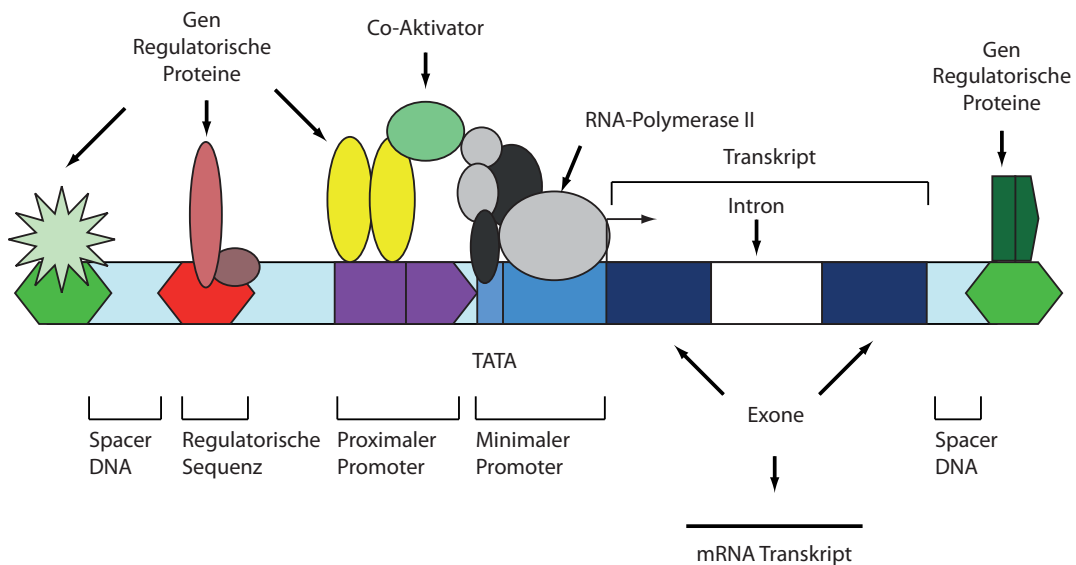
und Bateman, 1994). Der Kernbereich, der aus AT-Basenpaaren besteht, ist auf jeder Seite von GC-reichen Regionen flankiert. 70 bis 80 bp 5'-stromaufwärts relativ zum Transkriptionsstart vieler Gene liegen CAAT-Boxen, deren Name sich aus der Konsensussequenz [(C)CAAT] ableitet, an die die TF binden. Ungefähr 110 bp 5' relativ zum Transkriptionsstart liegt die sogenannte GC-Box (Konsensussequenz GGGCGG), die ebenfalls die Bindung von TF vermittelt.



**Abbildung 1: Beteiligte der Transkriptions-Regulation.** Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA-Sequenzen (Transkriptionsfaktor-Bindestellen, TFBS), die entweder proximal oder distal zum Transkriptionsstart liegen. Interaktionen zwischen gebundenen TF und Co-Faktoren stabilisieren die Transkriptions-Initiations-Maschinerie und aktivieren die Genexpression. Da die Regulierung durch das sequenzspezifische Binden von TF gewährleistet wird, ist sie sehr abhängig von der Chromatinstruktur. (Modifiziert nach Wassermann und Sandelin, 2004).

### 1.3 Cis-Regulative Elemente

Die Transkription eukaryotischer Gene wird nicht allein durch den proximalen Promotor gesteuert, sondern auch darüber hinaus auch durch distale *cis*- und/oder *trans*-Faktoren. Während *cis*-Faktoren DNA Sequenzen sind, die auf dem gleichen DNA-Strang des zu regulierenden Gens liegen und für kein Genprodukt codieren, sind *trans*-Faktoren DNA-Sequenzen, die für ein Genprodukt (RNA/Protein) codieren (Stamatoyannopoulos, 2004). *Cis*-Faktoren besitzen Bindestellen für die Genprodukte von *trans*-Faktoren, und lassen sich in *Enhancer* (hochregulierend) und *Silencer* (herunterregulierend) unterscheiden. Diese können sowohl intergen stromaufwärts und stromabwärts eines Gens, als auch intragen liegen (Abbildung 1). Im Gegensatz zur basalen Promotoraktivität, für die ein Promotor zuständig ist, bewirken aktivierte *Enhancer* die maximale Verstärkung der Transkription eines Gens (Blackwood und Kadonaga, 1998).



**Abbildung 2: Schema eines Promotors mit Transkriptionsfaktoren (TF).** Der minimale Promotor ist eine DNA Sequenz an der die TF und die RNA Polymerase II binden. Weiterhin befinden sich im Promotor DNA-Sequenzen, die Binde-Motive für regulatorische Proteine darstellen. Diese Sequenzen können sowohl in Nachbarschaft zum minimalen Promotor liegen (proximaler Promotor, unidirektional), als auch stromaufwärts (bidirektional, bis zu einigen kb) oder stromabwärts des Gens, welches sie regulieren. *Enhancer* sind in *cis*-regulierende Sequenzen, die spezifische Bindestellen für TF sind, welche die Transkription verstärken. *Silencer* sind ebenfalls *cis*-regulierende Elemente und inhibieren die Transkription, zum Teil durch Binden der TF. Die regulatorischen Proteine, deren Bindestellen und deren Position relativ zum Promotor sind von Gen zu Gen unterschiedlich.

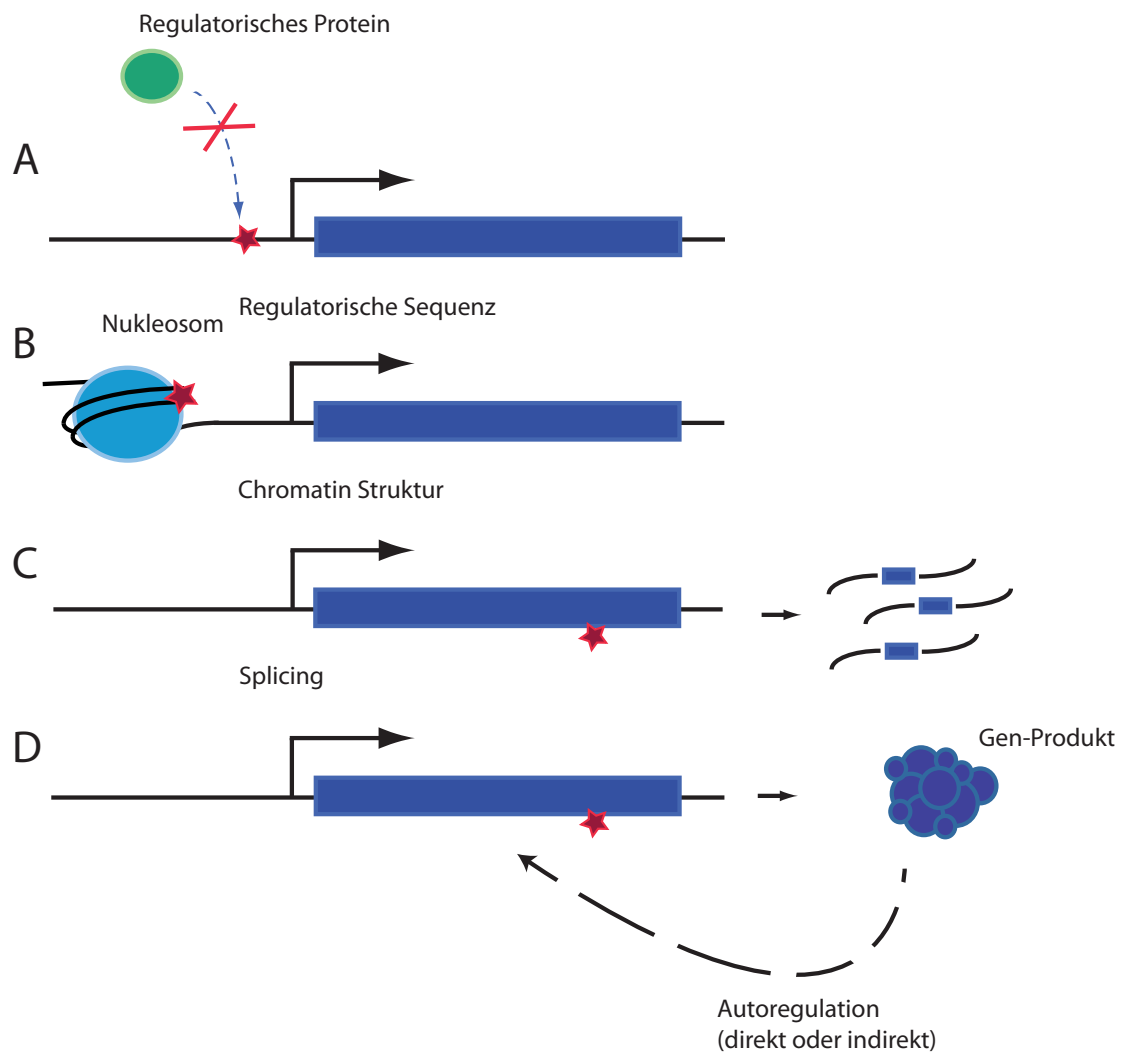
Ein Beispiel für einen intragenen *Enhancer* ist der *Enhancer* des *IgH*-Gens, das für die schwere Kette des Immunglobulins codiert. Wie viele *Enhancer* ist auch der *IgH-Enhancer* in einem Intron positioniert, er liegt zwischen den codierenden Regionen für  $J\kappa$  und  $C\kappa$ , die

Teile der schweren Kette sind (Emorin *et al.*, 1983). Darüber hinaus zeigt der *IgH-Enhancer* noch ein weiteres spezielles Charakteristikum: es konnte nachgewiesen werden, dass er zelltypspezifisch ist und nur in den Zellen aktiv ist, die Immunoglobuline exprimieren. In einigen wenigen Genen sind TF-Bindestellen auch in Exons beherbergt, wie z.B. in  *kreatin18* beim Menschen oder in  *nonA* bei *Drosophila Melanogaster* (Wray *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Genetische Variation in proximalen *cis*-regulativen Elementen

Mutationen in proximalen *cis*-regulativen Elementen können die Genexpression beeinflussen und so zu genetischen Erkrankungen beim Menschen führen (Abbildung 3). Zum Beispiel können Mutationen im *Faktor IX*-Gen, das auf dem X-Chromosom liegt, zu Hämophilie B führen. Die meisten dieser Patienten haben Mutationen in der codierenden Region des Gens. Einige Patienten haben jedoch eine Mutation in einer regulatorischen Region des *Faktor IX*-Gens, die 20 bp stromaufwärts der Transkriptions-Initiation lokalisiert ist und die Bindung des Transkriptionsfaktors HFN4 stört (Crossley *et al.*, 1992). Ein weiteres Beispiel für eine Krankheit durch Mutationen in proximalen *cis*-regulativen Elementen sind Punktmutationen in der Promotorregion des  $\text{A}\gamma$ -Globin-Gens, die zu einer Hämoglobinopathie führen. Die Mutationen stören die Bindung des TF GATA-1, wodurch es zu keiner Repression des  $\text{A}\gamma$ -Globin Gens kommt (Martin *et al.*, 1989). Weitere Mutationen in der TATA-Box und in der CACC-Box, die die  $\beta$ -Globin Genexpression vermindern, wurden bei Patienten mit Thalassämie beschrieben (Antonarakis *et al.*, 1984).

Neben Mutationen können auch Polymorphismen Einfluss auf den Phänotyp haben. Ein seltener Polymorphismus im Promotor des humanen Tumor Necrosis Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) Allels ist mit dem HLA-A1 B8-DR3-DQ2-Haplotyp assoziiert. Dieser Haplotyp zeigt eine Assoziation zur Autoimmunerkrankungen sowie zu einer hohen Expression des TNF $\alpha$ -Gens. Homozygote Träger des seltenen Allels haben ein siebenfach erhöhtes Risiko an cerebraler Malaria zu sterben (Wilson *et al.*, 1997).

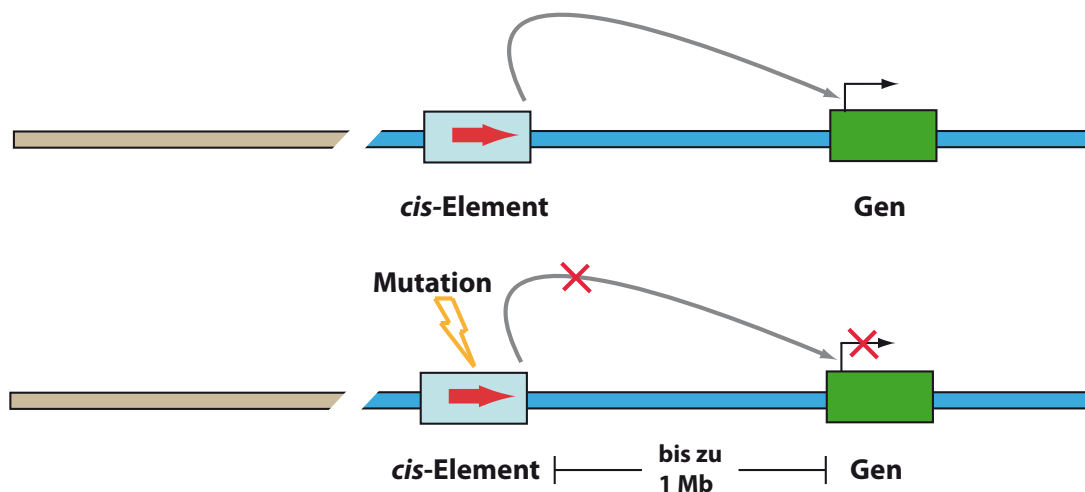


**Abbildung 3: Molekulare Mechanismen proximaler regulatorischer Variationen.** Proximale regulatorische Variationen (roter Stern) fungieren von einer Position nahe dem Gen. Diese Art der Variation kann einen Einfluss auf die Genexpression auf unterschiedliche Weise ausüben, wie z.B. durch: (A) Hemmung der Bindung eines regulatorischen Proteins an die regulatorische Sequenz (Veyrieras *et al.*, 2008), (B) das Binden des Nukleosoms oder die Remodellierung des Chromatins einen Einfluss auf die Chromatinstruktur (Kadota *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008), (C) die Genauigkeit des Intron-Splicings (Nembaware *et al.*, 2008) und (D) die Regulation des Gens durch sein eigenes Produkt oder durch das Produkt eines stromabwärts gelegenen Gens, welches in die transkriptionale Regulation des Gens involviert ist (Skelly *et al.*, 2009) (Modifiziert nach Skelly *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Genetische Variationen in distalen *cis*-regulativen Elementen

Die Hälfte aller distalen regulativen *cis*-Elemente liegt im Durchschnitt mehr als 250 kb von dem Gen entfernt, mit dem sie assoziiert sind (Vavouri *et al.*, 2006). So befindet sich z.B. der *Enhancer* des *PAX6*-Gens ca. 200 kb stromabwärts zum Gen (Griffin *et al.*, 2002). Dass die Lokalisation von distalen *cis*-Elementen nicht nur intergen ist, konnte bei dem *Enhancer* des *Sonic Hedgehog* (*SHH*) Gens gezeigt werden. Dieser befindet sich im Intron des benachbarten

*LMBR1*-Genes, welches mehr als 1 Mb von *SHH* entfernt liegt (Lettice *et al.*, 2003). Distale regulative *cis*-Elemente in Säugern sind evolutionär konserviert (Vavouri *et al.*, 2006), und es wird davon ausgegangen, dass Mutationen in diesen Regionen von pathogener Art sein können (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Genetische Variation in distalen *cis*-regulatorischen Regionen.** Schematische Darstellung einer potentiellen Funktion eines distalen *cis*-regulatorischen Elementes (oben), sowie des Einflusses von Mutationen distaler regulativer *cis*-Elemente auf die Genexpression (unten) (Modifiziert nach Dermitzakis *et al.*, 2005).

Eine pathogene Mutation in einem distalen regulatorischen Element konnte in der LCR (*locus control region*) des  $\beta$ -globin-Gens beschrieben werden. Translokations-Bruchpunkte und Deletionen in der evolutionär konservierten Region (ECR) führen zur Stilllegung des  $\beta$ -globin-Gens, welches ca. 50 kb stromabwärts zu der LCR liegt (Driscoll *et al.*, 1989). Eine weitere pathogene Punktmutation konnte in dem *Enhancer* des *SHH*-Gens identifiziert werden, die zu proximaler Polydaktylie führt (Lettice *et al.*, 2003).

#### 1.4 Allelspezifische Expression

Allelspezifische Expression von Genen kann durch genetische Variation in *cis*-regulativen Elementen beeinflusst werden (Wittopp, 2005). Von beiden Allelen eines autosomalen nicht geimprinteten Gens wird angenommen, dass sie co-dominant, also zu gleichen Anteilen, exprimiert werden. Durch das genetische Imprinting wird das paternale und maternale Genom nicht in gleichen Dosen exprimiert, mit anderen Worten, einige Gene des paternalen oder maternalen Genoms werden präferenziell exprimiert (Reik und Walter, 2001). Ein Verlust des

Imprintings bei Genen kann zu Erkrankungen, wie z.B. bei den Prader-Willi und Angelman Syndromen, führen (Horsthemke und Buiting, 2006).

Ein weiterer Prozess, bei der allelspezifischen Expression zum Tragen kommt, ist die X-chromosomale Inaktivierung während der frühen Embryogenese (Singer-Sam *et al.*, 1992). In diesen Prozess sind das X-Inaktivierungs-Zentrum (*Xic*) sowie die nicht-codierende *Xist*-RNA involviert. Die *Xist*-RNA bindet an das X-Chromosom und bedeckt dieses, und resultiert in Heterochromatin. Das Heterochromatin bleibt während der Zellzyklen kondensiert und zeigt nur geringe bis gar keine Genexpression. Bei der Inaktivierung des X-Chromosoms und dem genomischen Imprinting kommt es durch die Modifikation der DNA und des Chromatins zu einer molekularen Abgrenzung zwischen aktiven und inaktiven Bereichen des Chromosoms, welches zu einer allelspezifischen Genexpression führt.

Studien zeigen, dass allelische Imbalanz sowohl im humanen, als auch im murinen Genom auftritt, und lassen vermuten, dass differenzielle allelische Expression weit verbreitet ist (Arking *et al.*, 2002; Cargill *et al.*, 1999; Cowels *et al.*, 2002). Bei der Bestimmung des molekularen Genotyps spielt die Genexpression eine wichtige Rolle. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass regulatorische Allele mit einer Prädisposition für Erkrankungen einhergehen können. Beispiele dafür sind das humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Shin *et al.*, 1997), Demenz (van de Zee *et al.*, 2007) oder Schizophrenie (Bray *et al.*, 2003), aber auch neurogenerative Krankheiten wie das Louis Bar Syndrom (Watts *et al.*, 2002).

### **1.5 Identifikation von regulativen Elementen durch evolutionäre Konservierung**

Potentielle *cis*-regulative Elemente können mittels evolutionärer Analysen identifiziert werden (GuhaThakurta, 2006). Voraussetzung für diese Analysen ist die funktionelle Konservierung der *cis*-regulativen Elemente, obwohl der größte Teil ihrer möglichen Funktionen bis jetzt noch unbekannt ist. Die Genome von Säugern enthalten evolutionär konservierte Regionen (ECRs), die nicht funktionell transkribiert werden, wie in nicht-proteincodierende RNAs. Ungefähr 1 - 2 % des menschlichen Genoms besteht aus solchen einmaligen Sequenzen. Um funktionelle nicht protein-codierende Sequenzen zu identifizieren werden häufig Genomvergleiche verwendet. Bei dieser Technik werden die DNA Sequenzen verschiedener Spezies auf ECRs geprüft. Das minimale Kriterium eines ECRs ist eine mindestens 70 %-ige Sequenzidentität über eine Länge von 100 bp (Duret *et al.* 1993). Obwohl dieses minimale Kriterium nicht sehr stringent erscheint, liegt eine Konservierung von 70 % weit über dem Durchschnitt zwischen neutralen Sequenzen aus dem humanen und

dem murinen Genom (Hardison *et al.*, 2003). Im direkten Vergleich des murinen Genoms mit dem humanen Genom konnten ca. 330.000 ECRs identifiziert werden. Diese Sequenzen sind nicht repetitiv. 65 % von ihnen befinden sich in intergenen Regionen, die restlichen 35 % davon in Introns (*Data Genome Alignment and Annotation Database*, 2009). Der direkte Sequenzvergleich zwischen Mensch und Maus ist gut geeignet, um ECRs zu identifizieren, wohingegen sich zur Identifikation von codierenden Exons der Vergleich des menschlichen Genoms mit dem Genom des Huhns besser eignet (Dermitzakis *et al.*, 2005). Einige ECRs sind gleich hoch oder sogar höher evolutionär konserviert als manche codierende Sequenzen, ein Anzeichen, dass Variation in diesen ECRs unter einer sehr starken negativen Selektion stehen (Thomas *et al.*, 2003). Mutationen oder Variationen in ECRs können somit eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen. Ein Beispiel für eine pathogene Variante in einem ECR ist ein Polymorphismus, der sich auf den Phänotyp von Schweinen auswirkt, indem er die Expression von *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) beeinflusst. *IGF2*-Expression hat einen Einfluss auf das Muskelwachstum, die Fettablagerung und die Größe des Herzens bei Schweinen (Van Laere *et al.*, 2003).

## 1.6 Das Retinoblastom

In dieser Arbeit wurden modifizierende genetische Varianten in *cis* zum *RBI*-Gen untersucht. Mutationen im *RBI*-Gen können zu einer Disposition zum Retinoblastom und zu extraokulären Tumoren führen. Das Retinoblastom (OMIM 180200) ist ein bösartiger Augentumor, der seinen Ursprung in embryonalen Netzhautzellen hat. Obwohl die Inzidenz von 1 zu 15.000 bis 1 zu 20.000 selten ist, ist er dennoch der häufigste Augentumor bei Kindern (Devesa, 1975; Suckling, 1982). Phänotypisch unterscheidet man bei Retinoblastomen zwischen dem unilateralem Retinoblastom (ein Auge ist betroffen), das bei ca. 60 % der Kinder auftritt, und dem bilateralem Retinoblastom (zwei betroffene Augen), welches die verbleibenden 40 % ausmacht. Darüber hinaus wird bei bilateral betroffenen Kindern häufig multifokales Tumorwachstum beobachtet, im Gegensatz zu unilateralem Retinoblastom. Unilaterales Retinoblastom wird im Durchschnitt im Alter von 22 Monaten, bilaterales schon im Alter von 11 Monaten diagnostiziert.

Ein weißliches Aufleuchten (Leukokorie) in der Pupille, das durch Lichtreflektion der intraokularen Tumormasse verursacht wird, ist meist ein erstes Anzeichen des klinischen Retinoblastoms. Strabismus (Schielen) kann ebenfalls ein erstes Zeichen sein, seltener Glaukome, Uveitis oder Einblutungen in das *Corpus vitreum* (Balmer *et al.* 1993). Die



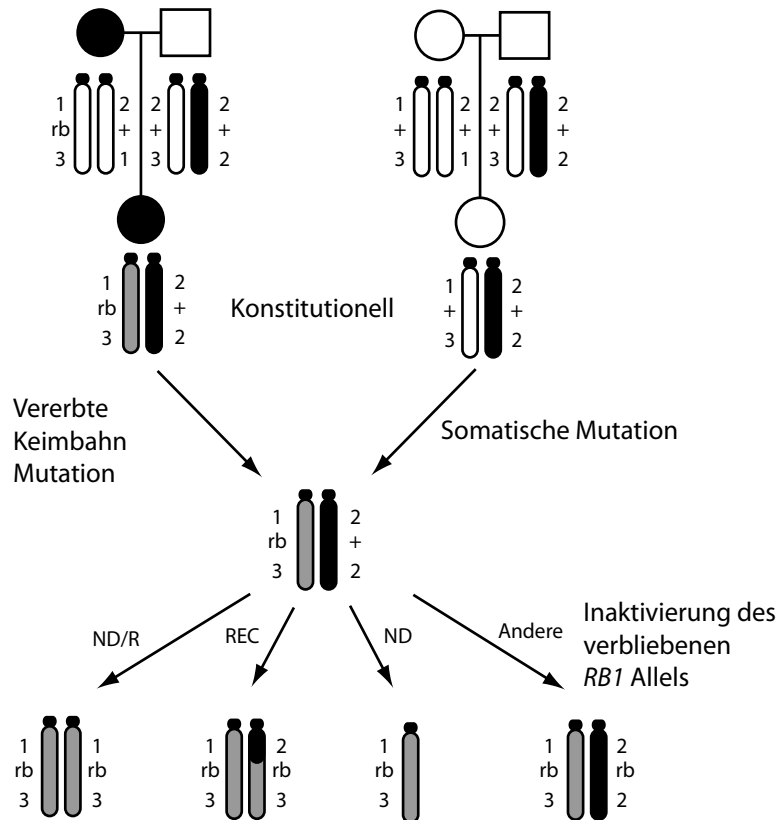
Therapie hängt von der Größe, Ausbreitung und Lokalisation des Tumors, sowie vom Alter des Patienten ab (Bornfeld *et al.*, 1997). Die Überlebensrate bei Patienten über fünf Jahren ist größer als 95 %. Jedoch treten bei Patienten mit erblichem Retinoblastom häufiger Tumore außerhalb des Auges auf (Zweitumore). Ein deutlich erhöhtes Risiko konnte dabei für Sarkome des Knochens, des Bindegewebes, der glatten Muskulatur und für bösartige Tumore des Gehirns beobachtet werden (Eng *et al.*, 1993). Auch das maligne Melanom der Haut sowie Lungenkarzinome, Blasenkarzinome (epitheliale Karzinome) konnten häufiger beobachtet werden (Kleinerman *et al.* 2000; Fletcher *et al.* 2004). Multiple subkutane Lipome entwickeln ungefähr 4 % der Patienten mit bilateralem Retinoblastom (Li *et al.* 1997). Der erhöhten Sterblichkeit bei Patienten mit erblichem Retinoblastom liegt eine Erkrankung an Zweitumoren zu Grunde (Eng *et al.*, 1993). Perkutane Strahlentherapien erhöhen das Risiko an Zweitumoren zu versterben. Patienten mit beidseitigem Retinoblastom, die keiner Strahlentherapie ausgesetzt waren, zeigten ein mehr als fünffach geringeres Risiko an Zweitumoren zu versterben (6% bis zum 40. Lebensjahr), verglichen mit Patienten, die eine Strahlentherapie erhielten (26% bis zum 40. Lebensjahr). Eine Interaktion zwischen erblicher Disposition zu Retinoblastom und Umweltfaktoren ist auch für das Auftreten von Lungenkrebs und Tabakrauchen festgestellt worden (Kleinerman *et al.* 2000; Fletcher *et al.* 2004).

### 1.6.1 Die Genetik des Retinoblastoms

Die meisten Patienten mit Retinoblastom haben eine sporadische Erkrankung, d.h. keine weiteren Angehörigen haben ein Retinoblastom. Nur bei 10 % der Erkrankten sind Familienmitglieder ebenfalls von einem Retinoblastom betroffen (familiäres Retinoblastom). Die Disposition zu Retinoblastom wird autosomal-dominant vererbt. Neben Patienten mit familiärem Retinoblastom haben nahezu alle Patienten mit sporadisch bilateralem Retinoblastom ebenfalls eine erbliche Disposition zu Retinoblastom. Im Gegensatz dazu haben von den Patienten mit sporadisch unilateralem Retinoblastom nur ca. 15 % die erbliche Form. Den meisten sporadischen unilateralen Retinoblastomen liegen also keine vererblichen genetischen Ursachen zu Grunde.

Mittels statistischer Untersuchungen entwickelte Knudson 1971 ein Modell, die Zwei-Schritt-Hypothese, die entscheidend dazu beitrug die genetischen Mechanismen, die dem erblichen und nicht-erblichen Retinoblastom zugrundeliegenden, zu verstehen (Knudson, 1971). Die Hypothese besagt, dass sowohl die erbliche als auch die nicht-erbliche Form durch zwei

Mutationen ausgelöst wird (Abbildung 5). Die Hypothese wurde später ergänzt um die Aussage, dass diese Mutationen die beiden Allele eines autosomalen Gens (Retinoblastom Gen) betreffen.



**Abbildung 5: Verlust der Heterozygotie bei der Entstehung des Retinoblastoms.** Bei der erblichen Form (oben links) erbt die betroffene Tochter ein mutiertes Retinoblastoma 1 (*RB1*)-Allel (rb) von ihrer betroffenen Mutter und ein normales *RB1*-Allel (+) von ihrem Vater. Oben rechts ist die nicht erbliche (sporadische) Form der Tumorgenese dargestellt. Hier inaktiviert eine somatische Mutation, die bei der Entwicklung der Retinazelle entsteht, eines der *RB1*-Allele. Aus beiden Fällen resultiert, dass die Tochter (mitte) ein wildtyp (wt) und ein mutiertes *RB1*-Allel besitzt, also heterozygot ist (rb/+). Das Retinoblastom entsteht nach einer Inaktivierung des verbliebenen wt Allels (unten). Folgende genetische Mechanismen sind u.a. für die Inaktivierung des verbliebenen *RB1*-Alles verantwortlich: Chromosomale Non-Disjunktion und Reduplikation der verbliebenen Kopie des Chromosoms 13 (ND/R), Mitotische Rekombination (REC), Non-Disjunktion (ND) und andere Mutationen, die das verbleibende *RB1*-Allel inaktivieren (Andere). (Modifiziert nach Cavanee *et al.*, 1983)

Bei der erblichen Form des Retinoblastoms liegt die erste Mutation schon in der Keimzelle vor (erster Schritt). In 75 % der Fälle handelt es sich hier um eine neu erworbene Mutation, in den restlichen 25 % ist die Mutation geerbt worden. Zur Tumorentstehung kommt es, wenn eine weitere somatische Mutation in einer Retinazelle auftritt (zweiter Schritt). Statistische

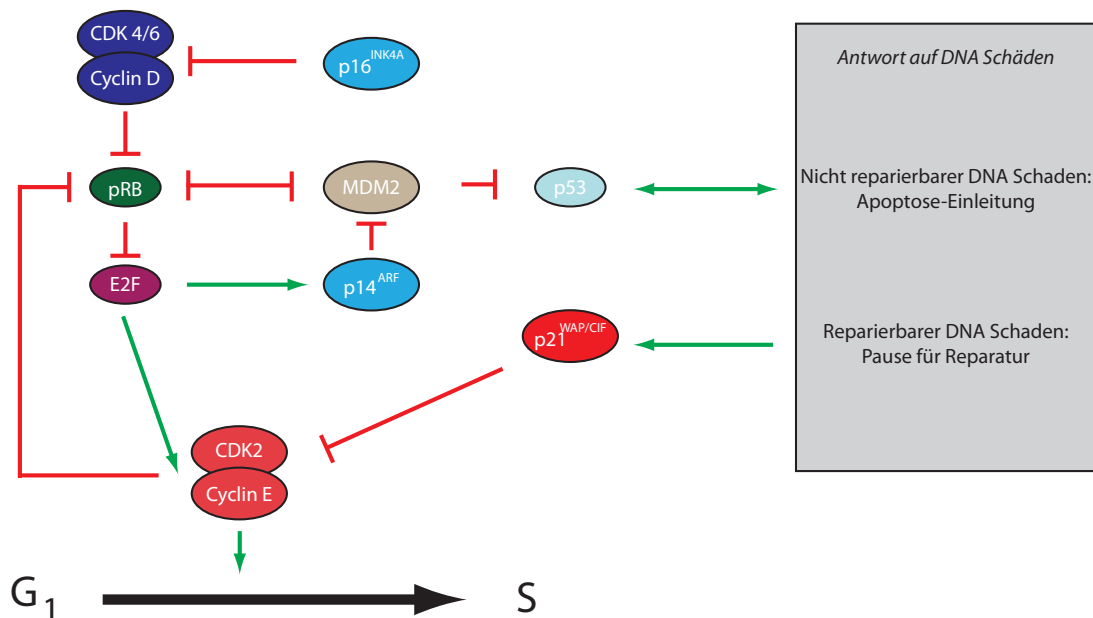
Analysen haben gezeigt, dass durchschnittlich sechs Tumorherde entstehen, weswegen sich in der Regel bilaterales Retinoblastom entwickelt. Bei der nicht-erblichen Form des Retinoblastoms treten zwei Mutationen (erster und zweiter Schritt) erst in einer Retinazelle auf, so dass nur ein Auge betroffen ist. Knudsons Zwei-Schritt-Hypothese wird durch molekulargenetische Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass die zwei auslösenden Mutationen beide Allele des *retinoblastoma 1 (RBI)*-Gens auf Chromosom 13 betreffen müssen (Cavenee *et al.* 1983; Godbout *et al.*, 1983).

### 1.6.2 Das Retinoblastom-Gen

Das Retinoblastom-Gen *RBI* (*retinoblastoma 1*, GenBank Accession Number: L11910) liegt auf Chromosom 13 Bande q14 (Knudson *et al.*, 1976; Cavenee *et al.*, 1983). Die *RBI*-Sequenz erstreckt sich über mehr als 178 kb und ist in 27 Exons unterteilt (Friend *et al.* 1986; McGee *et al.*, 1989). Die *RBI*-mRNA ist ca. 4,7 kb lang, der offene Leserahmen beträgt davon 2,7 kb, die restlichen 2 kb sind 3'-UTR. Durch intragene Mutationen in Tumormaterial konnte eine krankheitsursächliche Bedeutung des *RBI*-Gens betätigt werden (Fung *et al.*, 1987; Lee, *et al.*, 1987; Bookstein *et al.*, 1988). Die Funktion des *RBI*-Gens als Tumorsuppressor wurde 1990 bestätigt (Stanbridge, 1990).

Der offene Leserahmen von *RBI* codiert für ein 928 Aminosäuren langes Phosphoprotein (pRb) mit einer Größe von 110 kDa im unphosphorylierten Zustand, das im Zellkern lokalisiert ist (Lee *et al.*, 1987). pRb gehört zu der Familie der nukleären Pocket Proteine u.a. zusammen mit p107 und p130. Diese weisen Sequenzähnlichkeiten in Bereichen auf, die als A/B Pocket Domänen bezeichnet werden. Mitglieder der Transkriptionsfaktor E2F Proteinfamilie können wiederum von Proteinen, die A/B Pockets besitzen, gebunden werden. Weitere Bindungssequenzen, die von Cyclin-abhängigen Kinase Komplexen (*cyclin dependent kinase*, CDK) erkannt und phosphoryliert werden, befinden sich im C-Terminus (Lees *et al.*, 1991). Darüber hinaus kann die C-Terminale Region ebenfalls an die nukleare c-ABI-Tryosinkinase und an Mdm-2 binden. Der C-Terminus ist auch für die nukleare Lokalisation von pRB zuständig. Das pRB agiert als negativer Regulator während der Progression durch die G1-Phase, und liegt währenddessen in einer unphosphorylierten Form vor. In diesem Zustand kann es von E2F gebunden werden. Das Retinoblastom-Protein interagiert und kooperiert darüber hinaus mit der Histon-Deacetylase HDAC1 und hemmt so die Transkription (Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Während der späten G1-Phase und der frühen M1-Phase wird pRB von den Cyclin-CDK Komplexen phosphoryliert. Dadurch wird

E2F freigelassen, und es kommt zur Expression von Genen, die für die Zellteilung verantwortlich sind. E2F stimuliert u.a. die eigene Expression sowie die unterschiedlicher Cycline (G<sub>1</sub>/S-Cyclin und S-Cyclin). Durch die Cycline kommt es zur Aktivierung von der Cyclin-abhängigen S-CdK und G<sub>1</sub>/S-CdK Kinasen, die wiederum pRb phosphorylieren. Eine Freigabe von E2F führt zur Verstärkung des Kreislaufes (positive Rückkopplung, Autoinduktion). Durch Phosphorylierung werden p27 und Hct1, Inhibitoren von S-CdK und G<sub>1</sub>/S-CdK, inaktiviert. Gegen Ende der Mitose kommt es durch die Dephosphorylierung von pRB zur E2F-Reprimierung (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Kontrolle der Zellzyklus-Progression vermittelt durch pRb, p53 und weiteren Genprodukten.** Diese Kontrollpunkte formen einige der Zellzyklus-Kontrollpunkte, die bei dem Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase involviert sind. Bei diesem Übergang wird pRb von den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK4 / CDK6 phosphoryliert, wodurch die hemmende Funktion von pRb aufgehoben wird und die Transkription von E2F stimulierten Zielgenen aktiviert wird. (Modifiziert nach Strachan und Read, Human Molecular Genetics 3, 2004, S. 502)

Aufgrund der zentralen Rolle des pRb während des Zellzyklus ist es nicht verwunderlich, dass das Protein eine effiziente Angriffsfläche für unterschiedliche Onkogene darstellt (Whyte *et al.*, 1998; Ludlow *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1988). Neben der Zellzyklusregulation ist pRb ebenfalls noch in weiteren Prozessen, wie z.B. Differenzierung und Apoptose, involviert (Harbour und Dean, 2000).

Die Konsequenz einer Mutation im *RBI*-Gen variiert zwischen Mensch und Maus. Eine heterozygote Inaktivierung des *RBI*-Gens hat beim Menschen eine Disposition zu

Retinoblastomen und anderen Tumoren zur Folge. Interessanterweise konnten in einem murinen Modell mit dem gleichen Mutationsstatus keine Augentumore beobachtet werden, sondern multiple Tumore des Intermediärlappens der Hypophyse (Hu *et al.*, 1994), sowie medulläre Schilddrüsenkarzinome bei einigen Tieren (Williams *et al.*, 1994). *Rb1*-Knockout-Mäuse (homozygote Deletion des *Rb1*-Gens) versterben noch *in utero* (Lee *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1992).

### 1.6.3 Genotyp-Phänotyp Korrelationen

Patienten, die heterozygot für eine onkogene *RBI*-Mutation sind, zeigen einen variablen Phänotyp. Sie können Tumore in beiden Augen, aber auch nur in einem Auge entwickeln (variable Expressivität). In einigen Familien kann eine unvollständige Penetranz beobachtet werden, d.h. Mutationsträger können ein Retinoblastom haben, aber auch unbetroffen sein (Sakai *et al.*, 1991). Beim erblichen Retinoblastom sind Nonsense- und Frameshift-Mutationen in den Exons 2 - 25 mit einer hohen Penetranz mit beidseitigem Retinoblastom assoziiert (Lohmann und Gallie, 2004; Taylor *et al.*, 2007). Splice-Mutationen im Exon 1 können sowohl eine starke als auch eine milde Penetranz haben (Taylor *et al.*, 2007).

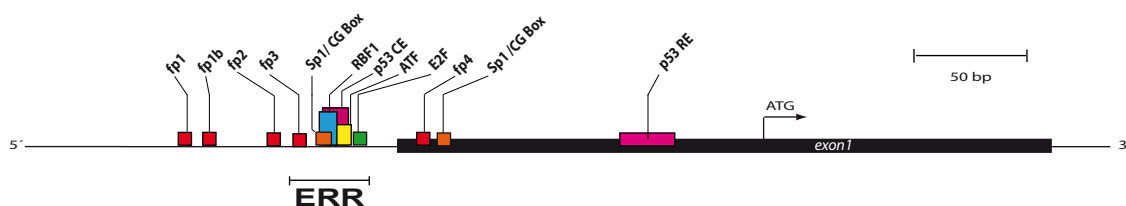
Penetranz und Tumor-Expressivität variieren mit der jeweiligen Mutation, welches zu der Annahme führt, dass es noch weitere modifizierende Faktoren in *cis* geben muss (Taylor *et al.*, 2007). Zusätzlich scheinen noch stochastische Ereignisse einen Einfluss auf den Phänotyp auszuüben, da eine ungleichmäßige Phänotypverteilung (Verhältnis von beidseitig, einseitig und nicht betroffenen Mutationsträgern) innerhalb einer Familie beobachtet wurde (Lohmann *et al.* 1994). Klutz *et al.* berichteten im Jahr 2002 von einigen wenigen elternspezifischen Effekten am *RBI*-Locus. Eine Splice-Mutation IVS6+1G>T (g.45867G>T) konnte in einigen Familien beobachtet werden. Eine Analyse der Phänotypverteilung zeigte, dass die beobachtete intrafamiliäre Variabilität der phänotypischen Expression nicht mit einer Poisson-Verteilung der jeweils zweiten beobachteten Mutation zu vereinbaren war. Durch weitere Analysen konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der Tumordisposition unterschiedlich war, je nachdem, ob das mutante Allel vom Vater oder von der Mutter weitergegeben wurde. Bei der getrennten Prüfung der Phänotypverteilungen für Familienmitglieder, welche das mutante Allel vom Vater bzw. von der Mutter ererbt haben, war die Variabilität jeweils konform mit einer Poisson-Verteilung. Bislang wurde beim erblichen Retinoblastom nur in Familien mit der Splice-Mutation IVS6+1G>T eine solche Variabilität der Tumordisposition in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft des mutanten

Allels festgestellt. Methylierungsunterschiede im Promotorbereich des *RBI* wurden in den untersuchten Familien nicht gefunden.

Kanber und Kollegen zeigten in einer kürzlich veröffentlichten Studie einen Patienten mit einer Imprintingstörung, bei dem auch eine Hypomethylierung einer CpG Insel (CpG 85) im Intron 2 des *RBI*-Gens vorhanden war (Kanber *et al.*, 2009). Das CpG 85 wies ein methyliertes maternales und ein unmethyliertes paternales Allel auf. Weitere Analysen dieser Studie zeigten, dass das CpG 85 einen Promotor für ein alternatives paternal exprimiertes Transkript darstellt, welches seinen Transkriptionsstart in einem neu entdeckten Exon 2B hat. Weitere Analysen dieser Arbeit ließen vermuten, dass die mRNA vom paternalen CpG 85 durch Interferenz in *cis* die Transkription des regulären *RBI*-Transkriptes, welches im in Exon 1 beginnt, mindert. Das reguläre maternale Transkript wird dabei um das 3 fache höher exprimiert als das alternative paternale Transkript.

#### 1.6.4 Der *RBI*-Promotor

Da das *RBI*-Gen ein *housekeeping* Gen ist, ist die CpG-Insel am 5'-Ende charakteristisch nicht methyliert (Greger *et al.*, 1989). Weiterhin typisch für ein *housekeeping* Gen ist, dass es keine offensichtliche CCAAT- oder TATA-Box-Motive im Promotor besitzt. Dies bedeutet, dass der Transkriptions-Initiations-Komplex von anderen initiierenden Bindungsfaktoren sowie anderen DNA-Bindemotiven rekrutiert werden muss (De Fiore *et al.*, 1999). Von einer Sequenz innerhalb des Promotors, die essentielle regulatorische Region (ERR) bezeichnet wird (Temple und Murray, 2005), konnte gezeigt werden, dass sie sowohl für die basale als auch für die regulierende Transkription wichtig ist. Eine schematische Darstellung des *RBI*-Promotors mit der ERR und anderen TFBS ist in Abbildung 7 dargestellt.

