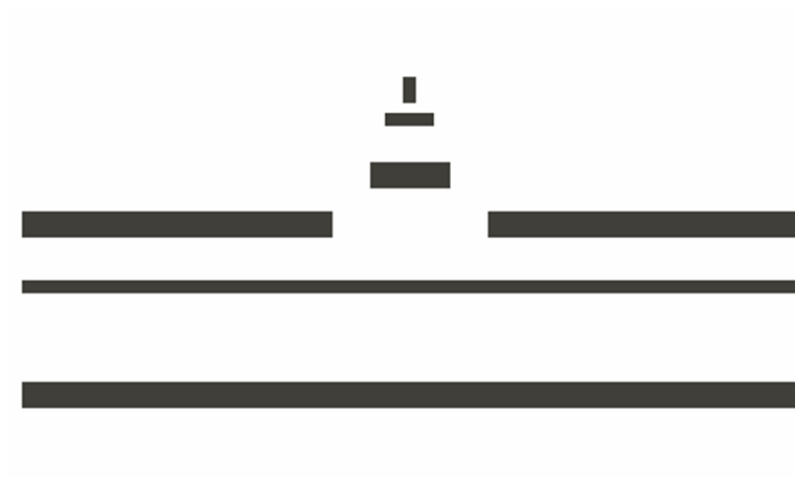


Katrin Guske

**Gewebespezifische und epigenetische Regulation der
KIBRA-Expression in humanen Nieren- und Nervenzellen**

-2014-

Biologie



Gewebespezifische und epigenetische Regulation der *KIBRA*-Expression in humanen Nieren- und Nervenzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Katrin Guske
aus Dresden

- 2014 -

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. Dirk Prüfer

Erster Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Eva Brand

Zweiter Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Eva Liebau

Datum der mündlichen Prüfung:

26.09.2014

Datum der Promotion:

17.10.2014

*„Man merkt nie, was schon getan wurde, man
sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“*

Marie Skłodowska Curie (1867-1934)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abstract	VII
1. Einleitung	1
1.1. Kontrolle der eukaryotischen Genexpression	1
1.1.1. Cis- regulatorische DNA/RNA-Elemente	1
1.1.1.1. Der <i>Core</i> -Promotor.....	1
1.1.1.2. <i>Cis</i> -regulatorische Elemente der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR).....	2
1.1.1.3. Der Transkriptionszyklus.....	3
1.1.1.4. Proximaler Promotor.....	4
1.1.1.5. <i>Enhancer</i> , <i>Scilencer</i> und Isolatoren.....	5
1.1.2. Posttranslationale Genregulation	6
1.1.3. Alternative Promotoren	7
1.1.4. CpG-Insel-Promotoren	8
1.2. Epigenetische Mechanismen	8
1.2.1. Histonmodifikation	9
1.2.2. DNA-Methylierung	10
1.2.3. Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung	11
1.3. Gerüstproteine	12
1.3.1. <i>Kidney and brain (KIBRA)</i> - ein zytoplasmatisches Gerüstprotein	13
1.3.1.1. KIBRA-Proteindomänen.....	14
1.3.1.2. KIBRA und Gedächtnisleistung.....	15
1.3.1.3. KIBRA-Zellmigration und -polarität.....	16
1.3.1.4. KIBRA und der Hippo-Signalweg.....	16
1.3.2. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg	18
1.4. Ziel der Arbeit	20
2. Material	22
2.1. Chemikalien	22

2.2. Verbrauchsmaterialien und Kits	23
2.3. Seren und Medien	24
2.4. DNA-Marker	24
2.5. Enzyme	24
2.6. Antikörper	25
2.7. Plasmide und Vektoren	25
2.8. Escherichia coli (E. coli)-Stämme	25
2.9. Eukaryotische Zelllinien	25
2.10. Geräte	26
3. Methoden	28
3.1. Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1. Isolierung von Nukleinsäuren	28
3.1.1.1. Isolierung genomischer DNA.....	28
3.1.1.2. Isolierung von RNA.....	28
3.1.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
3.1.2. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	29
3.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
3.1.3.1. <i>Reverse transcriptase</i> -PCR (RT-PCR).....	31
3.1.3.2. <i>RNA ligase mediated rapid amplification of</i> <i>cDNA ends</i> (RLM-RACE).....	31
3.1.4. DNA/RNA-modifizierende Reaktionen	32
3.1.4.1. Restriktionsendonukleasen.....	32
3.1.4.2. DNA-Dephosphorylierung.....	33
3.1.4.3. Ligation.....	33
3.1.5. Agarose-Gelelektrophorese	33
3.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	34
3.1.6.1. Gelextraktion.....	34
3.1.6.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion.....	34
3.1.6.3. Exo/SAP-Aufreinigung.....	35
3.1.7. Sequenzierung	35
3.1.8. Reporterassay	35
3.1.8.1. Konstruktion der Promotordeletionskonstrukte.....	35
3.1.8.2. Bestimmung der Transkriptionsaktivität.....	37
3.1.8.3. Überexpressionsexperimente.....	37
3.1.9. Zielgerichtete Mutagenese	38

3.1.10. Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP)	39
3.1.11. <i>In vitro</i> Methylierung	41
3.1.12. Bisulfitkonvertierung	41
3.2. Zellbiologische und mikrobiologische Methoden	42
3.2.1. Prokaryotische Zellen	42
3.2.1.1. Kulturbedingungen prokaryotischer Zellen	42
3.2.1.2. Herstellung kompetenter Zellen	43
3.2.1.3. Transformation	43
3.2.2. Eukaryotische Zellen	44
3.2.2.1. Kulturbedingungen eukaryotischer Zellen	44
3.2.2.2. Lagerung der Zellen	44
3.2.2.3. Transiente Transfektion	45
3.2.3. Studienpopulationen	45
3.2.4. <i>In silico</i> Analysen	46
3.2.5. Statistische Auswertung	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Identifizierung von TSS	47
4.2. Identifizierung von regulatorischen Bereichen	50
4.2.1. Identifizierung des alternativen 5'-Promotors P1b	52
4.2.2. Identifizierung der Intron-Promotoren P2 und P3	54
4.2.3. Einfluss der 5'-UTR auf die Transkriptionsaktivität	56
4.3. Identifizierung genetischer Varianten im <i>KIBRA</i>-Promotorbereich P1	57
4.3.1. Einfluss der identifizierten genetischen Varianten auf die P1-Transkriptionsaktivität	59
4.3.2. Analyse der molekularen Haplotypen	60
4.4. Identifizierung von TCF7L2-Bindestellen in den <i>KIBRA</i>-Promotor P1a und P2	61
4.4.1. Regulation der <i>KIBRA</i> -Transkription durch TCF7L2	62
4.4.2. Mutagenese der TCF7L2-Bindestellen in P1a	63
4.4.3. Nachweis der TCF7L2-Bindung an den <i>KIBRA</i> -Promotor P1a	64
4.4.4. Regulation der <i>KIBRA</i> -Expression durch die Transkriptionsfaktoren TCF7L2, YAP1 und TEAD4	65
4.5. Identifizierung von CpG-Inseln im <i>KIBRA</i>-Promotor	68

4.6. Effekt von Promotormethylierung auf die Transkriptionsaktivität von P1	69
4.7. <i>KIBRA</i> -Methylierungsmuster bei Nierenzellkarzinom	72
5. Diskussion	74
5.1. Die <i>KIBRA</i> -Expression basiert auf multiplen zelltypspezifischen TSS und einem komplexem Promotorsystem	75
5.2. Einfluss genetischer Varianten auf die Promotoraktivität	77
5.3. Regulation der <i>KIBRA</i> -Expression über Hippo- und Wnt-Signalweg	78
5.3.1. Regulation der <i>KIBRA</i> -Expression durch TCF7L2	79
5.3.2. TCF7L2, YAP1 und TEAD4: ein Modul bei der <i>KIBRA</i> -Expressionsregulation	80
5.4. CpG-Inseln und Methylierung	81
5.4.1. Einfluss des Methylierungsgrads auf die <i>KIBRA</i> -Expression	82
5.4.2. <i>KIBRA</i> -Methylierungsgrad im Nierengewebe	82
5.5. Zusammenfassung	84
6. Ausblick	85
7. Referenzen	87
8. Anhang	112
9. Kongressbeiträge	114
10. Publikationen	116

Abkürzungen

A	Adenin
AMPA	<i>Alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate</i>
AS	Aminosäure
as	<i>Antisense</i>
bp	Basenpaar
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPE	<i>Downstream promoter element</i>
Dvl	<i>Dishevelled</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGR1	<i>Early growth response 1</i>
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potentials
g	Erdbeschleunigung/Normalfallbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde
HAT	Histon-Acetylase
HDAC	Histon-Deacetylase
hrp27	<i>Human ribosomal protein 27</i>
IgG	Immunglobulin G
INR	Initiator-Element
kb	Kilobase
KIBRA	<i>Kidney and brain</i>
LATS	<i>Large tumor supressor kinase 1/2</i>
LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LTP	Langzeitpotentierung
M	Molare Masse
min	Minute
miRNA	MicroRNA
MolHap	Molekularer Haplotyp
MolProMD Münster	<i>Molecular Functional Profiling for Mechanism Detection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

MST1/2	<i>Mammalian sterile 20-like kinase 1/2</i>
NF2	Neurofibromin 2
NF-κB	<i>Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal, <i>nuclear localization signal</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAR3	<i>Par-3 partitioning defective 3 homolog</i>
PAR6	<i>Par-6 partitioning defective 6 homolog alpha</i>
PATJ	<i>Pals1-associated tight junction protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>Polymerase chain reaction</i>
PDZ	Domäne von <i>Post synaptic density-95</i> , <i>Discs large</i> und <i>Zonula occludentes-1</i>
PKCζ	Proteinkinase C zeta
PSD	Postsynaptische Dichte
RLM-RACE	<i>RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
sec	Sekunde
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
ss	<i>Sense</i>
SV40	Simian-Virus 40
T	Thymin
TAF	TBP-assoziierter Faktor
TAZ/Wwtr1	<i>WW-domain-containing transcription regulator 1</i>
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCF7L2	<i>Transcription factor 7 like 2</i>
TEAD	<i>TEA domain family member</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestelle
Tm	Schmelztemperatur, <i>melting temperature</i>
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	Unit
UTR	untranslatierte Region

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
wt	Wildtyp
YAP1	<i>Yes-associated protein 1</i>

Abbildungsverzeichnis

1.	Der Transkriptionszyklus	4
2.	Epigenetische Mechanismen der Genregulation	11
3.	Wirkmechanismen von Gerüstproteinen	13
4.	<i>KIBRA</i> -Genlocus und Proteindomänen	15
5.	Der Hippo-Signalweg	18
6.	Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg	20
7.	RLM-RACE	32
8.	Das pGL3-Vektor-System	36
9.	Darstellung der chemischen Reaktion der Konvertierung von Cytosin zu Uracil	42
10.	TSS in der 5'-flankierenden Region von <i>KIBRA</i>	46
11.	Die zelltypspezifischen TSS2 und TSS3 liegen im ersten Intron von <i>KIBRA</i>	49
12.	Transkriptionsaktivität der seriellen <i>KIBRA</i> -Promotordeletionskonstrukte	51
13.	Die Transkriptionsaktivität von P1b ist auf renale Zellen beschränkt	53
14.	Die Intron-Promotoren P2 und P3 sind in neuronalen Zellen inaktiv	55
15.	Effekt der 5'-UTR auf die Transkriptionsaktivität des <i>KIBRA</i> -Promotors	56
16.	Genetische Varianten in der 5'-flankierenden Region von <i>KIBRA</i>	57
17.	<i>In silico</i> Analyse der Transkriptionsfaktorassemblierung an Position -580	58
18.	Einfluss der genetischen Varianten auf die Transkriptionsaktivität von P1	59
19.	Die Transkriptionsaktivität von MolHap1 und MolHap2 im Vergleich	60
20.	TCF7L2-Bindestellen im <i>KIBRA</i> -Promotor P1a und P2	62
21.	Die TCF7L2-Überexpression führt in IHKE-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität	63
22.	Effekt der TCF7L2-Bindestellenmutagenese auf die Transkriptionsaktivität von P1a	64
23.	TCF7L2 bindet an den <i>KIBRA</i> -Promotor P1a	65
24.	YAP1 und TEAD4 sind an der Regulation der <i>KIBRA</i> -Expression in IHKE-Zellen beteiligt	67
25.	<i>KIBRA</i> -CpG-Inseln sind im Promotorbereich P1a und P1b lokalisiert	68
26.	Lage der Promotordeletionskonstrukte für die Methylierungsexperimente	69
27.	Inaktivierung der <i>KIBRA</i> -Promotorbereiche P1a und P1b durch vollständige Methylierung der CpG-Inseln	70
28.	Zelltypspezifischer Effekt auf die <i>KIBRA</i> -Transkriptionsaktivität durch partielle Methylierung der CpG-Inseln	71
29.	<i>KIBRA</i> -Methylierungsstatus im Nierengewebe	73
30.	Das <i>KIBRA</i> -Promotorsystem	77

31.	Das TCF7L2/YAP1/TEAD-Modul am <i>KIBRA</i> -Promotor P1a	81
A1.	Lokalisation der TSS-spezifischen Oligonukleotide	112
A2.	TCF7L2-Überexpression führt in HPCT-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität	112
A3.	Sequenzierung der bisulfitkonvertierten DNA	113
A4.	SP1 ist an der konstitutiven <i>KIBRA</i> -Expression beteiligt	113

Tabellenverzeichnis

1.	Oligonukleotide zur Generierung serieller Promotordeletionskonstrukte (AC026689)	36
2.	Oligonukleotide zur Generierung der seriellen Intron-Promotordeletionskonstrukte (AC026689)	37
3.	Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese (AC026689, Position des Basenaustausch grau markiert, BS=Bindestelle)	38
4.	Oligonukleotide für den ChIP-Assay (AC026689)	40
5.	Oligonukleotide für die Analyse des <i>KIBRA</i> -Methylierungsstatus (AC026689)	42
6.	Zellzahl pro 24iger-Loch	43

Abstract

KIBRA (WW and C2 domain containing 1, WWC1) was initially characterized as a cytoplasmic scaffold protein, mainly expressed in kidney and brain tissue. Genetic association studies have replicatively associated the *KIBRA*-locus with memory performance, cognition and an increased risk for late-onset Alzheimer's disease. In the kidney, KIBRA interacts with polarity proteins, thereby regulating apicobasal cell polarity and cell migration of podocytes. KIBRA has also been shown to function as an upstream member of the Hippo pathway, which is involved in the regulation of organ growth, regeneration and apoptosis. Dysregulation of Hippo pathway components including KIBRA have been described in human cancer development.

Since there is scarce information on *KIBRA* gene expression regulation, we analyzed the molecular basis of tissue-specific *KIBRA* expression in human kidney epithelial (IHKE, HPCT) and neuroblastoma (SH-SY5Y, SK-SN-SH) cells. We determined transcriptional start sites by rapid amplification of 5'-cDNA ends (5'-RACE), generated serial promoter deletion constructs and mapped transcriptionally active regions by reporter gene assay. The regulation of *KIBRA* expression by transcription factors was investigated in cotransfection experiments and by chromatin immunoprecipitation. We identified one constitutively active core promoter (P1a) and three alternative promoters (P1b, P2 and P3), which were exclusively active in kidney cells. We provide detailed insight into molecular cell-type specific *KIBRA* transcriptional regulation by transcription factor 7 like 2 (TCF7L2), the Yes-associated protein 1 (YAP1) and TEA domain family member (TEAD).

Based on this detailed analysis of the *KIBRA* 5'-regulatory region, we analyzed the epigenetic regulation of human *KIBRA* expression. We identified two separate methylation-sensitive CpG islands located within the *KIBRA* core promoter P1a (CpG1) and the alternative promoter P1b (CpG2). The impact of CpG island methylation on *KIBRA* expression was analyzed by *in vitro* methylation and reporter gene assay. Methylation of CpG sites by SssI resulted in a total abrogation of the promoter activity *in vitro*, while partial methylation by HpaII only repressed the P1a promoter activity in IHKE cells. Furthermore, we determined specific *KIBRA* methylation patterns in different renal cell carcinoma subtypes by bisulfite sequencing.

Our findings provide a potential basis for future studies on malfunctioning *KIBRA* regulation in pathophysiological conditions such as cancer development.

KIBRA (*WW and C2 domain containing 1, WWC1*) ist ein zytoplasmatisches Gerüstprotein mit konstitutiver Expression in Hirn- und Nierengewebe. Schon mehrfach wurde der *KIBRA*-Genlocus mit Gedächtnisleistung und der *late-onset* Alzheimer-Erkrankung assoziiert. In der Niere spielt KIBRA als Brückenmolekül zwischen Zytoskelett und Polaritätsproteinen eine Rolle bei der Regulation der apikal-basalen Zellpolarität und der Zellmigration von Podozyten. Zudem scheint KIBRA ein wichtiger Regulator des Hippo-Signalwegs zu sein. Dieser Signalweg ist an der Kontrolle der Organgröße, der Zellregeneration und an apoptotischen Prozessen beteiligt. Eine Dysregulation des Hippo-Signalwegs bzw. der Komponenten dieses Signalwegs, KIBRA eingeschlossen, wurde wiederholt bei pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorgenese beschrieben.

Da es bislang neben diesen funktionellen Daten keine Untersuchungen zur Genstruktur sowie der gewebespezifischen Regulation der *KIBRA*-Expression gibt, wurde eine molekular-funktionelle Charakterisierung des humanen *KIBRA*-Gens in immortalisierten epithelialen Nieren- (IHKE, HPCT) und Neuroblastomazellen (SH-SY5Y, SK-N-SH) durchgeführt. Hierfür wurde zuerst die Position der *KIBRA*-Transkriptionsstartstellen mittels *rapid amplification of 5'-cDNA ends* (5'-RACE) in beiden Zelltypen ermittelt. Zur Identifizierung regulatorischer Bereiche wurden serielle Promotordeletionskonstrukte generiert und im Reporterassay in beiden Zelltypen bezüglich der Transkriptionsaktivität untersucht. Der Einfluss ausgewählter Transkriptionsfaktoren auf die *KIBRA*-Transkription wurde mittels Überexpressionsexperimenten und die Bindung eines Transkriptionsfaktors an den Promotorbereich mittels Chromatin-Immunpräzipitation analysiert. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass *KIBRA* über einen konstitutiven *Core*-Promotor (P1a) und drei nierenspezifische alternative Promotoren (P1b, P2 und P3) verfügt. Außerdem wurde der Transkriptionsfaktor *transcription factor 7 like 2* (TCF7L2) im Komplex mit *Yes-associated protein 1* (YAP1) und *TEA domain family member* (TEAD) als wichtiger Regulator des alternativen *KIBRA*-Promotorsystems identifiziert.

Anschließend erfolgte die Analyse der epigenetischen Regulation der *KIBRA*-Expression. Dabei wurden mittels *in silico* Analyse zwei CpG-Inseln, im *Core*-Promotor P1a (CpG1) und im alternativen Promotor P1b (CpG2), von *KIBRA* identifiziert. Ferner wurde der Einfluss der Promotormethylierung auf die Transkriptionsaktivität mittels *in vitro* Methylierung der Promotordeletionskonstrukte im Reporterassay untersucht. Die Transkriptionsaktivität des Promotorbereichs P1a wurde in beiden Zelltypen durch die vollständige Methylierung mit SssI reprimiert. Die partielle Methylierung durch HpaII hingegen führte zu einer Inhibierung der Transkriptionsaktivität des *Core*-Promotors P1a in IHKE-Zellen. Des Weiteren wurde mittels Bisulfitsequenzierung das *KIBRA*-Methylierungsmuster in unterschiedlichen Nierenzellkarzinom-Subtypen untersucht.

Zusammengefasst bilden die Ergebnisse dieser Arbeit die Basis für zukünftige Studien zur Dysregulierung der *KIBRA*-Expression in pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorgenese.

1. Einleitung

1.1. Kontrolle der eukaryotischen Genexpression

Die Steuerung biologischer Prozesse wie Entwicklung, Proliferation, Apoptose, Alterung und Differenzierung der Zellen eines Organismus erfordert die räumlich und zeitlich präzise abgestimmte Genexpression. Die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahr 2004 führte zur Katalogisierung von 20.000-25.000 proteinkodierender Gene (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004). Dies entspricht nur etwa 1,5% des menschlichen Genoms. Weitere 45% umfassen repetitive DNA-Elemente und die restlichen ~50% galten lange Zeit als sogenannte „junk“-DNA. Neuste Studien lassen jedoch vermuten, dass eine Vielzahl *cis*-regulatorischer Elemente in diesen Bereichen des Genoms lokalisiert sind und eine wichtige Rolle bei der komplexen Steuerung der Genexpression in den unterschiedlichen Zelltypen eines Organismus spielen (Heintzman & Ren, 2009). Diese *cis*-regulatorischen Elemente beinhalten meist Bindungsmotive für *trans*-wirkende Elemente, die Transkriptionsfaktoren. Das Zusammenwirken *cis*-regulatorischer Elemente, der verfügbaren Transkriptionsfaktoren und deren Interaktion untereinander sowie der basalen Transkriptionsmaschinerie reguliert die Intensität, mit der die Transkription eines bestimmten Gens initiiert wird (Maston et al., 2006).

1.1.1. *Cis*-regulatorische DNA/RNA-Elemente

In Eukaryonten erfolgt die Transkription proteinkodierender Gene durch die RNA-Polymerase II. Diese Gene enthalten typischerweise zwei Klassen *cis*-regulatorischer DNA-Elemente: (1) einen Promotor, der sich aus dem *Core*-Promotor sowie dem stromaufwärts gelegenen proximalen Promotor zusammensetzt, und (2) die distalen regulatorischen Elemente wie *Enhancer*, *Silencer* und Isolatoren (Maston et al., 2006).

1.1.1.1. Der *Core*-Promotor

Als *Core*-Promotor wird der ~80 bp umfassende Bereich stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) eines Gens bezeichnet, welcher als Assemblierungsstelle für die basale Transkriptionsmaschinerie und somit zur Bildung des Präinitiationskomplexes (PIK) dient (Carninci et al., 2006; Smale & Kadonaga, 2003). Das erste beschriebene

Core-Promotorelement war die TATA-Box. Dabei handelt es sich um eine AT-reiche Sequenz, die sich etwa 25-30 bp stromaufwärts von der TSS befindet und eine Bindungsstelle für das TATA-Box bindende Protein (TBP), eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors IID (TFIID), darstellt (Butler & Kadonaga, 2002; Smale & Kadonaga, 2003). Zusätzlich zur TATA-Box können im eukaryotischen Core-Promotor weitere regulatorische Elemente wie Initiatorelement (INR), *downstream promoter element* (DPE), *upstream promoter element* (UPE), *downstream core element* (DCE), *TFIIB recognition element* (BRE), *motif ten element* (MTE) und *X core promoter element 1* (XCPE1) vertreten sein (Juven-Gershon et al., 2008). Viele Gene unterscheiden sich in der Art und Kombination ihrer Core-Promotorelemente. So kommen TATA-Boxen nur in 10-16% und INR-Elemente nur in etwa 55% der Core-Promotoren humaner proteinkodierender Gene vor (Heintzman & Ren, 2007). Ferner gibt es zusätzlich Core-Promotoren, die keines der bekannten regulatorischen Elemente besitzen (Juven-Gershon et al., 2008).

1.1.1.2. Cis-regulatorische Elemente in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR)

Die 5'-UTR ist eine regulatorische Region, die zwar in mRNA transkribiert, nicht aber in Protein translatiert wird. 5'-UTRs können verschiedene regulatorische Elemente enthalten, die eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsinitiationskontrolle spielen (Hughes, 2006).

Die Sekundärstruktur und der GC-Gehalt der 5'-UTR haben einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Vergleichende *in silico* Analysen von Genen mit einer hohen und niedrigen Proteinexpression haben gezeigt, dass 5'-UTRs, die eine effiziente Transkription ermöglichen, kurz und relativ unstrukturiert sind. Sie besitzen meist einen niedrigen GC-Gehalt und enthalten keine stromaufwärts gelegenen Start-Codons (uAUGs; Kochetov et al., 1998). Im Vergleich dazu sind die 5'-UTRs von Genen mit einer niedrigen Proteinexpression im Durchschnitt länger, GC-reich und besitzen einen höheren Grad an vorhergesagten Sekundärstrukturen (Pickering & Willis, 2005). Diese hochstrukturierten 5'-UTRs sind oft mit Genen assoziiert, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind, und die entsprechenden mRNAs werden in der Regel entwicklungs- oder gewebespezifisch exprimiert.

Eine gut charakterisierte Sekundärstruktur der 5'-UTR, die einen großen Einfluss auf die Transkription hat, ist die G-Quadruplex-Struktur (G4). Diese Strukturen werden durch Guanin-reiche Sequenzen gebildet, die sich in eine sehr stabile, nicht-kanonische, tetraedrische Struktur falten und einen starken reprimierenden Einfluss auf die Translation ausüben (Beaudoin & Perreault, 2010). Weitere regulatorische Elemente der 5'-UTR sind interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) und stromaufwärts, vor dem eigentlichen

Translationsstart, gelegene offene Leserahmen (uORF; Komar & Hatzoglou, 2005; Meijer & Thomas, 2002). IRES ermöglichen eine direkte Bindung der Ribosomen an die mRNA, unabhängig von weiteren Initiationsfaktoren und haben dadurch Einfluss auf die Translationsinitiation (Komar & Hatzoglou, 2005). Die uORFs sind in ~50% der menschlichen 5'-UTRs vorhanden, und ihre Anwesenheit korreliert mit einer reduzierten Proteinexpression. Im Durchschnitt reduzieren uORFs den mRNA-Spiegel um etwa 30%, was zu einer um 30-80% reduzierten Proteinexpression führt (Calvo et al., 2009; Meijer & Thomas, 2002).

1.1.1.3. Der Transkriptionszyklus

Die Transkriptionsinitiation erfolgt nach der Bildung des PIKs. Dieser Proteinkomplex setzt sich aus den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) IIA, IIB, IID, IIE, IIF und IIH sowie der RNA-Polymerase II zusammen und ermöglicht deren Anlagerung an den *Core*-Promotor (Butler & Kadonaga, 2002). Ein Transkriptionszyklus besteht aus mindestens acht verschiedenen Schritten (Abb. 1). (1) Im ersten Schritt des Zyklus erfolgt eine Chromatin-Remodellierung. Dabei wird das Chromatin des entsprechenden Gens bzw. einer Gengruppe mittels Histon-Acetylierung dekondensiert und somit zugänglich für die RNA-Polymerase II und die GTFs gemacht (Lemon & Tijan, 2000). (2) Anschließend erfolgt die Assemblierung des PIKs am *Core*-Promotorbereich. Zuerst bindet TFIID, ein Komplex aus TBP und mehreren TBP-assoziierten Faktoren (TAF), an die TATA-Box. Danach werden die Faktoren TFIIA und TFIIB rekrutiert, was eine Anlagerung der RNA-Polymerase II zusammen mit TFIIF an den Komplex ermöglicht. (3) Mithilfe von TFIIE bindet TFIIH an den Proteinkomplex, entwindet die DNA und die Initiation der Transkription kann durch die RNA-Polymerase II erfolgen (Thomas & Chiang, 2006). (4) In der frühen Elongationsphase verfügt die RNA-Polymerase II über eine starke Bindung sowohl zur DNA-Matrize als auch zum naszierenden mRNA-Strang. Der RNA-Polymerase II-Komplex löst sich von der *Core*-Promotorsequenz und fährt kurz entlang der DNA-Matrize bevor es zu einer Transkriptionspause in der Promotor-proximalen Region kommt (Adelman & Lis, 2012). (5) Anschließend erfolgt eine Hyperphosphorylierung des arretierten RNA-Polymerase II-Komplexes. Daraufhin verlässt dieser die Promotor-proximale Region und es folgt entweder ein Abbruch der Transkription oder (6) der Übergang in die produktive Elongation des gesamten Gens (Li & Gilmour, 2011). (7) Anschließend kommt es zur Termination der Transkription. Dabei löst sich der RNA-Polymerase II-Komplex von der DNA sowie der RNA. (8) Die freien Komponenten des Komplexes stehen für einen erneuten Transkriptionszyklus zur Verfügung (Fuda et al., 2009; Matson et al., 2006).

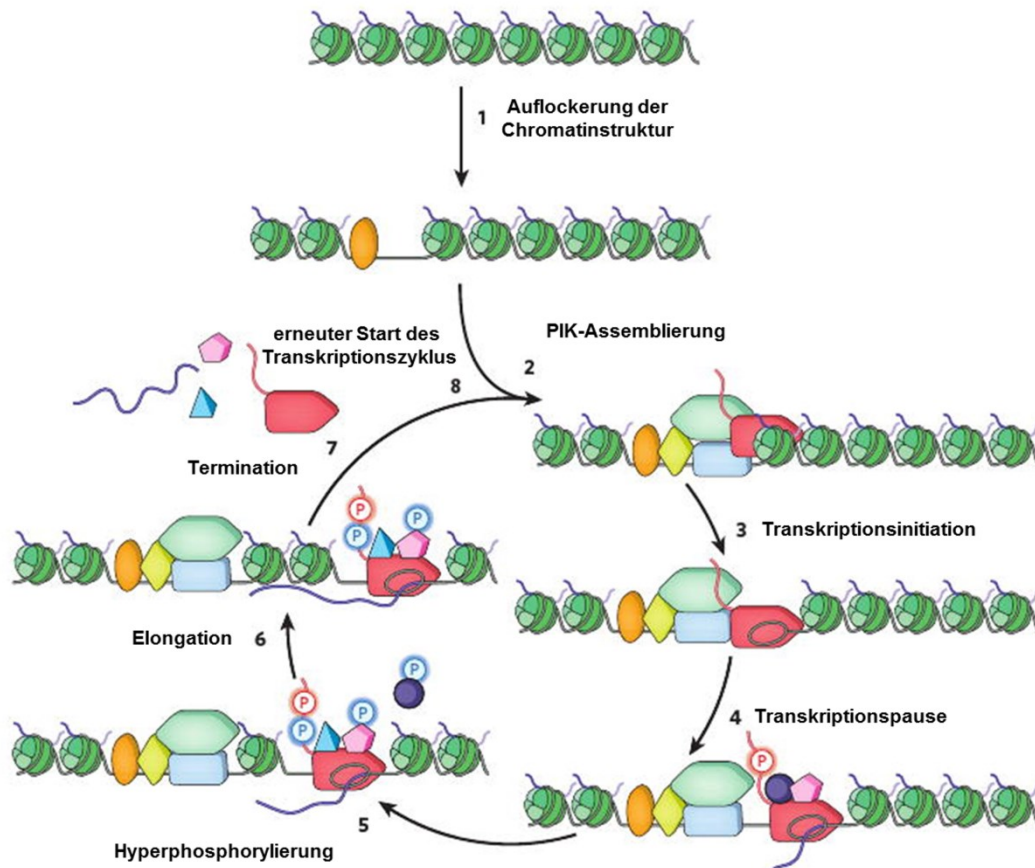


Abb. 1: Der Transkriptionszyklus

(1) Rekrutierung von Aktivatoren und Dekondensierung des Chromatins. (2) Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIK) am *Core*-Promotor durch Rekrutierung genereller Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II. (3) Entwinden der DNA um den TSS und Initiation der Transkription. (4) RNA-Polymerase II entweicht aus dem *Core*-Promotorbereich, transkribiert bis zu 50 bp und pausiert in der Promotor-proximalen Region. (5) Hyperphosphorylierung des arretierten RNA-Polymerase II-Komplexes. (6) RNA-Polymerase II-Komplex beendet die Transkriptionspause und das gesamte Gen wird transkribiert. (7) Termination der Transkription; der RNA-Polymerase II-Komplex zerfällt. (8) Die freie RNA-Polymerase II wird einem neuen Transkriptionszyklus zugeführt. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Fuda et al., 2009)

1.1.1.4. Proximaler Promotor

Die Transkriptionsaktivität wird neben der basalen Transkriptionsmaschinerie stark durch weitere *cis*-regulatorische Elemente beeinflusst, da die Assemblierung des PIKs auf der *Core*-Promotorsequenz nur für eine basale Transkriptionsrate eines Gens ausreichend ist. Der *cis*-regulatorische Bereich, welcher sich ~250 bp stromaufwärts des *Core*-Promotors befindet, wird als proximale Promotorregion bezeichnet. In diesem Bereich befinden sich

~6-12 bp lange Konsensussequenzen, welche von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden werden (Claessens & Gewirth, 2004). Dabei sind einzelne Positionen der Konsensussequenz essentiell für die Bindung des Transkriptionsfaktors, andere hingegen sind variabel. Dadurch können Sequenzvariationen (z.B. *single nucleotide polymorphisms, SNPs; copy number variations, CNVs; etc.*) Einfluss auf die Transkriptionsintensität eines Gens nehmen, da sie in Abhängigkeit der Sequenz die Bindungsstärke, das Dimerisierungsverhalten sowie die Struktur des gebundenen Transkriptionsfaktors und somit dessen Aktivität ändern können (Claessens & Gewirth, 2004; Lefstin & Yamamoto, 1998; Pabo & Sauer, 1992). Ferner können Transkriptionsfaktoren in Kombination mit rekrutierten Kofaktoren sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren Einfluss auf die Transkriptionsrate nehmen (Lonard & O'Malley, 2005).

1.1.1.5. *Enhancer, Silencer* und Isolatoren

Enhancer sind DNA-Segmente, die die Transkription von Genen unabhängig von ihrer Lage oder Orientierung bezüglich des Promotors durch Wechselwirkungen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren aktivieren können (Dillon & Sabbattini, 2000; Ptashne, 1986). Sie sind meist mehrere hundert Kilobasenpaare stromaufwärts oder stromabwärts vom *Core*-Promotor entfernt in einem Intron, nach dem 3'-Ende des Gens oder in proteinkodierenden DNA-Bereichen lokalisiert (Ritter et al., 2012). Im Allgemeinen kommen *Enhancer* mit dem entsprechenden Promotor durch eine Schleifenbildung der dazwischenliegenden DNA sowie mittels zelltypspezifischer Transkriptionsfaktoren in Kontakt (Bulger & Groudine, 1999; Marsman & Horsfield, 2012). Beispielweise sind für die Schleifenbildung zwischen dem *Enhancer*-Bereich des β -Globin (*HBB*; Hämoglobin, β -Untereinheit)-Locus und den verschiedenen *HBB*-Genen die erythroid-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Kruppel-like factor 1* (*KLF1*) und *GATA binding protein 1* (*GATA-1*) erforderlich (Drissen et al., 2004; Vakoc et al., 2005). Zudem haben neueste Studien gezeigt, dass *Enhancer* einen Einfluss auf Prozesse wie Chromatin-Remodellierung und die Freisetzung des RNA-Polymerase II-Komplexes vom *Core*-Promotor haben (Ong & Corces, 2011).

Silencer sind *cis*-regulatorische Elemente, die im Gegensatz zum *Enhancer* einen reprimierenden Effekt auf die Transkription eines Gens haben, jedoch in der Regel die gleichen Charakteristika aufweisen (Ogbourne & Antalis, 1998).

Isolatoren fungieren bei der Genexpression als Blockade zwischen zwei Genen und begrenzen die Transkriptionsaktivität auf definierte Bereiche im Genom. Sie besitzen zwei Haupteigenschaften: (1) sie können die *Enhancer*-Promotor-Kommunikation blockieren, und

(2) sie verhindern die Ausbreitung repressiver Chromatinstrukturen (Heterochromatin). Isolatoren üben ihre Funktion in Abhängigkeit ihrer Position jedoch unabhängig von ihrer Orientierung aus (Maston et al., 2006).

1.1.2. Posttranslationale Genregulation

Die 3'-UTR ist stromabwärts des Stopkodons proteinkodierender Gene lokalisiert und an zahlreichen Regulationsprozessen wie der mRNA-Prozessierung, -Stabilität, Polyadenylierung, Translation sowie der mRNA-Lokalisierung beteiligt (Siepel et al., 2005). Im Gegensatz zur Promotorregion sind regulatorische Elemente der 3'-UTR hauptsächlich auf einem der beiden DNA-Stränge konserviert, was die Rolle der 3'-UTR bei der Genregulation auf posttranskriptionaler Ebene unterstreicht (Xie et al., 2005). Die verschiedenen regulatorischen Elemente der 3'-UTR umfassen unter anderem das Polyadenylierungssignal, diverse Proteinbindestellen (AU-reiche Elemente), Sekundärstrukturen und Bindestellen für microRNAs (miRNAs; Barrett et al., 2012).

MicroRNAs sind endogene, nichtkodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von ~22 nt, die gezielt mit der mRNA interagieren und so die posttranskriptionale Genexpression regulieren. Die meisten primären miRNA-Transkripte (pri-miRNAs) werden durch die RNA-Polymerase II transkribiert und anschließend durch einen Enzymkomplex, bestehend aus dem RNA-bindenden Protein Pasha (DGCR8) und der RNase III Drosha, zu einer etwa 60-70 nt großen *precursor* miRNA (pre-miRNA) prozessiert (Lee et al. 2004a; Tomari & Zamore, 2005). Diese pre-miRNAs werden mittels Rezeptorprotein Exportin-5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort von einem weiteren RNase III-Enzym, Dicer, zu 21-24 nt großen doppelsträngigen miRNAs gespalten. Im weiteren Verlauf der miRNA-Prozessierung bleibt Dicer an der doppelsträngigen miRNA gebunden, und es kommt zur Bildung des inhibitorischen *RNA-induced silencing complex* (RISC). In diesem Proteinkomplex wird die doppelsträngige miRNA in eine einzelsträngige Form überführt, welche an die 3'-UTR der entsprechenden Ziel-mRNA bindet (Bartel, 2004; Cullen, 2004; Lee et al., 2004b; Quelet et al. 2006). Diese Interaktion kann entweder auf partieller oder perfekter Basenpaarung beruhen, was zur Inhibierung der Translation oder Degradation der mRNA führt (Gerin et al., 2010; Paik et al., 2011; Song et al., 2008; Yekta et al., 2004).

