



Zentrum für Humangenetik

„NACHWEIS DER EXPRESSION VON HMGB1 UND HMGA2 ZUR ANWENDUNG IN DER TUMOR- UND PRÄNATALDIAGNOSTIK“

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen

vorgelegt von
Nina Winter

Bremen, 22.05.2012

-
1. Gutachter: Prof. Dr. Jörn Bullerdiek
 2. Gutachter: PD Dr. Burkhard M. Helmke

„Hiermit erkläre ich, Nina Winter, geboren am 10. Dezember 1979 in Stadthagen, dass für das Verfassen der vorliegenden Dissertation mit dem Titel **„Nachweis der Expression von HMGB1 und HMGA2 zur Anwendung in der Tumor- und Pränataldiagnostik“** folgende drei Aussagen zutreffen:“

1. Ich habe die Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt.
2. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.
3. Ich habe die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Bremen, den 29.03.2012

(Nina Winter)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Probenmaterial und Zelllinien	10
2.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	11
2.3	Real-Time PCR	11
2.4	Proteinanalysen.....	12
2.5	Chromatin Immunopräzipitation.....	13
2.6	Klonierung und Sequenzierung	15
3	ERGEBNISSE	16
3.1	Publikation I: Chromatin immunoprecipitation to analyze DNA binding sites of HMGA2 (Winter <i>et al.</i> , 2011).....	16
3.2	Publikation II: Elevated levels of HMGB1 in cancerous and inflammatory effusions (Winter <i>et al.</i> , 2009).....	27
3.3	Quantitative Expressionsanalyse des <i>HMGA2</i> -Gens in Aszites und Pleurapunktaten.....	34
3.4	Publikation III: Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2 - implications for noninvasive prenatal diagnosis (Winter <i>et al.</i> , 2008)	36
3.5	Quantitative Expressionsanalyse des <i>HMGA2</i> -Gens in Urinproben von schwangeren Frauen	43
4	DISKUSSION	44
4.1	HMGA2-Bindestellen	44
4.2	Expression von HMGB1 und HMGA2 in Exsudaten	48
4.3	HMGA2 in der Pränataldiagnostik.....	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	SUMMARY	58
7	LITERATURVERZEICHNIS	60
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
	DANKSAGUNG	84
	PUBLIKATIONEN I-III	85

1 EINLEITUNG

Die Regulation von Genen im eukaryotischen Organismus ist ein komplexer Prozess, der es erforderlich macht, die Faktoren der Gentranskription in seinen Einzelheiten zu betrachten. Die Voraussetzung für das Verständnis von zellulären Abläufen wie Zellproliferation, Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen, aber auch der Dysregulation durch Protoonkogene, liegt in der Untersuchung von Genexpression und -aktivierung. Die DNA liegt im Zellkern immer Protein-assoziiert als Chromatin vor. Die Mehrheit dieser Proteine, die zur Verpackung der DNA dienen, sind Histone, am zweithäufigsten sind die stark konservierten High-Mobility-Group-Proteine (HMG-Proteine) vorhanden, welche reversibel an das Chromatin binden (Bianchi *et al.*, 2005). Sie spielen bei der Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur eine wichtige Rolle. Alle haben die Eigenschaft Konformationsänderungen des Chromatins hervorzurufen, wodurch sie strukturelle, aber auch regulative Aufgaben in der Zelle übernehmen. Durch ihre Bindung können sie die Struktur der DNA so verändern, dass DNA-abhängige Prozesse unterstützt oder reprimiert werden (Wolffe, 1994; Bustin *et al.*, 1996). Es handelt sich bei den HMG-Proteinen um architektonische Transkriptionsfaktoren, die nach ihren charakteristischen Bindungsdomänen in drei Gruppen unterteilt werden, dazu gehören HMGN, HMGB und HMGA (Goodwin *et al.*, 1973).

Die Untergruppe der ubiquitär exprimierten HMGN-Proteine zeichnet sich durch eine zentrale Domäne von etwa 30 Aminosäuren aus. HMGN lagert sich mit dieser Nukleosomenbindungsdomäne sequenzunabhängig an das Chromatin an, was zu einer aufgelockerten, offenen Chromatinstruktur führt, wodurch die Transkription und Replikation erleichtert wird (Crippa *et al.*, 1992).

Zur Subfamilie der HMGB-Proteine gehören HMGB1, HMGB2 und HMGB3, von denen HMGB1 das am besten charakterisierte Protein ist. Lokalisiert ist das entsprechende Gen in der chromosomalen Region 13q12-13. Es kodiert für ein Protein mit zwei DNA-Bindungsdomänen, die A-Box und die B-Box, die aus jeweils ca. 80 Aminosäuren bestehen, sowie einem sauren C-Terminus (Bianchi *et al.*, 1992; Ferrari *et al.*, 1996). Die strukturspezifische Bindung von HMGB1 an die kleine Furche der DNA bewirkt eine Biegung, wodurch sich andere Transkriptionsfaktoren leichter an ihre Zielsequenz anlagern können. Durch diese Interaktionen können HMGB-Proteine direkt die Transkription von Genen positiv oder negativ beeinflussen

(Agresti *et al.*, 2003). HMGB1 agiert allerdings nicht nur intrazellulär als architektonischer Transkriptionsfaktor, es kann auch passiv oder aktiv von Zellen als körpereigener Alarmstoff sezerniert werden (Ulloa *et al.*, 2006). Passiv gelangt es durch die defekte Membran von beschädigten oder nekrotischen Zellen in das umgebende Gewebe und ruft dort eine entzündliche Reaktion hervor, wodurch Reparaturprozesse eingeleitet werden (Scaffidi *et al.*, 2002). Dabei dient HMGB1 als Marker für das Immunsystem, der anzeigt, in welchem Ausmaß eine Verletzung des Gewebes vorliegt. Durch dieses Signal werden Monozyten und Leukozyten stimuliert, diese entfernen Zelltrümmer und bekämpfen mögliche Pathogene. Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen setzen apoptotische Zellen kein HMGB1 frei, hier bleibt das Protein fest an die DNA gebunden (Ulloa *et al.*, 2006). Aktiv wird HMGB1 als Immunantwort von Monozyten und Makrophagen nach Stimulation durch andere proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktoren (TNF), Interleukine (IL) oder Endotoxine, abgegeben (Wang *et al.*, 2001). Die Ausschüttung von HMGB1 aktiviert die Rezeptoren RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products), TLR2 oder TLR4 (Toll-Like Receptor 2 und 4) und initiiert dadurch den Nuclear Factor- κ B- (NF- κ B) und den MAP-Kinase-Signalweg. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden spielt eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen, bei der Angiogenese und in der Tumorentwicklung (Hori *et al.*, 1995; Yamagishi *et al.*, 1997; Taguchi *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2002). HMGB1 ist in allen Körperzellen nachweisbar, allerdings steht eine Überexpression in Zusammenhang mit der Entwicklung verschiedener Neoplasien (Bustin, 1999). Wenn HMGB1 dabei als unkontrollierter Transkriptionsfaktor agiert, kann es zu einer veränderten Aktivierung der Zielgene kommen. Durch diesen gestörten Mechanismus wird unter anderem der Tumornekrosefaktor- β hochreguliert, was die Entwicklung von Tumoren und Metastasen zur Folge hat (Ulloa *et al.*, 2006). In Fällen von Brustkrebs (Flohr *et al.*, 2001; Brezniceanu *et al.*, 2003), Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Choi *et al.*, 2003), malignen Lymphomen (Meyer *et al.*, 2008), Leberzellkarzinomen (Cheng *et al.*, 2008) und kolorektalen Adenokarzinomen (Xiang *et al.*, 1997) wurde eine erhöhte HMGB1-Expression dokumentiert. Die Rolle des extrazellulären HMGB1 bei der Entstehung von Malignomen ist bisher noch nicht ausreichend geklärt. Es wird angenommen, dass ein Zusammenspiel von HMGB1 und RAGE besteht, denn eine Überexpression dieser beiden Gene konnte in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Ulloa *et al.*, 2006).

Zur Untergruppe der HMGA-Familie gehören die Proteine HMGA1a, HMGA1b, und HMGA1c, die durch alternatives Spleißen der *HMGA1*-mRNA entstehen, sowie das HMGA2-Protein, welches durch ein eigenes Gen kodiert wird (Johnson *et al.*, 1989; Friedmann *et al.*, 1993). *HMGA2* ist in der chromosomalen Region 12q14-15 lokalisiert und besitzt die zwei Spleißvarianten HMGA2a und HMGA2b (Chau *et al.*, 1995; Schoenmakers *et al.*, 1995; Hauke *et al.*, 2002). Das funktionale Motiv des HMGA2-Proteins besteht aus drei stark konservierten AT-Hooks, mit denen es mit hoher Affinität an die kleine Furche AT-reicher DNA-Abschnitte bindet (Solomon *et al.*, 1986; Reeves *et al.*, 1990; Chau *et al.*, 1995). Bereits 1996 konnten Maher und Nathans zeigen, dass für diese hochaffine Bindung von HMGA2 zwei bis drei separierte AT-Bereiche in der Zielsequenz notwendig sind (Maher *et al.*, 1996). Erst kürzlich wurden in einer SELEX-Studie (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) außerdem zwei 15 bp lange Konsensussequenzen (5'-ATATTCGCGAWWATT-3' und 5'-ATATTGCGCAWWATT-3' (W: A oder T)) identifiziert, an deren Sequenzmuster HMGA2 mit höchster Affinität bindet. Besteht dieser Abschnitt ausschließlich aus AT-Basen, ist die Bindungsaffinität von HMGA2 an die Sequenz fünfmal schwächer (Cui *et al.*, 2007). Es bleibt allerdings ungeklärt, ob diese optimale Bindung auch *in vivo* nachweisbar ist, denn dort liegt die DNA als Chromatin vor, und zusätzlich können Protein-Protein-Interaktionen die Bindung beeinflussen.

Neben den drei positiv geladenen AT-Hooks besitzen die HMGA2-Proteine in ihrer C-terminalen Domäne eine große Anzahl saurer Aminosäuren. Die Funktion dieses Bereichs ist bis heute nicht eindeutig geklärt, aber vermutlich werden durch Phosphorylierung dieser Domäne posttranslationale Modifikationen induziert, die sich auf die Bindungsaktivität des HMGA2-Proteins auswirken können. Außerdem scheint HMGA2 mit einem phosphorylierten C-Terminus eine kompaktere Form anzunehmen, wodurch das Protein für Enzyme schwerer zugänglich ist (Chau *et al.*, 1995; Maurizio *et al.*, 2011). Die Anlagerung von HMGA-Proteinen an die DNA verursacht strukturelle Modulationen der Chromatin-Struktur, wie Krümmung, Streckung, Endwindung und Supercoils (Falvo *et al.*, 1995; Chase *et al.*, 1999; Bagga *et al.*, 2000; Slama-Schwok *et al.*, 2000). Diese Konformationsänderungen ermöglichen die Rekrutierung weiterer Chromatinproteine und somit die Bildung von Transkriptions- und Enhanceosomenkomplexen. Durch die spezifische Bindung von HMGA2 an Promotorregionen kommt es zur transkriptionellen Aktivierung oder

Inhibierung bestimmter Gene (Thanos *et al.*, 1995; Klein-Hessling *et al.*, 1996; Zentner *et al.*, 2001).

Die Expression von HMGA2 ist größtenteils auf die Embryonalentwicklung beschränkt, eine Re-Expression in adulten Zellen tritt häufig bei neoplastischen Transformationen auf (Rogalla *et al.*, 1996; Gattas *et al.*, 1999; Sgarra *et al.*, 2009). In benignen Tumoren sind chromosomale Rearrangierungen die Hauptursache für eine erhöhte HMGA2-Expression. Durch diese Translokationen entstehen *HMGA2*-Fusionsgene oder trunkierte Varianten, die einer veränderten Expressionsregulation unterliegen (Schoenmakers *et al.*, 1995; Kazmierczak *et al.*, 1996; Borrmann *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2007). Ein Grund dafür ist die fehlende Bindestelle für die miRNA *let-7* in der 3'-UTR, die normalerweise zu einer posttranskriptionellen Regulierung der *HMGA2*-Expression oder dem Abbau der mRNA führt. Da aber aufgrund der fehlenden Bindestellen keine Regulierung durch *let-7* erfolgen kann, entstehen funktionale Varianten von HMGA2, die intakt sind und an die DNA binden können, so dass eine unkontrollierte Proliferation der Zellen die Folge ist (Fusco *et al.*, 2007). In der normalen Entwicklung kommt es zu einer vermehrten Expression von *let-7* in der späten fetalen und adulten Phase. Die dadurch induzierte Reprimierung von *HMGA2* führt zu einer Differenzierung der Zellen (Nishino *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu den benignen Neoplasien scheinen bei malignen Tumoren genregulatorische Mechanismen eine Rolle bei der Reaktivierung der *HMGA2*-Expression zu spielen. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei malignen Tumoren wie dem Bronchialkarzinom (Sarhadi *et al.*, 2006), dem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Miyazawa *et al.*, 2004) und dem Mammakarzinom (Langelotz *et al.*, 2003) der Grad der Malignität sowie die Metastasierungsneigung mit einem Anstieg der *HMGA2*-Expression korrelieren (Miyazawa *et al.*, 2004; Chiappetta *et al.*, 2008). Weiterhin konnte in Versuchen von Fedele *et al.* gezeigt werden, dass transgene Mäuse, bei denen *HMGA2* durch einen Promotor hochreguliert wurde, eine Reihe verschiedener Tumoren ausbildeten (Fedele *et al.*, 2002). Eine Blockierung der Protein-Synthese von HMGA2 hingegen unterdrückt das Wachstum Virus-induzierter Schilddrüsentumoren (Berlingieri *et al.*, 1995).

HMGA2 spielt auch bei der Stammzellerneuerung eine wichtige Rolle. Mesenchymale Stammzellen sind in allen adulten Organen vorhanden. Sie sind der Ausgangspunkt für die Geweberegeneration, denn sie besitzen das Potential zu proliferieren und sich in unterschiedlichste differenzierte Zellen zu entwickeln. Ist eine

Zellerneuerung erforderlich, wird die ruhende Stammzelle durch HMGA2 aktiviert (Morrison *et al.*, 1997). Mit zunehmendem Alter der Stammzellen kommt es zu einer verringerten HMGA2-Expression, die invers mit einer p14^{arf}- und p16^{ink4a}-Expression korreliert. Man spricht bei p14^{arf} und p16^{ink4a} auch von Tumorsuppressorgenen, denn kommt es zu einer Überexpression von HMGA2, aktivieren diese Gene im Normalfall einen Schutzmechanismus, der eine unkontrollierte Zellerneuerung verhindert (Nishino *et al.*, 2008; Markowski *et al.*, 2011). Bei malignen Tumoren sind diese Gene allerdings häufig inaktiviert (Caca *et al.*, 2002).

Um einen Überblick über die genregulatorischen Mechanismen der HMG-Proteine zu erhalten, sollten in der vorliegenden Arbeit HMGA2-Bindestellen mittels Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) charakterisiert werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, bestimmte DNA-bindende Proteine zu detektieren, die Besetzung von Genpromotoren *in vivo* zu untersuchen und somit einen Einblick in die Expressionsregulation bestimmter Gene zu erhalten (Solomon *et al.*, 1988; Weinmann *et al.*, 2002). Die DNA liegt im Zellkern Protein-assoziiert als Chromatin vor und wird bei Bedarf transkribiert. Dies erfolgt durch Transkriptionsfaktoren, die sich an bestimmte DNA-Abschnitte anlagern. Mit Hilfe der ChIP kann diese Momentaufnahme der Protein-DNA-Bindung festgehalten und untersucht werden (Aparicio *et al.*, 2005). Der Vorteil gegenüber anderen Verfahren *in vitro* wie dem DNase I Footprinting oder der SELEX-Methode (Galas *et al.*, 1978; Ellington *et al.*, 1990; Tuerk *et al.*, 1990) ist die reversible Fixierung von Proteinen und DNA durch Formaldehyd in lebenden Zellen (Wells *et al.*, 2002). Das Formaldehyd sorgt für eine kovalente Vernetzung von Proteinen und DNA sowie von Proteinen untereinander, sodass die Struktur während der ChIP erhalten bleibt (Orlando, 2000). Nach dem Fixieren der Proteine mit der DNA, dem sogenannten Crosslinking, werden die Zellen zerstört und das Chromatin mittels Ultraschall in Stücke von einigen hundert Basenpaaren Länge fragmentiert. Die DNA-Abschnitte, an die das Zielprotein gebunden hat, werden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert und dadurch selektiert. Nach Lösung der DNA-Protein-Komplexe werden die isolierten DNA-Fragmente untersucht. Erstmals entwickelt und beschrieben wurde diese Methode von Solomon *et al.* und im Laufe der Jahre immer weiterentwickelt (Solomon *et al.*, 1988). Heute findet sie häufig Verwendung in Kombination mit quantitativer PCR, Klonierung und Sequenzierung, Microarray-Technologie (ChIP-on-

Chip) oder Second-Generation-DNA-Sequencing (ChIP-Sequencing) (Weinmann *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2006; Ponzielli *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009).

Durch die Charakterisierung *in vivo* können einerseits bekannte DNA-Abschnitte untersucht und andererseits neue, bisher unbekannte Bindestellen identifiziert werden. Weiterhin können mit dieser Methode nicht nur Proteine, die direkt an die DNA binden, erfasst werden, sondern auch solche, die in einem Transkriptionskomplex agieren (Orlando, 2000).

Neue Erkenntnisse über das Bindungsverhalten der HMG-Proteine an das Chromatin können auch für die Tumordiagnostik von Bedeutung sein. Um Diagnosen, Prognosestellung und Therapieplanung von Patienten zu optimieren, ist die Etablierung von neuen Biomarkern als Ergänzung zu den bekannten Standardmethoden erforderlich. Es liegen zahlreiche Studien vor, die das Potential von HMG-Proteinen als Tumormarker bereits bestätigt haben, wobei die Expression meist in Gewebe- oder Blutproben bestimmt wurde (Rommel *et al.*, 1997; Langelotz *et al.*, 2003; Miyazawa *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Expression von HMGB1 und HMGA2 erstmals in Pleura- und Aszitesflüssigkeiten untersucht werden.

Der Pleuraspalt befindet sich zwischen der *Pleura visceralis* (Lungenfell) und der *Pleura parietalis* (Rippenfell) und enthält normalerweise eine Flüssigkeitsmenge von 6 ml. Durch das Zusammenspiel von hydrostatischem und kolloidosmotischem Druck wird diese normalerweise konstant gehalten (Ayvazian, 1977). Liegt eine Störung dieses Gleichgewichtes vor, kann ein Pleuraerguss mit Flüssigkeitsansammlungen von bis zu 1,5 Litern die Folge sein (Villena *et al.*, 2000). Die Hauptursache dafür sind entzündliche oder maligne Erkrankungen wie Pneumonie oder das Bronchialkarzinom (Marel *et al.*, 1995).

Bei dem Aszites handelt es sich ebenfalls um eine pathologische Vermehrung von Flüssigkeit, die sich in der freien Peritonealhöhle zwischen den Organen sammelt. Häufigste Ursache ist ein Stauungserguss aufgrund einer dekompensierten Leberzirrhose (>80%) (Runyon, 2004).

Wichtig bei der Diagnose von Ergüssen ist die Differenzierung zwischen Transsudaten und Exsudaten, da in der Regel nur Exsudate weiter intensiv behandelt werden müssen. Das Transsudat entspricht nicht-resorbierter, gestauter Flüssigkeit, häufig hervorgerufen durch Herz- oder Niereninsuffizienz sowie

Leberzirrhose. Exsudate entstehen durch Infektionen, Tumoren oder Autoimmunkrankheiten. Fast die Hälfte aller Exsudate zeigt eine maligne Genese, verursacht durch Bronchial- und Mammakarzinome sowie Lymphome (Marel *et al.*, 1995; Antunes *et al.*, 2003). Die Zuordnung des jeweiligen Ergusses erfolgt bis heute weltweit nach den Light-Kriterien. Dabei wird bei einer Punktion gewonnenes Material auf den Gehalt von Eiweiß und Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht. Obligat erfolgen bakterielle und zytologische Bestimmungen. Wird bei der Eiweiß- und LDH-Messung mindestens ein Light-Kriterium erfüllt (Erguss-Eiweiß/Serum-Eiweiß $>0,5$; Erguss-LDH/Serum-LDH $>0,6$; Erguss-LDH $>2/3$ des Serumnormalwertes), liegt ein Exsudat vor (Light *et al.*, 1972). Diese Unterteilung der Ergüsse in Transsudate und Exsudate ist umstritten, denn die Light-Kriterien weisen zwar eine Sensitivität von 95% auf, aber nur eine Spezifität von 78%. Dadurch wird fast ein Viertel der Patienten mit einem Transsudat einer unnötigen und möglicherweise falschen Therapie unterzogen (Valdes *et al.*, 1991; Heffner *et al.*, 1997; Light, 1997). Weitaus kritischer ist allerdings das Ergebnis einer neueren Studie zu bewerten, bei der über 11% der malignen Ergüsse durch die Klassifizierung nach den Light-Kriterien nicht als solche erkannt, sondern als Transsudat klassifiziert wurden (Gonlugur *et al.*, 2008). Um die Diagnosefehler zu minimieren, ist es wichtig zuverlässigere Unterscheidungsparameter für Transsudate und Exsudate zu etablieren. Zudem ist auch die Differenzierung von entzündlichen und malignen Ergüssen nicht immer eindeutig möglich (Heidari *et al.*, 2007). Zytologische Untersuchungen sind dabei unumgänglich, allerdings ist die Trefferquote stark abhängig von der Menge an Tumorzellen im punktierten Material, der Qualität und Anzahl der Präparate und letztlich auch von der Erfahrung des Pathologen (Antonangelo *et al.*, 2007).

In der embryonalen Entwicklung übernimmt HMGA2 hauptsächlich Aufgaben der Proliferation und zellulären Differenzierung, wobei es abundant in nahezu allen Geweben des Fetus exprimiert wird (Rogalla *et al.*, 1996). Bisherige Studien zur HMGA2-Expression beschränkten sich auf die Untersuchung des embryonalen Gewebes sowie Plazenta- und Chorionzottenzellen (Rogalla *et al.*, 1996; Hirling-Folz *et al.*, 1998; Gattas *et al.*, 1999). In dieser Arbeit sollte erstmals die Expression von HMGA2 in Zellen des Fruchtwassers und Urins von Schwangeren quantitativ bestimmt und die Ergebnisse in Hinblick auf neue Anwendungsmöglichkeit in der Pränataldiagnostik analysiert werden.

Die Überwachung der Schwangerschaft durch Ultraschallscreening ist die am häufigsten eingesetzte Methode in der nicht-invasiven Pränataldiagnostik. Mit ihr können Auffälligkeiten während der Schwangerschaft entdeckt und diese gegebenenfalls mit weiteren Tests abgeklärt werden. Bei der im Ultraschall gemessenen Nackenfaltentransparenz kann eine vorläufige Aussage über Chromosomendefekte getroffen werden. Ergänzt wird diese Methode häufig durch eine Blutuntersuchung der Mutter, bei der die Konzentration bestimmter Schwangerschaftshormone gemessen wird. Diese Werte werden dann mit dem Alter der Schwangeren und der Schwangerschaftsdauer in Verbindung gebracht, um das individuelle Risiko statistisch zu ermitteln (Kagan *et al.*, 2008). Besteht der Verdacht auf eine Fehlbildung, Organerkrankung oder Chromosomenaberration des Fetus, erfolgt ein invasiver Eingriff in Form von Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie. Die so gewonnenen Amnionzellen werden kultiviert und einer Chromosomen- und DNA-Analyse unterzogen (Stranc *et al.*, 1997). Ursprung dieser Zellen ist die Haut, sowie der Magen-Darm- und Urogenitaltrakt des Fetus (Mann *et al.*, 1996). Das Fruchtwasser enthält neben den intakten Zellen auch freie fetale DNA (Bianchi *et al.*, 2001), deren Typisierung immer mehr an Bedeutung in der Analyse des fetalen Genoms gewinnt. Untersuchungen an freier DNA aus dem Fruchtwasser haben gezeigt, dass mit Hilfe der Microarray-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (Array-CGH) zuverlässig alle numerischen Chromosomenanomalien des Fetus detektiert werden konnten (Larrabee *et al.*, 2004; Lapaire *et al.*, 2007).

Eine neue Entwicklung in der Pränataldiagnostik ermöglicht die Entdeckung von fetalen Zellen im mütterlichen Blutkreislauf (Lo, 1994). Bisher ist eine geeignete Methode zur Separierung dieser Zellen von denen der Mutter allerdings noch nicht etabliert (Bischoff *et al.*, 2002). Vielversprechender erweist sich die Untersuchung zellfreier fetaler DNA, die erstmals von Lo *et al.* (1997) im mütterlichen Blut detektiert werden konnte (Lo *et al.*, 1997). Ein Vorteil gegenüber intakten fetalen Zellen ist, dass zellfreie, zirkulierende DNA in viel höherer Konzentration im Blutkreislauf der Mutter zu finden ist (Bischoff *et al.*, 2002). Die freie DNA stammt in erster Linie von apoptotischen Zellen. Während des programmierten Zelltodes wird die DNA fragmentiert und in apoptotische Vesikel verpackt, wodurch sie geschützt ist und stabil bleibt (Nagata, 2000; Bischoff *et al.*, 2005). Der Anteil der fetalen DNA an der gesamten freien DNA im Blut beträgt allerdings nur 3,4-6,2% (Lo *et al.*, 1998). Dadurch werden die Untersuchungsbedingungen eingeschränkt, denn es kommt zu

einer Überlagerung des Signals durch die mütterliche, zellfreie DNA. Aus diesem Grund konzentrieren sich die meisten Studien auf Allele, welche nicht im mütterlichen Genom vorhanden sind. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Geschlechtsbestimmung aus dem Blut der Mutter mit Y-Chromosom-spezifischen Markern möglich ist (Al-Yatama *et al.*, 2001; Sekizawa *et al.*, 2001). Auch die Abklärung des Rhesus-Faktors des Fetus ist mit Hilfe der zellfreien DNA aus dem Blut möglich (Lo *et al.*, 1998). Als schwieriger hingegen erweist sich die Untersuchung von zellfreier fetaler DNA in Urinproben der Mutter. Nur in durchschnittlich 35% der Proben konnte die geschlechtsspezifische DNA des Fetus detektiert werden (Al-Yatama *et al.*, 2001; Majer *et al.*, 2007). Aussichtsreicher könnte eine gezielte Anreicherung fetaler DNA aus Blut- oder Urinproben sein. Ein Ansatzpunkt ist die Auftrennung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese (Jorgez *et al.*, 2009), denn fetale DNA ist mit weniger als 300 bp wesentlich kürzer als die maternale, freie DNA (Chan *et al.*, 2004). Bisher ist allerdings nicht bestätigt, ob mit dieser Methode ausreichend Material zur Verfügung steht, um chromosomale oder genetische Veränderungen zuverlässig zu detektieren (Lo, 2008).

Wie eingangs beschrieben, spielen die HMG-Proteine eine entscheidende Rolle im Wachstum und in der Entwicklung von Tumoren, sowie bei der Aktivierung der Immunabwehr. Zum besseren Verständnis dieser Mechanismen war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung von HMGA2-Bindestellen und deren Lokalisation im humanen Genom mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation. Außerdem sollte in einer Studie die Expression der Proteine HMGB1 und HMGA2 in Aszites- und Pleuraflüssigkeiten von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen bestimmt werden. Diese Ergebnisse sollten in Bezug auf ihren Einsatz in der Tumordiagnostik beleuchtet werden.