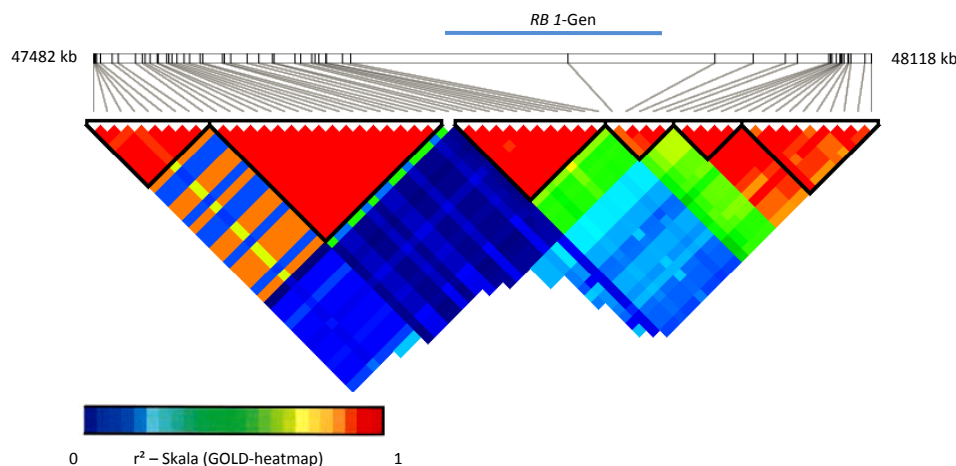


**Abbildung 7: Schematische Darstellung des *RBI*-Promotors.** Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) in der Promotorregion sind als viereckige farbige Kästchen dargestellt: Sp1/CG Box (orange), RBF1 (blau), p53 Control Element (p53 CE) (violett), ATF (gelb), E2F (grün), p53 Responsive Element (p53 RE) (violett). Identifizierte, aber noch nicht charakterisierte TFBS (fp1, fp1b, fp2, fp3 und fp4) sind in rot dargestellt. Das *RBI*-Exon 1 ist als schwarzer Balken gezeigt. Die essentielle regulatorische Region (ERR) befindet sich 5'-stromaufwärts zum Exon 1. An Position g.2060 (relativ zu NCBI *GenBank Database* L11910) ist das ATG Startcodon durch einen Pfeil angezeigt. Abbildung maßstabsgetreu.

Deletionsanalysen kartieren die ERR von der genomischen Position g.1844 bis g.1879 (bezogen auf die *GenBank Accession Number* - L11910), welche unter anderen TFBS für E2F, ATF und Sp1 beherbergt (Gill *et al.*, 1994). Die Sp1 und AFT TFBS innerhalb der ERR sind die essentiellen Aktivatoren der basalen Promotoraktivität (Sakai *et al.*, 1991).

### 1.6.5 Mögliche *cis*-modifizierende Faktoren in der *RB1*-Region

Die Beziehung zwischen Genotyp- und Phänotyp-Variation kann durch Sequenzvarianten beeinflusst werden (Lander, 1996). Die häufigsten Typen von Sequenzvarianten im humanen Genom sind SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), kleine Insertionen oder Deletionen und Variationen in repetitiven Sequenzen. SNPs kommen im humanen Genom durchschnittlich alle 1000 bis 2000 Basen vor (Altshuler *et al.*, 2000) und können als genetische Marker bei der Identifizierung von Krankheitsgenen in Familien durch: Linkage-Studien, LD in isolierten Populationen und Assoziationsanalysen bei Patienten- und Kontroll-Gruppen dienen (Collins *et al.*, 1997; Kruglyak, 1997).



**Abbildung 8: Haplotyp-Blöcke in der Region um das *RB1*-Gen** (Chr13: 47482–48118 kb, Population: CEU); die Lage des *RB1*-Gens ist durch einen blauen Balken angegeben, bei der Berechnung der Haplotypblöcke wurden SNPs mit einer Frequenz des selteneren Allels (minor allele frequency) von  $>0,3$  berücksichtigt. Als Parameter für das Kopplungsgleichgewicht wurde  $r^2$  gewählt, die Werte sind durch eine Farbskala von blau = 0 bis rot = 1 wiedergegeben, Haplotypblöcke sind schwarz umrandet. Die Haplotypblockanalyse wurde mit der Software Haploview, Version 4.2 erstellt. Es wurden die Daten des „*International HapMap Project*“ verwendet.

Sivakumaran *et al.* zeigten 2005 bei der Analyse von genetischen Polymorphismen in der *RB1*-Region in verschiedenen menschlichen Populationen sowie in Primaten, dass die codierenden Sequenzen des *RB1*-Gens eine außergewöhnlich hohe Konservierung zeigen. Auch im nicht-proteincodierenden Bereich sind im Vergleich zu anderen Genen

Polymorphismen seltener und Varianten mit geringer MAF (*minor allele frequency*) größer. Daten des HapMap-Projekts zeigten ein fast vollständiges Kopplungsungleichgewicht. Die Allele im Kopplungsungleichgewicht bilden einen Haplotypblock, der mehr als 300 kb überspannt (Abbildung 8).

### 1.7 Ziel der Arbeit

Drei ineinandergreifende Teilprojekte waren geplant, um in dieser Arbeit genetische Variation in *cis* zum *RBI*-Locus zu identifizieren.

1. Im ersten Teilprojekt sollten *in vitro* Assays zur Analyse der möglichen funktionellen Auswirkung genetischer Variation etabliert werden. Dazu sollten zunächst Variationen in der *RBI*-Promotorregion auf ihre Auswirkung auf die relative allelspezifische Transkriptmenge untersucht werden. Das Spektrum der Variationen sollte onkogene Mutationen, Polymorphismen und genetische Variation mit keinem erkennbaren Einfluss auf den Retinoblastom-Phänotyp umfassen. Der mögliche Einfluss dieser Variationen auf die Transkriptionsrate *in-vitro* sollte durch Luciferase-Reporter-Assays und Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) bestimmt werden.
2. Durch eine Assoziationsstudie sollte überprüft werden, ob einzelne Allelvarianten oder ganze Haplotypen mit Parametern der Krankheitsausprägung, wie z.B. das Alter bei der Diagnose, die Zahl der Tumorherde, Bildung von Zweitumoren und/oder Art der Zweitumore, korrelieren. Um einen größtmöglichen Anteil der genetischen Variationen im Bereich des *RBI*-Gens zu erfassen, sollte mit Hilfe der Daten des Hapmap-Projektes ein Set an Tag-SNPs identifiziert werden, die in einem hohen Kopplungsungleichgewicht ( $r^2$ ) mit anderen SNPs liegen.
3. Eine mögliche phänotypisch relevante Wirkung von genetischen Variationen im *RBI*-Gen ist allelspezifische Expression. Diese konnte aber bis heute noch nicht gezeigt werden, da es im *RBI*-Gen praktisch keine exprimierten Polymorphismen gibt. Daher kann das mögliche allelische Ungleichgewicht auf messenger RNA (mRNA)-Ebene nicht detektiert werden. Eine andere Strategie ist die Nutzung der prä-mRNA (oder heteronuklearen RNA, hnRNA). Durch die Analyse von intronischen Varianten in der hnRNA konnte in dieser Arbeit der mögliche Unterschied von Allelen untersucht werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), BD (Heidelberg), Roche (Mannheim) und GibcoBRL (Eggenstein) in *pro analysis* Qualität bezogen.

#### 2.1.2 Standardlösungen

Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich die Prozentangaben bei Feststoffen auf (w/v) und bei Flüssigkeiten auf (v/v).

6 x DNA Probenpuffer	0,25 % 15 % 10 mM	Bromphenolblau oder Xylenblau Ficoll EDTA
TBE-Puffer	89 mM 89 mM 2 mM	Tris (base minimum) Borsäure EDTA, pH 8,3
TAE-Puffer	40 mM 1 mM	Tris-Acetat EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 7,8 EDTA
Tris-Puffer	1 M Tris	pH 7,9
PBS	137 mM 2,7 mM 1,5 mM 8,1 mM	NaCl KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

### 2.1.3 Grössenstandards

DNA-Grössenmarker	FastRuler™ High Range DNA Ladder (Fermentas)
	FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (Fermentas)
	FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas)
	pUC 19 DNA/ <i>MspI</i> (Fermentas)
	1 kb Ladder (Invitrogen)

### 2.1.4 Medien

#### 2.1.4.1 Medien für die Kultur von Bakterien

LB-Medium (1l)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl
LB/ AMP-Medium (1l)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 100µg/ml Ampicillin
LB/ AMP/ X-Gal Platten	12 g/l Agar, 100 µg/ml Ampicillin, 32 µg/ml X-Gal in LB-Medium
LB/ AMP-Platten	12 g/l Agar, 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

#### 2.1.4.2 Medien für die Kultur von Zellen

D-MEM	D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (pH 7,0), 4,5 g/l D-Glukose, 29,23 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> (Gibco)
Ham's F-12	F-12 Nutrient Mixture (Ham) mit GlutaMAX™ I (GIBCO)
Opti-MEM	Opti-MEM I Serumreduziertes Medium (GIBCO)
FKS	Mycoplex™ Fötales Kälberserum (FKS) (PAA)
Trypsin/EDTA:	2 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in PBS (pH 7,2) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>

## 2.1.5 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.1.5.1 Bakterienstamm

*E. coli* DH5 $\alpha$ : F', endA1, hsdR17, ( $r_k^- m_k^+$ ), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal<sup>r</sup>), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, ( $\Phi$ 80dlacD(lacZ)M15)

### 2.1.5.2 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie (adhärent, D-MEM)
HEK-293	humane embryonale Nieren-Zelllinie (adhärent, D-MEM)
CHO-K1	chinesische Hamster Ovar-Zelllinie (adhärent, Ham's F12)
Y-79	humane Retinoblastoma Zelllinie (in Suspension, D-MEM)

### 2.1.6 Plasmide

#### Plasmide für den Luziferase Assay

pGL3-Basic	Reporterplasmid mit dem Gen für die Firefly-Luziferase (Promega)
pGL3-Enhancer	Reporterplasmid; enthält das Gen für die Firefly-Luziferase unter Kontrolle des SV40-Enhancers (Promega)
pGL4.74 [ <i>hRluc</i> /TK]	Reporterplasmid zur Transfektionskontrolle; enthält das Gen für die Renilla-Luziferase unter Kontrolle des HSV-TK-Promotors (Promega)

### 2.1.7 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

#### weitere Enzyme:

GoTaq Green Mastermix	(Promega)
Desoxyribonuclease I	(Sigma Aldrich)
RNase Inhibitor	(Perkin Elmer)
AmpliTaq Gold Polymerase	(Roche)
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	(Roche)
Proteinase K	(Roche)

### 2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Biomers.net GmbH, Ulm bezogen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Primer auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/μl mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Oligonukleotide, die nicht bereits im Institut etabliert waren, wurden mit der Online-Applikation Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>; Version2.1.10) erstellt. Die einzelnen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1.9 Genetische Variation in der *RB1*-Promotorregion

Die Promotermutationen bzw. -variationen wurden nach folgenden Kriterien in drei Gruppen eingeteilt:

#### **PRED (*predisposing to retinoblastoma*) *RB1*-Promotorvarianten**

Varianten, die ursächlich für die Retinoblastomentstehung sein können (*predisposing to retinoblastoma*), werden im Folgenden als PRED Varianten bezeichnet. Diese Varianten erfüllen zumindest eine vier Kriterien: i) neue Keimbahn Mutation, ii) Mosaik Mutation, iii) somatische Mutation (im Tumor identifiziert aber nicht in konstitutioneller DNA) oder iv)

Variante in mehr als einer nicht verwandten Familie mit mehr als zwei betroffenen Trägern der Mutation.

#### **Patienten mit NED (*no effect on risc of retinoblastoma detected*) *RB1*-Promotorvarianten**

Mutationen, wurden als NED eingestuft, wenn eine der drei aufgeführten Kriterien erfüllt war: i) Variante wurde bei nicht an Retinoblastom erkrankten Individuen gefunden, die keine Angehörigen mit Retinoblastom hatten, ii) Variante wurde in konstitutioneller DNA und Tumor DNA gefunden, wobei die Tumor DNA zusätzlich zwei Rb prädispositionierende Mutationen somatischen Ursprungs zeigt, sowie iii) Variante wurde zusätzlich zu einer für Rb (mit-)ursächlichen Mutation (LOH, Hypermethylierung, vorzeitiges Stop-Codon, invariante Splice-Site) in konstitutioneller DNA gefunden.

#### **VUC (*variant of uncertain consequence*) *RB1*-Promotorvarianten**

Die dritte Klasse umfasst alle Promotor-Varianten, die weder die Kriterien für PRED noch für NED erfüllten.

#### **2.1.9.1 Funktionelle Analyse genetischer Variation in der *RB1*-Promotorregion**

Für die funktionelle Analyse der Promotorvariationen mit dem Luziferase Assay (2.2.4.4) und der ESMA Technologie (2.2.5.1) wurden elf Promotervarianten von Retinoblastom Patienten für die jeweilige Analyse herangezogen. Die genomische Position (g.) der Variante wird relativ zu NCBI *GenBank Database* L11910 angegeben.

##### **g.1718 C>T (rs4151418)**

- Die Variante g.1718 C>T wird in der NCBI Datenbank als Polymorphismus mit der rs Nummer 4151418 geführt (MAF = 0,017). Diese Variante wurde bei Mitgliedern innerhalb einer Familie mit unilateralem und bilateralem Retinoblastom, sowie unbetreffenen Trägern identifiziert. Neben dem SNP konnte noch eine weitere Mutation an Position g.56909 delGT identifiziert werden.

##### **g.1821 G>A**

- Die Mutation wurde im Tumor und Blut bei einem Patienten mit einseitig isoliertem Retinoblastom identifiziert. Der Tumor zeigte keinen Heterozygotieverlust sowie

keine weiteren Mutationen. Die Mutation konnte ebenfalls in zwei unbetroffenen Familien-Mitgliedern gefunden werden.

#### **g.1848 G>T**

- Diese Mutation wurde bei einem Patienten mit bilateralem Retinoblastom gefunden. Neben dieser Mutation konnte eine homozygote Mutation des *RBI* Promoters festgestellt werden (Diane Rushlow, Toronto, persönliche Mitteilung).

#### **g.1862 G>A**

- Mutation erstmals von Sakai *et al.* (1991) beschrieben. In einer untersuchten Familie zeigten Mitglieder der heterozygoten Mutation nur unilaterales Retinoblastom. In einer weiteren Familie wurden sowohl unbetroffene Mutationsträger, als auch Träger des mutierten Allels mit unilateralem und bilateralem Retinoblastom beschrieben.

#### **g.1867T>G**

- Diese Mutation wurde bei Patient mit familiärem bilateralem Retinoblastom beobachtet, sowie in einer weiteren Familie mit zwei betroffenen Mutationsträgern und einem nicht betroffenen Träger der Mutation.
- Mutation wurde bereits in einer Publikation von Taylor *et al.* (2007) bei Patienten und unbetroffenen Mutations-Träger beschrieben.

#### **g.1877 C>T**

- Die Mutation wurde bei einem Patienten mit unilateralem Retinoblastom identifiziert. Neben dieser Mutation konnten noch zwei weitere Mutationen gefunden werden. Eine Mutation in Exon 10 (g.64400\_644001dupT/p.Leu337PhefsX4), sowie die Deletion der Exons 2 bis 6. Beide Mutationen kommen nicht im Blut vor. Die Promotermutation g. 1877 C>T ist bis jetzt unveröffentlicht (Claude Houdayer, Paris, persönliche Mitteilung).

#### **g.1910G>C**

- Mutation erstmals von Cowell *et al.* (1996) in einer Familie mit unbetroffenen Trägern der Mutation, sowie Patienten mit unilateralem Retinoblastom identifiziert.

**g.1980 del6bp**

- Die 6 bp Deletion wurde im Tumor eines Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom identifiziert. Diese konnte ebenfalls im Blut festgestellt werden, sowie bei einem weiteren Mitglied der Familie des Patienten.

**g.1991 G>C**

- Die bis jetzt unpublizierte Mutation, wurde bei einem Patienten mit bilateralem Retinoblastom gefunden. Die Mutation geht mit einer Keimbahn-Framshift-Mutation in Exon 12 (g.70303delT/p.Ser397GlnfsX4) einher (Claude Houdayer, Paris, persönliche Mitteilung).

**g.2101 C>T (pAla14Ala)**

- Die Mutation wurde bei einem Patienten mit unilateralem Retinoblastom und dessen Vater im Blut identifiziert. Die Mutation wurde nicht im Tumor gefunden. 2005 beschrieb Nichols *et al.* diese Mutation in einem Patienten mit isoliert bilateralem Retinoblastom. In einer zuvor veröffentlichten Publikation von Hogg *et al.* (1993) wurde die selbe Mutation bei einem Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom beschrieben. Zusätzlich konnte in diesem Fall noch eine 13q Deletion festgestellt werden. Beide Mutationen konnten nur im Tumor, nicht aber im Blut detektiert werden.

**g.2118 C>T (pPro20Leu)**

- Die Mutation wurde bei einem Patienten mit unilateralem Retinoblastom identifiziert. Neben der Promotor-Mutation konnte auch eine heterozygote somatische Mutation c.2536\_2537insC (g.173722\_173723insC) in Exon 25 gefunden werden, sowie ein heterozygot methylierter *RBI* Promoter (Diane Rushlow, persönliche Kommunikation, Toronto). Des Weiteren wurde die g.2118 C>T Mutation in Veröffentlichungen von Brichard *et al.* (2006) bei Patient mit unilateralem Retinoblastom und asymptomatischen Mutations-Trägern beschrieben.

### 2.1.9.2 Patientenkollektiv der Assoziationsstudie

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv setzte sich aus 121 Familien-Trios zusammen. Ein Trio bestand dabei aus einem Patienten mit isoliert-einseitigem Retinoblastom und beiden Elternteilen, die kein Retinoblastom zeigten.

### 2.1.9.3 Patientenauswahl für die Untersuchung nach Mutationen in 5'-stromaufwärts gelegenen ECRs

In einer Extremgruppe von 32 Patienten wurde eine Mutationsanalyse auf genetische Variation in evolutionär hoch konservierten Regionen im 5'-stromaufwärts Bereich durchgeführt. Die Extremgruppe bestand aus 22 Patienten mit unilateralem Retinoblastom. Bei 11 dieser Patienten wurde eine frühe Diagnose im Kindesalter festgestellt, und bei weiteren 11 Patienten eine späte Diagnose. Zusätzlich enthielt das Patienten-Kollektiv 10 Patienten mit familiärem bilateralem Retinoblastom. Diese Patienten zeigten einen besonderen Phänotyp auf, da bei diesen mehrheitlich Zweittumore diagnostiziert werden konnten (u.a. multiple Lipome).

### 2.1.10 Online Datenbanken und Browser

UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu">genome.ucsc.edu</a>
ECR Browser	<a href="http://ecrbrowser.dcode.org">ecrbrowser.dcode.org</a>
International HapMap Project	<a href="http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov">hapmap.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NCBI Browser	<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov">ncbi.nlm.nih.gov</a>
Primer 3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3">frodo.wi.mit.edu/primer3</a>
Biomers	<a href="http://biomers.net">biomers.net</a>
Human Genome Variation Society	<a href="http://hgvs.org">hgvs.org</a>
Fluxus Network	<a href="http://fluxus-engineering.com">fluxus-engineering.com</a>

(Stand 01.02.2010)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit DNA

#### 2.2.1.1 Präparation von DNA aus peripherem Blut

Genomische DNA wurde sowohl automatisiert mit der BioRobot EZ1 Workstation (Qiagen), als auch mit der FlexiGene-Methode (Qiagen) isoliert.

##### DNA-Präparation mit der BioRobot EZ1 Workstation

Die DNA Präparation durch die BioRobot EZ1 Workstation von Qiagen funktioniert vollautomatisch und nach dem Prinzip der magnetischen Trennung. Die Zellen werden mit Proteinase K aufgeschlossen und mit magnetischen Partikeln gemischt, an welche die DNA bindet. Durch ein magnetisches Feld werden die magnetischen Partikel mit der DNA von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Nach einem Waschschrift wird die DNA eluiert. Danach schließt sich ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 10.000 x g an, um kontaminierende magnetische Partikel zu entfernen, wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

##### DNA-Präparation aus Blut mit der FlexiGene-Methode

Zu 3 ml EDTA-Blut wurden 7.5 ml FG1-Puffer gegeben, mehrmals invertiert, anschließend die Zellkerne abzentrifugiert (5 min, 2000 x g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 1,5 ml mit Qiagen-Protease versetzter FG2-Puffer hinzugegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 1,5 ml 100 %-iges Isopropanol hinzugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und der Ansatz für 3 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 3 min bei 2000 x g wurde der Überstand verworfen, das Pellet 5 min an der Luft getrocknet, in 300 µl FG3-Puffer für 1 h im 65 °C Thermomixer bei 850 rpm inkubiert, und anschließend bei RT über Nacht auf einem Taumel-Rollmischer gelöst.

### 2.2.1.2 GenomiPhi™-DNA Amplifikation

Zur Vervielfältigung von sehr geringen Mengen an DNA wurde das „GenomiPhi™ DNA Amplification Kit“ (GE Healthcare) benutzt. Mit Hilfe der DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi 29 und einem Satz zufälliger Hexamere konnte eine repräsentative Amplifikation des ganzen Genoms gewährleistet werden. Die einzelnen Schritte der Methode sind hier kurz zusammengefasst. Für die Amplifikation der DNA-Proben wurden 10 ng DNA eingesetzt und nach Zugabe von 9 µl Sample Buffer für 3 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und 9 µl Reaktionspuffer und 1 µl des Enzym-Mixes hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C über Nacht. Die Enzyme wurden bei 60 °C für 10 min inaktiviert. Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 200 µl verdünnt.

### 2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Für die analytische Präparation wurde eine Bakterieneinzelkolonie (*E. coli* Stamm DH5α) über Nacht in 3 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurden die Zellen sedimentiert (4 min, 2600 x g), das Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 lysiert. Zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben und 15 min bei 10300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl 100 %-igem Ethanol versetzt und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 min, 16000 x g). Das Pellet wurde mit 300 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 - 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Bei größeren Mengen an Plasmid DNA ist das „Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) verwendet worden. Hierzu wurden 250 ml Bakteriensuspension pelletiert und die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde in 100 – 300 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die einzelnen Puffer für beide Methoden setzten sich wie folgt zusammen:

Puffer P1:	10 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100 µg/ml	RNase A

Puffer P2:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat
		mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen

#### 2.2.1.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Fragmente aus genomischer oder Plasmid-DNA amplifiziert. Standardmäßig wurde die GoTaq Green DNA Polymerase (Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 12,5 µl Go Taq Green 2x Master-Mix, jeweils 10 pmol eines 5' und eines 3' Oligodesoxynukleotids (Primer) und 100 – 200 ng Template-DNA. Das Endvolumen betrug 25 µl. Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 2 min bei 95 °C eingefügt. Danach wurde folgendes PCR Programm ausgeführt:

Denaturierung	15 s	95 °C
Annealing der Primer	30 s	55 °C – 68 °C (je nach Primer)
Elongation	60 s	72 °C

In der Regel wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Annealingtemperatur war abhängig von den jeweiligen  $T_m$ -Werten der Primer. Je nach Größe des zu amplifizierenden DNA Fragmentes wurde die Elongationszeit entsprechend angepasst (1 min/kb). Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine finale Elongationsphase bei 72 °C für 7 min.

#### 2.2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen

PCR Produkte wurden entweder enzymatisch mit ExoSAP-IT (USB), oder mit Hilfe des MultiScreen Filtrationssystem (Millipore) oder Microcon-Säulen (Millipore) aufgereinigt. Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurde ausschließlich mittels Micorcon-Säulen aufgereinigt. Die einzelnen Schritte der verschiedenen Methoden wurden nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Zur größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 bis 2 %-ige Agarose-Minigele mit 1 x TAE-Puffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Den DNA-Proben wurde 6 x DNA Probenpuffer zugegeben und die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 – 120 Volt in TAE-Laufpuffer mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen DNA-Fragmente dienten spezifische Größenstandards (2.1.3). Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 302$  nm sichtbar gemacht werden.

### 2.2.1.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder das MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht ( $\lambda = 302$  nm) mit einem Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit einem dreifachen Gelvolumen Puffer QC versetzt und bei 50 °C für 10 min in einem Thermoblock bei 450 rpm gelöst. Das gelöste Gelstück wurde anschließend mit einem Gelvolumen Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde anschließend auf eine QIAquick Säule gegeben, Zentrifugiert (1 min, 10.000 x g) und nacheinander mit 500 µl Puffer QC und 750 µl PE Puffer gewaschen. Die DNA wurde in 25 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA Konzentration von wurde mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40µg/ml RNA. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> 1,8 bzw. bei proteinfreier RNA 2,0.

Alternativ wurde bei einigen PCR-Proben die ungefähre DNA-Konzentration durch Auftragen eines Aliquots auf ein Agarosegel bestimmt. Durch den Intensitätsvergleich der

Banden mit einem Längen-Marker (2.1.3), dessen Konzentrationen der einzelnen Banden bekannt waren, konnte eine ungefähre DNA-Konzentration ermittelt werden.

#### 2.2.1.9 Restriktionsendonukleaseverdau

PCR-Produkte ( $\geq 1\mu\text{g}$ ) mit Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen und Plasmid-DNA ( $\geq 3\mu\text{g}$ ) mit Multiple Cloning Sites (MCS) wurden für analytische und präparative Zwecke verdaut. Um ein direktes Klonieren der PCR in den pGL3-Enhancer bzw. pGL3-Basic Vektor zu bewerkstelligen, wurden sowohl die PCR-Produkte als auch die Expressionsvektoren mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *XhoI* geschnitten. PCR-Produkte konnten parallel verdaut werden. Der Verdau wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein Doppelverdau der pGL3-Expressions-Vektoren war nicht möglich. Deswegen wurde der Vektor zuerst für 2 h mit 20 U *MluI* linearisiert. Anschließend wurden weitere 20 U *XhoI* hinzugegeben und erneut 2 h verdaut. Da die beiden Enzyme nicht hitzeinaktiviert werden konnten, wurden die Enzyme durch 0,5 M EDTA (pH 8.0) inaktiviert. Damit bei allen Reaktionsansätzen die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde, wurde die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease dem Maßstab der Reaktion angepasst und somit sichergestellt, dass das Gesamtvolumen der Restriktionsenzyme nie größer als 10 % war.

#### 2.2.1.10 *In Vitro* Synthese von spezifischen Mutationen

Für einige funktionelle Analysen des *RBI* Promotors wurden unter Verwendung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) spezifische Mutanten hergestellt. Das hier angewandte *in vitro* System beruht auf der Verwendung spezifisch veränderter Primer in der PCR. Als Vorlage diente ein Plasmid, welches die zu mutierende *RBI* Promotor Sequenz enthielt. Kompetente Bakterien wurden anschließend direkt mit dem zirkulären PCR-Produkt transformiert. Die Parameter der PCR wurden gemäß der Stratagene Online-Applikation „sdmdesigner“ ([www.stratagene.com/sdmdesigner](http://www.stratagene.com/sdmdesigner)) ermittelt. Für Basensubstitutionen wurden Primer von ca. 30 - 35 bp Länge verwendet, die im mittleren Teil die gewünschte Basen-Substitution aufwiesen.

### **2.2.1.11 Klonierung**

#### **2.2.1.11.1 Vektor-DNA**

Für die funktionellen Analysen der genetischen Variationen im RB1 Promotor wurden die Expressions -Vektoren pGL3-Enhancer und pGL3-Basic (Promega) verwendet (Plasmid-Karten im Anhang).

#### **2.2.1.11.2 Insert-DNA**

Die DNA-Fragmente, die für eine gerichtete Klonierung benutzt wurden, wurden aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe der Microcon-Methode bzw. dem Multiscreen Filtration System (Millipore) (2.2.1.4) aufgereinigt und anschließend und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (2.2.1.10)

#### **2.2.1.11.3 Ligation**

Für das pGL3-Vektorsystem wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation wurde in einem Reaktionsvolumen von 15 µl mit 3 Units T4 DNA Ligase (Promega) in 1 x Ligasepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 10 % Polyethylenglycol) angesetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

#### **2.2.1.12 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurde mit dem BigDye Terminator v1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Einer 10 µl Sequenzierreaktion wurden 4 µl Terminator Ready Reaction Mix BigDye, 10 –100 ng DNA als Matrize aus einer PCR bzw. 500 ng bei DNA von einem Plasmid eingesetzt und jeweils 5 pmol des jeweiligen Primers hinzugegeben. Die Sequenzier-Reaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 1 min bei 96 °C eingefügt. Danach wurde folgende Sequenz-Reaktion durchgeführt:

Denaturierung	10 s	96 °C
Annealing des Primers	5 s	50 °C – 60 °C (je nach Primer)
Elongation	4 min	72 °C
	∞	4 °C

Es wurden 25 Zyklen durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Sephadex Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyzer 3100 sowie dem 3130 *xl* Genetic Analyser (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit den Programmen "Codon Code Aligner Version 3.0.1" (Codon Code Cooperation).

### 2.2.1.13 TaqMan SNP Genotyping-Assays

Die allelische Diskriminierung erfolgte mittels TaqMan SNP Genotyping Assays von Applied Biosystems. Es wurden TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays (Assays-on-Demand) sowie Custom TaqMan Gene Expression Assays verwendet. Die Assays enthalten zwei Primer um den zu analysierenden Bereich zu amplifizieren und zwei fluoreszenzmarkierte Sonden, die spezifisch an je ein Allel binden. Die Sonde für das Allel 1 ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC markiert, die Sonde für das Allel 2 ist FAM markiert. Zusätzlich enthalten die Sonden noch einen nichtfluoreszierenden Quencher, der, solange die Sonde intakt ist, die Fluoreszenz unterdrückt. Während der PCR lagert sich jede Sonde spezifisch an ein Allel an. Die DNA-Polymerase verlängert die Primer am 3' Ende und degradiert durch ihre 5' – 3' Nuklease-Aktivität die Sonden, die an die DNA hybridisiert haben. Dadurch wird der Quencher vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Sonden, die nicht an die DNA hybridisiert haben, werden nicht gespalten und es kommt zu keinem Fluoreszenzsignal. Je nach gemessenem Fluoreszenzsignal (VIC oder FAM) kann nun bestimmt werden, welche Allele vorhanden sind. Die PCR-Reaktion wurde mit 5 - 10 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 5 µl durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren folgende: Vor dem ersten Zyklus erfolgte zunächst eine Denaturierung bei 95 °C für 10 min.

Danach wurde folgende Reaktion ausgeführt:

Denaturierung	15 s	95 °C
Denaturierung	15 s	92 °C
Elongation	90 s	60 °C
	∞	4 °C

Es wurden 50 Zyklen durchgeführt. Die Proben wurden dann anschließend in einem ABI PRISM Sequence Detection System 7900HT analysiert. Zur Auswertung wurde die SDS Software Version 2.2 für allelische Diskriminierung (Applied Biosystems) verwendet. Die verwendeten Assays sind im Einzelnen im Anhang aufgeführt.

## 2.2.2 Arbeiten mit RNA

### 2.2.2.1 Isolierung von heteronukleärer hnRNA (hnRNA) aus Fibroblasten

Die Isolierung erfolgte durch das Cytoplasmatic & Nuclear RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation). Die einzelnen Schritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt um die hnRNA zu isolieren. Zusätzlich wurde die hnRNA einem optionalen *DNase I* Verdau unterzogen, um eine DNA Kontamination zu verhindern. Hierbei wurde die RNA mit 1,25 Kunitz *DNase I* auf einer Säule für 60 min bei 37 °C verdaut. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte hnRNA bei -70°C gelagert.

### 2.2.2.2 Präparation von RNA mit dem PAXgene RNA Blood Kit (QIAGEN)

Es wurde bei der Abnahme 2.5 ml Blut durch ein Vakuum in einen mit Lysepuffer gefüllten Vacutainer („PAXgene blood RNA Tube“) gezogen. Hier erfolgte nach kurzem Schütteln direkt eine Lyse der Zellen und Stabilisierung der RNA. Vor der Präparation der RNA musste die Blutprobe für ein Minimum von 2 h in dem PAXgene-Blutröhrchen bei RT inkubiert werden, um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten. Der Vacutainer wurde für 10 min bei 4000 g zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das Leukozytenpellet mit 5 ml RNase-freiem Wasser resuspendiert. Erneut wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 360 µl Puffer BR1 gelöst und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 55°C in einem Schüttelinkubator bei maximaler Schüttelfrequenz, nachdem 300 µl Puffer BR2 und 40 µl Proteinase K zu der Probe hinzugefügt worden sind. Die Proteinreste wurden 3 min bei maximaler Umdrehung in einer Mikrozentrifuge pelletiert und der Überstand mit der RNA vorsichtig in ein neues 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 350 µl absolutem Ethanol präzipitiert und an ein PAXgene-Säulchen gebunden, das sich in einem Auffanggefäß befindet. Dazu wurde die Probe mit dem Präzipitat auf die Säule pipettiert und



für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Das aufgefangene Filtrat konnte verworfen werden. Zum Waschen der gebundenen RNA wurden 700 µl Puffer BR3 auf die Säule pipettiert und wiederum für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschstritte mit jeweils 500 µl ethanolhaltigem Puffer BR4. Dazu wurde beim ersten Schritt mit 8000 g für 1 min und beim zweiten Schritt für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Entfernen möglicherweise verbliebener Ethanolreste folgte eine Zentrifugation bei maximaler Umdrehung für 1 min. Die RNA wurde mit 50 µl RNase freies Wasser durch Zentrifugation von 1 min bei 8000 g in ein 1.5 ml umfassendes Reaktionsgefäß eluiert. Eine zweite Elution der RNA erfolgte mit 30 µl Wasser und einer Zentrifugation in ein zweites, neues Reaktionsgefäß. Die RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 2.2.2.3 Reverse Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)

#### *RT-Reaktion*

In diesem ersten Schritt wurde die hnRNA durch die Reverse Transkriptase mit Hilfe von zufälligen Hexameren in cDNA umgeschrieben. Es wurden dafür die Reagenzien des GeneAmp RNA PCR Kits (Applied Biosystems) benutzt. Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription umfasste 20 µl und wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen angesetzt. Er setzte sich wie folgt zusammen: 20 - 50 ng hnRNA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1 mM dNTPs, 1 Unit RNase Inhibitor, 2,5 Units Reverse Transkriptase, 2,5 µM zufälligen Hexamere, 1x Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3). Zum Ausschluss einer Kontamination der PCR-Reaktionslösung wurde ein weiterer Kontrollansatz ohne cDNA angesetzt (Wasser-Kontrolle). Die Reaktion wird in vier Schritten durchgeführt:

Binden zufälliger Hexamere	10 min	21 °C
Reverse Transkription	15 min	42 °C
Denaturierung	5 min	99 °C
	∞	4 °C.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

*PCR*

Standardmäßig wurde die GoTaq Green DNA Polymerase (Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 25 µl Go Taq Green 2x Master-Mix, jeweils 20 pmol eines 5'- und eines 3'- Oligodesoxynukleotids (Primer). Je 10 µl cDNA wurden zu den vorbereiteten PCR Ansätzen pipettiert und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht. Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 2 min bei 95 °C eingefügt. Danach wurde folgendes PCR-Programm ausgeführt:

Denaturierung	15 s	95 °C
Annealing der Primer	30 s	55 °C -68 °C (je nach Primer)
Elongation	60 s	72 °C

In der Regel wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur war abhängig von den jeweiligen T<sub>m</sub>-Werten der Primer. Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine finale Elongationsphase bei 72 °C für 7 min. Des Weiteren wurden an der cDNA der Isolierten hnRNA insgesamt fünf verschiedene PCR Ansätze mit fünf unterschiedlich lokalisierten Primer Systemen (PS) im *RBI* Gen bzw. im ubiquitär exprimierten *β-Aktin* Gen durchgeführt:

Primer für die RT-PCR-Analysen:

*RBI* Gen:*Primer System II (PS II):*

c.1535_SE	TGTCCTTCCCATGGATTCTG
g.78386_AS	TCCCTATTTGTTCTTGAGGT

*Primer System III (PS III):*

g.77139_SE	TCCTCTTACCAAGGATTAATGAGAA
g.78386_AS	TCCCTATTTGTTCTTGAGGT

#### 2.2.2.4 Quantitative Analyse des allelischen hnRNA-Transkriptverhältnisses (SNaPshot-Analysen)

Um das allelische Transkriptverhältnis der hnRNA des *RBI* Gens zu bestimmen wurden „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen) durchgeführt. Es wurden

Primer entwickelt, die mit ihrem 3'-Ende direkt an einem Polymorphismus liegen. In der SNaPshot-Reaktion wird der Primer um ein farbmarkiertes Didesoxynukleotid verlängert und so spezifisch mit den komplementären Basen der Allele des Polymorphismus markiert. Bei der anschließenden Auswertung am Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) kann aus den Signalintensitäten der farbmarkierten Primer der beiden Allele das Transkriptverhältnis bestimmt werden. Die Analysen wurden mit dem „SNaPshot Multiplex Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Matrize diente aufgereinigtes hnRNA RT-PCR-Produkt oder aufgereinigtes DNA-PCR-Produkt. Der SNaPshot-Reaktions-Ansatz (10 µl) setzte sich aus 100 – 200 ng aufgereinigtem PCR-Produkt, 5 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix und 1 µl Primer (0,2 µM) zusammen. Die SNaPshot Reaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Einer initialen Denaturierung von 3 min bei 96°C folgten 25 Zyklen aus je 10 sec Denaturierung bei 96°C, 5 sec Annealing bei 45 – 60°C (abhängig vom jeweiligen Primer) und 30 sec Elongation bei 60°C. Der SNaPshot-Reaktions-Ansatz wurde durch Zugabe von 1 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB) mit anschließender Inkubation bei 37°C für 60 min und Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 min aufgereinigt. 0,5µl des aufgereinigten SNaPshot-Produktes wurden mit 9 µl Formamid (FA) und 0,5 µl GeneScan-120 LIZ size standard (Applied Biosystems) gemischt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems). Die Auswertung erfolgte mit der GeneScan Analysis 3.7 (Applied Biosystems) und der Genotyper 3.7 (Applied Biosystems) Software. Für die Primer zur Untersuchung der verschiedenen SNPs siehe Anhang.

### 2.2.3 Bakterien

#### 2.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien (modifiziert nach Maniatis *et al.*, 1982)

Einzeller die DNA aus der umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5α wurde in 10 ml b-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g MgSO<sub>4</sub>, pH 7,6 mit KOH eingestellt) bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml b-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen eines OD<sub>550</sub>-Wertes von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 1250 x g und 4 °C sedimentiert und das

Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit 0.2 M HAc eingestellt) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen erneut für 15 min bei 1250 x g und 4 °C sedimentiert und das Pellet in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH eingestellt) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

7,5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1 – 2 ng Plasmid-DNA wurden zu 50 µl kompetenten Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42 °C, dann wurde der Ansatz 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit dem Selektionsmarker Ampicillin ausgestrichen, und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.4 Zellkultur

#### 2.2.4.1 Kultivierung der Zellen

Alle Säugerzelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C und unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor und nach der Benutzung sterilisiert.

#### 2.2.4.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 70 – 80 % Konfluenz pro Zellkulturflasche (Nunc, 75 cm<sup>2</sup>) geerntet. Bei adhären wachsenden Zellen wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch eine 3 – 5-minütige Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst. Bei Suspensionszellen wurde das Medium durch Zentrifugation der Zellen (5 min bei 500 x g) abgenommen und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Ein Teil der Zellen wurde in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen pro

Flasche zur weiteren Kultivierung auf neue Zellkulturflaschen mit 10 ml entsprechendem Medium verteilt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### 2.2.4.3 Transiente Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion der Zellen für die Luziferase-Reporter Experimente erfolgte mittels FuGENE HD (Roche). Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide in 100  $\mu$ l Opti-MEM Medium verdünnt. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurde die dreifache Menge ( $\mu$ g DNA/ $\mu$ l FuGENE) an FuGENE HD, bezogen auf die Menge der zu transfizierenden DNA, in 100  $\mu$ l Opti-MEM verdünnt. Nach 5 min Inkubation wurde die verdünnte DNA mit dem verdünnten FuGENE gemischt und weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Komplexe in 50  $\mu$ l Aliquots auf die Zellen gegeben (96 Well Format, pro Well ca.  $1 \times 10^4$  Zellen) und für 48 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.4.4 Luziferase-Reporter Assay

Um die Auswirkungen der einzelnen genetischen Variationen im *RBI* und deren Einfluss auf die relative Transkriptmenge zu untersuchen, wurden Luziferase Reporter Assays in CHO-K1, HeLa, HEK-293 und Y79 Zellen durchgeführt. Mittels Fugene HD wurde das jeweilige *RBI*-Promotor Reporterkonstrukt transient transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde bei jedem Ansatz zusätzlich ein Reporterkonstrukt für die Renilla Luziferase im Verhältnis 1:25 transfiziert. Die Luziferase Reporter Assays wurden mit dem Dual-Luziferase Reporter Assay System (Promega) durchgeführt. Nach 48-stündiger Inkubation der transfizierten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 50  $\mu$ l PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 20  $\mu$ l Lyse-Puffer aufgenommen und für 30 min lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit dem Luminometer Centro LB 960 (Berthold Technologies). Es wurden mindestens zwei unabhängige dreifach Messungen pro *RBI*-Promotor-Konstrukt durchgeführt. Die relative Luziferase-Aktivität wurde berechnet, indem der Quotient aus der Firefly Luziferase-Aktivität und der Renilla Luziferase-Aktivität gebildet wurde. Die ermittelten Quotienten wurden schließlich normalisiert, indem der Wert des Normal-Person *RBI*-Promotors gleich 100 % gesetzt wurde.

## 2.2.5 Protein-DNA-Interaktionen

### 2.2.5.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) dient zum Nachweis einer möglichen Protein-DNA Interaktion *in vitro*. Dazu wird ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit einem nukleären Proteinextrakt inkubiert. Im Falle einer Protein-DNA Interaktion wandern die Komplexe im nativen Polyacrylamidgel langsamer als die freie DNA und können mittels Autoradiografie als verschobene Bande (*shift*) dargestellt werden. Die EMSA Methode wurde in dieser Arbeit angewandt, um den Einfluss der genetischen Variation im *RBI*-Promotor und deren Einfluss auf die Bindungseigenschaften von Proteinen in dieser Region zu untersuchen. Hierzu wurde das Gel Shift Assay System (Promega) verwendet. Die Durchführung der Methode erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

#### 2.2.5.1.1 Annealing der Oligonukleotide

Zur Anlagerung der Oligonukleotide wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  der komplementären Oligonukleotide (100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) mit 50  $\mu\text{l}$  1 M Tris (pH 7,9) und 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O gemischt. Der Ansatz wurde 4 min bei 95 °C inkubiert und dann langsam auf RT abgekühlt. Die so erhaltenen doppelsträngigen Oligonukleotide (dsOligos) haben somit eine Konzentration von 50 pmol/ $\mu\text{l}$ . Für den weiteren Versuchsverlauf wurden die dsOligos auf 1,75 pmol/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

#### 2.2.5.1.2 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

2  $\mu\text{l}$  der dsOligos (1,75 pmol/ $\mu\text{l}$ ) wurden für die radioaktive Markierung mit 1  $\mu\text{l}$  10 x T4 Polynucleotide Kinase Buffer (700 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1  $\mu\text{l}$  EAYSTIDES Adenosine 5'-Triphosphate, [ $\gamma$ <sup>32</sup>-P] (3.000 Ci/mmol, Perkin Elmer), 5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 1  $\mu\text{l}$  T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ $\mu\text{l}$ ) gemischt, und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Es wurde 1  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen, und 49  $\mu\text{l}$  1 x Puffer EB (Qiagen) zur Verdünnung hinzugegeben. Die Proben wurden mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und in 25 - 50  $\mu\text{l}$  1 x Puffer EB (Qiagen) eluiert. Die

Radioaktivität in *counts per minute* (cpm) wurde mit Hilfe des Packard TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer gemessen (1900TR; A Canberra Company, Dreieich).

### 2.2.5.1.3 Protein-DNA Bindereaktion

Um eine Protein-DNA-Interaktion nachzuweisen, wurden die radioaktiv markierten dsOligos in einer Konzentration von 60.000 cpm in die Bindereaktion eingesetzt. Die Protein-DNA - Bindereaktion wurde nach dem unten aufgeführten Schema in Tabelle 1 durchgeführt. Die radioaktiv markierten dsOligos wurden nach einer Inkubation von 10 min bei RT zu dem Bindereaktionsansatz hinzugefügt und für weitere 20 min bei RT inkubiert.