1.1.3. Alternative Promotoren

Neben dem Schlüsselmechanismus des alternativen Spleißens tragen ebenso alternative Promotoren eines Gens zur Erweiterung der Transkript- und Proteinvariabilität einer Zelle bei. Die Nutzung alternativer Promotoren ist gleichzeitig ein wichtiger Mechanismus um die zelltypspezifische oder entwicklungspezifische Genexpression zu regulieren (Goodrich & Tjian, 2010). Mehrere Studien haben gezeigt, dass vermutlich 30-50% der humanen Gene über multiple alternative Promotoren verfügen (Carninci et al., 2006; Cooper et al., 2006; Kimura et al., 2006; Tan et al., 2006). Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist noch nicht vollständig geklärt wie die Promotorauswahl in der Zelle erfolgt. Einige diskutierte Mechanismen sind: (1) unterschiedliche Kombinationen von *Core*-Promotorelementen, (2) Variabilität der *cis*-regulatorischen Elemente der stromaufwärts gelegenen Promotorregionen sowie (3) epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Chromatin-Remodellierung (Barrett et al., 2012; Davuluri et al., 2008).

Beispielsweise besitzt das Hämoglobin γ -Gen (*HBG1*) zwei alternative Promotoren mit und ohne TATA-Box, die jeweils die *HBG1*-Expression während und nach der Embryonalentwicklung regulieren (Duan et al., 2002). Dabei erfolgt die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie an die unterschiedlichen *Core*-Promotoren in Abhängigkeit vom entsprechenden Entwicklungsstadium (Davuluri et al., 2008). Zusätzlich werden alternative Promotoren bei der Expression funktionell unterschiedlicher Proteinisoformen verwendet (Davuluri et al., 2008). Die Transkription des *lymphoid enhancer-binding factor 1* (LEF1), einem Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs, wird durch zwei alternative Promotoren initiiert. Dabei wird durch Promotor P1 die Expression des Volllängenproteins reguliert. Diese LEF1-Proteinisoform wirkt auf die Transkription der Zielgene des Wnt-Signalwegs in der Zelle aktivierend. Der Promotor P2 ist im LEF1-Intron lokalisiert und führt zur Expression einer verkürzten Proteinisoform, welche im Gegensatz zur Volllängenproteinisoform die Transkription der entsprechenden Zielgene des Signalwegs reprimiert (Arce et al., 2006). Ferner kann die Verwendung alternativer Promotoren dazu führen, dass mRNA-Varianten entstehen, welche die gleiche proteinkodierende Sequenz besitzen, sich aber in der Länge ihrer 5'-UTR unterscheiden. Die Komplexität der 5'-UTR wiederum beeinflusst die mRNA-Stabilität und -Translationseffizienz, was unterschiedliche Expressionsniveaus eines Proteins z.B. in Abhängigkeit des Differenzierungsgrads der Zelle ermöglicht (Blaschke et al., 2003).

1.1.4. CpG-Insel-Promotoren

Im humanen Genom sind etwa 50-70% der CpG-Dinukleotide durch kovalente Bindung einer Methylgruppe an die C5-Position des Cytosinrings (5-mC) chemisch modifiziert (Abb. 2; Erlich et al., 1982). Diese Methylierung verhindert die Transkription potentiell schädlicher Sequenzen im Genom, wie z.B. repetitiver Elemente, viraler *Inserts* und Transposons (Herman & Baylin, 2003). Da Methylcytosine spontan hydrolytisch zu Thymin desaminieren, sind CpG-Dinukleotide mit einem Auftreten von ca. 21% der zu erwarteten Basenverteilung im Gesamtgenom statistisch unterrepräsentiert. Ausnahmen bilden CpG-Inseln im Genom. Diese DNA-Regionen haben eine Länge von ≥ 200 bp mit einem GC-Anteil von $> 50\%$ sowie einem Verhältnis von beobachteten zu statistisch erwarteten CpG-Dinukleotiden (CpG_{Obs}/CpG_{Exp}) von $\geq 0,6$ (Kim et al., 2009) und sind in der gesunden Zelle frei von Methylierung. Ferner überlappen diese CpG-Inseln mit 60-70% der Promotorregionen aller humanen Gene. Diese umfassen sowohl die konstitutiven *housekeeping*-Gene als auch zu 40% gewebespezifisch exprimierte Gene (Illingworth & Bird, 2009). Im Allgemeinen verfügen CpG-Insel-Promotoren über multiple Transkriptionsstartstelle (TSS), welche sich über einen Bereich von 50-150 bp der 5'-flankierenden Region verteilen (Carninci et al., 2006). Zudem fehlen bei diesem Promortyp meist regulatorische Elemente wie z.B. TATA-Box, MTE und DPE (Juven-Gershon et al., 2008). Der Mechanismus der Transkriptionsinitiation an CpG-Insel-Promotoren ist Gegenstand aktueller Forschung. Die beiden Transkriptionsfaktoren SP1 und *nuclear transcription factor Y* (NF-Y) scheinen jedoch eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation von CpG-Insel-Promotoren zu spielen (Antequera, 2003).

1.2. Epigenetische Mechanismen

Die Epigenetik umfasst erbliche Veränderungen der Genregulation und -expression, welche nicht auf einer Änderung der DNA-Sequenz wie z.B. Punktmutation, Inversion, Deletion oder Translokation beruhen und meist reversibel sind (Delcuve et al., 2009). Die epigenetische Genregulation wird über verschiedene Mechanismen wie z.B. DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, einschließlich Methylierung, Acetylierung sowie Phosphorylierung oder mittels miRNAs beeinflusst (Dwivedi et al., 2011). Diese vererbaren epigenetischen Veränderungen ermöglichen während der Entwicklung von mehrzelligen Organismen eine spezifische Differenzierung der Zellen trotz gleicher genetischer Information (Morgan et al., 2005). Der epigenetische Zustand einer Zelle ist jedoch nicht statisch sondern ändert sich im Laufe der Lebenszeit und ist zudem abhängig von intra- sowie extrazellulären Reizen

(Delcuve et al., 2009). Ferner kann eine Dysregulation epigenetischer Mechanismen einer Zelle bei pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorgenese oder bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten (Lu et al., 2013).

1.2.1. Histonmodifikationen

In der eukaryotischen Zelle ist die genomische Information als Chromatin organisiert. Die strukturelle und funktionelle Einheit des Chromatins stellen Nukleosomen dar. Diese bestehen aus einem Oktamer von je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 und sind von 147 bp DNA umwickelt (Abb. 2). Es existieren zwei Hauptmechanismen, durch die Histonmodifikationen Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen können (Kouzarides, 2007). Der erste Mechanismus beruht auf der Neutralisierung der positiven Histon-Ladung, was die Bindung zu den negativ geladenen DNA-Phosphatresten schwächt. Das beste Beispiel dafür ist die durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) katalysierte Histon-Acetylierung. Dabei wird die positive Ladung der Lysine mittels Transfers von Acetylgruppen neutralisiert. Die Acetylierung verringert die Affinität zwischen Histon und DNA, wodurch ein offener Chromatinzustand erreicht wird, der Transkriptionsfaktoren oder RNA-Polymerase den Zugang zu regulatorischen Elementen der DNA erleichtert. Gegenspieler sind die Histon-Deacetylasen (HDACs), welche die Acetylgruppen an den Histonen entfernen und somit eine Verdichtung der Chromatinstruktur, auch als Heterochromatin bezeichnet, bewirken (Bannister & Kouzarides, 2011).

Der zweite Mechanismus wie Histonmodifikationen die Dynamik von Chromatin regulieren, ist die Rekrutierung spezifischer Effektorproteine. Diese Proteine verfügen über spezielle Proteindomäne wie z.B. Bromo-, Chromo- oder *plant homeodomain* (PHD)-Domäne, mittels derer einzelne aber auch Kombinationen von Histonmodifikationen erkannt und gebunden werden (Ruthenburg et al., 2007). Die gebundenen Effektorproteine beeinflussen entsprechend der Histonmodifikationen den Zustand des Chromatins. Ferner beeinflussen sich die unterschiedlichen Histonmodifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung gegenseitig, indem sie neue Modifikationen stimulieren, blockieren oder bestehende erhalten bzw. entfernen (Lee et al., 2010).

1.2.2. DNA-Methylierung

Drei Mitglieder der DNA-Methyltransferasenfamilie (DNMT) katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) an die C5-Position des Cytosinrings (5-mC) der DNA: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B (Abb. 2; Herman & Baylin, 2003; Zangi et al., 2010).

Obwohl sich diese Enzyme in ihrer Struktur stark ähneln, besitzen sie unterschiedliche Funktionen und Expressionsmuster (Yen et al., 1992; Xie et al., 1999). DNMT1 ist die am besten untersuchte Methyltransferase und wird ubiquitär in allen Geweben, einschließlich des Gehirns, exprimiert (Goto et al., 1994). Während der DNA-Replikation ist DNMT1 an der Replikationsgabel lokalisiert (Leonhardt et al., 1992). Dort bindet DNMT1 den neusynthetisierten Tochterstrang und methyliert diesen entsprechend des Methylierungsmusters des replizierten parentalen DNA-Strangs (Hermann et al., 2004). Zusätzlich ist DNMT1 in der Lage, DNA-Methylierung zu reparieren. DNMT1 wird als Erhaltungsmethyltransferase (*maintenance methyltransferase*) bezeichnet, da sie das ursprüngliche DNA-Methylierungsmuster in einer Zellpopulation aufrechterhält (Mortusewicz et al., 2005). Im Gegensatz zu DNMT1 besitzen sowohl DNMT3A und DNMT3B *in vitro* keine Präferenz für hemimethylierte DNA sondern methylieren unmethylierte sowie hemimethylierte DNA mit gleicher Aktivität (Okano et al., 1999). Aus diesem Grund werden DNMT3A und DNMT3B auch als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet. Für eine wichtige Rolle der Methyltransferasen bei der embryonalen Entwicklung spricht, dass der Knockout von DNMT1 oder DNMT3B in Mäusen embryonal letal ist (Okano et al., 1999). DNMT3A-defiziente Mäuse sind hingegen unterentwickelt und versterben 4 Wochen nach der Geburt (Okano et al., 1999). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass DNMT3B während der frühen Embryonalentwicklung, DNMT3A hingegen für die spätere zelluläre Differenzierung erforderlich ist.

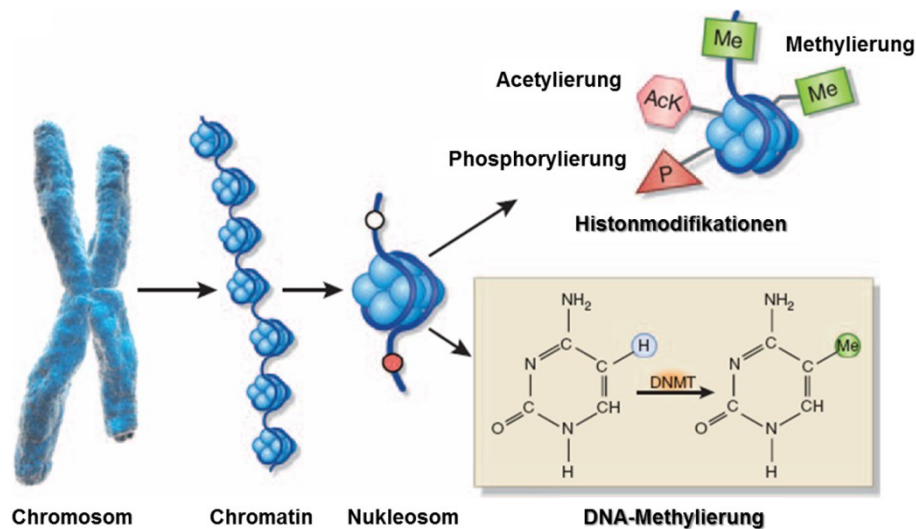


Abb. 2: Epigenetische Mechanismen der Genregulation

Nukleosomen bestehen aus DNA-umwickelten Histon-Oktameren und bilden die strukturelle und funktionelle Einheit des Chromatins. Histonmodifikationen, die durch verschiedene Enzyme katalysiert werden, können an mehreren Positionen auftreten und umfassen unter anderem Methylierungs-, Acetylierungs- und ebenso Phosphorylierungsreaktionen. Die Methylierung der DNA erfolgt an der C5-Position des Cytosinrings (5-mC) in CpG-Dinukleotiden und wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. Zusammen bilden diese Modifikationen ein einzigartiges epigenetisches Muster, das zur Regulation der Chromatinorganisation und Genexpression beiträgt. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dwivedi et al., 2011).

1.2.3. Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung korreliert meist mit einer stabilen Repression der Transkription und kann diese auf unterschiedliche Art und Weise inhibieren. Eine Möglichkeit ist die Störung der Interaktion zwischen spezifischen Transkriptionsfaktoren oder der basalen Transkriptionsmaschinerie und den regulatorischen Regionen der methylierten DNA. Da die Mehrheit der spezifischen Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsensussequenzen mit CpG- und GC-reichen Motiven bindet, kann die DNA-Methylierung dieses verhindern. Ferner kann eine Promotormethylierung Einfluss auf die Nukleosomenstabilität oder -position haben, was eine Kondensierung der Chromatinstruktur bewirkt und zum Ausschluss der basalen Transkriptionsmaschinerie von der entsprechenden Core-Promotorregion führt (Bird & Wolffe, 1999).

Des Weiteren kann eine Inhibierung der Transkription durch Mitglieder der Methyl-CpG-bindenden (MBD)-Proteinfamilie erfolgen. Bisher wurden fünf dieser

MBD-Proteine identifiziert: Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2), MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4. Diese Proteine, MBD3 ausgeschlossen, weisen eine höhere Affinität zu methylierter als zu unmethylierter DNA auf (Fraga et al., 2003). Am besten charakterisiert ist bis heute der Mechanismus der Transkriptionshemmung für MeCP2. MeCP2 verfügt über zwei Proteindomänen, eine Transkriptionsrepressor-Domäne (TRD) und über eine Methyl-Binde-Domäne für die Interaktion mit der methylierten DNA. Mittels TRD kann MeCP2 an Korepressoren der SIN3-Familie, *v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog* (SKI), und dem *nuclear receptor co-repressor* (N-CoR)-Komplex binden. Die Korepressorkomplexe interagieren daraufhin mit HDACs und rekrutieren diese zur methylierten DNA, was zur Kondensierung des Chromatins und somit zur Inhibition der Transkription betroffener Gene führt (Jones et al., 1998; Kokura et al., 2001; Wade, 2001).

1.3. Gerüstproteine

Gerüstproteine (*scaffold proteins*) umfassen Proteine, deren Funktion die Vermittlung von Proteinkomplexen ist. Erst im Proteinkomplex, einer Zusammenlagerung mehrerer Proteine, können viele Proteine ihre Funktion in der Zelle übernehmen. Die Mitglieder dieser Gerüstproteine verfügen meist über mehrere Proteindomänen oder -bindemotive und die Kombination der einzelnen Domänen der Gerüstproteine kann in Abhängigkeit vom zu organisierenden Signalweg stark variieren (Good et al., 2011).

Gerüstproteine können über vier verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen (Abb. 3A-D; Alexa et al., 2010; Buday & Tompa, 2010; Zeke et al., 2009). Durch die Assemblierung mehrerer Interaktionspartner eines Signalwegs an ein Gerüstprotein wird die lokale Konzentration der Komponenten in der Zelle erhöht, was eine schnellere und effizientere Signaltransduktion ermöglicht (Abb. 3A; Ferrell & Cimprich, 2003). Darüber hinaus können sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren eines Signalwegs in den gleichen Signalkomplex rekrutiert werden. Ebenso kann ein bestimmtes Protein unterschiedliche Signalkomplexe mehrerer Signalwege binden. Durch diese kombinatorische Verwendung von Komponenten können sich mehrere Signalwege die identischen Signalkomponenten teilen, was eine Vernetzung ermöglicht (Abb. 3B; Bhattacharyya et al., 2006). Zusätzlich eröffnet die Assemblierung unterschiedlicher Komponenten in einem solchen Signalmodul die Möglichkeit der dynamischen Regulation von Signalwegen mittels negativer Rückkopplung. Dabei nehmen die Produkte des zu regulierenden Signalwegs negativ Einfluss auf die Verfügbarkeit des am Signalmodul beteiligten Gerüstproteins und führen somit zur Unterbrechung der Signaltransduktion (Abb. 3C; Levchenka et al., 2000). Ferner sind Gerüstproteine nicht nur passive Bindungspartner, sie können ebenso aktiv die

Signalstärke des jeweiligen Signalwegs variieren und regulieren. Gerüstproteine sind in der Lage, Konformationsänderungen bei Interaktionspartnern zu bewirken und durch allosterische Effekte deren katalytische Aktivität zu beeinflussen (Abb. 3D; Smock & Gierasch, 2009).

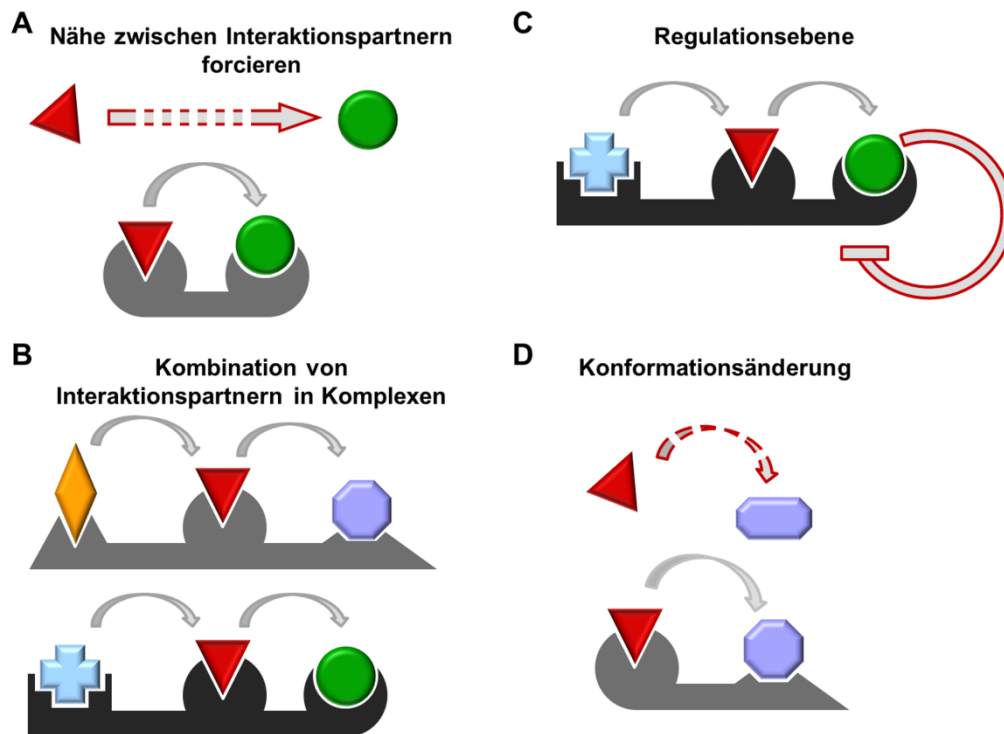


Abb.3: Wirkmechanismen von Gerüstproteinen

(A) Gerüstproteine können durch die Assemblierung unterschiedlicher Interaktionspartner die räumliche Nähe dieser Signalkomponenten forcieren und die lokale Konzentration erhöhen. (B) Die Assemblierung von Interaktionspartnern in Signalkomplexen kann in kombinatorischer Art und Weise erfolgen, wodurch ein Signalmolekül (rotes Dreieck) durch Bindung unterschiedlicher Gerüstproteine in verschiedenen Signalwegen wirken kann. (C) Durch negative Rückkopplung kann die Verfügbarkeit des Gerüstproteins und darüber der entsprechende Signalweg reguliert werden. (D) Gerüstproteine können die Konformation interagierender Enzyme ändern und somit Einfluss auf deren katalytische Aktivität nehmen. (Abbildung verändert nach Zeke et al., 2009)

1.3.1. Kidney and brain (KIBRA) - ein zytoplasmatisches Gerüstprotein

KIBRA (*WW and C2 domain containing 1, WWC1*) ist ein zytoplasmatisches Gerüstprotein mit konstitutiver Expression in Hirn- und Nierengewebe. Das humane KIBRA-Gen ist auf Chromosom 5q34 lokalisiert. Die insgesamt 23 Exone des Gens kodieren für die 1113

Aminosäuren (AS) von KIBRA (Abb. 4A, Schneider et al., 2010). KIBRA ist ein Mitglied der WWC-Proteinfamilie. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie verfügen über zwei WW-Domänen, eine *C2-like*-Domäne, potentielle *coiled-coil*-Domänen, ein Bindemotiv für die atypische Proteinkinase C (aPKC) und ein PDZ (Domäne von *Post synaptic density-95*, *Discs large* und *Zonula occludentes-1*)-Bindemotiv. Im menschlichen Genom existieren zwei zu *WWC1* homologe Gene: *WWC2* mit 49% und *WWC3* mit 39% Sequenzhomologie. Dabei kodiert *WWC3* für ein Protein ohne WW-Domänen (Yoshihama et al., 2012).

1.3.1.1. KIBRA-Proteindomänen

Humanes KIBRA verfügt N- sowie C-terminal über eine Vielzahl bekannter Proteindomänen (Abb. 4B). Die zwei KIBRA-WW-Domänen (AS 6-86) umfassen jeweils einen Bereich von 35-40 AS und enthalten zwei konservierte Tryptophan-Reste (WW). Diese Domänen sind für eine Vielzahl der KIBRA-Interaktion verantwortlich. Die KIBRA-WW-Domänen erkennen das prolinreiche PPxY-Motiv und sind von *Drosophila* bis zum Menschen hoch konserviert (>50% Homologie; Kremerskothen et al., 2003).

Darüber hinaus verfügt KIBRA über ein potentielles Kernlokalisierungssignal (NLS, AS361-376; Rayala et al., 2006) sowie über eine durch zwei viersträngige β -Faltblätter gebildete *C2-like*-Domäne (AS 655-783). Diese Domäne ist für die calciumabhängige Phospholipidbindung verantwortlich und dient ebenfalls der KIBRA-Homodimerisierung (Johannsen et al., 2008). Des Weiteren ist die C2-Domäne charakteristisch für Proteine, die eine Funktion beim zellulären Vesikeltransport besitzen (Rizo und Südhof, 1998). Schließlich verfügt KIBRA noch über eine Glutaminsäure-reiche Region (AS 845-873) sowie ein Klasse III PDZ-Bindemotiv, welches zwischen den AS 1110 und 1113 identifiziert wurde (Duning et al., 2008; Kremerskothen et al., 2003; Rayala et al., 2006).

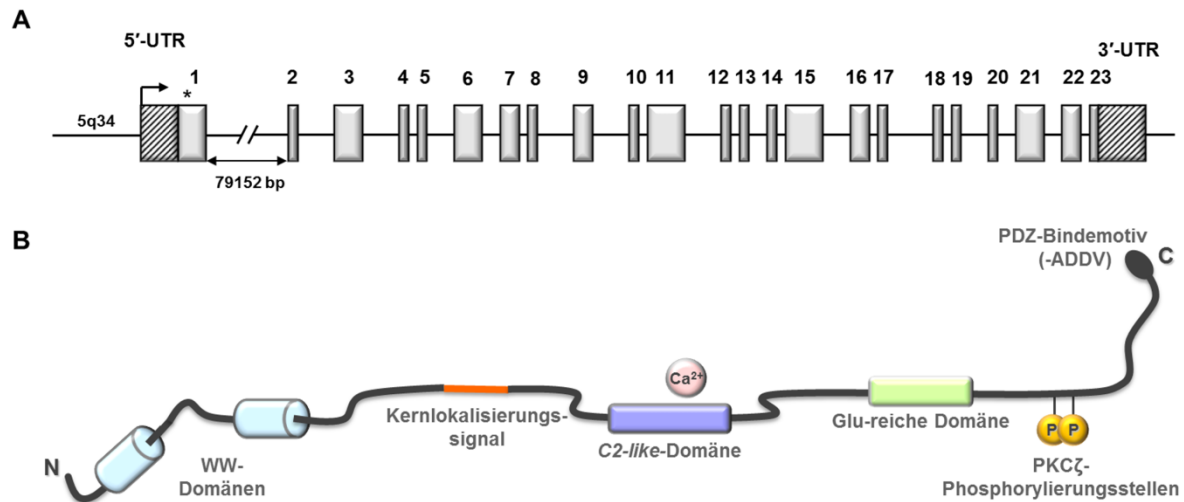


Abb. 4: KIBRA-Genlocus und Proteindomänen

(A) Das humane *WWC1*-Gen ist auf Chromosom 5q34 lokalisiert. Die insgesamt 23 Exone des Gens kodieren für die 1113 AS von KIBRA. (B) KIBRA verfügt über zwei WW-Domänen (AS 6-86), ein potentielles Kernlokalisierungssignal (AS 361-376), eine *C2-like*-Domäne (AS 655-783), eine Glutaminsäure (Glu)-reiche Region (AS 845-873), zwei Proteinkinase C-zeta (PKC ζ)-Phosphorylierungsstellen (Ser975, Ser978) und ein Klasse III PDZ-Bindemotiv (-ADDV). (Abbildung verändert nach Schneider et al., 2010)

1.3.1.2. KIBRA und Gedächtnisleistung

Die funktionelle Rolle von KIBRA in Neuronen ist bereits gut definiert. KIBRA ist unter anderem am Vesikeltransport sowie der Synaptogenese beteiligt und der *KIBRA*-Genlocus wurde mehrfach mit Gedächtnisleistung (Almeida et al., 2008; Bates et al., 2009; Nacmias et al., 2008; Papassotiropoulos et al., 2006; Scharper et al., 2008; Wersching et al., 2011) und der *late-onset* Alzheimer-Erkrankung assoziiert (Burgess et al., 2011; Corneveaux et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Der erste mittels *Yeast-two-Hybrid-Screen* identifizierte KIBRA-Interaktionspartner war das postsynaptische Protein Dendrin (Kremerskothen et al., 2003). Später folgten weitere postsynaptische Proteine, wie Synaptopodin und die Proteinkinase C zeta (PKC ζ), was auf eine KIBRA-Beteiligung an Prozessen der postsynaptischen Dichte (PSD) schließen lässt (Büther et al., 2004; Duning et al., 2008). Die KIBRA-Interaktion mit Dendrin und Synaptopodin erfolgt über die WW-Domänen, da beide Proteine über ein PPxY-Motiv verfügen. Dendrin und Synaptopodin sind wichtige Organisatoren des postsynaptischen Zytoskelettes und spielen bei synaptischer Plastizität und der aktivitätsabhängigen Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung eine Rolle (Duning et al., 2008; Kremerskothen et al., 2006; Mundel et al., 1997). Die PKC ζ ist bei der Langzeitpotenzierung (LTP) von Bedeutung. Sie interagiert mit

einem kurzen Abschnitt des C-Terminus von KIBRA und phosphoryliert die an den Position 975 und 978 befindlichen Serine (Büther et al., 2004).

Die LTP ist ein zellulärer Prozess, bei dem kurze repetitive Perioden synaptischer Aktivität zu einer langanhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung führen, was durch eine Erhöhung des exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) gekennzeichnet ist (Lisman et al., 2012). Dabei werden *alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate* (AMPA)-Rezeptoren vermehrt in die postsynaptische Membran eingebaut und der Neurotransmitter Glutamat präsynaptisch verstärkt freigesetzt (Ko & Kelly, 1999; Serulle et al., 2008). Dies führt zu der langandauernden Erhöhung des EPSP und trägt vermutlich entscheidend zur Gedächtnisbildung bei (Arancio et al., 1996; Büther et al., 2004). KIBRA interagiert über den Bereich der potentiellen *coiled-coil*-Domänen mit der *protein interacting with C-kinase 1* (PICK1). Diese Proteinkinase reguliert den Transport der AMPA-Rezeptoren an die Membran, was auf eine KIBRA-Beteiligung bei der Gedächtnisbildung schließen lässt (Makuch et al., 2011).

1.3.1.3. KIBRA-Zellmigration und -polarität

KIBRA ist als zytoplasmatisches Gerüstprotein an weiteren zellulären Prozesse wie Zellpolarität und -migration beteiligt (Schneider et al., 2010; Yoshihama et al., 2012). Es interagiert mit Polaritätsproteinen wie *pals1 associated tight junction-protein* (PATJ) über die Klasse III PDZ-Bindestelle (ADDV) oder den *par-3-3-homolog partitionierung defekt* (PAR3)/*par-6 Partitionierung defekt 6 Homolog alpha* (PAR6)/aPKC-Komplex, wodurch KIBRA an der Regulation der apikal-basalen Zellpolarität und Zellmigration der Podozyten beteiligt ist.

Sec3, eine Komponente des *Exocyst*-Komplexes, ist ein weiterer KIBRA-Bindungspartner und an der Regulation der gerichteten Zellmigration beteiligt (Rosse et al., 2009). Interaktion zwischen der aPKC mit dem *Exocyst*-Komplex ist für die Zellmigration in NRK-Zellen erforderlich, und KIBRA dient dabei als Brückenmolekül (Rosse et al., 2009).

1.3.1.4. KIBRA und der Hippo-Signalweg

Der Hippo-Signalweg wurde ursprünglich in *Drosophila* identifiziert und ist an der Kontrolle der Organgröße, der Zellregeneration und an apoptotischen Prozessen beteiligt (Boggiano & Fehon, 2012; Lapi et al., 2008; Liu et al., 2012). In Abwesenheit der Hippo-Signaltransduktion transloziert *Yes-associated protein 1* (YAP1) in den Zellkern, wo es als

Transkriptionskoaktivator mit diversen Transkriptionsfaktoren wie z.B. *TEA domain family member 1-4* (TEAD1-4) interagiert und die Transkription der Hippo-Zielgene reguliert (Zhao et al., 2008a).

Das zytoplasmatische Gerüstprotein KIBRA interagiert mit Komponenten des Hippo-Signalwegs wie Neurofibromin 2 (NF2) und *large tumor suppressor kinase 1/2* (LATS1/2) sowie *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14* (PTPN14) und *angiomin* (AMOT). Diese Interaktionen führen zu einer durch KIBRA induzierten Aktivierung des Hippo-Signalwegs und zur Repression der YAP1-Transkriptionsaktivität (Abb. 5; Baumgartner et al., 2011; Genevet et al., 2010; Yu et al., 2010; Xiao et al., 2011).

Dabei bewirkt die Aktivierung des Signalwegs die Phosphorylierung von LATS1/2 durch die *mammalian sterile 20-like kinase 1/2* (MST1/2; Hwang et al., 2007). In Säugerzellen sind die MST1/2 vorgeschalteten Komponenten und Mechanismen, die zur Aktivierung des Hippo-Signalwegs führen, eng mit der Zelldichtedetektion verknüpft und Gegenstand aktueller Forschung. LATS1/2 interagiert in der Zelle mit *Mps one binder kinase activator 1A/B* (MOB1A/B), die ebenfalls durch MST1/2 phosphoryliert wird (Praskova et al., 2008; Wei et al., 2007). Durch die Phosphorylierung von MOB1A/B wird die Interaktion mit LATS1/2 begünstigt, was die LATS1/2-Aktivität verstärkt. Anschließend werden die Transkriptionskoaktivatoren YAP1 und *WW-domain-containing transcription regulator 1* (*Wwtr1/TAZ*, YAP1-Ortholog) durch LATS1/2 an mehreren Serin-Resten phosphoryliert (Basu et al., 2003; Zhao et al., 2007). Durch die YAP1-Phosphorylierung an Ser127 wird eine Bindungsstelle für 14-3-3-Proteine erzeugt. Die entstandenen YAP1/14-3-3-Komplexe werden im Zytoplasma zurückgehalten. Darüber hinaus löst die YAP1-Phosphorylierung an Ser381 die Phosphorylierung weiterer Reste durch CK1 ϵ aus, was zum *β -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase* (β -TrCP)-vermittelten YAP1-Abbau führt (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010).

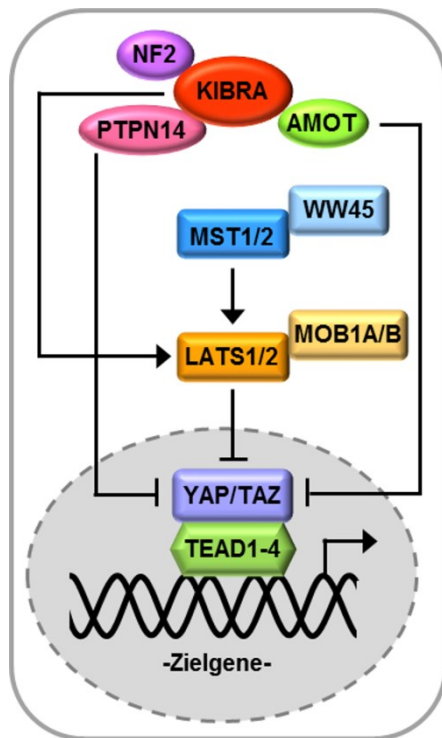


Abb. 5: Der Hippo-Signalweg

KIBRA interagiert mit NF2, LATS1/2, PTPN14 und AMOT, was eine Aktivierung des Hippo-Signalwegs induziert. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung von LATS1/2 und MOB1A/B durch MST1/2 sowie dem daraus resultierenden Abbau der Transkriptionskoaktivatoren YAP1/TAZ und der Repression der Zielgen-Transkription. (Abbildung verändert nach Zhang et al., 2014)

1.3.2. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt-Signalweg spielt sowohl während der Embryonalentwicklung als auch bei der Gewebemöostase im adulten Organismus eine wichtige Rolle (Holland et al., 2013). Gleichzeitig ist die Dysregulierung der Komponenten des Wnt-Signalwegs bei der Entwicklung und dem Verlauf diverser Erkrankungen, wie z.B. unterschiedlicher Malignome von Bedeutung (Voronkov & Krauss, 2013). Neuste Studien deuten auf eine enge Verbindung zwischen Hippo- und Wnt-Signalweg hin (Imajo et al., 2012; Varelas et al., 2010). Beispielsweise ist YAP1, der Schlüsselfaktor des Hippo-Signalwegs, in der Lage zusammen mit β -Catenin, einem zentralen Signalmolekül des Wnt-Signalwegs, im Komplex an *T-cell factor* (TCF)/LEF-Bindestellen zu binden, wodurch die Transkription gemeinsamer Zielgene reguliert wird (Heallen et al., 2011). Derzeit sind drei Signalwege bekannt, die durch Bindung von Wnt-Liganden an entsprechende Rezeptoren aktiviert werden: der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der nicht-kanonische Wnt/planare Zellpolaritäts-Signalweg und der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg. Von diesen drei Signalkaskaden ist der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg der am besten untersuchte Signalweg (Clevers, 2006).

In Abwesenheit extrazellulärer Wnt-Liganden liegt das zytosolische β -Catenin in einem Multiproteinkomplex gebunden (*Destruction Complex*) vor. Dieser *Destruction Complex* wird durch die Interaktion der Gerüstproteine *adenomatous polyposis coli* (APC) sowie AXIN1/2 mit den beiden Ser/Thr-Kinasen *casein kinase 1 α* (CK1 α) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 β

(GSK3 β) gebildet (Behrens et al., 1998; Hart et al., 1999; Peters et al., 1999). Die Gerüstproteine APC und AXIN koordinieren im Multiproteinkomplex die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β und CK1 α (Liu et al., 2002; Zeng et al., 2005). Das phosphorylierte β -Catenin wird durch die β -TrCP ubiquitinyliert und durch Proteasomen abgebaut (Aberle et al., 1997). Steht β -Catenin nicht zur Verfügung, wird die Transkription der Wnt-Zielgene durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie im Komplex mit Korepressoren der Groucho-Familie (Grg/TLE) an die Promotorregionen reprimiert (Abb. 6A; Brantjes et al., 2001; Cavallo et al., 1998).

Die extrazelluläre Bindung der Wnt-Liganden an einen Rezeptor der *frizzled* (FZD)-Familie und *low density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP5/6) führt zur Destabilisierung des *Destruction Complex* (Cliffe et al., 2003; Cong et al., 2004). Die Aktivierung der Rezeptoren bewirkt die Hyperphosphorylierung des Gerüstproteins *Dishevelled* (Dvl) und dessen Rekrutierung an die Plasmamembran. Parallel dazu wird der zytoplasmatische Bereich von LRP5/6 durch die CK1 γ phosphoryliert (Bilic et al., 2007). Diese Phosphorylierungsereignisse und die Multimerisierung von Dvl führen wiederum zur Rekrutierung von AXIN an die Plasmamembran (Cliffe et al., 2003; Cong et al., 2004). Dadurch wird die Bildung des *Destruction Complex* verhindert, die GSK3 β inhibiert, und es kommt zur β -Catenin-Anreicherung in der Zelle. β -Catenin transloziert in den Zellkern und bindet an die Mitglieder der TCF/LEF-Familie, was eine Verdrängung der Grg/TLE-Korepressoren bewirkt. Ferner rekrutiert β -Catenin Aktivatoren wie CBP/p300 (CREB bindendes Protein) und BRG1 an den im Promotorbereich gebundenen β -Catenin/TCF-Komplex, was zur Transkription der Wnt/ β -Catenin-Zielgene führt (Abb. 6B; Barker et al., 2001; Miyagishi et al., 2000).