Da das HMGA2-Protein wichtige Funktionen in der embryonalen Entwicklung besitzt, sollte die Expression von *HMGA2* in Fruchtwasser- und Urinproben von Schwangeren untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte eine neue Methode der ChIP vorgestellt werden, mit der gezielt zellfreie fetale DNA aus dem Fruchtwasser angereichert werden kann. Hierbei wurde das Ziel verfolgt, anhand dieses neuartigen diagnostischen Zugangs ein nicht-invasives Verfahren für eine molekulargenetische Diagnostik zu entwickeln.

2 MATERIAL UND METHODEN

Eine detaillierte Beschreibung der Methoden ist in den Publikation I-III zu finden, zusätzliche Informationen werden in diesem Kapitel gegeben.

2.1 Probenmaterial und Zelllinien

Die Urin- und Fruchtwasserproben wurden vom Zentrum für Humangenetik der Universität Bremen und von Dr. A. Neumann, Praxis für Pränatalmedizin am Klinikum Links der Weser in Bremen, bereitgestellt. Die Pleura- und Aszitespunktate wurden von Dr. D. Krisponeit, Zentrum für Innere Medizin, Hämatologie und Onkologie am Klinikum Bremen Mitte, entnommen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Forderungen der Deklaration von Helsinki wurden erfüllt, alle Patienten und Testpersonen wurden über die Studien aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung vor der Probenentnahme.

Folgende humane Zelllinien und Gewebeproben wurden für die Untersuchungen vom Zentrum für Humangenetik der Universität Bremen bereitgestellt:

Ad211	SV40 transfizierte pleomorphe Adenom-Zelllinie
FRO	anaplastische Schilddrüsenkarzinom
FTC133	follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie
FTC238	follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie
HCT116	Kolonkarzinom-Zelllinie
Li14	SV40 transfizierte Lipom-Zelllinie
MCF7	Mammakarzinom-Zelllinie
MM31	Myometrium (Gewebe)
MRIH186	Zervixkarzinom-Zelllinie
MRIH196	Zervixkarzinom-Zelllinie
MRIH215	Zervixkarzinom-Zelllinie
NB4	akute Promyelozyten Leukämie
supT1	Lymphom-Zelllinie
TPC1	papilläre Schilddrüsenkarzinom
WRO	follikuläre Karzinom-Zelllinie

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640, TC 199 oder McCoy's 5A Medium, versetzt mit 10% oder 20% fetalem Kälberserum. Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.

2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Isolierung der RNA aus Urin- und Fruchtwasserproben wurde das Zymo Research Urine RNA Isolation Kit (HIS Diagnostics, Freiburg) verwendet. Die Isolierung von RNA aus Zellkulturflaschen wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kit for Isolation of Total RNA from Heart, Muscle and Skin Tissue (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

In der cDNA-Synthese wurden 250 ng RNA mit Hilfe von 200 U M-MLV Reverse-Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) und 150 ng Random-Primer nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

2.3 Real-Time PCR

2.3.1 Quantitative Real-Time PCR

Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte mit dem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System und dem Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt). Für die Detektion von *HMGA2* wurde ein kommerziell erhältlicher Genexpressions-Assay (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Als endogene Kontrolle dienten 18S rRNA (Sonde: 5'-6-FAM-TGC CAG CAG CCG C-MGB-3', forward Primer: 5'-GGA TCC ATT GGA GGG CAA GT-3', reverse Primer: 5'-AAT ATA CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3') (Antonov *et al.*, 2005) oder *HPRT* (Hypoxanthin Phosphoribosyl-Transferase) (Sonde: 5'-6- FAM-CAA GCT TGC TGG TGA AAA GGA CCC C-TAMRA-3', forward Primer: 5'-GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG TCA A-3', reverse Primer: 5'-GTC TGG CTT ATA TCC AAC ACT TCG T-3') (Specht *et al.*, 2001). Die Quantifizierung wurde für alle Messungen in 96-Well Platten mit je 2 µl cDNA durchgeführt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde ein Temperaturprofil von 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, gefolgt von der Amplifikation in 50 Zyklen für 15 s bei 95°C und dem Annealing-/Elongationsschritt für 60 s bei 60°C verwendet. Die Proben wurden dreifach bestimmt und alle Messungen beinhalteten Negativ-Kontrollen ohne Template sowie Kontrollen ohne Reverse-Transkriptase.

2.3.2 Real-Time PCR mit genomischer DNA

Um die Anreicherung der DNA-Fragmente aus der Chromatin Immunopräzipitation mit den potentiellen HMGA2-Bindestellen zu bestimmen, wurde eine Real-Time PCR-Messung mit genomischer DNA durchgeführt. Dazu wurden 2-3 µl der ChIP-Proben in die PCR eingesetzt und die Amplifikation von GAPDH (Sonde: 5`-6-FAM-AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC-TAMRA-3`, forward Primer: 5`-CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC-3`, reverse Primer: 5`-CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT-3`) ermittelt.

Die Auswertung der Messung erfolgte durch den Vergleich der Ct-Werte der IP-Probe mit der NoAb-Kontrolle (Fold Enrichment), berechnet mit folgender Formel:

$$\text{Anreicherung} = 2^{(\text{Ct NoAb} - \text{Ct IP})}$$

Ct = Schwellenwert der Real-Time PCR

2.4 Proteinanalysen

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Das Gesamtprotein aus den Pleura- und Aszitespunktaten sowie den Zelllinien, wurde mit Hilfe von RIPA-Puffer isoliert und die Konzentration mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) bestimmt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und mit den BSA- (Bovine Serum Albumin) und BGG- (Bovine Gamma Globulin) Standardkurven verglichen.

2.4.2 ELISA-Messung

Die Konzentration von HMGB1 wurde mit dem kommerziell erhältlichen HMGB1 ELISA Kit (Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan) nach Herstellerangaben ermittelt.

2.4.3 Western Blot

Für den Nachweis von HMGA2 und β-Actin wurden 15 mg Gesamtprotein der jeweiligen Zelllinie in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die sekundären, mit alkalischer Phosphatase konjugierten, Antikörper hinzugegeben und die Banden mit Hilfe des Substrats BCIP/NBT visualisiert. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ.

Für die Überprüfung der Protein-Expression in der Chromatin Immunopräzipitation wurden die Proben nach der SDS-PAGE auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen und mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach der Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Banden mit dem Substrat BCIP/NBT visualisiert.

2.5 Chromatin Immunopräzipitation

Die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen wird durch die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) ermöglicht. In dieser Arbeit basiert die Methode der ChIP auf den modifizierten Protokollen von Spencer *et al.* (Spencer *et al.*, 2003) und Dahl und Collas (Dahl *et al.*, 2007). Für die ChIP aus den Zellen von HCT116 und zellfreier fetaler DNA aus Fruchtwasserproben wurden die experimentellen Bedingungen an einigen Stellen angepasst und optimiert.

2.5.1 Chromatin Immunopräzipitation aus Zellen

Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden zwischen 3×10^6 und $1,2 \times 10^7$ HCT116-Zellen geerntet. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Röhrchen überführt und mit MyCoy's 5A Medium versetzt. Die Quervernetzung der Proteine mit der DNA erfolgte durch Zugabe von Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1%. Nach anschließender Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Glycin in einer Endkonzentration von 0,125 mM gestoppt. Alle folgenden Schritte fanden, soweit nicht anders angegeben, bei 4°C statt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Pellet mit eiskalter 1x PBS/0,5 mM AEBSF-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Lyse der Zellen mit ChIP Lysis-Puffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für 5 min auf Eis. Das Lysat wurde erneut pelletiert, mit eiskalter 1x PBS/0,5 mM AEBSF-Lösung gewaschen und in 300 µl ChIP Lysis (High Salt)-Puffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) resuspendiert. Anschließend folgte eine Ultraschallbehandlung (37,5 min, 10 s Puls, 20 s Pause) auf Eis, bei der das Chromatin gelöst und fragmentiert wurde. Die optimale Größe der DNA-Fragmente für die ChIP liegt zwischen 200 und 500 Nukleotiden, eine Überprüfung der Fragmentlängen nach der Ultraschallbehandlung fand im Agarosegel statt. Dann wurde das Lysat bei $10.621 \times g$ für 10 min zentrifugiert, gefolgt vom ersten Preclearing-Schritt, bei dem 100 µl magnetische Dynabeads Protein G (Invitrogen, Karlsruhe) zum Überstand gegeben wurden. Nach einer Inkubation von 30 min in einem Rotationsinkubator wurde das Reaktionsgefäß in

einen magnetischen Ständer gestellt und der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 10% des Probenvolumens als Inputmaterial der ChIP abgenommen und bei -20°C eingefroren, um gegebenenfalls die Fragmentierung der DNA zu kontrollieren. Der restliche Teil der Probe wurde in zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eines diente als IP-Probe und wurde mit 4 µg HMGA2-Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) versetzt, das andere wurde als NoAb-Kontrolle ohne Antikörper mitgeführt. „IP“ steht hierbei für die immunpräzipitierte Probe und „NoAb“ für die No Antibody-Kontrolle, also die Negativkontrolle, in der keine Immunopräzipitation stattfindet. Beide Fraktionen wurden über Nacht auf einem Rotationsinkubator inkubiert. Um unspezifische Interaktionen zwischen DNA und magnetischen Beads zu vermeiden, wurden je 50 µl Dynabeads Protein G mit 22,2 µg gescherter Heringssperma-DNA für 30 min geblockt (Preclaring II) und anschließend zur IP-Probe und NoAb-Kontrolle gegeben. Die Proben wurden für 2 h in einem Rotationsinkubator inkubiert und die Beadkomplexe anschließend mit Hilfe des magnetischen Ständers pelletiert und der Überstand verworfen bzw. für eine spätere Überprüfung im Western Blot aufbewahrt. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml ChIP-Lysis-Puffer, viermal mit 1 ml ChIP-Lysis (High Salt)-Puffer und ChIP-Waschpuffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) und einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der Pellets in 150 µl 1%iger SDS-Lösung. Zur Elution der DNA-Protein-Antikörper-Komplexe von den Beads wurden die Proben in einem Schüttelwasserbad für 2 h bei 67°C inkubiert. Nach Entfernung der Beads wurden 15 µl für Western Blot-Analysen entnommen und der restliche Überstand unter Zugabe von 5 µl Proteinase K erneut bei 67°C für 2 h im Wasserbad geschwenkt, um die DNA-Protein-Quervernetzungen zu revertieren. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit H₂O verdünnt, um eine Präzipitation zu vermeiden, anschließend wurden die DNA-Fragmente mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.5.2 Chromatin Immunopräzipitation mit zellfreier fetaler DNA

Die Fruchtwasserproben wurden innerhalb von 6-8 h nach der Amniozentese bei 1000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und 2 ml des Überstandes in ein neues Röhrchen überführt. Um die Vernetzung der Proteine mit der zellfreien DNA während des Protokolls zu erhalten, wurde Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% zum Überstand gegeben (Crosslinking). Die Reaktion

wurde nach 10 min mit Glycin in einer Endkonzentration von 0,125 mM gestoppt, die Probe anschließend in zwei Aliquots aufteilt und mit je 50 µl Protein A/G PLUS Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) versetzt (Preclearing I). Nach einer Inkubation für 30 min in einem Rotationsinkubator wurden die Aliquots bei 20.800 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wonach eines mit 1 µg des HMGA2-spezifischen Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) versetzt wurde (IP-Probe) und das andere als Negativkontrolle (NoAb-Kontrolle) diente. Es folgte eine Inkubation über Nacht in einem Rotationsinkubator. Die Immunkomplexe wurden für 2 h mit 50 µl Protein A/G PLUS Agarose, die zuvor 30 min mit 3 µg gescherter Heringssperma-DNA äquilibriert wurden (Preclearing II), inkubiert. Danach wurden die durch die A/G PLUS Agarose immobilisierten Komplexe abzentrifugiert (1 min bei 15.300 x g) und das Pellet anschließend viermal mit je 1 ml ChIP Lysis (High Salt)- und ChIP-Waschpuffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der Pellets in 150 µl 1%iger SDS-Lösung. Die Trennung der Immunkomplexe von der Agarose erfolgte in einem Schüttelwasserbad für 2 h bei 67°C. Um die DNA-Protein-Quervernetzungen zu revertieren, erfolgte nach der Pelletierung der Agarose eine erneute Inkubation des Überstandes bei 67°C über Nacht. Eventuell verbliebene Agarose wurde durch eine abschließenden Zentrifugation bei 15.300 x g für 3 min entfernt und die Überstände in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:2 mit H₂O, wurden die DNA-Fragmente mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.6 Klonierung und Sequenzierung

Für die Klonierung in den Vektor pGEM-T easy wurden die DNA-Fragmente aus der Chromatin Immunopräzipitation zuerst einem A-Tailing unterzogen. Nach der Ligation in den Vektor wurde das Plasmid in chemokompetente E. coli DH5α eingeschleust. Die Selektion erfolgte über das Blue/White-Screening auf AIX-Platten und die Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

Die Klone wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert.

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Publikationen sowie der nicht publizierten Ergebnisse werden in den Kapiteln 3.1 bis 3.5 vorgestellt und in Kapitel 4 zusammengefasst diskutiert.

3.1 Publikation I: Chromatin immunoprecipitation to analyze DNA binding sites of HMGA2 (Winter *et al.*, 2011)

Das HMGA2-Protein steht als architektonischer Transkriptionsfaktor in Zusammenhang mit der Entwicklung einiger maligner und benigner Neoplasien sowie der Metastasierung von Tumorzellen. Um die Wirkungsweise des Chromatin-assoziierten Proteins besser zu verstehen, sollen in der folgenden Studie Bindestellen von HMGA2 mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation charakterisiert werden.

Zuerst erfolgte die Auswahl von geeignetem Zellmaterial für die ChIP. Dazu wurde die Expression von *HMGA2* auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zelllinien bestimmt. Von den 14 untersuchten Zelllinien zeigte HCT116 (Kolonkarzinom) die höchste Expression. Auf Proteinebene war die relative Menge von HMGA2 3,5-fach höher und auf mRNA-Ebene 5,6-fach höher als in der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC133. Im Vergleich zu Myometrium (MM31) war die in der Real-Time PCR gemessene *HMGA2*-Expression sogar 3.300-fach höher. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Untersuchungen die Zelllinie HCT116 ausgewählt.

Das ChIP-Protokoll wurde für die Untersuchung der HMGA2-Bindestellen in der Zelllinie HCT116 optimiert und die Anreicherung der DNA-Fragmente in den Proben mit der Real-Time PCR verifiziert. Nach der Klonierung wurden 49 DNA-Fragmente sequenziert und auf ihren AT-Gehalt und die Lokalisierung im menschlichen Genom untersucht. Die Größe der Fragmente reichte dabei von 105 bp bis 1.848 bp, bei einem Mittelwert von 517 bp. Alle DNA-Sequenzen konnten im menschlichen Genom wiedergefunden werden, wobei 23 intergenisch und 23 intragenisch lokalisiert waren. Die übrigen Sequenzen wurden in Regionen des Genoms gefunden, die bisher noch keinem chromosomalen Abschnitt zugeordnet sind.

HMGA2 besitzt die Fähigkeit, an AT-reiche Abschnitte der DNA zu binden, weshalb der AT-Gehalt der ChIP-Sequenzen bestimmt wurde. Ungefähr 3/4 der Fragmente besaßen einen AT-Gehalt, der über dem Durchschnitt des humanen Genoms von 59% (Lander *et al.*, 2001) liegt. 1/5 wies sogar einen AT-Gehalt von über 70% auf.

Um die Verteilung des AT-Gehaltes im Genom mit dem der ChIP-Sequenzen vergleichen zu können, wurde das gesamte Genom in Abschnitte von 500 bp unterteilt und der AT-Gehalt bestimmt. Statistische Auswertungen ergaben, dass die AT-Verteilung in den ChIP-Sequenzen signifikant höher ist, als in den Fragmenten des humanen Genoms ($p=0,0012$) (Wilcoxon Test). Als nächstes wurden die ChIP-Fragmente mit Hilfe des NCBI BLAST Programms (Basic Local Alignment Search Tool) auf mögliche konservierte Sequenzen untersucht. Hier gab es eine hohe Trefferquote und die konservierten Sequenzen hatten, verglichen mit dem humanen Genom, einen signifikant höheren AT-Gehalt ($p=2,2e^{-16}$). Dieser erhöhte AT-Gehalt wurde auch bei einem Vergleich der ChIP-Sequenzen untereinander festgestellt ($p=1,561e^{-05}$) (Wilcoxon Test). Alle ChIP-Sequenzen zeigten multiple AT-Abschnitte, mit Ausnahme der Klone 25 und 49, die jeweils nur einen AT-Abschnitt aufwiesen.

Um die verschiedenen Alignments der konservierten Sequenzen zu interpretieren, wurde ein Sequenzlogo generiert. Hierzu wurden 11 und 12 bp lange, konservierte Abschnitte aus den ChIP-Fragmenten verwendet, in beiden Fällen zeigte sich ein erhöhter AT-Gehalt in den flankierenden Region und keine Spezifität der Basen in der Mitte der Sequenzen.

In einer SELEX-Studie haben Cui und Leng 71 Konsensussequenzen generiert, die mögliche Bindestellen für HMGA2 darstellen (Cui *et al.*, 2007). Die höchste Bindungsaffinität von HMGA2 ergab sich bei den Basenabfolgen 5'-ATATTCGCGAWWATT-3' und 5'-ATATTGCGCAWWATT-3' (W: A oder T). Die 49 DNA-Sequenzen aus der ChIP wurden nach den 15 bp langen Konsensussequenzen gescreent, allerdings gab es keine Übereinstimmungen. In weiteren Analysen wurde das gesamte humane Genom nach den SELEX-Sequenzen mit Hilfe des NCBI BLAST-Programms abgesucht. Es ergaben sich sechs Treffer für die zwei Sequenzen mit der höchsten Bindungsaffinität. Für die 4096 Varianzsequenzen, bei denen eine Bindung von HMGA2 statistisch weniger wahrscheinlich ist, gab es 27.455 Analogien im humanen Genom. Das bedeutet, dass im Durchschnitt alle 104.565 bp eine HMGA2-Bindestelle vorliegt. Im Vergleich zu dem theoretisch erwarteten Vorkommen eines 15 bp-langen Sequenzmusters (alle 262.144 bp im Genom) ist die Konsensussequenz aus der SELEX-Studie 2,5-mal öfter vorhanden.

I**Chromatin immunoprecipitation to analyze DNA binding sites of HMGA2**

Nina Winter, Rolf Nimzyk, Carolin Bösche, Anke Meyer, Jörn Bullerdiek

PLoS One. 6 (4):e18837 (2011)

Eigenanteil:

- Durchführung und Auswertung der Studie zusammen mit Carolin Bösche mit Ausnahme der Bioinformatik
- Verfassen der Veröffentlichung zusammen mit Jörn Bullerdiek und Rolf Nimzyk

Chromatin Immunoprecipitation to Analyze DNA Binding Sites of HMGA2

Nina Winter¹, Rolf Nimzyk¹, Carolin Bösch¹, Anke Meyer¹, Jörn Bullerdiek^{1,2*}

¹ Centre for Human Genetics, University of Bremen, Bremen, Germany, ² Clinic for Small Animals and Research Cluster REBIRTH, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany

Abstract

Background: *HMGA2* is an architectonic transcription factor abundantly expressed during embryonic and fetal development and it is associated with the progression of malignant tumors. The protein harbours three basically charged DNA binding domains and an acidic protein binding C-terminal domain. DNA binding induces changes of DNA conformation and hence results in global overall change of gene expression patterns. Recently, using a PCR-based SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) procedure two consensus sequences for HMGA2 binding have been identified.

Methodology/Principal Findings: In this investigation chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments and bioinformatic methods were used to analyze if these binding sequences can be verified on chromatin of living cells as well.

Conclusion: After quantification of HMGA2 protein in different cell lines the colon cancer derived cell line HCT116 was chosen for further ChIP experiments because of its 3.4-fold higher HMGA2 protein level. 49 DNA fragments were obtained by ChIP. These fragments containing HMGA2 binding sites have been analyzed for their AT-content, location in the human genome and similarities to sequences generated by a SELEX study. The sequences show a significantly higher AT-content than the average of the human genome. The artificially generated SELEX sequences and short BLAST alignments (11 and 12 bp) of the ChIP fragments from living cells show similarities in their organization. The flanking regions are AT-rich, whereas a lower conservation is present in the center of the sequences.

Citation: Winter N, Nimzyk R, Bösch C, Meyer A, Bullerdiek J (2011) Chromatin Immunoprecipitation to Analyze DNA Binding Sites of HMGA2. *PLoS ONE* 6(4): e18837. doi:10.1371/journal.pone.0018837

Editor: Jennifer V. Schmidt, University of Illinois at Chicago, United States of America

Received: August 23, 2010; **Accepted:** March 21, 2011; **Published:** April 14, 2011

Copyright: © 2011 Winter et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: These authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bullerd@uni-bremen.de

Introduction

High mobility AT-hook 2 (HMGA2) is a chromatin-associated protein implicated in the development and progression of benign and malignant tumors as well as stem cell self-renewal [1,2,3]. Although some single target genes directly regulated by HMGA2 have been identified there is little doubt that it rather acts as a global chromatin switch than as a transcription factor controlling a few genes only [4,5,6]. On the other hand, its primary action as a chromatin-remodeling switch molecule requires a large number of DNA binding sites throughout the genome which would fit with its relative abundance e.g. in embryonic stem cells [7,8]. Nevertheless, surprisingly little is known about possible patterns of its binding sites on the chromatin of living cells. Akin to the other mammalian HMGA proteins HMGA2 is characterized by three highly basic DNA-binding motifs called AT-hooks. All three AT-hooks show striking amino acid similarities with each other. Generally, the minor grooves of AT-rich DNA stretches are thought to represent suitable binding sites for the AT-hooks [9,10]. Moreover, stable DNA binding apparently requires interacting of the central AT-hook and either of the two flanking hooks to DNA [11]. In a recent paper, Cui and Leng [12] have used a SELEX procedure for the analysis of the interactions of short random DNA fragments with HMGA2 to delineate consensus sequences for the binding of AT-hooks. The study has resulted in the

identification of a DNA motif and its derivatives strongly supporting HMGA2 binding but the results were obtained using naked DNA instead of chromatin fragments and comprehensive data on its chromatin binding in living cells are missing. Herein, we have performed a study based on chromatin immunoprecipitation (ChIP) from living cancer cells to analyze HMGA2 binding sites. The resulting fragments have been analyzed for a common binding motif as well as for similarities to the sequences emerging from the study by Cui and Leng [12].

Results

Isolation of HMGA2 binding sites via ChIP

The first step for characterization of HMGA2 binding sites was to choose an adequate cell line showing high levels of HMGA2 for the following ChIP analyses. Therefore, we investigated the *HMGA2* mRNA expression of 14 cell lines and one tissue sample of human origin. RNA expression of cell line HCT116 (adenocarcinoma of the colon) was up to 3,300-fold elevated in comparison to sample MM 31 (myometrium). This expression of *HMGA2* mRNA in HCT116 was by far the highest among the cell lines investigated (Fig. 1). To check these results on the protein level Western Blot analysis was performed using selected cell lines. As shown in Figure 2 we detected HMGA2 in three cell lines and the amount of protein was calculated referring to β -actin as

endogenous control. In the HCT116 cell line the relative amount of HMGA2 detected in Western Blot analysis was 2.1- (Li14) and 3.4-fold (FTC133) higher. This tendency corresponds to the relative *HMGA2* mRNA expression measured with real-time PCR, in which HCT116 shows a 3.8-fold (Li14) and 5.6- (FTC133) higher expression (Fig. 2B).

For this study two basic protocols for ChIP [13,14] have been optimized for use with HCT116 cells. A flow diagram of the procedure is provided in Figure S1, and the details are given under materials and methods. The DNA enrichment within the samples was measured by real-time PCR and analysis was done by comparing the data from the immunoprecipitated sample (IP) against the background signal of the negative control without antibody (NoAb) to calculate the x-fold enrichment. In Table 1 the results of five samples used for ChIP followed by cloning of the DNA fragments are displayed. Average enrichment of the IP samples was 246-fold. The amplified gene sequence of GAPDH has no known HMGA2 binding site and served as a control to evaluate the DNA concentration and enrichment after ChIP.

Furthermore, the enrichment of HMGA2 during ChIP was confirmed by Western blot analysis (Fig. 3) as revealed by the presence of HMGA2 in the IP sample but not in the corresponding supernatant. In contrast, HMGA2 can be detected in the supernatant of the NoAb control and not in the eluate of the negative control. The immunoprecipitated DNA fragments were cloned into pGEM-T easy vector for blue/white screening. 49 clones from ChIP-derived DNA fragments were obtained and sequenced.

Analysis of immunoprecipitated and sequenced DNA fragments

All 49 sequences were mapped to single loci in the human genome using the NCBI BLAST tool (Table 2). Length of ChIP DNA fragments ranged from 105 bp to 1848 bp with an average length of 517 bp. 23 of the cloned sequences were located intergenic and 23 intragenic. The remaining fragments matched to an unplaced genomic region not assigned to a chromosome until now. Table 2 displays the genes which are located upstream or downstream within the flanking regions of the 23 intergenic

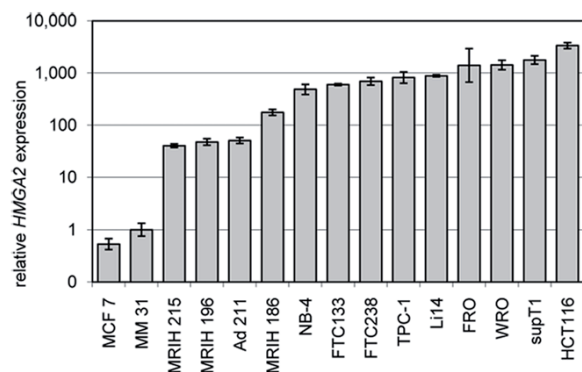


Figure 1. Relative expression of *HMGA2* in different samples. Origin of the various human cell lines and fresh sample: MCF 7 (mamma carcinoma), MM 31 (myometrium); MRI-H215, MRI-H196 and MRI-H186 (cervical carcinoma); Ad 211 (pleomorphic adenoma); NB-4 (promyelocytic leukemia); FTC133 and FTC238 (follicular thyroid carcinoma); TPC-1 (papillary thyroid carcinoma); Li14 (lipoma); FRO (anaplastic thyroid carcinoma); WRO (follicular carcinoma); supT1 (T cell lymphoblastic lymphoma); HCT116 (colon carcinoma). doi:10.1371/journal.pone.0018837.g001

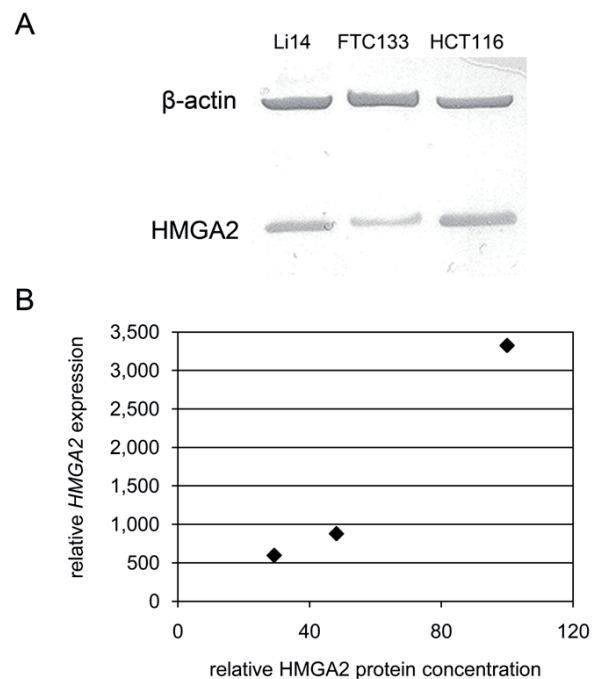


Figure 2. Western blot analysis of HMGA2 in different cell lines. (A) Expression of HMGA2 in three cell lines was determined using β -actin as endogenous control. (B) Comparison of *HMGA2* mRNA expression and HMGA2 protein expression in exemplary cell lines. doi:10.1371/journal.pone.0018837.g002

sequences, with a distance ranging from approximately 500 bp to 2000 kb. From a total of the 23 intragenic sequences seven were located within the first intron and three in the second intron. The remaining 12 sequences were assigned to various other introns, except for one fragment located in the second exon of a gene. Detailed sequences are listed in Table S1.