### 2.2.5.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteineigenschaften nicht zu verändern, wurde der Protein-DNA Interaktionsnachweis mit einem nativen (nicht-denaturierenden) Gel durchgeführt. Hierfür wurde ein 5 %-iges natives Polyacrylamidgel (v/v) gegossen, welches sich wie folgt zusammensetzte: 6 ml 10 x TBE Puffer, 10 ml 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, w/v Rotiphorese Gel 30), 3ml Glycerol (50 %), 41 ml H<sub>2</sub>O, 600 µl 10 % APS, 150 µl UltraPure<sup>TM</sup> TEMED.

**Tabelle 1: EMSA Protein DNA Reaktionsansatz**

Reagenz	Negativ- Kontrolle	Probe	spezifischer Kompetitor	unspezifischer Kompetitor
5 x Gel Shift Binding Buffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
HeLa Nuclear Extract	-	2 µl	2 µl	2 µl
Unmarkierte spezifische dsOligos (50 <sup>x</sup> )	-	-	x µl	-
Unmarkierte spezifische dsOligos (50 <sup>x</sup> )	-	-	-	x µl
Markierte dsOligos	x µl	x µl	x µl	x µl

Nach Zugabe von 2,5 µl 5 x Gel Pilot Loading Dye (Qiagen) zu den Proben wurden diese auf das Gel aufgetragen und in 1 x TBE Puffer bei 130 V, 25 mA und 4 °C für 4 – 6 h

aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde auf einem Whatman Chromatographie Papier (Whatman International England) bei 80 °C ca. 25 – 30 Minuten vakuumgetrocknet. Die Exposition des Röntgenfilms (Fugi Medical X-Ray Film, 100NIF Super RX) wurde bei - 80 °C für ungefähr 10 - 16 Stunden durchgeführt, und der Röntgenfilm anschliessend mit der Entwicklungsmaschine Curix 60 (Agfa) entwickelt.

### 2.2.6 Assoziationsstudie

Durch eine Assoziationsstudie sollte untersucht werden, ob ein einzelnes variantes Allel oder ganze Haplotypen mit Parametern bei der Krankheitsausprägung bei Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom korreliert sind. Dazu sollte untersucht werden, ob ein bestimmtes Merkmal (Allel oder Haployp) häufiger oder seltener in einer Gruppe vorkam, verglichen mit einer Gruppe, die dieses Merkmal nicht besitzt. Sollte der Unterschied zwischen den beiden Gruppen für einen Marker oder Haplotyp statistisch signifikant sein ( $p \leq 0,05$ ), bedeutet das, dass ein Risiko für das Merkmal mit dem Marker assoziiert ist.

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv setzte sich aus 121 Familien-Trios zusammen. Ein Trio bestand dabei aus einem Patienten mit einseitigem Retinoblastom und beiden Elternteilen, die kein Retinoblastom hatten.

#### 2.2.6.1 Statistische Analysen

#### 2.2.6.2 Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Die Daten aus den TaqMan SNP Genotyping Assays (2.2.1.13) wurden mit der JMP Genomics Version 3.2 Software (SAS Institute Inc.) ausgewertet. Hierzu wurde der TDT angewandt. Der TDT ist ein familien-basierter Test, bei dem Trios aus beiden Eltern und dem betroffenen Kind auf einen genetischen Marker (SNP) hin untersucht werden (Spielman *et al.*, 1993).

#### 2.2.6.3 Haplotypbestimmung

Die Haplotypvarianten der Kinder und Eltern basieren auf den Daten aus den TaqMan SNP Genotyping Assays (2.2.1.13), und wurden mit der Hapmap Software Haploview Version 4.2



(<http://www.broadinstitute.org/mpg/haploview>; Barrett *et al.*, 2005) ermittelt. Die Beziehung zwischen den Haplotypvarianten wurde mit dem Median Joining Algorithmus (Bandelt *et al.*, 1999) bestimmt, wofür die Software Network 4.1.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) benutzt wurde.

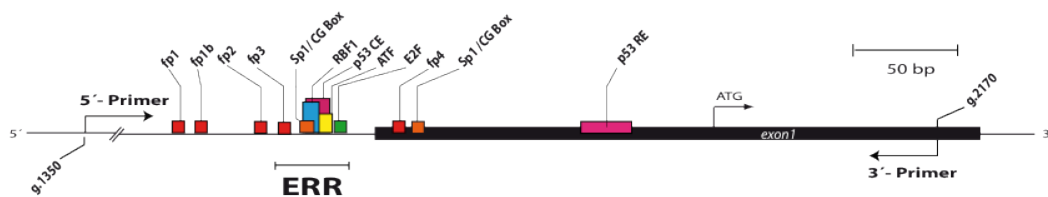
### 2.2.7 Evolutionäre Analysen: ECR Browser

Mit der Online-Applikation ECR-Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org>) war es möglich evolutionär konservierte Regionen (*evolutionary conserved regions*, ECRs) im Genom bereits sequenzierter Spezies zu identifizieren und diese graphisch darzustellen. Das Programm ist ein web-basierter Genom-Browser, mit dem es möglich war mehrere Alignments einer genomischen Region verschiedener bis jetzt sequenzierter Spezies, wie dem menschlichen Genom, Nagern oder auch von Fischen, wie *Fugu fugu*, darzustellen, und zu vergleichen. Anhand dieser Daten erstellt der ECR-Browser ein Profil evolutionär konservierter Regionen unter Berücksichtigung der eingegebenen benutzerdefinierten Parameter (Ovcharenko *et al.*, 2004). Durch eine benutzerdefinierte Angabe der Sequenzidentität zwischen den einzelnen Spezies in Prozent und der Länge der ECRs, konnten die Daten individuell gefiltert werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des *RBI*-Promotors

Um den Einfluss genetischer Variation im *RBI*-Promotor in Bezug auf die relative Transkriptmenge des *RBI*-Gens hin zu charakterisieren, wurden Luziferase-Reporter-Gen-Assays mit *RBI*-Promotorvariationen durchgeführt. Sakai *et al.* hatten 1991 gezeigt, dass ein Fragment stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts des *RBI*-Gens, nämlich g.1361 bis g. relativ zu NCBI *GenBank Database* L11910, volle Promotoraktivität zeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde das von Sakai *et al.* untersuchte Promotorfragment am 3'-Ende um 133 bp verlängert, um somit die Auswirkung von Sequenzvarianten im proteincodierenden Bereich des Exons 1 auf die relative Transkriptmenge hin zu untersuchen. Die Verlängerung des Promotorfragmentes durch den proteincodierenden Bereich hatte dabei keinen Einfluss auf die Expressionsanalysen, da dieser verlängerte Teil nicht *in frame* mit dem *luc+* Gen war.



**Abbildung 3.1 Schematische Illustration des *RBI*-Promotors.** Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFBS) sind als viereckige farbige Kästchen dargestellt: Sp1/CG Box (orange), RBF1 (blau), p53 Control Element (p53 CE) (violett), ATF (gelb), E2F (grün), p53 Responsive Element (p53 RE) (violett). Identifizierte, aber noch nicht charakterisierte TFBS fp1, fp1b, fp2, fp3 und fp4 sind rot dargestellt. Das Exon 1 wird als schwarzer Balken angezeigt. Die essentielle regulatorische Region (ERR) befindet sich 5'-stromaufwärts zum Exon 1. An Position g.2060 (relativ zu NCBI *GenBank Database* L11910) ist das ATG Startcodon durch einen Pfeil angezeigt. Die PCR-Primer zur Amplifikation des *RBI*-Promotorfragmentes zur Klonierung in einen Expressionsvektor werden durch die jeweiligen Pfeile abgebildet.

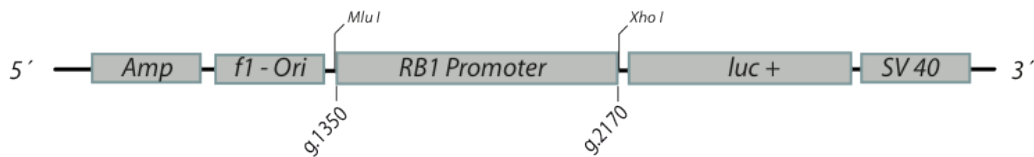
Das untersuchte Promotorfragment mit einer Länge von 819 bp erstreckt sich von der genomischen Position g.1350 bis g.2170 (relativ zu NCBI *GenBank Database* L11910). Dieses Promotorfragment beherbergt alle bekannten regulatorischen Elemente der *RBI*-Transkriptionskontrolle. So ist in dieser evolutionär konservierten Promotorregion die essentielle regulatorische Region (ERR) mit den bereits validierten TFBS für Sp1, AFT, p53 und E2F enthalten und zusätzlich uncharakterisierte TFBSs (Abbildung 3.1). Das *RBI*-

Promotorfragment wurde in der *sense* Orientierung in die *Multiple Cloning Site* eines pGL3-Enhancer Expressionsvektors stromaufwärts zu einem SV40-Enhancer kloniert.

Die DNA für das Promotorfragment wurde mittels PCR an einer Normal-Person (NP) DNA amplifiziert, und wird im Folgenden *RBI* NP genannt. Das *RBI*-Promotorfragment mit der jeweiligen genetischen Variation wurde direkt an Patienten DNA amplifiziert. Um eine direkte Klonierung in den pGL3-Expressionsvektor zu gewährleisten, wurde am 5'-Ende des *forward* Primers eine *MluI* bzw. an dem 5'-Ende des *reverse* Primers eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Somit konnte eine gerichtete Klonierung gewährleistet werden, um die gleiche Orientierung zum *RBI*-Locus herzustellen. Stand keine Patienten-DNA mit der jeweiligen Promotorvariation zur Verfügung, wurden Mutationen durch eine spezielle Mutagenese-PCR-Technik hergestellt, bei der das pGL3-*RBI* NP Promotorkonstrukt als Matrize für die PCR diente (Primer im Anhang).

### 3.1.1 Funktionelle Analyse von *RBI*-Promotorvarianten mit dem pGL3-Enhancer-Vektor

Sieben Promotorvarianten wurden in einen Luziferase-Reportergen-Expressionsvektor mit einem SV40-Enhancer 5'-stromaufwärts zum *luc+* Gen inseriert. Das Reporterkonstrukt wird im Folgenden als pGL3-Enhancer bezeichnet (Abbildung 3.2). Reporterkonstrukte mit dem Enhancer-Element und der jeweiligen Variation im *RBI*-Promotor werden nach ihrer genomischen Position relativ zu NCBI *GenBank Database* L11910 bezeichnet. Liegt eine Mutation beispielsweise an der genomischen Position g.1862 und ist für einen Basenaustausch von Guanin nach Adenosin (G>A) verantwortlich, wird dieses Konstrukt im Folgenden als pGL3-E g.1862 G>A bezeichnet. Gleiches gilt für weitere Mutationen im *RBI*-Gen. Das pGL3-E g.1862 G>A Reporterkonstrukt diente in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für die Luziferase-Assays. Diese Punktmutation wurde zuvor als onkogen charakterisiert (Sakai *et al.*, 1991). Diese Mutation wurde in der Literatur beschrieben, dass sie die *RBI*-Gen Expression in Luziferase-Assays deutlich vermindert, da sie sich in der Erkennungssequenz eines Sp1-Bindemotivs befindet. Sakai *et al.* (1991) identifizierten diese Promotormutation sowohl bei Patienten (mit unilateralem Retinoblastom), als auch bei unbetroffenen Individuen innerhalb derselben Familie (unvollständige Penetranz).



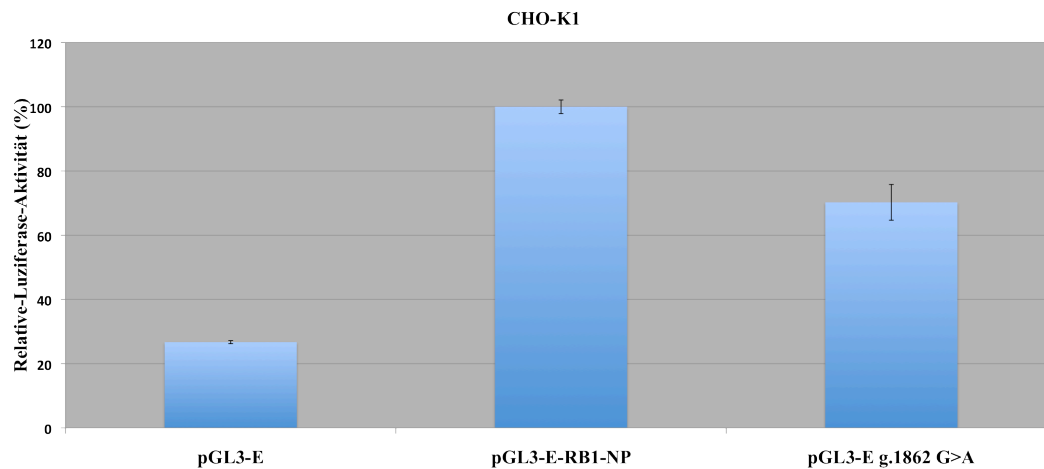
**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines Teils des pGL3-Enhancer Luziferase-Assay Reporterkonstruktes mit inseriertem *RB1*-Promotorfragment.** Die Position im Genom des inserierten Promotorfragmentes wird durch die genomische Position relativ zu *NCBI GenBank Database* L11910 angegeben. Das 819 bp große Promotorfragment wurde 5'-stromaufwärts zum *luc +* Gen inseriert.

Drei Kontroll-Reporterkonstrukte wurden transient in CHO-K1-Zellen transfiziert:

- i) ein promotorloser Vektor ohne Insert als negative Kontrolle (pGL3-E)
- ii) ein Vektor mit der NP *RB1* Promotor-Sequenz (pGL3-E-*RB1* NP)
- iii) ein Vektor mit der bereits validierten onkogenen Mutation g.1862 G>A als positive Kontrolle (pGL3-E g.1862 G>A).

Zunächst wurden die Luziferase-Assays mit den drei Kontroll-Reporterkonstrukten in CHO-K1-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.3). Zellen, die mit der Positivkontrolle pGL3-E g.1862G>A transfiziert wurden zeigten nur eine moderate Reduktion der Genexpression von 30 % im Vergleich zu dem Referenzwert (Abbildung 3.3).

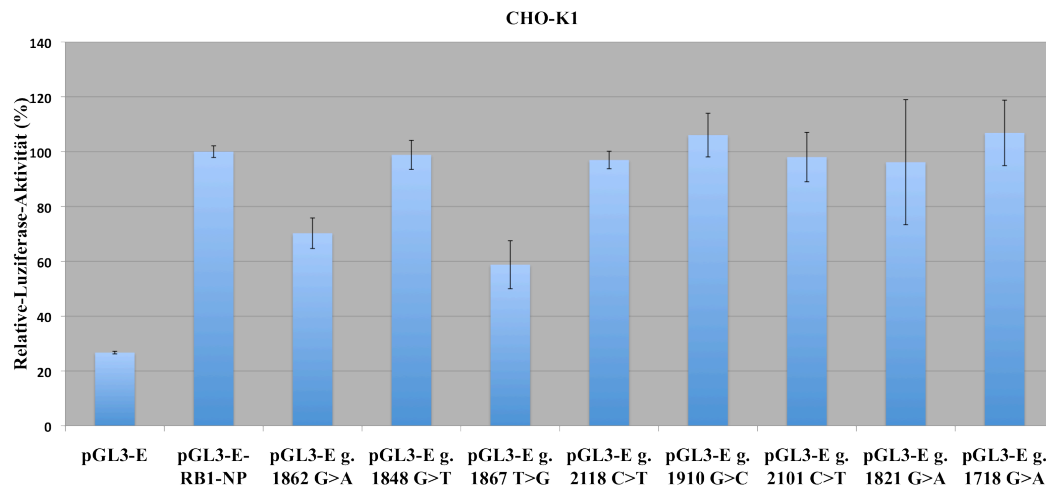
Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen in der Veröffentlichung von Sakai *et al.* (1991), die eine deutliche Reduktion von über 90 % beobachten konnten, so war die hier beobachtete reduzierte Luziferase-Aktivität um nur 30 % zu gering bzw. die Genexpression zu hoch. Ebenfalls zeigte die Negativkontrolle eine zu hohe Luziferase-Aktivität von über 20 % (Abbildung 3.3). Obwohl bei den Untersuchungen von Sakai *et al.* (1991) ein anderes Zellsystem (CV-1 Zellen, Nierenzellen aus dem Affen) und ein anderer Luziferase-Vektor (pXP2) genutzt wurde, lag es dennoch nahe, dass diese Beobachtung auf einen ungewollten Einfluss des SV40-Enhancers in dem Reporterplasmid zurückzuführen ist.



**Abbildung 3.3: *RB1*-Promotorvariationen g.1862 G>A untersucht mit dem pGL3-Enhancer Vektor.** Die Luziferase-Aktivitäten wurde in CHO-K1 Zellen ermittelt. Als Negativkontrolle diente ein pGL3-E Vektor ohne Promotor (Säule 1). Die Luziferase-Aktivität der Zellen, die mit dem Konstrukt pGL3-E *RB1* NP transfiziert worden sind, wurde als Referenzwert (100 %) definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle wurde die von Sakai *et al.* bereits beschriebene Promotormutation g.1862G>A verwendet. Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

Um diese Annahme zu überprüfen wurden weitere *RB1*-Promotorvarianten mit dem pGL3 – E-Plasmid untersucht. Aber die Ergebnisse der Reporterkonstrukte (pGL3-E g.1718G>A, pGL3-E g.1821G>A, pGL3-E g.1848G>T, pGL3-E g.1910G>C, pGL3-E g.2101C>T, und pGL3-E g.2118C>T) zeigten in den meisten Fällen keine signifikante Änderung in der Genexpression (Abbildung 3.4). Einzig in den CHO-K1-Zellen mit dem pGL3-E g.1867T>G Reporterkonstrukt konnte eine Reduktion der Genexpression beobachtet werden. Diese war sogar überraschender Weise geringer als die der Positivkontrolle (Abbildung 3.4. Säule 7). Die Mutation liegt in der *Activating Transcription Factor* (ATF) TFBS (Tab. 3.3), und stört dadurch die Protein-DNA-Interaktion (Sakai *et al.*, 1991).

Diese experimentellen Beobachtungen ließen darauf schließen, dass der SV40-Enhancer einen ungewollten Einfluss auf die relative Transkriptmenge der einzelnen Promotorvarianten zu ausübt.

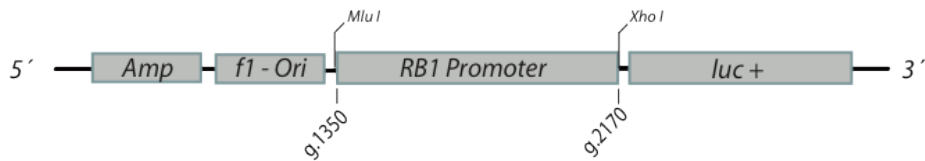


**Abbildung 3.4: Luziferase-Aktivität von acht *RB1*-Promotorvariationen untersucht in CHO-K1-Zellen mit dem pGL3-Enhancer-Vektor.** Als Negativkontrolle diente ein pGL3-E-Vektor ohne Promotor (Säule 1). Die Luziferase-Aktivität der Zellen, die mit dem Konstrukt pGL3-*RB1* NP transfiziert worden sind, wurde als Referenzwert (100 %) definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle wurde die von Sakai *et al.* bereits beschriebene Promotormutation g.1862G>A verwendet. Alle Promotorvariationen außer der Positivkontrolle und der Mutation an Position g.1867 T>G (Säule 5) zeigten keine signifikante Veränderung der Genexpression. Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

### 3.1.2 Funktionelle Analyse von *RB*-Promotorvarianten mit dem pGL3-Basic Vektor

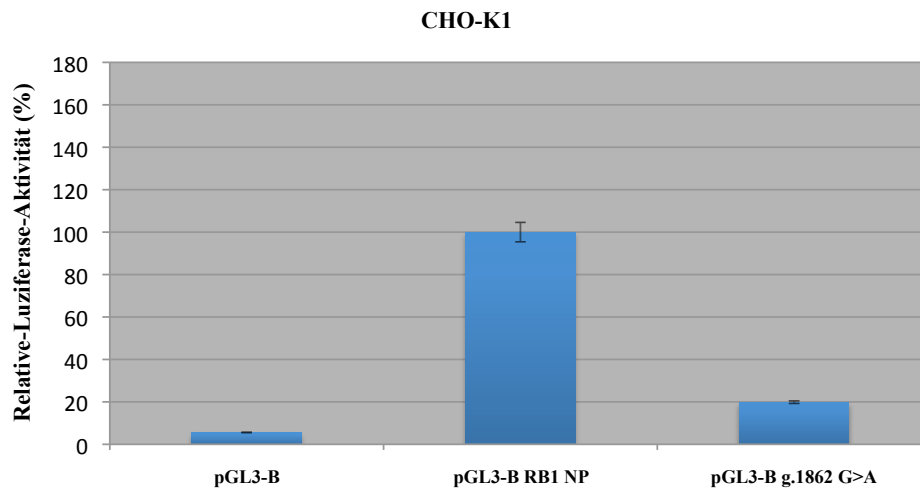
Um den möglichen Einfluss des SV40-Enhancer-Elementes auf den *RB1*-Promotor auszuschließen, wurden Reporterkonstrukte ohne den Enhancer mit den *RB1*-Promotorvariationen hergestellt. Hierzu wurden in einen pGL3-Basic-Luziferase-Vektor (pGL3-B) die bereits vorhandenen Promotorvarianten aus den pGL-3-Enhancer-Vektoren mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *MluI* herausgeschnitten und 5'-stromaufwärts des *luc+*-Gens in einen pGL3-B-Vektor ligiert (Abbildung 3.5). Somit besitzt der pGL3-B Vektor kein zusätzliches *cis*-Element, das einen ungewollten Einfluss auf die Genexpression im Luziferase-Assay haben könnte. Als erstes wurden die CHO-K1 Zellen nur mit den drei Kontroll-Reporterkonstrukten, transient transfiziert:

- i) ohne Insert als Negativkontrolle (pGL3-B)
- ii) mit der NP *RB1* Promotorsequenz (pGL3-B-*RB1* NP)
- iii) ein Reporterkonstrukt mit der bereits als onkogen validierten Mutation g.1862 G>A (pGL3-B g.1862 G>A) als Positivkontrolle



**Abbildung 3.5: Schematische Darstellung eines Teils des pGL3-Basic-Luziferase-Assay Reporterkonstruktes mit inseriertem *RB1*-Promotorfragment.** Die Position im Genom des inserierten Promotorfragmentes wird durch die genomische Position relativ zu NCBI GenBank Database L11910 angegeben. Das 819 bp große Promotorfragment wurde 5'-stromaufwärts zum *luc +* Gen inseriert.

Die Luziferase-Aktivität von Zellen mit dem pGL3-B-*RB1* NP-Konstrukt wurde als Referenzwert (100 %) definiert (Abbildung 3.6 Säule 2 ).



**Abbildung 3.6: Luziferase-Aktivität der onkogenen *RB1*-Promotorvariation g.1862 G>A untersucht in CHO-K1-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor ohne SV40-Enhancer.** Als Negativkontrolle diente ein pGL3-B Vektor ohne Promotor (Säule1). Die Luziferase-Aktivität der Zellen, die mit dem Konstrukt pGL3-B *RB1* NP transfiziert worden sind, wurden als Referenzwert (100 %) definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle wurde die von Sakai *et al.* bereits beschriebene Promotormutation g.1862G>A verwendet. Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

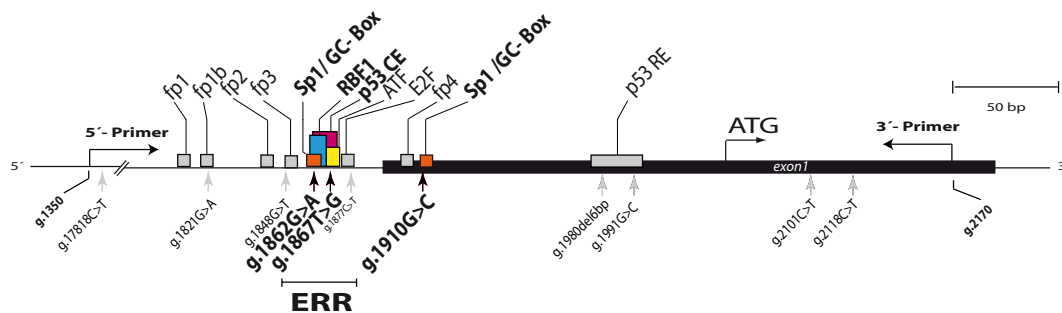
Im Unterschied zu den Ergebnissen der Luziferase-Assays mit dem pGL3 – E Reporterkonstrukten (Abbildung 3.3), zeigt die interne Kontrolle pGL3-B g.1862 G>A nun eine sehr deutliche Reduktion der Genexpression von mehr als 80 % im Vergleich zum Referenzwert (Abbildung 3.6 Säule 3).

Dieses bestätigte die Annahme, dass der SV40-Enhancer in den pGL3-E-Konstrukten einen Einfluss auf die Genexpression ausgeübt hat. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die

folgenden Untersuchungen nur noch mit dem pGL3-B Reporter-Plasmid durchgeführt. Zu den bereits vorhandenen Promotorvariationen, die schon mit dem pGL3-E-Plasmid untersucht worden sind (Abbildung 3.4), wurden noch drei weitere für die Untersuchungen mit dem pGL3-B-Vektor hinzugezogen: pGL3-B g.1980del6pb, pGL3-B g.1877C>T und pGL3-B g.1991G>C (Tabelle 5).

### 3.1.2.1 Funktionelle Analyse der PRED (*Predisposing to retinoblastoma*)-Varianten

Neben der bereits von Sakai *et al.* validierten Punktmutation g.1862 G>A ließen sich nach der Kriterien (siehe 2.1.9) zwei weitere Promotormutationen, g.1867T>G und g.1910G>C, als PRED typisieren. Das pGL3-B g.1862 G>A diene als interne Positivkontrolle für die Validierung der Promotor-Analysen.

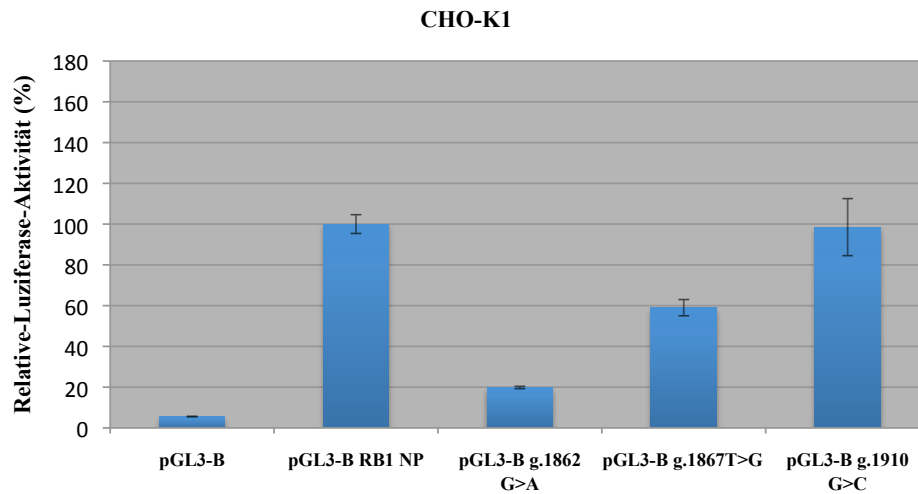


**Abbildung 3.7: Schematische Illustration des *RB*-Promotors mit allen untersuchten PRED Mutationen.** TFBS sind dann als viereckige farbige Kästchen dargestellt, wenn eine TFBS durch eine Promotormutation betroffen ist. Die essentielle regulatorische Region (ERR) befindet sich 5'-stromaufwärts zum Exon 1. Betroffene TFBS sind Sp1/CG Box (orange); RBF1 (blau); p53 *Control Element* (p53 CE) (violett); ATF (gelb). An Position g.2060 (relativ zu NCBI GenBank Database L11910) wird das ATG-Startcodon durch einen Pfeil gezeigt. Die PCR-Primer zur Amplifikation des *RB1* Promotorfragmentes zur Klonierung in einen Expressionsvektor werden durch die jeweiligen Pfeile abgebildet.

### 3.1.2.2 Funktionelle Analyse in CHO-K1-Zellen

Die Mutationen vom Typ PRED wurden als erstes in der CHO-K1-Zelllinie (2.1.5.2) untersucht. Die Zelllinie wurde aufgrund ihrer sehr hohen Transfektionseffizienz für die ersten Experimente ausgesucht.



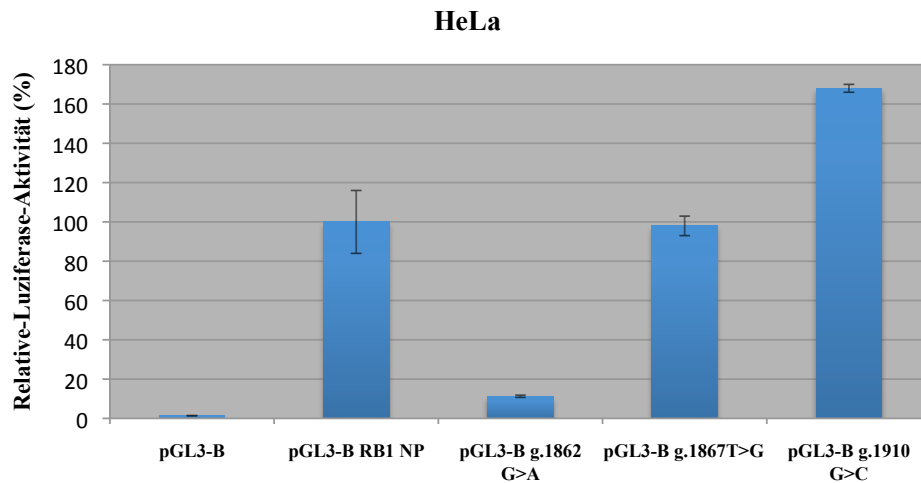


**Abbildung 3.8: Luziferase-Aktivität *RBI*-PRED-Promotorvariationen untersucht in CHO-K1-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RBI*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RBI*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RBI*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

Auch in diesem Experiment ist eine deutliche Reduzierung der Genexpression in den Zellen zu beobachten, die mit dem pGL3-B g.1862G>A-Konstrukt transfiziert wurden. Die Reduktion beträgt ca. 80 % verglichen mit der Genexpression der NP *RBI*-Promotorsequenz (Abbildung 3.8). Die Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt pGL3-B g.1867T>G transfiziert wurden, zeigen nur noch eine Genexpression von 59 % im Vergleich zum NP *RBI*-Promotorkonstrukt (Abbildung 3.8). Das Reporterkonstrukt pGL3-B g.1910G>C zeigte in dem CHO-K1-Zellsystem keine signifikante Änderung in der Genexpression verglichen mit dem NP *RB*- Promotorkonstrukt (Abbildung 3.8.).

### 3.1.2.3 Funktionelle Analyse in HeLa-Zellen

Als nächstes wurden die Promoteranalysen in der humanen HeLa-Zelllinie (2.1.5.2) durchgeführt. Die Zellen wurden mit drei unterschiedlichen PRED-Promotorkonstrukten transfiziert.



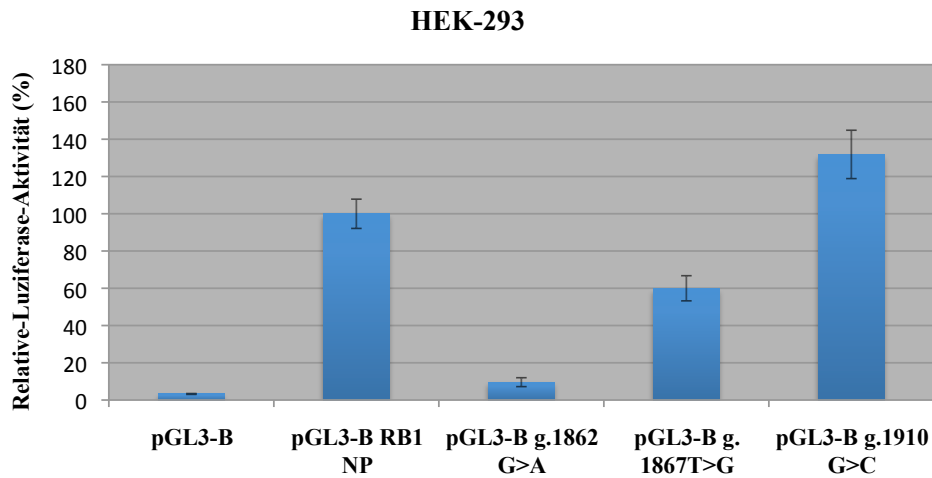
**Abbildung 3.9: Luziferase-Aktivität *RBI* PRED-Promotorvariationen untersucht in HeLa-Zellen mit dem pGL3-Basic Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RBI*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RBI*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RBI*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

Die Positivkontrolle pGL3-B g.1862G>A zeigte eine Verminderung der Genexpression auf 11 % verglichen zu dem NP *RBI*-Promotorkonstrukt (Abbildung 3.9). Im Vergleich zu den Ergebnissen der CHO-K1-Zellen (Abbildung 3.8) ist die Promotoraktivität durch die Mutation g.1862 noch stärker vermindert.

Das Reporterkonstrukt g.1867T>G (Abbildung 3.9) führte zu keiner differenziellen Antwort (Luziferase-Aktivität bei 98 %). Die Promotormutation g.1910G>C führte sogar zu erhöhter Promotoraktivität (168 %).

#### 3.1.2.4 Funktionelle Analyse in HEK-293 Zellen

Sakai *et al.* 1991 verwendeten für die Expressions-Assays die Affennieren-Zelllinie CV-1. Um bezüglich des Zelltyps eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit Analysen mit einer humanen Nieren-Zelllinie (HEK-293, 2.1.5.2) durchgeführt.

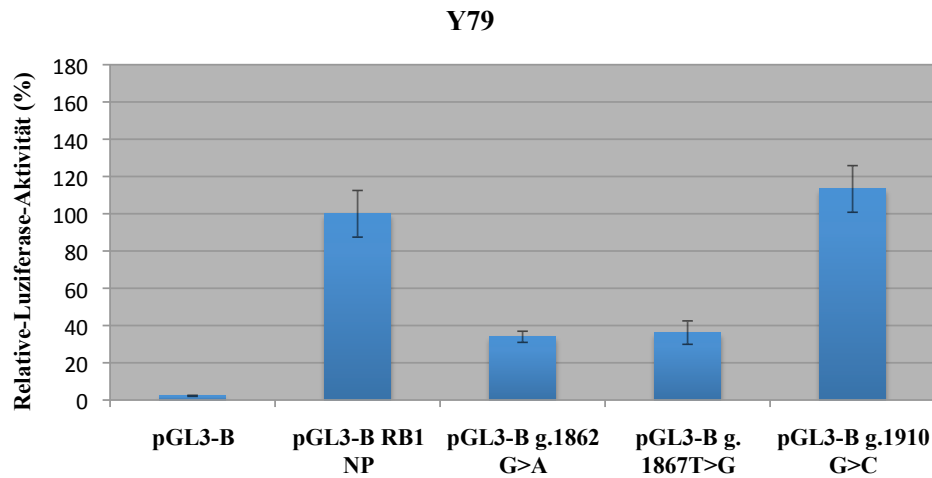


**Abbildung 3.10: Luziferase-Aktivität *RB1* PRED-Promotorvariationen untersucht in HEK-293-Zellen mit dem pGL3-Basic Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RB1*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100-%) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

Die Genexpression des pGL3-B g.1862G>A Reporterkonstruktes liegt bei ca. 9 % (Abbildung 3.10). Das pGL3-B g.1867T>G Promotorkonstrukt zeigte eine Verminderung der Promotoraktivität auf 60 % (Abbildung 3.10), das g.1910G>C Konstrukt eine erhöhte Promotoraktivität (130 %).

### 3.1.2.5 Funktionelle Analyse in Y79-Zellen

Die PRED-Mutationsanalysen wurden in einem Zellsystem funktionell untersucht, welches dem Gewebe, in dem die Retinoblastom-Tumorgenese stattfindet, am ähnlichsten ist. Die Assays wurden in Y79-Retinoblastoma-Zellen durchgeführt (2.1.5.2) und freundlicherweise von Harald Stephan (Kinderklinik, UK Essen) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen genetischer Variationen des *RB1*-Gens in dieser Retinoblastom-Zelllinie durchgeführt.



**Abbildung 3.11: Luziferase-Aktivität *RB1*-PRED-Promotorvariationen untersucht in Y79-Retinoblastoma-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RB1*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

Die Promotoraktivität der g.1862 G>A Variante beträgt in Y79-Zellen 34 %. Das Promotorkonstrukt g.1867 T>G zeigte eine reduzierte Promotoraktivität von 36 % und die Variante g.1910G>C keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 3.11).

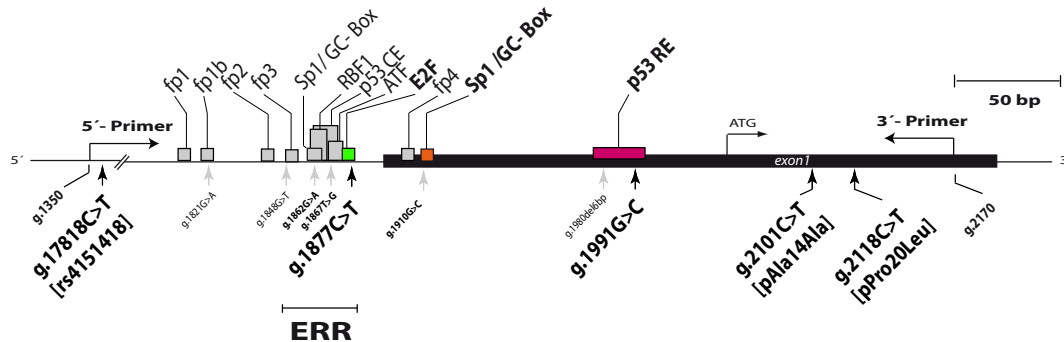
### 3.1.3 NED (*No effect on risk of retinoblastoma detected*) *RB1*-Promotorvarianten

Unter Berücksichtigung der in 2.1.9 beschriebenen Kriterien wurden fünf Mutationen als NED eingestuft und in vier Zelllinien (2.1.5.2) analysiert (Abbildung 3.12). Das Design des Experimentes entspricht dem der Untersuchungen von PRED Varianten (3.1.2.1). Die von Sakai *et al.* beschriebene Mutation g.1862 G>A diente als Positivkontrolle.

#### 3.1.3.1 Funktionelle Analyse der NED Varianten in CHO-K1-, HeLa-, HEK-293- und Y79-Zellen

5'-stromaufwärts der *RB1*-Promotorregion befindet sich an Position g.1718 ein Polymorphismus von Cytosin nach Thymin (rs4151418). Die MAF dieses SNPs (CEU Population) liegt bei 0,017 und dieser ist daher eine seltene Variante. Mit dem

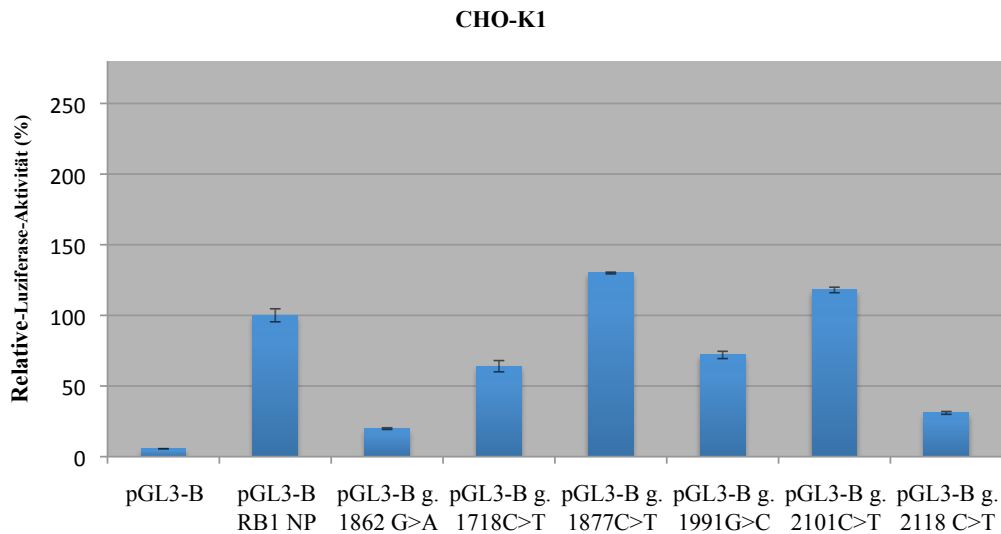
Reporterkonstrukt transfizierte CHO-K1-, HEK-293- und Y79-Zellen zeigten eine Reduktion in der Genexpression.



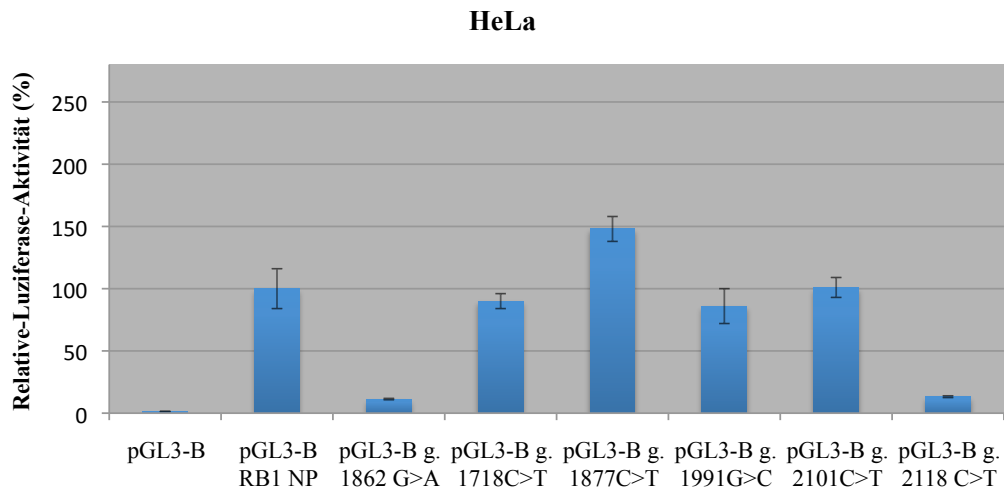
**Abbildung 3.12: Schematische Illustration des *RBI*-Promotors mit allen untersuchten NED-Mutationen.** TFBS sind dann als viereckige farbige Kästchen dargestellt, wenn eine TFBS durch eine Promotormutation betroffen ist. Nicht betroffene TFBS sind als graue Kästchen dargestellt. Die essentielle regulatorische Region (ERR) befindet sich 5'-stromaufwärts von Exon 1. Betroffene TFBS sind E2F (grün) und p53 Responsive Element (p53 RE) (violett). Zusätzlich befindet sich 5'-stromaufwärts ein SNP (rs4151418; g.1718 C>T) und im porteinocodierenden Teil des Exons 1 zwei Mutationen (g.2101 C>T und g.2118 C>T). An Position g.2060 (relativ zu NCBI GenBank Database L11910) ist das ATG Startcodon durch einen Pfeil gezeigt. Die PCR Primer zur Amplifikation des *RBI*-Promotorfragmentes zur Klonierung in einen Expressionsvektor werden durch die jeweiligen Pfeile abgebildet.

Die beobachtete Promotoraktivität lag in CHO-K1-Zellen bei 64,48 % (Abbildung 3.13), in Y79- Zellen bei 59,04 % (Abbildung 3.16), in HEK-293-Zellen bei 71,91 % (Abbildung 3.15) und in HeLa- Zellen bei 90,4 % (Abbildung 3.14).

Das Promotorkonstrukt pGL3-B g.1877 C>T zeigte in drei von vier Zelllinien einen Anstieg der Promotoraktivität: HEK-293-Zellen (121 %; Abbildung 3.15), CHO K1 (130 %; Abbildung 3.13) und HeLa-Zellen (148 %; Abbildung 3.14). In Y79-Zellen wurde eine Aktivitätsreduktion von 20 % beobachtet (Abbildung 3.16). In dem nicht proteincodierenden Teil des Exons 1 befindet sich an Position g.1991 eine Punktmutation von Guanin nach Cytosin (g.1991 C>G). In den Luziferase-Assays zeigte das Promotorkonstrukt eine Promotoraktivität von 45 % in HEK-293- Zellen (Abbildung 3.15), von 72 % CHO-K1-Zellen (Abbildung 3.13) und von 75 % in Y79-Zellen (Abbildung 3.16). HeLa-Zellen zeigten keine signifikante Änderung der Promotoraktivität (Abbildung 3.14).