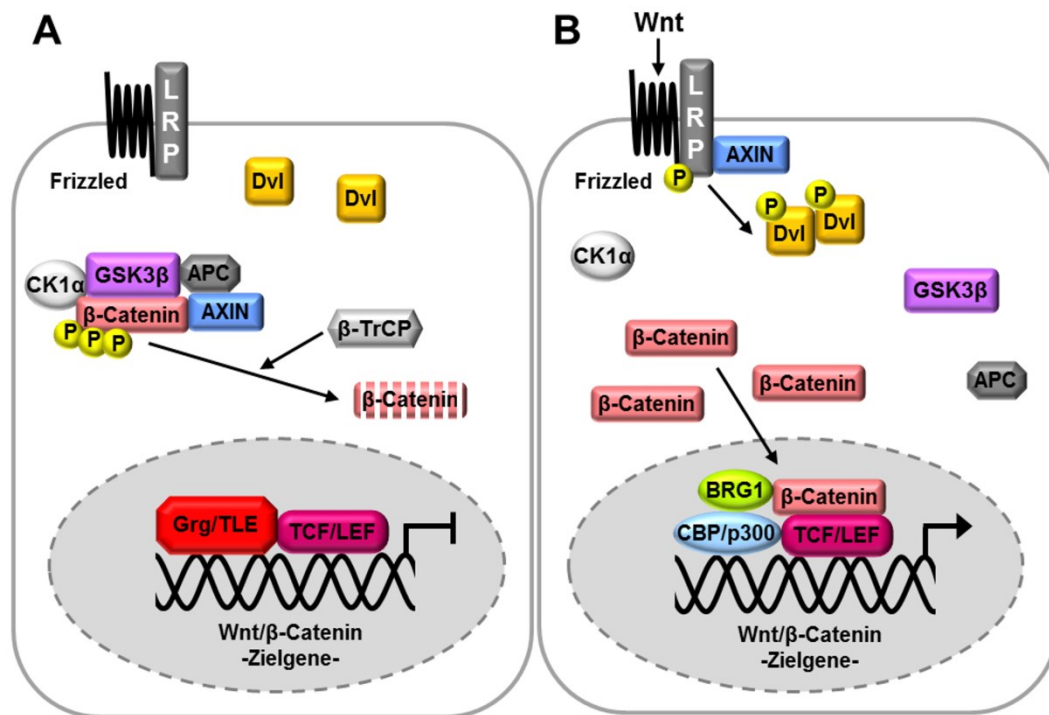


Abb. 6: Der Wnt/β-Catenin-Signalweg

(A) Ist der Wnt/β-Catenin-Signalweg inaktiv, wird das zytoplasmatische β-Catenin durch den *Destruction Complex* (AXIN, APC, CK1α und GSK3β) gebunden, hyperphosphoryliert, durch β-TrCP ubiquitinyliert und mittels Proteasomen abgebaut. Gleichzeitig wird die Transkription der Zielgene im Zellkern durch die Komplexbildung der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren mit den Korepressoren der Groucho-Familie (Grg/TLE) reprimiert. (B) Die extrazelluläre Bindung des Wnt-Liganden an die *frizzled*-Rezeptoren führt zur Destabilisierung des *Destruction Complex*, was durch die Phosphorylierung von LRP5/6 und Dvl sowie der daraus resultierenden Rekrutierung von AXIN zur Plasmamembran bedingt ist. β-Catenin transloziert in den Zellkern, bildet einen Komplex mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren und rekrutiert Aktivatoren wie CBP/p300 und BRG1, was zur Transkription der Wnt/β-Catenin-Zielgene führt.

1.4. Ziel der Arbeit

KIBRA ist als zytoplasmatisches Gerüstprotein an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellpolarität, Migration, Vesikeltransport, Transkriptionsregulation und Synaptogenese beteiligt (Schneider et al., 2010; Yoshihama et al., 2012). Die funktionelle Rolle von KIBRA in Neuronen ist bereits gut definiert und mehrfach wurde der *KIBRA*-Genlocus mit Gedächtnisleistung (Almeida et al., 2008; Bates et al., 2009; Nacmias et al., 2008; Papassotiropoulos et al., 2006; Scharper et al., 2008; Wersching et al., 2011) und der *late-onset* Alzheimer-Erkrankung assoziiert (Burgess et al., 2011; Corneveaux et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Zudem ist KIBRA ein wichtiger Regulator des Hippo

Signalwegs. Die Dysregulation dieses Signalwegs bzw. seiner Komponenten, KIBRA eingeschlossen, wurde wiederholt bei pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorgenese beschrieben (Dong et al., 2007; Hill et al., 2011; Lei et al., 2008; Shinawi et al., 2012; Steinhardt et al., 2008; Zhao et al., 2007; Zhao et al., 2008b). KIBRA scheint somit eine wichtige Rolle bei verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in unterschiedlichen Geweben zu spielen. Untersuchungen zur *KIBRA*-Genstruktur sowie der gewebespezifischen und epigenetischen Regulation der *KIBRA*-Expression wurden bisher nicht durchgeführt. Ziel dieser Arbeit ist daher die molekular funktionelle Charakterisierung des humanen *KIBRA*-Gens in Nieren- und Nervenzellen. Zuerst soll die Position der *KIBRA*-TSS mittels *RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends* (RLM-RACE) in beiden Zelltypen ermittelt werden. Zur Identifizierung regulatorischer Bereiche werden serielle Promotordeletionskonstrukte der 5'-flankierenden Region sowie zweier Regionen im ersten Intron von *KIBRA* generiert und im Reportergenassay in Nierenzellen und Nervenzellen auf Transkriptionsaktivität untersucht. Die polymorphe Struktur der *KIBRA* 5'-flankierenden Region wird mittels Amplifizierung und Resequenzierung analysiert und der potentielle Effekt auf die Transkriptionsaktivität im Reportergenassay getestet. Des Weiteren sollen potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen mittels *in silico* Analyse der *KIBRA*-Promotorregion identifiziert werden. Die Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der *KIBRA*-Regulation soll mittels Überexpressionsexperimente, Mutagenese der entsprechenden Bindestellen und die direkte Bindung an den entsprechenden Promotorbereich durch Chromatin-Immunpräzipitation untersucht werden. Die Analyse der epigenetischen Regulation der *KIBRA*-Expression soll mittels *in vitro* Methylierung der Promotordeletionskonstrukte sowohl partiell als auch vollständig durch entsprechende Methyltransferasen erfolgen. Der Effekt des Methylierungsgrads auf die Transkriptionsaktivität der einzelnen Promotorbereiche wird in beiden Zelltypen im Reportergenassay untersucht. Ferner wird das *KIBRA*-Methylierungsmuster in unterschiedlichen Nierenzellkarzinom-Subtypen mittels Bisulfitsequenzierung genomischer Patienten-DNA aus Nierengewebe analysiert.

2. Material

2.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar (Bacto)	BD Bioscience, Heidelberg
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Betain	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Fisher Scientific, Schwerte
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fisher Scientific, Schwerte
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Fisher Scientific, Schwerte
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt (Bacto)	Biozym Scientific, Oldendorf
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Fisher Scientific, Schwerte
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Darmstadt
Insulin-Transferrin-Selenium (100x)	Fisher Scientific, Schwerte
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KOAc)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	AppliChem, Darmstadt
Mangan(II)chlorid (MnCl_2)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. Material

Chemikalien	Hersteller
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Solution	Fisher Scientific, Schwerte
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem, Darmstadt
Rubidiumchlorid (RbCl)	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Trypton (Bacto)	BD Bioscience, Heidelberg
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zeocin	Life Technologies, Karlsruhe

2.2. Verbrauchsmaterialien und Kits

Verbrauchsmaterialien/Kits	Hersteller
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, US
complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
EpiTec Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
FirstChoice RLM-RACE Kit	Ambion, Darmstadt
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
jetPEI (Polyplus transfection)	HiSS Diagnostics, Freiburg im Breisgau
KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix	PEQLAB, Erlangen
KAPA HiFi PCR Kit	PEQLAB, Erlangen
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Magnetic Protein-G beads	Life Technologies, Karlsruhe
M-MuLV Reverse Transcriptase	Fisher Scientific, Schwerte
Nanofectin	PAA, Pasching
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel, Düren
5x Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim
PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit	Life Technologies, Karlsruhe
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies, Karlsruhe
tRNA	Roche Diagnostics, Mannheim

2.3. Seren und Medien

Serum/Medium	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fisher Scientific, Schwerte
Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (DMEM:Ham's F12; 1:1)	Fisher Scientific, Schwerte
Fetal bovine serum Gold (FBS)	PAA, Pasching
Rabbit serum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, ohne Phenolrot	Fisher Scientific, Schwerte

2.4. DNA-Marker

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte

2.5. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Exonuclease I (<i>E. coli</i>)	Fisher Scientific, Schwerte
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Methyltransferasen (<i>SssI</i> , <i>HpaII</i>)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K	Fisher Scientific, Schwerte
Restriktionsendonukleasen	Fisher Scientific, Schwerte
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RiboLock	Fisher Scientific, Schwerte
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fisher Scientific, Schwerte
T4-DNA-Ligase	Fisher Scientific, Schwerte
Trypsine-EDTA (0,05%)	Fisher Scientific, Schwerte

2.6. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Normal Mouse IgG	Merck Millipore, Darmstadt
TCF4 (C9B9) Rabbit mAb #2565	Cell Signaling, Frankfurt am Main

2.7. Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Hersteller/Referenz
pcDNA3.1(+)	Life Technologies, Karlsruhe
pCMV-SP1	Dr. Dimitris Kardassis, Heraklion, Griechenland
pCMV-Sport6-TCF7L2	Source BioScience, Berlin
pCpGL-Basic	Rehli Lab, Regensburg
pCR8/GW/TOPO	Life Technologies, Karlsruhe
pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pGL3-Basic	Promega, Mannheim
pGL3-Control	Promega, Mannheim
pRc/CMV	Dr. Dimitris Kardassis, Heraklion, Griechenland

2.8. *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
ChemiComp GT115	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 rspL (StrA)</i> <i>endA1 Δdcm uidA</i> (Δ <i>MluI</i>): <i>pir-116 ΔsbcC-sbcD</i>	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
One Shot Mach1-T1	F-φ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (<i>r_K-m_K</i>) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	Life Technologies, Karlsruhe
One Shot TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Life Technologies, Karlsruhe

2.9. Eukaryotische Zelllinien

Linie	Ursprung	Referenz
HPCT	Humane proximal tubuläre Nierenzellen	ECACC: 12020703
IHKE	Immortalisierte humane epitheliale Nierenzellen	Tveito et al. 1989

Linie	Ursprung	Referenz
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen	ATCC: CRL-2266
SK-N-SH	Humane Neuroblastomzellen	ATCC: HTB-11

2.10. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Systec VX-75	Systec, Wettenberg
Bakterienschüttler	Shaker Series 25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Brutschrank (Bakterien)	B 6120	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	MCO-18AIC	Sanyo, München
Geldokumentationsstation	Alphamager EC AlphaEase FC software (Version 6.0.0)	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
Heizblock	VMS-A	VWR International, Darmstadt
Luminometer	Sirius Single Tube	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Mikroskop	AE20	Motic, Wetzlar
pH-Meter	Calimatic 766	Knick, Berlin
Photometer	NanoPhotometer	Implen, München
Power supply	PowerPackBasic	BioRad, München
Rotationsschüttler	SB2 Tube Rotator	Bibby scientific limited, Stone, GBR
Schüttler	GFL 3006	GFL, Großburgwedel
Sequenzierer	ABI3730	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sonifikator	Bioruptor UCD-200	Diagenode, Liège, Belgien
Sterilbank (bakteriell)	Class II type EF	Clean air Techniek B.V., Woerden, Niederlande
Sterilbank (eukaryotisch)	HS 12	Heraeus, Hanau
Sterilbank (eukaryotisch)	LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
Thermocycler	PTC-225 DNA Engine Tetrad 2	MJ Research, Miami, USA
Thermoschüttler	TS-100	Kisker Biotech, Steinfurt
Ultra-Turrax	Miccra-D8	ART Prozess- & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mülheim
Vortexer	PV-1	Grant instruments, Cambridge, GBR
Waage	TE313S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL 1083	GFL, Großburgwedel
Zellzähler	Casy Model TT	Innovatis, Bielefeld

2. Material

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifuge	FVL-2400N	Kisker Biotech, Steinfurt
Zentrifuge	MIKRO 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	J2-21M/E Beckman	Coulter, Krefeld

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1.1. Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des *QIAamp DNA Blood Mini Kits* (Qiagen) aus Leukozyten aus 200 µl EDTA-behandeltem Vollblut, 25 mg Nierengewebe, 25 mg Cortex cerebri oder 5×10^6 kultivierten Zellen gewonnen. Die Gewebeprouben wurden zuvor mittels Ultra-Turrax auf Eis in 200 µl PBS homogenisiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss in Gegenwart von Proteinase K und 200 µl Puffer AI (Bindepuffer). Die Proben wurden bei 56°C für 10 min inkubiert und die DNA des Lysats an die Silica-Membran einer Säule gebunden. Danach wurde die an die Membran gebundene DNA mehrfach gewaschen und eluiert. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4-8°C, die Langzeitlagerung bei -20°C.

3.1.1.2. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin RNA Kits* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden ca. 5×10^6 kultivierte Zellen 2-fach mit kaltem PBS gewaschen, mittels eines Zellschabers geerntet und in 350 µl Lysepuffer (1% [v/v] β-Mercaptoethanol) lysiert. Es folgte die Reinigung des Lysats durch Filtration, die Nukleinsäure-Bindung an die Silica-Membran sowie der DNA-Verdau durch rDNase. Die membrangebundene RNA wurde anschließend mehrfach gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.1.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt aus *E. coli*-Übernachtskulturen. Die Aufarbeitung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präp; 2 ml Kultur) erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin*

Plasmid Kits (Macherey-Nagel), die Aufarbeitung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präp; 200 ml Kultur) mit Hilfe des *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits* (Life Technologies). Die Bakterienkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet, das entstandene Pellet anschließend in RNase A-haltigem Puffer resuspendiert und mittels Lysis-Puffer aufgeschlossen. Im Folgenden wurde das Lysat mit Neutralisierungspuffer versetzt und Zellreste, Proteine und genomische DNA abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA des gereinigten Lysats wurde im Falle der Mini-Präp an die Silica-Membran einer Säule gebunden, mehrfach gewaschen und anschließend eluiert. Das Lysat der Maxi-Präp wurde zunächst einem Endotoxin-Reinigungsschritt unterzogen. Hierzu wurde es 30 min bei 4-8°C mit 1/10 Volumen Endotoxin-Removal-Puffer A inkubiert, die Plasmid-DNA anschließend an eine Anionen-Austausch-Säule gebunden und vor dem eigentlichen Waschschrift mit einem Volumen Endotoxin-Removal-Puffer B gereinigt. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Eluierung der Plasmid-DNA. Das Eluat wurde nach Zugabe von Isopropanol (70% [v/v]) mittels Zentrifugation (15000 rpm, 30 min, 4°C) präzipitiert und anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Endotoxin-Removal-Puffer A

50 mM MOPS pH 7,0
750 mM NaCl
10% (w/v) Triton X-100
10% (v/v) Isopropanol

Endotoxin-Removal-Puffer B

100 mM NaAc pH 5,0
750 mM NaCl
1% (w/v) Triton X-100

3.1.2. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mittels NanoPhotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA- bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das Verhältnis der Extinktion E260/E280 gibt Auskunft über die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösung, wobei ein Wert von $\geq 1,8$ eine reine DNA-Lösung, ein Wert von ≥ 2 eine reine RNA-Lösung darstellt.

3.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung eines spezifischen

3. Methoden

DNA-Fragments. Durch Nutzung thermostabiler DNA-Polymerasen, die an eine einzelsträngige DNA gebundene spezifische Oligonukleotide (*sense* und *antisense*) verlängern, kommt es in einem dreistufigen Prozess aus Denaturierung der DNA-Doppelstränge, *Annealing* (Anlagerung der Oligonukleotide an an die DNA) und Elongation zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Abschnittes. Hierfür wurde bei Standard-Amplifikationen die GoTaq-Polymerase verwendet, eine thermostabile DNA-Polymerase, die keine *proof reading*-Funktion besitzt. Bei Amplifikationen für Klonierungsarbeiten oder GC-reicher DNA-Bereiche wurde die KAPA HiFi-Polymerase verwendet, welche über eine *proof reading*-Funktion verfügt.

Standard PCR-Ansatz

5 ng	<i>Template</i> -DNA
0,5 µM	<i>sense</i> Oligonukleotid
0,5 µM	<i>antisense</i> Oligonukleotid
250 µM	dNTP-Mix
1 M	Betain
1 x	Taq-Polymerasepuffer
0,625 U	Taq-Polymerase

auf 25 µl mit Nuklease-freien H₂O auffüllen

Standard PCR-Programm

Denaturierung	95°C	3 min	} 25-30 x
Denaturierung	95°C	30 sec	
<i>Annealing</i> *	58°C	30 sec	
Elongation [#]	72°C	1 min	
Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	15°C	∞	

KAPA HiFi PCR-Ansatz

5 ng	<i>Template</i> -DNA
0,3 µM	<i>sense</i> Oligonukleotid
0,3 µM	<i>antisense</i> Oligonukleotid
250 µM	dNTP-Mix
1 x	GC-Polymerasepuffer
0,5 U	KAPA HiFi-Polymerase

auf 25 µl mit Nuklease-freien H₂O auffüllen

KAPA HiFi PCR-Programm

Denaturierung	95°C	3 min	} 25-30 x
Denaturierung	98°C	20 sec	
<i>Annealing</i> *	58°C	30 sec	
Elongation [#]	72°C	1 min	
Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	15°C	∞	

* Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der eingesetzten DNA-Polymerase.

Spezielle PCR-Programme:

Bei schwer zu amplifizierenden DNA-Fragmenten wurden modifizierte PCR-Programme gewählt.

Touch down-PCR

Bei der *Touch down*-PCR wird zu Beginn eine *Annealing*-Temperatur 5-10°C über dem Optimum gewählt. Die anfängliche *Annealing*-Temperatur wird im Verlauf der PCR nach jedem dritten Zyklus um jeweils 2°C verringert bis die optimale *Annealing*-Temperatur erreicht ist. Daraufhin folgen 25 bis 30 weitere Standard-PCR-Zyklen. Dieses Protokoll erhöht die Spezifität der Reaktion und dient der Anreicherung des spezifischen Produktes.

Nested-PCR

Bei der *Nested*-PCR werden zwei voneinander getrennte PCR-Läufe durchgeführt, wobei das Amplifikat des ersten PCR-Ansatzes als *Template* für den zweiten PCR-Lauf dient. Hierfür wird zunächst eine Standard-PCR durchgeführt und der Reaktionsansatz mittels Agarosegel-Extraktion gereinigt oder direkt für den zweiten PCR-Lauf eingesetzt. Im zweiten PCR-Lauf wird ein Oligonukleotidpaar genutzt, das innerhalb des zuvor amplifizierten Bereichs bindet. Auf diese Weise wird Spezifität und Konzentration des Amplikons erhöht.

3.1.3.1. *Reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels *SuperScript II* (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden 100 ng bis 1 µg Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen (Abschnitt 3.1.1.2.) mit Oligo(dT)-Nukleotiden und dNTPs (10 mM) versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe des Reaktionspuffers, DTT sowie eines RNase-Inhibitors (Ribolock, Fisher Scientific) wurde der Probenansatz für 2 min bei 42°C inkubiert, mit 1 µl *SuperScript II* versetzt und für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine Inkubation bei 70°C für 10 min. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.1.3.2. *RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends* (RLM-RACE)

Die RLM-RACE ist ein Verfahren zur Amplifikation von cDNA-5'-Enden und dient der Bestimmung von Transkriptionsstartstellen. Sie erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *FirstChoice RLM-RACE Kits* (Ambion) unter Verwendung von 1 µg Gesamt-RNA (Abb. 7). Zunächst erfolgte die Dephosphorylierung von RNA-Bruchstücken mittels alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIP). Die intakte Vollängen-RNA, die an ihrem 5'-Ende eine Cap-Struktur besitzt, ist vor der enzymatischen Reaktion der Phosphatase geschützt. Diese Cap-Struktur wurde anschließend mittels einer

Pyrophosphatase (*tobacco acid phosphatase*, TAP) entfernt und an die entstandenen freien 5'-Monophosphatreste ein 45 nt lange RNA-Adaptersequenz ligiert. Nach der cDNA-Synthese mittels *random* Oligonukleotiden folgten *Nested*-PCRs mit adapterspezifischen *sense* Oligonukleotiden und genspezifischen *antisense* Oligonukleotiden. Das Amplifikat wurde anschließend zur genauen Bestimmung des 5'-Endes sequenziert.

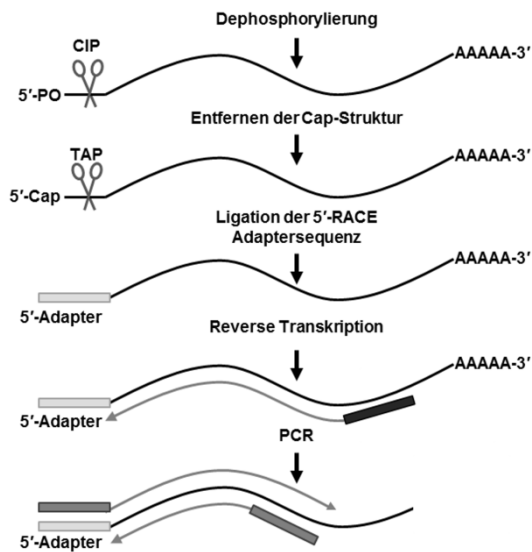


Abb. 7: RLM-RACE

RNA-Bruchstücke wurden zuerst mittels alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIP) dephosphoryliert. Anschließend erfolgte der Abbau der Cap-Struktur durch die Pyrophosphatase (*tobacco acid phosphatase*, TAP). An die entstandenen freien 5'-Monophosphatreste wurde eine 45 nt lange RNA-Adaptersequenzen ligiert. Danach erfolgte die cDNA-Synthese mittels *random* Oligonukleotiden sowie *Nested*-PCRs mit adapterspezifischen *sense* Oligonukleotiden und genspezifischen *antisense* Oligonukleotiden.

3.1.4. DNA/RNA-modifizierende Reaktionen

3.1.4.1. Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurde mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Ein Standard-Restriktionsansatz enthielt 1-2,5 U Restriktionsendonuklease, 1 x Restriktionsendonukleasepuffer (entsprechend zum Enzym) und 100 ng bis 1 µg DNA. Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf das Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Wenn eine Hitzeinaktivierung der verwendeten Restriktionsendonukleasen möglich war, erfolgte diese durch Inkubation bei 65-80°C für 10-15 min.

3.1.4.2. DNA-Dephosphorylierung

Der Abbau der freien 5'-Phosphatreste des zuvor durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektors sollte eine Re-Ligation während der Klonierung verhindern. Hierzu wurde der linearisierte Vektor zusammen mit 1 U *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65°C für 15 min hitzeinaktiviert. Die Zugabe von spezifischem SAP-Puffer entfiel, da die SAP in allen gängigen Endonuklease-Puffern aktiv ist.

3.1.4.3. Ligation

Bei dem Vorgang der Ligation werden zwei Nukleinsäure-Fragmente kovalent verbunden. Hierbei handelt es sich häufig um zuvor mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelte DNA-Fragmente, Vektor-DNA und die in diese einzubringende *Insert*-DNA. Die zuvor dephosphorylierte Vektor-DNA und das *Insert* wurden in einem äquimolaren Verhältnis von 1:3 oder 1:5 (Vektor:Insert) in Gegenwart von 1 x T4-DNA-Ligasepuffer, 1 U T4-DNA-Ligase und der entsprechenden Menge Nuklease-freiem Wasser in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht bei 16°C oder 4°C (bei *blunt end*-Ligation) inkubiert.

3.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden lineare DNA-Fragmente in 1 x TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Je nach zu erwartender Fragmentgröße wurden dafür 0,8% bis 2,5% Agarose (w/v) in 1 x TAE Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von 0,03 µg/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und auf die ausgehärteten Agarosegele aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE verwendet und als Größenstandard dienten *Gene Ruler DNA-Ladder*. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe der Geldokumentationsstation sichtbar gemacht.

50 x TAE-Puffer

40 mM Tris Base
1 mM EDTA
5,71% Essigsäure

6 x Ladepuffer

0,02% (w/v) Bromphenolblau
0,02% (w/v) Xylencyanol
30% (v/v) Glycerin
20 mM Tris-HCl pH 7,6
2 mM EDTA

3.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.1.6.1. Gelextraktion

Die Gelextraktion von DNA-Fragmenten wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) durchgeführt. Die gewünschte DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell an einem UV-Tisch ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des Puffers QG wurde das Gelstück durch Inkubation bei 50°C geschmolzen, die DNA daraufhin an die Silica-Membran einer Säule gebunden und anschließend mehrfach gewaschen. Kleinere Mengen DNA (<100 ng) wurden mit 30 µl, größere Mengen DNA (≥100 ng) mit 50 µl zuvor auf 70°C erhitzten Puffer AE eluiert.

3.1.6.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion diente der DNA-Reinigung und -Aufkonzentrierung. Hierzu wurden die DNA-Proben mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und 10 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumen Isopropanol sowie 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M; pH 5,8) versetzt und über Nacht bei -20°C oder 1 h bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurden die DNA-Proben für 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 75%-igen Ethanol vorsichtig gewaschen und für jeweils 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. In Abhängigkeit der zu erwartenden DNA-Konzentration wurde das Luft-getrocknete Pellet in 5-50 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

3.1.6.3. Exo/SAP-Aufreinigung

Die Exo/SAP-Aufreinigung von PCR-Produkten dient der PCR-Produktreinigung durch Abbau von Oligonukleotiden und Nukleotiden. Dafür wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl des Exo/SAP-Ansatzes versetzt und bei 37°C für 1h inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte bei 80°C für 15 min.

Exo/SAP-Ansatz

0,1 µl Exonuclease I *E. coli* (ExoI, 20 U/µl; Fisher Scientific)

1 µl *shrimp alkaline phosphatase* (SAP, 1 U/µl; Fisher Scientific)

mit dH₂O auf 10 µl auffüllen

3.1.7. Sequenzierung

Zur Analyse der polymorphen Struktur der *KIBRA* 5'-flankierenden Region und zur Kontrolle der Sequenzintegrität von PCR-Produkten sowie Plasmiden erfolgte eine Sequenzierung mittels des ABI3730 Fluoreszenz-Sequenzierers. Sequenzieransätze wurden nach Herstellerangaben mit dem *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) erstellt.

Standard Sequenzier-Ansatz

150 ng Plasmid-DNA bzw. 50 ng PCR-Produkt

0,4 µl BigDye 3.1

2 µl 5 x Sequenzierpuffer

1,6 µM Oligonukleotid

mit dH₂O auf 10 µl auffüllen

Sequenzier-Programm

96°C 5 min

96°C 15 sec

50°C 15 sec

60°C 4 min

26 x

3.1.8. Reportergenassay

3.1.8.1. Konstruktion der Promotordeletionskonstrukte

Zur Analyse putativer regulatorischer *KIBRA*-Bereiche wurden ausgehend von TSS1a (NM_015238.2) serielle Promotordeletionskonstrukte generiert. Hierzu wurde die zuvor sequenzierte genomische DNA mittels PCR amplifiziert (Tabelle 1/2), gereinigt und in

5'-3'-Orientierung in den pGL3-Basic Vektor über die Restriktionsschnittstellen *Mlu*I sowie *Bgl*II eingebracht. Der promotorlose Vektor pGL3-Basic besitzt ein Luziferase-Reportergen und eine *Multiple Cloning Site* (MCS). Die Kasette aus Reportergen und MCS wird von zwei Poly(A)-Signalen, welche ein starkes Stopp-Signal für Transkriptionsereignisse darstellen, begrenzt. Durch das Einbringen einer regulatorischen Sequenz mit TSS erfolgt nach transienter Transfektion die Expression der Luziferase. Die anschließende Detektion des Luziferase-Reportergens ermöglicht die Analyse der Transkriptionsaktivität der in den Vektor eingebrachten regulatorischen Sequenz. Der Vektor pGL3-Control besitzt einen starken SV40-Promotor sowie SV40-Enhancer und ermöglicht die Kontrolle der Transfektionseffizienz (Abb. 8).

Genetische Varianten wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (Abschnitt 3.1.9., Tabelle 3) in die Promotordeletionskonstrukte eingebracht.

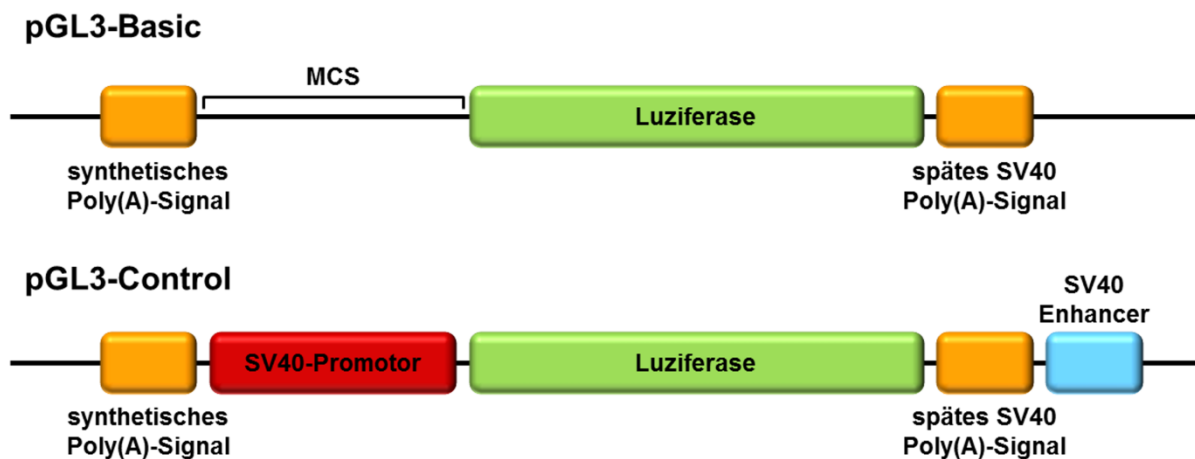


Abb. 8: Das pGL3-Vektor-System

Der promotorlose Vektor pGL3-Basic besitzt ein Luziferase-Reportergen, eine *Multiple Cloning Site* (MCS) und zwei Poly(A)-Signale, die starke Stopp-Signale für Transkriptionsereignisse darstellen. Putative Promotorbereiche werden in 5'-3'-Orientierung in den pGL3-Basic Vektor eingebracht. Der Vektor pGL3-Control besitzt einen starken SV40-Promotor, zwei Poly(A)-Signale, ein Luziferase-Reportergen sowie einen SV40-Enhancer.

Tabelle 1: Oligonukleotide zur Generierung serieller Promotordeletionskonstrukte (AC026689)

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_ss1	GCAGTTCAGTCACCTGTAGAG	-3627
KIBRA_ss2	CTGAGATGAAGGCGTGCTG	-3005
KIBRA_ss3	GTGAAACTCCAGCTCTACTG	-2507
KIBRA_ss4	GGGGAATTCCAACCTTTTGGGT	-2006
KIBRA_ss5	CAGGTTGAAGTGATTCTCATGC	-1443

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_ss6	CCTGTCACAAGTAAGTCCTCAA	-1045
KIBRA_ss7	GACTCCTGATTCTACACCAC	-730
KIBRA_ss8	GAAGTCACAAACCCGGCGA	-361
KIBRA_ss9	GGATCATGGTGCCTCGGC	+1
KIBRA_as1	GGTGCGGTTTCGTGTGGTC	+186
KIBRA_as2	CATGTTTGTGGTCTCATCTCC	-1781
KIBRA_as3	GCCGAGGCACCATGATCC	-1

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Generierung der Intron-Promotordeletionskonstrukte (AC026689)

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_ss10	GAGGCCTGTGTGCTGTTAG	-1909
KIBRA_ss11	CTTCATCTCTGTACCTCCTTG	-1011
KIBRA_ss12	GACAAGGAGCCATTACGG	-1860
KIBRA_ss13	GCATCAGACCCAAGAAGAGG	-776
KIBRA_as4	GATCCACAGCACCTGATTCC	+57
KIBRA_as5	CCTACAACCCAGCCAGTCC	+32

3.1.8.2. Bestimmung der Transkriptionsaktivität

Im 24-Loch-Format wurden transient transfizierte Zellen (Abschnitte 3.2.2.3) nach Entfernen des Mediums durch Zugabe von 100 µl 1 x *Passiv Lysepuffer* für 20 min bei RT auf dem Schüttler und nachfolgender Inkubation für 15 min bei -80°C lysiert. Anschließend wurden 20 µl/Loch Lysat mit 75 µl *Luciferase Assay Substrate* (Promega) versetzt und die Luciferase-Aktivität mittels Luminometer bestimmt.

3.1.8.3. Überexpressionsexperimente

Um zu untersuchen, ob Transkriptionsfaktoren die Expression von *KIBRA* regulieren, wurden diese *in vitro* überexprimiert. Dazu wurden die Zellen gleichzeitig mit den generierten seriellen Promotordeletionskonstrukten der einzelnen Promotorbereiche und dem Transkriptionsfaktor-Überexpressionvektor transfiziert. Die gleichzeitige Transfektion mit dem entsprechenden Expressionsvektor ohne Insert (Leervektor) und den generierten seriellen Promotordeletionskonstrukten diente dabei als Kontrolle. Dabei wurden immer gleiche Mengen der Expressionsvektoren oder der entsprechenden Leervektoren und Promotordeletionskonstrukte eingesetzt, d.h. das Verhältnis Promotordeletionskonstrukt zu

Expressionsvektor betrug 1:1 (0,5 µg Promotordeletionskonstrukt: Expressionsvektor/Leervektor 0,5 µg). Wurden drei Transkriptionsfaktoren gleichzeitig überexprimiert war das Verhältnis Promotordeletionskonstrukt zu Expressionsvektor oder entsprechenden Leervektoren 1:3 (0,5 µg Promotordeletionskonstrukt: Expressionsvektor/Leervektor ~0,2 µg).

3.1.9. Zielgerichtete Mutagenese

Zur Insertion von Punktmutationen im Rahmen einer zielgerichteten Mutagenese wurden entsprechende Oligonukleotide (Tabelle 3) mit einer Länge von 25-35 nt erstellt, welche die erwünschte Punktmutation beinhalteten und komplementär zueinander waren. Die Oligonukleotide wurden zusammen mit der zu modifizierenden Plasmid-DNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Durch die Verlängerung der Oligonukleotide mittels *proof reading* Polymerase (KAPA HiFi-Polymerase) erfolgte die gerichtete Insertion der Mutationen in die Plasmid-DNA. Nicht mutierte parentale DNA wurde anschließend durch das methylierungsabhängige Restriktionsenzym *DpnI* gespalten und die mutierten Plasmide in *E. coli* transformiert (Abschnitt 3.2.1.4.).

Mutagenese PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	3 min	} 15-20 x
Denaturierung	98°C	30 sec	
<i>Annealing</i>	56°C	45 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Elongation	72°C	20 min	
Lagerung	15°C	∞	

Tabelle 3: Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese (AC026689, Position des Basenaustauschs grau markiert, BS=Bindestelle)

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_ss14	CCTGCCATATGCTGAGGGCAAAAAGGG	-1691T
KIBRA_ss15	CTCTCCTTCCCCGGCAGGGGCAGC	-580C
KIBRA_ss16	GCGTGGAGGGCGCCGCGCGCCGCGCGG	-282C
KIBRA_ss17	CTGGGAGGCAGAGCTTGTAGTGAGCCGAG	-2416C
KIBRA_ss18	CAAGCACTGAGCCCCAAGGCCTGGCCTC	-1929A
KIBRA_ss19	GTAGAGATGGGGTTCACGATGTTGGCCAGGCTG	-1358G
KIBRA_ss20	GCTAACAAATAACAAAGGCATTACTATTAC	-1032A
KIBRA_as6	CCCTTTTTTGCCCTCAGCATATGGCAGG	-1691T

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_as7	GCTGCCCTGCCGGGGGAAGGAGAG	-580C
KIBRA_as8	CCGCGCGGCGCGCGGCCCTCCACGC	-282C
KIBRA_as9	CTCGGCTCACTACAAGCTCTGCCTCCCAG	-2416C
KIBRA_as10	GAGGCCAGGCCTTGGGGCTCAGTGCTTG	-1929A
KIBRA_as11	CAGCCTGGCCAACATCGTGAACCCCATCTCTAC	-1358G
KIBRA_as12	GTAATAGTAATGCCTTTGTTATTGTTAGC	-1032A
KIBRA_ss21	ATGGAATTTTGCTCTACTTACTTTCTTCTTTTC	TCF7L2 BS 1
KIBRA_ss22	CATAACACACCTACCTTAGAGTATCACAGGAAAG	TCF7L2 BS 2
KIBRA_ss23	TACTATTACTTTTATAGAGTGTTTTCCCTGACAC	TCF7L2 BS 3
KIBRA_as14	GAAAAAGAAGAAAGTAAGTAGAGCAAATTCATC	TCF7L2 BS 1
KIBRA_as15	CTTTCCTGTGATACTCTAAGGTAGGTGTGTTATG	TCF7L2 BS 2
KIBRA_as16	GTGTCAGGGAAAACA <u>CTCTATA</u> AAAGTAATAGTA	TCF7L2 BS 3

3.1.10 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Um die Interaktion spezifischer Transkriptionsfaktoren mit entsprechenden DNA-Bereichen zu untersuchen, wurden ChIP-Experimente nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Boyd et al., 1998; Liu et al., 2000). Hierzu wurde an DNA-gebundenes Protein zuerst fixiert, mittels ausgewählter spezifischer Antikörper präzipitiert und anschließend erfolgte der Nachweis der Proteinbindung an ausgewählte DNA-Bereiche unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide mittels PCR.

Die Fixierung der Zellen (ca. 1×10^7) erfolgte durch Zugabe von 37%-igen Formaldehyd (Endkonzentration v/v 1%) durch Inkubation für 20 min bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 400 μ l Zellysepuffer für 10 min bei RT lysiert. Anschließend wurden die intakten Zellkerne mittels Zentrifugation (800 rpm, 5 min, 4°C) zuerst pelletiert und dann in 1 ml Kernlysepuffer aufgeschlossen. Um eine durchschnittliche Fragmentgröße von 500 bp zu erhalten, wurde das Chromatin mit Hilfe eines Bioruptors (Diagenode; Intensität: *high*; Interval: 0,5; 45 min) sonifiziert. Die Größe der Chromatin-Fragmente wurde routinemäßig mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zunächst mit *Rabbit* Serum inkubiert (30 min, 4°C) und anschließend mit frisch präparierten magnetischen Protein-G *beads* (blockiert mit BSA und tRNA; 1 h, 4°C) versetzt (30 min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in ein *low-binding* Reaktionsgefäß überführt, mit 4 μ g des spezifischen Antikörpers gegen TCF7L2 versetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit frisch präparierten magnetischen Protein-G *beads* für 3 h bei 4°C

3. Methoden

inkubiert. Die magnetischen Protein-G *beads* wurden anschließend mehrfach mit den Waschpuffern I, II und III gewaschen bevor die Eluierung der Antikörper/Protein/DNA-Komplexe erfolgte. Die reverse Quervernetzung wurde durch eine Inkubation der Proben bei 67°C über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Proteine im Probenansatz durch eine Proteinase K-Behandlung (37°C, 2 h) degradiert, die DNA anschließend mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt (Abschnitt 3.1.6.3) und in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Proteinbindung an den ausgewählten DNA-Bereichen unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide mittels PCR (Abschnitt 3.1.3, Tabelle 4).