For further analysis we compared our ChIP fragments with known binding sites, as predicted by Cui and Leng [12]. Two consensus sequences (5'-ATATTCGCGAWWATT-3' and 5'-ATATTCGCGCAWWATT-3', where W represents A or T) have

Table 1. x-fold enrichment of the chromatin immunoprecipitated samples measured with *GAPDH* primers.

Sample	Average Ct-value	Ct ^{NoAb} -Ct ^{IP}	x-fold Enrichment
32 IP	29.85	8.55	374.29
32 NoAb	38.39		
33 IP	30.76	6.25	76.21
33 NoAb	37.01		
35 IP	30.37	8.86	464.65
35 NoAb	39.23		
36 IP	29.49	6.97	125.37
36 NoAb	36.46		
37 IP	29.84	7.57	190.15
37 NoAb	37.41		

doi:10.1371/journal.pone.0018837.t001

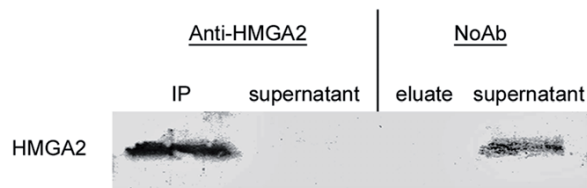


Figure 3. Western blot analysis of HMGA2 in ChIP samples. The analysis shows an enrichment of HMGA2 in the IP sample but not in the corresponding supernatant. No HMGA2 is detectable in the eluate of the NoAb control because HMGA2 remains in the supernatant of the non-immunoprecipitated sample. doi:10.1371/journal.pone.0018837.g003

been described. The ChIP DNA sequences have been screened for the described consensus sequences, to analyze whether these putative binding sites are part of our ChIP sequences obtained herein. None of the consensus sequences was detected in the sequences revealed by ChIP. Next, the ChIP-generated fragments were compared with sequences containing lower constraint as identified by the SELEX [12] study. This lower constraint expanded the described HMGA2 binding sequences to 4,096 binding sites within the human genome. With a Perl program using a pattern match representing the 4,096 possibilities and NCBI BLAST standalone tool the sequences were scanned for possible HMGA2 binding sequences. Again, none of these putative HMGA2 binding sites was detected in sequences resulting from ChIP.

Because none of the sequences for HMGA2 binding described by Cui and Leng [12] matched within the isolated ChIP fragments, we scanned the human genome for the putative consensus sequences generated in the above mentioned SELEX study. For this the Perl program and the NCBI BLAST tool adapted to short sequences were used. Only six matches in the whole genome can be found for the conserved possible HMGA2 binding sites described by Cui and Leng [12] (NCBI refseq human genomic sequences build 36). If the consensus is extended to the 4,096 possibilities, 27,455 matches exist (Human genome NCBI refseq sequences Build 36). Thus, a possible binding site for HMGA2 would occur on average every 104,565 bp. In comparison to the theoretically expected occurrence of such a 15 bp sequence pattern (every 262,144 bp in the human genome) the consensus is 2.5 times more often attendant.

Because HMGA2 is supposed to bind to the minor groove of AT-rich sequences [15], the sequences identified by the ChIP experiments have been analyzed for their AT-content. Approximately three-fourth of the sequences had AT-content exceeding the average of 59% in the human genome [16] with 20% of them even being highly AT-rich exceeding 70%. The AT-content in the deduced ChIP sequences was compared to the distribution in the human genome (NCBI refseq sequences Build 36), for that purpose the whole genome was split into pieces of 500 bp and the AT-content was determined (Fig. 4). For analysis of statistical significance and due to non-normality of the AT-distribution in the human genome [16] the Wilcoxon rank sum test as non-parametric alternative has been used. The distribution of the AT-content in the ChIP DNA sequences described herein is significantly higher than it would be expected in random fragments of the human genome ($p < 0.0012$) ($W = 105561580$).

The cloned sequences were analyzed for the presence of any conserved sequences using the NCBI BLAST tool. This analysis shows a high rate of matches. These sequences have a significant higher AT-content compared to the human genome

($W = 1169693292$, $p\text{-value} < 2.2e^{-16}$, Wilcoxon rank sum test) and to the ChIP-isolated sequences themselves ($W = 11787$, $p\text{-value} = 1.561e^{-05}$, Wilcoxon rank sum test). All sequences show multiple AT-stretches except for clone 25 and 49 containing only one AT-stretch. To identify further similarities between these BLAST matching sequences the 11 and 12 bp matches were adjusted manually from redundancies and used to create a sequence logo (WebLogo, <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). In both cases the logo shows a higher AT-content in the flanking regions and no specificity in the middle of the sequence (Fig. 5).

Discussion

A crucial question in field of gene regulation is where and to what extent transcription factors bind to DNA. This study is focused on the architectonic transcription factor HMGA2 which is abundantly expressed during embryonic and fetal development, whereas expression in normal fully differentiated adult cells is very low or even absent. This is the first time HMGA2 binding on chromatin in living cells is determined by ChIP analysis. The advantage of this method is that there is no need to prior identification of target genes regulated through binding of HMGA2. Furthermore, regulatory regions can be revealed whether they are located at promoters, introns or even distant enhancer elements.

In our study we selected a cell line with abundant expression of HMGA2 but this is not necessarily associated with malignant cellular behavior because, e.g. embryonic stem cells show a high level of HMGA2 associated with differentiation and cell proliferation during embryonic development [8]. Comparing the colon carcinoma cell line HCT116 with the thyroid carcinoma cell line FTC133 a drastical overexpression of HMGA2 both in the mRNA and the protein level compared to the myometrium was noted, the relationship between these two cell lines was in a comparable rang, i.e. HCT116 had a 5.6-fold higher expression of HMGA2 mRNA than FTC133 and a 3.4-fold higher expression on the protein level.

We compared the sequences of the DNA fragments obtained to results of a previously performed SELEX analysis on protein-free DNA [12]. These sequence motifs which should bind HMGA2 as described by Cui and Leng 2007 [12] have not been found in the DNA fragments revealed by ChIP. There are two possible explanations for the absence of corresponding sequences in the fragments identified by ChIP. First, HMGA2 proteins are not only interacting with DNA but also with a variety of other DNA binding and chromatin binding proteins like APEX1 (APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1) [17] and E4F1 (E4F transcription factor 1) [18]. If not distinguished from the highly similar HMGA1a and HMGA1b proteins, which is common in the literature, the HMGA proteins have a lot of molecular partners as transcription factors and other DNA binding proteins (reviewed in [19]). Considering this facts together with the direct involvement of HMGA2 in base excision repair with own enzymatic lyase activity [17] it is not likely that HMGA2 is binding DNA in a specific manner. Especially for the function in excision repair a specific binding site seems counterproductive to the occurrence of mutations only by chance not at specific sites.

The second possible explanation for the absence of similarities between the SELEX sequences and the ChIP DNA fragments is, that the occurrence of the consensus sequences for HMGA2 binding described by Cui and Leng [12] is rare and the statistics of appearance of a 15 bp sequence (approximately three times in the human genome, with the ambiguity approximately 18 times) implicates that these consensus sequences are of limited biological

Table 2. 49 clones from ChIP-derived DNA fragments and their distribution in the human genome.

Clone	Length [bp]	AT [%]	Localization	Gene Symbol	Location to Gene	Distance to Gene
41	105	61	1p35	PTPRU	upstream	180 kb
28	403	68	1q25	SEC16B	downstream	70 kb
3	440	61	1q25.1	TNR	intron 1	-
23	253	63	1q31	KCNT2	downstream	1000 kb
14	652	69	1q31.1	FDPSSL1	downstream	300 kb
27	1017	57	1q42	CDC42BPA	intron 21	-
8	715	68	2p13.3	GKN3P	intron 1	-
2	373	65	2p24.1	WDR35	intron 34	-
29	316	47	2q31	HOXD10	exon 2	-
48	1612	54	3p21	LARS2	intron 13	-
45	1592	59	3p22	STAC	downstream	170 kb
44	234	70	3q26.1	SI	downstream	25 kb
49	157	52	3q26.1	KPNA4	intron 1	-
40	171	62	4p15.1	ARAP2	downstream	2000 kb
16	395	63	4q31.1	CLGN	upstream	500 bp
12	981	69	4q32.3	SPOCK3	upstream	300 kb
10	350	73	4q34.3	RPL19P8	downstream	15 kb
39	561	60	5p14	PRDM9	downstream	117 kb
32	1080	61	6p22	DCDC2	intron 2	-
22	574	67	6q16	TSG1	upstream	113 kb
20	574	67	6q22	NKAIN2	intron 1	-
6	639	62	6q22.31	MAN1A1	downstream	830 kb
35	233	68	6q23	VNN3	upstream	900 bp
34	105	74	7q22	RELN	intron 33	-
17	323	58	7q36.1	ACTR3C	upstream	9 kb
4	492	72	8q21.12	PKIA	upstream	220 kb
7	219	72	8q23.2	PKHD1L1	intron 16	-
13	161	72	9q21.12	ALDH1A1	upstream	90 kb
36	276	52	9q22	COL15A1	intron 1	-
30	765	50	9q34	ENG	intron 8	-
46	180	69	10p11.2	CCDC7	downstream	32 kb
43	300	60	10p13	FAM107B	intron 2	-
15	305	71	10q21.3	JMJD1C	intron 22	-
5	1848	67	13q32.3	FGF-14	intron 1	-
11	363	71	14q21.3	RPL10L	downstream	350 kb
24	142	64	14q32	PPP4R4	intron 2	-
42	695	52	17q21	PLEKHM1	upstream	3 kb
33	1220	61	17q22	MBTD1	intron 6	-
19	508	51	17q23.3	RGS9	intron 19	-
18	495	64	18p11.22	PPP4R1	intron 23	-
31	412	60	18q21	STARD6	upstream	149 kb
26	287	64	19q12	ZNF99	downstream	25 kb
47	359	66	19q13.1	FCGBP	intron 3	-
9	511	66	20q13.11	PTPRT	intron 1	-
1	500	56	20q13.13	NFATC2	downstream	6.5 kb
25	235	46	21q22	RUNX1	intron 5	-
21	201	54	*			
37	633	62	*			
38	388	79	*			

*Unplaced genomic region.
doi:10.1371/journal.pone.0018837.t002

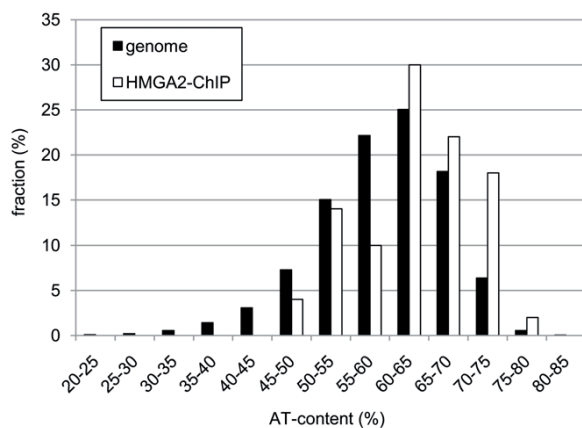


Figure 4. Histogram of the AT-content in the human genome and the ChIP DNA sequences. The whole human genome was split into pieces of 500 bp and AT-content was determined and compared to the AT-content of the sequences revealed by ChIP with HMGA2-antibody. The Wilcoxon rank sum test shows that the AT-content in the ChIP DNA sequences is significantly higher than in the human genome ($p < 0.0012$).

doi:10.1371/journal.pone.0018837.g004

relevance for the HMGA2 activity. According to its function as a chromatin-remodelling switch HMGA2 is supposed to require a large number of DNA binding sites throughout the genome. This is consistent with the observations of relative abundance of HMGA2 in embryonic stem cells by Li *et al.* [7,8]. Therefore, the rare occurrence of the consensus sequences has to be explained. Besides the possibility of artificial binding in the SELEX experiments the statistical 2.5 fold overrepresentation of the extended HMGA2 consensus sequences versus the representation of such sequences only by chance in the human genome points to a possible other explanation. The consensus motif described by Cui and Leng [12] is efficiently binding HMGA2 but *in vivo* this binding is maybe irrelevant. The binding might be too strong for purposes of dynamic regulation which is required for the proper activity of HMGA2.

The AT-content of the sequences generated by ChIP is significantly higher than the average of the human genome. This confirms the hypothesis that HMGA2 binds to AT-rich sequences. It therefore seems feasible to speculate that a motif with central GC bases and flanking AT bases is the possible target of HMGA2.

The analysis of the DNA fragments among each other shows a multitude of matches for conserved AT-stretches. All sequences but two contain multiple AT-stretches. A possible explanation for these two sequences having only one AT-stretch is that HMGA2 does not necessarily need DNA to interact with because it can bind to DNA- or chromatin binding proteins as well [17,18]. To identify further similarities between these BLAST matching sequences, 11 bp and 12 bp matches were used exemplarily to create a sequence logo. Interestingly, the high AT-content in the flanking sequences resembles the pattern of the SELEX sequences presented by Cui and Leng [12]. This pattern has a central of 4 GC-rich bases flanked by AT-rich sequences. It is well known, that HMGA2 is a DNA binding protein that specifically recognizes the minor groove of AT-rich DNA sequences. One turn in DNA consists of approximately 10 bp and thus both presented patterns fit to the HMGA2 AT-hook composition and the winding of the DNA molecule.

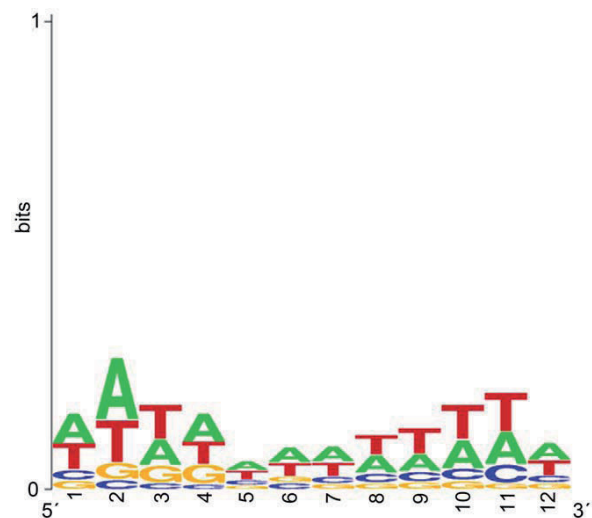


Figure 5. Sequence analysis of the concerted BLAST alignments of the detected ChIP sequences. The sequence logo was created by 12 bp long BLAST alignments. Sequence conservation, measured in bits of information, is illustrated by the height of stacking of the four letters for each position in the binding sites. The relative heights are proportional to their frequencies shown in the 134 BLAST sequences. The sequence logo was generated by WebLogo (available at <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

doi:10.1371/journal.pone.0018837.g005

HMGA2 is able to regulate certain genes via binding to promoter or enhancer regions, which are located upstream or downstream to the target gene, as well as intronic e.g. in case of the *IMP2* gene [20,21]. Except for one sequence all possible binding sites were assigned to non-coding regions. Some of the genes identified to be located close to the generated ChIP DNA fragments play an important role in different types of cancer with high HMGA2 expression. *RELN* and *ALDH1A1* are expressed in prostate cancer [22,23], *ENG* [24], *SI* [25], *FCGBP* [26] and *PTPRT* [27] are associated with colonic tumors. *HOXD10* [28] and *MAN1A1* [29] show an up-regulated gene expression in breast cancer. The *RPL10L* gene is related to ovarian cancer [30] and *JMJD1C* plays an essential role in embryogenesis and carcinogenesis [31]. A functional relation between the oncofetal HMGA2 and the above mentioned genes is feasible and as a transcription factor HMGA2 is able to influence many different regulatory processes [32]. It remains to be elucidated, if HMGA2-binding is directly related to the up- or down-regulation of expression in this certain cases either through directly binding to DNA or in a complex with other proteins.

To the best of our knowledge this is the first approach to characterize possible HMGA2 binding sites in the chromatin of living cells by ChIP and cloning. Via protein-DNA binding HMGA2 plays important roles in tumor growth and stem cell-renewal. The possibility to screen, localize, and characterize the whole human genome for sequences bound to HMGA2, can help to understand in which way HMGA2 is associated with different biological processes.

Materials and Methods

Ethics Statement

The use of the human myometrium sample for this study was approved by the local medical ethics committee and followed the

guidelines of the declaration of Helsinki. The patient gave written informed consent for clinical procedure and research use of the tissues.

Cell culture

14 human cell lines and one sample of fresh tissue were examined in this study: MCF 7 (mammary carcinoma) [33], MM 31 (myometrium); MRI-H215, MRI-H196 and MRI-H186 (cervical carcinoma) (provided by H. Löhrike, German Cancer Research Center, Heidelberg); Ad 211 (pleomorphic adenoma) [34]; NB-4 (promyelocytic leukemia) [35]; FTC133 and FTC238 (follicular thyroid carcinoma) [36]; TPC-1 (papillary thyroid carcinoma) [37]; Li14 (lipoma) [38]; FRO (anaplastic thyroid carcinoma) [39]; WRO (follicular carcinoma) [40]; supT1 (T cell lymphoblastic lymphoma) [41]; HCT116 (colon carcinoma) [42]. They were cultured in RPMI 1640, TC 199 or McCoy's 5A medium supplemented with 10% or 20% fetal bovine serum and 2% penicillin/streptomycin (all Invitrogen, Karlsruhe, Germany). All cells were incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Sample MM 31 was taken during surgery, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for RNA isolation.

RNA-Isolation

Total RNA was purified from cell lines and the tissue sample according to the "RNeasy mini protocol for isolation of total RNA from heart, muscle and skin tissue" (Qiagen, Hilden, Germany) including on-column DNase I digest and homogenisation with QIAshredder®. Following quantification, 5 µg RNA have been digested a second time with DNaseI (6.75 U) for 15 min at room temperature and a cleanup according to the RNeasy mini protocol was performed to remove possible contaminating DNA completely.

Chromatin Immunoprecipitation

Approximately 1×10^7 HCT116 cells were harvested with TrypLE Express (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and the cell suspension was transferred into a sterile tube filled with McCoy's 5A medium. Proteins were crosslinked to the DNA using a final concentration of 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The formaldehyde was quenched with 0.125 M glycine (final concentration). After centrifugation the cell pellet was rinsed with an ice-cold PBS/AEBSF solution and then suspended in ChIP Lysis Buffer (Santa Cruz, Heidelberg, Germany). The sample was incubated on ice for 5 min and the pellet was rinsed with an ice-cold PBS/AEBSF solution again. For sonication, the pellet was suspended in 300 µl ChIP Lysis Buffer High Salt (Santa Cruz, Heidelberg, Germany). Fragmentation of the DNA was performed on ice, first to isolate and break down the nuclei and then to fragment the DNA (size 200–500 nucleotides). The parameters were 10 s pulse on and 20 s pulse off for 37.5 min with a Bandelin sonicator HD 3200 plus (Bandelin, Berlin, Germany). The sheared chromatin was cleared by centrifugation at 4°C (10 min at $10,621 \times g$).

Magnetic Dynabeads protein G (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were prepared before usage following the manufacturer's instruction. To reduce the background signal a preclearing step was performed. 100 µl beads were added to the sample and the suspension was incubated for 30 min at 4°C with rotation. The supernatant was transferred and divided into two fractions (IP and NoAb). 4 µg anti-HMGA2 antibody (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) were added to the IP sample, the fraction without antibody (NoAb) served as a negative control. Both fractions were incubated over night at 4°C on a rotator. To avoid unspecific interactions between DNA and beads, Dynabeads protein G were

rotated with 22.2 µg salmon sperm DNA for 30 min at 4°C before use. After this second preclearing step, the IP and NoAb fractions were incubated on a rotator for 2 h at 4°C each with 50 µl of the blocked Dynabead suspension. The immune complexes were washed two times with 1 ml ChIP Lysis Buffer, four times with ChIP Lysis Buffer High Salt and ChIP Wash Buffer (Santa Cruz) and once with $1 \times$ TE buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA). All washing steps were carried out at 4°C. To reverse crosslinks the Dynabeads protein G were suspended in 150 µl SDS elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) and incubated in a shaking water bath for 2 h at 67°C. The supernatants were transferred into new 2 ml plastic tubes and incubated with 5 µg Proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) for another 2 h at 67°C. To avoid precipitation during the DNA isolation the samples were diluted 1:2 with H₂O. The DNA was isolated using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

SDS-PAGE and Western Blotting

The protein concentration was measured with the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Bonn, Germany) 15 µg of protein obtained from each sample were used for SDS-PAGE in a X-Cell Sure Lock Mini-Cell apparatus (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and transferred to a nitrocellulose membrane with the Fastblot 33 system (Biometra, Göttingen, Germany). The membrane was blocked with 5% BSA over night and incubated with rabbit polyclonal anti-HMGA2 antibody (1:3000, Biocheck, Foster City, USA) and mouse monoclonal anti-β-actin (1:7500, Novus Biologicals, Cambridge, United Kingdom) for one hour. Second antibodies were alkaline phosphatase-bovine anti-rabbit IgG (1:3750, Sante Cruz, Heidelberg, Germany) and alkaline phosphatase-goat anti-mouse IgG (1:7500, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The detection of β-actin was used as an internal control to confirm equivalent total protein loading. Relative HMGA2 protein expression was determined by band intensities with the ImageJ program.

For determination of protein expression in the ChIP samples, supernatants of samples after DNA-protein-antibody-bead-complex formation (IP and NoAb) and samples before Proteinase K digestion (IP and NoAb) were taken. Proteins were separated by SDS-PAGE as described by Laemmli [43] using the Minigel-System Protean II and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using the Mini-Transblot System (Biorad, Munich, Germany). The membrane was blocked with TBS-T buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Tween-20) containing 5% skimmed milk and incubated with rabbit polyclonal anti-HMGA2 antibody (1:800, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) for one hour. The second antibody-step was performed with the alkaline phosphatase-goat anti-rabbit IgG (1:5000, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and bands were visualized by adding BCIP/NBT substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Real-time PCR

All real-time PCRs were run on an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). For Quantification of *HMGA2* 250 ng total RNA were reverse transcribed with 200 units of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and 150 ng random hexamers (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) according to the manufacturer's instructions. The relative quantification method was carried out using 18S rRNA as endogenous control (forward primer 5'-GGA TCC ATT GGA GGG CAA GT-3'; reverse primer 5'-AAT ATA CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3' and probe 5'-6-FAM-TGC CAG CAG CCG C-MGB-3') [44]. The samples

were diluted (1:10) for the endogenous control due to higher expression level of 18S rRNA. *HMG2* (Assay Hs00171569_m1, Applied Biosystems) and 18S rRNA expression analyses were performed in triplicate in a total volume of 20 μ l using 2 μ l of each cDNA corresponding to 25 ng of total RNA. The expression of the endogenous control 18S rRNA showed only a slight variation in all the samples, the mean Ct value was 8.17 ± 0.21 .

IP fragments were analyzed in triplicates starting with 3 μ l of template DNA. The enrichment of DNA in the samples (IP, NoAb) was determined by amplification of *GAPDH*. The sequences for *GAPDH* were 5₋6-FAM-AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC-TAMRA-3₋ for the fluorescent probe, 5₋CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC-3₋ for the forward primer, and 5₋CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT-3₋ for the reverse primer (Operon, Cologne, Germany). PCR condition were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 50 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Results were calculated by subtracting the Ct-value of the sample from the corresponding NoAb control, followed by $2^{(\text{NoAb-IP})}$ to evaluate the x -fold higher amount of starting material of the sample applied in the real-time PCR.

Cloning of immunoprecipitated products

The ChIP-generated DNA fragments were A-tailed and ligated into the pGEM[®]-T easy vector (Promega, Mannheim, Germany) with T4 ligase at 4°C over night. The transformation was carried out according to the manufacturer's protocol with 100 μ l *Escherichia coli* DH5 α competent cells. 150 μ l respectively 200 μ l of the transformation culture were plated onto AIX-plates and incubated over night at 37°C. Plasmid DNA was isolated with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol.

In silico data analysis

Clones were sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). After revising with the Lasergene software, a BLAST

search of the human genome database at NCBI was performed to locate the sequences.

For identifying the consensus sequences in the human genomic sequences (NCBI refseq build 36) Perl (www.perl.org) with implemented Bio-Perl Modules [45] has been used. The possible genomic binding sequences have been identified by pattern matching. Specific sequences have been analyzed also using BLAST [46] adjusted to short sequences (Program = blastn, Word size = 7, Expect Value = 100, Filter = disabled). For statistical analysis the statistics software R (www.r-project.org) has been used. The sequence logo was generated by WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Supporting Information

Figure S1 Scheme of the HMGA2 chromatin immunoprecipitation cloning procedure. Cells were crosslinked with formaldehyde to preserve the structure of chromatin and proteins. After lysis and sonication the fragmented DNA was immunoprecipitated with a HMGA2-antibody. For Western Blot analysis aliquots were taken after immunoprecipitation. Crosslinks were reversed in the rest of the samples, DNA was eluted and enrichment of ChIP DNA fragments was measured by real-time PCR. ChIP DNA fragments of the remaining samples were cloned into a vector, sequenced and analyzed.

(TIF)

Table S1 Sequences of the cloned fragments.

(XLS)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NW RN CB JB. Performed the experiments: NW CB AM. Analyzed the data: NW RN CB. Contributed reagents/materials/analysis tools: RN JB. Wrote the paper: NW RN JB.