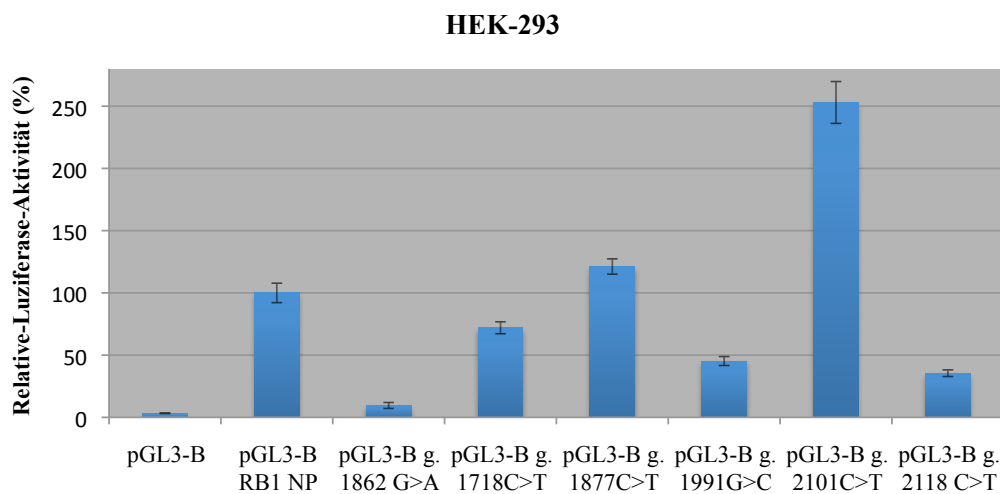


**Abbildung 3.13: Luziferase-Aktivität *RB1*-NED-Promotorvariationen untersucht in CHO-K1-Zellen mit dem pGL3-Basic Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RB1* Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.



**Abbildung 3.14: Luziferase-Aktivität *RB1*-NED Promotorvariationen untersucht in HeLa-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RB1*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

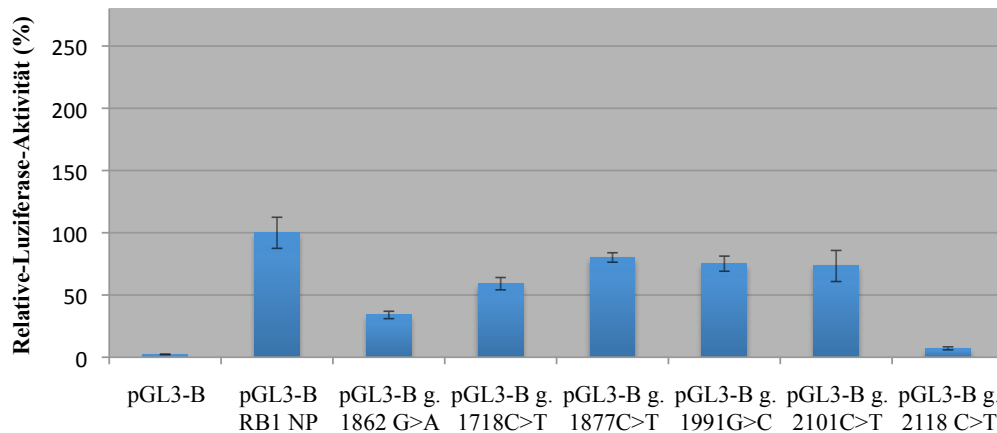
Zwei untersuchte Promotormutationen sind in dem proteincodierenden Bereich des Exons 1 lokalisiert. Eine stille Punktmutation befindet sich an der Position g.2101 und stellt einen Basenaustausch von Cytosin nach Thymin dar. In den Luziferase-Assays zeigte diese Promotorvariante heterogene Antworten in der Promotor-Aktivität: CHO-K1-Zellen (118,11 %, Abbildung 3.13), HeLa-Zellen (101,17 %, Abbildung 3.14), HEK-293 Zellen (253,81 %, Abbildung 3.15) und Y79-Zellen (73,31 %, Abbildung 3.16)



**Abbildung 3.15: Luziferase-Aktivität *RB1*-NED-Promotorvariationen untersucht in HEK-293 Zellen mit dem pGL3-Basic Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne RB1-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1* Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

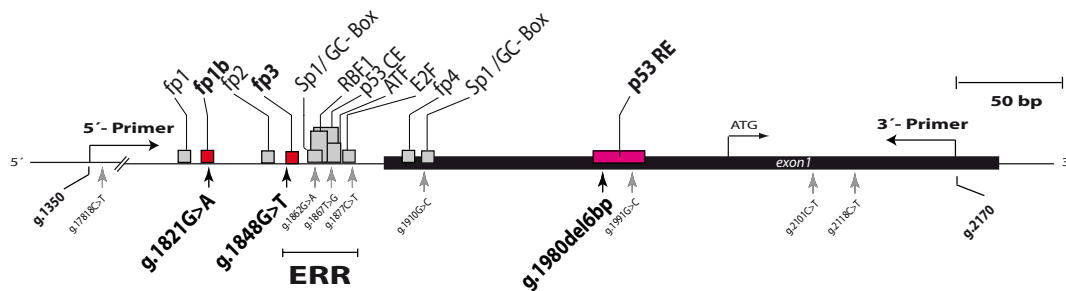
Die zweite Mutation befindet sich an der Position g.2118 und resultiert in einem Basenaustausch von C>T. Die Missense-Mutation von Cytosin nach Thymin resultiert auf Aminosäuren-Ebene in einem Austausch im pRb von Prolin nach Leucin an der zwanzigsten Stelle (p.Pro20Leu). Alle vier Zelllinien zeigten eine signifikante Reduzierung der Promotoraktivität: CHO-K1- (31,87 %, Abbildung 3.13), HEK-293 35,44 % (Abbildung 3.15), HeLa- (13,2 % Abbildung 3.14) und Y79-Zellen (7,06 % Abbildung 3.16).

## Y79



**Abbildung 3.16** Luziferase-Aktivität *RB1* NED-Promotorvariationen untersucht in Y79-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor. Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RB1*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

### 3.1.4 VUC (Variant of uncertain consequence) *RB1*-Promotorvarianten



**Abbildung 3.18:** Schematische Illustration des *RB1*-Promotors mit allen untersuchten VUC-Mutationen. TFBS sind dann als viereckige farbige Kästchen dargestellt, wenn eine TFBS durch eine Promotormutation betroffen ist. Die essentielle regulatorische Region (ERR) befindet sich 5'-stromaufwärts zum Exon 1. Betroffene TFBS sind potenzielle TFBS fp1b und fp3 (rot) und das p53 Responsive Element (p53 RE) (violett). An Position g.2060 (relativ zu *NCBI GenBank Database* L11910) ist das ATG-Startcodon durch einen Pfeil angezeigt. Die PCR-Primer zur Amplifikation des *RB1*-Promotorfragmentes zur Klonierung in einen Expressionsvektor werden durch die jeweiligen Pfeile abgebildet.

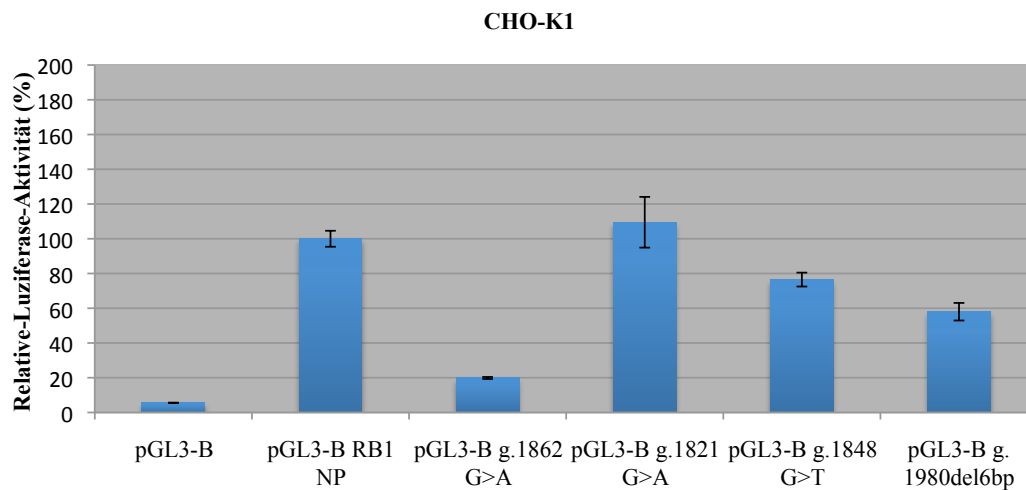
Die dritte Promotorklasse umfasst alle Varianten, die nicht als PRED (3.1.2.1) oder NED (3.1.3) klassifiziert worden sind. Unter Berücksichtigung der PRED- und NED-Kriterien



(2.1.9) konnten die drei Mutationen g.1821 G>A, g.1848 G>T und g.1980 del6bp als VUC eingestuft werden.

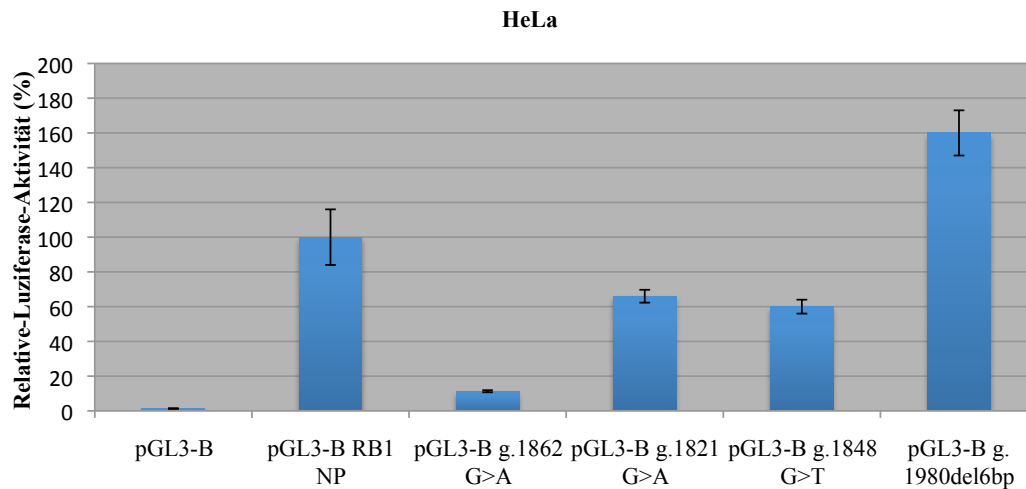
### 3.1.4.1 Funktionelle Analyse der VUC Mutationen in CHO-K1-, HeLa-, HEK-293- und Y79-Zellen

Alle Zelllinien zeigten eine signifikante starke Verminderung der Promotoraktivität mit der Positivkontrolle g.1862 G>A in den Luziferase-Assays.



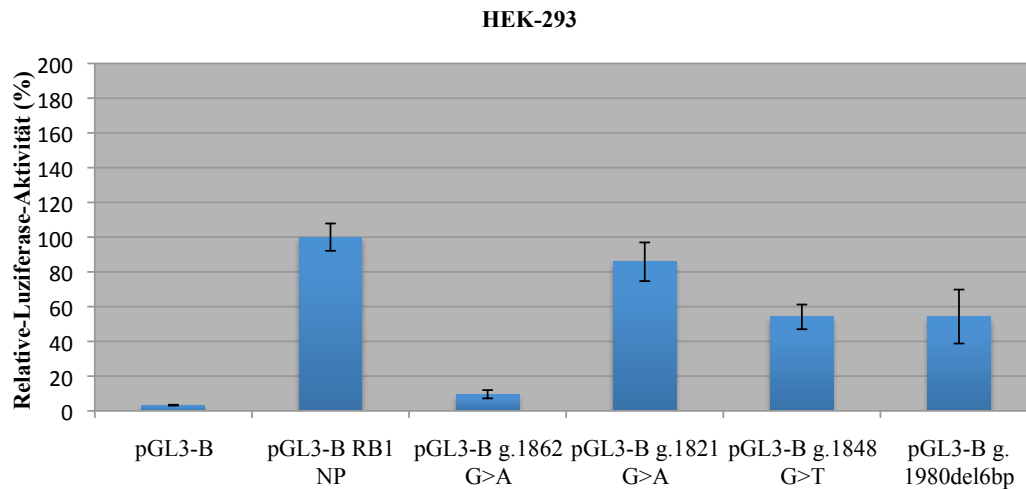
**Abbildung 3.19: Luziferase-Aktivität *RBI*-VUC-Promotorvariationen untersucht in CHO-K1-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B-Reporterkonstrukt ohne RB1-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RBI*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Die Punktmutation g.1821 G>A (Säule 3) befindet sich in einer potentiellen TFBS fp1b sowie g.1848 (Säule 4) in der potentiellen TFBS fp3 (Temple and Murray, 2005). Die 6 bp-Deletion liegt im Zentrum des p53 Responsive Elements (Säule 6). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RBI*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

In drei der vier Zelllinien (CHO-K1, HEK-293 und Y79), die mit dem Promotorkonstrukt pGL3 g.1821 G>A transfiziert wurden, konnte keine Änderung in der Promotoraktivität beobachtet werden. In HeLa-Zellen wurde eine moderate Minderung der Promotoraktivität auf 60 % beobachtet (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20: Luziferase-Aktivität *RB1*-VUC-Promotorvariationen untersucht HeLa-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B Reporterkonstrukt ohne *RB1* Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Die Punktmutation g.1821 G>A (Säule 3) befindet sich in einer potenziellen TFBS fp1b sowie g.1848 (Säule 4) in der potenziellen TFBS fp3 (Temple and Murray, 2005). Die 6 bp-Deletion liegt im Zentrum des p53 *Responsive Elements* (Säule 6). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

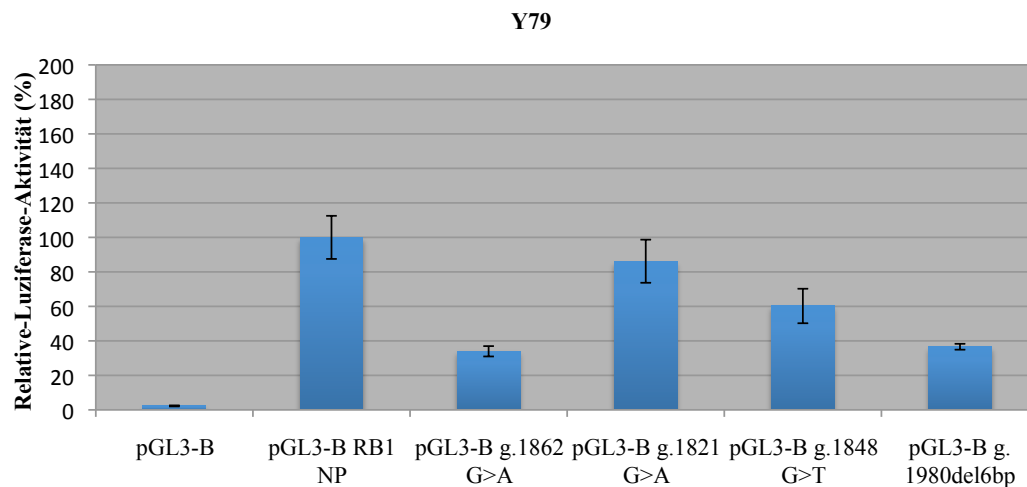
Die zweite Mutation der VUC-Klasse befindet an der Position g.1848 und ist für einen Basenaustausch von Guanin nach Thymin verantwortlich. In allen vier Zelllinien konnte eine signifikante Minderung der Promotoraktivität festgestellt werden: HeLa- (60 %, Abbildung 3.20), Y79- (60 %, Abbildung 3.22), CHO-K1- (75 %, Abbildung 3.19), und HEK-93-Zellen (54 %, Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Luziferase-Aktivität *RB1*-VUC-Promotorvariationen untersucht in HEK-293-Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B-Reporterkonstrukt ohne *RB1*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1* Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Die Punktmutation g.1821 G>A (Säule 3) befindet sich in einer potenziellen TFBS fp1b sowie g.1848 (Säule 4) in der potenziellen TFBS fp3 (Temple and Murray, 2005). Die 6 bp-Deletion liegt im Zentrum des p53 Responsive Elements (Säule 6). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

Die letzte Mutation der VUC Klasse ist eine Deletion von 6 bp an Position g.1980. Die Ergebnisse der Luziferase-Assays zeigen in drei der vier Zelllinien eine Reduzierung der Promotoraktivität: CHO-K1- (58 %, Abbildung 3.19), HEK-293- (54 %, Abbildung 3.20) und Y79-Zellen (36 %, Abbildung 3.22). In den HeLa-Zellen war hier die Promotoraktivität mehr als 1,5-fach erhöht (Abbildung 3.20).

Eine Übersicht aller relativen Luciferase-Reporter-Assay-Daten ist in Tabelle 4 dargestellt. Des Weiteren ist in Tabelle 5 eine Zusammenfassung aller Reporterkonstrukte mit der jeweiligen genetischen Variationen des *RB1*-Promoters, der betroffenen TFBS sowie die Klassifizierung der Mutation zu sehen.



**Abbildung 3.22: Luziferase-Aktivität *RB1*-VUC-Promotorvariationen untersucht in Y79- Zellen mit dem pGL3-Basic-Vektor.** Das pGL3-B-Reporterkonstrukt ohne *RB1*-Promotor-Insert dient als Negativkontrolle (Säule 1). Als Referenzwert (100 %) wurde das Reporterkonstrukt mit dem pGL3-B NP *RB1*-Promotor definiert (Säule 2). Als Positivkontrolle diente das Reporterkonstrukt mit der bereits validierten onkogenen Mutation pGL3-B g.1862 G>A (Säule 3). Die Punktmutation g.1821 G>A (Säule 3) befindet sich in einer potenziellen TFBS fp1b sowie g.1848 (Säule 4) in der potenziellen TFBS fp3 (Temple and Murray, 2005). Die 6 bp-Deletion liegt im Zentrum des p53 Responsive Elements (Säule 6). Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachmessungen pro *RB1*-Promotor-Reporterkonstrukt durchgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist dargestellt.

**Tabelle 4: Relative Aktivität der Luziferase-Reporter-Assays der elf *RB1*-Promotorvariationen in den Zelllinien CHO-K1, HeLa, HEK-293 und Y79.** Der angegebene Wert ist der Quotient aus der Firefly-Luziferase- und der Renilla-Luziferase-Aktivität. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung des Mittelwerts. Spalte 1 CHO-K1-Zellen, Spalte 2 HeLa-Zellen, Spalte 3 HEK-293-Zellen und Spalte 4 Y79- Zellen.

	CHO K1	HeLa	HEK-293	Y79
pGL3-B	5,6 +/- 0,06	1,35 +/- 0,12	3,27 +/- 0,24	2,28 +/- 0,3
pGL3-B <i>RB1</i> NP	100 +/- 4,6	100 +/- 16	100 +/- 7,87	100 +/- 12,5
pGL3-B g.1862 G>A	19,85 +/- 0,58	11,3 +/- 0,6	9,57 +/- 2,38	33,96 +/- 3
pGL3-B g.1848 G>T	76,52 +/- 4	60,54 +/- 4	54,11 +/- 7,11	60,22 +/- 10
pGL3-B g.1867T>G	59,14 +/- 4	98,61 +/- 5	59,95 +/- 6,76	36,18 +/- 6,25
pGL3-B g.1980del6bp	58,23 +/- 5,05	160,2 +/- 13	54,29 +/- 15,53	36,6 +/- 1,7
pGL3-B g.2118 CT	31,87 +/- 1	13,2 +/- 0,7	35,44 +/- 2,63	7,06 +/- 1,2
pGL3-B g.1910 G>C	98,54 +/- 14	168,71 +/- 2	131,85 +/- 13	113,31 +/- 12,5
pGL3-B g.1877C>T	130,34 +/- 0,7	148,26 +/- 10	121,17 +/- 6,1	80,15 +/- 3,75
pGL3-B g.2101 C>T	118,11 +/- 2	101,17 +/- 8	253,81 +/- 16,8	73,31 +/- 12,5
pGL3-B g.1821 G>A	109,47 +/- 14,6	66,9 +/- 3,7	85,83 +/- 11,12	86,18 +/- 12,5
pGL3-B g.1991G>C	72,6 +/- 2,6	86,03 +/- 14	45,25 +/- 3,6	75,22 +/- 6,1
pGL3-B g.1718C>T	64,48 +/- 4	90,4 +/- 6	71,91 +/- 4,79	59,04 +/- 5

**Tabelle 5: pGL3- Reporter-Plasmide** Spalte 1, Auflistung aller pGL3-Luziferase-Reporter-Plasmide für die transiente Transfektion. Spalte 2, genomische Position der untersuchten genetischen Variationen relativ zu L11910. Spalte 3, verwendetes Reporter-Plasmid; E, pGL3-Enhancer; B, pGL3-Basic. Spalte 4, umgebende Nukleotidsequenz der genetischen Variation (in Klammern hervorgehoben) im *RBI* Promotor. Spalte 5, betroffene Bindestelle innerhalb des *RBI*-Promotors.

Reporter-Plasmid	Position relativ zu L11910	pGL3 Vektor	Klassifizierung	Teil der Insertbasensequenz mit Promotorvariation (+ Strang) im Zentrum
pGL3-B		E / B		kein Insert
pGL3-B <i>RBI</i> NP		E / B		NP <i>RBI</i> -Sequenz
pGL3-B g.1862	+ 1862	E / B	PRED	5'-CGCCGCGGGC ( <b>G/A</b> ) GAAGTGACGT-3'
pGL3-B g.1848	+ 1848	E / B	VUC	5'-CCTCGCGGAC ( <b>G/A</b> ) TGACGCCGCG-3'
pGL3-B g.1867	+ 1867	E / B	PRED	5'-CGGGCGGAAG ( <b>T/G</b> ) GACGTTTTCC-3'
pGL3-B g.1980del6bp	+ 1980	- / B	VUC	5'-AGGACGG (----- /GGCGTG)CCCCGACGT-3'
pGL3-B g.2118	+ 2118	E / B	NED	5'-GCCGCGGAAC ( <b>C/T</b> ) CCCGGCACCG-3'
pGL3-B g.1910	+ 1910	E / B	PRED	5'-TTGCCGGGCG ( <b>G/C</b> ) GGGAGGGCGC-3'
pGL3-B g.1877	+ 1877	- / B	NED	5'-TGACGTTTTC ( <b>C/T</b> ) CGCGTTGGA-3'
pGL3-B g.2101	+ 2101	E / B	NED	5'-CCACCGCCGC ( <b>C/T</b> ) GCTGCCGCCG-3'
pGL3-B g.1821	+ 1821	E / B	VUC	5'-CCCCACAGAC ( <b>G/A</b> ) CCGGCGGGCC-3'
pGL3-B g.1991	+ 1991	- / B	NED	5'-GGCGTGCCCC ( <b>G/C</b> )ACGTGCGCGC-3
pGL3-B g.1718	+ 1718	E / B	NED	5'-GCGCCGGATG ( <b>C/T</b> ) CTCCTGGAAG-3

### 3.2 DNA-Protein-Interaktionsnachweise durch *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA)

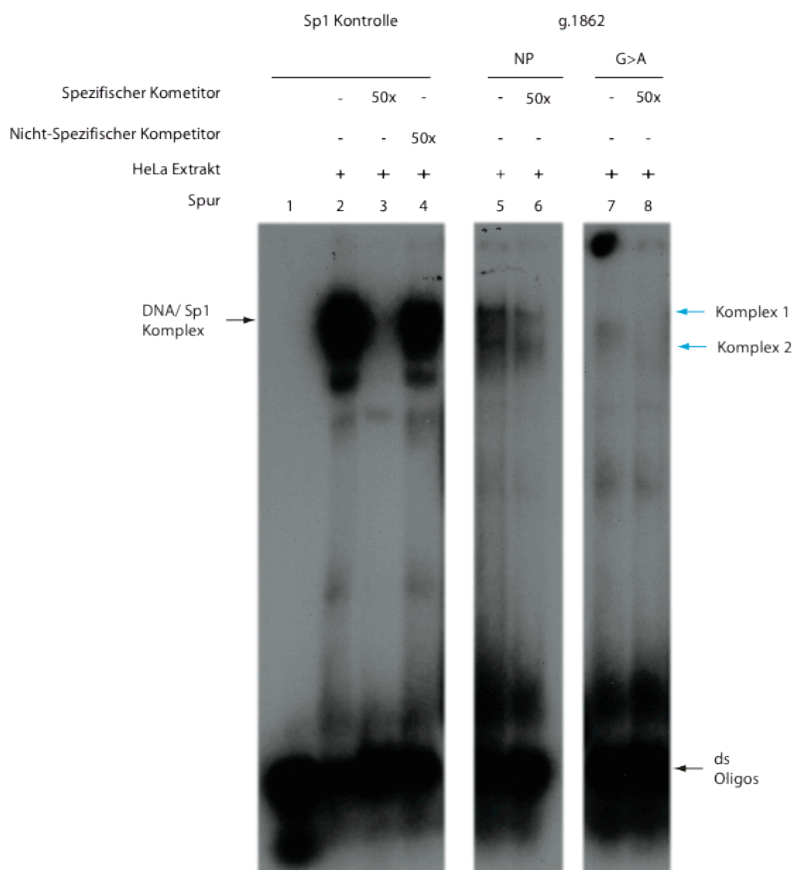
Mutationen in regulatorischen DNA-Sequenzen können die Bindeeigenschaft regulatorischer Proteine ändern. Dies kann zu einer verringerten oder gar keiner DNA-Protein-Interaktion führen oder aber zu einem Gewinn einer Interaktion. Um dies zu untersuchen wurde in dieser Arbeit die EMSA-Technologie angewendet. Mit diesem Verfahren ist es möglich, *in vitro* die DNA-Protein-Interaktion im Bereich um die Mutation zu untersuchen. Dazu wurden dsDNA-Oligonukleotide (ds Oligonukleotide) mit einer Länge von ca. 25-35 nt generiert, die die untersuchende Mutation im Zentrum hatten. Die ds Oligonukleotide wurden am 5'-Ende radioaktiv mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] markiert ( $^{32}\text{P}$ ), mit nukleärem HeLa Zellextrakt inkubiert und auf einem nicht-denaturierendem 5 % Polyacrylamid Gel aufgetragen.

#### 3.2.1 EMSA für PRED-Mutationen

Die PRED-Mutationen (3.1.2.1) wurden mittels der EMSA Technologie auf ihre Bindeeigenschaften untersucht. Durch die EMSAs sollte untersucht werden, ob es zu einer differenziellen Bindung im direkten Vergleich zwischen dem NP-Allel und dem mutierten Allel kommt.

Abbildung 3.24 zeigt exemplarisch den Aufbau eines EMSA-Experimentes. Die Spuren 1 - 4 zeigen die Kontrollreaktion mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] markierten Sp1 – ds Oligonukleotiden. In Spur 1 wurde nur das markierte Sp1 dsOligonukleotid aufgetragen. Da der Reaktionsansatz, der in dieser Spur aufgetragen wurde, mit keinem nukleärem HeLa Zellextrakt inkubiert wurde, konnte es hier zu keiner DNA-Protein-Interaktion kommen. Das ds Oligonukleotid wandert deswegen schneller in dem Gel. In Spur 2 wurde der Reaktionsansatz mit den markierten Sp1 ds Oligonukleotid und dem nukleärem HeLa-Extrakt aufgetragen. In dieser Spur konnte eine Interaktion zwischen dem ds Oligonukleotid und den nukleärem Extrakt gezeigt werden, da ein DNA-Protein-Komplex gebildet wurde, der durch seine Größe langsamer in das Gel wandert. Dieser Komplex wurde hier als DNA/Sp1-Komplex bezeichnet und mit einem schwarzen Pfeil auf der rechten Seite des Gels gekennzeichnet (Abbildung 3.24). Um die Spezifität des in Spur 2 gebildeten DNA/Sp1-Komplexes nachzuweisen, wurde in dem Reaktionsansatz in der dritten Spur ein unmarkiertes Sp1-ds Oligonukleotid als spezifischer Kompetitor mit einem Überschuss (50 x) hinzugegeben. Der spezifische Kompetitor tritt in direkte Konkurrenz mit dem markierten Sp1-ds Oligonukleotid um die Proteine. Auf Grund des hohen Überschusses ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass Proteine an das unmarkierte ds Oligonukleotid binden als an das markierte. Folglich

ist die Intensität der Banden verringert. In Spur 4 wurde ein Reaktionsansatz aufgetragen, mit einem zusätzlich nicht radioaktiv markierten AP2-(*Activating Protein 2*) ds Oligonukleotid. Dieses besitzt keine Bindestelle für das Sp1-Protein und stellt somit keine Konkurrenz für die Sp1 ds Oligonukleotide dar. Das Sp1-Protein bindet daher an das Sp1-dsOligonukleotid und zeigt das gleiche Bandenmuster wie in Spur 1.



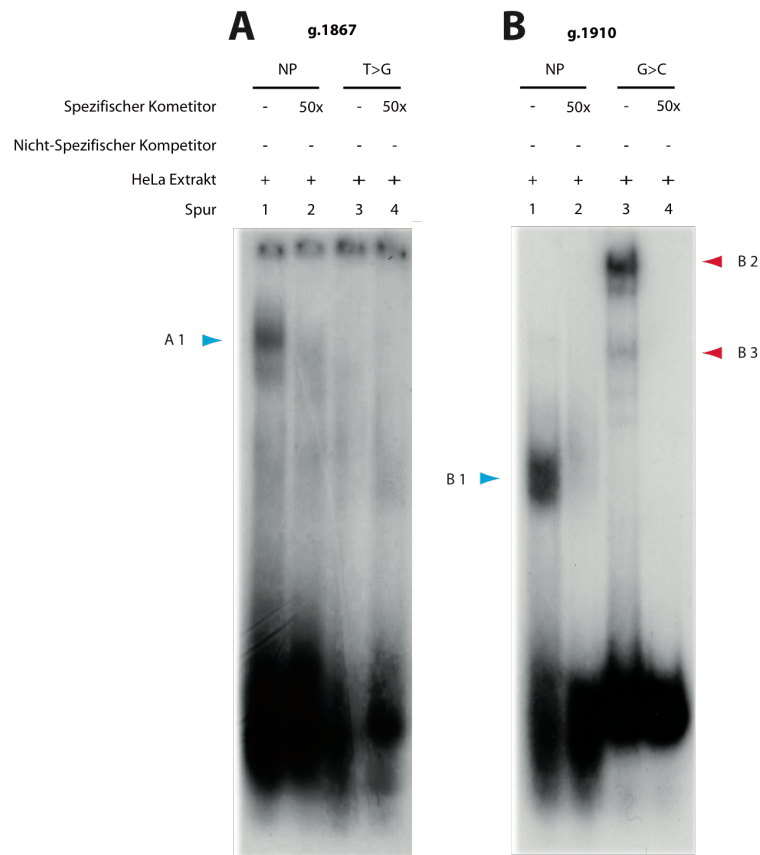
**Abbildung 3.24: Interaktionsnachweis der g.1862 Promotorvariante; Autoradiogramm des *Electrophoretic Mobility Shift Assays*, 5 % natives Polyacrylamidgel (v/v);** Spur 1:  $^{32}\text{P}$ -markierte Sp1-ds Oligonukleotide ohne nukleären HeLa-Extrakt (Negativkontrolle), Spur 2:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte Sp1-ds Oligonukleotide mit nukleären HeLa-Extrakt (Positiv-Kontrolle), Spur 3:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte SP1-ds Oligonukleotide mit unmarkierten Sp1-ds Oligonukleotide (spezifischer Kometitor) mit nukleären HeLa-Extrakt, Spur 4:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte Sp1-ds Oligonukleotide mit unmarkierten AP2-ds Oligonukleotide (unspezifischer Kometitor) mit nukleären HeLa-Extrakt, Spur 5:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte g.1862 NP-ds Oligonukleotide mit nukleären HeLa-Extrakt, Spur 6:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte g.1862 NP ds Oligonukleotide mit unmarkierten g.1862 NP ds Oligonukleotide (spezifischer Kometitor) mit nukleären HeLa-Extrakt, Spur 7:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte g.1862 G>A -ds Oligonukleotide mit nukleären HeLa-Extrakt, Spur 8:  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierte g.1862 G>A -ds Oligonukleotide mit unmarkierten g.1862 G>A -ds Oligonukleotide (spezifischer Kometitor) mit nukleären HeLa-Extrakt.

Die in dem Autoradiogramm (Abbildung 3.24) gezeigten Spuren 5 und 6 sind die Ergebnisse des Bindeverhaltens der Proben für die NP-Sequenz g.1862 mit der von Sakai *et al.* identifizierten Sp1-Bindestelle. In Spur 5 konnte eine Interaktion in Form von zwei Banden (Komplexen) mit den Proteinen aus dem nukleären HeLa Extrakt beobachtet werden (blaue Pfeile). Die Bande am unteren Ende der Spur zeigt freie ds Oligonukleotide. In der Spur 6 wurde der Reaktionsansatz mit einem Überschuss des spezifischen Kompetitors aufgetragen. Diese Spur zeigte eine deutliche Reduktion der DNA-Protein-Bindung im Vergleich zur Spur 5. Somit konnte die Bindung des NP g.1862 als spezifisch angesehen werden. In den Spuren 7 und 8 wurden die Reaktionsansätze mit der g.1862 G>A Mutation in gleicher Weise wie in den Spuren 5 und 6 aufgetragen. Diese ermöglichte somit einen direkten Vergleich zwischen der NP- und Mutationssequenz. In der Spur 7 kam es durch die Mutation zu einem totalen Verlust der DNA-Protein-Interaktion, da die beiden Banden auf der Höhe der blauen Pfeile aus Spur 5 nicht mehr detektiert wurden. Dass dieser Verlust durch eine Nichtbindung der Proteine bedingt war, konnte in Spur 8 gezeigt werden, da es in diesem Reaktionsansatz ebenfalls zu keiner Komplexbildung kam. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die NP g.1862 DNA Sequenz in der Lage ist eine DNA-Protein-Interaktion einzugehen und, dass die Mutation an Position g.1862 hingegen zu einem Verlust dieser Interaktion führt.

In Abbildung 3.25 A sind die Ergebnisse der Untersuchungen auf die DNA-Protein Bindeeigenschaften in dem ausgewählten Bereich für das ds Oligonukleotid g.1867 NP (Spur 1 und 2) sowie g.1867 T>G (Spur 3 und 4) dargestellt. Die Mutation befindet sich in der von Sakai *et al.* beschriebenen Bindestelle für den Transkriptions-Faktor ATF. Das Autoradiogramm des EMSAs zeigt in Spur 1 eine eindeutige Interaktion zwischen Proteinen und der markierten g.1867 NP Sequenz (A1, linker blauer Pfeil). In Spur 2 wurde zu dem aufgetragenen Reaktionsansatz noch zusätzlich ein unmarkierter spezifischer Kompetitor im Überschuss hinzugegeben, um zu prüfen, ob diese Interaktion spezifisch ist.

Der in Spur 1 detektierte Komplex A1 verschwand auf Grund der Konkurrenz um die Proteine des nukleären HeLa-Extraktes. Dies zeigt, dass die Bindung des A1-Komplexes spezifisch ist. Im direkten Vergleich zwischen der NP-Sequenz und der g.1867 G>T Mutation konnte man in Spur 3 erkennen, dass es durch Einbringen der Mutation G>T zu einem Verlust der DNA-Protein-Interaktion kam. Der EMSAs zeigt somit, dass die Mutation g.1867 T>G einen direkten Einfluss auf die DNA-Protein-Bindeeigenschaften hat.





**Abbildung 3.25: Interaktionsnachweis der PRED-Promotorvarianten; Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays, 5 % natives Polyacrylamidgel (v/v);** Für EMSAs A und B gelten gleiche experimentelle Bedingungen. Spur 1:  $^{32}\text{P}$ -markierte NP-dsOligos mit nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 2:  $^{32}\text{P}$ - NP dsOligos mit unmarkierten dsOligos (spezifischer Kometitor) mit nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 3:  $^{32}\text{P}$ -markierte dsOligos mit der zu untersuchten Mutation und nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 4:  $^{32}\text{P}$ -markierte mutierte -dsOligos mit unmarkierten mutierten -dsOligos (spezifischer Kometitor) und nukleärem HeLa-Extrakt. (A) g.1867 NP (Spur 1 und 2), g.1867 T>G (Spur 3 und 4); (B) g.1910 NP (Spur 1 und 2), g.1910 G>C (Spur 3 und 4). Durch Einbringen der g.1867 T>G Mutation kommt es zu einem Verlust des DNA-Protein-Komplexes. Das g.1910 G>C Allel zeigt zwei Band-Shifts, die bei dem NP Allel nicht beobachtet werden konnten.

In Spur 1 der Abbildung 3.25 B des Autoradiogrammes mit der g.1910 NP konnte in dem ausgewählten Bereich ein starker DNA-Protein-Komplex nachgewiesen werden (B1, linker blauer Pfeil). Die Spezifität des B1-Komplexes wurde durch den Verlust der Interaktion in Spur 2 bestätigt, in welcher ein Überschuss an unmarkierten g.1910 NP ds Oligonukleotid hinzugegeben wurde. Nach der Einführung der Mutation G>C konnte ein verändertes Bindeprofil erkannt werden. Zum Einen kam es zum Verlust des B1-Komplexes in Spur 1, zum Anderen konnten zwei, in Spur 1 nicht beobachtete, Komplexe detektiert werden (rote Pfeile, rechts). DNA-Protein-Komplex B2 zeigt eine sehr starke Bande und eine zusätzlich weiter in das

Gel hineingewanderte Bande. Komplex B3 zeigt eine noch weiter in das Gel gewanderte schwache Bande. B2 und B3 wandern nicht so weit in das Gel, und befinden sich im direkten Vergleich zu B1 höher (Band-Shifts). Dass die Komplexe in Spur 3 spezifisch sind, konnte durch den Verlust von DNA-Protein-Interaktion in Spur 4 gezeigt werden (spezifischer Kompetitor). Mit diesem EMSA wurde erwiesen, dass der ausgewählte Bereich um die genomische Position g.1910 in der Lage ist mit Proteinen zu interagieren sowie, dass die Mutation g.1910 G>C zu einen veränderten Bindeverhalten führt.

### 3.2.2 EMSA für NED-Mutationen

Die NED-Mutationen (3.1.3.1) wurden mittels der EMSA-Technologie auf ihre Bindeeigenschaften untersucht. In Abbildung 3.26 A wurde die DNA-Protein-Bindeeigenschaft des SNPs rs4151418 im Bereich der genomischen Position g.1718 untersucht. In Spur 1 des EMSA Autoradiogrammes konnte ein spezifischer DNA Komplex beobachtet werden (A1, linker blauer Pfeil), der durch das unmarkierte spezifische ds Oligonukleotid verdrängt wird (Spur 2). Im direkten Vergleich zwischen dem NP ds Oligonukleotid (Spur 1) und der g.1718 C>T Variante (Spur 3) kann man eine deutlich gesteigerte Affinität der Bindung der Proteine an das g.1718 C>T ds Oligonukleotid erkennen. Dass auch diese DNA-Protein Bindung in Spur 3 spezifisch ist, wird durch das Verdrängen g.1718 C>T Variante durch das spezifische unmarkierte ds Oligonukleotid in Spur 4 bestätigt.

In Abbildung 3.26 B konnten zwei DNA-Protein-Komplexe (B1 und B2, linke blaue Pfeile) mit dem ds Oligonukleotid in dem Bereich der genomischen Position g.1877 in der ersten Spur nachgewiesen werden. Der obere Komplex B1 ist spezifisch, da dieser in Spur 2 durch den spezifischen markierten Kompetitor verdrängt werden konnte. Komplex B2, der etwas weiter in das Gel wandert ist, scheint unspezifisch zu sein, da durch Zugabe des spezifischen unmarkierten Kompetitors dennoch eine Bande auf der gleichen Höhe in Spur 2 zu sehen ist. Im direkten Vergleich zwischen dem NP und dem g.1877 C>T ds Oligonukleotid können die beiden in Spur 1 beobachteten Komplexe B1 und B2 nicht detektiert werden. Somit resultiert die eingeführte Mutation zu einer differenziellen Antwort bezüglich des Bindeverhaltens. In Spur 3 konnten hingegen zwei neue DNA-Protein-Interaktionen beobachtet werden. Eine Bande (B3, rechter roter Pfeil) liegt etwas über der unspezifischen B2 Bande, B4 dagegen etwas darunter. Komplexe 3 und 4 sind spezifisch (Interaktions-Verlust durch spezifischen Kompetitor). Somit konnte gezeigt werden, dass das g.1877 NP ds Oligonukleotid in der Lage ist eine DNA-Protein-

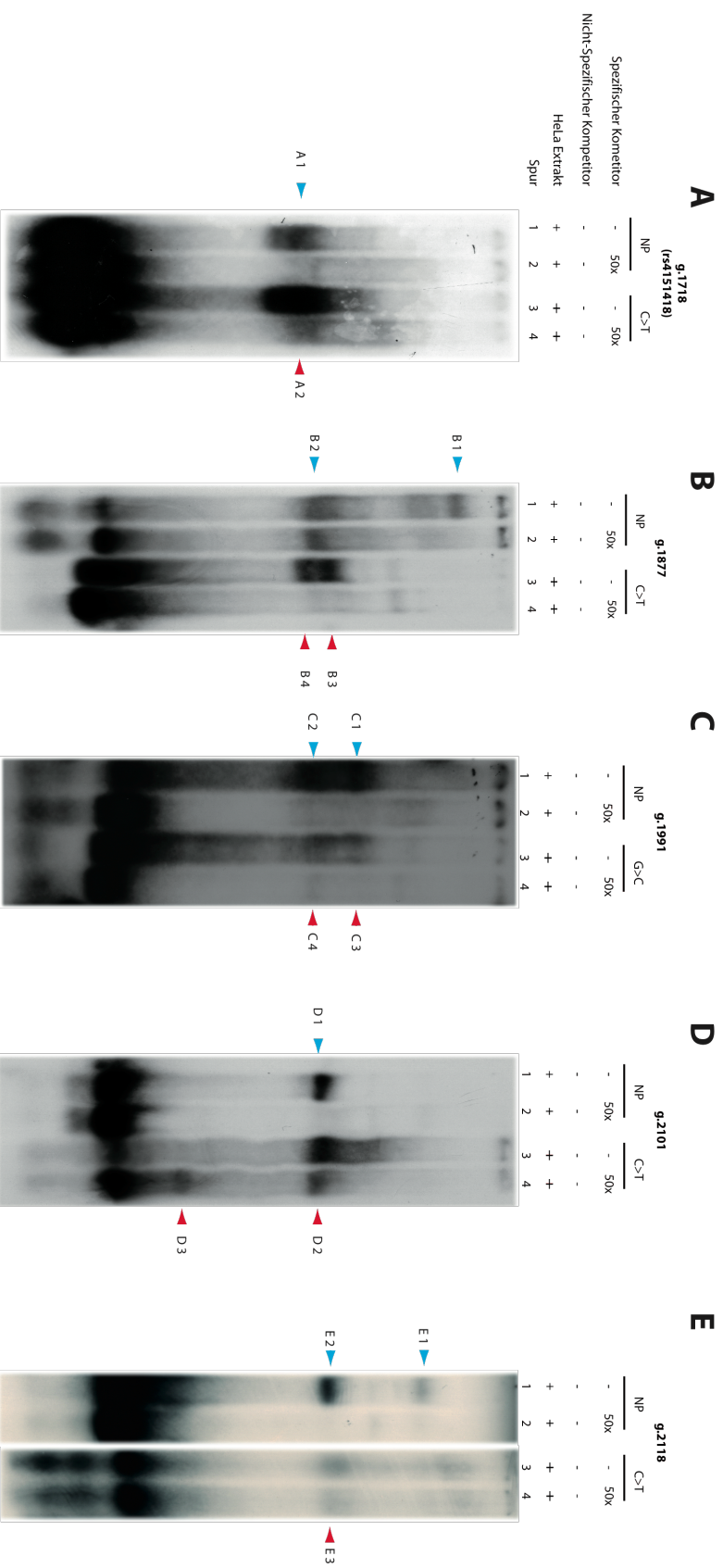
Interaktion einzugehen und, dass es durch die Mutation g.1877 C>T zu dem Verlust der ursprünglichen Interaktion kommt sowie zur Entstehung von zwei neuen DNA-Protein Interaktionen.