Zellysepuffer

10 mM Tris pH 8,0
10 mM NaCl
0,2% (v/v) NP-40
Roche complete protease inhibitor

Kernlysepuffer

50 mM Tris pH 8,0
10 mM EDTA
1% (w/v) SDS
Roche complete protease inhibitor

Verdünnungspuffer

20 mM Tris pH 8,0
2 mM EDTA
150 mM NaCl
1% (v/v) TritonX-100
Roche complete protease inhibitor

Waschpuffer I

20 mM Tris pH 8,0
2 mM EDTA
50 mM NaCl
1% (v/v) TritonX-100
0,1% (w/v) SDS

Waschpuffer II

10 mM Tris pH 8,0
1 mM EDTA
0,25 mM LiCl
1% (v/v) NP-40
1% (w/v) Desoxycholsäure

Waschpuffer III

20 mM Tris pH 7,6
50 mM NaCl

Eluierungspuffer

10 mM NaHCO₃
1% (w/v) SDS

Tabelle 4: Oligonukleotide für den CHIP-Assay (AC026689)

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_ss24	CAAGATGGAATTTTGCTTTGCTTAC	-1165
KIBRA_as17	GGACTTACTTGTGACAGGCTG	-1027

3.1.11. *In vitro* Methylierung

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden und CpG-Inseln in regulatorischen Regionen von Genen kann die Transkriptionsregulation dieser Gene beeinflussen. Um zu ermitteln, welchen Einfluss der Methylierungsgrad der *KIBRA*-Promotoren auf die Transkriptionsaktivität hat, wurden die identifizierten CpG-Inseln gezielt in den pCpGL-Basic Vektor (Klug & Rehli, 2006) kloniert. Bei dem pCpGL-Vektor handelt es sich, wie beim pGL3-Basic-Vektor, um einen promotorlosen Reportergenvektor, der ein Luziferase-Reportergen besitzt. Der pCpGL-Vektor zeichnet sich durch die Abwesenheit von CpG-Dinukleotide aus und kann somit nicht durch DNA-Methyltransferasen methyliert werden.

Für die *in vitro* Methylierung wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 12 U Methyltransferase *SssI* oder *HpaII* in Anwesenheit von 640 µM *S*-Adenosyl-L-methionine (SAM) für 6 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Abschnitt 3.1.6.3) gereinigt, das getrocknete DNA-Pellet in Nuklease-freiem H₂O aufgenommen, auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und im Reportergenassay eingesetzt. Als Kontrolle diente gleichbehandelte Plasmid-DNA ohne Zusatz der Methyltransferasen.

3.1.12. Bisulfitkonvertierung

Der Methylierungsstatus der CpG-Inseln von *KIBRA* im Nierengewebe wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des *EpiTect Bisulfite Kits* (Qiagen) analysiert. Hierfür wurden 500 ng der isolierten genomischen DNA mit einem Bisulfit-haltigen Puffer versetzt. Daraufhin kam es zur hydrolytischen Desaminierung der unmethylierten Cytosine erst zu Cytosinsulphonat und anschließend zu Uracilsulphonat (Abb. 9). Es folgte die Bindung der DNA an die Membran eines Säulchens, die Entfernung von Pufferresten durch einen Waschschrift sowie die Desulfonierung des Uracilsulphonats zu Uracil. Nach weiteren Waschschriften wurde die konvertierte DNA eluiert, mittels PCR durch die Verwendung des *KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix* (PEQLAB) amplifiziert und in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) subkloniert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA (Abschnitt 3.1.1.3.) und die Sequenzierung (Abschnitt 3.1.7.) mittels im Vektor gelegener, zum Insert gerichteter Oligonukleotide (Tabelle 5).

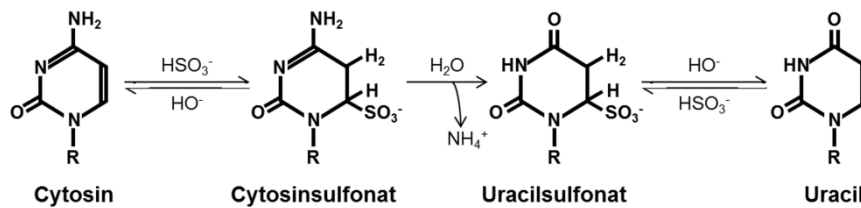


Abb. 9: Darstellung der chemischen Reaktion der Konvertierung von Cytosin zu Uracil

Bei der Bisulfit-Konvertierung genomischer DNA kommt es zur hydrolytischen Desaminierung unmethylierter Cytosinreste erst zu Cytosinsulphonat-, dann zu Uracilsulphonat und anschließend zu Uracilresten.

Tabelle 5: Oligonukleotide für die Analyse des *KIBRA*-Methylierungsstatus (AC026689)

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Position
KIBRA_ss25	TAATTTTATACGCGGGTAGTTAGAC	-3708
KIBRA_ss26	GGTTTAGTTTTTTAGTTTTGGGAC	-605
KIBRA_as18	AAATTAACCTAAATCTATTCGCT	-3375
KIBRA_as19	ACCTCTCACGCTACCATATACGT	-127
M13_ss	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	pGEM-T Easy
M13_as	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT	pGEM-T Easy

3.2. Zellbiologische und mikrobiologische Methoden

3.2.1 Prokaryotische Zellen

3.2.1.1 Kulturbedingungen prokaryotischer Zellen

E. coli Kulturen wurden entweder in flüssigem LB-Medium im Schüttler (250 rpm) oder auf festen LB-Agarplatten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur spezifischen Selektion transformierter Bakterien wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt.

LB-Medium

10 g Trypton (Bacto)
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
auf 1000 ml mit H₂O auffüllen
120 min bei 121°C autoklavieren

LB-Agar

15 g Agar (Bacto) auf 1000 ml LB-Medium
120 min bei 121°C autoklavieren
Zugabe des Antibiotikums nach Abkühlung
auf 56°C

3.2.1.2. Herstellung kompetenter Zellen

Zuerst wurden 200 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ versetzt. Dieses LB-Medium wurde mit einer 5 ml *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₉₀ von 0,4-0,6 bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Die Kultur wurde anschließend bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 1/2,5 Volumen eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz erneut bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/25 Originalvolumen TFBII aufgenommen, für 15-60 min auf Eis inkubiert, anschließend in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert (100 µl) und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung kompetenter Zellen erfolgte bei -80°C.

TFBI-Puffer

30 mM KOAc
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15% Glycerin

TFBII-Puffer

10 mM MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15% Glycerin

3.2.1.3. Transformation

Für die Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes (Abschnitt 3.1.4.3.) oder 50 ng Plasmid-DNA zu den noch gefrorenen Aliquots (100 µl) der chemisch kompetenten *E. coli* gegeben und für 5-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock für 30 sec bei 42°C und eine Inkubation für 2 min auf Eis. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C

im Brutschrank inkubiert. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurde das Bakterienpellet nach der Zentrifugation in 80 µl einer 1:1 Lösung IPTG (100 mM)/X-Gal (20 mg/ml) resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2. Eukaryotische Zellen

3.2.2.1 Kulturbedingungen eukaryotischer Zellen

Die Neuroblastomazellen (SH-SY5Y) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 20% (v/v) fetalem *bovine serum* (FBS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptavidin und 2 mM/ml L-Glutamin kultiviert.

Die Kultivierung der Neuroblastomazellen (SH-N-SH) erfolgte in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium ohne Phenolrot mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptavidin und 2 mM/ml L-Glutamin.

Die immortalisierten humanen Nierenepithelzellen (IHKE) wurden in DMEM/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM:Ham's F12, 1:1) mit 1% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM/ml L-Glutamin, 10 ml/l *Insulin-Transferrin-Selenium*, 1,25 g/l NaHCO₃, 55 mg/l Natriumpyruvat, 10 µg/l *epidermal growth factor* und 15 mmol/l HEPES (Merck) kultiviert.

Humane proximal tubuläre Nierenzellen (HPCT) wurden in DMEM:Ham's F12 mit 5% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM/ml L-Glutamin, 10 ml/l *Insulin-Transferrin-Selenium*, 1,25 g/l NaHCO₃, 55 mg/l Natriumpyruvat, 10 µg/l *epidermal growth factor* und 15 mmol/l HEPES kultiviert.

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm²) im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten 5%-igen CO₂-Atmosphäre. Die konfluenten Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 0,05%-igen Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und für die weitere Kultivierung in gewünschter Dichte ausgesät.

3.2.2.2. Lagerung der Zellen

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung zunächst mit PBS gewaschen und mit 0,05%-igen Trypsin-EDTA trypsiniert. Nach Zugabe von Medium wurden die Zellen für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und in FBS mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Die in Kryoröhrchen überführten Zellen wurden in einem *Freezing*-Container bei -80°C eingefroren und dadurch

um -1°C pro min runtergekühlt. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen am darauffolgenden Tag in den Stickstofftank zur Langzeitlagerung überführt.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden durch ein schnelles Erwärmen auf 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Medium überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung des DMSOs.

3.2.2.3. Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion der Zellen (IHKE-, HPCT-, SH-SY5Y und SK-N-SH-Zellen) erfolgte mittels Transfektionsreagenz jetPEI. Hierfür wurden die Zellen in einer 24-Loch-Platte in $500\ \mu\text{l}/\text{Loch}$ Medium ausgesät (Tabelle 6) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte 2 h vor der Transfektion ein Mediumwechsel. Für die Transfektion wurden $1\ \mu\text{g}$ des zu transfizierenden Plasmids sowie $2\ \mu\text{l}$ des jetPEI-Transfektionsreagenz getrennt voneinander mit je $50\ \mu\text{l}$ jetPEI-NaCl-Lösung ($150\ \text{mM}$) gemischt. Die beiden Ansätze wurden anschließend vereint und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes tröpfchenweise mit $100\ \mu\text{l}/24\text{iger Loch}$ unter Schütteln der Kulturplatte. Die Zellen wurden anschließend für 4 h im Brutschrank inkubiert. Danach folgte ein weiterer Mediumwechsel sowie die Inkubation der Zellen für 24 h im Brutschrank. Für die Transfektion der Promotordeletionskonstrukte wurden äquimolare Mengen der einzelnen Plasmide eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pGL3-Basic, als Positivkontrolle der Vektor pGL3-Control transfiziert.

Tabelle 6: Zellzahl pro 24iger-Loch

Linie	Zellen pro 24iger-Loch
HPCT	2×10^5
IHKE	1×10^5
SH-SY5Y	$2,5 \times 10^5$
SK-N-SH	$1,5 \times 10^5$

3.2.3. Studienpopulationen

Die polymorphe Struktur der *KIBRA* 5'-flankierenden Region wurde zum einen in dem Patientenkollektiv der *Münster Molecular Functional Profiling for Mechanism* (MolProMD; Dördelmann et al., 2008) -Studie untersucht. In der MolProMD-Studie wurden Patienten erfasst, die unter kardiovaskulären Erkrankungen leiden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster

genehmigt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Studienteilnehmern eingeholt.

Das humane Gewebe des Cortex cerebri wurde durch Frau Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Münster) und das humane Nierengewebe durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Eberhardt Schlatter (Experimentelle Nephrologie Universitätsklinikum Münster) für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Studien wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster genehmigt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Studienteilnehmern eingeholt.

3.2.4. *In silico* Analysen

Die Analyse putativer TFBS erfolgte *in silico* mit Hilfe der Programme PROMO 3.0.2 (<http://algggen.lsi.upc.es/>; Messeguer et al., 2002) und AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/>; Grabe, 2002) unter Verwendung der Standardeinstellungen sowie der diesen Programmen zugrundeliegenden Datenbank TRANSFAC (Version 7 bzw. 8.3).

Für die Analyse der molekularen Haplotypen wurde das Programm Haploview 4.2. (Barrett et al., 2005) verwendet.

Die Identifizierung der CpG-Insel erfolgte mit Hilfe des Programms *CpG Island searcher* (Version 10/29/04, <http://cpgislands.usc.edu/>; Takai & Jones, 2002; Takai & Jones, 2003).

Die Analyse potentieller TSS erfolgte unter Verwendung einer Datenbank für TSS (DBTSS; <http://dbtss.hgc.jp/>; Tsuchihara et al., 2009) in Kombination mit der Vorhersage von *DNase I-hypersensitive sites* durch den *UCSC genome browser* (<http://genome.ucsc.edu/>; Karolchik et al., 2003; Thomas et al., 2007).

3.2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.03; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Signifikanzen wurden mittels ungepaarten zweiseitigen *Student's t-Test* berechnet (Konfidenzintervall 95%). Das Signifikanzniveau wurde festgelegt auf: $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Identifizierung von TSS

Die Transkriptvariabilität eines Gens kann unter anderem auf die Nutzung von unterschiedlichen TSS sowie damit assoziierte Promotoren zurückgeführt werden und ist charakteristisch für die zelltyp- und entwicklungspezifische Regulation von ubiquitär exprimierten Genen (Carninci et al., 2006; Hochheimer & Tjian 2003; Kim et al., 2003; Lee et al., 2005). Aus diesem Grund wurde zunächst die TSS-Architektur von *KIBRA* in renalen IHKE- und HPCT-Zellen sowie in neuronalen SH-SY5Y- und SK-N-SH-Zellen untersucht. Um die für *KIBRA* in der ENCODE-Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>; Rosenbloom et al., 2012) aufgeführten TSS zu validieren, wurde eine RLM-RACE (Schaefer, 1995) unter Verwendung von RNA aus den renalen und neuronalen Zelllinien durchgeführt. Die Methode der RLM-RACE bietet gegenüber einer konventionellen 5'-RACE den Vorteil, dass nur vollständig prozessierte Transkripte mit einer 5'-Capstruktur amplifiziert werden. Der in der Datenbank annotierte TSS1a an Position +1 konnte in allen analysierten Zelllinien bestätigt werden (AC026689). Des Weiteren wurden in der 5'-flankierenden Region von *KIBRA* zwei bisher unbeschriebene TSS gefunden. Diese wurden als TSS1b (Position -153) und TSS1c (Position -415) bezeichnet (Abb. 10). Zum späteren vereinfachten Nachweis der neu identifizierten TSS wurde eine PCR etabliert, die auf der Verwendung von *sense* Oligonukleotiden, welche an den jeweiligen TSS lokalisiert waren, und einen *antisense* Oligonukleotid in Exon 2 basiert (Abb. A1). TSS1b und TSS1c konnten sowohl in den beiden renalen (IHKE, HPCT) als auch in den neuronalen Zelllinien (SH-SY5Y, SK-N-SH) detektiert werden (Abb. 10). Die drei TSS in der 5'-flankierenden Region von *KIBRA*, TSS1a, TSS1b und TSS1c können somit als konstitutive TSS bezeichnet werden.

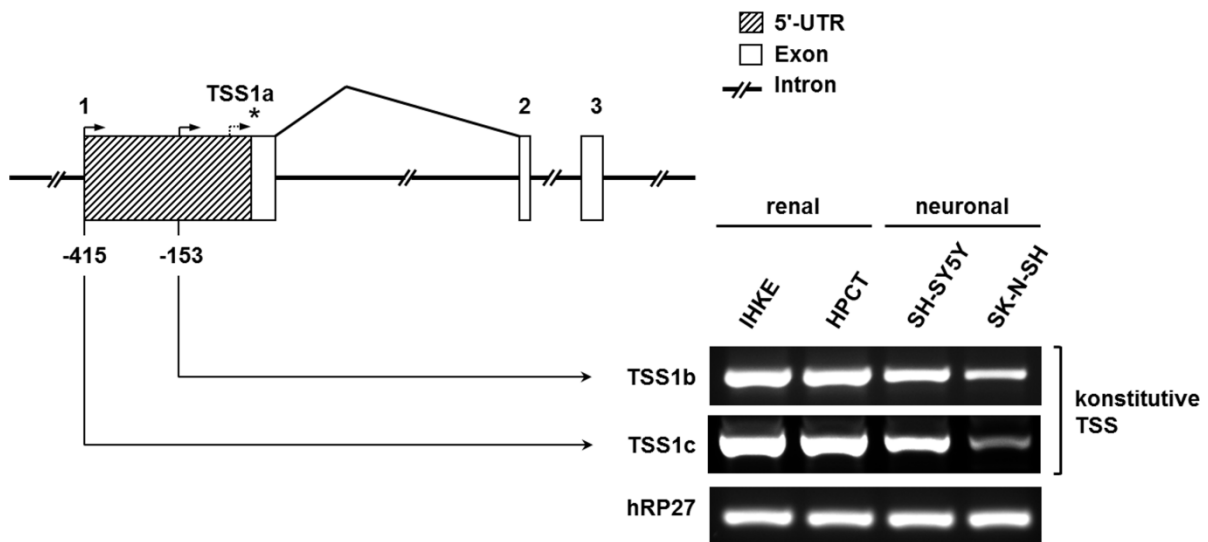


Abb. 10: TSS in der 5'-flankierten Region von *KIBRA*

Schematische Darstellung des *KIBRA*-Genlocus und Position der TSS. Der annotierte TSS1a (+1, NM_015238) ist durch einen grauen Pfeil dargestellt, die mittels RLM-RACE neu identifizierte TSS1b und TSS1c an den Positionen -153 und -415 sind durch schwarze Pfeile markiert. Die Validierung der TSS erfolgte mittels PCR durch entsprechende *sense* Oligonukleotide, welche an den jeweiligen TSS lokalisiert waren und einem *antisense* Oligonukleotid in Exon 2. TSS1b und TSS1c konnten sowohl in den renalen IHKE- und HPCT-Zelllinien als auch in den beiden neuronalen Zelllinien (SH-SY5Y, SK-N-SH) nachgewiesen werden. Die Initiierung der Transkripte von beiden TSS erfolgte unabhängig von Stimulation und Differenzierungsstatus der Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Als Gelladeg Kontrolle diente hRP27.

Unter Verwendung einer Datenbank für TSS (DBTSS; <http://dbtss.hgc.jp/>; Tsuchihara et al., 2009) in Kombination mit der Vorhersage von *DNase I-hypersensitive sites* durch den *UCSC genome browser* (<http://genome.ucsc.edu/>; Karolchik et al., 2003; Thomas et al., 2007) konnten, in weiteren RLM-RACE-Experimenten, zwei zusätzliche TSS im *KIBRA*-Intron 1 identifiziert werden, TSS2 an Position +3898 und TSS3 an Position +24561 stromabwärts von TSS1a (Abb. 11A). Hieraus resultierten zwei neue alternative Exone, 2a und 2b, mit einer jeweiligen Länge von 328 bp und 205 bp. Ein potentieller alternativer Translationsstartpunkt (TLS) mit einer entsprechenden „Kozak-Sequenz“ wurde in Exon 3 detektiert (Kozak, 1986). Die Nutzung von TSS2 und TSS3 in Kombination mit dem TLS in Exon 3 würde zu einer trunkeierten *KIBRA*-Proteinisoform führen, der beide WW-Domänen fehlen (Abb. 11B). Die TSS im ersten Intron von *KIBRA* wurden ausschließlich in den beiden renalen Zelllinien detektiert, nicht aber in den neuronalen Zelllinien. Die intronischen TSS von *KIBRA*, TSS2 und TSS3, sind somit zelltypspezifisch.

Zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse wurde zusätzlich RNA aus Nierengewebe sowie dem Cortex cerebri (Großhirnrinde) von jeweils drei Patienten isoliert (Methodenteil 3.1.1.2.) und

4. Ergebnisse

mittels PCR auf die intronischen TSS untersucht. Durch diesen Ansatz konnte gezeigt werden, dass TSS3 ausschließlich und TSS2 hauptsächlich im renalen Gewebe verwendet werden, was die zuvor erzielten Ergebnisse aus den Zelllinien stützt (Abb. 11C). Lediglich in einer von drei Gewebeproben aus dem Cortex cerebri wurde TSS2 schwach detektiert. Die intronischen TSS von *KIBRA* sind somit nicht nur zelltypspezifisch sondern auch gewebespezifisch.

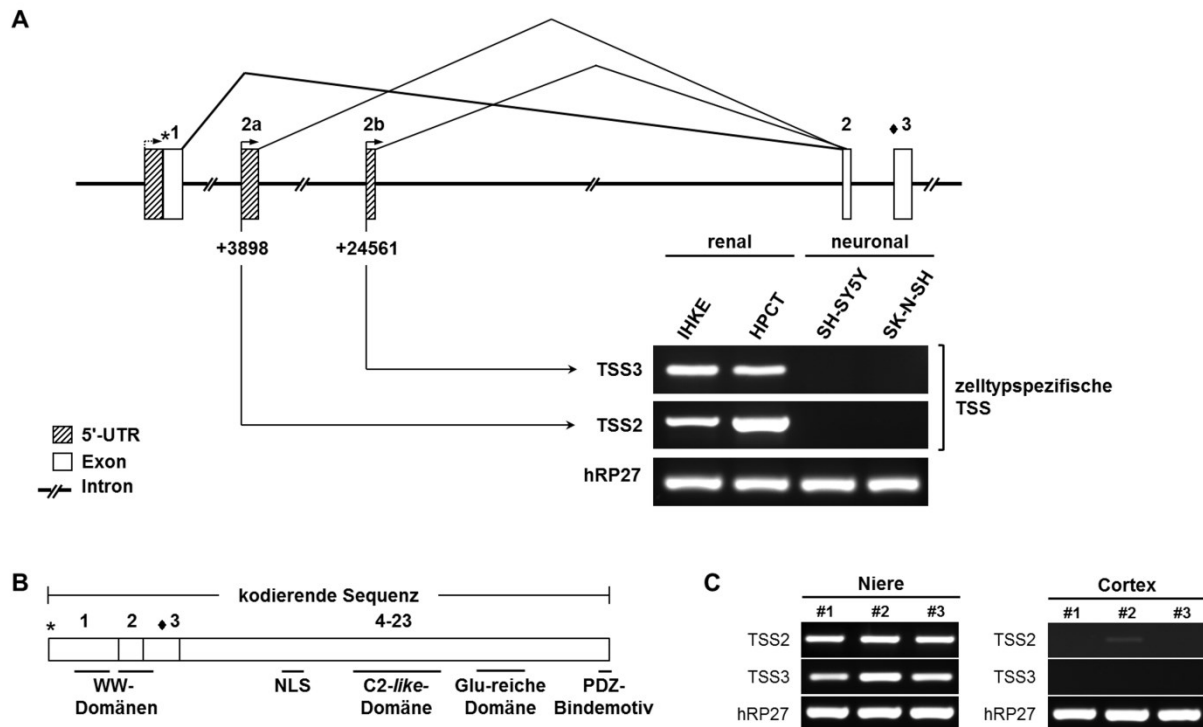


Abb. 11: Die zelltypspezifischen TSS2 und TSS3 liegen im ersten Intron von *KIBRA*

A) Schematische Darstellung des *KIBRA*-Genlocus und der TSS-Positionen. Die beiden mittels Datenbankanalyse und RLM-RACE neu identifizierten TSS2 und TSS3 im ersten Intron von *KIBRA* wurden ausschließlich in den renalen Zelllinien (IHKE, HPCT) detektiert. Die daraus resultierenden alternativen Exone, 2a und 2b, haben eine Länge von 328 bp bzw. 205 bp. Ein potentieller alternativer Translationsstartpunkt (TLS) befindet sich im Exon 3 (schwarze Raute). Die Nutzung der beiden TSS würde zu einer trunkierten *KIBRA*-Proteinisoform führen, der beide WW-Domänen fehlen. **B)** Schematische Darstellung der Protein-Domänen von *KIBRA*. Die beiden WW-Domänen werden durch Exon 1, Exon 2 und zum Teil durch Exon 3 kodiert. Des Weiteren besitzt *KIBRA* ein Kernlokalisierungssignal (NLS), eine C2-like-Domäne, eine Glutaminsäure (Glu)-reiche Region und ein PDZ (Domäne von *Post synaptic density-95*, *Discs large* und *Zonula occludentes-1*)-Bindemotiv. **C)** *Ex vivo* Validierung der Exone 2a und 2b mittels semiquantitativer PCR aus Nierengewebe und dem Cortex cerebri. Die beiden TSS, TSS2 und TSS3, konnten im Nierengewebe, nicht aber im Cortex cerebri nachgewiesen werden. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Als Gelladeg Kontrolle diente hRP27.

4.2. Identifizierung von regulatorischen Bereichen

Zur Identifizierung regulatorischer Bereiche von *KIBRA* wurde das pGL3-System der Firma Promega mit den Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Control verwendet (Abb. 8). Der promotorlose Vektor pGL3-Basic besitzt ein Luziferase-Reportergen. Eingefasst ist die Kasette aus Reportergen und *Multiple Cloning Site* (MCS) durch zwei poly(A)-Sites, die starke Stopp-Signale für Transkriptionsereignisse darstellen. Durch das Einbringen einer regulatorischen Sequenz mit TSS erfolgt nach transienter Transfektion die Expression der Luziferase. Die anschließende Detektion des Luziferase-Reportergens ermöglicht die Analyse der Transkriptionsaktivität der in den Vektor eingebrachten regulatorischen Sequenz. Der Vektor pGL3-Control besitzt einen starken SV40-Promotor sowie SV40-Enhancer und ermöglicht die Kontrolle der Transfektionseffizienz.

In silico Analysen der 5'-flankierende Region von *KIBRA* deuten auf die Lokalisation von zwei CpG-Inseln hin. Zur Analyse der putativen regulatorischen Bereiche um die neu identifizierten TSS wurden ausgehend von TSS1a serielle Deletionskonstrukte generiert (3'-Position +186). Da die erste CpG-Insel auch die 5'-UTR umfasst und potentiell regulatorische Elemente beinhalten kann, wurde diese bei der Generierung der Deletionskonstrukte explizit eingeschlossen. Das längste Konstrukt umfasste 3627 bp der 5'-flankierenden Region von *KIBRA* und beinhaltete somit auch die zweite weiter 5'-gelegene CpG-Insel sowie potentielle proximale Promotoren. Diese befinden sich meist in einer Entfernung von ~250-1000 bp stromabwärts vom TSS. Ebenso enthalten ist der komplette *Core*-Promotorbereich. Dieser umfasst die ersten ~80-100 bp um den TSS (Carninci et al., 2006; Smale & Kadonaga, 2003). Alle weiteren Konstrukte stellten 5'-Trunkierungen des Vollängenkonstrukts -3627/+186 dar. Die Deletionskonstrukte wurden dabei seriell um ca. 500 bp trunkiert. Die generierten Promotordeletionskonstrukte wurden im Reportergenassay in den renalen und neuronalen Zelllinien auf ihre Transkriptionsaktivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptionsaktivität der 5'-flankierenden Region von *KIBRA* in allen getesteten Zelllinien in zwei Bereiche unterteilt war (Abb. 12A). Der proximale Promotorbereich von Position -361 bis -1443 wurde entsprechend als Promotor P1a bezeichnet, der distale, von Position -2507 bis -3627 reichende Promotor, als P1b (Abb. 12B). Das Deletionskonstrukt -361/+186 von Promotor P1a besaß im Vergleich die geringste Transkriptionsaktivität und bildete den sogenannten *Core*-Promotor von *KIBRA*. Die Promotordeletionskonstrukte -1045/+186 und -1443/+186 wiesen die höchste Transkriptionsaktivität von Promotor P1a auf. Die 5'-UTR von *KIBRA*, repräsentiert durch das Deletionskonstrukt +1/+186, besaß keine eigenständige Transkriptionsaktivität. Die stärkste Transkriptionsaktivität im Promotorbereich P1b wurde für das Deletionskonstrukt -3006/+186

4. Ergebnisse

detektiert (Abb. 12B). Das Deletionskonstrukt -2006/+186 repräsentierte einen Bereich mit signifikant verminderter Transkriptionsaktivität im Vergleich zu P1a-Deletionskonstrukt -1443/+186 und P1b -2607/+186 ($p < 0,0001$). Aufgrund der beschriebenen Verteilung der Transkriptionsaktivitäten der generierten Promotordeletionskonstrukte war anzunehmen, dass es sich bei den Promotorbereichen P1a und P1b um ein alternatives und potentiell unabhängiges Promotorsystem handeln könnte.

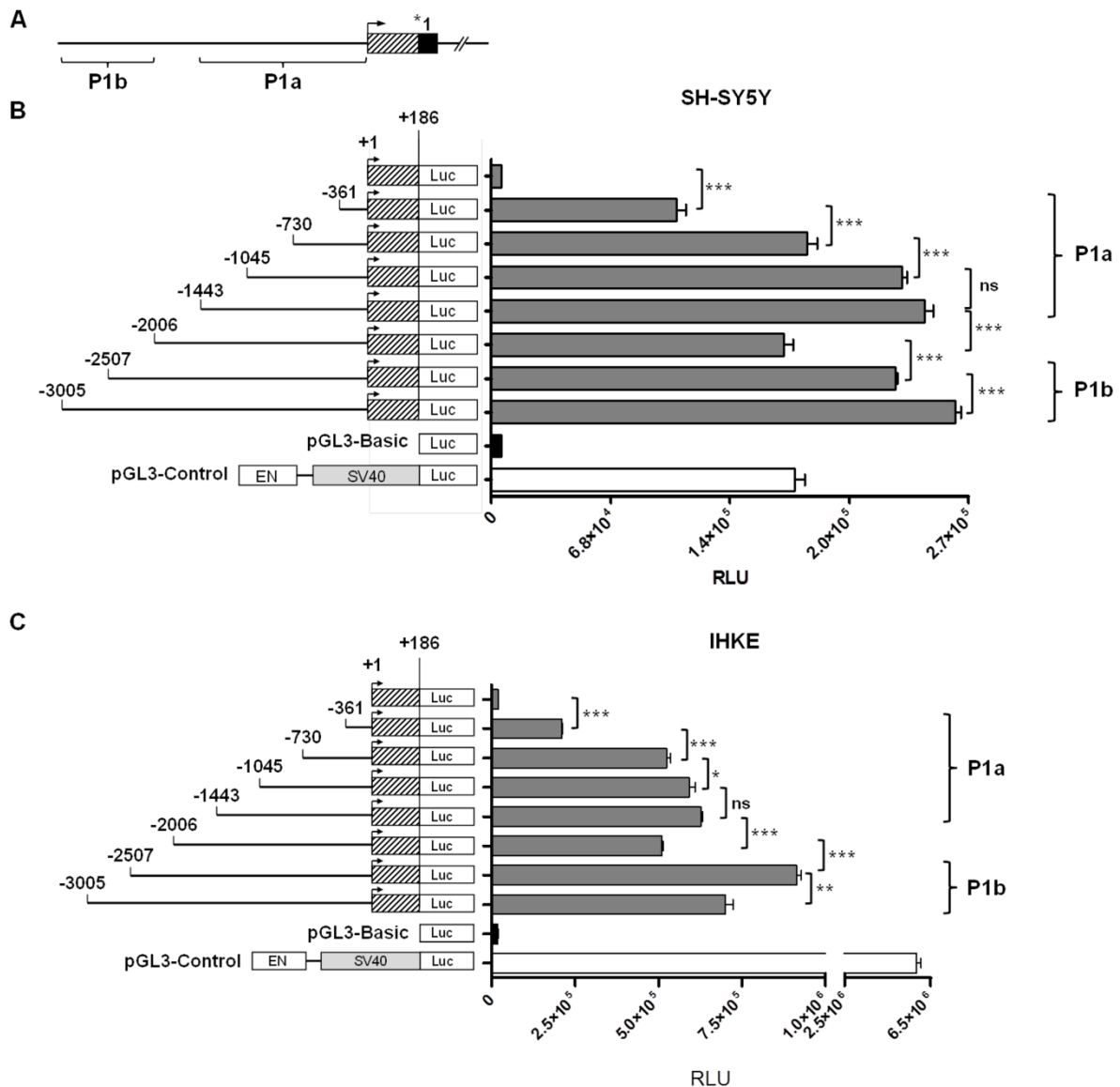


Abb. 12: Transkriptionsaktivität der seriellen *KIBRA*-Promotordeletionskonstrukte

A) Schematische Darstellung der Transkriptionsaktivität der beiden durch ~1060 bp voneinander getrennten Bereiche P1a und P1b. **B)** Das Deletionskonstrukt -361/+186 besaß die geringste, die Deletionskonstrukte -1045/+186 und -1443/+186 die höchste Transkriptionsaktivität von Promotor P1a. Eine signifikante Abnahme der Transkriptionsaktivität im Vergleich zu Deletionskonstrukt -1443/+186 war bei Deletionskonstrukt -2006/+186 zu beobachten. Das Deletionskonstrukt

-2507/+186 kennzeichnet einen erneuten Anstieg der Transkriptionsaktivität. Die isolierte 5'-UTR (+1/+186) besaß keine eigenständige Transkriptionsaktivität. **C)** Ähnliche Ergebnisse wurden in den IHKE-Zellen erzielt. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001; **<0,01; *<0,05; ns=nicht signifikant. Luc markiert das Luziferasegen. RLU=*relative light unit*.

4.2.1. Identifizierung des alternativen 5'-Promotors P1b

Um festzustellen ob es sich bei P1b um einen eigenständigen, alternativen Promotor von *KIBRA* handelt, wurde die Promotoraktivität von P1b unabhängig von P1a in den beiden renalen und neuronalen Zelllinien untersucht.

Für die Analyse im Reporterassay wurden 3'-verkürzte Promotordeletionskonstrukte beginnend bei Position -1781 generiert, die ausschließlich den isolierten Promotor P1b beinhalten (Abb. 13A). In den IHKE-Zellen wiesen die trunkierten P1b-Deletionskonstrukte eine starke eigenständige Transkriptionsaktivität auf (Abb. 13B). Die Transkriptionsaktivität des Konstrukts -3005/+1781 war vergleichbar mit der des Vollängenkonstrukts -3005/+186 (Abb. 13B). In den HPCT-Zellen verfügte das P1b-Deletionkonstrukt -3627/-1781 über eine ausreichende Transkriptionsaktivität (Abb. 13B). Im Gegensatz dazu besaßen alle trunkierten P1b-Deletionskonstrukte in den beiden neuronalen Zelllinien keine eigenständige Transkriptionsaktivität (Abb. 13C).

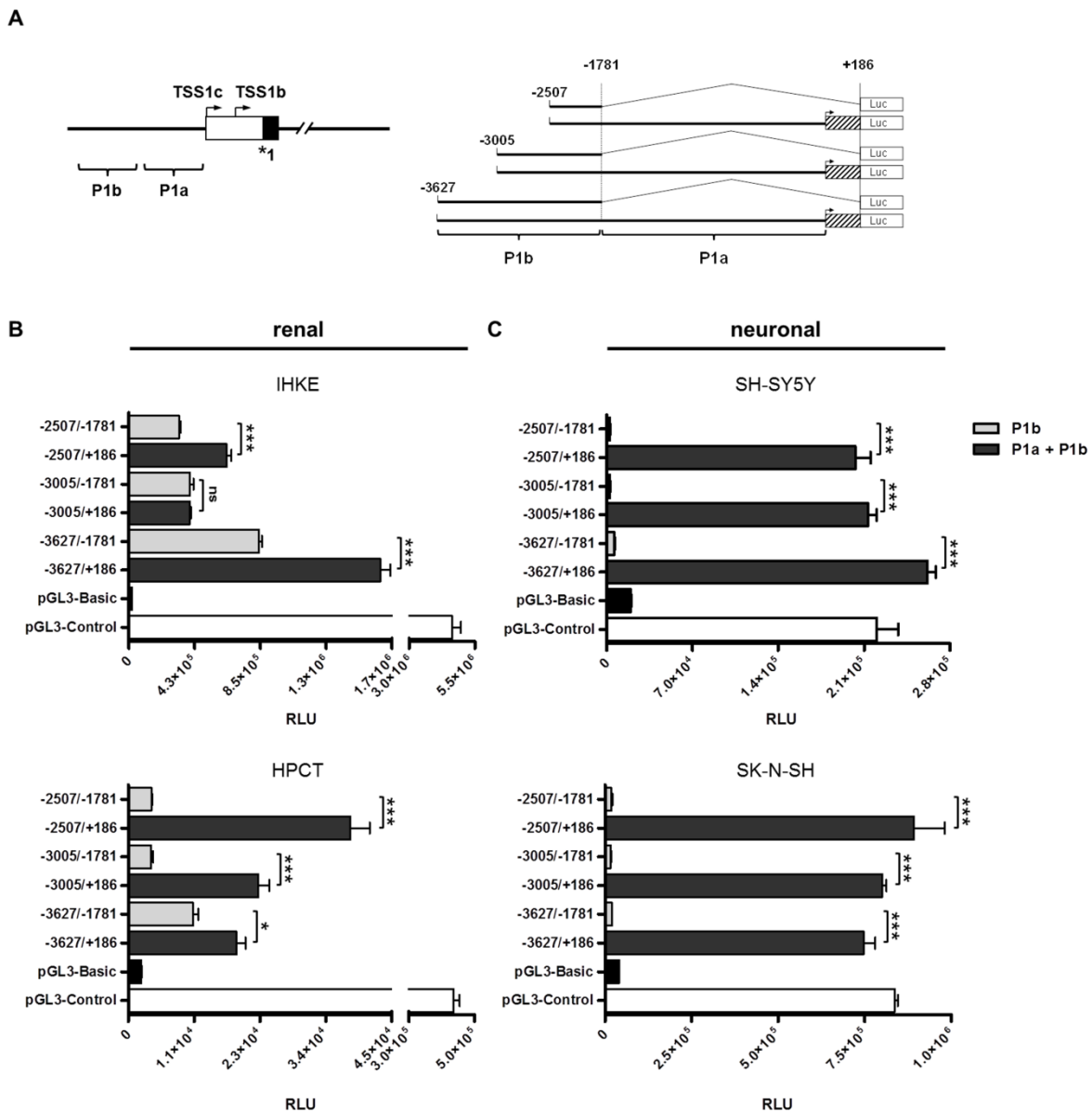


Abb. 13: Die Transkriptionsaktivität von P1b ist auf renale Zellen beschränkt

A) Schematische Darstellung der beiden transkriptionsaktiven Bereiche P1a und P1b, sowie der P1b- und P1a/P1b-Promotordeletionskonstrukte. **B)** In den renalen Zelllinien (IHKE, HPCT) besaßen alle trunkierten P1b-Deletionskonstrukte eine starke Transkriptionsaktivität. In den IHKE-Zellen war die Transkriptionsaktivität des trunkierten Deletionkonstrukts -3005/-1781 vergleichbar mit dem Volllängenkonstrukt -3005/+186. **C)** In den neuronalen Zelllinien (SH-SY5Y, SK-N-SH) besaßen alle generierten P1b-Promotordeletionskonstrukte keine eigenständige Transkriptionsaktivität. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. *** $p < 0,001$; ns=nicht signifikant. RLU=*relative light unit*.