References

- Fusco A, Fedele M (2007) Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 899–910.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135: 227–239.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, et al. (1995) Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10: 436–444.
- Bustin M (1999) Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19: 5237–5246.
- Reeves R (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277: 63–81.
- Bustin M, Reeves R (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 35–100.
- Li O, Vasudevan D, Davey CA, Droge P (2006) High-level expression of DNA architectural factor HMGA2 and its association with nucleosomes in human embryonic stem cells. *Genesis* 44: 523–529.
- Li O, Li J, Droge P (2007) DNA architectural factor and proto-oncogene HMGA2 regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 581: 3533–3537.
- Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265: 8573–8582.
- Solomon MJ, Strauss F, Varshavsky A (1986) A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1276–1280.
- Pfannkuche K, Summer H, Li O, Hescheler J, Droge P (2009) The High Mobility Group Protein HMGA2: A Co-Regulator of Chromatin Structure and Pluripotency in Stem Cells? *Stem Cell Rev Rep*.
- Cui T, Leng F (2007) Specific recognition of AT-rich DNA sequences by the mammalian high mobility group protein AT-hook 2: a SELEX study. *Biochemistry* 46: 13059–13066.
- Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR (2003) Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31: 67–75.
- Dahl JA, Collas P (2007) Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* 25: 1037–1046.
- Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, et al. (1997) The solution structure of an HMGI(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4: 657–665.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
- Summer H, Li O, Bao Q, Zhan L, Peter S, et al. (2009) HMGA2 exhibits dRP/AP site cleavage activity and protects cancer cells from DNA-damage-induced cytotoxicity during chemotherapy. *Nucleic Acids Res* 37: 4371–4384.
- Sgarra R, Tessari MA, Di Bernardo J, Rustighi A, Zago P, et al. (2005) Discovering high mobility group A molecular partners in tumour cells. *Proteomics* 5: 1494–1506.
- Sgarra R, Zammiti S, Lo Sardo A, Maurizio E, Arnoldo L, et al. (2009) HMGA molecular network: From transcriptional regulation to chromatin remodeling. *Biochim Biophys Acta*.
- Reeves R, Beckerbauer L (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519: 13–29.
- Cleyen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, et al. (2007) HMGA2 regulates transcription of the Imp2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res* 5: 363–372.
- Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, et al. (2007) Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. *Mod Pathol* 20: 344–351.
- Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, et al. (2010) ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Lab Invest* 90: 234–244.
- Dassoulas K, Gazouli M, Theodoropoulos G, Christoni Z, Rizos S, et al. (2010) Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 703–708.

25. Jessup JM, Lavin PT, Andrews CW, Jr., Loda M, Mercurio A, et al. (1995) Sucrase-isomaltase is an independent prognostic marker for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 38: 1257–1264.
26. Yasui Y, Tanaka T (2009) Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *J Carcinog* 8: 10.
27. Zhao Y, Zhang X, Guda K, Lawrence E, Sun Q, et al. (2010) Identification and functional characterization of paxillin as a target of protein tyrosine phosphatase receptor T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2592–2597.
28. Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R (2008) MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 68: 8195–8200.
29. Urruticocchea A, Aguilar H, Sole X, Capella G, Martin LA, et al. (2008) Pre-clinical validation of early molecular markers of sensitivity to aromatase inhibitors in a mouse model of post-menopausal hormone-sensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 109: 463–470.
30. Rohozinski J, Anderson ML, Broaddus RE, Edwards CL, Bishop CE (2009) Spermatogenesis associated retrogenes are expressed in the human ovary and ovarian cancers. *PLoS One* 4: e5064.
31. Takeuchi T, Watanabe Y, Takano-Shimizu T, Kondo S (2006) Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn* 235: 2449–2459.
32. Cleyne I, Van de Ven WJ (2008) The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 32: 289–305.
33. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409–1416.
34. Rogalla P, Kazmierczak B, Rohen C, Trams G, Bartnitzke S, et al. (1994) Two human breast cancer cell lines showing decreasing telomeric repeat length during early in vitro passaging. *Cancer Genet Cytogenet* 77: 19–25.
35. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, et al. (1991) NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77: 1080–1086.
36. Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roher HD (1990) Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res* 118: 48–63.
37. Tanaka J, Ogura T, Sato H, Hatano M (1987) Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model. *Virology* 161: 62–72.
38. Belge G, Kazmierczak B, Meyer-Bolte K, Bartnitzke S, Bullerdiek J (1992) Expression of SV40 T-antigen in lipoma cells with a chromosomal translocation T(3;12) is not sufficient for direct immortalization. *Cell Biol Int Rep* 16: 339–347.
39. Namba H, Hara T, Tukazaki T, Migita K, Ishikawa N, et al. (1995) Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF1/Cip1 pathway in human thyroid cells. *Cancer Res* 55: 2075–2080.
40. Estour B, Van Herle AJ, Juillard GJ, Totanes TL, Sparkes RS, et al. (1989) Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 57: 167–174.
41. Smith SD, Shatsky M, Cohen PS, Warnke R, Link MP, et al. (1984) Monoclonal antibody and enzymatic profiles of human malignant T-lymphoid cells and derived cell lines. *Cancer Res* 44: 5657–5660.
42. Brattain MG, Brattain DE, Sarrif AM, McRae LJ, Fine WD, et al. (1982) Enhancement of growth of human colon tumor cell lines by feeder layers of murine fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 69: 767–771.
43. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
44. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirota M, et al. (2005) Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 85: 1040–1050.
45. Stajich JE, Block D, Boulez K, Brenner SE, Chervitz SA, et al. (2002) The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res* 12: 1611–1618.
46. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.

3.2 Publikation II: Elevated levels of HMGB1 in cancerous and inflammatory effusions (Winter *et al.*, 2009)

Die Diagnose von Pleuraergüssen und Aszites stellt häufig ein Problem dar, denn meist ist eine eindeutige Ursache für die Flüssigkeitsansammlung im Pleuraspalt oder Bauchraum nicht auf den ersten Blick erkennbar. Um die Diagnostik zu vereinfachen, ist die Etablierung von eindeutigen Biomarkern zur Unterscheidung von Transsudaten und Exsudaten von großer Bedeutung. Auch die Differenzierung zwischen Exsudaten malignen oder entzündlichen Ursprungs ist dabei wichtig. Da ein Zusammenhang zwischen HMGB1 und inflammatorischen Mechanismen sowie malignen Neoplasien besteht, sollte in dieser Studie der Proteingehalt von HMGB1 in 36 Aszites und Pleurapunktaten bestimmt werden.

Die 36 Ergussproben wurden in maligne und entzündliche/infektiöse Exsudate unterteilt, als Kontrollgruppe dienten die Transsudate. Obwohl die Konzentration des Gesamtproteins innerhalb dieser drei Gruppen nur leichte Schwankungen aufwies (Transsudate 6,83 mg/ml; entzündliche Exsudate 7,83 mg/ml; maligne Exsudate 8,74 mg/ml), konnten Unterschiede in der Konzentration des HMGB1-Proteins nachgewiesen werden (Transsudate 36,62 ng/ml, entzündliche Exsudate 111,45 ng/ml, maligne Exsudate 118,00 ng/ml). Die Konzentration von HMGB1, relativ zur Gesamtproteinmenge, war in der Gruppe der Exsudate mit 0,0015% dreimal höher als in der Gruppe der Transsudate (0,0005%). Diese Berechnungen, bezogen auf den prozentualen Anteil von HMGB1, ergaben einen statistisch signifikanten Anstieg von HMGB1 in den Exsudaten ($p < 0,001$).



Elevated levels of HMGB1 in cancerous and inflammatory effusions

Nina Winter¹, Anke Meyer¹, Andreas Richter, Dietz Krisponeit, Jörn Bullerdiek

Anticancer Research 29 (12):5013-5017 (2009)

¹ Nina Winter und Anke Meyer sind gleichberechtigte Erstautoren der Publikation

Eigenanteil:

- Durchführung und Auswertung der Studie zusammen mit Anke Meyer
- Verfassen der Publikation zusammen mit Jörn Bullerdiek und Anke Meyer

Elevated Levels of HMGB1 in Cancerous and Inflammatory Effusions

NINA WINTER^{1*}, ANKE MEYER^{1*}, ANDREAS RICHTER¹, DIETZ KRISPONEIT² and JÖRN BULLERDIEK^{1,3}

¹Centre for Human Genetics, University of Bremen, 28359 Bremen;

²General Hospital Bremen Mitte, Centre for Internal Medicine, Hematology and Oncology, 28177 Bremen;

³Clinic for Small Animals and Research Cluster REBIRTH, University of Veterinary Medicine, 30137 Hannover, Germany

Abstract. *Background:* Recently, it has become obvious that the HMGB1 protein can act as a proinflammatory and proangiogenic mediator when actively secreted by macrophages or passively released from necrotic cells playing an important role in the pathogenesis of several diseases including cancer. *Materials and Methods:* The absolute and relative amount of HMGB1 was measured with an ELISA in different effusion types. *Results:* The amount of HMGB1 protein in the samples differed between 0.0004% and 0.0025% of the total sample protein. The mean values of transudates were significantly ($p < 0.001$) lower than the mean values of exudates. *Conclusion:* HMGB1, a so-called danger signalling protein, was found to be highly expressed in human pleural and peritoneal effusions due to cancer and inflammation. Compared to transudates the average level of HMGB1 was significantly higher in exudates. These results underline the characteristics of HMGB1 as a possible target for treatment in advanced cancer as well.

High mobility group box 1 (HMGB1), also known as amphoterin or HMG1, belongs to a group of chromatin-associated non-histone proteins characterized by low molecular weight, acidic solubility and high content of charged amino acids (1, 2). Proteins of the HMGB family, comprising HMGB1, HMGB2, and HMGB3, are characterized by two DNA-binding domains called HMG boxes (3). Currently the best analyzed member of this group is HMGB1. HMGB1 is an intracellular protein, which can

be secreted for example by activated monocytes, macrophages, and astrocytes and can be released by necrotic or damaged cells (4-6). Extracellular HMGB1 can signal through the receptor for advanced glycation end products (RAGE) (7, 8) and the toll-like receptors TLR2 and TLR4 (9-11). Activation of these receptors can enable nuclear factor kappa B (NF- κ B) signalling pathways linked to e.g. angiogenesis and/or inflammatory processes (9, 10, 12-15). In cancer, these angiogenic properties of HMGB1 can also lead to a better vascular supply resulting in a faster and greater growth of the tumor (11, 16). Generally, overexpression of HMGB1 has been detected in subsets of carcinomas of the breast (17, 18), tumors of the gastrointestinal tract (19), hepatocellular carcinomas (20), and malignant lymphomas (21).

The aim of this study was to measure the level of HMGB1 in effusions of various origin and to determine if effusions due to cancer or inflammatory disease show elevated levels of HMGB1 protein compared to these from transudates. Furthermore, it was investigated whether the amount of HMGB1 in effusions due to cancer is consistently increased or if it is not a general phenomenon in effusions of malignant tumors.

Patients and Methods

A total of 36 samples were collected from patients at the General Hospital Bremen Mitte, Bremen, Germany: 30 samples from pleural and 6 from ascitic effusions were obtained (Table I). As a control group patients with transudative effusions were included in this study as well; the most common cause for transudates is congestive heart failure or liver cirrhosis (22, 23), and as a rule no malignant or inflammatory background exists. Samples were subdivided into three groups, namely transudative effusions, infectious or inflammatory exudative effusions, and malignant exudative effusions.

Sample preparation. Samples of 50-100 ml pleural or peritoneal fluid were collected in 50 ml tubes and immediately frozen at -20°C for no more than 15 hours. After thawing, 2 ml of each sample were

*Both authors contributed equally to this paper.

Correspondence to: Jörn Bullerdiek, Centre for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, 28359 Bremen, Germany. Tel: +49 4212184239, Fax: +49 4212184239, e-mail: bullerd@uni-bremen.de

Key Words: HMGB1, angiogenesis, ELISA, exudates, transudates.

Table I. Samples from patients with various effusions and their total and relative HMGB1 concentration (T: transudate; E: exudate; P: pleural effusion; A: ascitic effusion).

Case no.	Type	Location	Death of patient	Observation time (days)	Diagnosis	Age (years)	HMGB1 total (ng/ml)	HMGB1 relative (%x1000)
1	T	P		25	Cardiac insufficiency	82	9.43	0.13
2	T	P		25	Cardiac insufficiency	82	2.83	0.04
3	T	P		1	Cardiac insufficiency	65	23.58	0.62
4	T	P		24	Cardiac insufficiency	69	51.42	0.81
5	T	P		6	Cirrhosis of the liver	60	4.62	0.06
6	T	A		32	Cirrhosis of the liver	49	7.60	0.23
7	T	P		77	Cardiac insufficiency	68	5.98	0.09
8	E	P		20	Pneumonia	91	36.57	0.80
9	T	A		600	Cardiac insufficiency, liver dysfunction	74	70.93	0.71
10	E	P		136	Lymphocytic chronic effusion	76	116.35	1.83
11	E	A		30	Peritonitis	58	57.60	1.10
12	E	A	†	757	Kidney transplantation/peritonitis	61	49.06	2.10
13	E	A		173	Pneumonia	71	35.22	0.24
14	E	P		23	Pneumonia	76	300.00	2.20
15	E	P		651	Post infectious	63	34.26	1.24
16	E	P		1	Suspicion of hyperergy (allergy)	60	261.13	2.33
17	E	P	†	35	Mycobacteriosis	75	129.59	1.64
18	E	P	†	208	Bacterial pleurisy	69	51.29	0.44
19	E	P		8	Pleurapneumonia	74	153.09	2.24
20	E	P		1	Hemorrhagic pulmonary infarction	58	113.25	1.58
21	E	P	†	62	Bronchial carcinoma	56	216.67	2.16
22	E	P	†	47	Mamma carcinoma	63	225.47	2.51
23	E	P	†	23	Carcinoma of the esophagus	48	58.49	0.56
24	E	P		807	Malignancy with unknown primary tumor	48	44.90	0.96
25	E	P	†	18	Mesothelioma	79	151.91	1.80
26	T	P		2	Cardiac insufficiency	47	82.96	0.74
27	E	P		742	Malignancy with unknown primary tumor	48	29.56	0.79
28	T	P		1	Renal insufficiency	82	19.07	0.39
29	E	P		1	Rendu-Osler disease, mesothelioma	62	92.06	1.65
30	E	P		105	Dedifferentiated adenocarcinoma	75	120.90	1.33
31	E	A	†	55	Mamma carcinoma	57	134.95	1.08
32	T	P	†	1	Cardiac insufficiency	66	124.36	2.23
33	E	P	†	26	Mesothelioma	58	136.67	1.57
34	E	P	†	30	Mamma carcinoma	63	118.33	1.36
35	E	P	†	22	Mamma carcinoma	63	156.57	1.43
36	E	P	†	1	Mamma carcinoma	53	47.57	0.57

taken and stored at -80°C until further use. A total of 200 μl of each sample were used for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Protein preparation. Total proteins were isolated with RIPA-buffer (containing: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA). Protein concentration was measured with the Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) following the manufacturer's instructions. All measurements were carried out in triplicate and compared to bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG) standard curves.

ELISA. A 2-step sandwich ELISA was performed using the HMGB1 ELISA Kit (Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan) following the manufacturer's instructions.

Analysis of results. All samples were measured at least in duplicate or triplicate, and the results were averaged. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test, with a significance level of $p < 0.05$. In addition the percentage of HMGB1 in comparison to the total protein amount was calculated.

Results

The effusions (Table I) were subdivided into the three groups: transudates (n=11), effusions due to inflammation or infectious diseases (n=12), and malignant effusions (n=13). Whereas the average total protein concentration within the groups showed only slight variation (transudates 6.83 mg/ml; inflammatory effusions 7.83 mg/ml; malignant effusions 8.74 mg/ml), the amount of HMGB1 strongly varied between 2.83 ng/ml (case

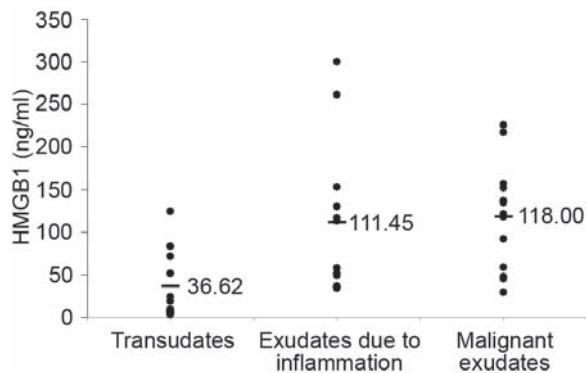


Figure 1. Average protein concentration of HMGB1 in effusion samples quantified with the ELISA.

no. 2, cardiac insufficiency) and 300.00 ng/ml (case no. 14, pneumonia) (Figure 1). The average HMGB1 concentration of the three groups was 36.62 ng/ml for the transudates, 118.00 ng/ml for malignant effusions, and 111.45 ng/ml for inflammatory effusions (Figure 1).

A highly significant association (t -test, $p < 0.001$) was found between the HMGB1 concentration and the existence of an exudate. Higher HMGB1 protein concentrations did not simply depend on the different cell densities varying in transudates and exudates (Figure 2). With regard to the percentage of HMGB1 present relative to the total protein amount, the increase in exudative effusions was also statistically significant ($p < 0.001$). The total HMGB1 protein level as well as HMGB1 relative to the total protein amount was three-fold higher in exudates than in transudates: 0.0005% in transudative effusions compared to 0.0015% from both groups of exudates.

Eleven patients died from their disease within two months after sampling, among these, one patient with a transudative effusion was affected by cardiac insufficiency, one by an inflammatory effusion and the others died from cancer. The patient dying from cardiac insufficiency showed the highest percentage of HMGB1 by far within this group. Within the exudative samples, no correlation between the HMGB1 concentration and survival of the patients was detected.

Discussion

HMGB1 plays an important role in tumorigenesis and acts as a proinflammatory mediator in the immune response (24, 25). This suggests that HMGB1 can serve as an important target in the diagnosis and management of exudative effusions. In the present study, most of the patients with transudative effusions had cardiac insufficiencies or renal dysfunctions (Table I). The exudative effusions were mainly caused by carcinoma or inflammatory diseases.

Recently several studies were carried out addressing 'newer' biomarkers for peritoneal and pleural effusions. A

cytological test was performed in which D2-40, X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), MOC-31, and Wilms tumor 1 (WT1) were tested (26), describing the markers MOC-31 and D2-40 as very sensitive and specific markers of epithelial and mesothelial cells, respectively, compared to the established calretinin. In addition to these newer markers, the classification with Light *et al.*'s criteria is amongst others the most common to differentiate between transudates and exudates (27). In our investigation, only slight differences of total protein amount were detected in the groups of effusions. Nevertheless, the total protein amount was lower for transudates than for exudates (6.83 mg/ml vs. 8.29 mg/ml).

The results of the present study demonstrate that the relative amount of HMGB1 was approximately three-fold higher in exudative effusions than in transudates. This significantly higher protein level was detected with the HMGB1 ELISA alone and also with regard to the total amount of protein (percentage of HMGB1). This definitively proves that the lower HMGB1 protein value is not caused by the lower cell densities in transudate samples.

A high HMGB1 protein level in the effusion may indicate highly active NF- κ B or mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways mediated by receptors such as *e.g.* RAGE or TLR (9, 10, 15). This could serve as an indicator for transformed cells (28). Malignant effusions due to metastatic spread represent a frequent problem in advanced cancer. Herein, it has been shown that malignant effusions are often characterized by high levels of the danger signaling protein HMGB1 that are in the same range as in effusions due to inflammatory processes. Extracellular HMGB1 has been linked to both inflammation and cancer. In the latter group of diseases HMGB1 can promote tumor growth by the stimulation of cell proliferation and by inducing neo-angiogenesis (9). On the other hand, HMGB1 is also able to stimulate dendritic cells and thus may support an immune response against tumor cells (29, 30). Antibodies against HMGB1 are able to reduce inflammation and suppress cell migration, tumor growth and metastasis formation (6, 15). The therapeutic use *e.g.* of HMGB1 antibodies instilled locally in case of malignant effusions remains to be investigated. While such therapy will reduce the proliferative potential of the cancer cells as well as their further spread, it might also repress a proper response of the immune system against the cancer cells (15, 31).

This is to the best of our knowledge the first report aimed at determining the concentration of HMGB1 in effusions and suggests interesting new approaches for the treatment of patients with malignant effusions.

Acknowledgements

We thank K. Sobczyk, T. Schwarz and N. Schwochow for excellent technical assistance. Furthermore, the Authors acknowledge the valuable technical support of E. Meyer.

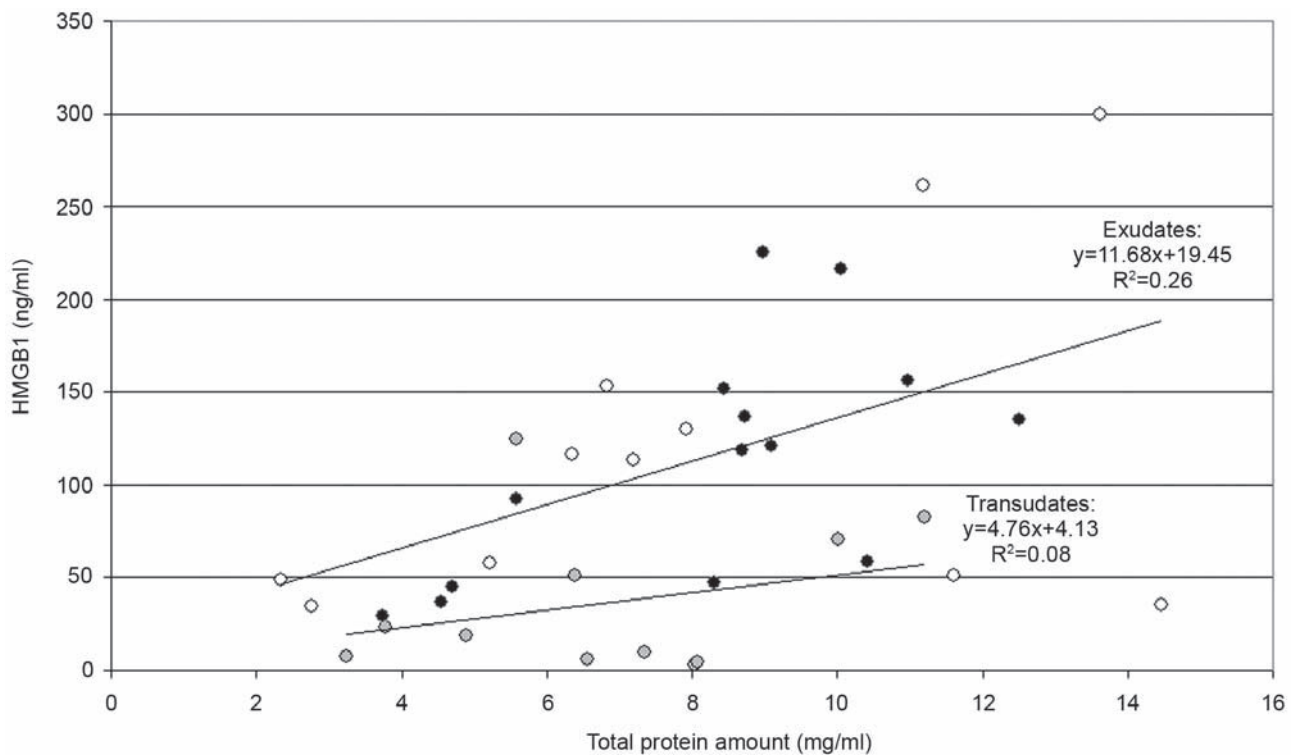


Figure 2. Concentration of HMGB1 in effusion samples quantified with the ELISA in correlation to total protein amount (light grey: transudates; black: malignant exudates; white: exudates due to inflammation).

References

- Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M and Bianchi ME: New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *Embo J* 20(16): 4337-4340, 2001.
- Goodwin GH, Sanders C and Johns EW: A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 38(1): 14-19, 1973.
- Landsman D and Bustin M: A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays* 15(8): 539-546, 1993.
- Passalacqua M, Patrone M, Picotti GB, Del Rio M, Sparatore B, Melloni E and Pontremoli S: Stimulated astrocytes release high-mobility group 1 protein, an inducer of LAN-5 neuroblastoma cell differentiation. *Neuroscience* 82(4): 1021-1028, 1998.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A and Tracey KJ: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285(5425): 248-251, 1999.
- Scaffidi P, Misteli T and Bianchi ME: Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418(6894): 191-195, 2002.
- Parkkinen J and Rauvala H: Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin. *J Biol Chem* 266(25): 16730-16735, 1991.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D and Schmidt AM: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270(43): 25752-25761, 1995.
- Schlueter C, Weber H, Meyer B, Rogalla P, Roser K, Hauke S and Bullerdiek J: Angiogenic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenic switch molecule. *Am J Pathol* 166(4): 1259-1263, 2005.
- van Beijnum JR, Buurman WA and Griffioen AW: Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high-mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 11(1): 91-99, 2008.
- van Beijnum JR, Dings RP, van der Linden E, Zwaans BM, Ramaekers FC, Mayo KH and Griffioen AW: Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature. *Blood* 108(7): 2339-2348, 2006.
- Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ and Rauvala H: Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res* 62(16): 4805-4811, 2002.
- Huttunen HJ, Fages C and Rauvala H: Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 274(28): 19919-19924, 1999.

- 14 Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA and Schmidt AM: Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 272(28): 17810-17814, 1997.
- 15 Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM and Schmidt AM: Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405(6784): 354-360, 2000.
- 16 Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, Melloni E and Presta M: Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol* 176(1): 12-15, 2006.
- 17 Brezniceanu ML, Volp K, Bosser S, Solbach C, Lichter P, Joos S and Zornig M: HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J* 17(10): 1295-1297, 2003.
- 18 Flohr AM, Rogalla P, Meiboom M, Borrmann L, Krohn M, Thode-Halle B and Bullerdiek J: Variation of HMGB1 expression in breast cancer. *Anticancer Res* 21(6A): 3881-3885, 2001.
- 19 Choi YR, Kim H, Kang HJ, Kim NG, Kim JJ, Park KS, Paik YK, Kim HO and Kim H: Overexpression of high-mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with *KIT* mutation. *Cancer Res* 63(9): 2188-2193, 2003.
- 20 Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Lu XF, Zhong N, Zhang ZL, Fan W and Li YQ: Serum high-mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 40(6): 446-452, 2008.
- 21 Meyer A, Staratschek-Jox A, Springwald A, Wenk H, Wolf J, Wickenhauser C and Bullerdiek J: Non-Hodgkin lymphoma expressing high levels of the danger-signalling protein HMGB1. *Leuk Lymphoma* 49(6): 1184-1189, 2008.
- 22 Joseph J, Badrinath P, Basran GS and Sahn SA: Do we need all three criteria for the diagnostic separation of pleural fluid into transudates and exudates? An appraisal of the traditional criteria. *Med Sci Monit* 9(11): CR474-476, 2003.
- 23 Kuiper JJ, van Buuren HR and de Man RA: Ascites in cirrhosis: a review of management and complications. *Neth J Med* 65(8): 283-288, 2007.
- 24 Zeh HJ, 3rd and Lotze MT: Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 28(1): 1-9, 2005.
- 25 Yang H, Wang H, Czura CJ and Tracey KJ: The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 78(1): 1-8, 2005.
- 26 Lyons-Boudreaux V, Mody DR, Zhai J and Coffey D: Cytologic malignancy *versus* benignancy: how useful are the 'newer' markers in body fluid cytology? *Arch Pathol Lab Med* 132(1): 23-28, 2008.
- 27 Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC and Ball WC Jr: Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 77(4): 507-513, 1972.
- 28 Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M and Rauvala H: Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *J Biol Chem* 268(26): 19726-19738, 1993.
- 29 Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ and Chiorazzi N: High-mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 173(1): 307-313, 2004.
- 30 Ulloa L and Messmer D: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(3): 189-201, 2006.
- 31 Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L and Kroemer G: Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 15(1): 3-12, 2008.