Das Autoradiogramm in 3.26 C zeigt die DNA-Protein-Interaktion zwischen dem ds Oligonukleotid im Bereich der genomischen Position g.1991. In Spur 1 konnten zwei starke Komplexbildungen beobachtet werden (C1 und C2, blaue Pfeile, links). Da es in Spur 2 durch die Zugabe des spezifisch unmarkierten ds Oligonukleotid zum einem Verlust dieser Interaktion kommt, wurde bestätigt, dass diese beiden Komplexe spezifisch an die Proteine des nukleären HeLa-Extraktes binden. In Spur 3 wurde der Reaktionsansatz mit dem ds Oligonukleotid, welches die Mutation g.1991 G>C im Zentrum beherbergt, aufgetragen. In dieser Spur kann man die in Spur 1 ebenfalls beobachteten Komplexe C1 und C2 erkennen. Im Vergleich wird aber deutlich, dass die Intensität der in Spur 1 beobachteten Interaktion deutlich vermindert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass es durch das Einführen der Mutation hier zu einer verringerten DNA-Protein-Interaktion gekommen ist. Durch Zugabe des spezifischen Kompetitors konnte keine Interaktion mehr detektiert werden (Spur 4).

Die Bindeeigenschaften der Mutation um die genomische Position g.2101 ist in Abbildung 3.26 D dargestellt. Eine spezifische DNA-Protein-Interaktion konnte gezeigt werden (D1, linker blauer Pfeil). In Spur 3 wurde der Reaktionsansatz mit dem mutierten ds Oligonukleotid g.2101 C>T aufgetragen. Auch hier kommt es zu einer Komplexbildung auf gleicher Höhe wie in Spur 1. Verglichen mit der Intensität des D1-Komplexes ist diese aber deutlich stärker (D2, rechter roter Pfeil). Die Spezifität des g.2101 C>T ds Oligonukleotids konnte aber in Spur 4 durch den Kompetitor bestätigt werden. Des Weiteren wurde eine zusätzliche unspezifische Bande im unteren Drittel des Gels in Spur 4 beobachtet (Komplex D3). Die Ergebnisse des EMSA zeigen, dass dieser Bereich des ersten Exons in der Lage ist eine DNA-Protein-Bindung einzugehen, die durch die Mutation an Position g.2101 C>T verstärkt wird.

Im Autoradiogramm der untersuchten Mutation im Bereich der Position g.2118 (Abbildung 3.26 E) zeigte die Spur 1 zwei DNA-Protein-Interaktionen (Komplex E1 und E2, linke blaue Pfeile). Komplex E1 befindet sich in dem oberen Drittel des Gels und zeigt eine schwache, aber dennoch klare Bande. Komplex E2 wanderte weiter in das Gel als E1. Auch ist die im EMSA beobachtete Intensität im Vergleich stärker als Komplex 1. Beide Banden sind spezifisch, da sie in Spur 2 mit dem spezifischen Kompetitor nicht mehr detektiert werden konnten. In Spur 3 wurde das mutierte ds Oligonukleotid g.2118 C>T aufgetragen. E1 konnte hier nicht mehr nachgewiesen werden, und E2 ebenfalls nur noch sehr marginal (Komplex E3, rechter roter Pfeil). Spur 4, mit dem spezifischen Kompetitor zeigt, die gleichen Ergebnisse wie in Spur 3.

Durch diesen EMSA konnte gezeigt werden, dass der ausgewählte Bereich des ersten Exons um die genomische Position g.2118 in der Lage ist eine DNA-Protein-Interaktion einzugehen, die durch Einbringen der Mutation zu einem Verlust führt.



**Abbildung 3.26: Interaktionsnachweis NED-Promotor-Varianten; Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays, 5 % natives Polyacrylamidgel (v/v); Für die EMSAs A-E gelten gleiche experimentelle Bedingungen. Spur 1: <sup>32</sup>P-markierte NP-dsOligos mit nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 2: <sup>32</sup>P-NP dsOligos mit unmarkierten dsOligos (spezifischer Kompetitor) mit nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 3: <sup>32</sup>P-markierte dsOligos mit der zu untersuchen Mutation und nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 4: <sup>32</sup>P-markierte mutierte -dsOligos mit unmarkierten mutierten -dsOligos (spezifischer Kompetitor) und nukleärem HeLa-Extrakt. (A) g.1718 NP (Spur 1 und 2), g.1718 C>T (Spur 3 und 4); (B) g.1877 NP (Spur 1 und 2), g.1877 C>T (Spur 3 und 4); (C) g.1991 NP (Spur 1 und 2), g.1991 G>T (Spur 3 und 4), (D) g.2101 NP (Spur 1 und 2), g.2101 C>T (Spur 3 und 4) und (E) g.2118 NP (Spur 1 und 2), g.2118 C>T (Spur 3 und 4), blaue Pfeile auf der rechten Seite zeigen NP dsOligo Interaktionen, rote Pfeile die DNA-Protein-Interaktion der mutierten ds Oligonukleotide.**

### 3.2.3 EMSA für VUC-Mutationen

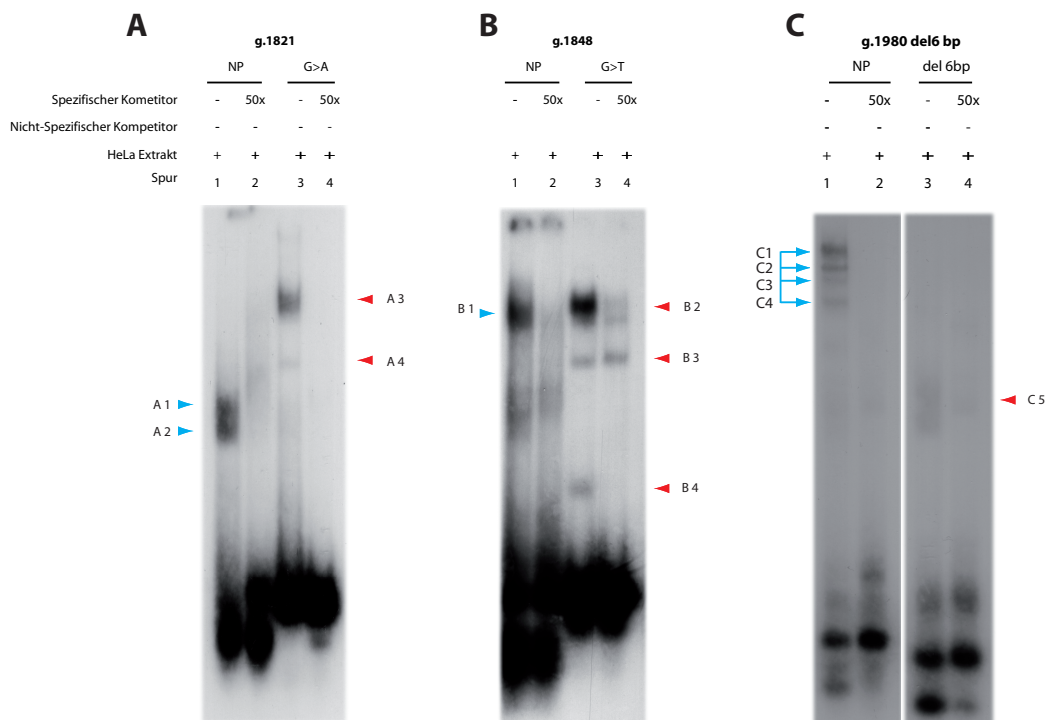
Mit dem EMSA in Abbildung 3.27 A wurde die DNA-Protein-Interaktion im Bereich der genomischen Position g.1821 untersucht. Das Autoradiogramm zeigt in Spur 1 zwei ungefähr gleichgroße Komplexe, die sich etwa in der Mitte des Gels befinden (Komplex A1 und A2, blaue Pfeile, links). A1 und A2 sind spezifisch, da es zu einem Verlust in Spur 2 kam (spezifischer Kompetitor). In Spur 3 wurde der Reaktionsansatz des ds Oligonukleotids mit der Mutation g.1821 G>A aufgetragen. Das mutierte ds Oligonukleotid zeigt ein anderes Wanderverhalten im Vergleich zu dem NP ds Oligonukleotid in Spur 1 (zwei Band-Shifts). Diese sind nicht so weit in das Gel gelaufen (Komplex A3 und A4, rechte rote Pfeile). Im Autoradiogramm ist A3 dabei deutlich intensiver als der darunterliegende Komplex A4. A3 und A4 konnten in der vierten Spur durch den spezifischen unmarkierten Kompetitor verdrängt werden, welches weiterhin die Spezifität der DNA-Protein-Interaktion in Spur 3 unterstreicht. Somit konnte gezeigt werden, dass die Region um die genomische Position g.1821 in der Lage ist, eine DNA-Protein-Interaktion einzugehen.

In Abbildung 3.27 B ist ein Autoradiogramm mit einem ds Oligonukleotid in der Region um g.1848 dargestellt. In Spur 1 kann man deutlich die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes im oberen Drittel des Gels erkennen (B1, linker blauer Pfeil). Durch das Verdrängen dieses Komplexes in der zweiten Spur durch den nicht markierten spezifischen Kompetitor, konnte die Bande in der ersten Spur als spezifisch betrachtet werden. Durch Einführung der Mutation g.1848 G>T in das ds Oligonukleotid zeigte es ein verändertes Bindevverhalten. So wanderte Komplex B1 kürzer in das Gel und wies eine deutlich stärkere Intensität auf (rechter roter Pfeil). Weiterhin konnte ein zusätzlicher Komplex mit geringerer Intensität detektiert werden (Komplex B3, rechter roter Pfeil). Eine dritte Bande (Komplex B4, rechter unterer roter Pfeil) konnte weiterhin im unteren Drittel des Gels beobachtet werden, mit vergleichbarer Intensität der des Komplexes B3. Die DNA-Protein-Komplexe B2 und B4 sind spezifisch, da es durch Zugabe des Kompetitors in Spur 4 zur Verdrängung der Banden kam. Im Gegensatz dazu ist B3 unspezifisch.

Abbildung 3.27 C zeigt den Interaktionsnachweis des ds Oligonukleotid mit der Region um die genomische Position g.1980, in der nicht proteincodierenden Region des Exons 1. In Spur 1 sind vier Komplexen im oberen Drittel des Gels zu erkennen. Die ersten beiden Banden haben die stärkste Intensität (Komplexe C1-C4, linke blaue Pfeile). Dieses Bandenmuster wurde in der zweiten Spur durch Hinzugabe des spezifischen Kompetitors verdrängt. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass die DNA-Protein-Interaktion der ersten Spur spezifisch ist. Die Deletion von 6 bp an Position g.1980 führte zu einem Verlust der Interaktion, sowie einer

schwachen neuen Interaktion (B5, Spur 3). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es durch die Deletion zu einem Verlust der Fähigkeit einen Proteinkomplex zu bilden gekommen ist.

Eine graphische Darstellung der Luziferase- und EMSA-Ergebnisse ist in Abbildung 3.28 zusammengefasst.



**Abbildung 3.27: Interaktionsnachweis VUC-Promotorvarianten ; Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays, 5 % natives Polyacrylamidgel (v/v);** Für die EMSAs A-C gelten gleiche experimentelle Bedingungen. Spur 1:  $^{32}\text{P}$ -markierte NP-dsOligos mit nukleärem HeLa - Extrakt, Spur 2:  $^{32}\text{P}$ -NP ds Oligonukleotide mit unmarkierten ds Oligonukleotide (spezifischer Kompetitor) mit nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 3:  $^{32}\text{P}$ -markierte ds Oligonukleotide mit der zu untersuchten Mutation und nukleärem HeLa-Extrakt, Spur 4:  $^{32}\text{P}$ -markierte mutierte ds Oligonukleotide mit unmarkierten mutierten ds Oligonukleotide (spezifischer Kompetitor) und nukleärem HeLa-Extrakt. (A) g.1821 NP (Spur 1 und 2), g.1821 G>A (Spur 3 und 4); (B) g.1848 NP (Spur 1 und 2), g.1848 G>T (Spur 4 und 4); (C) g.1980 NP (Spur 1 und 2), g.1980 del 6bp (Spur 3 und 4). Blaue Pfeile auf der linken Seite indizieren NP ds Oligonukleotide Interaktionen, rote Pfeile die DNA-Protein-Interaktion der mutierten ds Oligonukleotide.

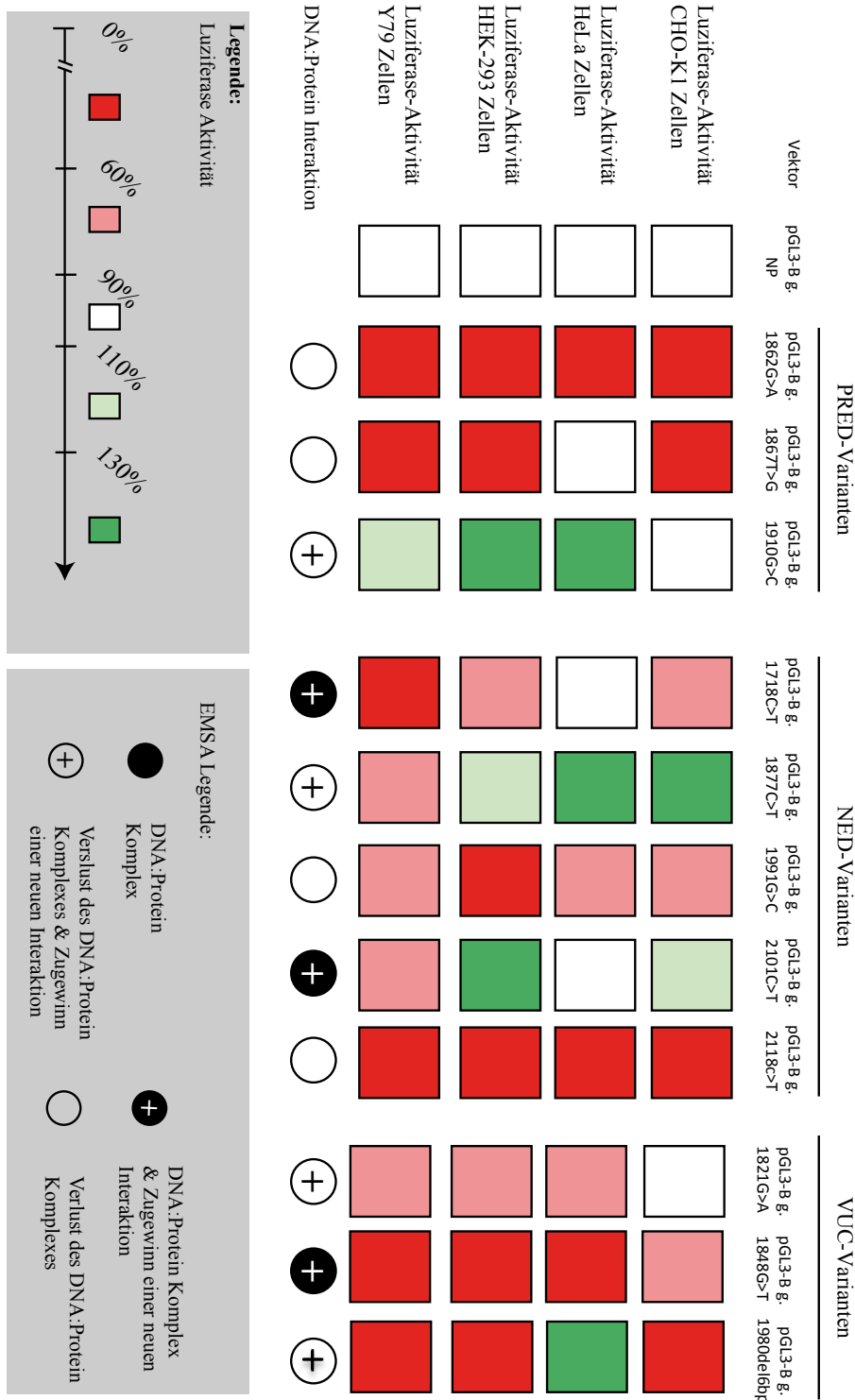


Abbildung 3.28: Graphische Aufarbeitung der *RBI*-Promotoraktivität und der EMSA-Daten. Die Ergebnisse der relativen *RBI*-Promotoraktivität der vier Zellsysteme sind in Kästchen dargestellt, die jeweiligen EMSA Ergebnisse in den darunterliegenden Kreisen.



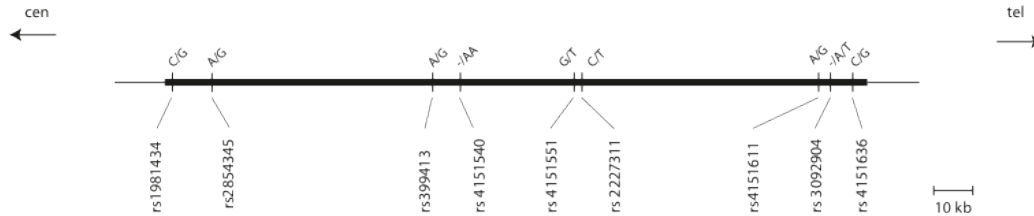
### 3.3 Analyse polymorpher Loci (SNPs) und Haplotypvarianten bei Patienten mit isoliert-unilateralem Retinoblastom (Familienbasierte Assoziationsstudie)

Nach der Knudsonschen Zwei-Schritt-Hypothese sind Patienten mit einseitigem Retinoblastom und einer Keimbahnmutation bei der Diagnose jünger als Patienten mit der nicht erblichen Form des Retinoblastoms (Knudson 1971). In zwei Publikationen von Klutz *et al.* (1999) und Lohmann *et al.* (1997) konnte diese Vermutung aber durch molekulargenetische Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz ist die Annahme, dass die Expression des *RBI*-Gens einer genetischen Modifikation *in cis* unterliegt. Daraus würde resultieren, dass Kinder mit früher Diagnose eines isoliert-unilateralem Retinoblastoms ohne konstitutionell prädisponierende Mutation als besonders suszeptible Gruppe aufzufassen sind. Aus diesem Grund wurden sie für eine Prüfung auf mögliche Assoziationen herangezogen. In dieser Arbeit wurde eine Gruppe aus 121 Familien-Trios mit einseitig betroffenen Kindern und nicht betroffenen Eltern untersucht.

#### 3.3.1 Auswahl des Markersatzes für die Genotypisierung in der *RBI*-Region

Da sich das *RBI*-Gen über mehr als 178 kb erstreckt, war es wichtig, einen Satz an Markern zu untersuchen, welcher die größtmögliche Variation in der *RBI*-Region abdeckt. In Bezug auf die Auswahl dieser Marker wurde auf einen bereits veröffentlichten Satz von elf tagSNPs für die Assoziationsanalyse von Variation am *RBI*-Locus in der Westeuropäischen Population zurückgegriffen (Song *et al.*, 2006). Acht der elf tagSNPs konnten in dieser Arbeit mit den Familien-Trios untersucht werden. Zwei der Marker (rs2854344, rs4151620) zeigten in den von Song *et al.* veröffentlichten Daten eine signifikante Assoziation bei dem Erlangen von Ovarialkarzinomen. Beide Marker konnten aber auf Grund von technischen Schwierigkeiten seitens der von ABI bestellten *Assays On Demand* nicht in unserem Kollektiv genotypisiert werden. Ein weiterer Marker rs2227311 im 5'-UTR des *P2RY5* Gens konnte gefunden werden, welcher im perfekten Kopplungsungleichgewicht ( $r_p^2 = 1$ ) mit rs4151620 liegt. Dieser Marker zeigte in einer weiteren Studie eine signifikante Assoziation für das Risiko an Brustkrebs zu erkranken (Lesueur *et al.*, 2006). Auf Grund dieser Tatsache wurde rs2227311 in den Satz der zu untersuchenden Marker mit aufgenommen. Abbildung 3.3.1 zeigt die Positionierung der Marker im *RBI*-Gen. In der Arbeit wurden acht SNPs (SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311; SNP7, rs4151611;

SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636) und eine 2 bp Insertion/ Deletion untersucht (SNP4, rs4151540).



**Abbildung 3.3.1: Verteilung der neun untersuchten Marker im *RBI*-Gen.** Das *RBI*-Gen ist als schwarzer Balken dargestellt. Die Position der Marker ist durch vertikale Linien dargestellt. Über den Linien sind die Allele, darunter die rs-Nummern der jeweiligen Marker. Im Text werden sie als SNP1 – SNP9 bezeichnet (vom Centromer zum Telomer).

### 3.3.2 Assoziationsstudie der *RBI*-Varianten

Patienten mit einseitig isoliertem Retinoblastom sowie die Eltern wurden mittels TaqMan-Assays genotypisiert. Mit einem *transmission-disequilibrium* Test (TDT) sollte festgestellt werden, ob diese Kinder bezüglich des Haplotypintergrundes des *RBI*-Gens Unterschiede aufweisen. Dies wäre als Anhaltspunkt dafür zu bewerten, dass diese Kinder eine genetisch besonders suszeptible Gruppe (*most susceptible group*) in Bezug auf das Retinoblastomrisiko darstellen.

**Tabelle. 6: Ergebnisse des Familienbasierten TDTs der 9 SNP-Marker**

Marker	dbSNP	$\chi^2$ -TDT	P-Werte (ProbTDT)	Freiheitsgrade
SNP 1	rs1981434	0,066667	0,2278	1
SNP 2	rs2854345	0,333333	0,2489	1
SNP 3	rs399413	0,142857	0,3489	1
SNP 4	rs4151540	0,296296	0,5341	1
SNP 5	rs4151551	1,315789	1,3809	1
SNP 6	rs2227311	0,209302	0,4349	1
SNP 7	rs4151611	0,076923	0,2465	1
SNP 8	rs3092904	0,169811	0,3852	1
SNP 9	rs4151636	1,923077	1,7986	1

Der TDT ist ein familienbasierter Assoziationstest (Spielman *et al.*, 1993), mit dem bestimmt werden kann, wie häufig ein bestimmtes Allel von einem heterozygoten Elternteil an ein

betroffenes Kind weitergegeben wird, d. h. es wird die Transmissionsrate eines prädisponierenden Allels untersucht. Wird ein Allel häufiger als der Zufall, d. h. in mehr als 50 % der Fälle an das betroffene Kind weitergegeben, so würde man erwarten, dass dieses Allel krankheitsverursachend ist. Ein Vorteil des TDT ist, dass er unabhängig von der Populationsstruktur ist. Die Ergebnisse des familiären TDTs sind in Tabelle 6 dargestellt. Keiner der untersuchten neun Marker (SNP1 – SNP9) zeigte ein positives Signal ( $p \leq 0,05$ ) für ein Retinoblastomrisiko.

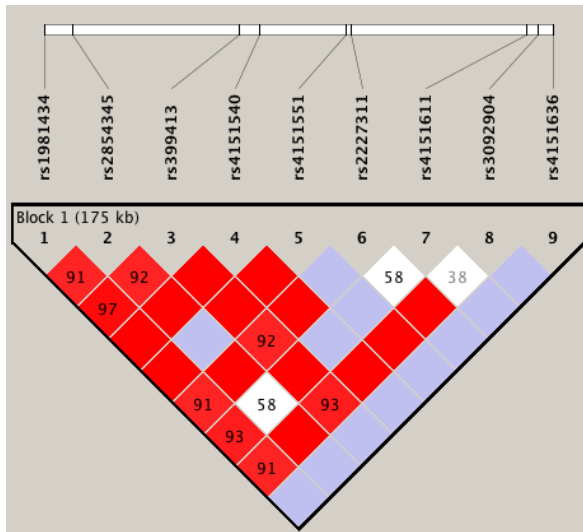
### 3.3.3 Analyse der Haplotypstruktur des *RB1*-Gens mit den neun Markern

Die erhaltenen Genotypdaten wurden neben der Assoziationsstudie (3.3.2) darüber hinaus für eine Untersuchung der Haplotypstruktur in der *RB1*s Region verwendet. Es wurden zunächst die Haplotypen aller Familien-Trios (Kinder, Vater, Mutter) ermittelt (Abbildung 3.3.2), sowie die Haplotypen der Subgruppen (Kinder, Eltern). Die Auswertung der Genotypen erfolgte mit dem Programm Haploview Version 4.2.

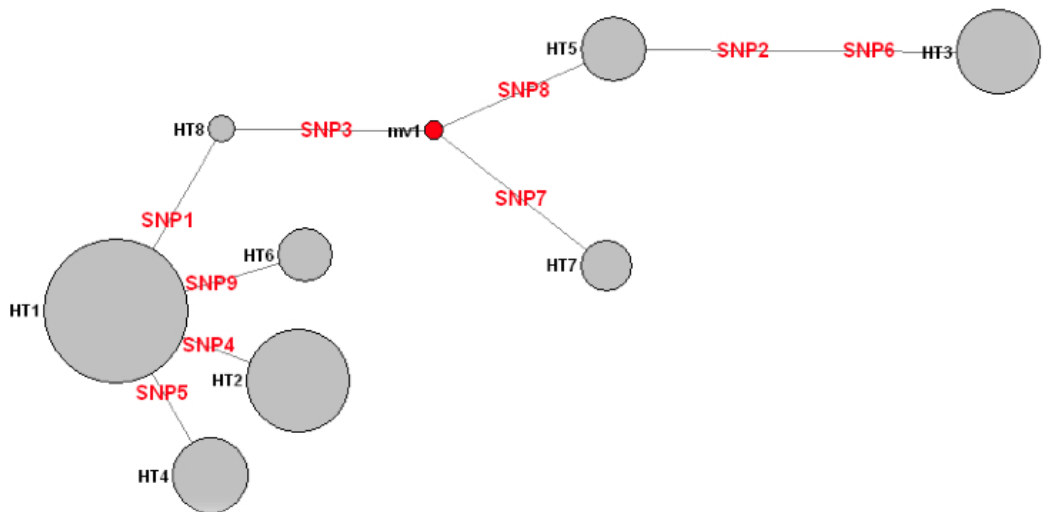
#### 3.3.3.1 Haplotypen der Trios

Für den untersuchten Bereich in der *RB1*-Region wurden acht unterschiedliche Haplotypen identifiziert (Tabelle 7). Die Ergebnisse der Haplotypfrequenzen zeigen, dass in den untersuchten Familien-Trios ein Haplotyp (Ht1) mit 46,5 % dominiert. Der zweithäufigste Haplotyp weist nur noch eine Frequenz von 16 % auf, der Dritthäufigste eine Frequenz von 10,6 %. Die restlichen Haplotypen hatten in der untersuchten Population eine Frequenz von: Ht4 9 %; Ht5 6,3 %; Ht6 4,5 % ; Ht7 4 % und Ht8 1,1 % (Tabelle 7).

Um die Beziehung der einzelnen Haplotypen untereinander zu untersuchen wurde der *Median Joining Algorithmus* der Software Network 3 benutzt (Abbildung 3.3.3). Die Entstehung der acht Haplotypen sind durch einen schrittweisen Mutationsprozess ohne Rekombination bedingt. Der häufigste Haplotyp Ht1 unterscheidet sich in einem Polymorphismus (SNP4) von dem zweithäufigsten Ht2. Die Haplotypen Ht4 und Ht6 unterscheiden sich ebenfalls nur durch einen Polymorphismus SNP9 bzw. SNP5. Die restlichen Haplotypen lassen sich auch schrittweise von Ht1 ableiten. Zwischen Ht8 und Ht5 konnte ein in den untersuchten Trios nicht beobachteter Haplotyp mv1 (*median vector*) beobachtet werden. Von diesem Haplotyp lassen sich der Haplotyp Ht7 und die weiteren Haplotypen Ht5 und Ht3 ableiten. Die graphische Darstellung des Haplotyps wurde mit der Haploview Software Version 4.2 ausgewertet (Abbildung 3.3.2).



**Abbildung 3.3.2: Haplotyp Struktur der untersuchten Trios.** Jedes Quadrat repräsentiert einen paarweisen Vergleich zwischen zwei Polymorphismen (SNP1 – SNP9). Die Werte für  $D'$  ( $\times 100$ ) sind in den Quadraten angegeben. Rote Quadrate kennzeichnen paarweise  $D'$ -Werte = 1 und ein statistisch signifikantes Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden Polymorphismen. Blaue Quadrate kennzeichnen auch paarweise  $D'$ -Werte = 1, aber ohne statistische Signifikanz. Weiße Quadrate kennzeichnen paarweise  $D'$ -Werte  $< 1$ , ohne statistische Signifikanz. SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP4, rs4151540; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311; SNP7, rs4151611; SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636.



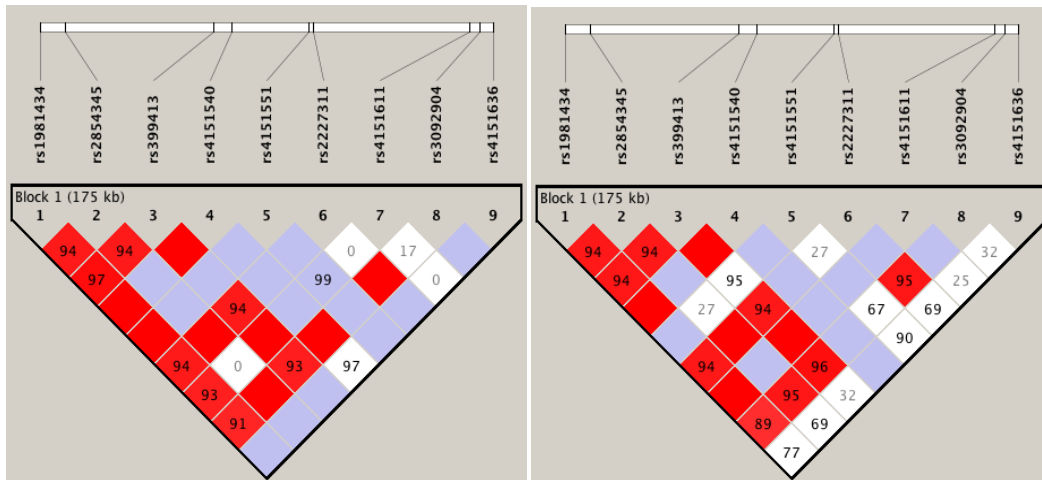
**Abbildung 3.3.3: Netzwerk Haplotypen Ht1 – Ht8 der untersuchten Trios.** Jeder Kreis repräsentiert einen Haplotyp, dabei sind die Flächen jedes Kreises proportional zur Frequenz des Haplotyps. Die Polymorphismen, in denen sich die Haplotypen unterscheiden, sind an den Verbindungslinien in rot angegeben. Ein nicht beobachteter Haplotyp mv1 (*median vector*) ist als roter Kreis dargestellt. SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP4, rs4151540; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311; SNP7, rs4151611; SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636. Ht 5 ist gleich mit dem Haplotypen eines rezenten Vorfahrens (Affe).

**Tabelle 7. Direkter Vergleich der ermittelten Haploypfrequenzen der Trios, sowie die Frequenzen (F.) der Eltern- und Kinder-Subgruppen.** In den Haplotypen (Ht) wird das allgemeine Allel mit 0, das rare Allel mit 1 dargestellt. Die Reihenfolge der untersuchten SNPs ist wie folgt: rs1981434, (1), rs2854345 (2), rs399413 (3), rs4151540 (4), rs4151551 (5), rs2227311 (6), rs4151611 (7), rs3092904 (8), rs4151636 (9).

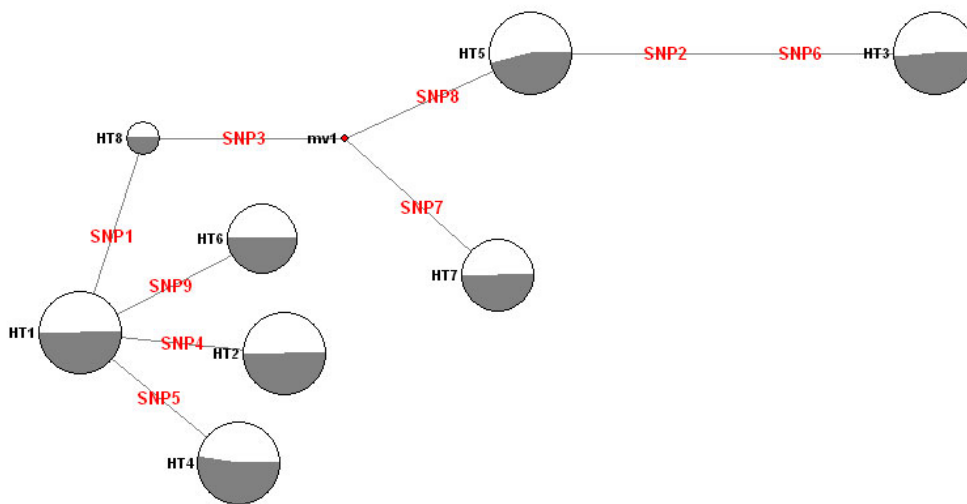
Ht	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Trios-F.	Eltern-F.	Kinder-F.
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.465)	(0.474)	(0.468)
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	(0.159)	(0.162)	(0.165)
3	1	1	1	0	0	1	0	1	0	(0.106)	(0.105)	(0.098)
4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	(0.090)	(0.084)	(0.093)
5	1	0	1	0	0	0	0	1	0	(0.063)	(0.061)	(0.052)
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	(0.045)	(0.041)	(0.041)
7	1	0	1	0	0	0	1	0	0	(0.040)	(0.043)	(0.042)
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.011)	rar	rar

### 3.3.3.2 Haplotypen der Eltern- und Kinder-Subgruppen

Die Subgruppen der Trios (Eltern und Kinder) wurden zusätzlich getrennt, da Kinder mit einseitigem Retinoblastom nach Mastunaga (1978) die am wenigsten resistente Gruppe (*most susceptible group*) darstellen. Die Analyse wurde mit der Haploview Software Version 4.2 durchgeführt. Die Ergebnisse der Haplotypanalyse zeigten keine deutlichen Unterschiede in der Frequenz der Haplotypen (Tab. 7). Die graphische Aufarbeitung der Haplotypnetzwerke der beiden Subgruppen erfolgte mit der Network Software und ist in Abbildung 3.3.5 dargestellt. Jeder Kreis repräsentiert einen der acht Haplotypen. Jeder Haplotyp konnte durch eine schrittweise Mutation ohne Rekombination abgeleitet werden. Die prozentuale Verteilung der Haplotyp-Subgruppen der Eltern ist als Sektor in weißer Farbe dargestellt, der der Kinder in grauer Farbe. Bei zwei der Haplotypen der beiden Gruppen wurde ein leicht verschobenes Verhältnis festgestellt. Ht4 wurde in der Kinder-Subgruppe mit einer Frequenz von 0,093 häufiger beobachtet, als bei der Eltern-Subgruppe mit 0,084 und Ht5 konnte bei den Eltern häufiger (0,061), als bei den Kindern (0,052) beobachtet werden (Daten statistisch nicht signifikant, Tab. 7).



**Abbildung 3.3.4: Haplotypstruktur der untersuchten Eltern (links) und Kinder (rechts).** Jedes Quadrat repräsentiert einen paarweisen Vergleich zwischen zwei Polymorphismen (P1 – P10). Die Werte für  $D'$  ( $\times 100$ ) sind in den Quadraten angegeben. Rote Quadrate kennzeichnen paarweise  $D'$ -Werte = 1 und ein statistisch signifikantes Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden Polymorphismen. Blaue Quadrate kennzeichnen auch paarweise  $D'$ -Werte = 1, aber ohne statistische Signifikanz. Weiße Quadrate kennzeichnen paarweise  $D'$ -Werte  $< 1$  ohne statistische Signifikanz. SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP4, rs4151540; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311, SNP7 rs4151611; SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636.



**Abbildung 3.3.5: Netzwerk der Haplotypen Ht1 – Ht8 der Eltern (weiß) und Kinder (grau).** Jeder Kreis repräsentiert einen Haplotyp. Die Sektoren innerhalb der Kreise sind proportional zu deren Frequenz in der untersuchten Gruppe. Die Polymorphismen in denen sich die Haplotypen unterscheiden sind an den Verbindungslinien in rot angegeben. Ein nicht beobachteter Haplotyp mv1 (*median vector*) ist als roter Kreis dargestellt. SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP4, rs4151540; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311 SNP7 rs4151611; SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636.

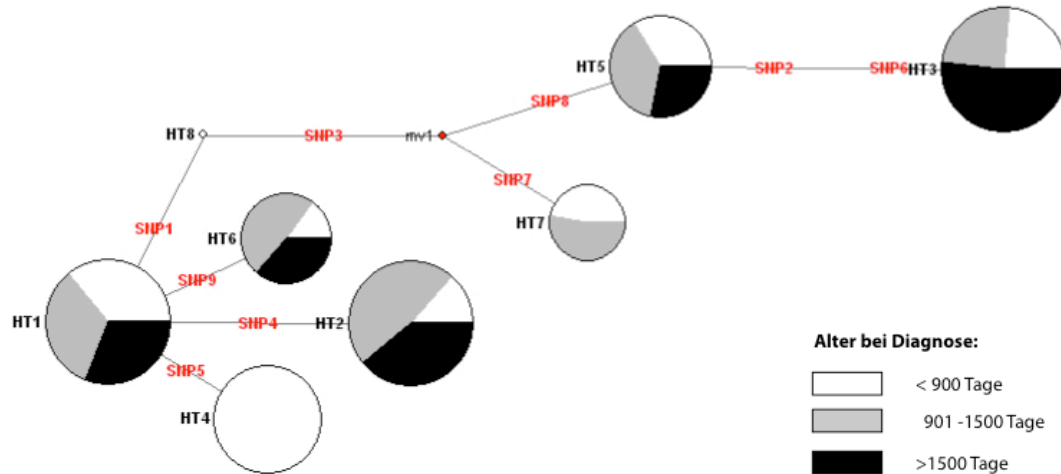
### 3.3.3.3 Alter bei Diagnose - Haplotypverteilung

Die Haplotypverteilung von Patienten in Bezug auf das Alter bei der Diagnose wurde untersucht. Die 121 Kinder aus der Assoziationsstudie wurden zunächst in 4 Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe A1 setzte sich aus 30 Patienten zusammen, bei denen ein Tumor in den ersten 500 Tagen nach der Geburt identifiziert wurde. Gruppe A2 bestand aus 36 Kindern, bei denen der Tumor zwischen dem 500. und 900 identifiziert wurde. Tag. Bei Kindern der Gruppe B (35 Kinder) wurde der Tumor zwischen dem 901. und 1500. Tage diagnostiziert. Bei der letzten Gruppe C (20 Kinder) wurde der Tumor erst nach dem 1500. Tag diagnostiziert. Gruppe A1 und A2 wiesen eine identische Anzahl an Haplotypen und deren Frequenzen auf und wurden deswegen in einer Gruppe A zusammengefasst (<900 Tage). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Alter bei Diagnose.** In den Haplotypen (Ht) wird das allgemeine Allel mit 0, das rare Allel mit 1 dargestellt. Die Reihenfolge der untersuchten SNPs ist wie folg: rs1981434, (1), rs2854345 (2), rs399413 (3), rs4151540 (4), rs4151551 (5), rs2227311 (6), rs4151611 (7), rs3092904 (8), rs4151636 (9).

Ht	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<900 Tage	901-1500 Tage	>1500 Tage.
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,529	0,486	0,451
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,063	0,222	0,181
3	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0,076	0,079	0,167
4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,157	-	-
5	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0,050	0,056	0,042
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,017	0,056	0,042
7	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0,038	0,042	-
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	rar	rar	rar

Abbildung 3.3.6 zeigt die Ableitung der Netzwerk der Haplotypen bei Alter bei Diagnose basierend auf den Daten der Tabelle 8. Weiße Sektoren innerhalb der Kreise zeigen die Frequenz der Haplotypen bei Patienten mit früher Diagnose (< 900 Tage), graue mit durchschnittlicher Diagnose (901 -1500 Tage) und schwarze solche mit später Diagnose (> 1500 Tage). Der dominierende Haplotyp Ht1 zeigt keinen Unterschied in der Frequenz der Verteilung zwischen den drei Gruppen, genauso wie bei Ht5. Ht6 und Ht7 zeigen die gleiche Verteilung der Haplotypen innerhalb der Gruppen, wobei Patienten mit durchschnittlicher Diagnose dominieren. Patienten mit später Diagnose dominieren bei Ht3. Ht7 konnte bei Patienten mit später Diagnose nicht identifiziert werden. Interessanterweise wurde Ht4 nur bei Patienten mit früher Diagnose gefunden (Daten statistisch nicht signifikant).



**Abbildung 3.3.6: Netzwerk der Haplotypen Ht1 – Ht8 bei Patienten mit unterschiedlichem Alter bei Diagnose.** Als Sektoren innerhalb der Kreise sind die identifizierten Haplotypen dargestellt. Die Fläche jedes Kreises, bzw. die jedes Sektors ist proportional zu der Frequenz des jeweiligen Haplotyps in der untersuchten Gruppe: weiß (<900 Tage), grau (901 – 1500 Tage) und schwarz (> 1500 Tage). Ein nicht beobachteter Haplotyp mv1 (*median vector*) ist als roter Kreis dargestellt. SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP4, rs4151540; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311, SNP7 rs4151611; SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636.

### 3.4 Allelspezifische Expression des *RBI*-Gens

Genetische Variation im *RBI*-Gen kann einen Einfluss auf den Phänotyp des Retinoblastoms haben, welcher durch allelspezifische Expression vermittelt werden könnte. Ein weit verbreiteter Ansatz, um allelspezifische Expression zu detektieren, ist das Verhältnis des Expressionsniveaus zweier Allele eines exprimierten Polymorphismus zu unterscheiden (Skelly *et al.*, 2009). Da der ORF des *RBI*-Gens in den uns zugänglichen Populationen frei von polymorphen Sequenzvarianten ist, konnte dieser Effekt bis jetzt aber noch nicht gezeigt werden (Lohmann, 1999). Deswegen wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt, bei der das primäre *RBI*-Transkript, die prä-mRNA (oder heteronukleare RNA, hnRNA) genutzt werden sollte. Durch eine Analyse von intronischen Polymorphismen sollte ein möglicher Unterschied von *RBI*-Allelen identifiziert werden.

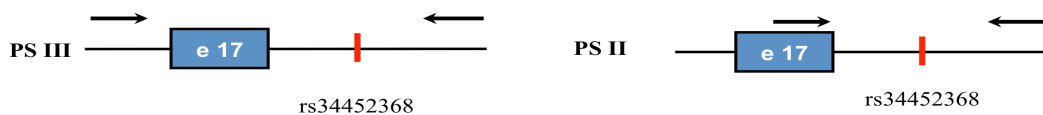


### 3.4.1 RT-PCR-Analyse an isolierter hnRNA und an PAXgene-RNA

Es wurden RT-PCR-Analysen mit hnRNA aus kultivierten Bindegewebszellen (Quelle: Operationsmaterial der Korrektur primärer Phimosen) durchgeführt. Die hnRNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde auf mögliche DNA-Kontamination überprüft, da diese bei späteren Untersuchungen der allelischen Expression die Ergebnisse beeinflussen würde. Es wurden zwei ineinandergreifende Ansätze gewählt, um DNA-Kontamination auszuschließen: eine PCR mit der cDNA (A, 3.4.2) an zwei intragenen *RBI*-Regionen und (B, 3.4.3) an zwei intergenen Regionen.