4.2.2. Identifizierung der Intron-Promotoren P2 und P3

Um zu ermitteln ob die neu identifizierten TSS im ersten Intron von *KIBRA* auch die Position alternativer Promotorbereiche kennzeichnen, wurden jeweils ~ 2kb der 5'-flankierenden Region ausgehend von TSS2 und TSS3 in den pGL3-Basic Vektor eingebracht (Abb. 14A). Die Intron-Promotordeletionskonstrukte wurden in die renalen und neuronalen Zelllinien transfiziert und deren Transkriptionsaktivität im Reporterassay untersucht. In den renalen Zelllinien besaßen alle generierten Intron-Promotordeletionskonstrukte eine ausreichende Transkriptionsaktivität im Vergleich zum P1a-Referenzkonstrukt -361/+186 (Abb. 14B), welches den *Core*-Promotor von *KIBRA* repräsentiert. Im Gegensatz dazu verfügte keines der Intron-Promotordeletionskonstrukte über Transkriptionsaktivität in den getesteten neuronalen Zelllinien (Abb. 14C). Dieses Ergebnis unterstützt die Ergebnisse der TSS-Analyse in Zelllinien. TSS2 und TSS3 wurden ausschließlich in den renalen, nicht aber in den neuronalen Zelllinien detektiert. Die beiden neu identifizierten Promotorbereiche wurden als alternative Promotorbereiche P2 und P3 bezeichnet.

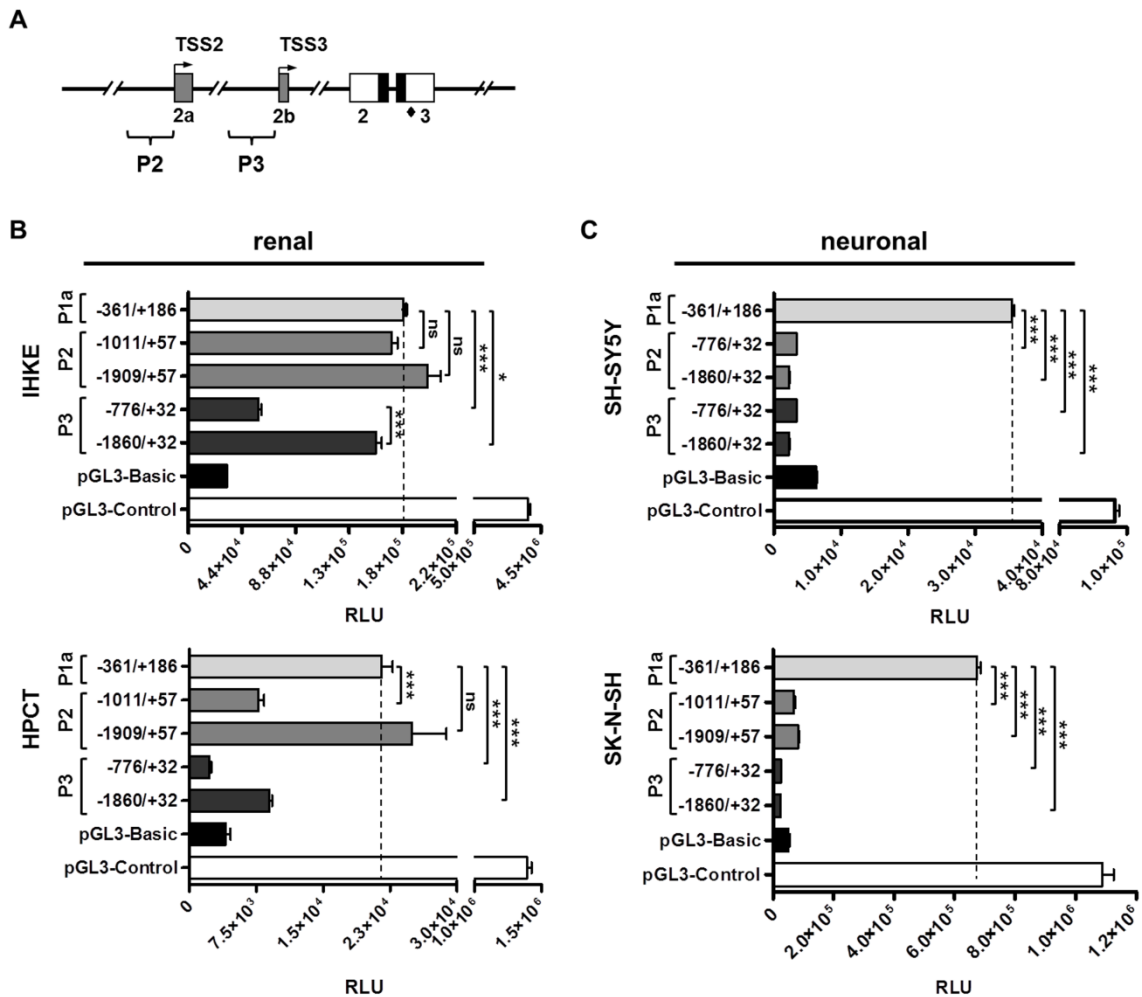


Abb. 14: Die Intron-Promotoren P2 und P3 sind in neuronalen Zellen inaktiv

A) Schematische Darstellung der Position der beiden putativen Promotorbereiche P2 und P3 im ersten Intron von *KIBRA*. **B)** In den renalen Zellen besaßen alle generierten Intron-Promotordeletionskonstrukte der beiden putativen Promotorbereiche P2 und P3 eine ausreichende Transkriptionsaktivität im Vergleich zum P1a-Referenzkonstrukt -361/+186. **C)** Im Gegensatz dazu verfügten die generierten Intron-Promotordeletionskonstrukte für P2 und P3 in den neuronalen Zellen über keine Transkriptionsaktivität. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns=nicht signifikant. RLU=*relative light unit*.

4.2.3. Einfluss der 5'-UTR auf die Transkriptionsaktivität

Da die 5'-UTR eines Gens häufig an der Transkriptionsregulation beteiligt ist (Core et al., 2008; Denoed et al., 2007; Hughes, 2006; Seila et al., 2008), wurde ebenfalls ein *KIBRA*-Promotordeletionskonstrukt ohne 5'-UTR basierend auf dem Deletionskonstrukt -1443/+186 generiert (Abb. 15A) und im Reporterassay in IHKE- und SH-SY5Y Zellen getestet. In den SH-SY5Y-Zellen führte das Entfernen der 5'-UTR zu einem signifikanten ~2,5-fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität ($p < 0,0001$) im Vergleich zum Volllängenkonstrukt (Abb. 15B). Ein vergleichbarer, jedoch schwächerer Effekt war bei den IHKE-Zellen zu beobachten. Hier führte das Entfernen der 5'-UTR zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptionsaktivität um das ~1,5-fache (Abb. 15B; $p < 0,0001$). Dieses Experiment zeigt, dass die 5'-UTR bei der Modulation der *KIBRA*-Transkription eine wichtige Rolle spielt.

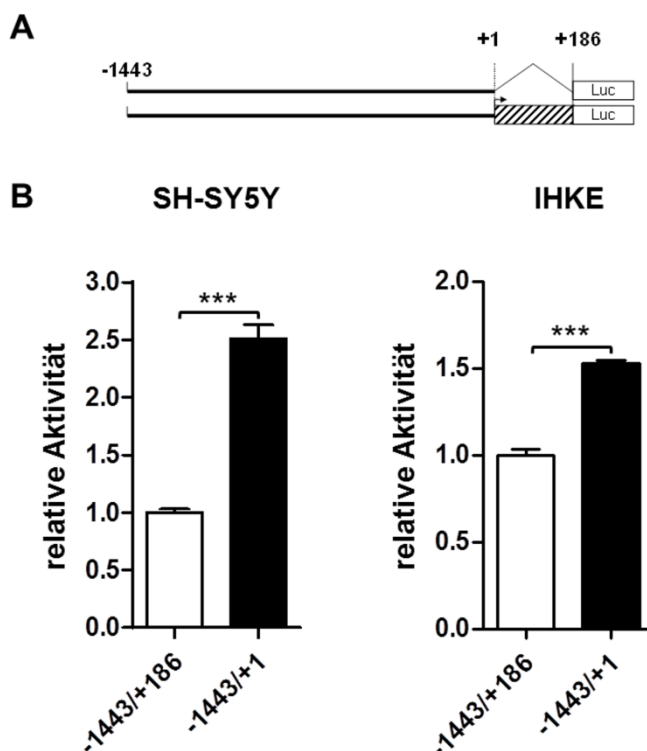


Abb. 15: Effekt der 5'-UTR auf die Transkriptionsaktivität des *KIBRA*-Promotors

A) Schematische Darstellung des Deletionskonstrukts ohne 5'-UTR, basierend auf dem Volllängenkonstrukt -1443/+186. **B)** In den SH-SY5Y-Zellen führte das Entfernen der 5'-UTR zu einem signifikanten ~2,5-fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität im Vergleich zum Volllängenkonstrukt. In den IHKE-Zellen stieg die Transkriptionsaktivität des trunkierten Deletionskonstrukts um das ~1,5-fache. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. *** $p < 0,001$.

4.3. Identifizierung genetischer Varianten im *KIBRA*-Promotorbereich P1

Genetische Varianten von *KIBRA* lokalisiert wurden bereits mehrfach mit Gedächtnisleistung, Wahrnehmung (Almeida et al., 2008; Bates et al., 2009; Nacmias et al., 2008; Papassotiropoulos et al., 2006; Scharper et al., 2008; Wersching et al., 2011) und der spät einsetzenden Alzheimer-Krankheit assoziiert (Burgess et al., 2011; Corneveaux et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Zur Identifizierung von genetischen Varianten im Promotorbereich P1 wurden insgesamt 2705 bp der 5'-flankierenden Region von *KIBRA* in 56 Patienten der MolProMD-Studie mittels Amplifizierung und Resequenzierung untersucht. Die Größe der Kohorte erlaubte eine Detektionsrate von >90% von minoren Allelen mit einer Allelhäufigkeit von 1% (Kruglyak & Nickerson 2001). Durch die Analyse konnten fünf bereits bekannte SNPs (G-2416C [rs10051069], G-1929A [rs12108717], T-1358G [rs1047587], T-1032A [rs72838318], T-580C [rs1265526]) verifiziert und zwei bisher noch nicht beschriebene SNPs (A-282C, C-1691T) identifiziert werden (Abb. 16). Mit Hilfe des Programms Haploview 4.2. (Barrett et al., 2005) konnte gezeigt werden, dass vier der bereits bekannten SNPs, G-2416C [rs10051069], G-1929A [rs12108717], T-1358G [rs1047587] und T-1032A [rs72838318], in einem kompletten Kopplungsungleichgewicht vorlagen (Abb. 16). Dies bedeutet, dass die minoren Allele dieser SNPs in der untersuchten Kohorte immer in Kombination miteinander vererbt werden und bildet somit einen molekularen Haplotyp ($C^{-2416}-A^{-1929}-G^{-1358}-A^{-1032}$).

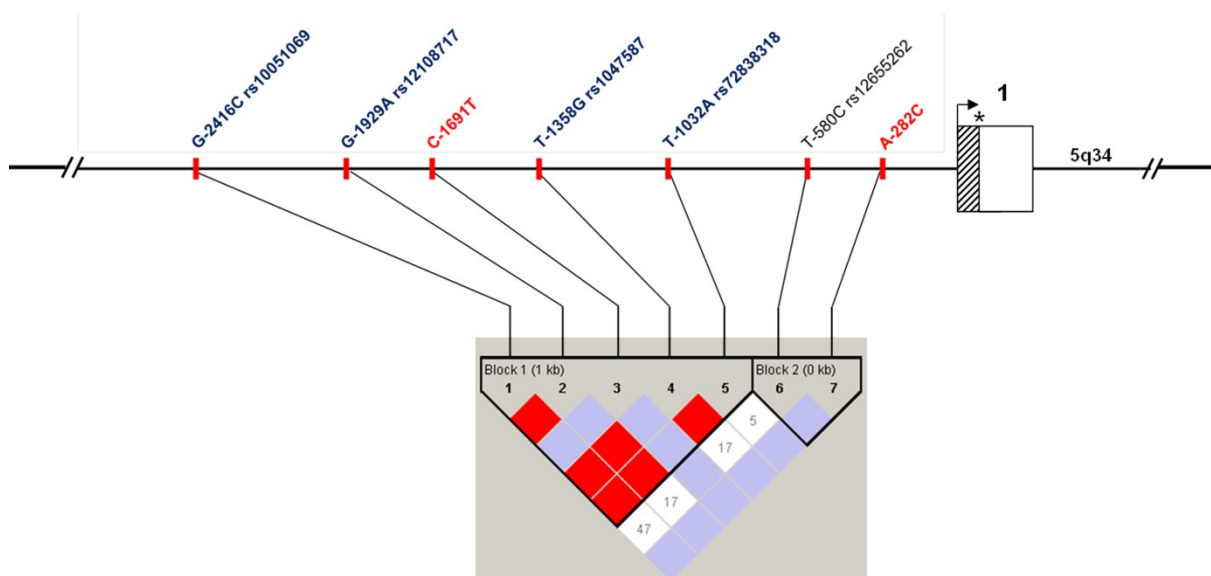


Abb. 16: Genetische Varianten in der 5'-flankierenden Region von *KIBRA*

In 2705 bp der 5'-flankierenden Region von *KIBRA* konnten insgesamt sieben SNPs identifiziert werden. Zwei der SNPs, A-282C und C-1691T, wurden bisher nicht beschrieben (rot markiert). Die genetischen Varianten, G-2416C [rs10051069], G-1929A [rs12108717], T-1358G [rs1047587] und

4. Ergebnisse

T-1032A [rs72838318] (blau markiert) lagen in einem kompletten Kopplungsungleichgewicht (rote Kästchen). Verwendet wurde das Haploview (Haploview 4.2.)-Standardfarbschema D'/LOD (*level of detail*): jede Diagonale repräsentiert den darüber liegenden SNP, jedes Kästchen einen paarweisen Vergleich der SNPs untereinander. Rote Kästchen stehen für eine statistische signifikante Assoziation der jeweiligen Allele (LOD>2). Weiße Kästchen zeigen an, dass kein statistisch signifikantes Kopplungsungleichgewicht vorliegt (D'<1).

Der putative Einfluss der Allele auf die Assemblierung von Transkriptionsfaktoren an den einzelnen Positionen wurde mittels *in silico* Analyse durch die Verwendung der Programme Alibaba 2.1 und PROMO 3.0.2 sowie der diesen Programmen zugrunde liegenden Datenbank TRANSFAC (Version 7 bzw. 8.3) untersucht (Grabe, 2002; Messeguer et al., 2002). Dabei zeigte sich an der Position T-580C in Anwesenheit des minoren C-Allels ein verändertes Transkriptionsfaktorbindungsmuster (Abb. 17). Die Bindestelle für den nukleären Faktor kappa B (NF-κB) geht bei Anwesenheit des minoren C-Allels verloren. Gleichzeitig entstehen zwei Bindestellen, eine Bindestelle der *activating transcription factor/cyclic AMP response element binding protein* (ATF/CREB)-Transkriptionsfaktorfamilie (CPE_bind) und eine *early growth response 1* (Egr1)-Bindestelle. Die beiden SP1-Bindestellen blieben hingegen unverändert.

```
gacgcaggtgaggggcggtctctccttccctggcaggggcagcgttaagggtggccggcg
=====Sp1=====
          =====Sp1=====
          =CPE bind=
                =====Sp1=====
                ===Egr-1===
                =NF-kappaB
                                =====Sp1=====
                                =AP-2alp
```

Abb. 17: *In silico* Analyse der Transkriptionsfaktorassemblierung an Position -580

Das minore C-Allel an Position -580 führte zu einem veränderten Transkriptionsfaktorbindungsmuster. Die Bindestelle für den nukleären Faktor kappa B (NF-κB) geht verloren (blau) und die Bindestelle CPE_bind Bindestelle der *activating transcription factor/cyclic AMP response element binding protein* (ATF/CREB)-Transkriptionsfaktorfamilie sowie die *early growth response 1* (Egr1)-Bindestelle werden durch das minore C-Allel neu generiert. Alibaba 2.1.: Standardeinstellung

4.3.1. Einfluss der identifizierten genetischen Varianten auf die P1-Transkriptionsaktivität

Das minore Allel der einzelnen SNPs wurde mittels zielgerichteter Mutagenese in die entsprechenden Promotordeletionskonstrukte eingebracht und der Einfluss auf die Transkriptionsaktivität im Reporterassay in den IHKE- und SH-SY5Y-Zellen überprüft. Die Insertion des C-Allels an Position -282 des Deletionskonstrukts -361/+186 führte in den IHKE-Zellen zu einer leichten, dennoch signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität ($p=0,025$; Abb. 18), hatte jedoch keinen Effekt auf die Transkriptionsaktivität in den SH-SY5Y-Zellen. Im Gegensatz dazu führte die Insertion des C-Allels an Position -580 in Konstrukt -730/+186 zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität in den IHKE-Zellen ($p=0,0109$; Abb. 18) und zu einer signifikanten Zunahme der Transkriptionsaktivität in den SH-SY5Y-Zellen ($p=0,0025$; Abb. 18), was erneut auf eine zelltypspezifische Nutzung des Promotorbereichs P1a schließen lässt. In beiden Zelllinien führte die Insertion des T-Allels an Position -1691 in Konstrukt -2006/+186 zu einer signifikanten Zunahme der Transkriptionsaktivität ($p_{\text{IHKE}}=0,0003$; $p_{\text{SH-SY5Y}}=0,0014$; Abb. 18).

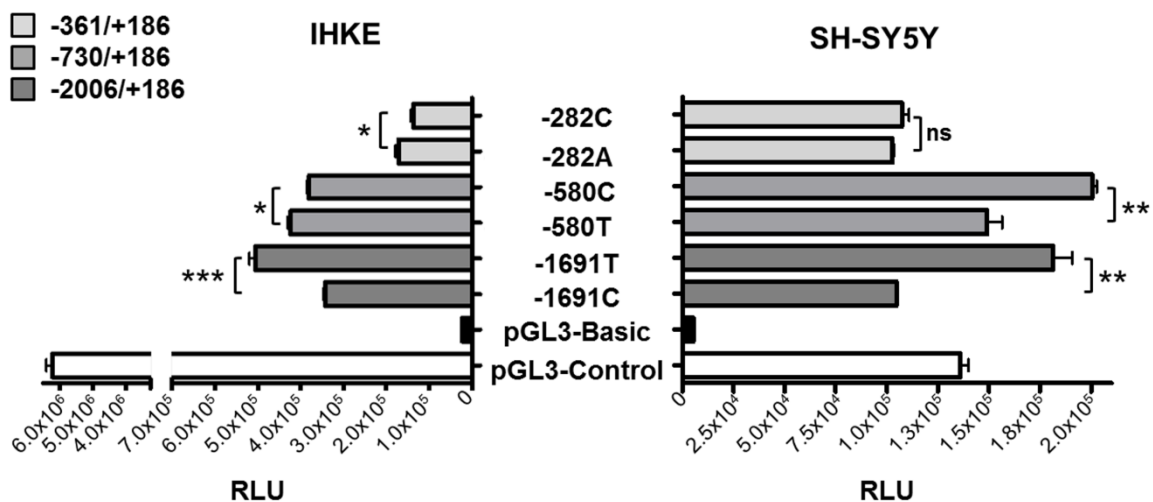


Abb. 18: Einfluss der genetischen Varianten auf die Transkriptionsaktivität von P1

Das Einbringen des T-Alleles an Position -1691 in Promotordeletionkonstrukt -2006/+186 führte zu einer Zunahme der Transkriptionsaktivität in beiden Zelllinien. Die Insertion des -580C Alleles führte in den SH-SY5Y-Zellen zu einem signifikanten Anstieg und in den IHKE-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität. In IHKE-Zellen führte die Insertion des C-Alleles an Position -282 in Konstrukt -361/+186 zu einer leichten Abnahme der Transkriptionsaktivität, hatte jedoch keinen Effekt auf die Aktivität des Konstrukts in den SH-SY5Y-Zellen. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken

repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001; **<0,01; *<0,05; ns=nicht signifikant. RLU=*relative light unit*.

4.3.2. Analyse der molekularen Haplotypen

Für die Analyse der molekularen Haplotypen wurden die minoren Allele der vier gekoppelten SNPs, G-2416C [rs10051069], G-1929A [rs12108717], T-1358G [rs1047587] und T-1032A [rs72838318], gemeinsam mittels Mutagenese in das Deletionskonstrukt -2507/+186 eingebracht. Die minoren Allele der vier gekoppelten SNPs bildeten den molekularen Haplotypen 2 (MolHap2: C⁻²⁴¹⁶-A⁻¹⁹²⁹-G⁻¹³⁵⁸-A⁻¹⁰³²). Im Reporteragenassay wies MolHap2 in den neuronalen SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zum molekularen Haplotypen 1 (MolHap1: G⁻²⁴¹⁶-G⁻¹⁹²⁹-T⁻¹³⁵⁸-T⁻¹⁰³²) eine signifikant gesteigerte Transkriptionsaktivität auf (Abb. 19). In den IHKE-Zellen war die Transkriptionsaktivität von MolHap2 im Vergleich zu MolHap1 leicht, aber nicht signifikant, erhöht (Abb. 19).

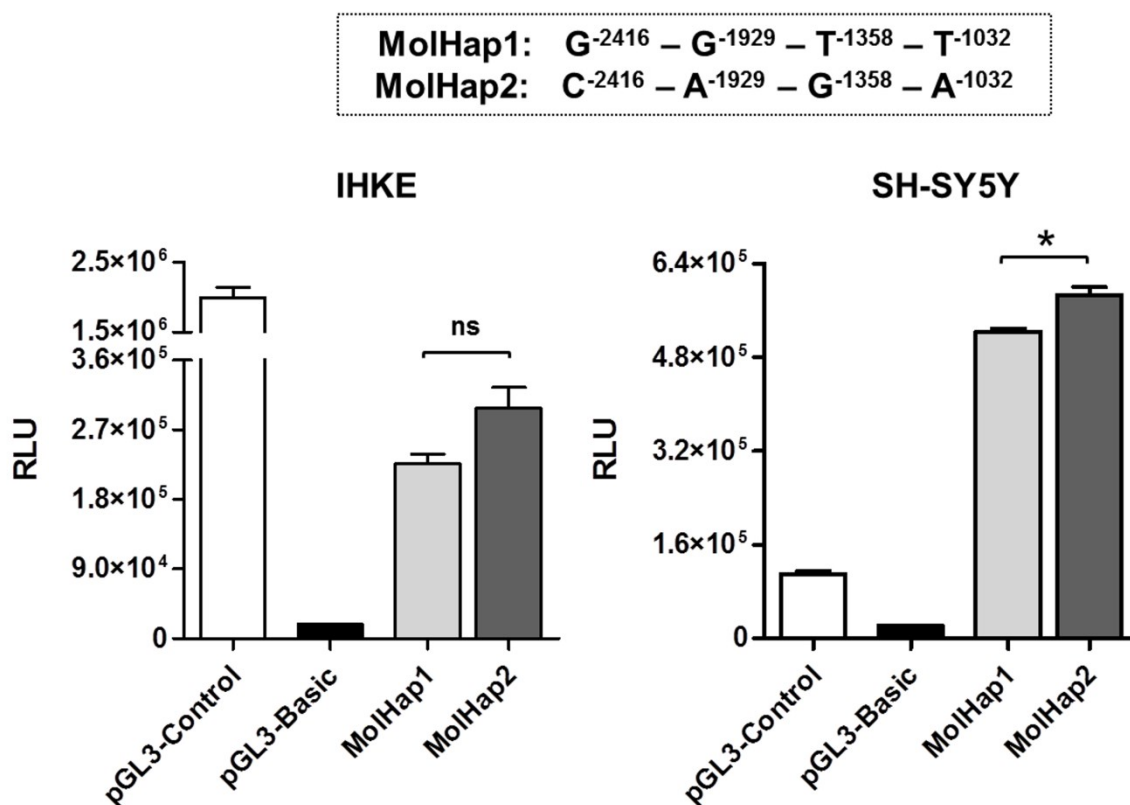


Abb. 19: Die Transkriptionsaktivität von MolHap1 und MolHap2 im Vergleich

In den SH-SY5Y-Zellen war die Transkriptionsaktivität von MolHap2 im Reporteragenassay signifikant gesteigert im Vergleich zu MolHap1. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken

SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. * $<0,05$. RLU=*relative light unit*.

4.4. Identifizierung von TCF7L2-Bindestellen in den *KIBRA*-Promotoren P1a und P2

Mit Hinblick auf *KIBRA* als Mitglied des Hippo-Signalwegs wurde eine *regulatory sequence pathway analysis* mit den beiden intronischen Promotoren, P2 und P3, sowie mit dem Promotorbereich P1 durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Zhao et al. (Zhao et al., 2010) demonstrierte mittels *ChIP-on-chip*-Analyse, dass die Expression mehrere Mitglieder des Hippo-Signalwegs durch den Transkriptionsfaktor TCF7L2 reguliert wird. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs (Zhao et al., 2010).

Für die Analyse der Bindestellen im *KIBRA*-Promotor wurden die regulatorischen Bereiche der Mitglieder des Hippo-Signalwegs *YAP1*, *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 (YES1)* und *TEAD1* den regulatorischen Bereichen von *KIBRA* gegenübergestellt. Die postulierten TCF7L2-Konsensussequenzen in den regulatorischen Bereichen von *YAP1*, *YES1* und *TEAD1* (Zhao et al., 2010) wurden dazu mittels PROMO 3.0.2 identifiziert und mit den Promotorsequenzen von *KIBRA* verglichen (*matrix dissimilarity rate* [MDR]: $<6\%$, humane Transkriptionsfaktoren, humane Transkriptionsfaktorbindestellen, *all query expectation values* [QEV] <0.6 ; Messeguer et al., 2002). Um ein falsch-positives Ergebnis auszuschließen, wurden die regulatorischen Bereiche von drei weiteren Genen in die Analyse eingeschlossen, die in der *ChIP-on-chip*-Analyse von Zhao et al. (Zhao et al., 2010) ebenfalls vertreten waren. Für die Regulation dieser Gene durch TCF7L2 existieren funktionelle Daten (Brabletz et al., 1999; He et al., 1998; Tetsu & McCormick 1999). Es handelt sich um die *matrix metalloproteinase 7 (MMP7)*, *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)* und *Cyclin D1 (CCND1)* bei denen die TCF7L2-Bindung experimentell bestätigt wurde. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte gezeigt werden, dass *KIBRA* über eine stark und zwei schwach konservierte TCF7L2-Bindestellen im Promotorbereich P1a sowie drei TCF7L2-Bindestellen im intronischen Promotorbereich P2 verfügt (Abb. 20)

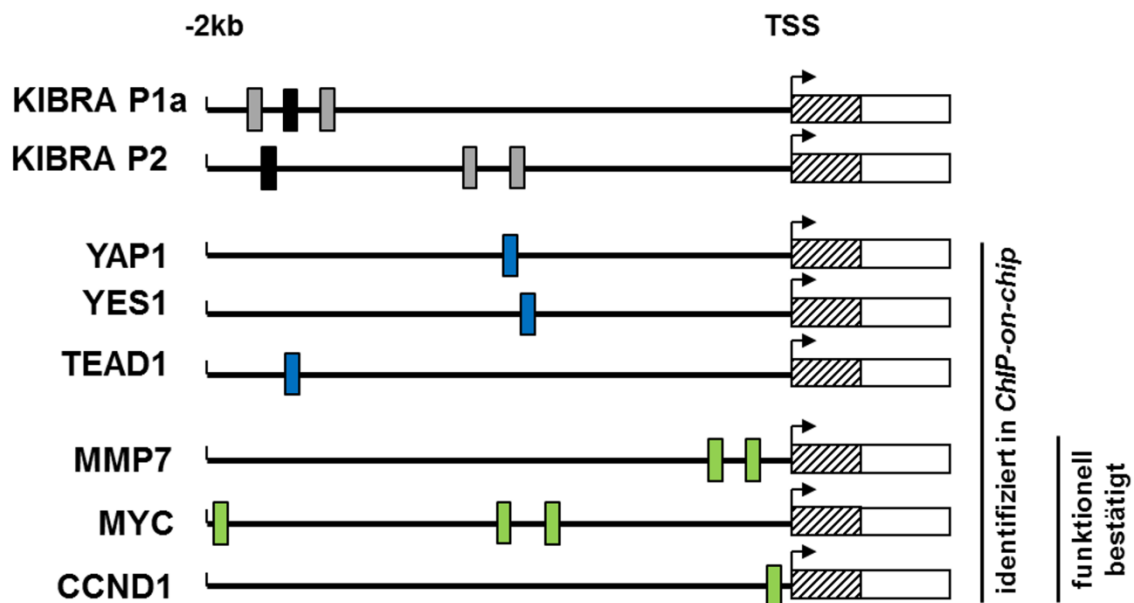


Abb. 20: TCF7L2-Bindestellen im *KIBRA*-Promotor P1a und P2

Schematische Darstellung der mittels *ChIP-on-chip*-Analyse (Zhao et al., 2010) identifizierten TCF7L2-Bindestellen in den ersten 2 kb der regulatorischen Bereiche von Mitgliedern des Hippo-Signalwegs: *YAP1*, *YES1* und *TEAD1* (blau) sowie der zusätzlich als funktionelle bestätigten Bindestellen der Gene *MMP7*, *MYC* und *CCND1* (grün). Die Sequenzen dieser Bindestellen wurden mit den ersten 2 kb der *KIBRA*-Promotoren verglichen. Dadurch konnte für *KIBRA* eine stark (schwarz) und zwei schwach (grau) konservierte TCF7L2-Bindestellen im Promotorbereich P1a und drei TCF7L2-Konsensussequenzen im intronischen Promotorbereich P2 identifiziert werden.

4.4.1. Regulation der *KIBRA*-Transkription durch TCF7L2

Um zu untersuchen ob TCF7L2 die Expression von *KIBRA* reguliert, wurde der Transkriptionsfaktor *in vitro* überexprimiert. Dazu wurden sowohl IHKE- als auch SH-SY5Y-Zellen gleichzeitig mit den seriellen Promotordeletionskonstrukten der einzelnen Promotorbereiche und dem TCF7L2-Überexpressionvektor transfiziert. In den IHKE-Zellen war bei dieser Kotransfektion eine signifikante, bis zu ~3,5-fache Steigerung der Transkriptionsaktivität (vs. Leervektorkontrolle) der Promotorbereiche P1a und P2 zu beobachten ($p < 0,001$; Abb. 21A). Auf die Transkriptionsaktivität von Promotor P1b hatte die Überexpression von TCF7L2 keinen Effekt. Der zweite intronische Promotor P3 reagierte mit einer leichten Steigerung der Transkriptionsaktivität auf die TCF7L2 Überexpression in den IHKE-Zellen (Abb. 21A). Im Gegensatz dazu führte in den SH-SY5Y die Kotransfektion mit TCF7L2 zu einer leichten Abnahme der Transkriptionsaktivität der Promotorbereiche P1b und P1a und hatte keinen Effekt auf die Intronpromotoren P2 und P3. Diese Daten unterstützen die *in silico* erzielten Ergebnisse und legen nahe, dass sich

Transkriptionsfaktorbindetstellen für TCF7L2 im Promotorbereich P1a und P2 befinden (Abb. 21B). In den renalen HPCT- und den neuronalen SK-NS-H-Zellen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Abb. A2).

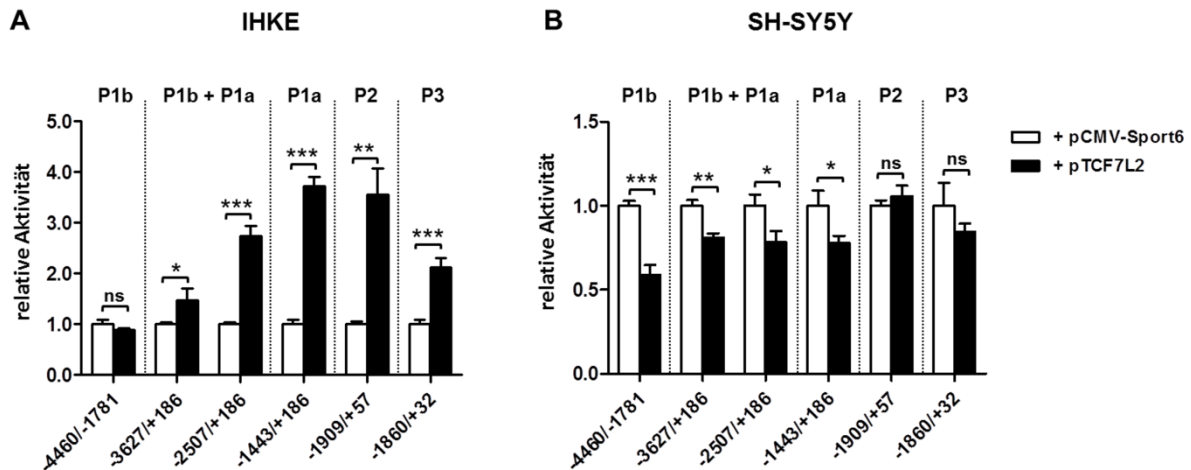


Abb. 21: Die TCF7L2-Überexpression führt in IHKE-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität

A) Die Überexpression von TCF7L2 führte in den IHKE-Zellen zu einer signifikanten, bis zu ~3,5-fache Steigerung der Transkriptionsaktivität verglichen mit der Leervektorkontrolle der Promotorbereiche P1a und P2. Auf die Transkriptionsaktivität von Promotor P1b hatte die Überexpression von TCF7L2 keinen Effekt. Durch die Überexpression von TCF7L2 stieg die Transkriptionsaktivität von Promotor P3 leicht an. **B)** In den SH-SY5Y führte die Überexpression von TCF7L2 zu einer leichten Abnahme der Transkriptionsaktivität der Promotorbereiche P1b und P1a, hatte aber keinen Effekt auf die Intronpromotoren P2 und P3. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001; **<0,01; *<0,05; ns=nicht signifikant.

4.4.2. Mutagenese der TCF7L2-Bindestellen in P1a

Zur Überprüfung der Funktionalität der im *KIBRA*-Promotorbereich P1a identifizierten TCF7L2-Bindestellen wurden diese an jeweils zwei Positionen mittels Mutagenese im Deletionskonstrukt -1443/+186 verändert (Abb. 22A). Im Reporterassay führte die Mutation der stark konservierten Bindestelle 2 zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität ($p_{B2}=0,0003$; $p_{B2+B3}=0,0004$) auf das Niveau der Leervektorkontrolle pGL3-Basic. Die Mutation der schwach konservierten Bindestellen 1 und 3 hatten keinen Effekt auf die Transkriptionsaktivität (Abb. 22B)

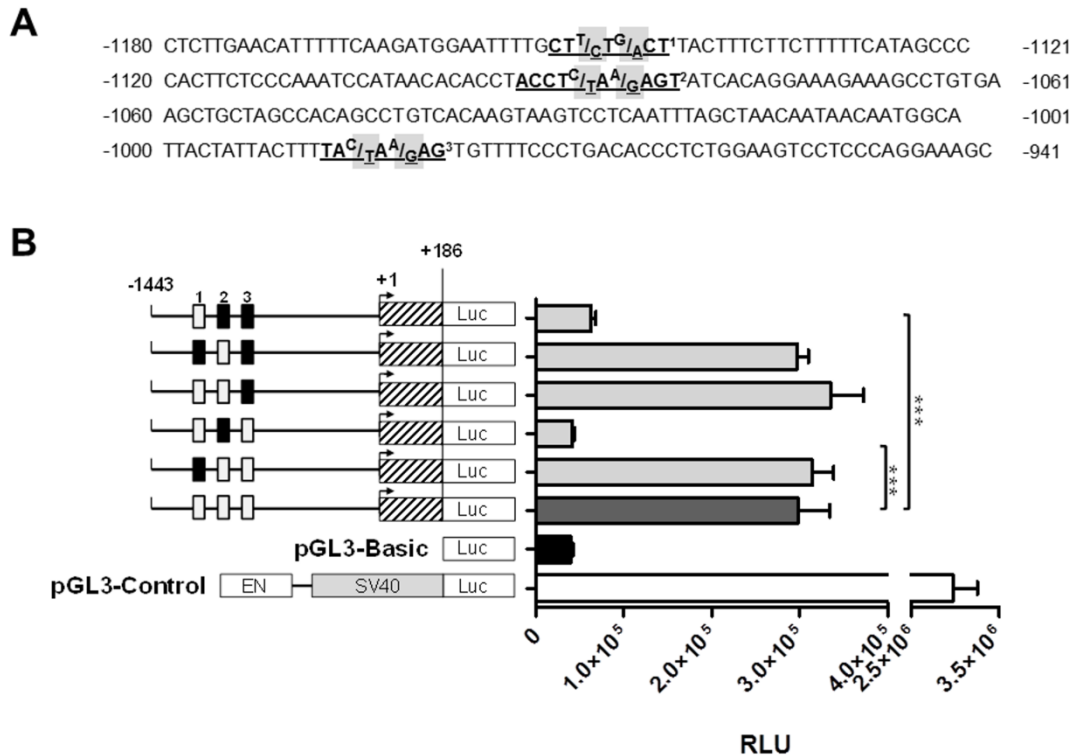


Abb. 22: Effekt der TCF7L2-Bindestellenmutagenese auf die Transkriptionsaktivität von P1a

A) Die im Promotor P1a identifizierten TCF7L2-Bindestellen wurden im Deletionskonstrukt -1443/+186 an jeweils zwei Positionen mutagenisiert (grau unterlegt). Die obere Base entspricht der wildtyp-Sequenz, darunter ist die eingebrachte Mutation dargestellt. **B)** In den IHKE-Zellen führte die Mutation der stark konservierten Bindestelle 2 allein, oder in Kombination mit der Bindestelle 3, zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität. Die separate Mutation der Bindestellen 1 und 3 hatte keinen Effekt auf die Transkriptionsaktivität. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001.