Received July 8, 2009

Revised October 30, 2009

Accepted November 2, 2009

3.3 Quantitative Expressionsanalyse des *HMGA2*-Gens in Aszites und Pleurapunktaten

(Nicht publizierte Ergebnisse)

Die Differenzierung zwischen entzündlichen und malignen Ergüssen ist wichtig für die weitere Vorgehensweise in der Behandlung. Als möglicher Marker bietet sich das *HMGA2*-Protein an, das hauptsächlich während der embryonalen Entwicklung exprimiert wird, eine Re-Expression allerdings bei einer Reihe von malignen Neoplasien auftritt. In dieser Studie wurde die *HMGA2*-Expression in Ergussproben von Patienten mit diversen Erkrankungen relativ quantifiziert. Ziel war es, mögliche Unterschiede in der Expression in Transsudaten sowie entzündlichen und malignen Exsudaten herauszufinden. Hierzu wurden 13 Aszites und 52 Pleurapunktate mittels Real-Time PCR untersucht (Abb 1). Bis auf eine Ausnahme konnte in allen Proben eine relative Expression von *HMGA2* gemessen werden. Der Mittelwert der *HMGA2*-Expression in den Transsudaten lag bei 5,01 (n=13) und in der Gruppe der Exsudate bei 194,54 (n=52). Dieser Anstieg von *HMGA2* in den Exsudaten war statistisch signifikant ($p < 0,042$). Nach einer weiteren Unterteilung in entzündliche (n=15) und maligne (n=37) Exsudate betragen die Mittelwerte der Expression jeweils 8,81 (entzündlich) und 269,84 (maligne). Auch hier wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der *HMGA2*-Expression in den malignen Exsudaten detektiert ($p < 0,045$).

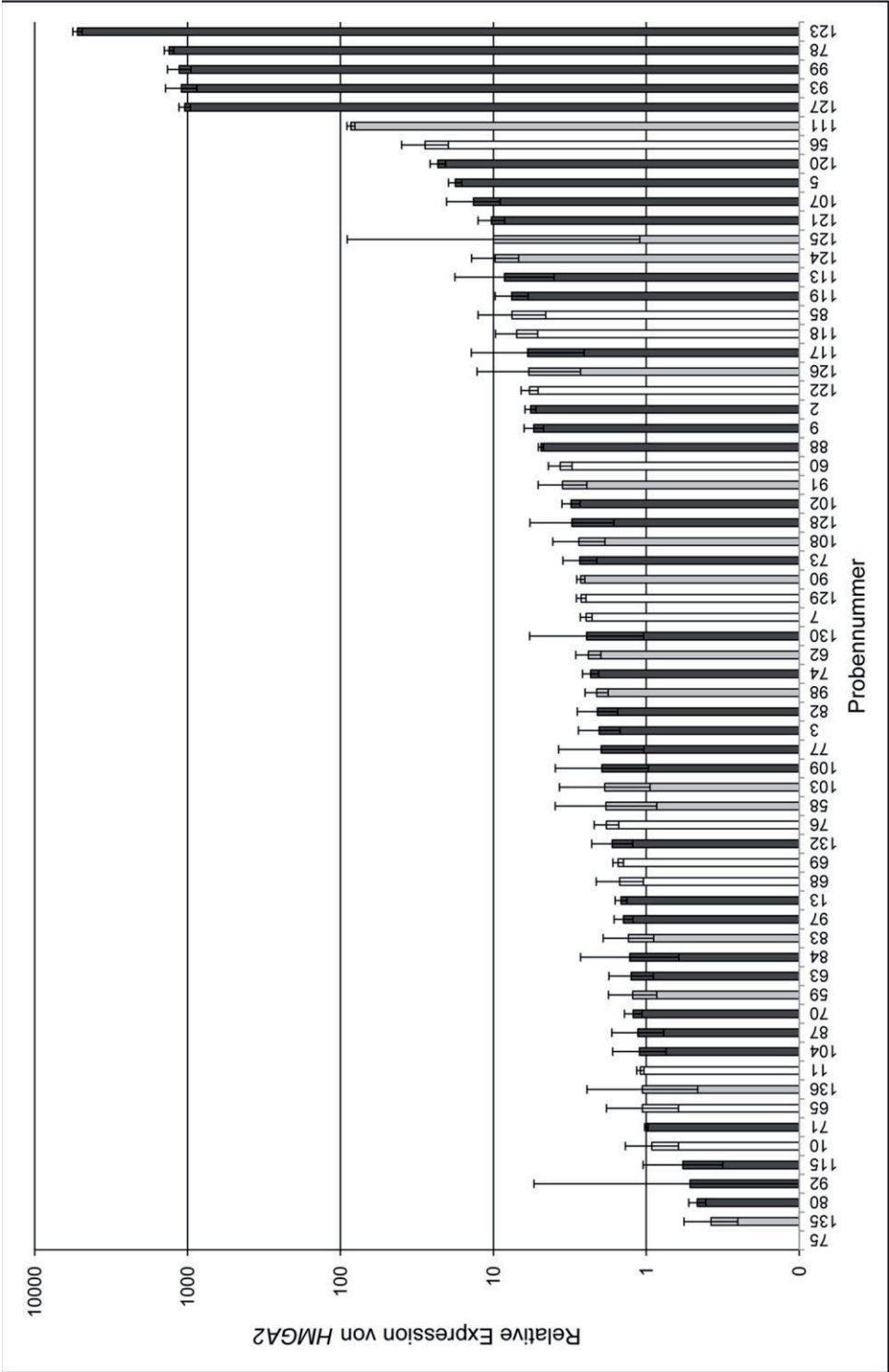


Abbildung 1: Logarithmische Darstellung der relativen HMG2-Expression in 65 Ergüssen von Patienten mit unterschiedlicher Diagnose (weiß: Transsudate; grau: entzündliche Exsudate; schwarz: maligne Exsudate).

3.4 Publikation III: Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2 - implications for noninvasive prenatal diagnosis (Winter *et al.*, 2008)

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Expression von *HMGA2* in Zellen aus Fruchtwasserproben gemessen und überprüft, in wie weit HMGA2-Proteine mit der fetalen DNA assoziiert sind.

Es konnte eine Überexpression von *HMGA2* in Zellen des Fruchtwassers bestimmt werden. Im Vergleich zu Zellen aus Urinproben (n=8) von gesunden, nicht schwangeren Probanden war die *HMGA2*-Expression in den Proben der Fruchtwasserzellen (n=58) 161-fach erhöht. Statistische Untersuchungen zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Fruchtwasserzellen und den Kontroll-Zellen ($p < 0,0001$). Die Messung der mRNA-Konzentration ergab in beiden Gruppen die gleiche Ausbeute.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob HMGA2-DNA-Komplexe im Fruchtwasser vorliegen. Dazu wurde eine modifizierte Methode der Chromatin Immunopräzipitation angewendet, mit der zellfreie Protein-DNA-Komplexe mit Hilfe eines anti-HMGA2-Antikörpers gezielt isoliert werden. Verglichen wurde die jeweilige Probe mit einer Negativkontrolle, die ohne Antikörper inkubiert wurde. Dadurch ist es möglich die Anreicherung der DNA-Fragmente mittels Real-Time PCR zu messen. Als Genabschnitt wurde in diesem Fall *GAPDH* ausgewählt. In allen 5 Proben konnte eine Anreicherung des zellfreien *GAPDH*-Fragments von 3- bis 200-fach gemessen werden. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur das Vorhandensein von HMGA2 in den Fruchtwasserzellen, sondern auch, dass HMGA2 an die zellfreie DNA gebunden vorliegt.



Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2-implications for noninvasive prenatal diagnosis

Nina Winter, Armin Neumann, Jörn Bullerdiek

Prenatal Diagnosis 28 (12):1126-1130 (2008)

Eigenanteil:

- Durchführung und Auswertung der Studie
- Verfassen der Publikation zusammen mit Jörn Bullerdiek

Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to *HMGA2* –implications for noninvasive prenatal diagnosis

N. Winter¹, A. Neumann³ and J. Bullerdiek^{1,2*}

¹Center for Human Genetics, University of Bremen, Bremen, Germany

²Clinic for Small Animals and research cluster REBIRTH, University of Veterinary Medicine, Hanover, Germany

³Practice for Prenatal Medicine, Bremen, Germany

Objective The expression of the high mobility group protein gene *HMGA2* is primarily confined to embryonic and fetal cells. The aim of this study was to determine the relative expression level of *HMGA2* in cells of amniotic fluid samples. Furthermore, it should be investigated by chromatin immunoprecipitation whether or not *HMGA2* is attached to cell-free DNA in amniotic fluid.

Method Expression levels of *HMGA2* in 58 amniotic fluid samples from the second trimester were measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Furthermore, the presence of *HMGA2*, attached to cell-free DNA was tested by chromatin immunoprecipitation.

Results Expression of *HMGA2* was detected in all samples, but in cells of the amniotic fluid it was 161-fold higher than in cells of the urine from healthy donors. The real-time PCR with *GAPDH* showed a signal in all samples treated with the improved protocol of immunoprecipitation.

Conclusion Our data clearly show that cells of the amniotic fluid strongly overexpress *HMGA2* according to their fetal origin. The fact that apparently *HMGA2* remains to be attached to cell-free DNA suggests interesting new approaches in noninvasive prenatal diagnosis. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: *HMGA2*; chromatin immunoprecipitation; amniotic fluid; cell-free fetal DNA; quantitative real-time PCR; RNA < fetal cells; nucleic acids and proteins

INTRODUCTION

The high mobility group protein *HMGA2* is a DNA-binding protein that attaches to the DNA by three binding motifs called AT-hooks. Binding occurs with little sequence specificity preferentially at the minor groove of DNA (Reeves and Nissen, 1990). *HMGA2* can induce conformational changes of DNA structure thereby influencing the transcriptional activity of many genes (Bustin and Reeves, 1996). There are several data available showing that in mammals the expression of *HMGA2* is mainly restricted to embryonic and fetal development while in adult its expression is confined to a few cell types only (Rogalla *et al.*, 1996; Gattas *et al.*, 1999) as, e.g. CD34 positive stem cells in the bone marrow (Rommel *et al.*, 1997). With current sensitive methods *HMGA2* mRNA expression is detectable in adult tissue as well as shown herein for the urine cells. Nevertheless, the amount of protein is usually too low to be detected. However, in adults, reexpression of *HMGA2* due to rearrangements of its gene locus occurs in frequent benign tumors (Ashar *et al.*, 1995; Schoenmakers *et al.*, 1995) and in malignant tumors increased expression is a frequent finding as, e.g. reported for lung cancer (Sarhadi *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2007), breast cancer (Rogalla *et al.*, 1997) and leukemia (Rommel *et al.*, 1997) (for review see Cleynen, 2007; Fusco and Fedele, 2007).

In contrast to the embryogenesis of mice (Hirring-Folz *et al.*, 1998), only a few human embryonic and fetal tissues have been tested for expression of *HMGA2* mRNA (Rogalla *et al.*, 1996). To the best of our knowledge, no data are available yet on the expression of that gene in cells of the amniotic fluid. These cells are currently the most widely used source of cells for 2nd trimester prenatal cytogenetic diagnosis and their major origin seems to be the urogenital tract of the fetus (Mann *et al.*, 1996). In addition to amniotic fluid cells, cell-free DNA obtained from amniotic fluid recently turned out to be a valuable source for genetic analysis (Lapaire *et al.*, 2007).

Herein, we have tested cells from 58 amniotic fluid samples for the expression of *HMGA2*. In addition, it has been tested by immunoprecipitation whether or not cell-free *HMGA2* occurs in the amniotic fluid and remains to be attached to fetal DNA. If the latter is the case it would have considerable implications for noninvasive prenatal diagnosis because immunoprecipitation against *HMGA2* could be used to select for fetal DNA, e.g. from maternal blood.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Amniotic fluid samples taken by amniocentesis in the 2nd trimester were centrifuged at 1000 × g. A measure

*Correspondence to: J. Bullerdiek, Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, D-28359 Bremen, Germany. E-mail: bullerd@uni-bremen.de

of 4–7 mL of the supernatant was applied to isolate total RNA and 2 mL of randomly selected amniotic fluid samples was used for the chromatin immunoprecipitation. Cells in the urine (30–60 mL urine per sample) of healthy nonpregnant volunteers served as control. All samples from patients and volunteers were taken with informed consent according to the local ethics committee.

RNA isolation

As to the analysis of *HMGA2* mRNA expression in amniotic fluid cells and controls, the total RNA was extracted from cells of the amniotic fluid samples and of control urine samples using the Zymo Research Urine RNA Isolation Kit (HISS Diagnostics, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantitated spectrophotometrically.

Reverse transcription

Reverse transcription (RT) was carried out in a 20- μ L volume containing 10 μ L (about 150 ng) of total RNA, 150 ng of random hexamer primers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and 10 mM of dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). After incubating at 65 °C for 5 min 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 100 mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 5 \times First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and 40 U RNase OUT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were added. RT reaction mixtures were incubated for 10 min at 25 °C, followed by 50 min at 37 °C and 15 min at 70 °C. The resulting cDNAs were used as template in the subsequent quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR).

Quantitative real-time RT-PCR

For relative quantification of *HMGA2* levels, RT-PCR amplifications were carried out using the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). As much as 2 μ L of each cDNA was amplified in a total volume of 20 μ L using universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). For detection of the target gene *HMGA2*, 1 μ L of *HMGA2*-assay (Hs00171569_m1) was added (Applied Biosystems). *HPRT* served as endogenous control where 10 μ M of each primer (forward primer: 5'-GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG TCA A-3', reverse primer: 5'-GTC TGG CTT ATA TCC AAC ACT TCG T-3') and 20 μ M fluorescent probe (5'-6-FAM-CAA GCT TGC TGG TGA AAA GGA CCC C-TAMRA-3', Applied Biosystems) were used. PCR conditions were as follows: 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles at 95 °C and 1 min at 60 °C. All samples were measured in triplicate and for each run, nontemplate controls and no reverse transcriptase controls were included.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Amniotic fluid was centrifuged at 1000 \times g for 10 min, and 2 mL of the supernatant was transferred to a 13-mL tube. To cross-link the protein DNA complexes, 37% formaldehyde was added to a final concentration of 1%. Cross-linking was performed between 2 and 6 h after amniocentesis. After 10 min of incubation at room temperature, the cross-linking reaction was stopped by adding 1 M glycine to a final concentration of 0.125 M. The sample was divided by half and transferred to two 1.5-mL tubes, and 50 μ L of Protein A/G Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was added to each tube. The samples were shaken for 30 min at 4 °C, followed by centrifugation at 14000 rpm (20, 800 \times g) for 5 min at ambient temperature. The supernatants were transferred to fresh 1.5 mL tubes. A quantity of 5 μ L containing 1 μ g of the *HMGA2* specific antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was added to one tube, and both tubes were incubated overnight on the rotator at 4 °C. The specificity of the *HMGA2* antibody was verified in former studies by performing western blot analysis (data not shown).

On the following day, for each sample, 50 μ L of Protein A/G Agarose was mixed with 3 μ g salmon sperm DNA and 250 μ L 1 \times PBS by rotation for 30 min at 4 °C. The agarose/salmon sperm DNA mix was added to the sample and the no-antibody control and rotated for 2 h at 4 °C. The agarose beads were collected by centrifugation at 12000 rpm (15300 \times g) for 1 min; the supernatants were discarded and the tubes were placed on ice. To wash the agarose beads, 1 mL Lysis High Salt Buffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was added to each tube, and the tubes were incubated for 2 min at room temperature on the rotator. After centrifugation for 1 min at 12000 rpm (15300 \times g), the supernatants were discarded. This washing step was repeated once, and then the beads were washed twice with 1 mL of wash buffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) for 2 min on the rotator. After centrifugation at 12000 rpm (15300 \times g) for 1 min, the supernatants were discarded and the agarose beads were resuspended in 150 μ L of 1% sodium dodecyl sulphate solution. The samples were incubated in a shaking waterbath at 65 °C for 2 h to reverse the cross-links, centrifuged at 12000 rpm (15300 \times g) for 3 min, and incubated overnight in the shaking waterbath at 65 °C.

To remove residual agarose beads, the samples were centrifuged at 12000 rpm (15300 \times g) for 3 min and the supernatants transferred to new 2.0-mL tubes. They were then diluted at a ratio of 1:2 with water to avoid precipitation, and 5 volumes of buffer PBI (Qiagen PCR Purification Kit) was added to each sample. A measure of 700 μ L of each sample was applied to QIAquick Spin Columns (Qiagen, Hilden, Germany) and centrifuged for 1 min at 13000 rpm (17900 \times g). This step was repeated until the samples were applied to the columns completely. The columns were washed with 700 μ L buffer PE and centrifuged at 13000 rpm (17900 \times g) for 1 min; the flow through was discarded; and the columns

CELL-FREE DNA IN AMNIOTIC FLUID

were re-centrifuged to remove residual buffer. To elute the DNA, the columns were transferred to new 1.5-mL tubes and 40 μ L water was applied to the membrane of the columns. After incubation at room temperature for 1 min, the columns were centrifuged at 13000 rpm ($17900 \times g$) for 1 min. The flow through was applied to the membrane of the columns to increase the final DNA concentration, incubated for 1 min at room temperature, and the columns were centrifuged again at 13000 rpm ($17900 \times g$) for 1 min. Finally, the eluted DNA was immediately used for real-time PCR or stored at -20°C .

Real-time PCR with genomic DNA

To determine the possible enrichment of DNA resulting from the ChIP experiment, the samples were measured with the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (for concentrations and cycling conditions see protokol above). Two microliters of every sample and its respective no-antibody control were used to detect the *GAPDH* gene. The sequences for *GAPDH* were 5'-6-FAM-AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC-TAMRA-3' for the fluorescent probe, 5'-CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC-3' for the forward primer, and 5'-CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT-3' for the reverse primer (Operon, Cologne, Germany). Results were calculated by subtracting the Ct-value of the sample from the corresponding NoAb control, followed by $2^{(\text{sample} - \text{NoAb control})}$ to evaluate the x -fold higher amount of starting material of the sample applied in the real-time PCR.

RESULTS

When comparing the *HMGA2* expression level in cells from amniotic fluid samples ($n = 58$) and from urine

samples ($n = 8$) of apparently healthy nonpregnant volunteers, a strong overexpression of *HMGA2* in amniotic fluid cells becomes evident. The average expression level in the amniotic fluid cells exceeded that of urine cells 161-fold. Moreover, no overlap between samples of the two groups was seen (Figure 1, Table 1). Accordingly, statistical analysis revealed highly significant differences between the amniotic fluid cells and the control cells taken from urine ($P < 0.0001$; unpaired t -test with Welch's correction) whereas the yield of mRNA from both amniotic fluid and urine was in the same range.

As a next step, it was checked if *HMGA2*-DNA aggregates could be found in the amniotic fluid. For the latter investigations, a modified chromatin immunoprecipitation procedure was applied that allowed to isolate these complexes by an anti-*HMGA2* antibody and to analyze the DNA fragments attached to *HMGA2* in the complexes. In this study five amniotic fluid samples were tested. Compared to the NoAb-control isolated fragments containing *GAPDH* were clearly enriched, indicating not only the presence of *HMGA2* in the amniotic fluid but also cell-free DNA being attached to it (Table 2).

DISCUSSION

The results of the present study place amniotic cells of the 2nd trimester among the cells strongly overexpressing *HMGA2*. These cells are known to originate mainly from the urogenital tract of the fetus as, for example, shown by Mann *et al.* (1996), but other cell types might contribute to the high *HMGA2* expression, too. As described, previously fetal tissues show a high expression level of *HMGA2* (Rogalla *et al.*, 1996) and this holds true as well for cells of the amniotic fluid, which derive directly from the fetus. The average *HMGA2* expression level measured in cells of amniotic fluid is 263, whereas the lowest sample shows an expression of

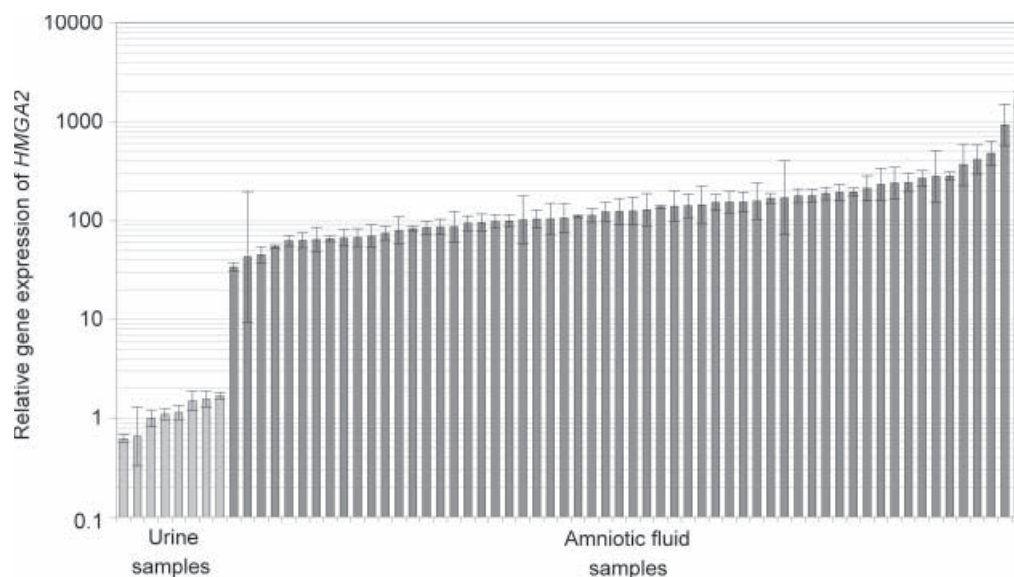


Figure 1—Relative *HMGA2*-expression of cells from urine and amniotic fluid samples

N. WINTER ET AL.

Table 1—Results of the relative expression analysis for *HMGA2* in the amniotic fluid of women in the 2nd trimester using quantitative real-time PCR

Sample No.	Days of pregnancy	Relative expression of <i>HMGA2</i>	Karyotype	Sample No.	Days of pregnancy	Relative expression of <i>HMGA2</i>	Karyotype
1	148	33.86	46,XY, 9qh ⁺	31	108	128.76	46,XY
2	109	42.91	46,XX	32	109	136.90	46,XX
3	98	45.18	46,XX	33	110	139.78	46,XX
4	111	54.65	46,XX	34	95	141.12	46,XX
5	106	62.37	46,XY	35	95	144.20	46,XY
6	118	62.99	46,XY	36	108	152.76	46,XX
7	106	64.20	46,XY	37	112	153.50	46,XY
8	110	65.64	46,XY	38	98	154.04	46,XX
9	103	66.62	46,XY	39	105	157.42	46,XX
10	116	67.39	46,XY	40	109	168.08	46,XX
11	120	69.81	46,XY	41	109	169.84	46,XY
12	110	74.56	46,XY	42	108	177.89	46,XX
13	108	79.76	46,XY	43	107	178.17	46,XX
14	108	82.76	46,XX	44	112	187.92	46,XX
15	106	85.05	46,XY	45	95	192.92	46,XY
16	104	86.26	46,XY	46	127	194.28	46,XY
17	106	86.57	46,XY	47	132	212.48	46,XX
18	113	94.09	46,XX	48	106	232.36	46,XX
19	106	95.46	46,XX	49	109	240.00	46,XX
20	104	97.78	46,XX	50	109	242.68	46,XX
21	114	99.09	46,XY	51	112	268.26	46,XX
22	101	101.81	46,XX	52	106	280.19	46,XX
23	109	103.69	46,XX	53	101	281.33	46,XY
24	100	103.79	46,XY	54	110	368.03	46,XY, inv. (9)
25	101	105.94	46,XY	55	115	414.67	46,XX
26	119	110.92	46,XY	56	109	478.47	46,XY
27	103	112.67	46,XX	57	101	928.67	46,XX
28	108	122.60	46,XY	58	124	1721.17	46,XY
29	105	123.85	46,XY				
30	161	125.19	46,XY				

Table 2—Enrichment of DNA with the ChIP method in amniotic fluid samples, tested with *GAPDH* (Substraction of the NoAb control from ChIP sample; 2^{difference} means the *x*-fold higher amount of raw material applied to the real-time PCR, whereas 1 means the same amount of starting material)

Sample	<i>GAPDH</i> (Ct ^{sample} – Ct ^{NoAb})	<i>GAPDH</i> <i>x</i> -fold enrichment	Days of pregnancy	Karyotype
A	1.63	3.1	107	46,XY
B	4.04	16.5	100	46,XY
C	4.53	23.1	112	46,XY
D	5.34	40.6	113	46,XY, rob (14,21) mat, +21
E	7.64	199.9	100	46,XX

34. This is still a 20-fold overexpression compared to the urine sample with the highest *HMGA2* level. Urine samples have a mean expression of *HMGA2* of 1.15.

In a recent paper by Peter *et al.* the occurrence of cell-free DNA in the amniotic fluid has been demonstrated (Peter *et al.*, 2008). The results of the present study confirm the results of this paper. The data of the immunoprecipitation experiment demonstrate that cell-free DNA from amniotic fluid samples is present and can be enriched by using antibodies directed against *HMGA2* as shown by quantitative real-time PCR. The factor of enriched DNA in the amniotic fluid samples ranged from about 3 to 200 fold (Table 2); 1 this could be caused by

different periods of time, in which the samples were cross-linked. They were processed between 2 and 6 h after amniocentesis and it is possible that the *HMGA2* protein detaches constantly from the DNA throughout the time. For further experiments samples should be treated with formalin directly after amniocentesis to restrain the separating of protein and DNA.

Because cell-free fetal DNA is also detectable in the blood of pregnant women (Al-Yatama *et al.*, 2001; Majer *et al.*, 2007), immunoprecipitation by anti-*HMGA2* antibodies could generally be useful to specifically enrich fetal/embryonic DNA from these sources. Cell-free DNA in maternal blood is thought to originate mainly

CELL-FREE DNA IN AMNIOTIC FLUID

from trophoblastic cells which were shown to abundantly express *HMGA2* in mice compared to other tissues (Hirning-Folz *et al.*, 1998). Furthermore, over-expression of *HMGA2* has also been described for many tumors making it tempting to speculate that basically the same procedure can also be applied to enrich cell-free tumor DNA from patient's blood. *HMGA2* stably remains to be attached to the DNA and thus DNA-*HMGA2* complexes can be expected to be released from these cells highly expressing *HMGA2*.

REFERENCES

- Al-Yatama MK, Mustafa AS, Ali S, Abraham S, Khan Z, Khaja N. 2001. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* **21**: 399–402.
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, *et al.* 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* **82**: 57–65.
- Bustin M, Reeves R. 1996. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**: 35–100.
- Cleynen I, Van de Ven WJ. 2007. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* **32**: 289–305.
- Fusco A, Fedele M. 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 899–910.
- Gattas GJ, Quade BJ, Nowak RA, Morton CC. 1999. HMGIC expression in human adult and fetal tissues and in uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* **25**: 316–322.
- Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H. 1998. The expression pattern of the Hmgic gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* **23**: 350–357.
- Lapaire O, Lu XY, Johnson KL, *et al.* 2007. Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenat Diagn* **27**: 616–621.
- Majer S, Bauer M, Magnet E, *et al.* 2007. Maternal urine for prenatal diagnosis—an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenat Diagn* **27**: 1219–1223.
- Mann SE, Nijland MJM, Ross MG. 1996. Ovine fetal adaptations to chronically reduced urine flow: preservation of amniotic fluid volume. *J Appl Physiol* **81**: 2588–2594.
- Meyer B, Loeschke S, Schultze A, *et al.* 2007. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* **46**: 503–511.
- Peter I, Tighiouart H, Lapaire O, Johnson KL, Bianchi DW, Terrin N. 2008. Cell-free DNA fragmentation patterns in amniotic fluid identify genetic abnormalities and changes due to storage. *Diagn Mol Pathol* **17**: 185–190.
- Reeves R, Nissen MS. 1990. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* **265**: 8573–8582.
- Rogalla P, Drechsler K, Frey G, *et al.* 1996. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* **149**: 775–779.
- Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. 1997. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* **19**: 153–156.
- Rommel B, Rogalla P, Jox A, *et al.* 1997. HMGI-C, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* **26**: 603–607.
- Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, *et al.* 2006. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* **209**: 206–212.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* **10**: 436–444.