### 3.4.2 RT-PCR an intragenen *RBI*-Regionen (A)

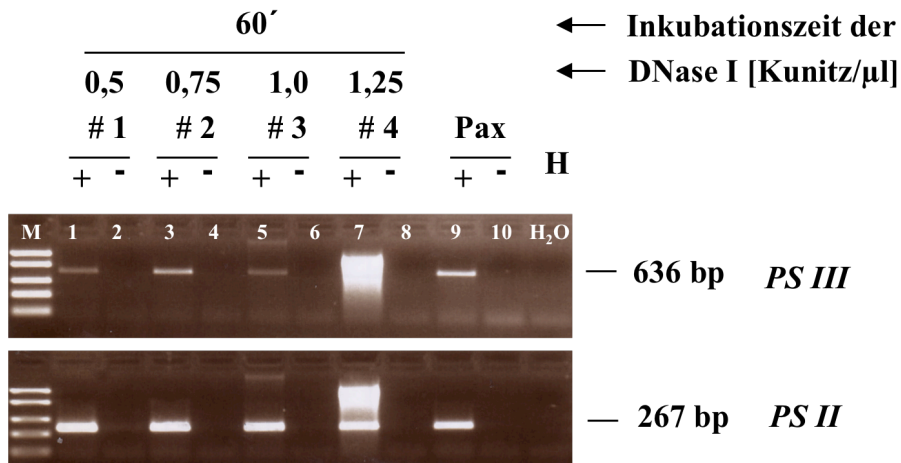
Bei der RT-PCR an den intragenen *RBI*-Regionen der hnRNA wurden zwei Primer-Systeme (PS) benutzt (Abbildung 3.4.1): PSIII (*forward*-Primer, Intron 16; *reverse*-Primer, Intron 17) amplifizierte ein 636 bp großes Fragment, PSII (*forward*-Primer, Exon 17; *reverse*-Primer, Intron 17) eines mit der Größe von 267 bp (Primersequenzen, 2.2.2.3).



**Abbildung 3.4.1 Lokalisation der intragenen Primersysteme (PS) II und III für die RT-PCR-Analyse an hnRNA.** PSIII amplifiziert ein Produkt von der Größe von 636 bp. Der *forward*-Primer liegt im Intron 16 und der *reverse*-Primer im Intron 17 des *RBI*-Gens. PSII amplifiziert ein Produkt mit der Größe von 267 bp. Der *forward*-Primer liegt im Exon 16 und der *reverse*-Primer im Intron 17. Beide PCR-Produkte beherbergen den Insertions/Deletions-Polymorphismus rs34452368.

In beiden Fällen ergab die RT-PCR ein einzelnes PCR-Produkt (PSIII, 636 bp und PSII, 267 bp). Zusätzlich wurde eine RT-PCR an PAXgene-isolierter RNA aus humanen Blut durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Isolationsmethode hinreichend ist, eine DNA-Kontamination der Probe auszuschließen. Auch hier ergaben sich die zwei spezifischen PCR-Produkte. Abbildung 3.4.2 zeigt die RT-PCR-Produkte der cDNA einer hnRNA, mit unterschiedlich behandelten DNaseI-Konzentrationen (Spuren 1, 3, 5, 7) und der PAX-RNA (Spur 9, 10). Als Kontrollreaktion, zum Ausschluss von DNA-Kontamination, wurden Reaktionsansätze ohne das Reverse Transkriptase Enzym durchgeführt (Spuren 2,4,6,8,10). In diesen Spuren gab es keine PCR-Produkte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die hnRNA-

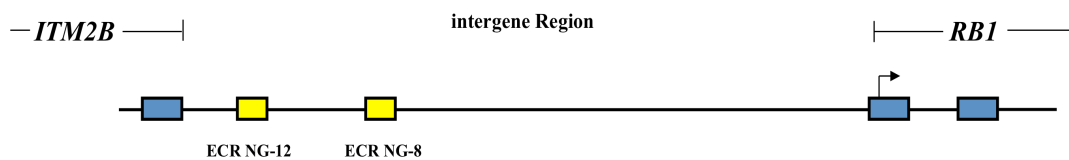
Isolation unabhängig von der eingesetzten DNaseI-Konzentration ist, sowie der Methodik der Isolierung, da ein Unterschied zwischen hnRNA und PAX-RNA konnte in diesem Versuchsaufbau nicht beobachtet werden konnte.



**Abbildung 3.4.2 RT-PCR an intergenen *RBI*-Regionen.** In Spuren 1 bis 8 sind die RT-PCR Produkte an einer hnRNA aufgetragen, mit unterschiedlich behandelten DNaseI-Konzentrationen (0,5 – 1,25 Kunitz/μl). In den Spuren 9 und 10 wurden RT-PCR Produkte einer PAX-RNA aufgetragen. Spuren mit RT-Enzym (+) zeigen ein spezifisches PCR-Produkt für das jeweilige Primersystem (PS), Spuren ohne RT-Enzym (-) zeigen keine und sind somit frei von genomischer DNA. M, Marker (Fast Ruler Middle Range); H<sub>2</sub>O, RT-PCR Ansatz ohne hnRNA.

### 3.4.3 RT-PCR an intragenen *RBI*-Regionen (B)

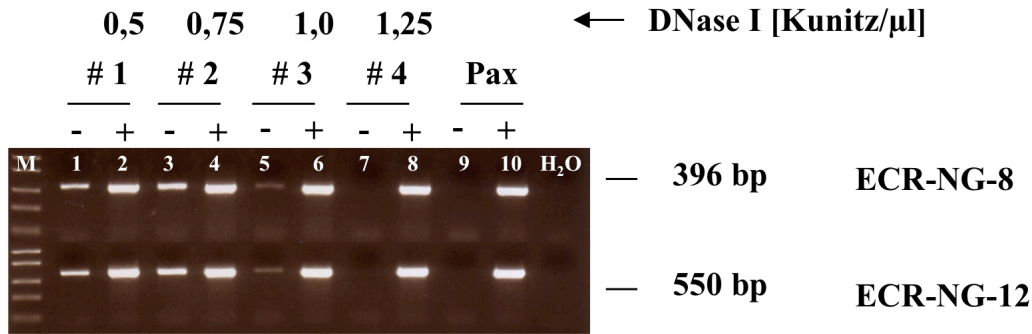
In einem weiteren Schritt wurden RT-PCR Analysen mit der hnRNA-cDNA und PAX RNA-cDNA (Abbildung 3.4.3) an zwei Bereichen 5'-stromaufwärts zum *RBI* Gen durchgeführt (ECR-NG 8 und ECR-NG 12). Es sollte zu keinem RT-PCR-Produkt kommen, da dieser Bereich nicht transkribiert wird.



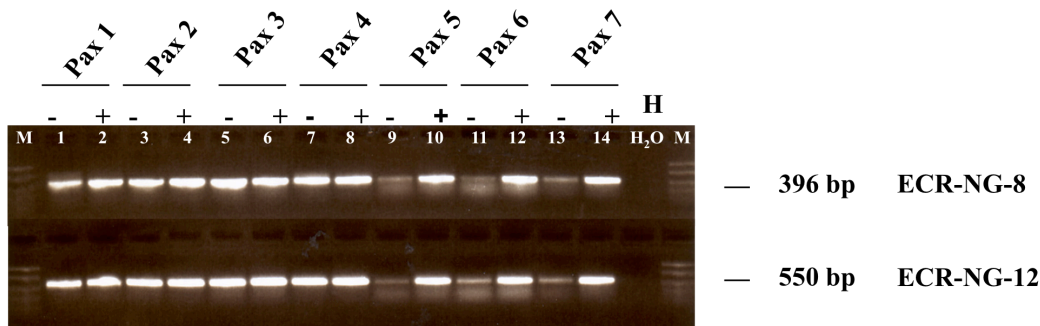
**Abbildung 3.4.3: Lokalisation zweier intergener ECRs 5'-stromaufwärts zum *RBI*-Gen.** Intergene Bereiche werden nicht transkribiert und eignen sich somit für eine Analyse von DNA-Kontamination in dieser Arbeit. Codierende Regionen (blau), ECRs (gelb). Abbildung nicht maßstabsgetreu.

In Abbildung 3.4.4 sind die Ergebnisse der Analyse der auch schon in 3.4.2 genutzten RNA-Proben dargestellt. Pro RNA-Probe wurde eine Reaktion mit Zugabe von genomischer DNA (+), die als positiv Kontrolle der PCR diente (Spuren 2, 4, 6, 8, 10) und eine reguläre RT-PCR

(-) (Spuren 1, 3, 5, 7, 9) durchgeführt. Alle RT-PCRs ergaben ein spezifisches Produkt (ECR-NG-8, 396 bp; ECR-NG-12, 550 bp) bei der positiven Kontrolle.



**Abbildung 3.4.4: RT-PCR an ECRs 5'-stromaufwärts zum *RBI*-Gen.** In Spuren 1 bis 8 sind die RT-PCR-Produkte an einer hnRNA aufgetragen, mit unterschiedlich behandelten DNaseI Konzentration (0,5 – 1,25 Kunitz/μl). In den Spuren 9 und 10 wurden RT-PCR-Produkte einer PAX-RNA aufgetragen. In den (+) Spuren wurden zu der RT-Reaktion zusätzlich 50 ng humane DNA als positiv-Kontrolle hinzugegeben. Alle Spuren der positiv-Kontrolle zeigen ein spezifisches PCR Produkt (ECR-NG-8, 396 bp; ECR-NG-12, 550 bp), (-) Spuren (RT-PCR ohne Zugabe von humaner DNA) die ein Produkt zeigen, waren mit genomischer DNA kontaminiert. hnRNA #4 und die PAX-RNA zeigten keine DNA-Kontamination. M, Marker (Fast Ruler Middle Range); H<sub>2</sub>O, RT-PCR ohne hnRNA.



**Abbildung 3.4.5 RT-PCR an ECRs 5'-stromaufwärts zum *RBI*-Gen an PAX-RNAs.** In Spuren 1 bis 14 sind die RT-PCR Produkte sieben verschiedener PAX-RNAs aufgetragen. In den (+) Spuren wurden zu der RT-Reaktion zusätzlich 50ng humane DNA als positiv-Kontrolle hinzugegeben. Alle Spuren der positiv-Kontrolle zeigen ein spezifisches PCR Produkt (ECR-NG-8, 396 bp; ECR-NG-12, 550 bp), (-) Spuren (RT-PCR ohne Zugabe von humaner DNA) die ein Produkt zeigen, waren mit genomischer DNA Kontaminiert. Keine der RAX-RNAs war frei von DNA-Kontamination. M, Marker (Fast Ruler Middle Range); H<sub>2</sub>O, RT-PCR ohne hnRNA.

Die Ergebnisse zeigen, dass einzig die hnRNA-Probe #4 (Spur 7), die mit 1,25 Kunitz/μl behandelt worden ist, kein PCR-Produkt zeigt, und somit keine DNA-Kontamination aufweist. Durch diesen Befund konnte eindeutig gezeigt werden, dass die hnRNA-Isolation erfolgreich war. Interessanterweise zeigte die PAX-RNA ebenfalls keine DNA-Kontamination (Spur 9). Da die Isolation von PAX-RNA aus Blut im Gegensatz zu der

hnRNA Isolation aus kultivierten Phimosmaterial kosten- und zeiteffektiver ist, wurden weitere PAX-RNA Proben auf DNA Kontamination untersucht. Die Abbildung 3.4.5 zeigte aber, dass dieses für weitere PAX-RNA Proben nicht bestätigt werden konnte, da alle untersuchten Proben eine DNA-Kontamination zeigten. Aus diesem Grund wurde diese Art der Isolation nicht weiter verfolgt.

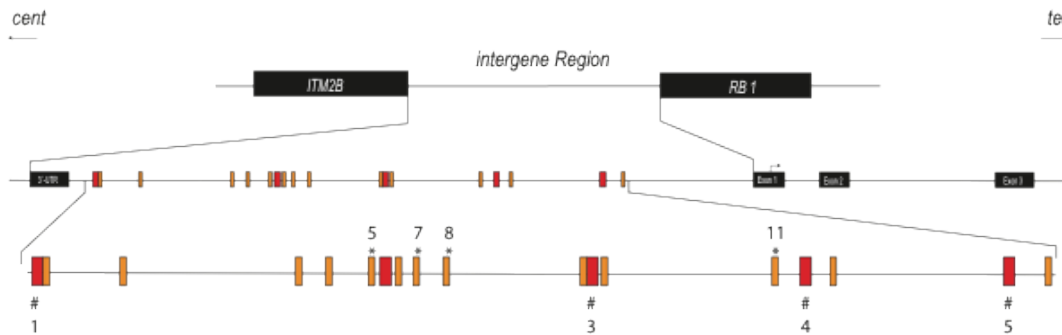
#### 3.4.4 Quantitative Analyse des allelischen hnRNA-Transkriptverhältnisses

Für eine quantitative Analyse des Quotienten der Transkriptmengen der Allele wurden „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen) durchgeführt.

Die Analysen an hnRNA ergaben bei den SNaPshot-Analysen keine verlässlichen Ergebnisse. Die erhaltenen Allelsignale waren zu gering (Daten nicht gezeigt) und auch nach Änderung der Bedingungen (verschiedene eingesetzte Volumina an cDNA) konnten keine validen Resultate erzielt werden. Da ein möglicher Erfolg der Analyse der allelspezifischen Analysen auf hnRNA-Ebene des *RBI*-Transkriptes durch Optimierung der Analysebedingungen nicht absehbar war, wurden diese Analysen zurück gestellt.

#### 3.5 Identifizierung evolutionär konservierter Regionen (*evolutionary conserved regions*, ECRs) in der 5'-stromaufwärts Region des *RBI*-Gens

Zur Identifizierung von ECRs in der 5'-stromaufwärts Region des *RBI*-Gens wurde im ECR-Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org>) ein Vergleich des menschlichen Genoms (hg18) mit dem der Maus (mm9) durchgeführt. Der zu untersuchte Bereich erstreckte sich über mehr als 41 kb bis zum 3'-UTR des *ITM2B* (Integral Membrane 2B) Gens. Auf Vergleiche mit anderen verfügbaren Genomen entfernt verwandter Spezies musste verzichtet werden, da diese keine hohe evolutionäre Konservierung in diesem Bereich aufweisen. Für die Identifikation von TFBS sind Sequenzvergleiche dieser beiden Genome hinreichend (Dermitzakis *et al.*, 2005). Die Suche nach möglichen TRFBs mittels Sequenzidentitäts-Vergleiche wird „*phylogenetic footprinting*“ genannt. Hingegen wird bei der Suche nach neuen Genstrukturen, z.B. Exone ein Vergleich mit dem Genom des Haushuhns (*Gallus gallus*) genutzt (Dermitzakis *et al.*, 2005). Nach gebräuchlicher Definition müssen ECRs mindestens eine Sequenzübereinstimmung von 70 % und eine Länge von 100 bp aufweisen. Diese Kriterien wurden bei der hier untersuchten intergenen Region angewandt. In der ungefähr 41 kb großen Region konnten insgesamt 18 ECRs identifiziert werden (Abb. 3.5.1).



**Abbildung 3.5.1. Identifizierung 18 ECR 5'-stromaufwärts zum *RBI*-Gens.** Detailansicht der intergenen Region zwischen dem *ITM2B* und dem *RBI* Gen. Die Region erstreckt sich über mehr als 41kb (Chr13: 47,734,228 – 47,775,884). Die als rote Kästchen dargestellten ECRs beherbergen SNPs. Die zusätzliche Raute (#) kennzeichnet ECRs mit SNPs, die für eine spätere Assoziationsstudie (3.5.2) untersucht worden sind. Die in orange dargestellten ECRs, besitzen nach Datenbank Recherche keine genetische Variation (*with non genetic variation*, ECR\_NG). In ECRs mit einem (\*) versehen, konnten in dem untersuchten Patientenkollektiv bei einzelnen Patienten Mutationen gefunden werden. Die Nummern über einem Kästchen gehören zu den ECR\_NGs, die Nummern unter den Kästchen zu den ECRs mit SNPs. Die Abbildung ist maßstabsgetreu (vom Centromer zum Telomer).

### 3.5.1 Mutationsanalyse der ECR\_NGs stromaufwärts des *RBI*-Gens

Von den 18 identifizierten ECRs im 5'-stromaufwärts-Bereich konnte nach intensiver Datenbank-Suche in 13 der ECRs keine genetische Variation festgestellt werden (Stand Anfang der Promotion). Diese ECRs werden im Folgenden als ECR\_NG (ECR *with no genetic variation*) bezeichnet. Eine in der Extremgruppe von 32 Patienten (siehe 2.19.3) durchgeführte Mutationsanalyse dieser 13 ECR\_NGs wurde mit den Proben durchgeführt, die mit Hilfe des „GenomiPhiTM DNA Amplification Kits“ amplifiziert worden sind. Durch die Sequenzierung aller 13 ECR\_NGs konnten insgesamt 4 Variationen (heterozygot) in dem Patientenkollektiv identifiziert werden (Tab. 10).

**Tabelle 9. Identifizierte ECRs ohne Polymorphismen (*no genetic variation*, ECR\_NG) 5'-stromaufwärts zum *RBI*-Gen.**

ECR_NG	Position relativ zu L11910	ECR Länge bei 70%-iger Sequenz-Identität	ECR_NG	Position relativ zu L11910	ECR Länge bei 70%-iger Sequenz-Identität
1	-g.39323	126 bp	8	-g.15900	187 bp
2	-g.32010	114 bp	9	-g.14964	169 bp
3	-g.30295	181 bp	10	-g.14311	96 bp
4	-g.23444	165 bp	11	-g.7592	106 bp
5	-g.18480	145 bp	12	-g.4978	397 bp
6	-g.17455	120 bp	13	-g.4572	122 bp
7	-g.17145	153 bp			

In ECR\_NG 5 konnte bei dem Patienten M5617 eine 7 bp Deletion (-g.18393 del 7 bp), in ECR 7 bei Patient M11968 eine Punktmutation (-g.17233 A>G), in ECR\_NG 8 bei vier Patienten M10466, M17664, M21344 und M4119 ein GT Stretch (beginnend von Position-g.15725) und bei Patient M10466 eine Punktmutation (-g.7578 T>C) identifiziert werden. Die Mutation -g.7578 T>C (rs55918923) enthält in der NCBI SNP Datenbank keine Information der Populationsfrequenz.

**Tabelle 10.: Ergebnisse der Mutationsanalyse der ECR\_NGs 5'-stromaufwärts des *RBI*-Gens.** Die Sequenzvariante -g.7578 C>T wird in der aktuellen Datenbank (dbSNP Built 131) als rs55918923 geführt.

ECR	Variation	Genotyp	dSNP
ECR_NG 5	-g.18393 del 7 bp	Heterozygot	
ECR_NG 7	-g.17233 A>G	Heterozygot	
ECR_NG 8	-g.15725 GT Stretch	Heterozygot	
ECR_NG 11	-g.7578 C>T	Heterozygot	rs55918923

### 3.5.2 Analyse der ECR mit SNPs stromaufwärts des *RBI*-Gens

In fünf der 18 ECRs wurden nach Datenbankanalyse Polymorphismen gefunden (Tab. 11). In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob Patienten mit Retinoblastom einen Unterschied in der Allelfrequenz zeigen (im Vergleich zu nicht transmittierten Allelel, TDT). Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv setzte sich aus 121 Trios zusammen.

Insgesamt wurden mit der Pyrosequencing-Technologie 6 SNPs (SNP-id\_143 - SNP-id\_148, Tabelle 11) genotypisiert. Die statistische Auswertung der Daten zeigt jedoch, dass für keinen der genotypisierten SNPs die erhaltenen Genotypfrequenzen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) erfüllten (Daten nicht gezeigt). Trotz intensiver Suche nach den möglichen Ursachen, insbesondere Genotypisierungsfehler, konnte der Grund für die Abweichung, die alle Marker in den Genotypisierungsdaten der Eltern betraf, nicht gefunden werden.

**Tabelle 11: In der dbSNP aufgeführte genetische Variaten in den ECRs in 5'- zum *RBI*-Gen**

ECR	Position relativ zu L11910	SNPs	ECR Länge bei 70 %-iger Sequenz-Identität
ECR_01	-g.37471	- rs 953500 (SNP_id 143) - rs 9535001 (SNP_id 144)	163 bp
ECR_02	-g.31118	- rs17071548 (SNP_id 145)	122 bp
ECR_03	-g.23983	- rs 7986777 (SNP_id 146)	150 bp
ECR_04	-g.18145	- rs 9562814 (SNP_id 147)	117 bp
ECR_05	-g.5321	- rs 33924343 (SNP_id 148)	151 bp

#### 4. Diskussion

Die Funktion von Genen kann durch genetische Variation verändert werden. Je nach Art und Lokalisation der Variation sowie der Genosis der Allele (homozygot bzw. heterozygot) kann diese Funktionsänderung den Phänotyp mehr oder weniger beeinflussen. Bei autosomal dominant erblichen Erkrankungen ist eine genetische Variation in einem Allel als Bedingung für die Entwicklung des Merkmals hinreichend (krankheitsursächliche Mutation). Das andere Extrem sind neutrale genetische Polymorphismen, deren Träger keine erkennbare Phänotyp-Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp zeigen. Zwischen diesen Extremen stehen genetische Varianten, die den Phänotyp des Mutationsträgers im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, genetischen und nicht-genetischen, beeinflussen. Zu dieser Kategorie gehören auch die genetischen Variationen in *cis* zum *RBI*-Locus, die, im Zusammenspiel mit krankheitsursächlichen Mutationen im *RBI*-Gen den Krankheitsverlauf beeinflussen. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist es, diese genetische Variation, deren Existenz aus genetischen Analysen abgeleitet worden war, zu identifizieren und ihren Einfluss auf die Funktion des *RBI*-Gens zu charakterisieren.

##### 4.1 *RBI*-Promotoranalysen

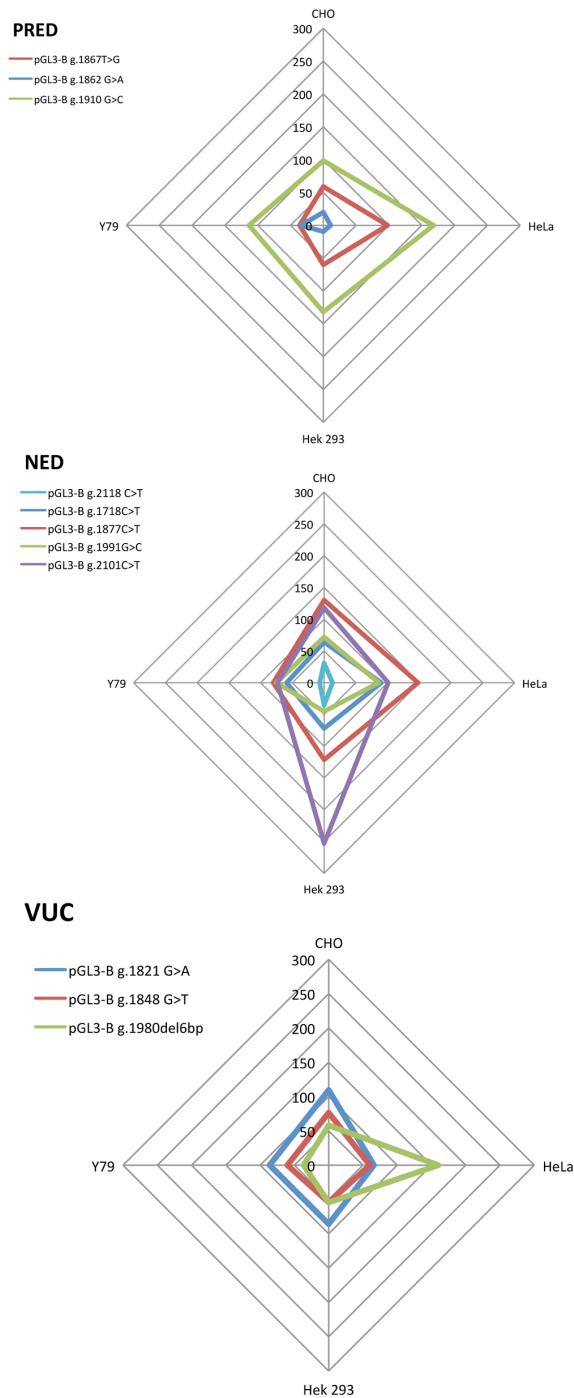
In diesem Teil der Arbeit wurde die Promotoraktivität sowie die DNA-Protein-Interaktion von genetischen Variationen im *RBI*-Promotor analysiert. Insgesamt wurden elf Promotormutationen untersucht, die nach genetischen Kriterien in drei Klassen eingeteilt werden können: PRED, NED und VUC (Erläuterung siehe 2.19). Abbildung 4 zeigt die Zusammenschau der *in vitro* Genexpression in den vier verwendeten Zelllinien und verdeutlicht die Unterschiede der Antworten, die nicht nur zwischen den Mutationsklassen sondern auch zwischen den Zelllinien beobachtet werden kann.

##### *Validierung der Methodik*

Die Mutation g.1862 G>A, die aufgrund von Kosegregation mit Retinoblastom in nicht verwandten Familien als krankheitsursächliche Mutation einzuordnen ist (PRED) und die eine starke Reduktion in der Promotoraktivität sowie einen Verlust der DNA-Protein-Interaktion zeigte (Sakai *et al.* 1991) wurde als Kontrolle zur Validierung der Assays verwendet. Die Daten der Genexpression zeigten in allen Zelllinien eine drastische Reduktion der Promotoraktivität und in den EMSA wurde ein totaler Verlust der DNA-Protein-Interaktion festgestellt. Die Bestätigung der Ergebnisse von Sakai *et al.* zeigt, dass die in dieser Arbeit



etablierten Promotoranalysen zumindest für diese Mutation valide sind. Die Mutation ist in einer Sp1/GC Erkennungs-Sequenz lokalisiert. Da Sp1 Bindestellen bei der Transkriptions-Initiierung von Genen involviert sind, denen, wie dem *RBI*-Gen, ein TATA-Box-Motiv fehlt (Kageyama *et al.*, 1989), kann die reduzierte Promotoraktivität durch diese Mutation hinreichend erklärt werden.



**Abb. 4 Multidimensionale graphische Aufarbeitung der *RBI*- Promotormutationen.**

Ergebnisse der Genexpressions-Assays der PRED (oben), NED (mitte) und VUC (unten) Mutationen des *RBI*-Promotors im direkten Vergleich der vier Zelllinien. Jede einzelne der vier Achsen stellt eine Zelllinie dar. Im Uhrzeigersinn: CHO-K1, HeLa, HEK-293 und Y79-Zelllinie. Eine einzelne Raute repräsentiert ein untersuchtes Reporterkonstrukt mit einer *RBI*-Promotormutation in den vier Zelllinien.

*Die Beeinflussung der Genexpression durch eine Promotormutation ist von der Herkunft der Zelllinie abhängig*

Die Heterogenität der Antworten in verschiedenen Zelllinien, bedingt durch das Vorhandensein unterschiedlicher und zellspezifischer Transkriptions-Faktoren, wird am deutlichsten bei den Ergebnissen der Analysen der als PRED klassifizierten Mutation g.1867 T>G. Eine Verminderung war in drei Zelllinien (CHO-K1, HEK-293 und Y79) festzustellen. Die deutlichste Antwort wurde in der Retinoblastom-Zelllinie-Y79 beobachtet, von der angenommen werden kann, dass sie unter den verwendeten Zelllinien der potentiellen Ausgangszelle des Retinoblastoms am nächsten kommt. In HeLa Zellen dagegen war keine wesentliche Änderung der Promotoraktivität zu erkennen, obwohl der EMSA klar einen Verlust der DNA-Protein-Interaktion zeigte. Größere Abweichungen in der Promotoraktivität bei Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Zelllinie sind auch bei anderen Mutationen augenfällig, so z.B. bei g.2101C>T (Abweichung in HEK-293) und g.1980del6bp (Abweichung in HeLa). Insgesamt erscheint die Varianz der Genexpressions-Ergebnisse innerhalb einer Mutationsklasse bei der Zelllinie Y79 am geringsten zu sein. Dieses Ergebnismuster spricht dafür, in Bezug auf die Untersuchung von Faktoren, die die Entstehung des Retinoblastoms modifizierenden, weitere Retinoblastom-Zelllinien zu untersuchen. Des Weiteren sollten zur Analyse modifizierender Faktoren für Zweitumorentstehung Zelllinien etabliert werden, die den potentiellen Ausgangszellen vergleichbar nah sind. Da Patienten mit familiären oder bilateralem Retinoblastom ein erhöhtes Risiko zu Neoplasien außerhalb des Auges zeigen, wie Osteosarkome oder Weichteil Sarkome (Eng *et al.*, 1993), wäre eine Zelllinie wie die Saos-2, eine humane Osteosarkom-Zelllinie, geeignet.

Die Mutation g.1867 T>G liegt in einer ATF Erkennungssequenz im *RBI*-Promotor (Sakai *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1994). Parker *et al.* zeigten, dass es bei einer Überexpression des *RBI*-Gens zu einer Promotoraktivierung durch die ATF Bindestelle kommt, und dass Mutationen innerhalb dieser TFBS zu einer Aufhebung dieser Autoinduktion führen. Der Verlust der Interaktion könnte eine mögliche Erklärung der verminderten Promotoraktivität sein (hervorgerufen durch Verlust der Autoinduktion). Die *RBI*-Autoinduktion spielt möglicherweise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Expression von pRB und eine Störung dieses Regelkreises könnte so das Entstehen eines Retinoblastoms auslösen.

*In vitro* Promotoraktivitäts-Analysen wurden eingesetzt, um Anhaltspunkte für die Krankheitsursächlichkeit von Mutationen zu gewinnen. Die Mutation g.1980del6bp wurde in DNA aus Tumor und Blut eines Kindes mit isoliert einseitigem Retinoblastom sowie bei nicht

erkrankten Angehörigen gefunden. Aufgrund dieser Daten kann eine Krankheitsursächlichkeit nicht festgestellt oder ausgeschlossen werden (VUC). Das Muster der Promotoraktivitäten in den verschiedenen Zelllinien gleicht jedoch dem der PRED Mutation g.1867 T>G Mutation: die Mutation führt zu einer Reduzierung der Promotoraktivität in drei der Zelllinien (CHO-K1, HEK-293 und Y79), wobei die deutlichste Antwort ebenfalls in der Retinoblastom Zelllinie Y79 beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu der g.1867 T>G Mutation konnte in dem HeLa-Zellsystem aber eine Steigerung der Promotoraktivität um das mehr als 1,5 fache beobachtet werden. In der EMSA zeigte die g.1980del6bp einen kompletten Verlust der DNA-Protein-Interaktion des Normalfragments und ein schwaches Signal einer Interaktion mit geringerer molarer Masse. Insgesamt unterstützen die Daten die Einschätzung, dass es sich bei der g.1980del6bp um eine krankheitsursächliche Mutation handelt.

Die Reduktion der Genexpression in den drei Zelllinien hervorgerufen durch die 6 bp Deletion, die sich in dem *p53 response element* im *RBI*-Promotor befindetet, ist vereinbar mit den Daten von Osifchin *et al.* (1994). Diese wiesen nach, dass p53 in geringen Dosen die Transkription des *RBI*-Gens durch Binden an den Promotor stimuliert. Dieses führt zu der Hypothese, dass es durch die Deletion zu keiner Interaktion des p53 Proteins und dem *RBI*-Promotor mehr kommen kann und somit in einer Verminderung der Promotor-Aktivität resultiert. In Bezug auf HeLa Zellen konnte für das p53 Protein eine Besonderheit aufgewiesen werden, da p53 durch *E6*, einem Onkoprotein codiert von dem humanen Papillomavirus, in diesen Zellen degradiert wird (Scheffner *et al.*, 1990). Diese Besonderheit kann ein Grund dafür liefern, dass die *RBI*-Promotoraktivität nicht reduziert ist, sondern sogar verstärkt. Mit diesem Wissen, dass p53 in HeLa-Zellen nicht (oder nur in sehr geringen Dosen) vorhanden ist, kann der beobachtete DNA-Protein-Komplex in dem EMSA nicht alleine durch das Binden von p53 erklärt werden, sondern es müssen noch weitere Proteine neben p53 an diese Region binden.

Eine weitere VUC-Promotormutation wurde im proteincodierenden Bereich des Exons 1 gefunden. Die stille Punktmutation befindet sich an der genomischen Position g.2101 C>T, die auf der Aminosäuren-Ebene keine Auswirkung hat (p.Ala14Ala). Die Genexpressions-Daten dieser Promotor-Variante zeigten keine eindeutigen Ergebnisse und waren abhängig von dem Zellsystem, in welchem sie untersucht wurden. In CHO-K1 und HEK-293 Zellen war die Expression erhöht, in Y79-Zellen reduziert und in HeLa Zellen neutral. Die EMSA Ergebnisse zeigten eine deutliche erhöhte DNA-Protein-Interaktion des mutierten ds Oligonukleotids und zusätzlich eine neue Interaktion mit geringerer molare Masse, obwohl

die Genexpressions-Daten des HeLa Zellsystem eine eindeutige neutrale Antwort gab. Diese heterogenen Resultate lassen darauf schließen, dass die Variation einen zellspezifischen Einfluss auf die Promotoraktivität ausübt. Die Evidenz einer Pathogenität dieser Mutation bleibt flüchtig, da diese Mutation in Blut und nicht in DNA aus Tumor (mit LOH) gefunden wurde.

Die Expressionsdaten der NED-Mutation an Position g.1991 G>C, die im p53 *control element* des *RB1*-Promotors liegt, zeigte in zwei Zelllinien (CHO-K1, Y79) eine moderate Reduktion der Promotoraktivität und in HEK-293 Zellen eine starke Antwort. Osifchin *et al.* (1994) zeigten, dass es durch Binden von p53 an das *control element* zu einer Promotoraktivierung kommt. Durch die Mutation kann somit die Reduktion der Promotoraktivität hinreichend erklärt werden, die durch die bei dem EMSA beobachtete verminderte DNA-Protein-Affinität unterstützt wird.

*Mutationen ohne direkt ersichtlichen Einfluss auf den RB1-Phänotyp zeigten funktionelle in vitro Antworten*

Mutationen, von denen anfänglich angenommen wurde, dass sie keine onkogene Ursache bezüglich des Retinoblastomrisikos darstellen (auf Grund weiterer krankheitsursächlichen Mutationen im *RB1*-Gen), dennoch eine eindeutig onkogene Antwort in den *in vitro* Analysen zeigten, konnte exemplarisch an einer Missens-Mutation im Exon 1 nachgewiesen werden.

Die Mutation g.2118 C>T (VUC) im proteincodierenden Bereich resultiert auf Aminosäure-Ebene in einem Austausch im pRb von Prolin nach Leucin an der zwanzigsten Stelle (p.Pro20Leu). Die Promotoranalysen zeigten, neben der g.1862G>A Mutation, die deutlichste Antwort der Promotoraktivität in allen Zelllinien. Insbesondere in Y79-Zellen konnte nahezu eine Inaktivierung des Promotors festgestellt werden, sowie ein totaler Verlust der DNA-Protein-Interaktion. Neben der Promotormutation konnte bei einem Patienten im Tumor auch ein hypermethylierter Promotor identifiziert werden, der aber in Betracht der deutlichen *in vitro* Ergebnisse nur eine untergeordnete Rolle bei der Retinoblastomausprägung spielen kann, da die Ergebnisse der *in vitro* Analysen auf eine krankheitsursächliche Mutation hindeuten.

Diese Daten stehen im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, dass regulatorische Regionen in nichtcodierenden Regionen anzusiedeln sind (Maston *et al.*, 2006). Dennoch gibt es einige seltene Beispiele, die zeigen, dass sich in der proteincodierenden Region von Genen regulatorische Elemente befinden, wie in dem sechsten Exon des human *Keratin 18*-Gens

(Neznanov *et al.*, 1997) und dem Globin-Gen beim Hasen (James-Pederson *et al.*, 1995). In dem humanen *GFAP* - Gen (*glial fibrillary acidic protein*) wurde neben einem Initiationskomplex stromaufwärts zum Transkriptionsstart auch 17 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts in der codierenden Region ein *cis*-Element identifiziert (Nakatani *et al.*, 1990). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit und denen der anderen Veröffentlichungen könnten die Daten dieser Arbeit einen ersten Hinweis liefern, dass in der proteincodierenden Region des Exons 1 ein regulatorisches Element beherbergt ist.

#### *Onkogene Mutationen können nicht-onkogene in vitro Antworten zeigen*

Gegensätzlich zu den Beobachtungen der g.2118 C>T Mutation, die ursprünglich als nicht-onkogen anzusehen war, konnten in den *in vitro* Analysen bei bereits validierten onkogenen Mutationen eindeutig nicht-onkogene Antworten in den *in vitro* Assays nachgewiesen werden.

Eine in der Sp1/ GC Box identifizierte Mutation (g.1910 G>C) wurde von Cowell *et al.* (1996) als einzig krankheitsursächliche Mutation in einer Familie mit milder Penetranz beschrieben. In ihren Daten (EMSA) beschrieben sie, dass die Mutation zu einer veränderten DNA-Protein-Interaktion führte (ebenfalls in dieser Arbeit beobachtet). Die Expressions-Ergebnisse zeigten in zwei der Zelllinien (HeLa, HEK-293) eine erhöhte Promotoraktivität und in den restlichen eine neutrale Antwort. Dass Mutationen in einem Sp1-Motiv auch zu einer gesteigerten Promotoraktivität führen können, zeigten die Ergebnisse von Rose *et al.* (1998). Diese identifizierten natürlich vorkommende Mutationen in einem Sp1-Motiv im proximalen Promotorsegment der *upstream regulatory region* (URR) des humanen Papillomavirus. Wie auch die Genexpressions-Daten dieser Arbeit konnten sie in ihren Daten eine erhöhte Promotoraktivität in dem HeLa-Zellsystem beobachten, hervorgerufen durch die Mutation in der Sp1 TFBS. Wie die Ergebnisse der *in-vitro* Sp1-Mutations-Daten in einen *in-vivo* Ansatz transferiert werden können, bleibt dennoch ungeklärt, zumal die Tumorgenese des Retinoblastoms mit einer Inaktivierung des *RBI*-Gens einhergeht, und nicht mit einer verstärkten Expression.

#### *Promotorpolymorphismen zeigen einen Effekt bei der RBI-Promotoraktivität*

Die Variation einer einzelnen Base, die in einer bestimmten Population mit einer Häufigkeit von  $\geq 1$  % vorkommt, wird als SNP bezeichnet. SNPs in Promotoren können einen Einfluss auf die Genexpression ausüben, wie z.B. die *in vitro* Daten der Veröffentlichung von

Thomson *et al.* (2004) zeigten, die eine veränderte Genexpression des *Cholesteryl ester transfer protein*-Gens durch SNPs im Promotor nachweisen konnten.

Dass ein SNP einen Einfluss auf die *RBI*-Promotoraktivität haben kann, konnte durch die Variation an der Position g.1718 C>T (rs4151418) gezeigt werden, da bei den Daten der Genexpression in drei Zelllinien (CHO-K1, HEK-293, Y79) eine milde Absenkung der Promotoraktivität beobachtet werden konnte. Weiterhin zeigten die DNA-Protein-Interaktions-Ergebnisse eine deutliche Erhöhung in der DNA-Affinität des varianten Fragments. Dieses lässt darauf schließen, dass dieser SNP als funktionelle Variante agiert und die *RBI*-Genexpression in *cis* beeinflusst. Unterstützt wird dieses durch die geringe MAF (0,017, CEU) des SNPs, welcher deswegen eher eine seltene Variante ist. Ein funktioneller Einfluss der Variante ist dennoch möglich, obwohl sich dieser in keiner (bis jetzt bekannten) TFBS befindet. In einer Veröffentlichung von Buckland *et al.* (2005) wurde gezeigt, dass nur 33% der funktionellen Varianten in einer TFBS liegen. Dieses lässt vermuten, dass entweder im humanen Genom noch eine große Anzahl an TFBS identifiziert werden müssen, oder dass andere sequenzabhängige Faktoren eine Rolle bei der Regulierung der Transkription spielen müssen. Weitere Studien zeigten, dass SNPs in Promotoren funktioneller Art sind und mit Krankheiten assoziiert sein können (Masotti *et al.*, 2005; Rokavec *et al.*, 2007). Trotz der Beobachtungen von funktionellen SNPs, darf nicht vernachlässigt werden, dass diese Variationen in einer Normalpopulation beobachtet wurden, und deswegen ihr Einfluss auf die Genexpression in einem als tolerabel angesehen Rahmen passiert.

#### *Uncharakterisierte TFBS zeigen funktionelle Antworten*

Stromaufwärts der essentiellen regulatorischen Region konnten von Temple und Murray (2005) eine Reihe von bis jetzt uncharakterisierten Protein-DNA Bindestellen experimentell nachgewiesen werden (Tabelle 13). Zwei bis jetzt uncharakterisierte TFBS waren dabei von besonderem Interesse, fp1b und fp3, da sich in beiden potentiellen TFBS jeweils eine VUC-Mutation befand. In der TFBS fp1b (g.1818 – g.1823) konnte eine Punktmutation g.1821 G>A identifiziert werden. Drei Zelllinien (CHO-K1, Hek 293 und Y79) zeigten neutrale Antworten. Auch das DNA-Protein-Bindevverhalten zeigte keinen deutlichen Unterschied zwischen den Allelen. Diese Daten lassen darauf schließen, dass diese Mutation, wie ursprünglich angenommen, keine Krankheitsursächlichkeit bedingt (*variant of uncertain consequence*). Temple und Murray (2005) identifizierten fp1b auf dem nicht-codierenden Strang, in entgegengesetzter Richtung zum *RBI*-Gen. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in den drei Zelllinien die Promotoraktivität durch die Mutation nicht

signifikant verändert wurde, da *cis*-Elemente abhängig von ihrer Orientierung agieren können (Remenyi *et al.*, 2004). Das würde darauf hinweisen, dass fp1b eventuell ein regulatorisches Element für ein anderes Gen als das *RBI* darstellt. Zellspezifische Faktoren könnten eine weitere Erklärung für reduzierte Promotoraktivität in den HeLa Zellen liefern.

Die Mutation g.1848 G>T liegt in der ersten Position der uncharakterisierten TFBS für den von Temple und Murray (2005) identifizierten TF fp3 (g.1848 – g.1854). fp3 liegt ebenfalls auf den nicht-codierenden Strang. Bei dieser Mutation konnte in allen Zellen eine moderate Reduktion der Promotoraktivität beobachtet werden. Durch die Mutation kam es zum Verlust einer Interaktion sowie dem Gewinn einer neuen Interaktion. Eine krankheitsursächliche Wirkung dieser Mutation kann somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Hinzu kommt, dass die Mutation in der *Essential Regulatory Region* (g.1844 bis g.1879; Gill *et al.*, 1994) des *RBI*-Promotors liegt, die für Steuerung der basalen Transkription verantwortlich ist.

Temple und Murray konnten in ihrer Veröffentlichung zeigen, dass die fp3 Sequenz ein mögliches Bindemotiv für das *cAMP-response element binding protein* Element ist. Dieses macht es durchaus möglich, dass fp3 eine Bindestelle für den TF CREB (*CRE binding transcription factor*) darstellt und eine Mutation innerhalb dieser Sequenz zu einem veränderten Bindeverhalten führt. In einer Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass CREB mit RbAp48 interagiert, welches ein Histon-bindendes Protein ist und anfänglich auch als pRB bindendes Protein beschrieben wurde (Zang *et al.* 2000; Qian *et al.* 1993).

#### *Mutationen in RBI-Silencer Element führen zu erhöhter Genexpression*

Silencer sind *cis*-regulative Elemente, die die Transkription eines Gens mitregulieren, indem sie durch das Binden von *trans*-Faktoren die Genexpression vermindern. Mutationen in *Silencern* können so einen Einfluss auf die Expression durch vermindertes oder differentielles Bindeverhalten des *trans*-Faktors an die mutierte DNA-Sequenz haben.