4.4.3. Nachweis der TCF7L2-Bindung an den *KIBRA*-Promotor P1a

Da sowohl die Überexpression von TCF7L2 als auch die Mutation der Bindestellen im *KIBRA*-Promotor P1a für eine Regulation der Expression durch den Transkriptionsfaktor sprechen, wurde die direkte Bindung an den Promotor mittels ChIP-Assay untersucht. Hierfür wurden Transkriptionsfaktoren zunächst *in vivo* an der DNA fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und die DNA sonifiziert. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen TCF7L2 wurden dann die DNA/Protein-Komplexe präzipitiert. Anschließend erfolgte der Nachweis des ausgewählten Promotorbereichs P1a mittels PCR (Abb. 23A). Als Negativkontrollen

4. Ergebnisse

dienten unbehandelte (Kontrolle 1) und mit Immuglobulin G (IgG, Kontrolle 2) inkubierte magnetische Protein G-*beads*. In den renalen IHKE-Zellen konnte eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors TCF7L2 an den *KIBRA*-Promotorbereich P1a bestätigt werden (Abb. 23B). Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor gewonnen Daten der Überexpressionsexperimente und der Mutation der Bindestellen.

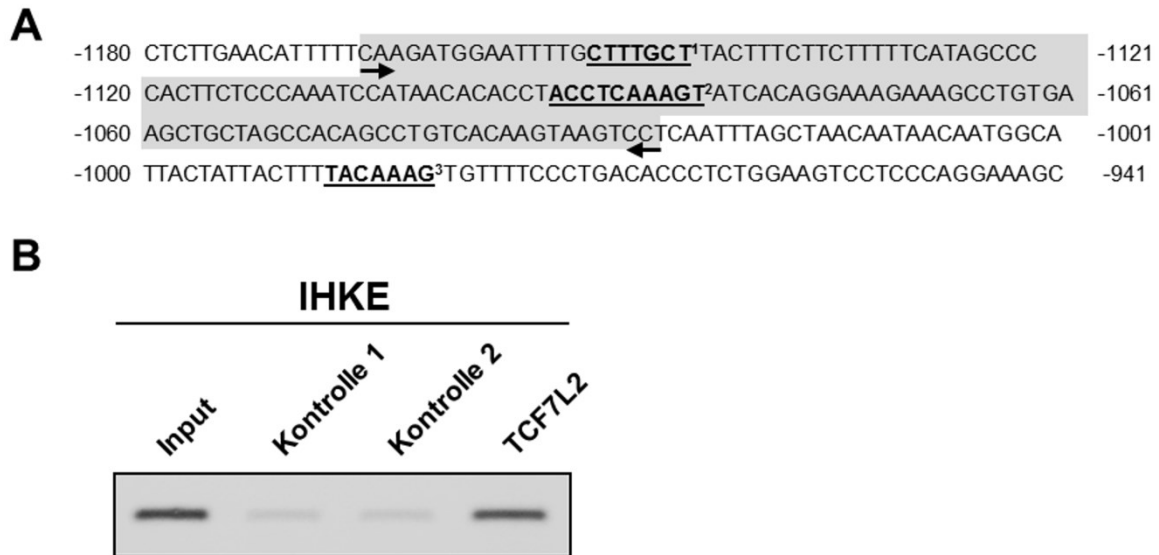


Abb. 23: TCF7L2 bindet an den *KIBRA*-Promotor P1a

A) Die Position der Oligonukleotide (Pfeile) für die ChIP-PCR mit funktionaler TCF7L2-Bindestelle 2.
B) In IHKE-Zellen bindet der Transkriptionsfaktor TCF7L2 an die im Promotorbereich P1a gelegene Konsensussequenz. Sonifizierte DNA ohne Antikörper diente als Positivkontrolle (Input). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte (Kontrolle 1) und mit Immunglobulin G (IgG, Kontrolle 2) behandelte magnetische Protein G *beads*. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

4.4.4. Regulation der *KIBRA*-Expression durch die Transkriptionsfaktoren TCF7L2, YAP1 und TEAD4

Die Arbeitsgruppe um Heallen et al. (Heallen et al., 2011) demonstrierte 2011, dass der Kofaktor YAP1, ein Schlüsselfaktor des Hippo-Signalwegs, zusammen mit β -Catenin an den TCF/LEF-Komplex im Zellkern bindet. Des Weiteren ist bekannt, dass YAP1 an der Regulation der *KIBRA*-Expression sowohl in *Drosophila*, als auch in der Maus und in humanen Zellen beteiligt ist (Genevet et al., 2010; Xiao et al., 2011). Mittels quantitativer RT-PCR und Western Blot-Analyse konnten die Arbeitsgruppen von Genevet (Genevet et al., 2010) und Xiao (Xiao et al., 2011) zeigen, dass bei YAP1-Überexpression sowohl die

KIBRA-Transkript- als auch die Proteinmenge zunimmt. Die direkte Interaktion von YAP1 mit dem *KIBRA*-Promotor wurde von beiden Arbeitsgruppen jedoch nicht untersucht. In Säugetierzellen reguliert der Hippo-Signalweg die Expression der Zielgene hauptsächlich mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren TEAD1-4, an die YAP1 als Kofaktor bindet (Goulev et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008; Chan et al., 2009; Peng et al., 2009; Zhang et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden im *KIBRA*-Promotor keine TEAD1-4-Bindestellen identifiziert, was sich mit den Ergebnissen Arbeitsgruppe Xiao et al. (Xiao et al., 2011) deckt. Um eine mögliche Regulation der *KIBRA*-Expression durch YAP1, TEAD1-4 in Interaktion mit TCF7L2 zu untersuchen wurden entsprechende Expressionsvektoren generiert. Im Reporterassay führte die Überexpression des Transkriptionsfaktor TEAD4 zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität aller *KIBRA*-Promotorbereiche im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Ausgenommen war der Intron-Promotor P3 ($p < 0,05$; Abb. 24A). Hier führte die TEAD4-Überexpression zu einer moderaten aber signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität ($p < 0,05$; Abb. 24A). Die Überexpression von YAP1 führte zu einer signifikanten bis ~2-fachen Steigerung der Transkriptionsaktivität aller Promotorbereiche im Vergleich zur Leervektorkontrolle ($p < 0,01$; Abb. 24B). Interessanterweise war ein synergistischer Effekt auf die Transkriptionsaktivität der Promotorbereiche P1, P1a und P2 zu beobachten, wenn alle drei Faktoren TCF7L2, TEAD4 und YAP1 gleichzeitig überexprimiert wurden. In diesem Experiment wurden äquimolare Mengen der Expressionsvektoren für TCF7L2, TEAD4 und YAP1 eingesetzt und die Kombination der drei Faktoren führte im Vergleich zur gleichen Menge Konstrukt in Kombination mit den entsprechenden Leervektoren zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität der Promotorbereiche P1 und P2 ($p < 0,05$; Abb. 24C).

4. Ergebnisse

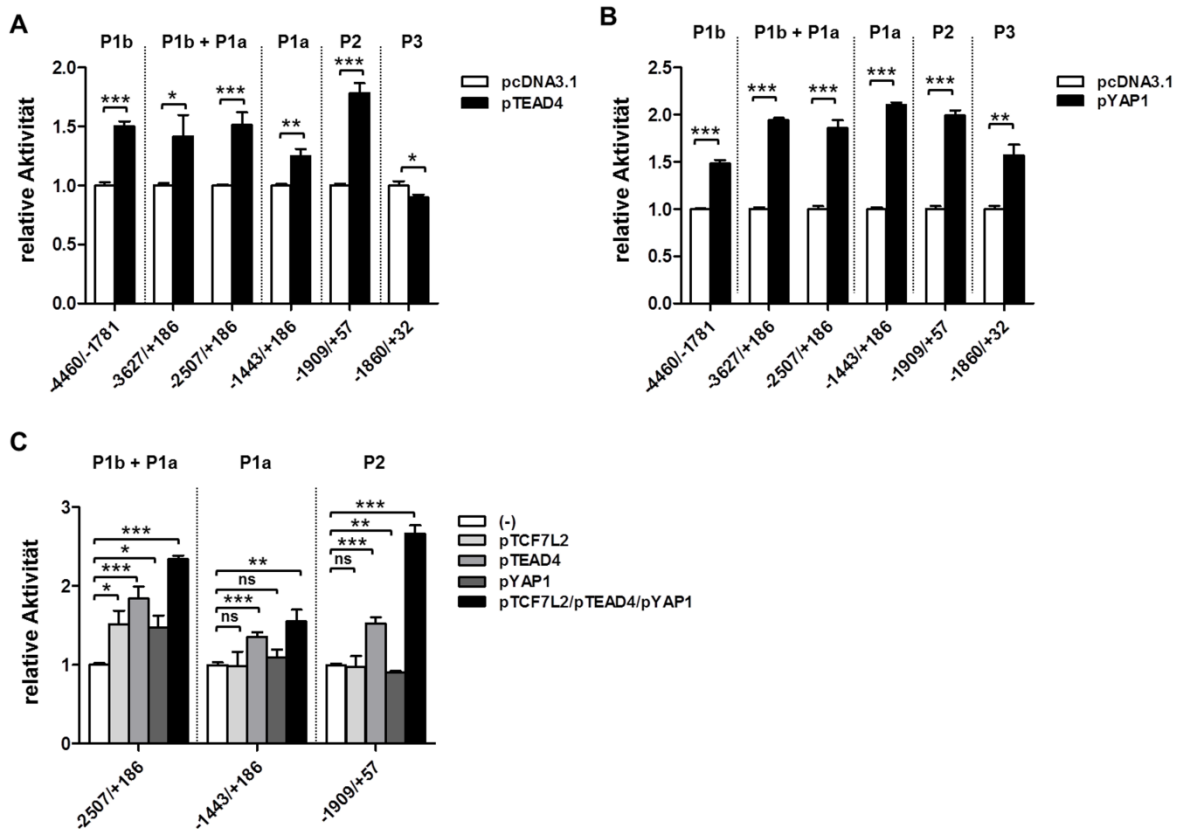


Abb. 24: YAP1 und TEAD4 sind an der Regulation der *KIBRA*-Expression in IHKE-Zellen beteiligt

A) Die Überexpression von TEAD4 führte zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität von P1b, P1, P1a und P2 im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Keine Steigerung der Transkriptionsaktivität war bei Intronpromotor P3 zu beobachten. **B)** Die Überexpression von YAP1 führte in den IHKE-Zellen zu einer Steigerung der Transkriptionsaktivität aller *KIBRA*-Promotorbereiche im Vergleich zur Leervektorkontrolle. **C)** Die kombinierte Überexpression der drei Faktoren, TCF7L2, TEAD4 und YAP1, hatte einen synergistischen Effekt auf die Transkriptionsaktivität der Promotorbereiche P1 und P2. Die Transkriptionsaktivität war um das ~2,5-fache erhöht im Vergleich zu den Leervektorkontrollen. Es wurden äquimolare Mengen der Expressionsvektoren für TCF7L2, TEAD4 und YAP1 oder der entsprechenden Leervektoren eingesetzt. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001; **<0,01; *<0,05; ns=nicht signifikant.

4.5. Identifizierung von CpG-Inseln im *KIBRA*-Promotor

In genregulatorischen Regionen sind häufig sogenannte CpG-Inseln lokalisiert, die durch unterschiedliche Methylierungsgrade Einfluss auf die Regulation der Transkription nehmen können (Bird, 1986). Sie stellen DNA-Regionen von ≥ 200 bp mit einem GC-Anteil von $>50\%$ und einem Verhältnis von beobachteten zu statistisch erwarteten CpG-Dinukleotiden (CpG_{Obs}/CpG_{Exp}) von $\geq 0,6$ dar (Kim et al., 2009). Durch das Programm *CpG island searcher* (Version 10/29/04, <http://cpgislands.usc.edu/>; Takai & Jones, 2002; Takai & Jones, 2003) wurden zwei CpG-Inseln, mit einer Größe von 205 bp (CpG-Insel 2, CpG2) bzw. 764 bp (CpG-Insel 1, CpG1), in der 5'-flankierten Region von *KIBRA* identifiziert. Die Lage der beiden CpG-Inseln stimmt mit den im Reporterassay identifizierten alternativen Promotorbereichen P1b (CpG 2) und dem konstitutiven Promotor P1a (CpG1) überein (Abb. 25).

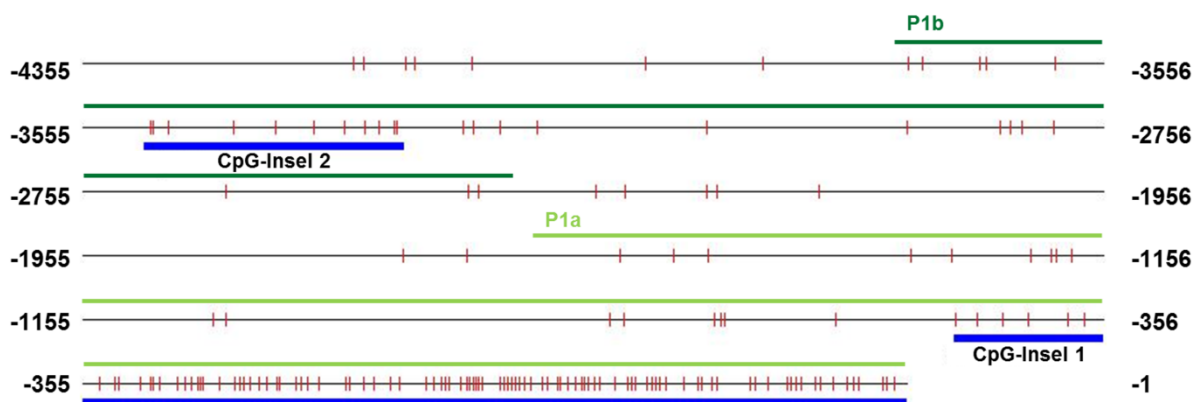


Abb. 25: *KIBRA*-CpG-Inseln sind im Promotorbereich P1a und P1b lokalisiert

Im Promotor P1 konnten durch die Verwendung des Programms *CpG Island searcher* zwei CpG-Inseln mit einer Länge von 205 bp bzw. 764 bp identifiziert werden. Beide CpG-Inseln waren in den zuvor im Reporterassay identifizierten alternativen Promotorbereichen P1b (dunkelgrün) und P1a (hellgrün) lokalisiert. Gewählte Parameter: GC=55%; $CpG_{Obs}/CpG_{Exp}=0,65$; Länge ≥ 200 bp; Abstand=100 bp.

4.6. Effekt von Promotormethylierung auf die Transkriptionsaktivität von P1

Ein hoher Methylierungsgrad von CpG-Insel-Promotoren korreliert meist mit stabiler Repression der Transkription der entsprechenden Gene (Deaton & Bird 2011; Vinson & Chatterjee 2012; Weber et al., 2007). Um zu ermitteln welchen Einfluss der Methylierungsgrad der *KIBRA*-Promotoren auf die Transkriptionsaktivität hat, wurden die identifizierten CpG-Inseln gezielt in den pCpGL-Basic Vektor (Klug & Rehli, 2006) kloniert. Bei dem pCpGL-Vektor handelt es sich wie beim pGL3-Basic-Vektor um einen promotorlosen Reportergenvektor, der ein Luziferase-Reportergen besitzt. Der pCpGL-Vektor zeichnet sich durch die Abwesenheit von CpG-Dinukleotide aus und kann somit nicht durch DNA-Methyltransferasen methyliert werden. Die generierten Promotordeletionskonstrukte P1aI und P1aII repräsentieren Teile der CpG-Insel 1 (Abb. 26). Das Konstrukt P1bI repräsentiert den proximalen Promotorbereich P1b mit der CpG-Insel 2. Das Promotordeletionskonstrukt P1bII ohne CpG-Insel 2 diente als Kontrollkonstrukt (Abb. 26).

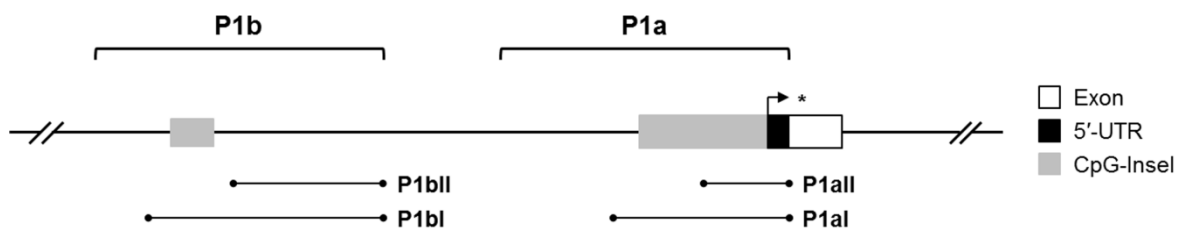


Abb. 26: Lage der Promotordeletionskonstrukte für die Methylierungsexperimente

Die generierten Promotordeletionskonstrukte P1aI und P1aII repräsentieren die CpG-Insel 1 im Promotorbereich P1a und das Promotordeletionskonstrukt P1bI den proximalen Promotorbereich P1b mit CpG-Insel 2. P1bII repräsentiert den Promotorbereich P1b ohne die CpG-Insel 2.

Die generierten Promotordeletionskonstrukte wurden *in vitro* mit Hilfe der SssI-Methyltransferase vollständig methyliert und anschließend in die beiden Zelllinien transfiziert. In den IHKE-Zellen führte die komplette Methylierung des Promotorbereichs P1a, repräsentiert durch die Konstrukte P1aI und P1aII, zu einer vollständigen Repression der Expression des Luziferase-Reportergens (Abb. 27A). Die Methylierung des Konstrukts P1bI hatte ebenfalls eine signifikante Abnahme der Transkriptionsaktivität zur Folge. Im Gegensatz dazu hatte die Methylierung mit SssI keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität des Promotordeletionskonstrukts P1bII, das einzige Konstrukt ohne CpG-Insel (Abb. 27A). In den neuronalen SH-SY5Y-Zellen waren die beiden generierten Promotordeletionskonstrukte P1bI und P1bII, welche den alternativen Promotorbereich P1b repräsentieren, unabhängig von ihrem Methylierungsstatus, transkriptionell inaktiv (Abb.

27B). Die Transkriptionsaktivität des Promotorbereichs P1a wurde, wie zuvor in den renalen IHKE-Zellen, durch die Methylierung mit Sssl reprimiert.

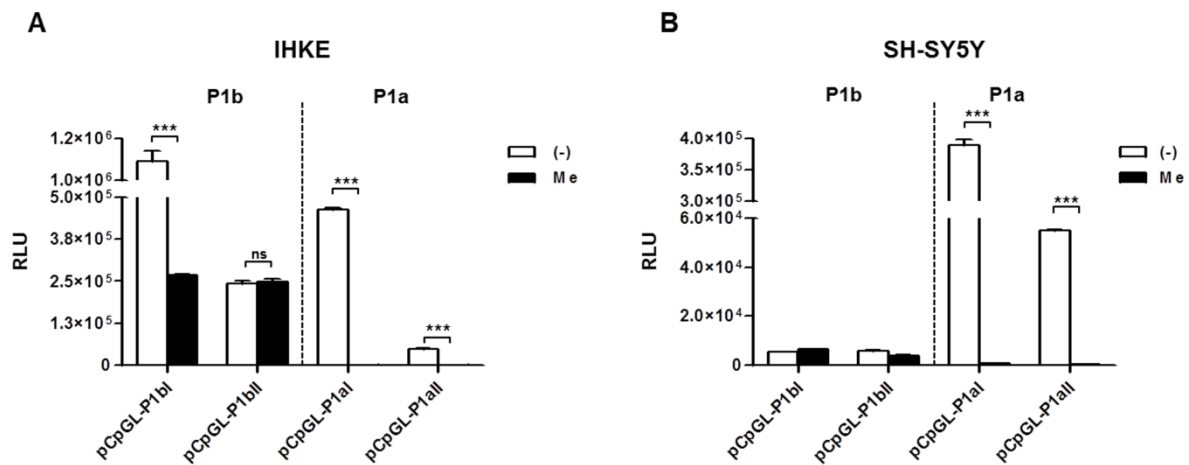


Abb. 27: Inaktivierung der KIBRA-Promotorbereiche P1a und P1b durch die vollständige Methylierung der CpG-Inseln

A) In den IHKE-Zellen führte die Methylierung der Promotordeletionskonstrukte P1aI und P1aII mit Sssl zu einer Repression der Transkription. Die Methylierung von P1bI führte zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität. Die Transkriptionsaktivität von P1bII war nicht beeinflusst von der Methylierung durch Sssl. **B)** In den SH-SY5Y-Zellen verfügten die beiden Promotordeletionskonstrukte P1bI und P1bII unabhängig vom Methylierungsstatus über keine Transkriptionsaktivität. Die Methylierung der Promotordeletionskonstrukte P1aI und P1aII mit Sssl führte wie in den IHKE-Zellen zu einer Repression der Transkription. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001.

Um *in vitro* ebenfalls ein partielles Methylierungsmuster nachzustellen, wurde die Methyltransferase *HpaII* verwendet. Diese DNA-Methyltransferase erkennt selektiv die Sequenz CCGG und methyliert nur die in diesem Motive befindlichen CpG-Dinukleotides. In den IHKE-Zellen hatte die partielle Methylierung des Promotorbereichs P1b keinen Effekt auf dessen Transkriptionsaktivität. Im Gegensatz dazu führte die partielle Methylierung des Promotorbereichs P1a mittels *HpaII* zur Inaktivierung der Konstrukte P1aI und P1aII (Abb. 28A). In SH-SY5Y-Zellen war das Promotordeletionskonstrukt P1bI wie schon in den anderen Experimenten, unabhängig von Methylierungsstatus, transkriptionell inaktiv (Abb. 28B). Interessanterweise war in den SH-SY5Y-Zellen nach der partiellen Methylierung für das Promotordeletionskonstrukt P1aI eine signifikante Steigerung der Transkriptionsaktivität zu beobachten ($p=0,001$; Abb. 28B). Dieses Ergebnis unterstützt die These der zelltypspezifischen Assemblierung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren in den IHKE- und SH-SY5Y-Zellen an den KIBRA-Promotoren.

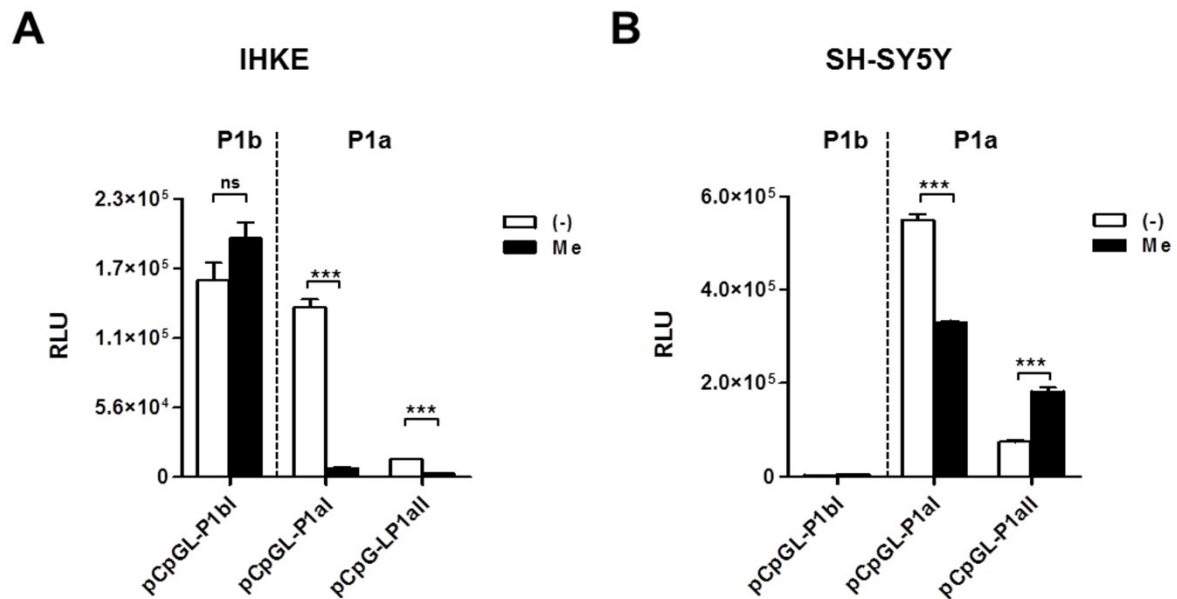


Abb. 28: Zelltypspezifischer Effekt auf die *KIBRA*-Transkriptionsaktivität durch partielle Methylierung der CpG-Inseln

A) In den IHKE-Zellen führte die partielle Methylierung der Promotordeletionskonstrukte P1al und P1all durch *Hpa*II zu einer Repression der Transkription. Die partielle Methylierung von P1bl hatte keinen Effekt auf die Transkriptionsaktivität. **B)** In den SH-SY5Y-Zellen war das Promotordeletionskonstrukt P1bl unabhängig vom Methylierungsstatus transkriptionell inaktiv. Die partielle Methylierung der Promotordeletionskonstrukte P1al und P1all durch *Hpa*II führte zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptionsaktivität von P1all und einer Abnahme bei P1al. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001.

4.7. *KIBRA*-Methylierungsmuster bei Nierenzellkarzinom

Um einen Anhaltspunkt für das zelltypspezifische Methylierungsmuster zu erhalten, wurde zunächst das Methylierungsmuster der identifizierten CpG-Inseln von *KIBRA* in IHKE- und SH-SY5Y-Zellen untersucht. Dazu wurde die genomische DNA der Zellen isoliert und einer Bisulfitkonvertierung unterzogen. Bei dieser Methode nutzt man das Prinzip der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von unmethylierter Cytosin zu Uracil. Die bisulfitkonvertierte DNA wird mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Das Resultat ist die genaue Information über den Methylierungsstatus aller Cytosine der Sequenz. Dabei konnte beobachtet werden, dass die CpG1 sowohl in den IHKE- als auch in den SH-SY5Y-Zellen frei von Methylierung war. Im Gegensatz dazu war die CpG2 in den neuronalen SH-SY5Y-Zellen vollständig methyliert. Die CpG2 war in den untersuchten renalen IHKE-Zellen frei von Methylierung.

Anschließend wurde das *KIBRA*-Methylierungsmuster in makroskopisch gesundem humanem Nierengewebe von acht Patienten mit unterschiedlichen Nierenzellkarzinom-Subtypen (klarzelliges, papilläres und chromophobes Nierenzellkarzinom) untersucht. Dazu wurde zuerst die genomische DNA aus den Gewebeproben isoliert und bisulfitkonvertiert. Da es sich bei Nierengewebe im Gegensatz zu den Zelllinien um eine Mischung unterschiedlicher Zelltypen und nicht um Zellklone handelt, die jeweils einen anderen Methylierungsstatus aufweisen können, wurde die bisulfitkonvertierte DNA im Anschluss an die PCR subkloniert. Nach der Transformation der erzeugten Vektoren wurde die Plasmid-DNA von jeweils fünf Klonen pro Proband und CpG-Inselle sequenziert (n=40). Diese Methode ermöglicht die Analyse des *KIBRA*-Methylierungsmusters einzelner Nierenzellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die 15 CpG-Dinukleotide der zweiten CpG-Inselle im Nierengewebe der Patienten, im Gegensatz zu dem zuvor detektierten Muster der renalen IHKE-Zellen, meist methyliert vorlagen. Der Methylierungsstatus der CpG2 lag bei 42-100% (Abb. 29).

Im Gegensatz zur CpG2 waren die 63 CpG-Dinukleotide der CpG1 im Nierengewebe der Patienten, wie schon zuvor in den IHKE-Zellen, meist unmethyliert. Der Methylierungsstatus der CpG1 lag bei 0-10%. Interessanterweise waren drei Bereiche in CpG1 in allen untersuchten Proben frei von Methylierung (Abb. 29).

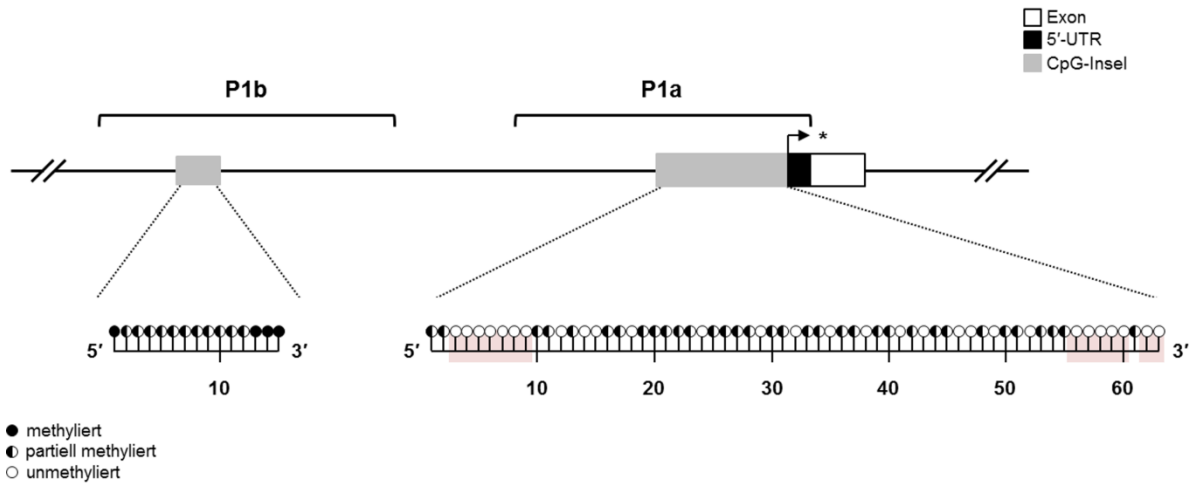


Abb. 29: KIBRA-Methylierungsstatus im Nierengewebe

Aus Gewebe von 8 Patienten mit unterschiedlichen Nierenzellkarzinom-Subtypen (klarzellig, papillär und chromophob) wurde genomische DNA isoliert, bisulfitkonvertiert und subkloniert. Insgesamt 40 Proben (5 pro Patient und CpG-Insel) wurden sequenziert und das Methylierungsmuster analysiert. CpG2 im Promotor P1b lag in den Patientenproben zu 42-100% methylert vor. CpG1 im Promotor P1a war in den Patientenproben mit einen Methylierungsgrad von 0-10% nur schwach methylert. Drei Regionen in P1a lagen frei von Methylierung vor (hell rot markiert).

5. Diskussion

KIBRA (WWC1) ist ein zytoplasmatisches Gerüstprotein mit konstitutiver Expression in Hirn- und Nierengewebe (Kremerskothen et al., 2003). Schon mehrfach wurde der *KIBRA*-Genlocus mit Gedächtnisleistung (Almeida et al., 2008; Bates et al., 2009; Nacmias et al., 2008; Papassotiropoulos et al., 2006; Scharper et al., 2008; Wersching et al., 2011) und der *late-onset* Alzheimer-Erkrankung assoziiert (Burgess et al., 2011; Corneveaux et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009). Die funktionelle Rolle von KIBRA in Neuronen ist bereits gut definiert. Zum Beispiel dient KIBRA der PKC ζ als Substrat, welche bei dem Prozess der Langzeitpotenzierung von Bedeutung ist (Büther et al., 2004). KIBRA bindet ebenfalls mittels der WW-Domänen an Dendrin und Synaptopodin. Diese beiden Proteine sind wichtige Organisatoren der postsynaptischen Zytoskelettes und spielen bei synaptischen Plastizität und der aktivitätsabhängigen Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung eine Rolle (Duning et al., 2008; Kremerskothen et al., 2006; Mundel et al., 1997).

KIBRA scheint zudem ein wichtiger Regulator des Hippo-Signalwegs zu sein (Baumgartner et al., 2010; Genevet & Tapon, 2011; Xiao et al., 2011; Yu et al., 2010). Dieser Signalweg wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifiziert und ist an der Kontrolle der Organgröße, der Zellregeneration und auch an apoptotischen Prozessen beteiligt (Boggiano & Fehon, 2012; Lapi et al., 2008; Liu et al., 2012). Eine Dysregulation des Hippo-Signalwegs bzw. der Komponenten dieses Signalwegs, KIBRA eingeschlossen, wurde wiederholt bei pathophysiologischen Prozessen wie der Krebsentstehung beschrieben (Dong et al., 2007; Hill et al., 2011; Lei et al., 2008; Shinawi et al., 2012; Steinhardt et al., 2008; Zhao et al., 2007; Zhao et al., 2008b). Erst kürzlich detektierte die Arbeitsgruppe um Moleirinho et al. (Moleirinho et al., 2012) eine verringerte *KIBRA*-Expression in Brustkrebstumoren des *Claudin-low*-Subtypes. KIBRA scheint somit eine wichtige Rolle bei diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu spielen. Bislang gibt es neben diesen funktionellen Daten jedoch keine Untersuchungen zur Genstruktur sowie der gewebespezifischen oder epigenetischen Regulation der *KIBRA*-Expression. Die Daten dieser Arbeit geben somit zum ersten Mal einen detaillierten Einblick in die komplexe Regulation von *KIBRA*.

5.1. Die *KIBRA*-Expression basiert auf multiplen zelltypspezifischen TSS und einem komplexem Promotorsystem

Wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, besitzt die 5'-flankierende Region von *KIBRA* einen hohen CG-Gehalt und zählt somit zu den *broad-type*-Promotoren. Diesen Promotortyp zeichnet aus, dass mehrere TSS für die Genexpression alternativ genutzt werden und *Core*-Promotorelemente wie die TATA-Box fehlen (Smale & Kadonaga, 2003). Dabei erfolgt die Initiierung der Transkription in der 5'-flankierenden Region an Pyrimidin/Purin-Dinukleotiden, die eine vereinfachte Konsensussequenz des Initiatorelements darstellen (Carninci et al., 2006). Diese Verteilung von TSS über einen ausgedehnten 5'-flankierenden Bereich erfordert den partiellen Ausschluss von ATG-Startcodons stromabwärts vom TSS, da die Translation meist vom ersten Start-ATG ausgehend an der naszierenden mRNA erfolgt. Diese Bereiche in der 5'-flankierenden Region werden als „ATG-Wüste“ bezeichnet (Lee et al., 2005). Die 5'-flankierende Region von *KIBRA* weist ebenfalls das Phänomen einer solchen „ATG-Wüste“ in den ersten 600 bp stromabwärts von TSS1a auf.

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels RLM-RACE und Datenbankanalyse neben dem annotierten TSS an Position +1 (NM_015238.2) zum ersten mal vier weitere TSS nachgewiesen werden: TSS1b und TSS1c (Position -153 und -415) sowie die intronischen TSS2 und TSS3 (Position +3898 und +24561). TSS1b und TSS1c konnten sowohl in den beiden renalen als auch in den neuronalen Zelllinien detektiert werden. Die Initiierung der *KIBRA* Transkription erschien gleich stark an TSS1b und TSS1c zu erfolgen.

Die intronischen TSS2 und TSS3 markieren die Position zweier neuer alternativer Exons, 2a und 2b. Ein potentieller alternativer TLS mit einer entsprechenden „Kozak-Sequenz“ (Kozak, 1986) wurde in Exon 3 detektiert. Die intronischen TSS, TSS2 und TSS3 wurden ausschließlich in den beiden renalen Zelllinien detektiert, nicht aber in den neuronalen Zellen und sind somit zelltypspezifisch.

Die *KIBRA*-Transkripte, welche durch TSS1a, TSS1b und TSS1c initiiert werden, unterscheiden sich in der Länge ihrer 5'-UTR, kodieren aber wahrscheinlich alle für die gleiche Proteinisoform. Die 5'-UTR dient häufig als regulatorischer Bereich und enthält oft eine Vielzahl regulatorischer Elemente und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Translation (Barrett et al., 2012). Im Allgemeinen steht eine kurze 5'-UTR mit einem geringen GC-Gehalt und einer schwach ausgeprägten Sekundärstruktur für eine effiziente Translation (Kochetov et al., 1998). Im Gegensatz dazu haben Proteine mit geringer Translationsrate meist eine längere 5'-UTR mit höherem GC-Gehalt und einer stark ausgeprägten Sekundärstruktur (Pickering & Willis, 2005). Die Expression von Genen mit einer so ausgeprägten 5'-UTR erfolgt meist zelltyp- oder entwicklungspezifisch durch die Möglichkeit

der Assemblierung unterschiedlichster RNA-Bindeproteine (Barrett et al., 2012). Welchen Einfluss dabei die unterschiedlichen 5'-UTR-Längen der einzelnen Transkripte auf die Translation von KIBRA haben, muss in weiterführenden Experimenten ermittelt werden.

Der Einfluss der 5'-UTR auf die Transkriptionsaktivität der *KIBRA*-Promotordeletionskonstrukte im Reporterassay, in renalen und den neuronalen Zellen, wurde ebenfalls untersucht. Das Promotordeletionskonstrukt +1/+186 welches nur die 5'-UTR hatte im Reporterassay keine eigenständige Transkriptionsaktivität. In den neuronalen Zellen führte das Entfernen der 5'-UTR zu einem signifikanten Anstieg der Transkriptionsaktivität. Ein vergleichbarer Effekt war bei den renalen Zellen zu beobachten. Dieses Experiment zeigt, dass die 5'-UTR bei der Modulation der *KIBRA*-Transkription eine wichtige Rolle spielt.

In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz serieller Promotordeletionskonstrukte gezeigt werden, dass die Initiierung der Transkription an TSS1a, TSS1b und TSS1c durch den Promotor P1 reguliert wird. Dieser Promotorbereich setzt sich aus P1a und P1b zusammen, die durch einen ~1060 bp langen Region voneinander getrennt sind. Der isolierte P1b war nur in renalen Zelllinien ein eigenständiger Promoter. Im Gegensatz dazu besaß P1b in den neuronalen Zelllinien nur in Kombination mit dem *Core*-Promotor Transkriptionsaktivität.