3.5 Quantitative Expressionsanalyse des *HMGA2*-Gens in Urinproben von schwangeren Frauen

(Nicht publizierte Ergebnisse)

Im Fruchtwasser konnte eine erhöhte Expression von *HMGA2* bestätigt werden. Ob diese auch im Urin von schwangeren Frauen nachweisbar ist, sollte in dieser Studie untersucht werden. Aus Zellen von 14 Urinproben, abgegeben in der 17. bis 39. Schwangerschaftswoche, wurde die mRNA isoliert und die Expression von *HMGA2* mit Hilfe der Real-Time PCR bestimmt. Als Kontrolle wurden 8 Urinproben von Männern und nicht schwangeren Frauen hinzugezogen. *HMGA2* konnte in allen 22 Proben nachgewiesen werden. Innerhalb der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den Proben der Männer (MW=1,50) und denen der nicht schwangeren Frauen (MW=1,91). Die relative Expression von *HMGA2* in der Gruppe der Schwangeren reichte von 0,17 bis 35.288,37 (Abb. 2). Der Mittelwert in der Kontrollgruppe lag bei 1,70 und in der Gruppe der Schwangeren bei 1.643,48.

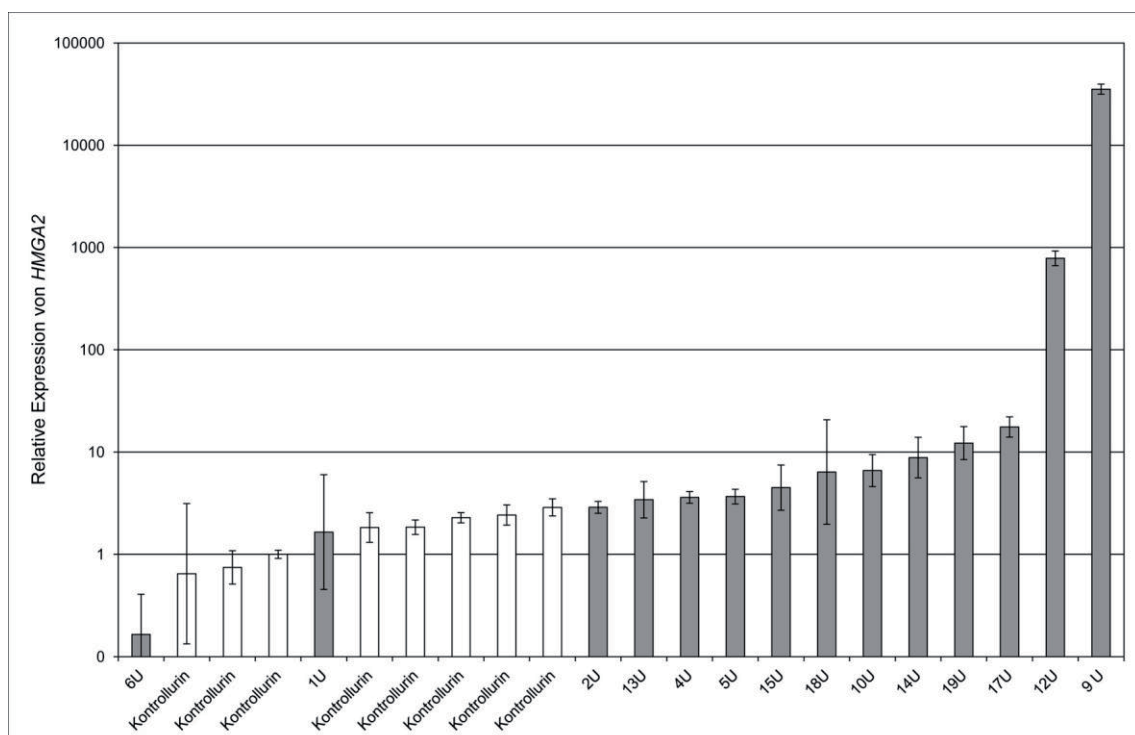


Abbildung 2: Logarithmische Darstellung der relativen *HMGA2*-Expression in 22 Urinproben von schwangeren (grau) und nicht schwangeren Probanden (weiß).

4 DISKUSSION

4.1 HMGA2-Bindestellen

Die HMGA2-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Organisation des Chromatins, der Expressionsregulierung verschiedener Gene und der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren. Dabei sind sie wesentlich an der Koordination von Proliferation und Differenzierung beteiligt, eine Störung dieser Prozesse kann benigne, aber auch maligne Neoplasien zur Folge haben. Versuche mit „knock-out“-Mäusen, bei denen HMGA2 homozygot deletiert wurde, haben gezeigt, dass es zu einem verminderten Wachstum (pygmy-Phänotyp) und einer starken Reduktion des Fettgehaltes kommt (Zhou *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu konnte bei transgenen Mäusen, bei denen ausschließlich eine trunkierte Variante von HMGA2 exprimiert wird, ein „giant“-Phänotyp mit Fettleibigkeit und einem erhöhten Vorkommen von Lipomen beobachtet werden (Battista *et al.*, 1999; Arlotta *et al.*, 2000). HMGA2 ist bedeutend für die Entwicklung und das Wachstum des ganzen Organismus, dies bestätigen auch neuere Studien bezüglich der Körpergröße des Menschen (Weedon *et al.*, 2008). Durch SNP-Analysen (Single Nucleotide Polymorphism) konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Thymin durch Cytosin innerhalb der 3'-UTRs des *HMGA2*-Gens ein Größenwachstum des Individuums von durchschnittlich ca. 1 cm zur Folge hat (Weedon *et al.*, 2007).

Um einen Beitrag zur Aufklärung des breiten Wirkungsspektrums des HMGA2-Proteins zu leisten, war ein Ziel dieser Arbeit, die Bindung des Proteins im humanen Genom an unbekannte Zielsequenzen *in vivo* zu untersuchen und zu charakterisieren. Hierzu wurde mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation eine Bibliothek erstellt, in der HMGA2-gebundene DNA-Fragmente angereichert vorliegen. Bisher beschränkten sich die meisten Untersuchungen der HMGA2-Bindestellen auf Promotorregionen ausgesuchter Gene. Tessari *et al.* konnten beispielsweise eine Regulation des Cyclin A-Gens durch HMGA2 nachweisen, welches eine entscheidende Rolle in der Steuerung des Zellzyklus spielt (Tessari *et al.*, 2003). Ein Zusammenhang besteht auch zwischen dem *Imp2*-Gen und HMGA2. Hier bindet HMGA2 an eine AT-reiche, regulatorische Region im ersten Intron, die möglicherweise als Enhancer oder alternativer Promotor eines verkürzten *Imp2*-Gens fungiert. In Untersuchungen an Liposarkomen konnten Cleynen *et al.* zeigen, dass eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der *HMGA2*- und *Imp2*-Expression

besteht (Cleyne *et al.*, 2007). Dieser Zusammenhang zeigte sich auch in Versuchen mit den Zelllinien MCF-7, MRLH-215, S277 und HCT116, bei denen die Expression der beiden Gene gleichzeitig anstieg (Winter, unveröffentlichte Ergebnisse). Ein weiterer Interaktionspartner von HMGA2 ist das *ERCC1*-Gen, welches an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt ist. Durch die Bindung von HMGA2 an den Promotorbereich wird *ERCC1* herunter reguliert (Borrmann *et al.*, 2003). Bis vor kurzem waren nur drei weitere Zielgene von HMGA2 identifiziert: *CDC2*, *TK1* und Cyclin E1, die alle wichtige Funktionen innerhalb des Zellzyklus übernehmen (Fedele *et al.*, 2006). Allerdings konnten in einer aktuellen Studie von Zha *et al.* (2012) weitere potentielle Zielgene von HMGA2 identifiziert werden. In einer Genom-weiten ChIP-on-Chip-Analyse an einer Magenkarzinom-Zelllinie wurden 1366 mögliche Bindestellen von HMGA2 erkannt und diese auf ihre biologischen Funktionen untersucht. Dabei konnten 140 Signalwege ausfindig gemacht werden, in denen mindestens zwei Gene direkte Bindungspartner von HMGA2 sind. Dazu gehören unter anderem der MAP-Kinase-, Wnt-, p53-, VEGF-, Notch- und TGF- β -Signalweg, in denen HMGA2 eine wichtige Rolle als Vermittler bei der Kontrolle von epithelialer Differenzierung, Tumorinvasivität und Metastasenbildung spielt (Ayoubi *et al.*, 1999; Thuault *et al.*, 2006; Queimado *et al.*, 2007; Markowski *et al.*, 2011; Zha *et al.*, 2012). Die Beteiligung der HMGA2-Proteine an vielen Prozessen wie der Veränderung der Chromatinstruktur, Chromosomen-Kondensation, DNA-Reparatur, Protein-Protein-Interaktion und die Funktion als genregulatorischer Transkriptionsfaktor lässt vermuten, dass eine große Anzahl von HMGA2-Bindestellen im humanen Genom vorliegt (Reeves, 2001). Ebenso impliziert die Bindung von HMGA an AT-reiche DNA-Abschnitte, aber auch an DNA mit ungewöhnlichen strukturellen Eigenschaften, wozu gebogene und superhelikale DNA, synthetische „four-way-junctions“ (Hill *et al.*, 1999), sowie eingeschränkte Regionen der DNA auf der Oberfläche von nukleosomalen Kernpartikeln gehören, eine umfangreiche Besetzung der DNA mit potentiellen Bindestellen (Reeves, 2001).

Cui und Leng fanden heraus, dass HMGA2 mit höchster Affinität an eine 15 bp-lange Konsensussequenz bindet, wenn diese ein bestimmtes Sequenzmuster von fünf GC-reichen Basenpaaren, flankiert von fünf AT-reichen Basenpaaren aufweist (Cui *et al.*, 2007). Diese Konsensussequenzen wurden mit den in der vorliegenden Arbeit generierten ChIP-Fragmenten verglichen. Dabei konnte keine Übereinstimmung im Sequenzmuster gefunden werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass HMGA2 *in*

in vivo auch an Proteine bindet, die mit der DNA assoziiert sind. Diese DNA-Abschnitte können bei einer SELEX-Untersuchung nicht detektiert werden, da es sich dabei um „nackte“ DNA handelt. Außerdem hat HMGA2 die Fähigkeit, mit seinen drei AT-Hooks an unterschiedliche DNA-Segmente zu binden. Zwei AT-Hooks könnten so beispielsweise an einer Stelle der DNA binden und der andere an einem weit entfernten DNA-Abschnitt, der durch Schlaufenbildung räumlich nahe der ersten Bindestelle liegt (Pfannkuche *et al.*, 2009).

Die zwei in der SELEX-Studie generierten Sequenzen mit der höchsten Bindungsaffinität von HMGA2 kommen im gesamten humanen Genom sechs Mal vor. Dies ist für ein Protein, welches an so vielen Funktionen beteiligt ist, äußerst selten. Die Bindung an diese Sequenzen ist zwar höchst effizient, aber möglicherweise zu stark für die dynamische Regulation der biologischen Prozesse *in vivo*. Die Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten ChIP-Sequenzen ergab, dass bei 3/4 der Fragmente ein höherer AT-Gehalt als der durchschnittliche Wert im humanen Genom vorliegt. Es ist bekannt, dass HMGA2 AT-reiche Abschnitte bevorzugt, allerdings sind für eine optimale Bindung zwei bis drei separierte AT-Bereiche notwendig (Maher *et al.*, 1996). Bei der ChIP-DNA handelt es sich um 105 bp bis 1.848 bp lange Fragmente, und zur Eingrenzung einer möglichen Bindestelle von HMGA2 wurde nach Konsensussequenzen gesucht. Ein Vergleich der Sequenzen untereinander zeigte, bis auf zwei Ausnahmen, bei allen Proben, eine Vielzahl von konservierten AT-Bereichen. Die Ausnahme der beiden ChIP-Sequenzen mit nur einem AT-Bereich lässt sich dadurch erklären, dass HMGA2 nicht notwendigerweise direkt an die DNA bindet. Diese Fragmente können über einen Komplex von HMGA2 mit DNA-assoziierten Proteinen immunpräzipitiert worden sein. Um die Bindestellen von HMGA2 weiter zu charakterisieren, wurde mit Hilfe von multiplen Alignments innerhalb der ChIP-Konsensussequenzen ein Sequenzlogo erstellt. Dabei ergab sich ein ähnliches Muster der Basenanordnung wie bei der von Cui und Leng durchgeführten SELEX-Studie (Cui *et al.*, 2007). In beiden Fällen besteht die Konsensussequenz aus einem GC-haltigen Mittelteil, der von zwei AT-reichen Regionen flankiert wird. HMGA2 bindet bevorzugt an AT-reiche Segmente der kleinen Furche in der Doppelhelix, wobei eine dieser Windungen der DNA aus ca. 10 bp besteht (Levitt, 1978; Reeves *et al.*, 1990). Die hier beschriebenen Sequenzmotive entsprechen demnach in ihrer Länge sowie in der Anordnung der AT-Hooks diesem Muster.

HMGA2 reguliert die Expression verschiedener Gene durch die Bindung an Promotor- oder Enhancerregionen, aber auch intronisch, wie am Beispiel des *Imp2*-Gens ersichtlich ist. Um den Kontext der Sequenzen im Genom zu untersuchen, wurden die Gene, die sich in der Umgebung zur jeweiligen HMGA2-Bindestelle befinden, betrachtet. Die Bindestellen liegen zur einen Hälfte intragenisch und zur anderen intergenisch vor, weshalb einerseits die Gene, in deren Intron oder Exon HMGA2 gebunden hat, untersucht wurden, und andererseits die Gene, die upstream oder downstream der Bindestelle lokalisiert sind. Einige der identifizierten Gene sind an der Entstehung von Tumoren beteiligt, in deren Gewebe auch eine hohe HMGA2-Expression nachgewiesen werden konnte.

Das in dieser Arbeit untersuchte Chromatin ist Bestandteil von Zellen eines Karzinoms, bei dem die Expression und Bindung von HMGA2 möglicherweise nicht der in gesunden Zellen entspricht. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um ein Kolonkarzinom, wobei in diesem Zusammenhang die vier Gene *ENG* (Dassoulas *et al.*, 2010), *SI* (Jessup *et al.*, 1995), *FCGBP* (Yasui *et al.*, 2009) und *PTPRT* (Zhao *et al.*, 2010), identifiziert werden, die in Kolonkarzinomen hoch bzw. runter reguliert werden. Denkbar wäre hier ein Zusammenhang zwischen HMGA2 und der transkriptionellen Regulierung dieser Gene. Diverse Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von HMGA2 in Mammakarzinomen mit dem Grad der Malignität korreliert (Rogalla *et al.*, 1997; Sezer *et al.*, 2000; Langelotz *et al.*, 2003). Gleiches gilt auch für die Gene *HOXD10* und *MAN1A1* (Reddy *et al.*, 2008; Urruticoechea *et al.*, 2008), die in unmittelbarer Nähe von HMGA2-Bindestellen lokalisiert sind. Weiterhin befinden sich ChIP-Sequenzen downstream von *RPL10L*, welches in Ovarialkarzinomen hochreguliert wird (Rohozinski *et al.*, 2009), sowie im Intron von *JMJD1C*, dessen regulative Funktionen bedeutend in der Embryogenese, aber auch in der Karzinogenese sind (Takeuchi *et al.*, 2006). Die Gene *RELN* und *ALDH1A1* werden beispielsweise in Prostata- und Ovarialkarzinomen überexprimiert (Perrone *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). Ob HMGA2 diese Gene durch direkte Bindung an die DNA oder gebunden in einem Proteinkomplex beeinflusst, bleibt ungewiss, trotzdem ist die Charakterisierung der Bindestellen ein wichtiger Schritt, um zu verstehen, in wie weit HMGA2 biologische Prozesse wie Wachstum, Tumorentwicklung oder Stammzellerneuerung steuert.

4.2 Expression von HMGB1 und HMGA2 in Exsudaten

HMGB1 war lange Zeit nur als architektonischer Transkriptionsfaktor für genregulatorische Prozesse im Zellkern bekannt. Heute weiß man, dass es extrazellulär auch als körpereigener Alarmstoff und proinflammatorischer Mediator in Abläufe der Immunantwort involviert ist. Seine Rolle als Zytokin bringt interessante Ansatzpunkte zur Diagnostik und Behandlung verschiedener maligner und entzündlicher Erkrankungen mit sich. Eine häufige und kritische Diagnose in diesem Zusammenhang ist die schwere Sepsis. Dabei handelt es sich um eine systemische Entzündungsreaktion des Organismus auf eine Infektion durch Bakterien oder Pilze, bzw. deren Toxine, aber auch durch Viren. Trotz Antibiotikabehandlung und intensivmedizinischer Betreuung sterben immer noch zwischen 48 und 55% der Patienten an einer Sepsis. Allein in Deutschland sind dies jährlich über 56.000 Menschen (Engel *et al.*, 2007). Untersuchungen haben gezeigt, dass im Serum von Sepsispatienten HMGB1 detektierbar ist, und dass der Schweregrad der Krankheit bei einem hohen HMGB1-Protein-Gehalt signifikant ansteigt (Ulloa *et al.*, 2006). Die Annahme, dass HMGB1 vermehrt in exsudativen Ergüssen messbar ist, wurde in diesem Zusammenhang auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Da Transsudate in der Regel zellärmer sind als Exsudate, wurde zuerst die Gesamtproteinkonzentration gemessen und anschließend der prozentuale Anteil sowohl von extrazellulärem HMGB1 als auch von HMGB1 aus abgeschilferten Zellen in der Flüssigkeit bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant höhere HMGB1-Expression in den Exsudaten im Vergleich zu den Transsudaten. Der Unterschied zwischen Ergüssen entzündlichen oder malignen Ursprungs war dabei unwesentlich. HMGB1 gilt, im Gegensatz zu TNF- α und IL-1 β , welche innerhalb von Minuten sezerniert werden, als später Mediator der inflammatorischen Reaktion. Während die Konzentration von TNF- α und IL-1 β nach einer Infektion mit Endotoxinen bereits wieder auf ein Normalniveau gesunken ist, wird HMGB1 durch Makrophagen erst 20 bis 72 Stunden später in das umgebende Gewebe abgegeben (Wang *et al.*, 2001; Ulloa *et al.*, 2006). Durch diese verzögerte, aber auch länger anhaltende Sekretion des Proteins entsteht ein größeres Zeitfenster, welches es ermöglicht, HMGB1 im Rahmen einer Diagnose oder Therapie zuverlässiger zu detektieren. So konnten unter anderem Ulloa *et al.* zeigen, dass durch eine Blockade mit spezifischen Antikörpern das inflammatorische Potential von HMGB1 bei Mäusen gesenkt wird und dadurch multiples Organversagen und schwere Sepsis verhindert werden

können (Ulloa *et al.*, 2006). Die Inhibierung von HMGB1 verspricht neue Ansätze in der Therapie zahlreicher Krankheiten, wobei in präklinischen Studien bisher Endotoxämie, Magen-Darm-Erkrankungen, Pankreatitis, Atemwegserkrankungen, Arthritis, hämorrhagischer Schock, Herzinfarkt, Schlaganfall, Immunreaktion (Transplantatabstoßung), Ischämie-Reperfusion und durch Sepsis hervorgerufene Peritonitis mit letalem Verlauf untersucht wurden. Alle Erkrankungen konnten durch die Verabreichung von Antikörpern oder Antagonisten von HMGB1 abgeschwächt werden (Andersson *et al.*, 2011). Dabei wurden entweder Antikörper gegen die B-Box-Bindedomäne eingesetzt, um den proinflammatorischen Effekt von HMGB1 direkt zu unterbinden, oder es wurde eine trunkierte Variante hergestellt, bei der nur die A-Box vorhanden ist, welche als Antagonist die inflammatorische Wirkung der B-Box neutralisiert (Yang *et al.*, 2004). Ein solcher Ansatz von lokal verabreichten Antikörpern wäre auch für die Therapie von Pleuraergüssen und Aszites denkbar. Ausschlaggebend für eine zuverlässige Diagnose ist die Kombination von verschiedenen Methoden wie Pleurabiopsie, zytologische Untersuchung der Flüssigkeit und Bestimmung des Proteingehaltes. Aber auch dadurch kann bisher nur eine Effektivität der Diagnose von ca. 70% erzielt werden (Antonangelo *et al.*, 2007; Heidari *et al.*, 2007). Die Bestimmung der HMGB1-Konzentration in der Pleura- und Aszitesflüssigkeit kann als Biomarker die Unterscheidung von Transsudaten und Exsudaten unterstützen und zusätzlich als Ansatzpunkt zur Therapie für eine Antikörperbehandlung eingesetzt werden.

Weitere Ursachen für die Entstehung von Exsudaten sind neben Infektionen auch häufig Tumoren. In diesem Zusammenhang erweist sich HMGB1 möglicherweise als interessanter Biomarker. HMGB1 wird in vielen malignen Geweben überexprimiert, wobei dies meist mit einer schlechten Prognose einhergeht. Die signifikant erhöhte Konzentration von HMGB1 in den malignen Ergüssen könnte von Tumorzellen verursacht werden, die das Protein in die Umgebung abgegeben haben. Dieses extrazelluläre HMGB1 kann durch seine Wirkung in Bezug auf Angiogenese, Zellmigration, Wundheilung und Gewebereparatur das Tumorstadium und die Metastasierung fördern (Srikrishna *et al.*, 2009). Ein limitierender Faktor in der Entwicklung von Tumoren ist die Neubildung von Blutgefäßen. Sobald der Tumor eine gewisse Größe überschreitet, die durch die vorhandenen Blutgefäße versorgt werden kann, kommt es zur Hypoxie und damit zur Nekrose der Zellen. Die malignen Zellen werden von Makrophagen abgebaut und setzen HMGB1 aus dem Zellkern

frei, was die Neubildung und Einsprossung von Kapillaren zur Folge hat (Sims *et al.*, 2010). Diese neoangiogenen Fähigkeiten von HMGB1 sind insofern problematisch, als dass sie zu einer verbesserten vaskulären Versorgung des Tumorgewebes führen, was wiederum in einem schnelleren und ausgedehnteren Wachstum des Tumors resultiert (Mitola *et al.*, 2006; van Beijnum *et al.*, 2006). Wie bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen besteht auch bei malignen Neoplasien die Möglichkeit, dem Tumorwachstum mit Antikörpern gegen HMGB1 entgegenzuwirken. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Blockade der Bindung zwischen dem extrazellulären HMGB1 und seinem Rezeptor RAGE das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren in Mäusen hemmt (Taguchi *et al.*, 2000; Huttunen *et al.*, 2002). Ein weiterer Ansatzpunkt für die Inhibierung von HMGB1 ist RAGE in seiner löslichen Form (sRAGE). Normalerweise ist RAGE ein membrangebundenes Protein, welches unter anderem durch HMGB1 aktiviert wird und Entzündungsprozesse sowie Abwehrreaktionen des Organismus einleitet. Liegt es gelöst vor, kann es HMGB1-Proteine binden, aber aufgrund der fehlenden Membranbindung keine weitere Signalkaskade auslösen und dadurch das Tumorwachstum inhibieren (Huttunen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008; Maillard-Lefebvre *et al.*, 2009). Dies bestätigt auch eine Studie von Jing *et al.*, in der nachgewiesen werden konnte, dass die Konzentration von sRAGE im Gewebe sowie im Serum von Lungenkrebspatienten signifikant niedriger ist als in Proben von gesunden Spendern (Jing *et al.*, 2010). Andersherum verhält es sich mit der Expression des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) im Serum von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, welche mit einer erhöhten HMGB1-Konzentration korreliert (Naumnik *et al.*, 2009). Eine Kombination von HMGB1 und VEGF könnte neue Ansatzpunkte für Diagnose- und Therapiemöglichkeiten von Exsudaten schaffen. Denn obwohl mittlerweile neben den Light's Kriterien auch neuere Biomarker, wie die Antikörper MOC-31 und D2-40, diskutiert werden, stellt die Unterscheidung von benignen und malignen Exsudaten immer noch ein medizinisches Problem dar (Lyons-Boudreaux *et al.*, 2008). Fiorelli *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen malignen Exsudaten und einer erhöhten VEGF-Konzentration bestätigen (Fiorelli *et al.*, 2011). In Verbindung mit den hier vorliegenden Ergebnissen und der Tatsache, dass HMGB1 in den meisten Tumoren überexprimiert wird, ist die Kombination von HMGB1 und VEGF ein optimales Ziel in der Therapie von malignen Ergüssen (Lotze *et al.*, 2003).

Bei der Diagnose eines Exsudates ist es von höchster Priorität, zu entscheiden, welcher Patient auf Grund seiner Erkrankung eine aggressivere Therapie bekommen soll. Ein möglicher Kandidat zur Abklärung der Malignität und somit der weiteren Behandlung eines Ergusses ist das HMGA2-Protein, welches schon seit längerem als prognostischer Tumormarker diskutiert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression von *HMGA2* in malignen Exsudaten fast 40-fach höher ist als in allen anderen gemessenen Ergüssen (Winter, unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei zeigte sich eine fast 2.000-fach höhere Expression in fünf der Proben, was auf eine hohe Aggressivität des Tumors schließen lässt. In diversen Studien zum Bronchial- oder Mammakarzinom, welche häufige Ursachen eines Exsudates sind, wurde eine Korrelation von ansteigender *HMGA2*-Expression und fortgeschrittener Malignität sowie Metastasenbildung bestätigt (Langelotz *et al.*, 2003; Sarhadi *et al.*, 2006). Denkbar wäre eine Kombination aus verschiedenen Biomarkern wie beispielsweise *HMGA2* und CEA (Carcinoembryonales Antigen) zur Diagnose und Verlaufskontrolle von malignen Ergüssen (Lawniczak *et al.*, 1992). Auch in der Therapie von Exsudaten könnte *HMGA2* als Target neue Ansatzpunkte bieten. Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass eine Blockade der *HMGA2*-Proteinsynthese durch Antisense-Konstrukte eine neoplastische Transformation von Schilddrüsen- und Retinoblastomzellen verhindern können (Berlingieri *et al.*, 1995; Chau *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, ist das *ERCC1*-Gen ein Interaktionspartner von *HMGA2*, dessen kodiertes Protein für DNA-Reparaturmechanismen zuständig ist und das durch *HMGA2* stark herunter reguliert wird (Borrmann *et al.*, 2003). Es bleibt zu klären, in wie weit sich die daraus resultierende genomische Instabilität auf die Therapie von Patienten mit malignen Ergüssen auswirkt.