Die Mutation g.1877 C>T in der Erkennungssequenz des E2F TF resultierte in drei Zelllinien (CHO-K1, HeLa und HEK-293) in einer erhöhten Promotoraktivität (Abb. 4). Diese Resultate korrelieren mit den Ergebnissen von Ohtani-Fujita *et al.* (1994). Sie führten Deletions- und Mutations-Analysen in der Region um g.1873 – g. 1880 durch und zeigten, dass die E2F TFBS im *RBI*-Promotor als *Silencer* agiert. Dieses erklärt hinreichend die erhöhte Aktivität des Promotors hervorgerufen durch die Punktmutation innerhalb des *Silencers*.

Einen Überblick aller validierten und putativen regulatorischen Elemente findet man in Tabelle 12 und in Tabelle 13.

**Tab. 12 Zusammenfassung validierter TFBS im *RBI* - Promotor**

Binde Motiv	<u>Konsensus Sequenz-Motiv</u> , Sequenz-Motiv im <i>RBI</i> - Promotor (genomische Position)	Wahrscheinlich gebundener Transkriptionsfaktor	Referenz
GC-Box	<u>GGGCGG</u> CGGGCGG (g.1857) CGGGCGGGGA (g.1904)	Sp1	Gill <i>et al.</i> (1994)
RBF1	<u>CGGAAGTG</u> GGCGGAAGT (g.1859)	E4TF1, Fli-1	Savoysky <i>et al.</i> (1994); Tamir <i>et al.</i> (1999)
p53 <i>Control Element</i>	<u>RRRCWWGYYY</u> GGAAGTGACG (g.1862)	p53	Shiio <i>et al.</i> (1992)
ATF	<u>TGACGYMR</u> GTGACGTTT (g.1866)	Activating Transcription Factor 2	Park <i>et al.</i> (1994); Sakai <i>et al.</i> (1991)
E2F	<u>TTTSSCGS</u> TTTCCCGC (g.1873)	E2F-1	Hamel <i>et al.</i> (1992); Shan <i>et al.</i> (1994)
p53 <i>Responsive Element</i>	<u>RRRCWWGYYY</u> AGAGGACGGGCGTGC- CCCGACGTG (g.1972)	p53	Osifchin <i>et al.</i> (1994)

**Tabelle. 13 Zusammenfassung uncharakterisierter DNA-Bindestellen im *RBI* - Promotor**

Binde Motiv	Motiv-Sequenz im <i>RBI</i> - Promotor (genomische Position)	Gebundener Transkriptionsfaktor	Referenz
fp1	GTTCCC (g.1808)	uncharakterisiert	Temple und Murray (2005)
fp1b	GACGCC (g.1818)	uncharakterisiert	Temple und Murray (2005)
fp2	AGCCT (g.1836)	uncharakterisiert	Temple und Murray (2005)
fp3	GTGACGC (g.1848)	uncharakterisiert	Temple und Murray (2005)
fp4	AGTTGC (g.1888)	uncharakterisiert	Temple und Murray (2005)

DNA-Bindemotiv Konsensussequenzen basieren auf der *Transcription Regulatory Region Database* (TRRD) (Kolchanov *et al.*, 2000). Die allgemeinen Konsensussequenzen sind unterstrichen, die jeweiligen *RBI*-Sequenzen sind nicht unterstrichen. Die in Klammern aufgeführten genomischen Positionen zeigen den Startpunkt der Basensequenz relativ zu L11910 an. Die Einordnung der Proteine basiert auf der TRANSFAC Klassifizierung (Wingender *et al.*, 2000). In der IUB Sequenz Nomenklatur steht S für die Basen C oder G; W steht für die Basen A oder T; M steht für die Basen A oder C; Y steht für die Basen T oder C; R steht für die Basen A oder G. (Tabelle 12 modifiziert nach Temple und Murray, 2005).



#### 4.2 Modifikation der Retinoblastomentstehung durch nicht-krankheitsursächliche genetische Variation im Bereich des *RBI*-Gens

*Die Untersuchung von Kindern mit isoliert einseitigem Retinoblastom erbringt keinen Hinweis darauf, dass eine häufige genetische Variante das Retinoblastomrisiko beeinflusst*

Matsunaga (1978) analysierte das Auftreten des Retinoblastoms unter der Annahme, dass Penetranz und Expressivität des Retinoblastoms Variablen sind, die sowohl durch genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren modifiziert werden können. Er schätzte aus seinen Daten, dass 13 % der Träger einer erblichen, krankheitsursächlichen Mutation im *RBI*-Gen kein Retinoblastom entwickeln. Diese Mutationsträger, so vermutete er, sind aufgrund der Faktoren, die Penetranz und Expressivität modifizieren, gegenüber der Entstehung eines Retinoblastoms resistent. Er vermutete, dass die andere Extremgruppe, d.h. die gegenüber der Entstehung eines Retinoblastoms am wenigsten resistente (*most susceptible group*), die Patienten sind, die erkranken, obwohl sie keine erbliche, krankheitsursächliche Mutation im *RBI*-Gen tragen. Dies sind die Patienten mit der nicht-erblichen Form des Retinoblastoms. Matsunaga schlug zur Bestimmung der Suszeptibilitäts-Faktoren vor, unbetroffene Mutationsträger mit nicht-erblichen Fällen zu vergleichen. Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass wesentliche Faktoren für das Ausbleiben von Retinoblastomen bei Trägern einer erblichen, krankheitsursächlichen Mutation im *RBI*-Gen zum einen die funktionelle Konsequenz der Mutation und, bei nicht-erkrankten Eltern, ein Mutationsmosaik ist. Dies spricht allerdings nicht gegen die Vermutung, dass Patienten mit der nicht-erblichen Form des Retinoblastoms eine in Bezug auf die Retinoblastomentstehung „*most susceptible group*“ sind. Als Vergleichsgruppe in Bezug auf die Verteilung der Faktoren sollten dann Normalpersonen herangezogen werden.

In dieser Arbeit wurden daher einseitig isoliert erkrankte Patienten mittels eines *transmission-disequilibrium* Tests (TDT, Spielman *et al.*, 1993) untersucht um festzustellen, ob diese Kinder in Bezug auf den Haplotyp Hintergrund des *RBI*-Gens einen Unterschied zeigen. Ein positives Ergebnis würde auf die Existenz von genetischen Faktoren in *cis* hinweisen, die eine erhöhte Suszeptibilität für die Entwicklung von Retinoblastom vermitteln.

Die Ergebnisse des TDTs zeigten jedoch für keinen der neun im *RBI*-Gen untersuchten Marker ein positives Signal. Die Patienten mit einseitig isoliertem Retinoblastom zeigten also keinen erkennbaren Unterschied bezüglich einer häufigen Variation in *cis*. Dieses Ergebnis lässt zwei mögliche Erklärungen zu. Zum einem ist es möglich, dass ein in dieser Arbeit nicht

erfasster (aber dennoch häufiger) Marker für die Modifikation verantwortlich ist (*common variant*) oder, dass die verursachenden genetischen Faktoren sehr heterogen sind, und wahrscheinlich verschiedene jeweils seltene Allele (*rare variant*) das Retinoblastomrisiko beeinflussen. Letztere wird durch die Veröffentlichung von Bomder und Bonilla (2008) unterstützt. Sie beschreiben in ihrer „*rare variant hypothesis*“, dass ein Teil einer vererbten Suszeptibilität bei häufigen humanen Krankheiten durch eine Anhäufung von Effekten einer Serie *low frequency* und unabhängig voneinander agierenden seltenen Varianten bedingt wird. Diese Hypothese wird weiterhin durch die Tatsache gestützt, dass der *RBI*-Locus einer starken Selektion unterliegt (Sivakumaran *et al.*, 2005). Ein solcher Selektionsdruck könnte durch genetische Variation bedingt werden, die durch eine geschwächte Funktion des *RBI*-Gens die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von isoliert einseitigem Retinoblastom erhöht (*most susceptible group*). Da der Selektionsdruck dieser genetischen Varianten eine Ausdehnung im Genpool der Population verhindert, müssen die Varianten als jeweils selten (*rare variants*) angesehen werden. Zugleich muss von einer hohen Heterogenie der Varianten ausgegangen werden. Dieses bedeutet, dass es viele verschiedene Varianten sind, die das Retinoblastomrisiko bedingen, und diese zusätzlich noch selten sind. Dass seltene Varianten durchaus krankheitsverursachend sein können, wurde unter anderem in den humanen Genen wie dem *APC* bei kolorektalem Karzinom (Frayling *et al.*, 1998) gezeigt. Weiterhin konnten Lovelock *et al.*, (2007) und Johnson *et al.* (2007) in zwei unabhängigen Assoziationsstudien beobachten, dass seltene Varianten in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* pathogene Eigenschaften besitzen, und diese Varianten eine Assoziation zu geringem oder moderatem Brustkrebsrisiko bei Frauen haben.

#### *Ein Anzeichen für modifizierende Einflüsse - Alter bei Diagnose*

Ein möglicher Hinweis auf die genetische Suszeptibilität bei Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom konnte bei der Haplotypverteilung (Alter bei Diagnose) identifiziert werden. Bei der Analyse der Netzwerkstruktur wurde die Frequenz der Haplotyp-Verteilung mit unterschiedlichem Alter untersucht.

Der Haplotyp 4 (Ht4; Abb. 3.3.6) konnte nur bei Patienten mit früher Diagnose (<900 Tage) festgestellt werden. Dieser hob sich nur durch einen SNP (rs 4151551) von dem häufigsten Haplotyp Ht1 ab. Die Ergebnisse dieser Haplotyp-Analysen sind ein Anzeichen für modifizierende Einflüsse *in cis*. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es also eine genetische Modifikation in Bezug auf das Alter bei Diagnose bei einseitig isolierten Patienten mit Retinoblastom gibt, die nach Matsunaga die *most susceptible group* darstellen. Dass es einen

möglichen alterspezifischen Effekt bei einseitig isolierten Patienten gibt, konnte mit den Ergebnissen der Haplotypverteilung nachgewiesen werden, der einen möglichen Effekt genetischer Variation in Abhängigkeit vom Alter bei Diagnose darstellt. Dass es einen Alterseffekt gibt, konnte schon bei einer Subgruppe jung diagnostizierter Patienten mit einseitig isoliertem Retinoblastom beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte diese Gruppe noch weiter einen Elterneffekt, da die *de novo* Mutationen auf dem paternalen Allel beobachtet wurde (Kato *et al.*, 1994).

#### *Genetische Variation in ECRs 5'-stromaufwärts zum RBI-Gen zeigen keine Phänotyp-Genotyp-Korrelation*

Da die Ergebnisse der statistischen Analysen (4.2) zu keiner Identifikation einer häufigen Variante in *cis* führte, wurden in der 5'-stromaufwärts Region des *RBI*-Gens durch den Vergleich der Sequenzen des humanen Genoms mit dem murinen Genom 18 evolutionär konservierte Regionen identifiziert und auf seltene Sequenzvarianten hin untersucht (*rare variant hypothesis*, Bomder und Bonilla, 2008). Insgesamt konnten nur in vier der 13 ECR\_NGs in einer Patientengruppe mit extremer Phänotypausprägung (2.1.9.3) heterozygote Sequenzvarianten gefunden werden. Die sehr geringe Frequenz der identifizierten Sequenzvarianten ließ drei Schlussfolgerungen zu: (A) es gibt keine seltenen Varianten oder (B) die gesuchten Varianten befanden sich nicht in den hier untersuchten Regionen oder (C) die Sequenzvarianten konnten nicht in dem untersuchten Patientenkollektiv in den untersuchten Regionen gefunden werden. Ein möglicher Lösungsansatz wäre eine Erhöhung der Patientengruppe, sowie die Sequenzvariations-Analyse auf zusätzliche Bereiche ausweiten, wie z.B. intergene Regionen, stromabwärts des *RBI*-Gens oder im optimalen Fall den kompletten Haplotypblock, in dem sich das *RBI*-Gen befindet. Eine Umsetzung dieser Herangehensweise stellt aber einen großen Aufwand dar, da pro Patient mehr als 300 kb untersucht werden müssten, und dieses sehr zeit- und kostenintensiv ist. Weiterhin könnten auch strukturelle Veränderungen im humanen Genom für eine Untersuchung in Betracht gezogen werden wie z.B. *Copy Number Variants* (CNVs). Einige wenige Assoziations-Studien zeigten bereits die Wichtigkeit von CNVs als krankheitssuszeptible Varianten (Ionita-Laza *et al.*, 2009). So konnten Gonzales *et al.* (2005) zeigen, dass eine verminderte Anzahl (verglichen mit dem normalen Populationsdurchschnitt) des *CCL3L1*-Gens merklich mit einer verstärkten Suszeptibilität von HIV/*acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) assoziiert ist. Im Falle des *RBI*-Gens müsste aber eine komplette Genomsequenzierung

durchgeführt werden, die mit dem derzeitigen Stand der Technologie zwar möglich ist, aber eine kostenintensive Alternative darstellt.

Da mit den ECRs, in denen Varianten identifiziert worden sind, keine weiteren funktionellen Analysen durchgeführt wurden, bleibt deren möglicher Einfluss auf die *RBI*-Genexpression noch ungeklärt. Eine aktuelle Studie mit einem vergleichbaren Ansatz konnte aber durch funktionelle Analysen von ECRs im Intron 2 des *RBI*-Gens ein *Silencer*-Element identifizieren (Röwenstrunk, 2009). Dieses unterstützt die Hypothese, dass Mutationen in ECRs einen Einfluss auf die Expression des *RBI*-Gens haben können. Möglich wäre ebenfalls, dass die identifizierten Varianten in den ECRs einen bis jetzt ungeklärten Einfluss auf die Entstehung von Zweittumoren haben. Bisher ist bekannt, dass die Entstehung von Zweittumoren nicht durch eine spezifische Mutation im *RBI*-Gen ausgelöst wird, aber mit dem *RBI*-Gen kosegregiert (Genuardi *et al.*, 2001). Eine mögliche genetische Ursache könnten modifizierende Faktoren in *cis* zum *RBI*-Gen sein.

Dass Mutationen in konservierten Regionen pathogener Art sein können, wurde in mehreren Veröffentlichungen nachgewiesen. Driscoll *et al.*, (1989) zeigten, dass die seltene humane Krankheit  $\gamma\delta\beta$ -Thalassämie durch eine Deletion im konservierten 5'-Bereich des  $\beta$ -Globin Gens verursacht wird. Bonafe *et al.*, (2005) identifizierten eine Reihe von pathogenen Mutationen in hoch konservierten Regionen des *RMRP*-Gens, welches für eine strukturelle RNA codiert, die einen Teil des RNase Komplex bildet. Die Mutationen führen zu der humanen *Cartilage-Hair*-Hypoplasie.

Eine weitere Assoziations-Analyse mit sechs SNPs, die durch eine *in silico* Analyse in fünf ECRs stromaufwärts zum *RBI*-Gen identifiziert worden sind, wurde mit 121 Familien-Trios (Patienten mit unilateralem Retinoblastom und unbetroffenen Eltern) durchgeführt. Es wurde geprüft, ob Patienten mit Retinoblastom einen Unterschied in der Allelfrequenz zeigen (im Vergleich zum nicht transmittierten Allel, TDT) und somit die von Matsunaga postulierte *most susceptible group* darstellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte jedoch, dass für keinen der genotypisierten SNPs die erhaltenen Genotypfrequenzen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) erfüllten, welches aber eine essentielle Grundvoraussetzung für die statistische Analyse mit einem TDT darstellt. Es ist möglich, dass dieser beobachteten Abweichung zwischen Kindern und Eltern eine (noch nicht identifizierte) biologische Ursache zugrunde liegt. Eine erneute Genotypisierung des gesamten Kollektives mit einer anderen Technologie war während dieser Arbeit nicht mehr möglich.

### 4.3 Allelspezifische Expression

Die Daten der Etablierung der hnRNA-Isolierung zeigten, dass es möglich war, hnRNA ohne DNA Kontamination zu isolieren. Trotzdem war eine quantitative Untersuchung einer allelspezifischen Expression des *RBI*-Gens mit der SNaPshot Technologie nicht möglich. Nach dem damaligen Stand des Wissens (Anfang der Promotion), war diese Herangehensweise der Untersuchung einer allelspezifischen Transkription des *RBI*-Gens berechtigt. Während der experimentellen Phase dieser Doktorarbeit konnten Kanber *et al.* (2009) eine allelspezifische Expression des *RBI*-Gens beobachten. Im Intron 2 des *RBI*-Gens konnte bei einem Patienten (mit einer generalisierten Imprintingstörung) eine nicht differentiell methylierte CpG Insel (CpG 85) identifiziert werden. Das CpG 85 ist maternal methyliert und paternal unmethyliert. Ihre Daten zeigten weiterhin, dass das CpG 85 einen Promotor für ein alternatives Transkript darstellt, da es paternal exprimiert wird. Demnach zeigten sie, dass das *RBI*-Gen dem Imprinting unterliegt. Weiterhin entdeckten sie eine allelische Imbalance, mit einem 3:1 (maternal:paternal) verschobenen Transkriptverhältnis, am *RBI*-Locus. In ihren Versuchen demethylierten sie das CpG 85 partiell und konnten weiterhin zeigen, dass diese Demethylierung mit einem geringer verschobenen Transkriptverhältnis des regulären *RBI*-Transkripts korreliert und schlussfolgerten, dass die verminderte Expression des regulären paternalen *RBI*-Transkripts auf die Expression des alternativen *RBI*-Transkripts, aufgrund des unmethylierten CpG 85, zurückzuführen ist.

Das Imprinting des *RBI*-Gens steht im direkten Zusammenhang mit einer Insertion einer DNA-Sequenz, die durch eine Retrotransposition eines Gens auf Chromosom 9 erklärt werden konnte. Ein Teil der inserierten DNA-Sequenz entwickelte sich in einen differentiell methylierten alternativen Promotor. Eine differentielle Methylierung dieses CpG führte zu einer verschobenen Transkription des *RBI*-Gens zu Gunsten des maternalen Allels.

Die von Kanber *et al.* (2009) beobachteten Eltereneffekte würden die allelspezifischen Expressionanalysen des *RBI*-Gens mit Hilfe der hnRNA, wie am Anfang der Promotion angedacht, erheblich erschweren. Ein dem Retinoblastom nahes Zellsystem würde die Identifikation erleichtern. Hierfür müsste jedoch für jeden Patienten eine eigene Zelllinie etabliert werden, welches mit einem erheblichen Aufwand (u.a. Zeit- und Kostenintensität) verbunden wäre.

## 5. Zusammenfassung

Das erbliche Retinoblastom, ein Augentumor des Kindesalters, wird durch Mutationen im *Retinoblastoma 1* - Gen (*RBI*) verursacht. Der Verlauf der Erkrankung, insbesondere die Zahl der Tumorherde, das Alter bei Diagnose und das Auftreten von Tumoren außerhalb des Auges wird durch zusätzliche Faktoren beeinflusst. Ein Teil dieser modifizierenden Einflüsse kann durch genetische Variation in *cis* zum *RBI*-Gen erklärt werden. In dieser Promotionsarbeit sollten mögliche modifizierende Faktoren in *cis* identifiziert und ihr Einfluss auf die allelische Expression des *RBI*-Gens untersucht werden.

Variation in *cis* kann die Genfunktion durch Beeinflussung der Transkriptionsinitiation modifizieren. Daher wurden variante *RBI*-Promotorallele funktionell in Bezug auf Aktivität (Luziferase-Assays) und DNA-Protein-Interaktion (EMSA) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Promoters nicht nur sehr ausgeprägt abhängig von der jeweils verwendeten Zelllinie ist, sondern sogar bei einzelnen Varianten in gegensätzlichen Aktivitätsänderungen resultierte. Es konnten bislang unbekannte regulativ relevante Genbereiche identifiziert (Exon 1) werden und die funktionelle Einordnung von bereits bekannten Mutationen wurde korrigiert (g.2118C>T, g.1980del6bp).

Patienten mit isoliert einseitigem Retinoblastom sollten nach Überlegungen von Matsunaga (1978) Faktoren aufweisen, die die Retinoblastomentstehung begünstigen (*most susceptible group*). Eine häufig vorkommende Variation in *cis* zum *RBI*-Gen zeigte hier bei dieser Patientengruppe keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen (nicht transmittierte Allele der Eltern, TD-Test). Dies schließt die Existenz begünstigender Faktoren nicht aus, da eine hier nicht erfasste und dennoch häufige Variation eine Rolle spielen könnte. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die begünstigenden Faktoren heterogen und jeweils selten sind (*rare variants*). Bei dem Vergleich der in der Patientengruppen beobachteten Haplotypen wurde ein Haplotyp, der sich von den anderen durch den SNP rs4151551 unterschied, nur bei Patienten mit früher Diagnose (<900 Tage) gefunden. Dies ist neben *parent-of-origin* Effekten (Schüler *et al.* 2005) der zweite Hinweis auf das Diagnosealter modifizierende Einflüsse in *cis*.

Unter der Annahme, dass modifizierende Einflüsse durch seltene Varianten in *cis* vermittelt werden, wurden in der Umgebung des *RBI*-Gens in der 5'- evolutionär konservierte Regionen (ECR) bestimmt und Patientengruppen mit extremer Phänotypausprägung (Zahl der Tumoren, Alter bei Diagnose, Zweittumoren) auf seltene Sequenzvarianten untersucht. Es konnten seltene Varianten in vier ECRs identifiziert werden. Diese sind Kandidaten für funktionelle Analysen der allelischen *RBI*-Genexpression.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abramson, D. H., L. S. Gamell, R. M. Ellsworth, E. F. Kruger, C. A. Servodidio, L. Turner and D. Sussman (1994). "Unilateral retinoblastoma: new intraocular tumours after treatment." Br J Ophthalmol **78**(9): 698-701.
- Altshuler, D., V. J. Pollara, C. R. Cowles, W. J. Van Etten, J. Baldwin, L. Linton and E. S. Lander (2000). "An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing." Nature **407**(6803): 513-516.
- Antonarakis, S. E., S. H. Irkin, T. C. Cheng, A. F. Scott, J. P. Sexton, S. P. Trusko, S. Charache and H. H. Kazazian, Jr. (1984). "beta-Thalassemia in American Blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(4): 1154-1158.
- Arking, D. E., A. Krebsova, M. Macek, Sr., M. Macek, Jr., A. Arking, I. S. Mian, L. Fried, A. Hamosh, S. Dey, I. McIntosh and H. C. Dietz (2002). "Association of human aging with a functional variant of klotho." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 856-861.
- Balmer, A., C. Gailloud, F. Munier, S. Uffer and Y. Guex-Crosier (1993). "Retinoblastoma. Unusual warning and clinical signs." Ophthalmic Paediatr Genet **14**(1): 33-38.
- Blackwood, E. M. and J. T. Kadonaga (1998). "Going the distance: a current view of enhancer action." Science **281**(5373): 60-63.
- Bodmer, W. and C. Bonilla (2008). "Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases." Nat Genet **40**(6): 695-701.
- Bonafe, L., E. T. Dermitzakis, S. Unger, C. R. Greenberg, B. A. Campos-Xavier, A. Zankl, C. Ucla, S. E. Antonarakis, A. Superti-Furga and A. Reymond (2005). "Evolutionary comparison provides evidence for pathogenicity of RMRP mutations." PLoS Genet **1**(4): e47.
- Bookstein, R., E. Y. Lee, H. To, L. J. Young, T. W. Sery, R. C. Hayes, T. Friedmann and W. H. Lee (1988). "Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2210-2214.
- Bornfeld, N., A. Schuler, N. Bechrakis, G. Henze and W. Havers (1997). "Preliminary results of primary chemotherapy in retinoblastoma." Klin Padiatr **209**(4): 216-221.
- Bray, N. J., P. R. Buckland, N. M. Williams, H. J. Williams, N. Norton, M. J. Owen and M. C. O'Donovan (2003). "A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain." Am J Hum Genet **73**(1): 152-161.
- Briard-Guillemot, M. L., C. Bonaiti-Pellie, J. Feingold and J. Frezal (1974). "[Genetic study of retinoblastoma (author's transl)]." Humangenetik **24**(4): 271-284.

- Brichard, B., M. Heusterspreute, P. De Potter, C. Chantrain, C. Vermylen, C. Sibille and J. L. Gala (2006). "Unilateral retinoblastoma, lack of familial history and older age does not exclude germline RB1 gene mutation." Eur J Cancer **42**(1): 65-72.
- Buckland, P. R. (2004). "Allele-specific gene expression differences in humans." Hum Mol Genet **13 Spec No 2**: R255-260.
- Buckland, P. R., B. Hoogendoorn, S. L. Coleman, C. A. Guy, S. K. Smith and M. C. O'Donovan (2005). "Strong bias in the location of functional promoter polymorphisms." Hum Mutat **26**(3): 214-223.
- Butte, A. J., V. J. Dzau and S. B. Glueck (2001). "Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues"." Physiol Genomics **7**(2): 95-96.
- Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemeslari, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley and E. S. Lander (1999). "Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes." Nat Genet **22**(3): 231-238.
- Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphree, L. C. Strong and R. L. White (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-784.
- Cheung, V. G., L. K. Conlin, T. M. Weber, M. Arcaro, K. Y. Jen, M. Morley and R. S. Spielman (2003). "Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells." Nat Genet **33**(3): 422-425.
- Clarke, A. R., E. R. Maandag, M. van Roon, N. M. van der Lugt, M. van der Valk, M. L. Hooper, A. Berns and H. te Riele (1992). "Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development." Nature **359**(6393): 328-330.
- Collins, F. S., M. S. Guyer and A. Charkravarti (1997). "Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation." Science **278**(5343): 1580-1581.
- Cooper, D. N., P. D. Stenson and N. A. Chuzhanova (2006). "The Human Gene Mutation Database (HGMD) and its exploitation in the study of mutational mechanisms." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 1**: Unit 1 13.
- Cowell, J. K., B. Bia and A. Akoulitchev (1996). "A novel mutation in the promoter region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene." Oncogene **12**(2): 431-436.
- Cowles, C. R., J. N. Hirschhorn, D. Altshuler and E. S. Lander (2002). "Detection of regulatory variation in mouse genes." Nat Genet **32**(3): 432-437.



- Crossley, M., M. Ludwig, K. M. Stowell, P. De Vos, K. Olek and G. G. Brownlee (1992). "Recovery from hemophilia B Leyden: an androgen-responsive element in the factor IX promoter." Science **257**(5068): 377-379.
- DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha and D. M. Livingston (1988). "SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene." Cell **54**(2): 275-283.
- Dermitzakis, E. T., A. Reymond and S. E. Antonarakis (2005). "Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes." Nat Rev Genet **6**(2): 151-157.
- Devesa, S. S. (1975). "The incidence of retinoblastoma." Am J Ophthalmol **80**(2): 263-265.
- Draper, G. J., B. M. Sanders, P. A. Brownbill and M. M. Hawkins (1992). "Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling." Br J Cancer **66**(1): 211-219.
- Driscoll, M. C., C. S. Dobkin and B. P. Alter (1989). "Gamma delta beta-thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' beta-globin gene activation-region hypersensitive sites." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7470-7474.
- Duan, S., R. S. Huang, W. Zhang, W. K. Bleibel, C. A. Roe, T. A. Clark, T. X. Chen, A. C. Schweitzer, J. E. Blume, N. J. Cox and M. E. Dolan (2008). "Genetic architecture of transcript-level variation in humans." Am J Hum Genet **82**(5): 1101-1113.
- Dunn, J. M., R. A. Phillips, X. Zhu, A. Becker and B. L. Gallie (1989). "Mutations in the RB1 gene and their effects on transcription." Mol Cell Biol **9**(11): 4596-4604.
- Duret, L., F. Dorkeld and C. Gautier (1993). "Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates evolution: potential involvement in post-transcriptional regulation of gene expression." Nucleic Acids Res **21**(10): 2315-2322.
- Eisenberg, E. and E. Y. Levanon (2003). "Human housekeeping genes are compact." Trends Genet **19**(7): 362-365.
- Emilsson, V., G. Thorleifsson, B. Zhang, A. S. Leonardson, F. Zink, J. Zhu, S. Carlson, A. Helgason, G. B. Walters, S. Gunnarsdottir, M. Mouy, V. Steinthorsdottir, G. H. Eiriksdottir, G. Bjornsdottir, I. Reynisdottir, D. Gudbjartsson, A. Helgadottir, A. Jonasdottir, U. Styrkarsdottir, S. Gretarsdottir, K. P. Magnusson, H. Stefansson, R. Fossdal, K. Kristjansson, H. G. Gislason, T. Stefansson, B. G. Leifsson, U. Thorsteinsdottir, J. R. Lamb, J. R. Gulcher, M. L. Reitman, A. Kong, E. E. Schadt and K. Stefansson (2008). "Genetics of gene expression and its effect on disease." Nature **452**(7186): 423-428.
- Emorine, L., M. Kuehl, L. Weir, P. Leder and E. E. Max (1983). "A conserved sequence in the immunoglobulin J kappa-C kappa intron: possible enhancer element." Nature **304**(5925): 447-449.

- Eng, C., F. P. Li, D. H. Abramson, R. M. Ellsworth, F. L. Wong, M. B. Goldman, J. Seddon, N. Tarbell and J. D. Boice, Jr. (1993). "Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma." J Natl Cancer Inst **85**(14): 1121-1128.
- Fatemi, M., M. M. Pao, S. Jeong, E. N. Gal-Yam, G. Egger, D. J. Weisenberger and P. A. Jones (2005). "Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level." Nucleic Acids Res **33**(20): e176.
- Fletcher, O., D. Easton, K. Anderson, C. Gilham, M. Jay and J. Peto (2004). "Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors." J Natl Cancer Inst **96**(5): 357-363.
- Frayling, I. M., N. E. Beck, M. Ilyas, I. Dove-Edwin, P. Goodman, K. Pack, J. A. Bell, C. B. Williams, S. V. Hodgson, H. J. Thomas, I. C. Talbot, W. F. Bodmer and I. P. Tomlinson (1998). "The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10722-10727.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja (1986). "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma." Nature **323**(6089): 643-646.
- Fung, Y. K., A. L. Murphree, A. T'Ang, J. Qian, S. H. Hinrichs and W. F. Benedict (1987). "Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene." Science **236**(4809): 1657-1661.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol **196**(2): 261-282.
- Gill, R. M., P. A. Hamel, J. Zhe, E. Zacksenhaus, B. L. Gallie and R. A. Phillips (1994). "Characterization of the human RB1 promoter and of elements involved in transcriptional regulation." Cell Growth Differ **5**(5): 467-474.
- Godbout, R., T. P. Dryja, J. Squire, B. L. Gallie and R. A. Phillips (1983). "Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma." Nature **304**(5925): 451-453.
- Gonzalez, E., H. Kulkarni, H. Bolivar, A. Mangano, R. Sanchez, G. Catano, R. J. Nibbs, B. I. Freedman, M. P. Quinones, M. J. Bamshad, K. K. Murthy, B. H. Rovin, W. Bradley, R. A. Clark, S. A. Anderson, J. O'Connell R, B. K. Agan, S. S. Ahuja, R. Bologna, L. Sen, M. J. Dolan and S. K. Ahuja (2005). "The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility." Science **307**(5714): 1434-1440.
- Greger, V., E. Passarge, W. Hopping, E. Messmer and B. Horsthemke (1989). "Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma." Hum Genet **83**(2): 155-158.

- Griffin, C., D. A. Kleinjan, B. Doe and V. van Heyningen (2002). "New 3' elements control Pax6 expression in the developing preectum, neural retina and olfactory region." Mech Dev **112**(1-2): 89-100.
- GuhaThakurta, D. (2006). "Computational identification of transcriptional regulatory elements in DNA sequence." Nucleic Acids Res **34**(12): 3585-3598.
- Hamel, P. A., R. M. Gill, R. A. Phillips and B. L. Gallie (1992). "Transcriptional repression of the E2-containing promoters EIIaE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene." Mol Cell Biol **12**(8): 3431-3438.
- Harbour, J. W. and D. C. Dean (2000). "Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis." Nat Cell Biol **2**(4): E65-67.
- Hardison, R. C. (2000). "Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements." Trends Genet **16**(9): 369-372.
- Hardison, R. C., J. Oeltjen and W. Miller (1997). "Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome." Genome Res **7**(10): 959-966.
- Hardison, R. C., K. M. Roskin, S. Yang, M. Diekhans, W. J. Kent, R. Weber, L. Elnitski, J. Li, M. O'Connor, D. Kolbe, S. Schwartz, T. S. Furey, S. Whelan, N. Goldman, A. Smit, W. Miller, F. Chiaromonte and D. Haussler (2003). "Covariation in frequencies of substitution, deletion, transposition, and recombination during eutherian evolution." Genome Res **13**(1): 13-26.
- Hong, F. D., H. J. Huang, H. To, L. J. Young, A. Oro, R. Bookstein, E. Y. Lee and W. H. Lee (1989). "Structure of the human retinoblastoma gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5502-5506.
- Horsthemke, B. and K. Buiting (2006). "Imprinting defects on human chromosome 15." Cytogenet Genome Res **113**(1-4): 292-299.
- Horsthemke, B., V. Greger, H. J. Barnert, W. Hopping and E. Passarge (1987). "Detection of submicroscopic deletions and a DNA polymorphism at the retinoblastoma locus." Hum Genet **76**(3): 257-261.
- Houdayer, C., M. Gauthier-Villars, A. Lauge, S. Pages-Berhouet, C. Dehainault, V. Caux-Moncoutier, P. Karczynski, M. Tosi, F. Doz, L. Desjardins, J. Couturier and D. Stoppa-Lyonnet (2004). "Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF." Hum Mutat **23**(2): 193-202.
- Hu, N., A. Gutsmann, D. C. Herbert, A. Bradley, W. H. Lee and E. Y. Lee (1994). "Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance." Oncogene **9**(4): 1021-1027.

- Ionita-Laza, I., A. J. Rogers, C. Lange, B. A. Raby and C. Lee (2009). "Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis." Genomics **93**(1): 22-26.
- James-Pederson, M., S. Yost, B. Shewchuk, T. Zeigler, R. Miller and R. Hardison (1995). "Flanking and intragenic sequences regulating the expression of the rabbit alpha-globin gene." J Biol Chem **270**(8): 3965-3973.
- Johnson, N., O. Fletcher, C. Palles, M. Rudd, E. Webb, G. Sellick, I. dos Santos Silva, V. McCormack, L. Gibson, A. Fraser, A. Leonard, C. Gilham, S. V. Tavtigian, A. Ashworth, R. Houlston and J. Peto (2007). "Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility." Hum Mol Genet **16**(9): 1051-1057.
- Kadota, M., H. H. Yang, N. Hu, C. Wang, Y. Hu, P. R. Taylor, K. H. Buetow and M. P. Lee (2007). "Allele-specific chromatin immunoprecipitation studies show genetic influence on chromatin state in human genome." PLoS Genet **3**(5): e81.
- Kageyama, R., G. T. Merlino and I. Pastan (1989). "Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box." J Biol Chem **264**(26): 15508-15514.
- Kanber, D., T. Berulava, O. Ammerpohl, D. Mitter, J. Richter, R. Siebert, B. Horsthemke, D. Lohmann and K. Buiting (2009). "The human retinoblastoma gene is imprinted." PLoS Genet **5**(12): e1000790.
- Kato, M. V., K. Ishizaki, T. Shimizu, Y. Ejima, H. Tanooka, J. Takayama, A. Kaneko, J. Toguchida and M. S. Sasaki (1994). "Parental origin of germ-line and somatic mutations in the retinoblastoma gene." Hum Genet **94**(1): 31-38.
- Kleinerman, R. A., R. E. Tarone, D. H. Abramson, J. M. Seddon, F. P. Li and M. A. Tucker (2000). "Hereditary retinoblastoma and risk of lung cancer." J Natl Cancer Inst **92**(24): 2037-2039.
- Klutzn, M., D. Brockmann and D. R. Lohmann (2002). "A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the RB1 gene." Am J Hum Genet **71**(1): 174-179.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Knudson, A. G., Jr., A. T. Meadows, W. W. Nichols and R. Hill (1976). "Chromosomal deletion and retinoblastoma." N Engl J Med **295**(20): 1120-1123.
- Kolchanov, N. A., O. A. Podkolodnaya, E. A. Ananko, E. V. Ignatieva, I. L. Stepanenko, O. V. Kel-Margoulis, A. E. Kel, T. I. Merkulova, T. N. Goryachkovskaya, T. V. Busygina, F. A. Kolpakov, N. L. Podkolodny, A. N. Naumochkin, I. M. Korostishevskaya, A. G. Romashchenko and G. C. Overton (2000). "Transcription regulatory regions database

- (TRRD): its status in 2000." Nucleic Acids Res **28**(1): 298-301.
- Lander, E. S. (1996). "The new genomics: global views of biology." Science **274**(5287): 536-539.
- Lee, E. Y., C. Y. Chang, N. Hu, Y. C. Wang, C. C. Lai, K. Herrup, W. H. Lee and A. Bradley (1992). "Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis." Nature **359**(6393): 288-294.
- Lee, W. H., R. Bookstein, W. Wheatley, W. F. Benedict and E. Y. Lee (1987). "A null allele of esterase D is a marker for genetic events in retinoblastoma formation." Hum Genet **76**(1): 33-36.
- Leek, J. T. and J. D. Storey (2007). "Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis." PLoS Genet **3**(9): 1724-1735.
- Lees, J. A., K. J. Buchkovich, D. R. Marshak, C. W. Anderson and E. Harlow (1991). "The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2." EMBO J **10**(13): 4279-4290.
- Lettice, L. A., S. J. Heaney, L. A. Purdie, L. Li, P. de Beer, B. A. Oostra, D. Goode, G. Elgar, R. E. Hill and E. de Graaff (2003). "A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly." Hum Mol Genet **12**(14): 1725-1735.
- Li, F. P., D. H. Abramson, R. E. Tarone, R. A. Kleinerman, J. F. Fraumeni, Jr. and J. D. Boice, Jr. (1997). "Hereditary retinoblastoma, lipoma, and second primary cancers." J Natl Cancer Inst **89**(1): 83-84.
- Liu, N., F. C. Lucibello, K. Korner, L. A. Wolfrain, J. Zwicker and R. Muller (1997). "CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters." Nucleic Acids Res **25**(24): 4915-4920.
- Lohmann, D. R. (1999). "RB1 gene mutations in retinoblastoma." Hum Mutat **14**(4): 283-288.
- Lohmann, D. R. and B. L. Gallie (2004). "Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer." Am J Med Genet C Semin Med Genet **129C**(1): 23-28.
- Lohmann, D. R., M. Gerick, B. Brandt, U. Oelschlager, B. Lorenz, E. Passarge and B. Horsthemke (1997). "Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma." Am J Hum Genet **61**(2): 282-294.
- Lovelock, P. K., A. B. Spurdle, M. T. Mok, D. J. Farrugia, S. R. Lakhani, S. Healey, S. Arnold, D. Buchanan, F. J. Couch, B. R. Henderson, D. E. Goldgar, S. V. Tavtigian, G. Chenevix-Trench and M. A. Brown (2007). "Identification of BRCA1 missense substitutions that confer partial functional activity: potential moderate risk variants?" Breast Cancer Res **9**(6): R82.

- Ludlow, J. W., J. A. DeCaprio, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Paucha and D. M. Livingston (1989). "SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family." *Cell* **56**(1): 57-65.
- Magnaghi-Jaulin, L., R. Groisman, I. Naguibneva, P. Robin, S. Lorain, J. P. Le Villain, F. Troalen, D. Trouche and A. Harel-Bellan (1998). "Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase." *Nature* **391**(6667): 601-605.
- Masotti, C., L. M. Armelin-Correa, A. Splendore, C. J. Lin, A. Barbosa, M. C. Sogayar and M. R. Passos-Bueno (2005). "A functional SNP in the promoter region of TCOF1 is associated with reduced gene expression and YY1 DNA-protein interaction." *Gene* **359**: 44-52.
- Maston, G. A., S. K. Evans and M. R. Green (2006). "Transcriptional regulatory elements in the human genome." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 29-59.
- Matsunaga, E. (1978). "Hereditary retinoblastoma: delayed mutation or host resistance?" *Am J Hum Genet* **30**(4): 406-424.
- McGee, T. L., D. W. Yandell and T. P. Dryja (1989). "Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene." *Gene* **80**(1): 119-128.
- Mihara, K., X. R. Cao, A. Yen, S. Chandler, B. Driscoll, A. L. Murphree, A. T'Ang and Y. K. Fung (1989). "Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product." *Science* **246**(4935): 1300-1303.
- Nakatani, Y., M. Brenner and E. Freese (1990). "An RNA polymerase II promoter containing sequences upstream and downstream from the RNA startpoint that direct initiation of transcription from the same site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(11): 4289-4293.
- Neznanov, N., A. Umezawa and R. G. Oshima (1997). "A regulatory element within a coding exon modulates keratin 18 gene expression in transgenic mice." *J Biol Chem* **272**(44): 27549-27557.
- Nembaware, V., B. Lupindo, K. Schouest, C. Spillane, K. Scheffler and C. Seoighe (2008). "Genome-wide survey of allele-specific splicing in humans." *BMC Genomics* **9**: 265.
- Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, R. Takahashi, P. D. Robbins, T. P. Dryja and T. Sakai (1994). "A silencer element in the retinoblastoma tumor-suppressor gene." *Oncogene* **9**(6): 1703-1711.
- Osifchin, N. E., D. Jiang, N. Ohtani-Fujita, T. Fujita, M. Carroza, S. J. Kim, T. Sakai and P. D. Robbins (1994). "Identification of a p53 binding site in the human retinoblastoma susceptibility gene promoter." *J Biol Chem* **269**(9): 6383-6389.
- Park, K., J. Choe, N. E. Osifchin, D. J. Templeton, P. D. Robbins and S. J. Kim (1994). "The human retinoblastoma susceptibility gene promoter is positively autoregulated by its own

- product." J Biol Chem **269**(8): 6083-6088.
- Pastinen, T., R. Sladek, S. Gurd, A. Sammak, B. Ge, P. Lepage, K. Lavergne, A. Villeneuve, T. Gaudin, H. Brandstrom, A. Beck, A. Verner, J. Kingsley, E. Harmsen, D. Labuda, K. Morgan, M. C. Vohl, A. K. Naumova, D. Sinnett and T. J. Hudson (2004). "A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression." Physiol Genomics **16**(2): 184-193.
- Qian, Y. W., Y. C. Wang, R. E. Hollingsworth, Jr., D. Jones, N. Ling and E. Y. Lee (1993). "A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast." Nature **364**(6438): 648-652.
- Reik, W. and J. Walter (2001). "Genomic imprinting: parental influence on the genome." Nat Rev Genet **2**(1): 21-32.
- Remenyi, A., H. R. Scholer and M. Wilmanns (2004). "Combinatorial control of gene expression." Nat Struct Mol Biol **11**(9): 812-815.
- Richter, S., K. Vandezande, N. Chen, K. Zhang, J. Sutherland, J. Anderson, L. Han, R. Pantan, P. Branco and B. Gallie (2003). "Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma." Am J Hum Genet **72**(2): 253-269.
- Rokavec, M., C. Justenhoven, W. Schroth, M. A. Istrate, S. Haas, H. P. Fischer, C. Vollmert, T. Illig, U. Hamann, Y. D. Ko, D. Glavac and H. Brauch (2007). "A novel polymorphism in the promoter region of ERBB4 is associated with breast and colorectal cancer risk." Clin Cancer Res **13**(24): 7506-7514.
- Rose, B., G. Steger, X. P. Dong, C. Thompson, Y. Cossart, M. Tattersall and H. Pfister (1998). "Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity." J Gen Virol **79** ( Pt 7): 1659-1663.
- Röwenstrunk, J. (2009) Identifizierung und Charakterisierung potenziell regulatorischer Variationen im Intron 2 des RB 1 – Gens. Bachelorarbeit.
- Sakai, T., N. Ohtani, T. L. McGee, P. D. Robbins and T. P. Dryja (1991). "Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene." Nature **353**(6339): 83-86.
- Savoysky, E., T. Mizuno, Y. Sowa, H. Watanabe, J. Sawada, H. Nomura, Y. Ohsugi, H. Handa and T. Sakai (1994). "The retinoblastoma binding factor 1 (RBF-1) site in RB gene promoter binds preferentially E4TF1, a member of the Ets transcription factors family." Oncogene **9**(7): 1839-1846.
- Schadt, E. E., S. A. Monks, T. A. Drake, A. J. Lusis, N. Che, V. Colinayo, T. G. Ruff, S. B. Milligan, J. R. Lamb, G. Cavet, P. S. Linsley, M. Mao, R. B. Stoughton and S. H. Friend (2003). "Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man." Nature

422(6929): 297-302.