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass annähernd 30-50% der humanen Gene und ungefähr 50% der Maus-Gene über multiple alternative Promotorsysteme verfügen (Carninci et al., 2006; Cooper et al., 2006; Kimura et al., 2006; Tan et al., 2006). Die Arbeitsgruppe von Kim et al. (Kim et al., 2005) z.B. identifizierte mittels *DNA-Microarray* 10567 aktive Promotoren in humanen Fibroblasten die zu 6763 bekannten Genen gehörten. Die Analyse zeigte, dass 24% der untersuchten Gene in Fibroblasten über multiple und aktive Promotoren verfügten. Diese Studien deuten darauf hin, dass eine Vielzahl an alternativen Promotoren existiert, deren Funktionalität und Einfluss auf die Ätiologie von Krankheiten noch weitestgehend unbekannt sind.

Vor diesem Hintergrund wurden die stromaufwärts gelegenen Regionen (P2, P3) der beiden neu identifizierten Exone 2a und 2b ebenfalls im Reporterassay auf ihre Transkriptionsaktivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle Deletionskonstrukte nur in den renalen Zelllinien über eine ausreichende Transkriptionsaktivität verfügten. P2 und P3 wurden, wie P1b, zelltypspezifisch alternativ genutzt.

Die Initiierung der Transkription an TSS2 und TSS3 ist potentiell geeignet um trunkierte KIBRA-Proteinisoformen ohne WW-Domänen zu generieren. Die KIBRA WW-Domänen sind essentiell für die Interaktion mit anderen Mitgliedern des Hippo-Signalwegs wie NF2/Merlin und LATS2. Eine intakte Interaktion resultiert in der Suppression der YAP1-Aktivität (Baumgartner et al., 2010; Genevet & Tapon, 2011; Xiao et al., 2011; Yu et al., 2010). Die Dysregulation des Hippo-Signalwegs, im Besonderen eine Fehlregulation von YAP1 oder der

Verlust von TAZ (YAP1-Ortholog) kann zur Entstehung von Zysten bei der polyzytischen Nierenerkrankung führen (Happé et al., 2011). Die funktionelle Bedeutung von trunkierten KIBRA-Proteinisoform im Hippo-Signalweg ist bis heute ungeklärt. Es scheint denkbar, dass trunkierte KIBRA-Proteinisoformen eine alternative Interaktion im Hippo-Signalweg ermöglichen und so die Signaltransduktion beeinflussen. Die Arbeitsgruppen Baumgartner (Baumgartner et al., 2010) und Xiao (Xiao et al., 2011) konnten nach Deletion der WW-Domänen keine Veränderung der KIBRA Protein/Protein-Interaktion zeigen, zumindest nicht unter den gewählten Versuchsbedingungen. Da die Transkripte von TSS2 und TSS3 in Nierengewebe vorhanden waren, nicht aber in den Nervenzelllinien und im Gehirn, könnte die trunkierte KIBRA-Proteinisoform im Nierengewebe oder bei der Nierenfunktion von entscheidender Bedeutung sein. Unsere Ergebnisse legen nahe, WW-Deletionsexperimente in renalen Zellen zu wiederholen.

Die beschriebenen Ergebnisse lassen sich zu einem Modell des komplexen alternativen *KIBRA*- Promotorsystems zusammenfassen, welches aus dem konstitutionellen Promotor P1a und den drei alternativen Promotoren P1b, P2 und P3 besteht (Abb. 30).

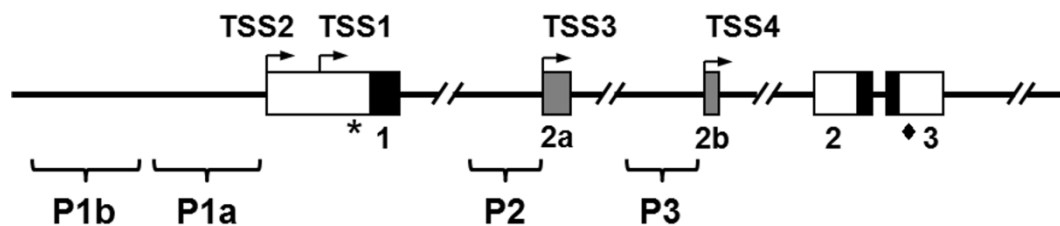


Abb. 30: Das *KIBRA*-Promotorsystem

Übersicht zur Lokalisierung der identifizierten *KIBRA*-Promoterregionen P1a, P1b, P2 sowie P3 und der dazu gehörigen TSS im Gen. Ein Stern kennzeichnet die Position des TLSs im ersten Exon, eine schwarze Raute den TLS in Exon 3. WW-Domänen (schwarze Kästchen): in Exon 1, 2 und 3.

5.2. Einfluss genetischer Varianten auf die Promotoraktivität

Die Regulation der eukaryotischen Transkription erfolgt über die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Konsensussequenzen in der Promotorregion des Gens. Diese Transkriptionsfaktorbindestellen können durch einen SNP verändert werden, sodass die Bindungsaffinität eines Transkriptionsfaktors beeinflusst, verhindert oder eine neue Bindestelle für einen anderen Faktor geschaffen wird (Schmitz et al., 2013). In der Folge kann sich die Zusammensetzung eines Transkriptionsfaktorkomplexes verändern, was wiederum die Transkriptionsaktivität des Promotors beeinflusst (Ponomarenko et al., 2002).

Die *in silico* Analyse der sieben identifizierten SNPs im *KIBRA*-Promotor P1 ergab für den SNP T-580C [rs1265526] ein verändertes Transkriptionsfaktorbindemuster. Dabei ging eine Bindestelle in Anwesenheit des minoren C-Allels verloren und zwei zusätzliche potentielle Bindestellen entstanden. Die für diesen Bereich vorhergesagten SP1-Bindestellen blieben erhalten.

SP1 bindet im Promotorbereich einer Vielzahl humaner Gene mit hoher Affinität an GC-Boxen und reguliert die konstitutive Expression von Genen mit TATA-Box freiem Promotor (Wierstra, 2008). Wie schon zuvor erwähnt hat die *KIBRA*-Promotorregion einen hohen GC-Gehalt und keine TATA-Box, somit ist die konstitutive Regulation durch SP1 wahrscheinlich. Daher wurde zusätzlich ein SP1-Expressionsvektor im Reporterassay getestet. Die Überexpression von SP1 führte zu einem ~6-fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität des Promotorbereichs P1a in renalen und neuronalen Zellen (Abb. A4), was für eine Regulation der konstitutiven *KIBRA*-Expression durch SP1 spricht.

SP1 kann an Bindestellen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie EGR1 und WT1, die ebenfalls GC-Boxen erkennen, konkurrieren (Silverman and Collins, 1999). Zusätzlich wird die Aktivität von SP1 noch über eine Reihe trans-aktivierender Elemente moduliert. So kann SP1 mit anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren wie SP3 und NF- κ B interagieren und je nach Interaktionspartner trans-aktivierend oder repressiv Einfluss auf die Expression nehmen (Safe & Abdelrahim, 2005; Wierstra, 2008). Auch wenn sich durch die Insertion des minoren -580C-Allels die vorhergesagten SP1-Bindestellen nicht direkt verändern, so hat der SNP womöglich Auswirkung auf die Bindung potentieller SP1-Interaktionspartner wie NF- κ B oder begünstigt die Bindung konkurrierender Transkriptionsfaktoren wie EGR1.

Im Reporterassay konnten für die renalen und neuronalen Zellen unterschiedliche Effekte auf die Transkriptionsaktivität nach Insertion des minoren C-Allels beobachtet werden. Etwa 60-89% aller regulatorischen SNPs sind zelltypspezifisch, und die Komplexität der regulatorischen SNPs korreliert mit der der Transkripte, was genotypspezifische Effekte auf die Wahl alternativer Transkripte einschließt (Dimas et al., 2009).

5.3. Regulation der *KIBRA*-Expression über Hippo- und Wnt-Signalweg

Als Regulator des Hippo-Signalwegs kann *KIBRA* sowohl bei der Kontrolle von Organgrößen als auch bei der Tumorgenese und der Entstehung polyzystischer Nierenerkrankungen eine Rolle spielen. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Imajo (Imajo et al., 2012) und Varelas (Varelas et al., 2010) deuten darauf hin, dass Komponenten des Hippo-Signalwegs die Signaltransduktion des Wnt-Signalwegs auf mehreren Ebenen inhibieren. Die Aktivierung der

Hippo-Signaltransduktion führt zur Phosphorylierung von YAP1 und verhindert dessen Translokation in den Zellkern. Im Zytoplasma interagiert das phosphorylierte YAP1 mit β -Catenin und verhindert dessen Translokation in den Zellkern (Imajo et al., 2011). Zusätzlich inhibiert YAP1 im Zytoplasma die Dvl-Phosphorylierung, was ebenfalls die Wnt-Signaltransduktion unterbricht (Varelas et al., 2010). Diese Studien zeigen, dass YAP1 abhängig von der Hippo-Signaltransduktion sowohl ein Wnt-Inhibitor als auch ein Wnt-Aktivator ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Hippo-Signalweg bei der Regulation des Wnt-Signalwegs und somit potentiell bei der Entwicklung und dem Verlauf von Erkrankungen, wie z.B. unterschiedlicher Malignome von Bedeutung ist (Barker & Clevers, 2006; Harvey & Tapon, 2007; Nusse, 2005; Zhao et al., 2010).

5.3.1. Regulation der *KIBRA*-Expression durch TCF7L2

Um mögliche Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, welche die *KIBRA*-Expression im Hippo-Signalwegs regulieren, wurde eine *regulatory sequence pathway analysis* mit den beiden intronischen Promotoren sowie dem Promotorbereich P1 durchgeführt. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte gezeigt werden, dass *KIBRA* über eine stark und zwei schwach konservierte TCF7L2-Bindestellen im Promotorbereich P1a sowie drei weitere Bindestellen im intronischen Promotorbereich P2 verfügt.

Interessanterweise wurde in der *ChIP-on-chip*-Analyse von Zhao et al. (Zhao et al., 2010) keine TCF7L2-Bindung in der 5'-Region von *KIBRA* identifiziert. Mit den hier vorliegenden Daten kann dies erklärt werden. Die *KIBRA*-Promotorstruktur war bis zu dieser Arbeit unbekannt und die alternativen *KIBRA*-Promotoren wurden somit in der *ChIP-on-chip*-Analyse nicht berücksichtigt. Außerdem legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass die TCF7L2-Bindung an den *KIBRA*-Promotor zelltypspezifisch ist. Die Überexpression von TCF7L2 führte in den renalen Zellen zu einer Aktivierung der Transkriptionsaktivität von P1a und P2. Im Gegensatz dazu hatte TCF7L2 in den neuronalen Zellen keinen Effekt.

Zusätzlich wurde die Funktionalität der einzelnen TCF7L2-Bindestellen im P1a mittels Mutagenese untersucht. Die Mutation der stark konservierten Bindestelle 2 identifizierte diese als funktionale Konsensussequenz. Zudem konnte eine direkte Interaktion von TCF7L2 mit diesem Promotorbereich im ChIP-Assay bestätigt werden. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Transkriptionsfaktor TCF7L2 als Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs an der Regulation der *KIBRA*-Transkription beteiligt ist und dadurch möglicherweise einen Einfluss auf die zelltypspezifische Hippo-Signaltransduktion hat. Interessanterweise wurde der *TCF7L2*-Genlocus wiederholt mit erhöhtem Mammakarzinom-Risiko assoziiert

(Burwinkel et al., 2006; Michailidou et al., 2013). Ebenso wurde kürzlich eine verringerte *KIBRA*-Expression in Mammakarzinomen des *Claudin-low*-Subtypes beschrieben (Moleirinho et al., 2012). Zukünftige Analysen müssen zeigen, inwiefern TCF7L2 funktionell an der Fehlregulation der *KIBRA*-Expression im Mammakarzinom beteiligt ist.

5.3.2. TCF7L2, YAP1 und TEAD4: ein Modul bei der *KIBRA*-Expressionsregulation

YAP1 ist ein Schlüsselfaktor des Hippo-Signalwegs und bindet zusammen mit β -Catenin, einem zentralen Signalmolekül des Wnt-Signalwegs, im Komplex an TCF/LEF-Bindestellen. Der Hippo-Signalweg reguliert die Expression seiner Zielgene hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren TEAD1-4, mit denen YAP1 als Kofaktor interagiert. Der *KIBRA*-Promotorbereich enthält, wie schon zuvor von der Arbeitsgruppe um Xiao et al. vermutet, keine Bindestellen für TEAD1-4. In dieser Arbeit konnte ein synergistisch-aktivierender Effekt von TCF7L2 in Kombination mit YAP1 und TEAD4 auf die Transkriptionsaktivität des *KIBRA*-Promotors P1 nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass TCF7L2 an die konservierten Bindestellen im P1-Promotor im Komplex mit β -Catenin, YAP1 und TEAD4 bindet, um die *KIBRA*-Expression zu regulieren. Dabei erfolgt die Interaktion über TCF7L2, da YAP1 über keine DNA-Bindemotive verfügt (Cao et al., 2008; Zhao et al., 2008a). In den letzten Jahren konnten durch *Microarray-Profiling* von Fibroblasten, Mammakarzinomzelllinien und Hepatozyten bereits eine Vielzahl von Zielgenen identifiziert werden, deren Transkription über den YAP1/TEAD-Komplex reguliert wird. Obwohl einige der Zielgene in den verschiedenen Zelltypen übereinstimmen, scheint der Großteil eher zelltypspezifisch zu sein (Dong et al., 2007; Hao et al., 2008; Lu et al., 2010; Overholtzer et al., 2006). Da YAP1 über eine Vielzahl von Interaktionspartnern verfügt (Levy et al., 2007; Strano et al., 2001, 2005; Vitolo et al., 2007), kann es über die Assemblierung mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren die zelltypspezifische Expression der Zielgene des Hippo-Signalwegs steuern.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit kann postuliert werden, dass TCF7L2 zusammen mit β -Catenin, TEADs und YAP1 einen Komplex am *KIBRA*-Promotor P1a bildet (Abb. 31). Zur Aufklärung der Struktur dieses Transkriptionsfaktorkomplexes könnte ein *Pull down* mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt werden. Diese Methode könnte auf die unterschiedlichen Zelllinien bzw. Gewebe angewandt ebenso weitere Einblicke in die zelltypspezifische Regulation der entsprechenden Promotorregionen bieten.

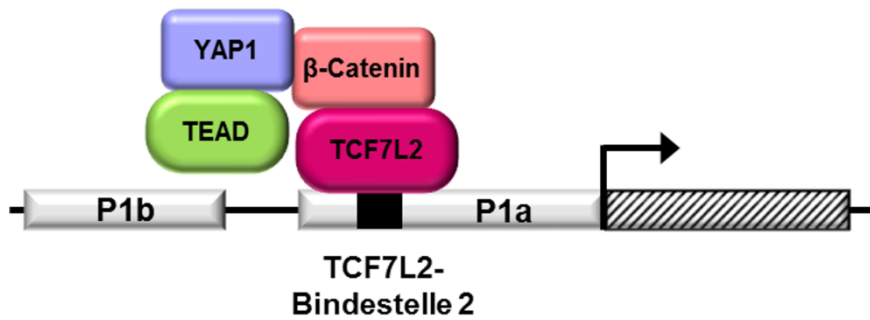


Abb. 31: Das TCF7L2/YAP1/TEAD-Modul am *KIBRA*-Promotor P1a

Hypothetisches Modell für die Interaktion von TCF7L2 im Komplex mit β-Catenin, YAP1 und TEAD an der Bindestelle 2 im *KIBRA*-Promotor P1a zur Initiierung der *KIBRA*-Transkription in Nierenzellen.

5.4. CpG-Inseln und Methylierung

CpG-Inseln befinden sich häufig in 5'-genregulatorischen Regionen von sogenannten *housekeeping*-Genen oder gewebespezifisch exprimierten Genen und erstrecken sich oft über die Promotorregion bis ins erste Exon, manchmal auch bis ins erste Intron des Gens (Plass, 2002). Diese CpG-Inseln können durch unterschiedliche Methylierungsgrade epigenetisch Einfluss auf die Regulation der Transkription nehmen und sind in gesunden Zellen meist unmethyliert (Bird, 1986). Die Hypermethylierung sonst unmethylierter CpG-Inseln von potentiellen Tumorsuppressorgenen sowie die parallel dazu auftretende globale Hypomethylierung von repetitiven Elementen in Satellitensequenzen oder von Regionen in den Centromeren der Chromosomen und Promotorregionen potentieller Onkogene sind bekannte epigenetische Veränderung, die zur Tumorgenese beitragen (Feinberg & Tycho, 2004; Plass, 2002).

Die Funktionen des Hippo-Signalwegs bei der Tumorunterdrückung wurden in gentechnisch veränderten Mausmodellen wiederholt demonstriert (Dong et al., 2007; Lei et al., 2008; Steinhardt et al., 2008; Zhao et al., 2007; Zhao et al., 2008b). Auch die Methylierung der Promotoren einzelner Mitglieder des Hippo-Signalwegs scheint bei der Tumorgenese eine Rolle zu spielen. So sind die *Lats1/2*-Promotoren beispielsweise bei ca. 50% der auftretenden Mammakarzinome und 60-70% der Astrozytome hypermethyliert (Jiang et al., 2006; Takahashi et al., 2005). Ebenfalls konnte eine Hypermethylierung des *Mst1*-Promotors bei ca. 37% und des *Mst2* bei ca. 20% der Weichteilsarkome beobachtet werden (Seidel et al., 2007).

5.4.1. Einfluss des Methylierungsgrads auf die *KIBRA*-Expression

Ein hoher Methylierungsgrad von CpG-Insel-Promotoren korreliert meist mit stabiler transkriptioneller Repression der entsprechenden Gene (Deaton & Bird, 2011; Vinson & Chatterjee, 2012; Weber et al., 2007). Eine Hypermethylierung eines Teils des *KIBRA*-Promotors P1a und die damit verbundene Repression der *KIBRA*-Expression wurde bereits in Zellen von Patienten mit akuter und chronischer lymphatischer Leukämie beobachtet (Hill et al., 2011; Shinawi et al., 2012). Des Weiteren wurde eine erniedrigte *KIBRA*-Expression beim Mammakarzinom des *Claudin-low*-Subtypes beschrieben (Moleirinho et al., 2012). Die Analysen von Hill und Shinawi (Hill et al., 2011; Shinawi et al., 2012) umfassten jeweils nur einen Teil der CpG1. Da es bislang keine Untersuchungen zur *KIBRA*-Genstruktur sowie der gewebespezifischen Regulation der Expression gab, wurde auch die epigenetische Regulation des gesamten Promotorbereichs P1a und somit der vollständigen CpG1 sowie des alternativen Promotors P1b mit der CpG2 noch nicht untersucht.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die beiden CpG-Inseln in den pCpGL-Basic Vektor (Klug et al., 2006) kloniert. In beiden Zelllinien, renal und neuronal, führte die komplette Methylierung des Promotorbereichs zur vollständigen Repression der Transkriptionsaktivität. Dieses Experiment zeigt, dass sowohl die Methylierung der großen CpG1 als auch die der kleinen CpG2 einen signifikanten Effekt auf die Transkriptionsaktivität der *KIBRA*-Promotoren hat.

Interessanterweise wurde der Promotorbereich P1a in den IHKE-Zellen durch partielle Methylierung mittels *HpaII* transkriptionell inaktiviert. Im Gegensatz dazu war in den SH-SY5Y-Zellen nach der partiellen Methylierung eine signifikante Steigerung der Transkriptionsaktivität für einen Teil des Promotorbereichs P1a zu beobachten. Dieses Ergebnis unterstützt die These der zelltypspezifischen Assemblierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktorkomplexe im *KIBRA*-Promotorbereich von in den renalen und neuronalen Zellen.

5.4.2. *KIBRA*-Methylierungsgrad im Nierengewebe

Nierenkarzinome machen mit jährlich mehr als 250000 Neuerkrankungen weltweit ca. 2% aller Malignome aus (Maher, 2013). Das Nierenzellkarzinom ist der am häufigsten vertretene Typ, der sich wiederum in verschiedene Subtypen unterteilen lässt. Unter den Subtypen wird das klarzellige Nierenzellkarzinom mit ca. 75% am häufigsten diagnostiziert, gefolgt vom papillären Nierenzellkarzinom, das ca. 15% aller Subtypen ausmacht. Das chromophobe

Nierenzellkarzinom tritt mit einer Häufigkeit von ca. 5% auf und die restlichen 5% verteilen sich auf die eher seltenen Subtypen wie das Onkozytom und das Ductus Bellini-Karzinom (Dutcher, 2013; Maher, 2013). Neben den klassischen, gut untersuchten Ursachen für die Entstehung von Nierenzellkarzinomen wie die Mutation des von Hippel-Lindau (VHL)-Gens und die damit verbundene Dysregulation der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) zeigen neueste Studien, dass verstärkt epigenetische Mechanismen und die damit verbundene Dysregulation der Transkription als Auslöser der Erkrankung in Betracht kommen (Arai et al., 2006, 2011; Yamada et al., 2006). So konnte bei Genen der Wnt-Antagonisten-Familie, wie *Dickkopf homolog 3 (DKK3)*, *secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)*, *SFRP2*, *SFRP5* und *WNT inhibitory factor 1 (WIF1)* in Nierenzellkarzinomen eine Promotorhypermethylierung oder repressive Histonmodifikation beobachtet werden (Kawamoto et al., 2008; Urakami et al., 2006). Da die Signaltransduktion von Wnt- und Hippo-Signalweg eng miteinander verknüpft sind und eine Dysregulation beider Signalwege zur Tumorgenese beiträgt, wurde das Methylierungsmuster der beiden CpG-Inseln von *KIBRA* in humanem Nierengewebe von Patienten mit unterschiedlichen Subtypen des Nierenzellkarzinoms untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die 15 CpG-Dinukleotide der zweiten CpG-Insel im Nierengewebe der Patienten zu 42-100% methyliert vorlagen. Im Gegensatz dazu lag der Methylierungsstatus der 63 CpG-Dinukleotide in CpG1 bei 0-10%. Obwohl die *KIBRA*-Methylierungsanalyse in makroskopisch gesundem, humanen Nierengewebe erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in den hier untersuchten Zellen schon eine Veränderung des Methylierungsmuster vorliegt. Das zelluläre Methylierungsmuster verändert sich bereits bevor eine makroskopische Diagnose möglich ist. Somit könnte zukünftig die Analyse des *KIBRA*-Methylierungsstatus oder anderer Komponenten des Hippo-Signalwegs zur Früherkennung von bestimmten Krebserkrankungen beitragen (Gal-Yam et al., 2008).

Interessanterweise wiesen drei Bereiche in CpG1 kein Methylierungsereignis in allen untersuchten Proben auf. In diesen Bereichen konnten mittels *in silico* Analyse SP1-Bindestellen detektiert werden. Wie bereits erwähnt ist SP1 als Transkriptionsfaktor an der konstitutiven *KIBRA*-Expression in den beiden getesteten Zelllinien beteiligt. Zusätzlich sind SP1-Bindestellen als regulatorische DNA-Elemente in der Lage während der Embryogenese, dem Alterungsprozess und der Tumorgenese CpG-Insel vor der *de novo* Methylierung zu schützen (Boumber et al., 2008; Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994). Potentiell könnten die SP1-Bindestellen eine natürliche Barriere für die CpG-Methylierung darstellen und somit die Methylierung an den drei Bereichen der CpG1 im *KIBRA*-Promotor P1a verhindern.

5.5. Zusammenfassung

KIBRA wurde ursprünglich als ein mit Gedächtnisleistung assoziiertes Protein identifiziert (Papassotiropoulos et al., 2006). Diese Funktion wurde kürzlich in konditionellen KIBRA-Knockout Mausmodellen bestätigt (Makuch et al., 2011; Vogt-Eisele et al., 2013). Auffallend war, dass die generierten KIBRA-Knockout Mäuse keine physiologischen Veränderungen oder Verhaltensdefizite aufwiesen. Im *Open-field*-Test offenbarten sich Defizite beim räumlichen Lernen und Gedächtnisleistung. Zunehmend wird der *KIBRA*-Genlocus auch mit pathologischen Prozessen wie der *late-onset* Alzheimer-Erkrankung assoziiert (Burgess et al., 2011; Corneveaux et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2009).

Während die Rolle von KIBRA in Neuronen bereits gut definiert ist, ist seine physiologische Funktion in nicht-neuronalen Zellen noch relativ unbekannt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass KIBRA ein wichtiger Regulator des Hippo-Signalwegs ist, was auf eine KIBRA-Funktion beim epithelialen Zellwachstum schließen lässt (Baumgartner et al., 2010; Genevet & Tapon, 2011; Xiao et al., 2011; Yu et al., 2010). Weitere Studien zeigten außerdem, dass KIBRA in andere biologische Prozesse wie Zellpolarität, Mitose und Zellmigration involviert ist (Duning et al., 2008; Rosse et al., 2009; Yang et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte für *KIBRA* zum ersten Mal gezeigt werden, dass I) ein komplexes, alternatives und zelltypspezifisches Promotorsystem existiert, welches differentiell die *KIBRA*-Expression in Niere und Gehirn reguliert, II) sich aus der Nutzung zweier renaler TSS im ersten Intron zwei alternative Exons ergeben, III) TCF7L2 im Komplex mit YAP1 und TEAD ein wichtiger Regulator des alternativen *KIBRA*-Promotorsystems ist und IV) der Methylierungsstatus der beiden identifizierten CpG-Inseln bei der Regulation von *KIBRA* eine wichtige Rolle spielt.

Die Experimente zur Analyse des *KIBRA*-Methylierungsstatus sollten zukünftig erweitert werden, so dass die detektierten Methylierungsmuster mit unterschiedlichen Subtypen des Nierenzellkarzinoms korreliert werden können. Zusätzlich könnte mittels *Real-time* PCR untersucht werden, inwieweit die unterschiedlichen Methylierungsmuster eine Auswirkung auf das *KIBRA*-Expressionslevel in den Patientenproben haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *KIBRA*-Expression in den Zellen durch ein komplexes, alternatives Promotorsystem gesteuert wird. Dieses alternative Promotorsystem wird zusätzlich differentiell durch den Transkriptionsfaktorkomplex bestehend aus TCF7L2, YAP1 und TEAD reguliert. Mit einem besseren Verständnis der zelltypspezifischen Transkriptionsregulation könnte in Zukunft die Modulation der *KIBRA*-Expression oder anderer Komponenten des Hippo-Signalwegs eine neue Option zur Therapie verschiedener Malignome und gegebenenfalls weiterer Erkrankungen darstellen.

6. Ausblick

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Mechanismen zur Steuerung von Gewebewachstum und Regeneration beschrieben; unser Wissen über diese Prozesse ist jedoch nach wie vor unvollständig. Die Identifizierung des Hippo-Signalwegs als eine entscheidende Determinante der Organgröße, hat einen neuen Ansatzpunkt für aktuelle und zukünftige Forschung geschaffen (Boggiano & Fehon, 2012; Lapi et al., 2008; Liu et al., 2012). Insbesondere die Funktionalität einzelner Hippo-Komponenten bei diversen biologischen und pathophysiologischen Prozessen sowie bei der Transkriptionsregulation von Genen ist weitestgehend unbekannt. Diese Arbeit gibt erste Einblicke in die zelltypspezifische und epigenetische Regulation der *KIBRA*-Expression. Zukünftige Studien müssen klären inwieweit epigenetische Veränderung von *KIBRA* und anderer Komponenten des Hippo-Signalwegs bei pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorgenese eine Rolle spielen.

Bei epigenetischen Veränderungen handelt es sich vor allem um Histonmodifikationen oder Methylierung der DNA. Diese Veränderungen haben gegenüber Mutationen den Vorteil, dass sie reversibel sind. Sie bieten daher gute Ansatzpunkte für die Therapie bei Malignomen (Sharma et al., 2010). Epigenetischen Therapieansätze umfassen unter anderem die Pyrimidin-Nukleosidanaloga wie 5-Azacytidin (Vidaza) und 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Dacogen), welche die Methylierung bei der DNA-Replikation verhindern, wodurch es zu einer Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommt (Fenaux et al., 2009; Kantarjian et al., 2012). Epigenetische Inhibitoren bieten gegenüber konventionellen Zytostatika den Vorteil, dass sie schon bei niedrigen Dosen wirksam sind und eine geringe Toxizität besitzen. Ihre Wirkung ist jedoch nur vorübergehend und nach dem Absetzen des Medikaments kommt es zur Neubildung des Tumors. Zusätzlich haben diese Inhibitoren einen positiven Einfluss auf die Chemosensitivität der Tumorzelle und werden deshalb häufig in Kombination mit konventionellen Zytostatika eingesetzt (Azad et al., 2013; Yoo & Jones, 2006).

Neben der Tumorgenese scheinen epigenetische Veränderungen auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen. Hier kommt es ebenso wie bei der Tumorgenese im Gehirn zu einer global auftretenden Hypomethylierung des Genoms sowie zu einer spezifischen Hypermethylierung von sonst unmethylierten regulatorischen Bereichen (Lu et al., 2013). Gezielte epigenetische Therapien könnten in Zukunft die Behandlung neurodegenerativen Erkrankungen unterstützen.

Ein weiterer wichtiger Faktor im Zusammenhang mit epigenetischen Therapieansätzen ist die Entwicklung sensitiver und spezifischer molekularer Marker, welche idealerweise die

interindividuell unterschiedliche Antwort auf die DNA-Demethylierungstherapie vorhersagbar machen könnten. Dieses Forschungsgebiet ist noch unerschlossen, obwohl die DNA-Demethylierung schon klinisch Anwendung findet und epigenetische Veränderungen zur Früherkennung, Diagnostik und Prognose bei Malignomen beitragen (Azad et al., 2013; Yoo & Jones, 2006). Die epigenetischen Biomarker wie Septin9 (ColoVantage) und Vimentin (ColoSure) z.B. wurden mit Kolonkarzinom und bestimmten Präkanzerosen assoziiert gefunden und finden sowohl in der klinischen Diagnostik sowie bei der Früherkennung Anwendung (Ned et al., 2011; Warren et al., 2011). Die weitere Analyse der Regulation der Komponenten des Hippo- und Wnt-Signalwegs könnte zukünftig weitere solcher Biomarker anderer Malignome identifizieren und somit zu einer besseren und individuelleren Therapie von Patienten beitragen.

7. Referenzen

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16:3797-3804.

Adelman K, Lis JT (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet.* 13:720-731.

Alexa A, Varga J, Reményi A (2010). Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. *FEBS J.* 277:4376-4382.

Almeida OP, Schwab SG, Lautenschlager NT, Morar B, Greenop KR, Flicker L and Wildenauer D (2008). KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in later life, but does not increase the risk of mild cognitive impairment. *J Cell Mol Med.* 12:1672-1676.

Antequera F (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* 60:1647-1658.

Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S (2006). Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer.* 119:288-296.

Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y (2011). Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology.* 78:1-9.

Arancio O, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (1996). Nitric oxide acts as a retrograde messenger during long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol Paris.* 90:321-322.

Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene.* 25:7492-7504.

Azad N, Zahnow CA, Rudin CM, Baylin SB (2013). The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past. *Nat Rev Clin Oncol.* 10:256-266.

Bannister AJ, Kouzarides T (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21:381-395.

Barker N, Clevers H (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 5:997-1014.

Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 20:4935-4943.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 21:263-265.

Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-297.

Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 11:11-23.

Bates TC, Price JF, Harris SE, Marioni RE, Fowkes FG, Stewart MC, Murray GD, Whalley LJ, Starr JM and Deary IJ (2009). Association of KIBRA and memory. *Neurosci Lett.* 458:140-143.

Baumgartner R, Poernbacher I, Buser N, Hafen E, Stocker H (2010). The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in Drosophila. *Dev Cell.* 18:309-316.

Beaudoin JD, Perreault JP (2010). 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors. *Nucleic Acids Res.* 38:7022-7036.

Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kühl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science.* 280:596-599.

Bhattacharyya RP, Reményi A, Good MC, Bashor CJ, Falick AM, Lim WA (2006). The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science.* 311:822-826.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Biernat M, Niehrs C (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*. 316:1619-1622.

Bird AP, Wolffe AP (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*. 99:451-454.

Bird AP (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 321:209-213.

Blaschke RJ, Töpfer C, Marchini A, Steinbeisser H, Janssen JW, Rappold GA (2003). Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J Biol Chem*. 278:47820-47826.

Boggiano JC, Fehon RG (2012). Growth control by committee: intercellular junctions, cell polarity, and the cytoskeleton regulate Hippo signaling. *Dev Cell*. 22:695-702.

Boumber YA, Kondo Y, Chen X, Shen L, Guo Y, Tellez C, Estécio MR, Ahmed S, Issa JP (2008). An Sp1/Sp3 binding polymorphism confers methylation protection. *PLoS Genet*. 4:e1000162.

Boyd KE, Wells J, Gutman J, Bartley SM, Farnham PJ (1998). c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13887-13892.

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*. 155:1033-1038.

Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 371:435-438.

Brantjes H, Roose J, van De Wetering M, Clevers H (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res*. 29:1410-1419.

Buday L, Tompa P (2010). Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J*. 277:4348-4355.

Bulger M, Groudine M (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* 13:2465-2477.

Burgess JD, Pedraza O, Graff-Radford NR, Hirpa M, Zou F, Miles R, Nguyen T, Li M, Lucas JA, Ivnik RJ, Crook J, Pankratz VS, Dickson DW, Petersen RC, Younkin SG, Ertekin-Taner N (2011). Association of common KIBRA variants with episodic memory and AD risk. *Neurobiol Aging.* 32:557.e1-557.e9.

Burwinkel B, Shanmugam KS, Hemminki K, Meindl A, Schmutzler RK, Sutter C, Wappenschmidt B, Kiechle M, Bartram CR, Frank B (2006). Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer.* 6:268.

Büther K, Plaas C, Barnekow A, Kremerskothen J (2004). KIBRA is a novel substrate for protein kinase Czeta. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:703-707.

Butler JE, Kadonaga JT (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16:2583-2592.

Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:7507-12.

Cao X, Pfaff SL, Gage FH (2008). YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes Dev.* 22:3320-3334.

Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CA, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest AR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET, Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA, Hayashizaki Y (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet.* 38:626-635.

Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signaling activity. *Nature.* 395:604-608.

Chan SW, Lim CJ, Loo LS, Chong YF, Huang C, Hong W (2009). TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation. *J Biol Chem.* 284:14347-14358.

Claessens F, Gewirth DT (2004). DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem.* 40:59-72.

Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127:469-480.

Cliffe A, Hamada F, Bienz M (2003). A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol.* 13:960-966.

Cong F, Schweizer L, Varmus H (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development.* 131:5103-5115.

Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, Nguyen L, Myers RM (2006). Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res.* 16:1-10.

Core LJ, Waterfall JJ and Lis JT (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science.* 322:1845-1848.

Corneveaux JJ, Liang WS, Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Zismann VL, Joshipura KD, Pearson JV, Hu-Lince D, Craig DW, Coon KD, Dunckley T, Bandy D, Lee W, Chen K, Beach TG, Mastroeni D, Grover A, Ravid R, Sando SB, Aasly JO, Heun R, Jessen F, Kölsch H, Rogers J, Hutton ML, Melquist S, Petersen RC, Alexander GE, Caselli RJ, Papassotiropoulos A, Stephan DA, Huentelman MJ (2010). Evidence for an association between KIBRA and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 31:901-909.

Cullen BR (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell.* 16:861-865.

Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Plass C, Huang TH (2008). The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet.* 24:167-177.

Deaton AM, Bird A (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25:1010-1022.

Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR (2009). Epigenetic control. *J Cell Physiol.* 219:243-250.

Denoëud F, Kapranov P, Ucla C, Frankish A, Castelo R, Drenkow J, Lagarde J, Alioto T, Manzano C, Chrast J, Dike S, Wyss C, Henrichsen CN, Holroyd N, Dickson MC, Taylor R, Hance Z, Foissac S, Myers RM, Rogers J, Hubbard T, Harrow J, Guigó R, Gingeras TR, Antonarakis SE, Reymond A (2007). Prominent use of distal 5' transcription start sites and discovery of a large number of additional exons in ENCODE regions. *Genome Res.* 17:746-759.

Dillon N, Sabbattini P (2000). Functional gene expression domains: defining the functional unit of eukaryotic gene regulation. *Bioessays.* 22:657-665.

Dimas AS, Deutsch S, Stranger BE, Montgomery SB, Borel C, Attar-Cohen H, Ingle C, Beazley C, Gutierrez Arcelus M, Sekowska M, Gagnebin M, Nisbett J, Deloukas P, Dermitzakis ET, Antonarakis SE (2009). Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. *Science.* 325:1246-1250.

Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell.* 130:1120-1133.

Dördelmann C, Telgmann R, Brand E, Hagedorn C, Schröer B, Hasenkamp S, Baumgart P, Kleine-Katthöfer P, Paul M, Brand-Herrmann SM (2008). Functional and structural profiling of the human thrombopoietin gene promoter. *J Biol Chem.* 283:24382-24391.

Drissen R, Palstra RJ, Gillemans N, Splinter E, Grosveld F, Philipsen S, de Laat W (2004). The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev.* 18:2485-2490.

Duan ZJ, Fang X, Rohde A, Han H, Stamatoyannopoulos G, Li Q (2002). Developmental specificity of recruitment of TBP to the TATA box of the human gamma-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:5509-5514.

Duning K, Schurek EM, Schlüter M, Bayer M, Reinhardt HC, Schwab A, Schaefer L, Benzing T, Schermer B, Saleem MA, Huber TB, Bachmann S, Kremerskothen J, Weide T, Pavenstädt H (2008). KIBRA modulates directional migration of podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 19:1891-1903.

Dutcher JP (2013). Recent developments in the treatment of renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol.* 5:338-353.

Dwivedi RS, Herman JG, McCaffrey TA, Raj DS (2011). Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 79:23-32.

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10:2709-2721.

Feinberg AP, Tycko B (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 4:143-153.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR; International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 10:223-232.