4.3 HMGA2 in der Pränataldiagnostik

Einer der Hauptschwerpunkte in der Forschung auf dem Gebiet der Pränataldiagnostik ist die Entwicklung nicht-invasiver Methoden zur Analyse des genetischen Profils des Kindes. Bisher ist dies nur durch einen invasiven Eingriff in Form von Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie möglich, was mit dem Risiko einer Fehlgeburt von ca. 1,4 bzw. 1,9% verbunden ist (Tabor *et al.*, 2009). Um dies zu umgehen, sind Methoden zur Analyse der fetalen freien DNA im Blut oder Urin der Mutter denkbar. Nicht nur die Verminderung von Komplikationen, sondern auch die

Möglichkeit einer schnelleren Diagnosestellung zählt zu den Vorteilen solch einer nicht-invasiven Untersuchung. Großes Potential hat in diesem Zusammenhang das HMGA2-Protein, denn der Transkriptionsregulator spielt eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung. Dabei ist die *HMGA2*-Expression maximal in fetalen Zellen, während sie in adulten, voll differenzierten Zellen kaum nachweisbar ist (Rogalla *et al.*, 1996; Hirning-Folz *et al.*, 1998; Gattas *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die *HMGA2*-Expression in Zellen des Fruchtwassers des zweiten Trimesters der Schwangerschaft bestimmt. Diese Zellen sind das am häufigsten untersuchte Material in der zytogenetischen Pränataldiagnostik und waren in den hier durchgeführten Versuchen die Grundlage zur Entwicklung einer neuen Methode der selektiven Anreicherung von fetaler DNA. Der Ursprung dieser Zellen liegt hauptsächlich im Urogenitaltrakt des Fetus (Mann *et al.*, 1996). Aufgrund der guten Vergleichbarkeit wurden deshalb Urinproben von nicht schwangeren Probanden als Kontrolle für die Expressionsanalyse gewählt. In einer früheren Studie zur mRNA-Expression im Fruchtwasser wurden im Verlauf der Schwangerschaft unterschiedliche Expressionsprofile diverser Gen-Familien beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Organe und das Gewebe des Fetus während der Schwangerschaft in verschiedenen Stadien der Entwicklung befinden (Larrabee *et al.*, 2005). Auch in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie konnte in allen Fruchtwasserproben eine starke Expression von *HMGA2* nachgewiesen werden, wobei sich eine Korrelation zwischen dem Anstieg von *HMGA2* und der jeweiligen Schwangerschaftswoche ($p < 0,02$) zeigte.

Neben den Zellen befindet sich auch zellfreie fetale DNA im Fruchtwasser. Diese DNA ist eine vielversprechende Quelle für klinische Anwendungen zur Analyse des embryonalen Erbguts. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine neue Herangehensweise zur Differenzierung von mütterlicher und fetaler DNA erfolgreich durchgeführt. Das Ausgangsmaterial dafür stellte die zellfreie, mit Proteinen assoziierte DNA dar, die im Fruchtwasser in kurzen Fragmenten von weniger als 300 bp vorliegt (Larrabee *et al.*, 2004; Peter *et al.*, 2008). Diese Fragmente können mit Hilfe von Antikörpern gezielt immunpräzipitiert werden. Ziel sind dabei die embryonalen HMGA2-Proteine, durch die eine Selektion von fetaler und mütterlicher DNA erfolgt. Die angereicherte DNA ermöglicht anschließend eine molekulargenetische Charakterisierung des fetalen Genoms über Real-Time PCR und DNA-Sequenzierung. In der Regel können genetische Defekte des Fetus erst ab

der 13. Schwangerschaftswoche mittels Amniozentese, Chorionzottenbiopsie oder Nabelschnurpunktion abgeklärt werden. Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Methode könnte eine Untersuchung des fetalen Genoms zu einem früheren Zeitpunkt durchführbar sein, denn es ist anzunehmen, dass die Expression von *HMG2* schon in der frühen embryonalen Phase stark ansteigt.

Die Schwankungen in der Ausbeute der fetalen DNA sind mit 3- bis 200-fach relativ hoch, was vermutlich auf die unterschiedlichen Zeitpunkte des Fixierens mit Formaldehyd zwischen 2 bis 6 h zurückzuführen ist. Unfixiert lösen sich die Proteine kontinuierlich von der DNA, weshalb für weiterführende Experimente die sofortige Zugabe von Formaldehyd nach der Fruchtwasserpunktion ratsam ist.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten Methode der ChIP zeigen, dass eine Anreicherung von zellfreier fetaler DNA möglich ist. Ziel ist es, diese für die Anwendung in der nicht-invasiven Pränataldiagnostik zu etablieren. Hierbei konzentriert sich die heutige Forschung hauptsächlich auf die Untersuchung von fetaler DNA im mütterlichen Blut. Problematisch ist allerdings, dass die Konzentration dieser zellfreien fetalen DNA 100- bis 200-fach niedriger ist als im Fruchtwasser (Bianchi *et al.*, 2001). Hinzu kommt, dass der Anteil der fetalen DNA lediglich 3-6% der gesamten freien DNA beträgt (Lo *et al.*, 1998). Wichtig ist also, die fetale DNA gezielt anzureichern, um das Hintergrundsignal der mütterlichen freien DNA zu verringern. Untersuchungen am Blut der Mutter zeigen dazu verschiedene Ansätze. So konnten beispielsweise Li *et al.* über eine Fragmentlängenanalyse beobachten, dass die mütterliche zellfreie DNA mit einer Größe von etwa 500-1000 bp länger ist, als die fetale zellfreie DNA (Li *et al.*, 2004). Bei gesunden, nicht schwangeren Frauen sind die freien DNA-Fragmente etwa 200 bp lang, mit Beginn der Schwangerschaft wird also nicht nur fetale DNA nachweisbar, sondern es werden zugleich auch längere Fragmente mütterlicher DNA freigesetzt. Als Ursache hierfür werden sowohl hormonelle als auch physiologische Veränderungen diskutiert, aber auch ein verminderter Abbau der DNA-Fragmente während der Schwangerschaft kommt in Betracht (Chan *et al.*, 2004). Ein weiterer Ansatzpunkt zur Differenzierung von zellfreier fetaler und mütterlicher DNA ist das Methylierungsmuster, welches sich bei Feten deutliche von dem der Mutter unterscheidet. Durch methylgruppensensitive Restriktionsenzyme kann so die mütterliche DNA selektiv abgebaut werden (Nygren *et al.*, 2010). Ein anderes Verfahren beinhaltet die Behandlung der Blutproben mit

Formaldehyd direkt nach der Entnahme. Die Membranen der frei zirkulierenden Zellen werden stabilisiert, was zu einer verzögerten Lyse und somit zu einer verringerten Freisetzung der mütterlichen DNA führt. Dabei gelang es, den Anteil an freier fetaler DNA von 7,7 auf 20,2% zu erhöhen (Dhallan *et al.*, 2004). Bisher sind diese Methoden jedoch für die klinische Anwendung zu ungenau. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte neue Methode der ChIP könnte eine gezieltere Herangehensweise zur Selektion von fetaler DNA aus dem mütterlichen Blutkreislauf des Fetus ermöglichen. Da die Proben im Rahmen des Protokolls ebenfalls mit Formaldehyd behandelt werden, um die Bindung der Proteine an die DNA zu gewährleisten und die DNA-abbauenden Enzyme zu hemmen, könnte sich die oben genannte verringerte Zelllyserate durch das Formaldehyd positiv auf die Anreicherung der freien fetalen DNA auswirken.

Neben den Versuchen, die fetale DNA im mütterlichen Blutkreislauf nachzuweisen, gibt es bereits Ansätze, diese auch aus dem Urin der Mutter zu isolieren. Dies erwies sich zwar als prinzipiell möglich, allerdings stellte sich die Sensitivität in Studien mit geschlechtsspezifischen Genen weitaus geringer dar als in Untersuchungen des Blutplasmas. Ein Vergleich zwischen Laboren, die mittels quantitativer PCR das geschlechtsspezifische SRY-Gen in der fetalen DNA nachweisen, zeigte deutliche Unterschiede in der Sensitivität (0 bis 80%) (Botezatu *et al.*, 2000; Al-Yatama *et al.*, 2001; Koide *et al.*, 2005; Illanes *et al.*, 2006). Ein Grund für diese geringe Detektionsrate ist die Filtration der DNA durch die Nieren der Mutter. Fetale DNA gelangt durch die Plazenta in den mütterlichen Blutstrom, anschließend wird der Urin durch die Nieren gefiltert, wobei auch freie fetale DNA ausgeschieden wird. Die Nierenbarriere ist zwar für kleinere DNA-Fragmente von ca. 150 bp permeabel, allerdings werden über 95% der fetalen DNA bereits vorher abgebaut (Botezatu *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Problematik ist es wichtig, sensitivere Methoden zur Detektion der fetalen DNA zu entwickeln. Sollte es gelingen, durch eine einfache Urinabgabe der Mutter Hinweise auf den fetalen Karyotyp zu erhalten, so würde dies die Pränataldiagnostik revolutionieren, da auf einen invasiven Eingriff und sogar auf eine Blutentnahme verzichtet werden könnte. Daher ergab sich die Fragestellung, ob eine Expression von *HMGA2* in Urinproben messbar ist, und ob Unterschiede im Vergleich zu nicht schwangeren Probanden bestehen. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben von Schwangeren eine höhere *HMGA2*-Expression als die Kontrollproben von nicht schwangeren Probanden zeigten, wäre in weiteren

Versuchen die Anreicherung von zellfreier DNA mit Hilfe der ChIP denkbar, um die fetale DNA aus dem Urin der Mutter zu selektieren. Im Anschluss daran könnte durch ein hochparalleles Sequenzierungsverfahren, wie ChIP-Seq, eine komplette Charakterisierung des fetalen Genoms gewährleistet werden (Jothi *et al.*, 2008).

Auch zur Anwendung in der Tumorforschung ist die in dieser Arbeit vorgestellte neue Methode der ChIP vielversprechend. Seit langem ist bekannt, dass in Blut, Urin und sogar Speichel von Krebspatienten freie Tumor-DNA detektiert werden kann (Leon *et al.*, 1977; Mao *et al.*, 1994; Eisenberger *et al.*, 1999). Der Anteil von frei zirkulierender DNA steigt dabei mit dem Grad der Malignität, was den Ursprung in Zellen des Tumors vermuten lässt (Schwarzenbach *et al.*, 2009). Bisherige Analysen haben sich meist auf die mRNA-Expression in Hinblick auf einen Cut-Point zur Tumorklassifizierung beschränkt. Ein neuer Ansatzpunkt ist das Einfangen/Selektieren der Tumor-DNA, um mögliche Aberrationen direkt zu detektieren. Frühere Untersuchungen am Tumorgenom zeigten, dass sich die Mutationen im Primärtumor auch in DNA aus Körperflüssigkeiten nachweisen lassen (Sidransky, 1997). Diese spezifische DNA konnte in malignen Tumoren verschiedener Gewebe dokumentiert werden: Dickdarm, Pankreas, Lunge, Blase, Leber, Prostata, Niere, Brust, Magen, Gebärmutterhals und der Eierstöcke, sowie in Tumoren der Haut, des Nasenrachenraums und bei hämatologischen Erkrankungen (Bischoff *et al.*, 2005). Der Anteil an zellfreier DNA im Blutkreislauf ist dabei deutlich höher als bei gesunden Testpersonen (Shapiro *et al.*, 1983). Interessanterweise ist auch in bronchoalveolärer Lavage von Lungenkrebspatienten zellfreie Tumor-DNA vorhanden (Mills *et al.*, 1995). Basierend auf diesen Ergebnissen und der Beobachtung einer erhöhten *HMGA2*-Expression in Transsudaten und Exsudaten, ist es vorstellbar auch hier mit Hilfe einer Immunpräzipitation der DNA-assoziierten *HMGA2*-Proteine die Tumor-DNA anzureichern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das HMGA2-Protein ist ein architektonischer Transkriptionsfaktor, dessen Expression hauptsächlich auf die embryonale und fetale Entwicklung beschränkt ist, eine Reexpression tritt allerdings häufig bei einer Reihe von malignen Neoplasien auf. Die Bindung von HMGA2 verursacht strukturelle Veränderungen der DNA, wodurch die Expression verschiedener Gene beeinflusst wird. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten zwei Konsensussequenzen mit Hilfe einer PCR-basierten SELEX-Methode (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) generiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten mittels Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) und Bioinformatik diese Sequenzen im Chromatin von lebenden Zellen nachgewiesen werden. Zuerst wurde die Expression von *HMGA2* in verschiedenen Zelllinien bestimmt. Da die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 die höchste Expression aufwies, wurde diese für alle weiteren ChIP-Versuche ausgewählt. Dabei konnten 49 DNA-Fragmente mit potentiellen HMGA2-Bindestellen isoliert werden. Diese Fragmente wurden auf AT-Gehalt, Lokalisation im humanen Genom und Ähnlichkeiten mit den in der SELEX-Studie generierten Konsensussequenzen untersucht. Der AT-Gehalt der ChIP-Sequenzen lag deutlich über dem Durchschnitt des humanen Genoms. Außerdem konnten innerhalb der Fragmente 11 und 12 bp lange, konservierte Abschnitte gefunden werden, die Ähnlichkeiten sowohl untereinander als auch mit den SELEX-Sequenzen aufwiesen. Dabei zeigten die Fragmente einen erhöhten AT-Gehalt in den flankierenden Regionen und keine Spezifität der Basen in der Mitte der Sequenzen.

Erst in letzter Zeit fand man heraus, dass HMGB1 neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auch eine wichtige Rolle als proinflammatorischer und proangiogener Mediator spielt. Durch eine aktive Sezernierung von HMGB1 durch Makrophagen sowie die passive Freisetzung durch nekrotische Zellen ist HMGB1 an der Pathogenese von vielen entzündlichen, aber auch malignen Erkrankungen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression des HMGB1-Proteins und die mRNA-Expression von *HMGA2* in Ergussproben von Patienten mit diversen Erkrankungen bestimmt. Der Proteingehalt von HMGB1 sowie die mRNA-Expression des Protoonkogens *HMGA2* in Pleurapunktaten und Aszites waren in den Exsudaten deutlich erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen das Potential von HMGB1 und HMGA2 als mögliches Ziel bei der Behandlung von entzündlichen und malignen Exsudaten.

Da eine hohe Expression von *HMGA2* in erster Linie in embryonalen und fetalen Zellen auftritt, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Bestimmung von *HMGA2* in Zellen des Fruchtwassers und des Urins von Schwangeren. Außerdem sollte mit Hilfe der Chromatin Immunopräzipitation festgestellt werden, ob *HMGA2*-Proteine mit der zellfreien DNA im Fruchtwasser assoziiert vorliegen. Die Expression von *HMGA2* in 58 Fruchtwasser- und 14 Urinproben von Frauen im zweiten Trimester der Schwangerschaft wurde mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. In allen Proben konnte eine *HMGA2*-Expression gemessen werden, wobei in den Zellen des Fruchtwassers sowie in denen des Urins von Schwangeren eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse der Real-Time PCR mit *GAPDH* zur Detektion der DNA eine Anreicherung von zellfreier fetaler DNA in allen Fruchtwasserproben. Die Möglichkeit, mit dieser neuen Methode mittels *HMGA2*-Antikörpern die fetale DNA zu selektieren, eröffnet neue Perspektiven in der nicht-invasiven Pränataldiagnostik.

6 SUMMARY

HMGA2 is an architectonic transcription factor abundantly expressed during embryonic and fetal development and is associated with the progression of malignant tumors. DNA binding induces changes of DNA conformation and hence results in global overall change of gene expression patterns. Recently, using a PCR-based SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) procedure, two consensus sequences for HMGA2 binding have been identified. In the present study, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments and bioinformatic methods were used to analyze if these binding sequences can be verified on chromatin of living cells as well. After quantification of HMGA2 protein in different cell lines the colon cancer derived cell line HCT116 was chosen for further ChIP experiments because of its high HMGA2 protein level. 49 DNA fragments were obtained by ChIP. These fragments containing HMGA2 binding sites have been analyzed for their AT-content, localization in the human genome and similarities to sequences generated by a SELEX study. The sequences show a significantly higher AT-content than the average of the human genome. The artificially generated SELEX sequences and short BLAST alignments (11 and 12 bp) of the ChIP fragments from living cells show similarities in their organization. The flanking regions are AT-rich, whereas a lower conservation is present in the center of the sequences.

Recently, it has become obvious that the HMGB1 protein acts as a proinflammatory and proangiogenic mediator when actively secreted by macrophages or passively released from necrotic cells. Therefore, this protein plays an important role in the pathogenesis of several diseases including cancer. The absolute and relative amount of HMGB1 protein and the relative amount of *HMGA2* mRNA were quantitated within different effusion types. HMGB1, a so-called danger signaling protein, as well as the protooncogene *HMGA2* were found to be highly expressed in human pleural and peritoneal effusions due to cancer and inflammation. Given the known characteristics of HMGB1 and HMGA2, these results underline these proteins as possible targets for treatment in advanced cancer as well as in inflammatory diseases.

The expression of *HMGA2* is primarily confined to embryonic and fetal cells. One aim of the present work was to determine the relative expression level of *HMGA2* in cells of amniotic fluid and urine. In addition, it should be investigated by chromatin immunoprecipitation whether or not HMGA2 is attached to cell-free DNA in amniotic

fluid. Expression levels of *HMGA2* in 58 amniotic fluid and 14 urine samples from pregnant women in the second trimester were determined using quantitative real-time PCR. Expression of *HMGA2* was detected in all samples but it was significantly higher in cells of the amniotic fluid and urine samples from pregnant women than in cells of the urine from healthy donors. The real-time PCR for the DNA determination with *GAPDH* showed enrichment in all amniotic fluid samples treated with the improved protocol of immunoprecipitation. The fact that *HMGA2* apparently remains to be attached to cell-free DNA suggests interesting new approaches in noninvasive prenatal diagnosis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Agresti, A., R. Lupo, M. E. Bianchi und S. Muller (2003). "HMGB1 interacts differentially with members of the Rel family of transcription factors." *Biochem Biophys Res Commun* 302: 421-6.

Al-Yatama, M. K., A. S. Mustafa, S. Ali, S. Abraham, Z. Khan und N. Khaja (2001). "Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction." *Prenat Diagn* 21: 399-402.

Andersson, U., H. Erlandsson-Harris, H. Yang und K. J. Tracey (2002). "HMGB1 as a DNA-binding cytokine." *J Leukoc Biol* 72: 1084-91.

Andersson, U. und K. J. Tracey (2011). "HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection." *Annu Rev Immunol* 29: 139-62.

Antonangelo, L., F. S. Vargas, M. Seiscento, S. Bombarda, L. Teixeira und R. K. Sales (2007). "Clinical and laboratory parameters in the differential diagnosis of pleural effusion secondary to tuberculosis or cancer." *Clinics (Sao Paulo)* 62: 585-90.

Antonov, J., D. R. Goldstein, A. Oberli, A. Baltzer, M. Pirotta, A. Fleischmann, H. J. Altermatt und R. Jaggi (2005). "Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization." *Lab Invest* 85: 1040-50.

Antunes, G., E. Neville, J. Duffy und N. Ali (2003). "BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions." *Thorax* 58 Suppl 2: ii29-38.

Aparicio, O., J. V. Geisberg, E. Sekinger, A. Yang, Z. Moqtaderi und K. Struhl (2005). "Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo." *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21: Unit 21 3.

Arlotta, P., A. K. Tai, G. Manfioletti, C. Clifford, G. Jay und S. J. Ono (2000). "Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein

develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas." *J Biol Chem* 275: 14394-400.

Ayoubi, T. A., E. Jansen, S. M. Meulemans und W. J. Van de Ven (1999). "Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development." *Oncogene* 18: 5076-87.

Ayvazian, L. F. (1977). "Diagnostic aspects of pleural effusion." *Bull N Y Acad Med* 53: 532-6.

Bagga, R., S. Michalowski, R. Sabnis, J. D. Griffith und B. M. Emerson (2000). "HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology." *Nucleic Acids Res* 28: 2541-50.

Battista, S., V. Fidanza, M. Fedele, A. J. Klein-Szanto, E. Outwater, H. Brunner, M. Santoro, C. M. Croce und A. Fusco (1999). "The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis." *Cancer Res* 59: 4793-7.

Berlingieri, M. T., G. Manfioletti, M. Santoro, A. Bandiera, R. Visconti, V. Giancotti und A. Fusco (1995). "Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells." *Mol Cell Biol* 15: 1545-53.

Bianchi, D. W., E. S. LeShane und J. M. Cowan (2001). "Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid." *Clin Chem* 47: 1867-9.

Bianchi, M. E. und A. Agresti (2005). "HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation." *Curr Opin Genet Dev* 15: 496-506.

Bianchi, M. E., L. Falcicola, S. Ferrari und D. M. Lilley (1992). "The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins." *EMBO J* 11: 1055-63.

Bischoff, F. Z., D. E. Lewis und J. L. Simpson (2005). "Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure." *Hum Reprod Update* 11: 59-67.

Bischoff, F. Z., M. K. Sinacori, D. D. Dang, D. Marquez-Do, C. Horne, D. E. Lewis und J. L. Simpson (2002). "Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis." *Hum Reprod Update* 8: 493-500.

Borrmann, L., I. Kim, D. Schultheiss, P. Rogalla und J. Bullerdiek (2001). "Regulation of the expression of HMG1, a co-activator of the estrogen receptor." *Anticancer Res* 21: 301-5.

Borrmann, L., R. Schwanbeck, T. Heyduk, B. Seebeck, P. Rogalla, J. Bullerdiek und J. R. Wisniewski (2003). "High mobility group A2 protein and its derivatives bind a specific region of the promoter of DNA repair gene ERCC1 and modulate its activity." *Nucleic Acids Res* 31: 6841-51.

Botezatu, I., O. Serdyuk, G. Potapova, V. Shelepov, R. Alechina, Y. Molyaka, V. Ananev, I. Bazin, A. Garin, M. Narimanov, V. Knysh, H. Melkonyan, S. Umansky und A. Lichtenstein (2000). "Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism." *Clin Chem* 46: 1078-84.

Brezniceanu, M. L., K. Volp, S. Bosser, C. Solbach, P. Lichter, S. Joos und M. Zornig (2003). "HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma." *FASEB J* 17: 1295-7.

Bustin, M. (1999). "Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins." *Mol Cell Biol* 19: 5237-46.

Bustin, M. und R. Reeves (1996). "High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 35-100.

Caca, K., J. Feisthommel, K. Klee, A. Tannapfel, H. Witzigmann, C. Wittekind, J. Mossner und F. Berr (2002). "Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines." *Int J Cancer* 97: 481-8.

Chan, K. C., J. Zhang, A. B. Hui, N. Wong, T. K. Lau, T. N. Leung, K. W. Lo, D. W. Huang und Y. M. Lo (2004). "Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma." *Clin Chem* 50: 88-92.

Chase, M. B., S. B. Haga, W. D. Hankins, D. M. Williams, Z. Bi, J. W. Strovel, C. Obriecht und P. E. Berg (1999). "Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human beta-globin gene." *Am J Hematol* 60: 27-35.

Chau, K. Y., G. Manfioletti, K. W. Cheung-Chau, A. Fusco, N. Dhomen, J. C. Sowden, T. Sasabe, S. Mukai und S. J. Ono (2003). "Derepression of HMGA2 gene expression in retinoblastoma is associated with cell proliferation." *Mol Med* 9: 154-65.

Chau, K. Y., U. A. Patel, K. L. Lee, H. Y. Lam und C. Crane-Robinson (1995). "The gene for the human architectural transcription factor HMGI-C consists of five exons each coding for a distinct functional element." *Nucleic Acids Res* 23: 4262-6.

Cheng, B. Q., C. Q. Jia, C. T. Liu, X. F. Lu, N. Zhong, Z. L. Zhang, W. Fan und Y. Q. Li (2008). "Serum high mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma." *Dig Liver Dis* 40: 446-52.

Chiappetta, G., A. Ferraro, E. Vuttariello, M. Monaco, F. Galdiero, V. De Simone, D. Califano, P. Pallante, G. Botti, L. Pezzullo, G. M. Pierantoni, M. Santoro und A. Fusco (2008). "HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias." *Eur J Cancer* 44: 1015-21.

Choi, Y. R., H. Kim, H. J. Kang, N. G. Kim, J. J. Kim, K. S. Park, Y. K. Paik und H. O. Kim (2003). "Overexpression of high mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation." *Cancer Res* 63: 2188-93.

Cleynen, I., J. R. Brants, K. Peeters, R. Deckers, M. Debiec-Rychter, R. Sciot, W. J. Van de Ven und M. M. Petit (2007). "HMGA2 regulates transcription of the Imp2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB." *Mol Cancer Res* 5: 363-72.

Crippa, M. P., P. J. Alfonso und M. Bustin (1992). "Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain." *J Mol Biol* 228: 442-9.

Cui, T. und F. Leng (2007). "Specific recognition of AT-rich DNA sequences by the mammalian high mobility group protein AT-hook 2: a SELEX study." *Biochemistry* 46: 13059-66.

Dahl, J. A. und P. Collas (2007). "Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells." *Stem Cells* 25: 1037-46.

Dassoulas, K., M. Gazouli, G. Theodoropoulos, Z. Christoni, S. Rizos, A. Zisi-Serbetzoglou, C. Glava, T. Karantanos, C. Klonaris und P. Karakitsos (2010). "Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 703-8.

Dhallan, R., W. C. Au, S. Mattagajasingh, S. Emche, P. Bayliss, M. Damewood, M. Cronin, V. Chou und M. Mohr (2004). "Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation." *JAMA* 291: 1114-9.

Eisenberger, C. F., M. Schoenberg, C. Enger, S. Hortopan, S. Shah, N. H. Chow, F. F. Marshall und D. Sidransky (1999). "Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis." *J Natl Cancer Inst* 91: 2028-32.

Ellington, A. D. und J. W. Szostak (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature* 346: 818-22.

Engel, C., F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff,

M. Quintel, M. Ragaller, et al. (2007). "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study." *Intensive Care Med* 33: 606-18.

Falvo, J. V., D. Thanos und T. Maniatis (1995). "Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y)." *Cell* 83: 1101-11.

Fedele, M., S. Battista, L. Kenyon, G. Baldassarre, V. Fidanza, A. J. Klein-Szanto, A. F. Parlow, R. Visone, G. M. Pierantoni, E. Outwater, M. Santoro, C. M. Croce und A. Fusco (2002). "Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas." *Oncogene* 21: 3190-8.

Fedele, M., R. Visone, I. De Martino, G. Troncone, D. Palmieri, S. Battista, A. Ciarmiello, P. Pallante, C. Arra, R. M. Melillo, K. Helin, C. M. Croce und A. Fusco (2006). "HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity." *Cancer Cell* 9: 459-71.

Ferrari, S., P. Finelli, M. Rocchi und M. E. Bianchi (1996). "The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13." *Genomics* 35: 367-71.

Fiorelli, A., G. Vicidomini, M. Di Domenico, F. Napolitano, G. Messina, F. Morgillo, F. Ciardiello und M. Santini (2011). "Vascular endothelial growth factor in pleural fluid for differential diagnosis of benign and malignant origin and its clinical applications." *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 12: 420-4.

Flohr, A. M., P. Rogalla, M. Meiboom, L. Borrmann, M. Krohn, B. Thode-Halle und J. Bullerdiek (2001). "Variation of HMGB1 expression in breast cancer." *Anticancer Res* 21: 3881-5.

Friedmann, M., L. T. Holth, H. Y. Zoghbi und R. Reeves (1993). "Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene." *Nucleic Acids Res* 21: 4259-67.

Fusco, A. und M. Fedele (2007). "Roles of HMGA proteins in cancer." *Nat Rev Cancer* 7: 899-910.

Galas, D. J. und A. Schmitz (1978). "DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity." *Nucleic Acids Res* 5: 3157-70.

Gattas, G. J., B. J. Quade, R. A. Nowak und C. C. Morton (1999). "HMGIC expression in human adult and fetal tissues and in uterine leiomyomata." *Genes Chromosomes Cancer* 25: 316-22.

Gonlugur, T. E. und U. Gonlugur (2008). "Transudates in malignancy: still a role for pleural fluid." *Ann Acad Med Singapore* 37: 760-3.

Goodwin, G. H., C. Sanders und E. W. Johns (1973). "A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids." *Eur J Biochem* 38: 14-9.