- Schuler, A., S. Weber, M. Neuhauser, C. Jurklies, T. Lehnert, H. Heimann, G. Rudolph, K. H. Jockel, N. Bornfeld and D. R. Lohmann (2005). "Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional RB1 gene mutation but is influenced by a parent-of-origin effect." Eur J Cancer **41**(5): 735-740.
- Shan, B., C. Y. Chang, D. Jones and W. H. Lee (1994). "The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression." Mol Cell Biol **14**(1): 299-309.
- Shiio, Y., T. Yamamoto and N. Yamaguchi (1992). "Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5206-5210.
- Shin, H. D., C. Winkler, J. C. Stephens, J. Bream, H. Young, J. J. Goedert, T. R. O'Brien, D. Vlahov, S. Buchbinder, J. Giorgi, C. Rinaldo, S. Donfield, A. Willoughby, S. J. O'Brien and M. W. Smith (2000). "Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14467-14472.
- Singer-Sam, J., V. Chapman, J. M. LeBon and A. D. Riggs (1992). "Parental imprinting studied by allele-specific primer extension after PCR: paternal X chromosome-linked genes are transcribed prior to preferential paternal X chromosome inactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10469-10473.
- Skelly, D. A., J. Ronald and J. M. Akey (2009). "Inherited variation in gene expression." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 313-332.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA polymerase II core promoter." Annu Rev Biochem **72**: 449-479.
- Spielman, R. S., R. E. McGinnis and W. J. Ewens (1993). "Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)." Am J Hum Genet **52**(3): 506-516.
- Stamatoyannopoulos, J. A. (2004). "The genomics of gene expression." Genomics **84**(3): 449-457.
- Stanbridge, E. J. (1990). "Human tumor suppressor genes." Annu Rev Genet **24**: 615-657.
- Strachan, T., T. H. m. g. Strachan and A. P. Read (2004). Human molecular genetics 3. London, Garland Science.
- Suckling, R. D., P. H. Fitzgerald, J. Stewart and E. Wells (1982). "The incidence and epidemiology of retinoblastoma in New Zealand: A 30-year survey." Br J Cancer **46**(5): 729-736.
- Tamir, A., J. Howard, R. R. Higgins, Y. J. Li, L. Berger, E. Zacksenhaus, M. Reis and Y. Ben-David (1999). "Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression



- of the Rb gene during differentiation." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4452-4464.
- Taylor, M., C. Dehainault, L. Desjardins, F. Doz, C. Levy, X. Sastre, J. Couturier, D. Stoppa-Lyonnet, C. Houdayer and M. Gauthier-Villars (2007). "Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma." *Hum Mutat* **28**(3): 284-293.
- Temple, M. D. and V. Murray (2005). "Footprinting the 'essential regulatory region' of the retinoblastoma gene promoter in intact human cells." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(3): 665-678.
- Thomas, J. W., J. W. Touchman, R. W. Blakesley, G. G. Bouffard, S. M. Beckstrom-Sternberg, E. H. Margulies, M. Blanchette, A. C. Siepel, P. J. Thomas, J. C. McDowell, B. Maskeri, N. F. Hansen, M. S. Schwartz, R. J. Weber, W. J. Kent, D. Karolchik, T. C. Bruen, R. Bevan, D. J. Cutler, S. Schwartz, L. Elnitski, J. R. Idol, A. B. Prasad, S. Q. Lee-Lin, V. V. Maduro, T. J. Summers, M. E. Portnoy, N. L. Dietrich, N. Akhter, K. Ayele, B. Benjamin, K. Cariaga, C. P. Brinkley, S. Y. Brooks, S. Granite, X. Guan, J. Gupta, P. Haghghi, S. L. Ho, M. C. Huang, E. Karlins, P. L. Laric, R. Legaspi, M. J. Lim, Q. L. Maduro, C. A. Masiello, S. D. Mastrian, J. C. McCloskey, R. Pearson, S. Stantripop, E. E. Tionson, J. T. Tran, C. Tsurgeon, J. L. Vogt, M. A. Walker, K. D. Wetherby, L. S. Wiggins, A. C. Young, L. H. Zhang, K. Osoegawa, B. Zhu, B. Zhao, C. L. Shu, P. J. De Jong, C. E. Lawrence, A. F. Smit, A. Chakravarti, D. Haussler, P. Green, W. Miller and E. D. Green (2003). "Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions." *Nature* **424**(6950): 788-793.
- Thompson, J. F., D. B. Lloyd, M. E. Lira and P. M. Milos (2004). "Cholesteryl ester transfer protein promoter single-nucleotide polymorphisms in Sp1-binding sites affect transcription and are associated with high-density lipoprotein cholesterol." *Clin Genet* **66**(3): 223-228.
- van der Zee, J., I. Le Ber, S. Maurer-Stroh, S. Engelborghs, I. Gijssels, A. Camuzat, N. Brouwers, R. Vandenberghe, K. Slegers, D. Hannequin, B. Dermaut, J. Schymkowitz, D. Campion, P. Santens, J. J. Martin, L. Lacomblez, T. De Pooter, K. Peeters, M. Mattheijssens, M. Vercelletto, M. Van den Broeck, M. Cruts, P. P. De Deyn, F. Rousseau, A. Brice and C. Van Broeckhoven (2007). "Mutations other than null mutations producing a pathogenic loss of progranulin in frontotemporal dementia." *Hum Mutat* **28**(4): 416.
- Van Laere, A. S., M. Nguyen, M. Braunschweig, C. Nezer, C. Collette, L. Moreau, A. L. Archibald, C. S. Haley, N. Buys, M. Tally, G. Andersson, M. Georges and L. Andersson (2003). "A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig." *Nature* **425**(6960): 832-836.
- Vavouri, T., G. K. McEwen, A. Woolfe, W. R. Gilks and G. Elgar (2006). "Defining a genomic radius for long-range enhancer action: duplicated conserved non-coding elements hold the key." *Trends Genet* **22**(1): 5-10.

- Veyrieras, J. B., S. Kudaravalli, S. Y. Kim, E. T. Dermitzakis, Y. Gilad, M. Stephens and J. K. Pritchard (2008). "High-resolution mapping of expression-QTLs yields insight into human gene regulation." *PLoS Genet* **4**(10): e1000214.
- Vogel, F. (1979). "Genetics of retinoblastoma." *Hum Genet* **52**(1): 1-54.
- Wasserman, W. W. and A. Sandelin (2004). "Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements." *Nat Rev Genet* **5**(4): 276-287.
- Watts, J. A., M. Morley, J. T. Burdick, J. L. Fiori, W. J. Ewens, R. S. Spielman and V. G. Cheung (2002). "Gene expression phenotype in heterozygous carriers of ataxia telangiectasia." *Am J Hum Genet* **71**(4): 791-800.
- Whyte, P., K. J. Buchkovich, J. M. Horowitz, S. H. Friend, M. Raybuck, R. A. Weinberg and E. Harlow (1988). "Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product." *Nature* **334**(6178): 124-129.
- Williams, B. O., L. Remington, D. M. Albert, S. Mukai, R. T. Bronson and T. Jacks (1994). "Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53." *Nat Genet* **7**(4): 480-484.
- Wilson, A. G., J. A. Symons, T. L. McDowell, H. O. McDevitt and G. W. Duff (1997). "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3195-3199.
- Wingender, E., X. Chen, R. Hehl, H. Karas, I. Liebich, V. Matys, T. Meinhardt, M. Pruss, I. Reuter and F. Schacherer (2000). "TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation." *Nucleic Acids Res* **28**(1): 316-319.
- Wittkopp, P. J. (2005). "Genomic sources of regulatory variation in cis and in trans." *Cell Mol Life Sci* **62**(16): 1779-1783.
- Wong, J. M. and E. Bateman (1994). "TBP-DNA interactions in the minor groove discriminate between A:T and T:A base pairs." *Nucleic Acids Res* **22**(10): 1890-1896.
- Wray, G. A., M. W. Hahn, E. Abouheif, J. P. Balhoff, M. Pizer, M. V. Rockman and L. A. Romano (2003). "The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes." *Mol Biol Evol* **20**(9): 1377-1419.
- Yan, H., Z. Dobbie, S. B. Gruber, S. Markowitz, K. Romans, F. M. Giardiello, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2002). "Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis." *Nat Genet* **30**(1): 25-26.
- Zhang, Q., N. Vo and R. H. Goodman (2000). "Histone binding protein RbAp48 interacts with a complex of CREB binding protein and phosphorylated CREB." *Mol Cell Biol* **20**(14): 4970-4978.

## 7. Anhang

### 7.1 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5' - 3' Orientierung dargestellt.

Primer für die RT-PCR-Analysen an der cDNA der isolierten hnRNA:

*Primer System II:*

c.1535_SE	TGTCTTTCCCATGGATTCTG
g.78386_AS	TCCCTATTTGTTCTTGAGGT

*Primer System III:*

g.77139_SE	TCCTCTTACCAAGGATTAATGAGAA
g.78386_AS	TCCCTATTTGTTCTTGAGGT

Primer Systeme zur Amplifikation der 5' stomaufwärts Region zum *RBI*-Gen

*Primer System VI: ECR – NG 12*

RBg.7007_SE	ACAATTCGTTGTCCCCACTT
RBg.6458_AS	TCAAAACAGATGGGGAAGGA

*Primer System V: ECR – NG 8*

g.18002_SE	GGTTCATGAAGGCAGGATCT
g.17535_AS	CCAGGGAATCTTTAGGCTGA

Primer zur Amplifikation des *RBI*-Promoter Fragmentes mit Restriktions-Adaptoren

pGL3 - <i>Mlu</i> I_SE	CGAT <u>ACGCGT</u> TCCCTTCCTTTCCCTAACCA
pGl3 – <i>Xho</i> I_AS	ATCG <u>CTCGAGCT</u> GTCTGCTCTGGGTCCTC

Primer zur *RBI*-Promoterinsert-Sequenzierung

pGL3_SE	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
pGL3_AS	CTGTCCTGCTCTGGGTCCTC

## 7.2 Sonden für die SNP-Genotypisierung durch TaqMan Genotyping Assays (Applied Biosystems)

### *Assays on Demand*

rs1981434	Assay-ID:	C__11504561_20
rs399413	Assay-ID:	C__3042283_20
rs4151551	Assay-ID:	C__32359744_10
rs4151611	Assay-ID:	C__32359796_10
rs3092904	Assay-ID:	C__3042250_10
rs4151636	Assay-ID:	C__31604223_10
rs 2227311	Assay-ID:	C__15946411_10

### *Assays by Design*

rs2854345

PCR Primer

rs2854345\_F TGTCTGTGCCTTGCTGCTT

rs2854345\_R CCCAGCCCTGTCTTTGGAA

Farbmarkierte Reporter Primer

rs2854345\_V CTTCTTCGCCAGCAAGT (VIC markiert)

rs2854345\_M TTCTTCGCCGGCAAGT (FAM markiert)

rs4151540

PCR Primer

rs4151540\_F AATTCATTCATGTGCATATGGCTAACAATT

rs4151540\_R GATCCTTGGGCTATAGACTGAAATAACAT

Farbmarkierte Reporter Primer

rs4151540\_V TTCTTGAGGTAGATGTTAAG (VIC markiert)

rs4151540\_M TCTTGAGGTAGATTTGTTAAG (FAM markiert)

### 7.3 Oligonukleotide für die EMSA:

g.2118	
g.2118_NP_SE_EMSA	CGCTGCCGCCGCGGAACCCCCGGCACCGCCGCCGC
g.2118_NP_AS_EMSA	GCGGCGGCGGTGCCGGGGTTCCGCGGCGGCAGCG
g.2118_SE	CGCTGCCGCCGCGGAACCTCCCGGCACCGCCGCCGC
g.2118_AS	GCGGCGGCGGTGCCGGGAGTTCCGCGGCGGCAGCG
g.1980 del 6bp	
p53_EMSA_NP_SE	GGGAGAGGACGGGGCGTGCCCCGACGTGCGC
p53_EMSA_NP_AS	CGCACGTCGGGGCACGCCCCGTCCTCTCCC
p53_EMSA_del6_SE	GGGAGAGGACGGCCCCGACGTGCGC
p53_EMSA_del6_AS	CCCTCTCTGCGGGGCTGCACGCG
g.1848	
g.1948_NP_SE_EMSA	CCCGGGAGCCTCGCGGACGTGACGCCGCGGGCGG
g.1948_NP_AS_EMSA	CCGCCCCGCGGCGTCACGTCCGCGAGGCTCCCGGG
g.1948_NP_SE_EMSA	CCCGGGAGCCTCGCGGACGTGACGCCGCGGGCGG
g.1948_NP_AS_EMSA	CCGCCCCGCGGCGTCACGTCCGCGAGGCTCCCGGG
g.1867	
g.1867NP_SE_EMSA	CGGGCGGAAGTGACGTTTTCC
g.1867NP_AS_EMSA	GGAAAACGTCACTTCCGCCCCG
g.1867T>G_SE_EMSA	CGGGCGGAAGGGACGTTTTCC
g.1867T>G_AS_EMSA	GGAAAACGTCCCTTCCGCCCCG
g.1910	
g.1910_NP_EMSA_SE	GCGCTCAGTTGCCGGGCGGGGAGGGCGCGTCCGG
g.1910_NP_EMSA_AS	CGCGAGTCAACGGCCCGCCCCCTCCCGCGCAGGCC
g1910_SE	CCCGGGAGCCTCGCGGACCTGACGCCGCGGGCGG
g1910_AS	CCGCCCCGCGGCGTCAGGTCCGCGAGGCTCCCGGG

g.1877

g.1877\_NP\_SE\_EMSA GGC GGAAGT GACG TTTT CCCG CGGT TGGACG  
g.1877\_NP\_AS\_EMSA CGTCCAACCGCGGGAAAACGTC ACTTCCGCC  
g.1877\_SE GGC GGAAGT GACG TTTT CTCG CGGT TGGACG  
g.1877\_AS CCGCCTTCACTGCAAAAAGAGCGCCAACCTGC

g.2101

g.2101\_NP\_SE\_EMSA GGCCGCCACCGCCGCGCTGCCGCCGCGGAACCC  
g.2101\_NP\_AS\_EMSA GGGTTCCGCGGCGGCAGCGGCGGCGGTGGCGGCC  
g.2101\_SE GGCCGCCACCGCCGCTGCTGCCGCCGCGGAACCC  
g.2101\_SA GGGTTCCGCGGCGGCAGCAGCGGCGGTGGCGGCC

g.1821

g.1821\_NP\_EMSA\_SE CCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCGGGAGCC  
g.1821\_NP\_EMSA\_AS GGGTCAAGGGGTGTCTGCGGCCGCCCGGGCCCTCGG  
g1821\_SE CCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCGGGAGCC  
g1821\_AS GGCTCCCGGGCCCGCCGGCGTCTGTGGGGAACTGGG

g.1991

g.1991\_NP\_EMSA\_SE GGTTTTTCTCAGGGGACGTTGAAATTATTTTTGTA  
ACGGGA  
g.1991\_NP\_EMSA\_SE CCAAAAAGAGTCCCCTGCAACTTTAATAAAAACAT  
TGCCCT  
g1991\_SE GGTTTTTCTCAGGGGACGTTCAAATTATTTTTGTA  
ACGGGA  
g1991\_AS CCAAAAAGAGTCCCCTGCAAGTTTAATAAAAACA  
TTGCC

g.1718

g.1718\_NP\_EMSA\_SE CCGCGCCGGATGCCTCCTGGAAGGCGCC  
g.1718\_NP\_EMSA\_AS GGC GCGGCCTACG GAGGACCTTCCGCGG  
g.1718G>A\_EMSA\_SE CCGCGCCGGATGTCTCCTGGAAGGCGCC  
g.1718G>A\_EMSA\_AS GGC GCGGCCTACAGAGGACCTTCCGCGG

**7.4 Primer für die *in-vitro* Mutagenese:**

g.1877_SE	GGCGGAAGTGACGTTTTCTCGCGGTTGGACG
g.1877_AS	CCGCCTTCACTGCAAAAGAGCGCCAACCTGC
g.1991_SE	GGTTTTTCTCAGGGGACGTTCAAATTATTTTTGTAACGGGA
g.1991_AS	CCAAAAAGAGTCCCCTGCAAGTTTAATAAAAACATTGCCCT
g.1910_SE	CCCGGGAGCCTCGCGGACCTGACGCCGCGGGCGG
g.1910_AS	CCGCCCGCGGCGTCAGGTCCGCGAGGCTCCCGGG
g.1821_SE	CCCAGTTCCCCACAGACGCCGGCGGGCCCGGGAGCC
g.1821_AS	GGCTCCCGGGCCCGCCGGCGTCTGTGGGGAACCTGGG
g.2101_SE	GGCCGCCACCGCCGCTGCTGCCGCCGCGGAACCC
g.2101_SA	GGGTTCCGCGGCGGCAGCAGCGGCGGTGGCGGCC
g2118_SE	CGCTGCCGCCGCGGAACTCCCGGCACCGCCGCCGC
g2118_AS	GCGGCGGCGGTGCCGGGAGTTCGCGGCGGCAGCG
g_1877_SE	GGCGGAAGTGACGTTTTCTCGCGGTTGGACG
g_1877_AS	CCGCCTTCACTGCAAAAGAGCGCCAACCTGC
g1991_SE	GGTTTTTCTCAGGGGACGTTCAAATTATTTTTGTAACGGGA
g1991_AS	CCAAAAAGAGTCCCCTGCAAGTTTAATAAAAACATTGCCCT

**7.5 Primer für die Pyrosequenzierungen der ECR mit SNPs**

10574-10776

RBg\_seq-39315; AAAGGTCTAGATTCTATGTT

RBg\_seq-39219; TGTGGTTATGAATTAATAT

RBg-39206\_as\_BIO; GGGCAACAAACTCTTTGCTA

16927-17117

RBg\_seq-33046; TTTATTTTAATACCCGAAGT

RBg-32985\_as\_BIO; TTCCTCCATTGTGATTCAGC

24062-24220

RBg\_seq-25916; CATGAAAAACCTGATAGTG

RBg-25846\_as\_BIO; TTTCTGTACTTGTTTTCATATGCCTAA

29900-30049

RBg\_seq-19979; TAGTGAGTGAGCTATGGAGA

RBg-19912\_as\_BIO; GCAGAAGAGACAGGCAGTACA

42724-42900

RBg-7274\_se\_BIO; AGTTGGCAGAAATTGTGTGAAT

RBg\_seq-7239; GCCACACATGTTTCTCTAA

### **7.6 Primer für die Pyrosequenzierungen der ECR ohne genetische Variation (ECR\_NGs)**

ECR\_NG1

RBg-41333se                    CATGGCTTTTCATTTCA

RBg-41067as                    ACGACGGCAGTGGCTTTT

ECR\_NG2

RBg-34038se                    GGTATTGCCTGATCACCTTTTC

RBg-33800as                    AAGGGAAAGCTTGTCTCCAA

ECR\_NG3

RBg-32308se                    CAACCCAACAAATAATTTTGTC

RBg-32013as                    TGGCCTCCAGGATTGTTATT

ECR\_NG4

RBg-25462se                    GGCATGAATTGAACTTAACATCTTT

RB-25163as                    CCCAAGAGAAAATATAATCTTAGCC



---

ECR_NG5	
RBg_20501se	AGTAACGTTTAATGTTTGGTTTAACA
RBg-20211as	CAGGTCAGCGTAGGTTTCAA
ECR_NG6	
RBg-19478se	TTCAACCCCTAGTTCTCTCCTG
RBg-19240as	TGGCCACAGCTGTAGGATAC
ECR_NG7	
RBg-19161se	CCCTGATGGAGCCATCTACA
RBg-18893as	AATACTTGAGGCCCTGGAT
ECR_NG8	
RBg-18002se	GGTTCATGAAGGCAGGATCT
RBg-17535as	CCAGGGAATCTTTAGGCTGA
ECR_NG9	
RBg-16992se	GAACCAGGTACCCCATCTCC
RBg-16662as	GACCCACATCCCACTCAGAC
ECR_NG10	
RBg-16334 se	CGGCCTTAGAGGGCATTTTA
RBg-16086as	TTCAACCTGGGTTGTGATTTT
ECR_NG11	
RBg-9608se	TTGTCCCCACACTGTTCAAA
RBg-9393as	TCCTGCAGACACTCAGGATG
ECR_NG12	
RBg-7007se	ACAATTCGTTGTCCCCACTT
RBg -6458as	TCAAAACAGATGGGGAAGGA

ECR\_NG13

RBg-6616se

RBg-6357as

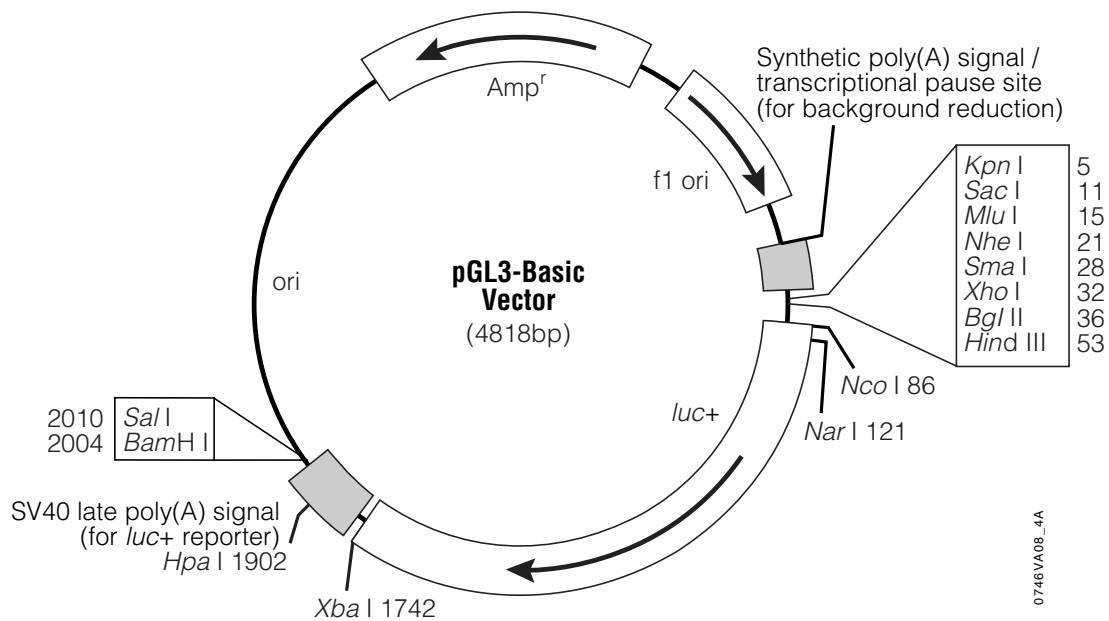
CAAACGTTATGGAAAATGTTTAACT

TCAAAATATAAATTTGAGGGAAACAG

## 7.7 Plasmidkarten:

Die Plasmidkarten des pGL3- Basic bzw. des pGL3-Enhancer Vektors sind in Abbildung 7.1 bzw. 7.2 dargestellt.

### 7.7.1 pGL3-Basic Vektor

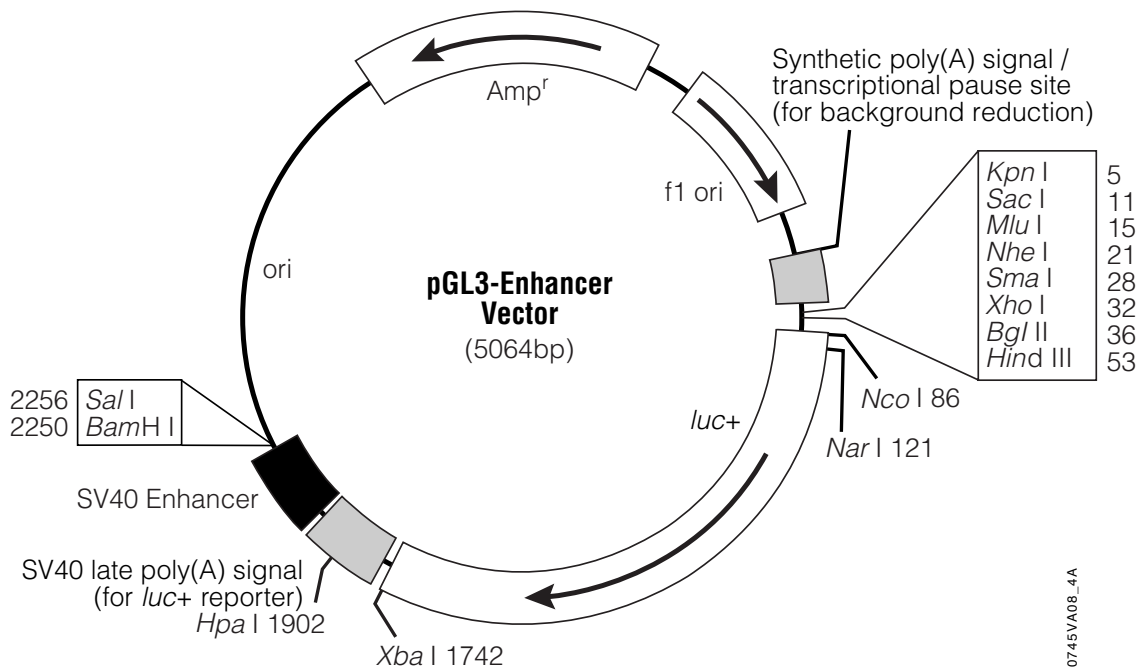


### pGL3-Basic Vektor Sequenz Referenz Punkte:

SV40 Promoter	(-)
SV40 Enhancer	(-)
Multiple cloning region	1–58
Luciferase gene ( <i>luc+</i> )	88–1740
GLprimer2 binding site	89–111
SV40 late poly(A) signal	1772–1993
RVprimer4 binding site	2080–2061
Col E 1-derived plasmid replication origin	2318
$\beta$ -lactamase gene ( <i>Amp<sup>r</sup></i> )	3080–3940
f1 origin	4072–4527
Synthetic poly(A) signal	4658–4811
RVprimer3 binding site	4760–4779

**Abbildung. 7.1.: Plasmidkarte des pGL3-Basic Vektors:** oben: schematische Darstellung der Plasmidkarte; unten: Referenzpunkte des pGL3-Basic Vektors modifiziert aus dem Handbuch „pGL3 Luciferase pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Promega“.

## 7.7.2 pGL3-Enhancer Vektor

**pGL3-Enhancer Vektor Sequenz Referenz Punkte:**

SV40 Promoter	(-)
Multiple cloning region	1-58
Luciferase gene (luc+)	88-1740
GLprimer2 binding site	89-111
SV40 late poly(A) signal	1772-1993
SV40 Enhancer	2013-2249
RVprimer4 binding site	2307-2326
Col E 1-derived plasmid replication origin	2564
$\beta$ -lactamase gene (Amp <sup>r</sup> )	3326-4186
f1 origin	4318-4773
Synthetic poly(A) signal	4904-5057
RVprimer3 binding site	5006-5025

**Abbildung. 7.2.: Plasmidkarte des pGL3-Enhancer Vektors:** oben: schematische Darstellung der Plasmidkarte; unten: Referenzpunkte des pGL3-Basic Vektors modifiziert aus dem Handbuch pGL3 Luciferase pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Promega.

## 7.8 Genotyp Daten der Familien Trios

**Tabelle 14. Genotypisierte Familien Trios im Hapmap-Format.** Mutter (M), Vater (V), Index (I). Individual ID (ID) SNP1, rs1981434; SNP2, rs2854345; SNP3, rs399413; SNP4, rs4151540; SNP5, rs4151551; SNP6, rs2227311; SNP7 rs4151611; SNP8, rs3092904; SNP9, rs4151636.

matID	M.	V.	ID	M/V/I	Ped ID	Trait										
						RB	SNP7	SNP1	SNP5	SNP8	SNP3	SNP4	SNP2	SNP9	SNP6	
M16761	2184	2185	2134	Index	00E0409	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16908	2145	2146	2144	Index	00E0466	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16910	0	0	2146	Vater	00E0466	0		1								
M16911	0	0	2145	Mutter	00E0466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M16920	2138	2137	2136	Index	00E0471	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M16923	0	0	2137	Vater	00E0471	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M16924	0	0	2138	Mutter	00E0471	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M16997	0	0	2157	Vater	00E0494	0					0					
M16998	0	0	2158	Mutter	00E0494	0	0	1		1	1	1	1	1	0	0
M17012	2161	2160	2159	Index	00E0516	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M17013	0	0	2160	Vater	00E0516	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
M17014	0	0	2161	Mutter	00E0516	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
M17178	2175	2174	2173	Index	00E0602	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M17179	0	0	2174	Vater	00E0602	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M17180	0	0	2175	Mutter	00E0602	0		0	1	0	0				2	
M17324	0	0	2184	Mutter	00E0409	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
M17325	0	0	2185	Vater	00E0409	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
M17427	2158	2157	2156	Index	00E0494	1	0	1	1	1	1				0	
M17681	2232	2231	2230	Index	00E0949	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
M17683	0	0	2231	Vater	00E0949	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M17684	0	0	2232	Mutter	00E0949	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
M18966	2390	2391	2389	Index	01E0228	1	1	2	0	1	2	1	0	0	0	0
M18969	0	0	2390	Mutter	01E0228	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
M18970	0	0	2391	Vater	01E0228	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
M19478	2449	2450	2448	Index	01E0547	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M19481	0	0	2449	Mutter	01E0547	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M19482	0	0	2450	Vater	01E0547	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
M19483	2454	2453	2452	Index	01E0548	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
M19486	0	0	2453	Vater	01E0548	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
M19487	0	0	2454	Mutter	01E0548	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
M19493	2460	2459	2458	Index	01E0550	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M19496	0	0	2459	Vater	01E0550	0	0	0						0		
M19497	0	0	2460	Mutter	01E0550	0	0	0		0	0	2	0			0
M19521	2655	2656	2469	Index	01E0564	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M19795	2474	2475	2473	Index	01E0764	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M19797	0	0	2474	Mutter	01E0764	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
M19798	0	0	2475	Vater	01E0764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M19799	2477	2516	2476	Index	01E0765	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M19801	0	0	2477	Mutter	01E0765	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
M19844	2483	2482	2481	Index	01E0788	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
M19846	0	0	2482	Vater	01E0788	0						0	0	0	0	
M19847	0	0	2483	Mutter	01E0788	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
M19912	2495	2496	2494	Index	01E0837	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
M19932	0	0	2495	Mutter	01E0837	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
M19933	0	0	2496	Vater	01E0837	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20006	0	0	2516	Vater	01E0765	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M20008	2500	2501	2499	Index	01E0896	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M20010	0	0	2500	Mutter	01E0896	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
M20011	0	0	2501	Vater	01E0896	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
M20728	2588	2587	2586	Index	01E1380	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20729	0	0	2587	Vater	01E1380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M20730	0	0	2588	Mutter	01E1380	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M20832	2598	2597	2596	Index	01E1443	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0

M20833	0	0	2598	Mutter	01E1443	0	0	2	0	2	2	1	0	0
M20835	0	0	2597	Vater	01E1443	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M20880	0	0	2604	Mutter	02E0014	0	0	1	1	1	1	1	0	1
M20881	0	0	2603	Vater	02E0014	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M20886	2604	2603	2602	Index	02E0014	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M21078	0	0	2637	Mutter	02E0154	0	0	0	0	0	0	0	1	1
M21079	2637	2638	2636	Index	02E0154	1	0	1	0	1	1	1	1	0
M21080	0	0	2638	Vater	02E0154	0	0	2	0	2	2	2	2	0
M21096	2645	2740	2644	Index	02E0168	1	0	0	0	0	0	0	0	2
M21149	2652	2653	2643	Index	02E0202	1	1	1	0	0	1	0	0	1
M21150	0	0	2645	Mutter	02E0168	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M21172	0	0	2652	Mutter	02E0202	0	1	1	0	0	1	0	0	0
M21173	0	0	2653	Vater	02E0202	0	0	0	0	0	0	0	0	2
M21274	0	0	2655	Mutter	01E0564	0	0	0	0	0	0	0	0	2
M21275	0	0	2656	Vater	01E0564	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M21342	0	0	2664	Mutter	02E0337	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M21343	0	0	2663	Vater	02E0337	0	1	2	0	0	1	0	0	0
M21344	2664	2663	2662	Index	02E0337	1	1	2	0	0	1	0	1	0
M21471	0	0	2686	Mutter	02E0419	0	1	1	0	0	1	0	0	1
M21472	2686	2687	2685	Index	02E0419	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M21474	0	0	2687	Vater	02E0419	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M21949	0	0	2740	Vater	02E0168	0	0	1	0	1	1	1	1	0
M22055	0	0	2766	Mutter	02E0801	0	0	0	0	0	0	0	0	2
M22056	0	0	2767	Vater	02E0801	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M22057	2766	2767	2765	Index	02E0801	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M22060	2770	2769	2768	Index	02E0802	1	0	0	0	0	0	1	0	1
M22061	0	0	2770	Mutter	02E0802	0	0	0	0	0	0	1	0	1
M22062	0	0	2769	Vater	02E0802	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M22121	2788	2789	2783	Index	02E0837	1	0	1	1	1	1	0	0	1
M22156	0	0	2788	Mutter	02E0837	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M22157	0	0	2789	Vater	02E0837	0	0	1	0	1	1	1	0	0
M22193	2797	2798	2787	Index	02E0886	1	0	1	0	1	1	1	1	0
M22238	0	0	2797	Mutter	02E0886	0	0	1	0	1	1	1	1	0
M22239	0	0	2798	Vater	02E0886	0	0	1	0	1	1	1	1	0
M22399	0	0	2824	Mutter	02E1028	0	0	0	0	0	0	1	0	1
M22400	0	0	2823	Vater	02E1028	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22401	2824	2823	2822	Index	02E1028	1	0	0	0	0	0	1	0	1
M22587	0	0	2850	Mutter	02E22589	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M22588	0	0	2849	Vater	02E22589	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M22589	2850	2849	2848	Index	02E22589	1	0	0	0	0	0	0	0	2
M22637	2855	2856	2854	Index	02E1188	1	0	1	1	1	1	0	0	0
M22639	0	0	2855	Mutter	02E1188	0	0	1	0	1	1	1	1	0
M22640	0	0	2856	Vater	02E1188	0	0	2	0	2	2	2	0	0
M22677	2862	2863	2853	Index	02E1189	1	0	1	0	1	1	1	1	0
M22678	0	0	2862	Mutter	02E1189	0	1	2	0	1	2	1	1	0
M22679	0	0	2863	Vater	02E1189	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22729	0	0	2870	Mutter	02E1234	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22730	2870	2871	2869	Index	02E1234	1	1	1	0	0	1	0	0	0
M22733	0	0	2871	Vater	02E1234	0	2	2	0	2	2	1	1	0
M22859	2956	2894	2892	Index	02E1318	1	0	1	0	1	1	1	1	0
M22899	0	0	2894	Vater	02E1318	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22987	0	0	2903	Mutter	02E1371	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22988	0	0	2904	Vater	02E1371	0	0	1	0	1	1	1	1	0
M22989	2903	2904	2902	Index	02E1371	1	0	1	2	2	1	1	1	0
M23060	0	0	2918	Mutter	02E1414	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M23060	0	0	2918	Mutter	02E1414	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M23062	0	0	2919	Vater	02E1414	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M23062	0	0	2919	Vater	02E1414	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M23064	2918	2919	2917	Index	02E1414	1	0	0	2	0	0	0	0	0
M23064	2918	2919	2917	Index	02E1414	1	0	0	2	0	0	0	0	0
M23212	0	0	2942	Mutter	03E0070	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M23213	0	0	2941	Vater	03E0070	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M23214	2942	2941	2940	Index	03E0070	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M23261	0	0	2956	Mutter	02E1318	0	0	1	0	1	1	1	1	0









M34454	0	0	4369	Vater	07E0336	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M34455	0	0	4370	Mutter	07E0336	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
M35271	4453	4452	4451	Index	07E0722	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M35275	0	0	4452	Vater	07E0722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M35276	0	0	4453	Mutter	07E0722	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M35383	4473	4472	4463	Index	07E0771	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M35501	0	0	4472	Vater	07E0771	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
M35502	0	0	4473	Mutter	07E0771	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M35825	3836	3835	3829	Index	05E0824	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M36208	4540	4539	4537	Index	07E1055	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M36236	0	0	4539	Vater	07E1055	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
M36237	0	0	4540	Mutter	07E1055	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M36289	4551	4550	4549	Index	07E1090	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M36292	0	0	4550	Vater	07E1090	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M36293	0	0	4551	Mutter	07E1090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M36367	4568	4567	4562	Index	07E1123	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M36399	4574	4573	4564	Index	07E1141	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M36432	0	0	4567	Vater	07E1123	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
M36433	0	0	4568	Mutter	07E1123	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
M36443	0	0	4573	Vater	07E1141	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
M36444	0	0	4574	Mutter	07E1141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M37212	0	0	4639	Vater	08E0181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M37213	0	0	4640	Mutter	08E0181	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
M37407	4640	4639	4638	Index	08E0181	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M37523	4675	4674	4670	Index	08E0273	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M37537	0	0	4674	Vater	08E0273	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
M37538	0	0	4675	Mutter	08E0273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M37706	4693	4692	4691	Index	08E0336	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
M37707	0	0	4692	Vater	08E0336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M37708	0	0	4693	Mutter	08E0336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M38292	4737	4736	4735	Index	08E0476	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M38294	0	0	4736	Vater	08E0476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M38295	0	0	4737	Mutter	08E0476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M38575	4760	4759	4755	Index	08E0597	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
M38648	0	0	4759	Vater	08E0597	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M38649	0	0	4760	Mutter	08E0597	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M38741	4775	4774	4772	Index	08E0666	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M38759	0	0	4774	Vater	08E0666	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
M38760	0	0	4775	Mutter	08E0666	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
M38810	4790	4789	4788	Index	08E0700	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M38811	0	0	4789	Vater	08E0700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M38812	0	0	4790	Mutter	08E0700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M38875	4799	4800	4795	Index	08E0722	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
M38905	0	0	4800	Vater	08E0722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M38906	0	0	4799	Mutter	08E0722	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
M39014	4817	4816	4814	Index	08E0785	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
M39041	0	0	4816	Vater	08E0785	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M39042	0	0	4817	Mutter	08E0785	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M39167	4832	4831	4828	Index	08E0833	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
M39210	0	0	4831	Vater	08E0833	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
M39211	0	0	4832	Mutter	08E0833	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
M39305	0	0	4839	Index	06E0408	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M39477	4864	4865	4854	Index	08E0944	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M39481	4862	4861	4853	Index	08E0943	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M39506	0	0	4862	Mutter	08E0943	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M39509	0	0	4865	Vater	08E0944	0	0	1		1	1	1	1		0
M39510	0	0	4864	Mutter	08E0944	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M40026	4917	4915	4916	Index	08E1165	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M40030	0	0	4915	Vater	08E1165	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M40031	0	0	4917	Mutter	08E1165	0					1				
M41067	4931	4930	4929	Index	09E0027	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M41141	0	0	4930	Vater	09E0027	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M41142	0	0	4931	Mutter	09E0027	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
M41837	4974	4973	4969	Index	09E0324	1	0	1	0	1	1	1	1	0	

---

M41926	0	0	4973	Vater	09E0324	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M41927	0	0	4974	Mutter	09E0324	0						2			

---

## **Danksagung:**

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Dietmar Lohmann für das interessante Thema, dass ich bearbeiten durfte. Vielen Dank für die interessanten Unterhaltungen während meiner Tätigkeit im Institut, aber auch für die hilfsbereiten Ratschläge. Auch bedanke ich mich dafür, dass mir die Möglichkeit geboten wurde an nationalen und internationalen Tagungen unsere Ergebnisse zu präsentieren zu können. Ebenso bedanke ich mich für dir vielen interessanten Gespräche, die über den wissenschaftlichen Rahmen hinaus führten, so dass ich immer „up to date“ in Bezug auf die neuesten technologischen Errungenschaften (Soft-und Hardware) war, und für den TX70 von AIWA. Danke!

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke, der mich in seinem Labor und innerhalb seiner Gruppe freundlich empfangen hat und für seine wissenschaftliche Betreuung.

Dank geht auch an Frau Dr. Karin Buiting und Herrn Dr. Michael Zeschnigk für die wissenschaftlichen Ratschläge und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine schöne Arbeitsatmosphäre und für eine gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei allen Kolleginnen aus dem R13 Labor bedanken, die mich seit Tag Eins warm empfangen und in allen Anstrengungen unterstützt haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten. Besonders danke ich Saskia Seland für die Interpretation von Sequenzen und Injektionszeit-Ratschläge sowie für die unerwarteten Kinderriegel auf meiner Tastatur. Ebenfalls möchte ich mich herzlichst bei Birgit Anspreger für den musikalischen Austausch und aufmunternde Worte während der Arbeit bedanken. Vielen herzlichen Dank geht auch an Inga Nowak, die mir oft technisch unter die Arme bei der schier endlos scheinenden hnRNA Isolation gegriffen hat, und uns leider zu früh verlassen hat. Auch danke ich sehr herzlich Tea Berulava für den sehr interessanten Austausch von wissenschaftlichen Fragestellungen und Kaugummis sowie die aufmunternden Ritter-Sport Schokoladen.

Besonderen Dank geht an Michaela Wawrzik und Nicholas Wagner, die zu jeder Zeit Ratschläge, Süßigkeiten und ein offenes Ohr für mich hatten. Danke sehr!

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Größten Dank geht an Berit Schneider für die immerwährende Unterstützung im Laufe der Promotion.

## Lebenslauf

Name **Tobias Schopen**  
Anschrift Albersloherweg 5  
48155 Münster  
Deutschland  
Geburtsdatum 12.09.1978  
Geburtsort Bielefeld  
Familienstand ledig

---

05/2010 - **diagenos**, Osnabrück  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ DNA-Diagnostik

### **Akademische Bildung:**

02/2006- 02/2010 **Universität Duisburg-Essen**, Essen  
Doktorand der Biologie am Institut für Humangenetik als Teil der  
Klinischen Forschergruppe: „Ophthalmologische Onkologie und  
Genetik“.

10/1999 – 07/2005 **Westfälische Wilhelms Universität**, Münster  
Diplom in Biologie mit Schwerpunkt Molekulargenetik  
Abschluss: Juli 2005

Zensur: 1,6

- Diplomarbeit: Note 1,3
- Kolloquien: Note 2,0

### **Zivildienst:**

1998 – 1999 Elisabeth Krankenhaus, Gütersloh

### **Schulausbildung:**

1990 – 1998 **Gymnasium Verl**, Gemeinde Verl  
Abschluss: Abitur

1986 – 1990 **Grundschule Grosse Heide**, Friedrichsdorf (Kreis Gütersloh)

Münster, Juni 2010

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Genetische Modifikation der Disposition zum Retinoblastom: Aufklärung der Rolle allelspezifischer Unterschiede der Expression mutierter und normaler *RBI*-Allele.“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Tobias Schopen befürworte.

Essen, Juni 2010 \_\_\_\_\_

Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/  
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen  
(Herr Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, Juni 2010 \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden  
(Tobias Schopen)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, Juni 2010 \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden  
(Tobias Schopen)