Ferrell JE Jr, Cimprich KA (2003). Enforced proximity in the function of a famous scaffold. *Mol Cell.* 11:289-291.

Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M (2003). The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res.* 31:1765-1774.

Fuda NJ, Ardehali MB, Lis JT (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature.* 461:186-192.

Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA (2008). Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med.* 59:267-280.

Genevet A, Tapon N (2011). The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *Biochem J.* 436:213-224.

Genevet A, Wehr MC, Brain R, Thompson BJ, Tapon N (2010). Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev Cell.* 18:300-308.

Gerin I, Bommer GT, McCoin CS, Sousa KM, Krishnan V, MacDougald OA (2010). Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299:E198-206.

Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science.* 332:680-686.

Goodrich JA, Tjian R (2010). Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nat Rev Genet.* 11:549-558.

Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H (1994). Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation.* 56:39-44.

Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol.* 18:435-441.

Grabe N (2002). AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* 2:S1-15.

Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X (2008). Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem.* 283:5496-5509.

Happé H, de Heer H, Peters DJ (2011). Polycystic kidney disease: the complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochem Biophys Acta.* 1812:1249-1255.

Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol.* 9:207-210.

Harvey K, Tapon N (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour - suppressor network. *Nat Rev Cancer.* 7:182-191.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281:1509-1512.

Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, Martin JF (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 332:458-461.

Heintzman ND, Ren B (2009). Finding distal regulatory elements in the human genome. *Curr Opin Genet Dev*. 19:541-549.

Heintzman ND, Ren B (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci*. 64:386-400.

Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349:2042-2054.

Hermann A, Goyal R, Jeltsch A (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*. 279:48350-48359.

Hill VK, Dunwell TL, Catchpoole D, Krex D, Brini AT, Griffiths M, Craddock C, Maher ER, Latif F (2011). Frequent epigenetic inactivation of KIBRA, an upstream member of the Salvador/Warts/Hippo (SWH) tumor suppressor network, is associated with specific genetic event in B-cell acute lymphocytic leukemia. *Epigenetics*. 6:326-332.

Hochheimer A and Tjian R (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev*. 17:1309-1320.

Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W (2013). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 25:254-264.

Hughes TA (2006). Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet*. 22:119-122.

Hwang E, Ryu KS, Pääkkönen K, Güntert P, Cheong HK, Lim DS, Lee JO, Jeon YH, Cheong C (2007). Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:9236-9241.

Illingworth RS, Bird AP (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583:1713-1720.

Imajo M, Miyatake K, Imura A, Miyamoto A, Nishida E (2012). A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. *EMBO J.* 31:1109-1122.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431:931-945.

Jiang Z, Li X, Hu J, Zhou W, Jiang Y, Li G, Lu D (2006). Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neurosci Res.* 56:450-458.

Johannsen S, Duning K, Pavenstädt H, Kremerskothen J, Boeckers TM (2008). Temporal-spatial expression and novel biochemical properties of the memory-related protein KIBRA. *Neuroscience.* 155:1165-1173.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 19:187-191.

Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 20:253-259.

Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, Gau JP, Chou WC, Buckstein R, Cermak J, Kuo CY, Oriol A, Ravandi F, Faderl S, Delaunay J, Lysák D, Minden M, Arthur C (2012). Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 30:2670-2677.

Karolchik D, Baertsch R, Diekhans M, Furey TS, Hinrichs A, Lu YT, Roskin KM, Schwartz M, Sugnet CW, Thomas DJ, Weber RJ, Haussler D, Kent WJ; University of California Santa Cruz (2003). The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res.* 31:51-54.

Kawamoto K, Hirata H, Kikuno N, Tanaka Y, Nakagawa M, Dahiya R (2008). DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 123:535-542.

Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*. 66:596-612.

Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD and Ren B (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*. 436:876-880.

Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, Ishii S, Sugiyama T, Saito K, Isono Y, Irie R, Kushida N, Yoneyama T, Otsuka R, Kanda K, Yokoi T, Kondo H, Wagatsuma M, Murakawa K, Ishida S, Ishibashi T, Takahashi-Fujii A, Tanase T, Nagai K, Kikuchi H, Nakai K, Isogai T, Sugano S (2006). Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res*. 16:55-65.

Klug M, Rehli M (2006). Functional analysis of promoter CpG methylation using a CpG-free luciferase reporter vector. *Epigenetics*. 1:127-130.

Ko GY, Kelly PT (1999). Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 19:6784-6794.

Kochetov AV, Ischenko IV, Vorobiev DG, Kel AE, Babenko VN, Kisselev LL, Kolchanov NA (1998). Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features. *FEBS Lett*. 440:351-355.

Komar AA, Hatzoglou M (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem*. 280:23425-2348.

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ and Clevers H (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*. 19:379-383.

Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, Markman M, Lamers W, Destree O and Clevers H (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol.* 18:1248-1256.

Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128:693-705.

Kozak M (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 44:283-292.

Kremerskothen J, Kindler S, Finger I, Veltel S, Barnekow A (2006). Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J Neurochem.* 96:1659-1666.

Kremerskothen J, Plaas C, Büther K, Finger I, Veltel S, Matanis T, Liedtke T and Barnekow A (2003). Characterization of KIBRA, a novel WW domain-containing protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:862-867.

Kruglyak L, Nickerson DA (2001). Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 27:234-236.

Lapi E, Di Agostino S, Donzelli S, Gal H, Domany E, Rechavi G, Pandolfi PP, Givol D, Strano S, Lu X, Blandino G (2008). PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop. *Mol Cell.* 32:803-814.

Lee JS, Smith E, Shilatifard A (2010). The language of histone crosstalk. *Cell.* 142:682-685.

Lee MP, Howcroft K, Kotekar A, Yang HH, Buetow KH, Singer DS (2005). ATG deserts define a novel core promoter subclass. *Genome Res.* 15:1189-1197.

Lee R, Feinbaum R, Ambros V (2004b). A short history of a short RNA. *Cell.* 116:S89-92, 1 p following S96.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23:4051-4060.

Lefstin JA, Yamamoto KR (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature.* 392:885-888.

Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, Zhao S, Xiong Y, Guan KL (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol.* 28:2426-2436.

Lemon B, Tjian R (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14:2551-2569.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH (1992). A targeting sequence directs DNAmethyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell.* 71:865-873.

Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5818-5823.

Levy D, Adamovich Y, Reuven N, Shaul Y (2007). The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ.* 14:743-751.

Li J, Gilmour DS (2011). Promoter proximal pausing and the control of gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 21:231-5.

Li J, Sutter C, Parker DS, Blauwkamp T, Fang M and Cadigan KM (2007). CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling. *EMBO J.* 26:2284-2294.

Liao Y, Lönnnerdal B (2010). Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 67:2969-2978.

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci.* 13:169-182.

Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 108:837-847.

Liu H, Jiang D, Chi F, Zhao B (2012). The Hippo pathway regulates stem cell proliferation, self-renewal, and differentiation. *Protein Cell* 3:291-304.

Liu S, Spinner DS, Schmidt MM, Danielsson JA, Wang S, Schmidt J (2000). Interaction of MyoD family proteins with enhancers of acetylcholine receptor subunit genes in vivo. *J Biol Chem.* 275:41364-41368.

Lonard DM, O'Malley BW (2005). Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci.* 30:126-132.

Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H (2013). DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci.* 5:85.

Lu L, Li Y, Kim SM, Bossuyt W, Liu P, Qiu Q, Wang Y, Halder G, Finegold MJ, Lee JS, Johnson RL (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:1437-1442.

Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* 8:2282-2292.

Maher ER (2013). Genomics and epigenomics of renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 23:10-7.

Makuch L, Volk L, Anggono V, Johnson RC, Yu Y, Duning K, Kremerskothen J, Xia J, Takamiya K, Huganir RL (2011). Regulation of AMPA receptor function by the human memory-associated gene KIBRA. *Neuron.* 71:1022-1029.

Marsman J, Horsfield JA (2012). Long distance relationships: enhancer-promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochim Biophys Acta.* 1819:1217-1227.

Maston GA, Evans SK, Green MR (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 7:29-59.

Meijer HA, Thomas AA (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J.* 367:1-11.

Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J and Albà MM (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* 18:333-334.

Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL, Schmidt MK, Chang-Claude J, Bojesen SE, Bolla MK, Wang Q, Dicks E, Lee A, Turnbull C, Rahman N; Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Collaboration, Fletcher O, Peto J, Gibson L, Dos Santos Silva I, Nevanlinna H, Muranen TA, Aittomäki K, Blomqvist C, Czene K, Irwanto A, Liu J, Waisfisz Q, Meijers-Heijboer H, Adank M; Hereditary Breast and Ovarian Cancer Research Group Netherlands (HEBON), van der Luijt RB, Hein R, Dahmen N, Beckman L, Meindl A, Schmutzler RK, Müller-Myhsok B, Lichtner P, Hopper JL, Southey MC, Makalic E, Schmidt DF, Uitterlinden AG, Hofman A, Hunter DJ, Chanock SJ, Vincent D, Bacot F, Tessier DC, Canisius S, Wessels LF, Haiman CA, Shah M, Luben R, Brown J, Luccarini C, Schoof N, Humphreys K, Li J, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Flyger H, Couch FJ, Wang X, Vachon C, Stevens KN, Lambrechts D, Moisse M, Paridaens R, Christiaens MR, Rudolph A, Nickels S, Flesch-Janys D, Johnson N, Aitken Z, Aaltonen K, Heikkinen T, Broeks A, Veer LJ, van der Schoot CE, Guénel P, Truong T, Laurent-Puig P, Menegaux F, Marme F, Schneeweiss A, Sohn C, Burwinkel B, Zamora MP, Perez JI, Pita G, Alonso MR, Cox A, Brock IW, Cross SS, Reed MW, Sawyer EJ, Tomlinson I, Kerin MJ, Miller N, Henderson BE, Schumacher F, Le Marchand L, Andrulis IL, Knight JA, Glendon G, Mulligan AM; kConFab Investigators; Australian Ovarian Cancer Study Group, Lindblom A, Margolin S, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AM, Jager A, Bui QM, Stone J, Dite GS, Apicella C, Tsimiklis H, Giles GG, Severi G, Baglietto L, Fasching PA, Haeberle L, Ekici AB, Beckmann MW, Brenner H, Müller H, Arndt V, Stegmaier C, Swerdlow A, Ashworth A, Orr N, Jones M, Figueroa J, Lissowska J, Brinton L, Goldberg MS, Labrèche F, Dumont M, Winqvist R, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Grip M, Brauch H, Hamann U, Brüning T; GENICA (Gene Environment Interaction and Breast Cancer in Germany) Network, Radice P, Peterlongo P, Manoukian S, Bonanni B, Devilee P, Tollenaar RA, Seynaeve C, van Asperen CJ, Jakubowska A, Lubinski J, Jaworska K, Durda K, Mannermaa A, Kataja V, Kosma VM, Hartikainen JM, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Dörk T, Kristensen VN, Anton-Culver H, Slager S, Toland AE, Edge S, Fostira F, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Sueta A, Wu AH, Tseng CC, Van Den Berg D, Stram DO, Shu XO, Lu W, Gao YT, Cai H, Teo SH, Yip CH, Phuah SY, Cornes BK, Hartman M, Miao H, Lim WY, Sng JH, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsarn P, Shen CY, Hsiung CN, Wu PE, Ding SL, Sangrajrang S, Gaborieau V, Brennan P, McKay J, Blot WJ, Signorello LB, Cai Q, Zheng W, Deming-Halverson S, Shrubsole M, Long J, Simard J, Garcia-Closas M, Pharoah PD, Chenevix-Trench G, Dunning AM, Benitez J, Easton DF (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 45:353-361.

Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, Nakajima T, Fukamizu A (2000). Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J Biol Chem.* 275:35170-35175.

Moleirinho S, Chang N, Sims AH, Tilston-Lünel AM, Angus L, Steele A, Boswell V, Barnett SC, Ormandy C, Faratian D, Gunn-Moore FJ, Reynolds PA (2012). KIBRA exhibits MST-independent functional regulation of the Hippo signaling pathway in mammals. *Oncogene.* <http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/full/onc2012196a.html>.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No 1:R47-58.

Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8905-8909.

Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol.* 139:193-204.

Nacmias B, Bessi V, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Piccini C, Sorbi S and Bracco L (2008). KIBRA gene variants are associated with episodic memory performance in subjective memory complaints. *Neurosci Lett.* 436:145-147.

Ned RM, Melillo S, Marrone M (2011). Fecal DNA testing for Colorectal Cancer Screening: the ColoSure™ test. *PLoS Curr.* 3:RRN1220.

Nusse R (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 15:28-32.

Ogbourne S, Antalis TM (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J.* 331:1-14.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99:247-257.

Ong CT, Corces VG (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet.* 12:283-293.

Orosz DE, Woost PG, Kolb RJ, Finesilver MB, Jin W, Frisa PS, Choo CK, Yau CF, Chan KW, Resnick MI, Douglas JG, Edwards JC, Jacobberger JW, Hopfer U (2004). Growth, immortalization, and differentiation potential of normal adult human proximal tubule cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40:22-34.

Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, Plante P, Provost P (2006). MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol.* 2006:69616.

Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, Deng CX, Brugge JS, Haber DA (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12405-12410.

Pabo CO, Sauer RT (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* 61:1053-1095.

Paik JH, Jang JY, Jeon YK, Kim WY, Kim TM, Heo DS, Kim CW (2011). MicroRNA-146a downregulates NF κ B activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 17:4761-4771.

Papassotiropoulos A, Stephan DA, Huentelman MJ, Hoerndli FJ, Craig DW, Pearson JV, Huynh KD, Brunner F, Corneveaux J, Osborne D, Wollmer MA, Aerni A, Coluccia D, Hänggi J, Mondadori CR, Buchmann A, Reiman EM, Caselli RJ, Henke K, de Quervain DJ (2006). Common Kibra alleles are associated with human memory performance. *Science.* 314:475-478.

Peng HW, Slattery M, Mann RS (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. *Genes Dev.* 23:2307-1239.

Peters JM, McKay RM, McKay JP, Graff JM (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature.* 401:345-350.

Pickering BM, Willis AE (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 16:39-47.

Plass C (2002). Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet.* 11:2479-2488.

Ponomarenko JV, Orlova GV, Merkulova TI, Gorshkova EV, Fokin ON, Vasiliev GV, Frolov AS, Ponomarenko MP (2002). rSNP_Guide: an integrated database-tools system for studying SNPs and site-directed mutations in transcription factor binding sites. *Hum Mutat.* 20:239-248.

Prade E, Tobiasch M, Hitkova I, Schäffer I, Lian F, Xing X, Tänzer M, Rauser S, Walch A, Feith M, Post S, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP, Burgermeister E (2012). Bile acids down-regulate caveolin-1 in esophageal epithelial cells through sterol responsive element-binding protein. *Mol Endocrinol.* 26:819-832.

Praskova M, Xia F, Avruch J (2008). MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol.* 18:311-321.

Ptashne M (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature.* 322:697-701.

Ritter DI, Dong Z, Guo S, Chuang JH (2012). Transcriptional enhancers in protein-coding exons of vertebrate developmental genes. *PLoS One.* 7:e35202.

Rizo J, Südhof TC (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem.* 273:15879-1582.

Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, Llorca J, Mateo I, Sánchez-Quintana C, García-Gorostiaga I, Sánchez-Juan P, Berciano J, Combarros O (2009). Age-dependent association of KIBRA genetic variation and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging.* 30:322-324.

Roose J, Clevers H (1999). TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1424:M23-37.

Rosenbloom KR, Sloan CA, Malladi VS, Dreszer TR, Learned K, Kirkup VM, Wong MC, Maddren M, Fang R, Heitner SG, Lee BT, Barber GP, Harte RA, Diekhans M, Long JC, Wilder SP, Zweig AS, Karolchik D, Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ (2013). ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update. *Nucleic Acids Res.* 41:D56-63.

Rosse C, Formstecher E, Boeckeler K, Zhao Y, Kremerskothen J, White MD, Camonis JH, Parker PJ (2009). An aPKC-exocyst complex controls paxillin phosphorylation and migration through localised JNK1 activation. *PLoS Biol.* 7:e1000235.

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:983-994.

Safe S, Abdelrahim M (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer.* 41:2438-2448.

Schaefer BC (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem.* 227:255-273.

Schaper K, Kolsch H, Popp J, Wagner M and Jessen F (2008). KIBRA gene variants are associated with episodic memory in healthy elderly. *Neurobiol Aging.* 29:1123-1125.

Schmitz B, Salomon A, Rötrige A, Ritter M, Ringelstein EB, Fischer JW, Paul M, Brand E, Brand SM (2013). Interindividual transcriptional regulation of the human biglycan gene involves three common molecular haplotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:871-880.

Schneider A, Huentelman MJ, Kremerskothen J, Duning K, Spoelgen R, Nikolich K (2010). KIBRA: A New Gateway to Learning and Memory? *Front Aging Neurosci.* 2:4.

Seidel C, Schagdarsurengin U, Blümke K, Würfl P, Pfeifer GP, Hauptmann S, Taubert H, Dammann R (2007). Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma. *Mol Carcinog.* 46:865-871.

Seila AC, Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, Young RA and Sharp PA (2008). Divergent transcription from active promoters. *Science.* 322:1849-1851.

Serulle Y, Arancio O, Ziff EB (2008). A role for cGMP-dependent protein kinase II in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Channels (Austin).* 2:230-232.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 31:27-36.

Shinawi T, Hill V, Dagklis A, Baliakas P, Stamatopoulos K, Agathangelou A, Stankovic T, Maher ER, Ghia P, Latif F (2012). KIBRA gene methylation is associated with unfavorable biological prognostic parameters in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics.* 7:211-215.

Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, Clawson H, Spieth J, Hillier LW, Richards S, Weinstock GM, Wilson RK, Gibbs RA, Kent WJ, Miller W, Haussler D (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 15:1034-1050.

Silverman ES, Collins T (1999). Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol.* 154:665-670.

Smale ST, Kadonaga JT (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 72:449-479.

Smock RG, Gierasch LM (2009). Sending signals dynamically. *Science.* 324:198-203.

Song B, Wang Y, Kudo K, Gavin EJ, Xi Y, Ju J (2008). miR-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit. *Clin Cancer Res.* 14:8080-8086.

Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, Montgomery EA, Anders RA (2008). Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol.* 39:1582-1589.

Strano S, Monti O, Pediconi N, Baccharini A, Fontemaggi G, Lapi E, Mantovani F, Damalas A, Citro G, Sacchi A, Del Sal G, Levrero M, Blandino G (2005). The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage. *Mol Cell.* 18:447-459.

Strano S, Munarriz E, Rossi M, Castagnoli L, Shaul Y, Sacchi A, Oren M, Sudol M, Cesareni G, Blandino G (2001). Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J Biol Chem.* 276:15164-15173.

Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2005). Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 11:1380-1385.

Tan JS, Mohandas N, Conboy JG (2006). High frequency of alternative first exons in erythroid genes suggests a critical role in regulating gene function. *Blood.* 107:2557-2561.

Tetsu O, McCormick F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398:422-426.

Thomas DJ, Rosenbloom KR, Clawson H, Hinrichs AS, Trumbower H, Raney BJ, Karolchik D, Barber GP, Harte RA, Hillman-Jackson J, Kuhn RM, Rhead BL, Smith KE, Thakkapallayil A, Zweig AS; ENCODE Project Consortium, Haussler D, Kent WJ (2007). The ENCODE Project at UC Santa Cruz. *Nucleic Acids Res*. 35:D663-667.

Thomas MC, Chiang CM (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 41:105-178.

Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol*. 2005 Jan 26;15(2):R61-4.

Tsuchihara K, Suzuki Y, Wakaguri H, Irie T, Tanimoto K, Hahimoto S, Matsushima K, Mizushima-Sugano J, Yamashita R, Nakai K, Bentley D, Esumi H, Sugano S (2009). Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res*. 37:2249-2263.

Tveito G, Hansteen IL, Dalen H, Haugen A (1989). immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel (II). *Cancer Res*. 49:1829-1835.

Urakami S, Shiina H, Enokida H, Hirata H, Kawamoto K, Kawakami T, Kikuno N, Tanaka Y, Majid S, Nakagawa M, Igawa M, Dahiya R (2006). Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res*. 12:6989-6997.

Vakoc CR, Letting DL, Gheldof N, Sawado T, Bender MA, Groudine M, Weiss MJ, Dekker J, Blobel GA (2005). Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell*. 17:453-462.

Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, Rossant J, Wrana JL (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev Cell*. 19:831-844.

Vinson C, Chatterjee R (2012). CG methylation. *Epigenomics*. 4:655-663.

Vitolo MI, Anglin IE, Mahoney WM Jr, Renoud KJ, Gartenhaus RB, Bachman KE, Passaniti A (2007). The RUNX2 transcription factor cooperates with the YES-associated protein, YAP65, to promote cell transformation. *Cancer Biol Ther.* 6:856-863.

Vogt-Eisele A, Krüger C, Duning K, Weber D, Spoelgen R, Pitzer C, Plaas C, Eisenhardt G, Meyer A, Vogt G, Krieger M, Handwerker E, Wennmann DO, Weide T, Skryabin BV, Klugmann M, Pavenstädt H, Huentelmann MJ, Kremerskothen J, Schneider A (2014). KIBRA (Kidney/BRAin protein) regulates learning and memory and stabilizes Protein kinase M ζ . *J Neurochem.* 128:686-700.

Voronkov A, Krauss S (2013). Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des.* 19:634-664.

Wade PA (2001). Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene.* 20:3166-3173.

Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, Fang JC, Samowitz WS, Heichman KA (2011). Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med.* 9:133.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 39:457-466.

Wei X, Shimizu T, Lai ZC (2007). Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J.* 26:1772-1781.

Wersching H, Guske K, Hasenkamp S, Hagedorn C, Schiwiek S, Jansen S, Witte V, Wellmann J, Lohmann H, Duning K, Kremerskothen J, Knecht S, Brand E, Floel A (2011). Impact of common KIBRA allele on human cognitive functions. *Neuropsychopharmacology.* 36:1296-1304.

Wierstra I (2008). Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 372:1-13.

Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell*. 14:388-398.

Xiao L, Chen Y, Ji M, Dong J (2011). KIBRA regulates Hippo signaling activity via interactions with large tumor suppressor kinases. *J Biol Chem*. 286:7788-7796.

Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 236:87-95.

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 434:338-345.

Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T, Kanai Y, Murakami Y (2006). Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*. 118:916-923.

Yang S, Ji M, Zhang L, Chen Y, Wennmann DO, Kremerskothen J, Dong J (2014). Phosphorylation of KIBRA by the extracellular signal-regulated kinase (ERK)-ribosomal S6 kinase (RSK) cascade modulates cell proliferation and migration. *Cell Signal*. 26:343-351.

Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR (2009). HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci*. 12:829-838.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 304:594-596.

Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P, Baylin SB (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res*. 20:2287-2291.

Yoo CB, Jones PA (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 5:37-50.

Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S, Ohno S, Chida K (2011). KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Curr Biol.* 21:705-711.

Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell.* 18:288-299.

Zangi R, Arrieta A, Cossío FP (2010). Mechanism of DNA methylation: the double role of DNA as a substrate and as a cofactor. *J Mol Biol.* 400:632-644.

Zeke A, Lukács M, Lim WA, Reményi A (2009). Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol.* 19:364-374.

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature.* 438:873-877.

Zhang H, Liu CY, Zha ZY, Zhao B, Yao J, Zhao S, Xiong Y, Lei QY, Guan KL (2009). TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 284:13355-13362.

Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell.* 14:377-387.

Zhang L, Yang S, Wennmann DO, Chen Y, Kremerskothen J, Dong J (2014). KIBRA: In the brain and beyond. *Cell Signal.* 2014 26:1392-1399.

Zhao B, Lei QY, Guan KL (2008b). The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 20:638-646.

Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21:2747-2761.

Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL (2008a). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22:1962-1971.

Zhao J, Schug J, Li M, Kaestner KH and Grant SF (2010). Disease-associated loci are significantly over-represented among genes bound by transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) in vivo. *Diabetologia*. 53:2340-2346.

8. Anhang

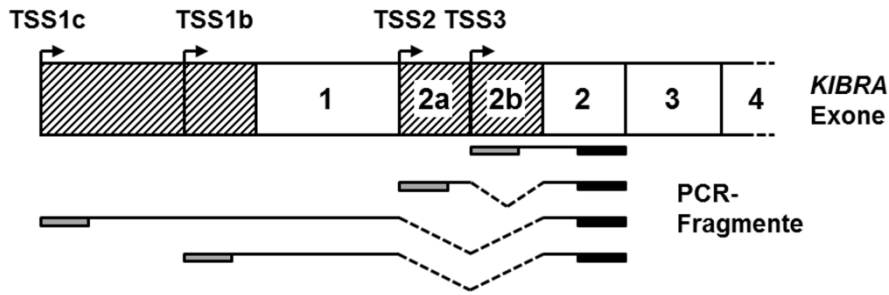


Abb. A1: Lokalisation der TSS-spezifischen Oligonukleotide

Für die Validierung der identifizierten TSS mittels semiquantitativer PCR wurden ein *antisense* Oligonukleotid in Exon 2 (schwarze Balken) und vier *sense* Oligonukleotide, die an den entsprechenden TSS lokalisiert waren (graue Balken), genutzt. Kodierende Exone sind durch weiße Kästchen dargestellt, alternative Exone und die 5'-UTR durch schraffierte Kästchen. Pfeile markieren die einzelnen TSS.

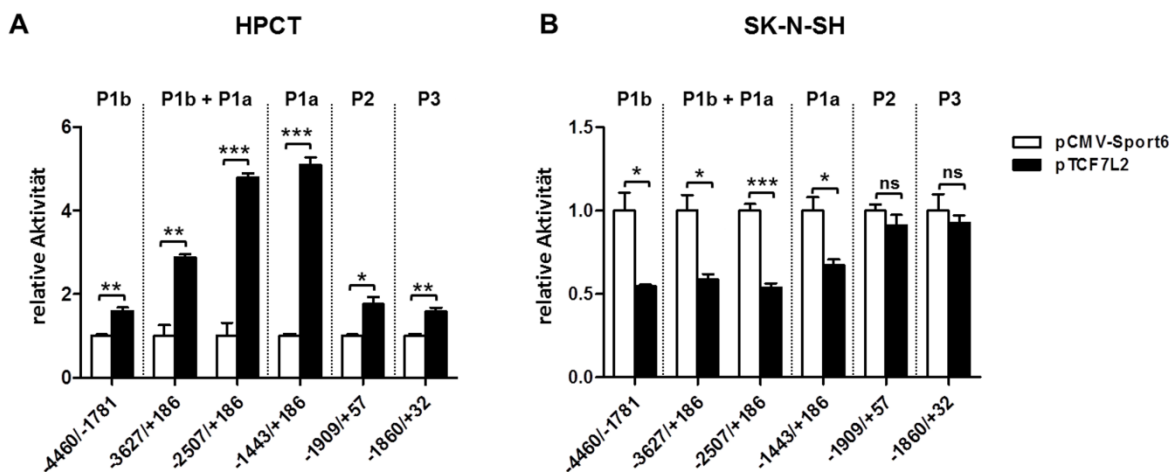


Abb. A2: TCF7L2-Überexpression führt in HPCT-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Transkriptionsaktivität

A) Die Überexpression von TCF7L2 führte in den HPCT-Zellen zu einer signifikanten, bis zu ~5-fachen Steigerung der Transkriptionsaktivität des Promotorbereichs P1a im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Durch die Überexpression von TCF7L2 stieg die Transkriptionsaktivität von Promotor P2, P3 und P1b leicht an. **B)** In den SK-N-SH-Zellen führte die Überexpression von TCF7L2 zu einer leichten Abnahme der Transkriptionsaktivität der Promotorbereiche P1b und P1a, hatte aber keinen Effekt auf die Intronpromotoren P2 und P3. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001; **<0,01; *<0,05; ns=nicht signifikant.

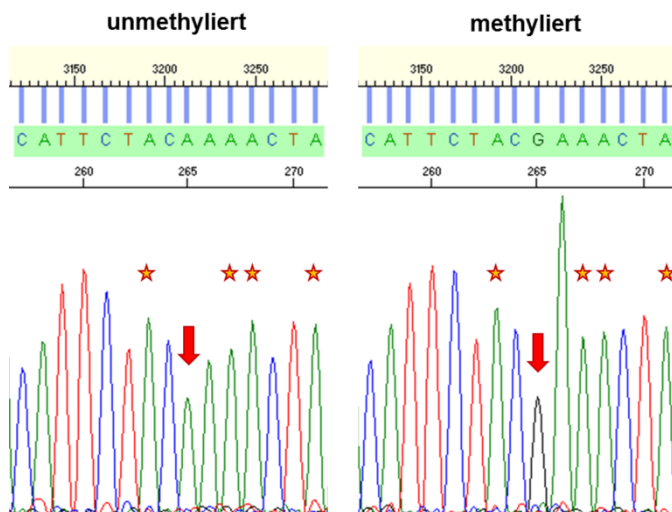


Abb. A3: Sequenzierung der bisulfidkonvertierten DNA

Darstellung einer Sequenzierung des reversen Strangs. Bei der Methode der Bisulfidkonvertierung wird das Prinzip der hydrolytischen Desaminierung von unmethylierten Cytosin zu Uracil genutzt. In der anschließenden PCR wird an der Stelle des unmethylierten Cytosin ein Thymin eingebaut. In der Sequenzierung wird dies deutlich: Alle unmethylierten Cytosine wurden in Thymin umgewandelt (Stern). Liegt eine Methylierung des CpG-Dinukleotides vor, ist es vor der Desaminierung geschützt (roter Pfeil rechts).

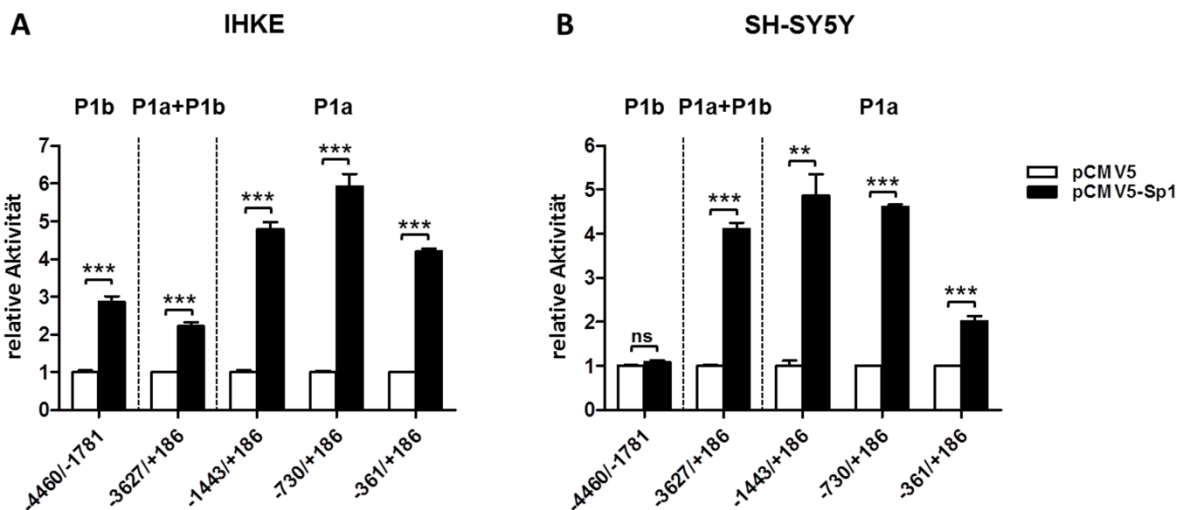


Abb. A4: SP1 ist an der konstitutiven KIBRA-Expression beteiligt

A/B) Die Überexpression von SP1 führte in den IHKE- und SH-SY5Y-Zellen zu einem starken bis zu ~6,5-fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität des Core-Promotobereichs P1a. Die Transkriptionsaktivität des Promotorbereichs P1b stieg in den IHKE-Zellen ebenfalls bis auf das ~3-fache an. Im Gegensatz dazu war der Promotorbereich P1b unabhängig von der SP1-Überexpression in den SH-SY5Y transkriptionell inaktiv. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. ***<0,001; **<0,01; ns=nicht signifikant.

9. Kongressbeiträge

Guske K, Schmitz B, Ciarimboli G, Brand S-M and Brand E (2013). Epigenetic mechanisms regulate the human KIBRA expression. 37. *Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention*, Münster (Poster)

Guske K, Schmitz B, Ciarimboli G, Brand S-M and Brand E (2013). Epigenetic regulation of human KIBRA expression. 5. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie*, Berlin (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schmitz B, Schelleckes M, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M and Brand E (2012). Tissue-specific transcriptional regulation of KIBRA expression in human kidney and neuronal cells. 36. *Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention*, Berlin (Poster) - Posterpreis

Guske K, Schelleckes M, Schmitz B, Pavenstädt HJ, Brand S-M and Brand E (2012). Tissue-specific transcriptional regulation of KIBRA expression in human renal and neuronal cells. 4. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie*, Hamburg (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M, and Brand E (2012). Functional analysis of the KIBRA promoter portions in kidney and neuroblastoma cells. 22. *European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (ESH)*, London (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M, and Brand E (2012). Tissue-specific regulation of KIBRA gene expression in renal and neuronal cell-types. 78. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)*, Dresden (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M, and Brand E (2011). Characterization of KIBRA promoter portions in kidney and neuroblastoma cells. 35. *Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention*, Köln (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M and Brand E (2011). Tissue-specific differences in the regulation of KIBRA gene expression in kidney and neuroblastoma cells. *3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie*, Berlin (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M and Brand E (2011). Tissue-Specific regulation of *KIBRA* gene expression in neuroblastoma and kidney cells. *21. European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (ESH)*, Mailand (Vortrag)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M and Brand E (2011). Tissue-specific differences in the regulation of KIBRA gene expression. *77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)*, Frankfurt (Poster)

Guske K, Herrmann M, Schelleckes M, Schmitz B, Duning K, Kremerskothen J, Brand S-M and Brand E (2010). Functional analysis and characterization of the KIBRA promoter region. *34. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention*, Berlin (Poster) - Posterpreis

10. Publikationen

Schmitz B, Nedele J, Guske K, Maase M, Lenders M, Schelleckes M, Kusche-Vihrog K, Brand SM, Brand E (2014). Soluble Adenylyl Cyclase in Vascular Endothelium: Gene Expression Control of Epithelial Sodium Channel- α , Na⁺/K⁺-ATPase- α/β , and Mineralocorticoid Receptor. *Hypertension*. 63:753-761.

Guske K, Schmitz B, Schelleckes M, Duning K, Kremerskothen J, Pavenstädt HJ, Brand SM, Brand E (2014). Tissue-specific differences in the regulation of KIBRA gene expression involve transcription factor TCF7L2 and a complex alternative promoter system. *J Mol Med (Berl)*. 92:185-196.

Schmitz B, Vischer P, Brand E, Schmidt-Petersen K, Korb-Pap A, Guske K, Nedele J, Schelleckes M, Hillen J, Rötrige A, Simmet T, Paul M, Cambien F, Brand SM (2013). Increased monocyte adhesion by endothelial expression of VCAM-1 missense variation in vitro. *Atherosclerosis*. 230:185-190.

Duning K, Wennmann DO, Bokemeyer A, Reissner C, Wersching H, Thomas C, Buschert J, Guske K, Franzke V, Flöel A, Lohmann H, Knecht S, Brand SM, Pöter M, Rescher U, Missler M, Seelheim P, Pröpper C, Boeckers TM, Makuch L, Haganir R, Weide T, Brand E, Pavenstädt H, Kremerskothen J (2013). Common exonic missense variants in the C2 domain of the human KIBRA protein modify lipid binding and cognitive performance. *Transl Psychiatry*. 3:e272.

Wersching H, Guske K, Hasenkamp S, Hagedorn C, Schiwiek S, Jansen S, Witte V, Wellmann J, Lohmann H, Duning K, Kremerskothen J, Knecht S, Brand E, Floel A (2011). Impact of common KIBRA allele on human cognitive functions. *Neuropsychopharmacology*. 36:1296-1304.

Moll D, Prinz A, Brendel CM, Berrera M, Guske K, Zaccolo M, Genieser HG, Herberg FW (2008). Biochemical characterization and cellular imaging of a novel, membrane permeable fluorescent cAMP analog. *BMC Biochem*. 9:18.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Dr. Eva Brand für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas sowie das Vertrauen in meine Arbeit und Person, insbesondere im Vorfeld der letztlich erfolgreichen Publikation. Außerdem danke ich Ihr für die Möglichkeit, meine Arbeit sowohl auf diversen nationalen als auch internationalen Kongressen vorzustellen und daraus profitieren zu können. Ebenso danke ich Frau Univ.-Prof. Dr. Eva Liebau, meiner Betreuerin der biologischen Fakultät der WWU.

Hiermit möchte ich mich herzlich bei alle KollegInnen der Arbeitsgruppen von Frau Univ.-Prof. Dr. Dr. Eva Brand und Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan-Martin Brand für die freundliche Unterstützung in allen Phasen der Promotion bedanken. Dr. Boris Schmitz danke ich für die Einführung ins Labor, die Betreuung meiner Dissertation und die vielen produktiven Gespräche. Weiterhin möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor bei Dr. Malte Lenders bedanken. Den technischen AssistentInnen Birgit Orlowski, Mira Schiwiek und Alois Rötrige danke ich besonders für ihre uneingeschränkte Hilfe und gute Laune im Labor, ohne die ich diese Arbeit sonst nie geschafft hätte. Dem Geschäftszimmer, Petra Hemker und Melanie Langener möchte ich für die immer offene Tür und die motivierenden Worte danken. Mein Dank gilt ebenso Jutta Beilker und Anne Huster, die stets einen guten Kaffee und ein offenes Ohr für mich hatten wenn es nötig war. Bei meinen Mitdotorandinnen Johanna Nedele, Andrea Salomon und Mareike Herrmann möchte ich mich ganz herzlich für die schönen Zeiten auch neben dem Laboralltag bedanken.

Nicht zuletzt geht mein besonderer Dank an Michael Schelleckes, der mich auf diesem Weg begleitet hat und mir stets eine sehr große Stütze war. Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die immer an mich geglaubt, mich unterstützt und motiviert hat meinen Weg zu gehen. Dein Sonnenschein hat es geschafft!