Hauke, S., A. M. Flohr, P. Rogalla und J. Bullerdiek (2002). "Sequencing of intron 3 of HMGA2 uncovers the existence of a novel exon." *Genes Chromosomes Cancer* 34: 17-23.

Heffner, J. E., L. K. Brown und C. A. Barbieri (1997). "Diagnostic value of tests that discriminate between exudative and transudative pleural effusions. Primary Study Investigators." *Chest* 111: 970-80.

Heidari, B., K. Bijani, M. Eissazadeh und P. Heidari (2007). "Exudative pleural effusion: effectiveness of pleural fluid analysis and pleural biopsy." *East Mediterr Health J* 13: 765-73.

Hill, D. A., M. L. Pedulla und R. Reeves (1999). "Directional binding of HMG-I(Y) on four-way junction DNA and the molecular basis for competitive binding with HMG-1 and histone H1." *Nucleic Acids Res* 27: 2135-44.

Hirning-Folz, U., M. Wilda, V. Rippe, J. Bullerdiek und H. Hameister (1998). "The expression pattern of the Hmgic gene during development." *Genes Chromosomes Cancer* 23: 350-7.

Hori, O., J. Brett, T. Slattery, R. Cao, J. Zhang, J. X. Chen, M. Nagashima, E. R. Lundh, S. Vijay, D. Nitecki und et al. (1995). "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system." *J Biol Chem* 270: 25752-61.

Huttunen, H. J., C. Fages, J. Kuja-Panula, A. J. Ridley und H. Rauvala (2002). "Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis." *Cancer Res* 62: 4805-11.

Illanes, S., M. L. Denbow, R. P. Smith, T. G. Overton, P. W. Soothill und K. Finning (2006). "Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine." *Prenat Diagn* 26: 1216-8.

Jessup, J. M., P. T. Lavin, C. W. Andrews, Jr., M. Loda, A. Mercurio, B. D. Minsky, C. Mies, B. Cukor, R. Bleday und G. Steele, Jr. (1995). "Sucrase-isomaltase is an independent prognostic marker for colorectal carcinoma." *Dis Colon Rectum* 38: 1257-64.

Jing, R., M. Cui, J. Wang und H. Wang (2010). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) soluble form (sRAGE): a new biomarker for lung cancer." *Neoplasma* 57: 55-61.

Johnson, K. R., D. A. Lehn und R. Reeves (1989). "Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y." *Mol Cell Biol* 9: 2114-23.

Jorgez, C. J. und F. Z. Bischoff (2009). "Improving enrichment of circulating fetal DNA for genetic testing: size fractionation followed by whole gene amplification." *Fetal Diagn Ther* 25: 314-9.

Jothi, R., S. Cuddapah, A. Barski, K. Cui und K. Zhao (2008). "Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data." *Nucleic Acids Res* 36: 5221-31.

Kagan, K. O., D. Wright, A. Baker, D. Sahota und K. H. Nicolaides (2008). "Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A." *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 618-24.

Kazmierczak, B., S. Wanschura, B. Rommel, S. Bartnitzke und J. Bullerdiek (1996). "Ten pulmonary chondroid hamartomas with chromosome 6p21 breakpoints within the HMG-I(Y) gene or its immediate surroundings." *J Natl Cancer Inst* 88: 1234-6.

Klein-Hessling, S., G. Schneider, A. Heinfling, S. Chuvpilo und E. Serfling (1996). "HMG I(Y) interferes with the DNA binding of NF-AT factors and the induction of the interleukin 4 promoter in T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15311-6.

Koide, K., A. Sekizawa, M. Iwasaki, R. Matsuoka, S. Honma, A. Farina, H. Saito und T. Okai (2005). "Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women." *Prenat Diagn* 25: 604-7.

Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, *et al.* (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* 409: 860-921.

Langelotz, C., P. Schmid, C. Jakob, U. Heider, K. D. Wernecke, K. Possinger und O. Sezer (2003). "Expression of high-mobility-group-protein HMGI-C mRNA in the peripheral blood is an independent poor prognostic indicator for survival in metastatic breast cancer." *Br J Cancer* 88: 1406-10.

Lapaire, O., X. Y. Lu, K. L. Johnson, Z. Jarrah, H. Stroh, J. M. Cowan, U. Tantravahi und D. W. Bianchi (2007). "Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant." *Prenat Diagn* 27: 616-21.

Larrabee, P. B., K. L. Johnson, C. Lai, J. Ordovas, J. M. Cowan, U. Tantravahi und D. W. Bianchi (2005). "Global gene expression analysis of the living human fetus using cell-free messenger RNA in amniotic fluid." *JAMA* 293: 836-42.

Larrabee, P. B., K. L. Johnson, E. Pestova, M. Lucas, K. Wilber, E. S. LeShane, U. Tantravahi, J. M. Cowan und D. W. Bianchi (2004). "Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype." *Am J Hum Genet* 75: 485-91.

Lawniczak, M., J. Sikora, P. Kania und J. Zeromski (1992). "The search for tumor-associated proteins in pleural effusions by means of monoclonal antibodies and a dot blot assay." *Lung* 170: 65-74.

Leon, S. A., B. Shapiro, D. M. Sklaroff und M. J. Yaros (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." *Cancer Res* 37: 646-50.

Levitt, M. (1978). "How many base-pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin? Some theoretical calculations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 640-4.

Li, T., Y. Su, Y. Mei, Q. Leng, B. Leng, Z. Liu, S. A. Stass und F. Jiang (2010). "ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome." *Lab Invest* 90: 234-44.

Li, Y., B. Zimmermann, C. Rusterholz, A. Kang, W. Holzgreve und S. Hahn (2004). "Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms." *Clin Chem* 50: 1002-11.

Light, R. W. (1997). "Diagnostic principles in pleural disease." *Eur Respir J* 10: 476-81.

Light, R. W., M. I. Macgregor, P. C. Luchsinger und W. C. Ball, Jr. (1972). "Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates." *Ann Intern Med* 77: 507-13.

Lo, Y. M. (1994). "Non-invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood." *J Clin Pathol* 47: 1060-5.

Lo, Y. M. (2008). "Fetal nucleic acids in maternal plasma." *Ann N Y Acad Sci* 1137: 140-3.

Lo, Y. M., N. Corbetta, P. F. Chamberlain, V. Rai, I. L. Sargent, C. W. Redman und J. S. Wainscoat (1997). "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum." *Lancet* 350: 485-7.

Lo, Y. M., N. M. Hjelm, C. Fidler, I. L. Sargent, M. F. Murphy, P. F. Chamberlain, P. M. Poon, C. W. Redman und J. S. Wainscoat (1998). "Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma." *N Engl J Med* 339: 1734-8.

Lo, Y. M., M. S. Tein, T. K. Lau, C. J. Haines, T. N. Leung, P. M. Poon, J. S. Wainscoat, P. J. Johnson, A. M. Chang und N. M. Hjelm (1998). "Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis." *Am J Hum Genet* 62: 768-75.

Lotze, M. T. und R. A. DeMarco (2003). "Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy." *Curr Opin Investig Drugs* 4: 1405-9.

Lyons-Boudreaux, V., D. R. Mody, J. Zhai und D. Coffey (2008). "Cytologic malignancy versus benignancy: how useful are the "newer" markers in body fluid cytology?" *Arch Pathol Lab Med* 132: 23-8.

Maher, J. F. und D. Nathans (1996). "Multivalent DNA-binding properties of the HMG-1 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6716-20.

Maillard-Lefebvre, H., E. Boulanger, M. Daroux, C. Gaxatte, B. I. Hudson und M. Lambert (2009). "Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases." *Rheumatology (Oxford)* 48: 1190-6.

Majer, S., M. Bauer, E. Magnet, A. Strele, E. Giegerl, M. Eder, U. Lang und B. Pertl (2007). "Maternal urine for prenatal diagnosis--an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester." *Prenat Diagn* 27: 1219-23.

Mann, S. E., M. J. Nijland und M. G. Ross (1996). "Ovine fetal adaptations to chronically reduced urine flow: preservation of amniotic fluid volume." *J Appl Physiol* 81: 2588-94.

Mao, L., R. H. Hruban, J. O. Boyle, M. Tockman und D. Sidransky (1994). "Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer." *Cancer Res* 54: 1634-7.

Marel, M., B. Stastny, L. Melinova, E. Svandova und R. W. Light (1995). "Diagnosis of pleural effusions. Experience with clinical studies, 1986 to 1990." *Chest* 107: 1598-603.

Markowski, D. N., N. Winter, F. Meyer, I. von Ahsen, H. Wenk, I. Nolte und J. Bullerdiek (2011). "p14Arf acts as an antagonist of HMGA2 in senescence of mesenchymal stem cells-implications for benign tumorigenesis." *Genes Chromosomes Cancer* 50: 489-98.

Maurizio, E., L. Cravello, L. Brady, B. Spolaore, L. Arnoldo, V. Giancotti, G. Manfioletti und R. Sgarra (2011). "Conformational role for the C-terminal tail of the intrinsically disordered high mobility group A (HMGA) chromatin factors." *J Proteome Res* 10: 3283-91.

Meyer, A., A. Staratschek-Jox, A. Springwald, H. Wenk, J. Wolf, C. Wickenhauser und J. Bullerdiek (2008). "Non-Hodgkin lymphoma expressing high levels of the danger-signalling protein HMGB1." *Leuk Lymphoma* 49: 1184-9.

Mills, N. E., C. L. Fishman, J. Scholes, S. E. Anderson, W. N. Rom und D. R. Jacobson (1995). "Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis." *J Natl Cancer Inst* 87: 1056-60.

Mitola, S., M. Belleri, C. Urbinati, D. Coltrini, B. Sparatore, M. Pedrazzi, E. Melloni und M. Presta (2006). "Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine." *J Immunol* 176: 12-5.

Miyazawa, J., A. Mitoro, S. Kawashiri, K. K. Chada und K. Imai (2004). "Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity." *Cancer Res* 64: 2024-9.

Morrison, S. J., N. M. Shah und D. J. Anderson (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." *Cell* 88: 287-98.

Muller, S., P. Scaffidi, B. Degryse, T. Bonaldi, L. Ronfani, A. Agresti, M. Beltrame und M. E. Bianchi (2001). "New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal." *EMBO J* 20: 4337-40.

Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." *Exp Cell Res* 256: 12-8.

Naumnik, W., W. Nilkowska, M. Ossolinska und E. Chyczewska (2009). "Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy." *Folia Histochem Cytobiol* 47: 703-9.

Nelson, J. D., O. Denisenko, P. Sova und K. Bomsztyk (2006). "Fast chromatin immunoprecipitation assay." *Nucleic Acids Res* 34: e2.

Nishino, J., I. Kim, K. Chada und S. J. Morrison (2008). "Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression." *Cell* 135: 227-39.

Nygren, A. O., J. Dean, T. J. Jensen, S. Kruse, W. Kwong, D. van den Boom und M. Ehrich (2010). "Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination." *Clin Chem* 56: 1627-35.

Orlando, V. (2000). "Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation." *Trends Biochem Sci* 25: 99-104.

Perrone, G., B. Vincenzi, M. Zagami, D. Santini, R. Panteri, G. Flammia, A. Verzi, D. Lepanto, S. Morini, A. Russo, V. Bazan, R. M. Tomasino, V. Morello, G. Tonini und C. Rabitti (2007). "Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade." *Mod Pathol* 20: 344-51.

Peter, I., H. Tighiouart, O. Lapaire, K. L. Johnson, D. W. Bianchi und N. Terrin (2008). "Cell-free DNA fragmentation patterns in amniotic fluid identify genetic abnormalities and changes due to storage." *Diagn Mol Pathol* 17: 185-90.

Pfannkuche, K., H. Summer, O. Li, J. Hescheler und P. Droge (2009). "The High Mobility Group Protein HMGA2: A Co-Regulator of Chromatin Structure and Pluripotency in Stem Cells?" *Stem Cell Rev Rep*.

Ponzielli, R., P. C. Boutros, S. Katz, A. Stojanova, A. P. Hanley, F. Khosravi, C. Bros, I. Jurisica und L. Z. Penn (2008). "Optimization of experimental design parameters for high-throughput chromatin immunoprecipitation studies." *Nucleic Acids Res* 36: e144.

Queimado, L., C. S. Lopes und A. M. Reis (2007). "WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors." *Genes Chromosomes Cancer* 46: 215-25.

Reddy, S. D., K. Ohshiro, S. K. Rayala und R. Kumar (2008). "MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions." *Cancer Res* 68: 8195-200.

Reeves, R. (2001). "Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function." *Gene* 277: 63-81.

Reeves, R. und M. S. Nissen (1990). "The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure." *J Biol Chem* 265: 8573-82.

Rogalla, P., K. Drechsler, G. Frey, Y. Hennig, B. Helmke, U. Bonk und J. Bullerdiek (1996). "HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors." *Am J Pathol* 149: 775-9.

Rogalla, P., K. Drechsler, B. Kazmierczak, V. Rippe, U. Bonk und J. Bullerdiek (1997). "Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade." *Mol Carcinog* 19: 153-6.

Rohozinski, J., M. L. Anderson, R. E. Broaddus, C. L. Edwards und C. E. Bishop (2009). "Spermatogenesis associated retrogenes are expressed in the human ovary and ovarian cancers." *PLoS One* 4: e5064.

Rommel, B., P. Rogalla, A. Jox, C. V. Kalle, B. Kazmierczak, J. Wolf und J. Bullerdiek (1997). "HMGI-C, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells." *Leuk Lymphoma* 26: 603-7.

Runyon, B. A. (2004). "Management of adult patients with ascites due to cirrhosis." *Hepatology* 39: 841-56.

Sarhadi, V. K., H. Wikman, K. Salmenkivi, E. Kuosma, T. Sioris, J. Salo, A. Karjalainen, S. Knuutila und S. Anttila (2006). "Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer." *J Pathol* 209: 206-12.

Scaffidi, P., T. Misteli und M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." *Nature* 418: 191-5.

Schmidt, D., M. D. Wilson, C. Spyrou, G. D. Brown, J. Hadfield und D. T. Odom (2009). "ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions." *Methods* 48: 240-8.

Schoenmakers, E. F., S. Wanschura, R. Mols, J. Bullerdiek, H. Van den Berghe und W. J. Van de Ven (1995). "Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours." *Nat Genet* 10: 436-44.

Schwarzenbach, H., C. Alix-Panabieres, I. Muller, N. Letang, J. P. Vendrell, X. Rebillard und K. Pantel (2009). "Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer." *Clin Cancer Res* 15: 1032-8.

Sekizawa, A., T. Kondo, M. Iwasaki, A. Watanabe, M. Jimbo, H. Saito und T. Okai (2001). "Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma." *Clin Chem* 47: 1856-8.

Sezer, O., C. Langelotz, J. U. Blohmer, P. Schmid, K. Akrivakis und K. Possinger (2000). "Detection of HMGI-C in the peripheral blood of breast cancer patients." *Eur J Cancer* 36: 1944-8.

Sgarra, R., S. Zammiti, A. Lo Sardo, E. Maurizio, L. Arnoldo, S. Pegoraro, V. Giancotti und G. Manfioletti (2009). "HMGA molecular network: From transcriptional regulation to chromatin remodeling." *Biochim Biophys Acta*.

Shapiro, B., M. Chakrabarty, E. M. Cohn und S. A. Leon (1983). "Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease." *Cancer* 51: 2116-20.

Sidransky, D. (1997). "Nucleic acid-based methods for the detection of cancer." *Science* 278: 1054-9.

Sims, G. P., D. C. Rowe, S. T. Rietdijk, R. Herbst und A. J. Coyle (2010). "HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer." *Annu Rev Immunol* 28: 367-88.

Slama-Schwok, A., K. Zakrzewska, G. Leger, Y. Leroux, M. Takahashi, E. Kas und P. Debey (2000). "Structural changes induced by binding of the high-mobility group I protein to a mouse satellite DNA sequence." *Biophys J* 78: 2543-59.

Solomon, M. J., P. L. Larsen und A. Varshavsky (1988). "Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene." *Cell* 53: 937-47.

Solomon, M. J., F. Strauss und A. Varshavsky (1986). "A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1276-80.

Specht, K., T. Richter, U. Muller, A. Walch, M. Werner und H. Hofler (2001). "Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue." *Am J Pathol* 158: 419-29.

Spencer, V. A., J. M. Sun, L. Li und J. R. Davie (2003). "Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding." *Methods* 31: 67-75.

Srikrishna, G. und H. H. Freeze (2009). "Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer." *Neoplasia* 11: 615-28.

Stranc, L. C., J. A. Evans und J. L. Hamerton (1997). "Chorionic villus sampling and amniocentesis for prenatal diagnosis." *Lancet* 349: 711-4.

Tabor, A., C. H. Vestergaard und O. Lidegaard (2009). "Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study." *Ultrasound Obstet Gynecol* 34: 19-24.

Taguchi, A., D. C. Blood, G. del Toro, A. Canet, D. C. Lee, W. Qu, N. Tanji, Y. Lu, E. Lalla, C. Fu, M. A. Hofmann, T. Kislinger, M. Ingram, A. Lu, H. Tanaka, *et al.* (2000). "Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases." *Nature* 405: 354-60.

Takeuchi, T., Y. Watanabe, T. Takano-Shimizu und S. Kondo (2006). "Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development." *Dev Dyn* 235: 2449-59.

Tessari, M. A., M. Gostissa, S. Altamura, R. Sgarra, A. Rustighi, C. Salvagno, G. Caretti, C. Imbriano, R. Mantovani, G. Del Sal, V. Giancotti und G. Manfioletti

(2003). "Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2." *Mol Cell Biol* 23: 9104-16.

Thanos, D. und T. Maniatis (1995). "Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome." *Cell* 83: 1091-100.

Thuault, S., U. Valcourt, M. Petersen, G. Manfioletti, C. H. Heldin und A. Moustakas (2006). "Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition." *J Cell Biol* 174: 175-83.

Tuerk, C. und L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* 249: 505-10.

Ulloa, L. und D. Messmer (2006). "High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe." *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 189-201.

Urruticoechea, A., H. Aguilar, X. Sole, G. Capella, L. A. Martin, M. Dowsett und J. R. Germa-Lluch (2008). "Pre-clinical validation of early molecular markers of sensitivity to aromatase inhibitors in a mouse model of post-menopausal hormone-sensitive breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 109: 463-70.

Valdes, L., A. Pose, J. Suarez, J. R. Gonzalez-Juanatey, A. Sarandeses, E. San Jose, J. M. Alvarez Dobana, M. Salgueiro und J. R. Rodriguez Suarez (1991). "Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates." *Chest* 99: 1097-102.

van Beijnum, J. R., R. P. Dings, E. van der Linden, B. M. Zwaans, F. C. Ramaekers, K. H. Mayo und A. W. Griffioen (2006). "Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature." *Blood* 108: 2339-48.

Villena, V., A. Lopez-Encuentra, F. Pozo, A. De-Pablo und P. Martin-Escribano (2000). "Measurement of pleural pressure during therapeutic thoracentesis." *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1534-8.

Wang, H., H. Yang, C. J. Czura, A. E. Sama und K. J. Tracey (2001). "HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation." *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1768-73.

Weedon, M. N., H. Lango, C. M. Lindgren, C. Wallace, D. M. Evans, M. Mangino, R. M. Freathy, J. R. Perry, S. Stevens, A. S. Hall, N. J. Samani, B. Shields, I. Prokopenko, M. Farrall, A. Dominiczak, et al. (2008). "Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height." *Nat Genet* 40: 575-83.

Weedon, M. N., G. Lettre, R. M. Freathy, C. M. Lindgren, B. F. Voight, J. R. Perry, K. S. Elliott, R. Hackett, C. Guiducci, B. Shields, E. Zeggini, H. Lango, V. Lyssenko, N. J. Timpson, N. P. Burtt, et al. (2007). "A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population." *Nat Genet* 39: 1245-50.

Weinmann, A. S. und P. J. Farnham (2002). "Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation." *Methods* 26: 37-47.

Wells, J. und P. J. Farnham (2002). "Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation." *Methods* 26: 48-56.

Winter, N., A. Meyer, A. Richter, D. Krisponeit und J. Bullerdiek (2009). "Elevated levels of HMGB1 in cancerous and inflammatory effusions." *Anticancer Res* 29: 5013-7.

Winter, N., A. Neumann und J. Bullerdiek (2008). "Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2-implications for noninvasive prenatal diagnosis." *Prenat Diagn* 28: 1126-30.

Winter, N., R. Nimzyk, C. Bosche, A. Meyer und J. Bullerdiek (2011). "Chromatin immunoprecipitation to analyze DNA binding sites of HMGA2." *PLoS One* 6: e18837.

Wolffe, A. P. (1994). "Architectural transcription factors." *Science* 264: 1100-1.

Xiang, Y. Y., D. Y. Wang, M. Tanaka, M. Suzuki, E. Kiyokawa, H. Igarashi, Y. Naito, Q. Shen und H. Sugimura (1997). "Expression of high-mobility group-1 mRNA in human gastrointestinal adenocarcinoma and corresponding non-cancerous mucosa." *Int J Cancer* 74: 1-6.

Yamagishi, S., H. Yonekura, Y. Yamamoto, K. Katsuno, F. Sato, I. Mita, H. Ooka, N. Satozawa, T. Kawakami, M. Nomura und H. Yamamoto (1997). "Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor." *J Biol Chem* 272: 8723-30.

Yang, G. L., L. H. Zhang, J. J. Bo, K. L. Hou, X. Cai, Y. Y. Chen, H. Li, D. M. Liu und Y. R. Huang (2011). "Overexpression of HMGA2 in bladder cancer and its association with clinicopathologic features and prognosis HMGA2 as a prognostic marker of bladder cancer." *Eur J Surg Oncol* 37: 265-71.

Yang, H., M. Ochani, J. Li, X. Qiang, M. Tanovic, H. E. Harris, S. M. Susarla, L. Ulloa, H. Wang, R. DiRaimo, C. J. Czura, J. Roth, H. S. Warren, M. P. Fink, M. J. Fenton, *et al.* (2004). "Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 296-301.

Yasui, Y. und T. Tanaka (2009). "Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis." *J Carcinog* 8: 10.

Zentner, M. D., H. H. Lin, H. T. Deng, K. J. Kim, H. M. Shih und D. K. Ann (2001). "Requirement for high mobility group protein HMGI-C interaction with STAT3 inhibitor PIAS3 in repression of alpha-subunit of epithelial Na⁺ channel (alpha-ENaC) transcription by Ras activation in salivary epithelial cells." *J Biol Chem* 276: 29805-14.

Zha, L., Z. Wang, W. Tang, N. Zhang, G. Liao und Z. Huang (2012). "Genome-wide analysis of HMGA2 transcription factor binding sites by ChIP on chip in gastric carcinoma cells." *Mol Cell Biochem*.

Zhang, C. L., M. G. Shu, H. W. Qi und L. W. Li (2008). "Inhibition of tumor angiogenesis by HMGB1 A box peptide." *Med Hypotheses* 70: 343-5.

Zhao, Y., X. Zhang, K. Guda, E. Lawrence, Q. Sun, T. Watanabe, Y. Iwakura, M. Asano, L. Wei, Z. Yang, W. Zheng, D. Dawson, J. Willis, S. D. Markowitz, M. Satake, et al. (2010). "Identification and functional characterization of paxillin as a target of protein tyrosine phosphatase receptor T." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2592-7.

Zhou, X., K. F. Benson, H. R. Ashar und K. Chada (1995). "Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C." *Nature* 376: 771-4.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl; µg	Mikroliter; -gramm
A	Adenin
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AIX	Ampicillin, ITPG und X-Gal
ALDH1A1	Aldehyd Dehydrogenase 1A1
Array-CGH	Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BGG	Bovine Gamma Globulin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CDC2	Cell Division Controller 2
CEA	Carcinoembryonales Antigen
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
cm	Zentimeter
Ct	Cycle Threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ENG	Endoglin
ERCC1	Excision Repair Cross-complementing Rodent Repair Deficiency
FAM	Carboxy-Fluorescein
FCGBP	IgG Fc Binding Protein
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
HMG	High Mobility Group Protein
HMGN	High Mobility Group Protein N
HMGA	High Mobility Group Protein A
HMGB	High Mobility Group Protein B

HOXD10	Homeobox D10
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
Imp2	Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2
IP	Immunpräzipitierte Probe
JMJD1C	Jumonji Domain Containing 1C
LDH	Laktatdehydrogenase
MAN1A1	Mannosidase- α , Class 1A, Member 1
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mg; ml; mM	Milligramm; -liter; -molar
min	Minute
miRNA <i>let-7</i>	MicroRNA Lethal-7
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
ng	Nanogramm
NoAb	No Antibody
p14 ^{ARF}	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A; p14 ^{ARF}
p16 ^{Ink4a}	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A; p16 ^{Ink4a}
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTPRT	Tyrosine Phosphatase Receptor Type T
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
RELN	Reelin
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RPL10L	Ribosomales Protein L10-like
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SI	Sucrase-Isomaltase
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin

TAMRA	Tetramethyl-Rhodamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TK1	Thymidinkinase
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
UTR	Untranslatierte Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Jörn Bullerdiek für die Übertragung des überaus interessanten Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Burkhard Helmke danke ich ganz herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit und für die Übernahme des Koreferats.

Für das Bereitstellen von Probenmaterial und die Beantwortung fachlicher Fragen im klinischen Bereich danke ich Dr. Dietz Krisponeit und Dr. Armin Neumann.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Humangenetik, für ihre Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Markus Klemke, Marietta Müller, Martina Lübbing, Dr. Andreas Richter, Norbert Drieschner, PD Dr. Gazanfer Belge, Carolin Bösche, Arlo Radtke, Lars Kloth, Dr. Volkhard Rippe, Dr. Rolf Nimzyk, Dr. Siegfried Loeschke, Dr. Anke Meyer, Henrieke Förster und Angelika Schneider-Uhlhorn, für die tolle Zusammenarbeit, Hilfestellungen und anregenden Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir diesen Weg ermöglichten und mir Vertrauen gaben, das gesteckte Ziel zu erreichen.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Mann Mario bedanken, der mir in allen Höhen und Tiefen zur Seite gestanden hat und immer für mich da war.

PUBLIKATIONEN I-III

Im Folgenden sind die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Publikationen in der Reihenfolge, in der sie im Ergebnisteil erscheinen, aufgeführt.

- I. **Winter N, Meyer A, Richter A, Krisponeit D, Bullerdiek J.** 2009. Elevated levels of HMGB1 in cancerous and inflammatory effusions. *Anticancer Research*. 29 (12):5013-5017.

Eigenanteil:

Durchführung und Auswertung der Studie zusammen mit Anke Meyer.

Verfassen der Veröffentlichung zusammen mit Jörn Bullerdiek und Anke Meyer.

Nina Winter und Anke Meyer sind gleichberechtigte Erstautoren des Artikels.

- II. **Winter N, Neumann A, Bullerdiek J.** 2008. Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2-implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 28 (12):1126-1130.

Eigenanteil:

Durchführung und Auswertung der Studie, Verfassen der Veröffentlichung zusammen mit Jörn Bullerdiek.

- III. **Winter N, Nimzyk R, Bösche C, Meyer A, Bullerdiek J.** 2011. Chromatin immunoprecipitation to analyze DNA binding sites of HMGA2. *PLoS One*. 6 (4):e18837

Eigenanteil:

Durchführung und Auswertung der Studie zusammen mit Carolin Bösche, bis auf die Bioinformatik. Verfassen der Veröffentlichung zusammen mit Jörn Bullerdiek und Rolf Nimzyk.