

1 Einleitung

Das H19-Gen zählt zu einer in den 90er Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnenden Gruppe von Genen, die dem sog. "genomischen Imprinting" unterliegen. Da die H19-Problematik in diesem Kontext zu sehen ist, wird im Folgenden zunächst die komplexe Thematik des Imprinting erläutert.

1.1 Genomisches Imprinting: geprägte Genexpression

Die Embryonalentwicklung von Säugetieren ist entscheidend davon abhängig, dass durch die Verschmelzung zweier haploider Gameten eine diploide Zygote entsteht, die sowohl das mütterliche als auch das väterliche Genom in sich trägt. Sollte nur eines der beiden Genome vorhanden sein, so kommt es zu schweren Fehlentwicklungen. Dies wurde zum ersten Mal in den 80er Jahren bei Mäusen gezeigt durch Manipulation einzelliger Embryonen: Enthielt die Zygote durch Transfer eines zweiten, mütterlichen Vorkerns (gynogenetische Zygote) oder durch Aktivierung der unbefruchteten Eizelle (parthenogenetische Zygote) lediglich das mütterliche Genom, entwickelten sich die Embryonen relativ normal, während das versorgende Trophoblastengewebe (Plazenta) stark retardiert war. Den umgekehrten Effekt beobachtete man bei androgenetischen Embryonen, die nach Transfer eines oder zweier väterlicher Vorkerne in eine entkernte Eizelle nur das väterliche Genom enthielten: schwach entwickelte Embryonen mit ausgeprägtem Trophoblastengewebe (Barton *et al.*, 1984, McGrath und Solter, 1984, Surani *et al.*, 1984). In keinem Fall konnten sich lebensfähige Individuen entwickeln. Auch beim Menschen sind solche stets letal verlaufenden uniparentalen Entwicklungen mit vergleichbarer Symptomatik bekannt: Bei den gestationsbedingten Trophoblastenerkrankungen beginnt durch die Befruchtung einer "leeren" (vorkernlosen) Eizelle eine androgenetische Entwicklung. Diese Scheinschwangerschaften weisen im Ultraschall statt des Embryos lediglich das charakteristische Rauschen proliferierenden Trophoblastengewebes auf, deren Malignität von der einfachen Blasenmole bis zum aggressiven Chorionkarzinom reichen kann (Schmidt-Matthiesen, 1989). Die parthenogenetische Variante (vermutlich als Resultat der Unterdrückung der zweiten meiotischen Teilung mit Chromosomen-Duplikation) bilden die Ovarteratome, die zu den Keimzelltumoren zählen. In ihnen finden sich ausdifferenzierte Gewebe aller drei Keimblätter (z.B. Haut, Haare, Zähne, glatte Muskulatur, Fett-, Nerven- und Drüsengewebe) mit organoide Komposition, wobei Plazentagewebe völlig fehlt (Ober und Thompson, 1985, Linder *et al.*, 1975).

Auch bei uniparentalen Disomien einzelner Chromosomen oder Teilen davon, die also zwei Kopien einer autosomalen Region von einem Elternteil hatten und keine des anderen, wurden bei Mäusen verschiedene Anomalien beobachtet wie hohe Sterblichkeit des Embryos bzw. Neugeborenen, Wachstums- und Verhaltensstörungen, je nachdem welches Chromosom betroffen war (Cattanach und Kirk, 1985). Als weiteres Beispiel für die Bedeutung der chromosomalen Herkunft ist die bevorzugte Inaktivierung des väterlichen X-Chromosoms im extraembryonalen Gewebe bei plazentabildenden Säugetieren sowie in somatischen Zellen von Beuteltieren anzuführen (Tagaki und Sasaki, 1975, Cooper *et al.*, 1993).

Somit wird deutlich, dass der jeweilige Beitrag der elterlichen Genome an der Entwicklung unterschiedlich ist, sie also funktionell nicht äquivalent sind. Da beide Elternteile jedoch prinzipiell das gleiche Genom und damit die gleichen Gene weitervererben, muss es also Gene geben, deren Expression abhängig ist vom Geschlecht des jeweiligen Elternteils, die also allelspezifisch differentiell exprimiert werden. Der diesem Phänomen zugrunde liegende Prozess wird genomisches oder parentales "Imprinting" (im Folgenden Prägung) genannt (Moore und Haig, 1991). Dadurch wird das klassische Bild von der Vererbung nach Mendelschen Regeln relativiert, bei der in diploiden Organismen beide Allele gleichermaßen zur Ausprägung des Phänotyps beitragen.

Geprägte Gene, Funktionen und Krankheiten

Die geprägte, d.h. allelspezifische, Expression von konkreten Genen wurde erstmals 1991 nachgewiesen für den fötalen Wachstumsfaktor Igf2 (insulin-like growth factor 2) und seinen Rezeptor Igf2r sowie für H19 mittels RNase-Protection-Assay bzw. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen. Man nutzte hierbei die Sequenzunterschiede (Polymorphismen) des zu untersuchenden Gens zwischen zwei Mäusearten, um die exprimierten Allele der Hybridmäuse der ersten Filialgeneration unterscheiden zu können (De Chiara *et al.*, 1991, Barlow *et al.*, 1991, Bartolomei *et al.*, 1991, Zhang und Tycko, 1992). Bis heute sind fast 40 solcher Gene bekannt (John und Surani, 2000), ihre Gesamtzahl wird auf 100 bis 200 geschätzt (Barlow, 1995), ein Teil ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Auffallend ist, dass geprägte Gene auf den Chromosomen häufig in bestimmten Regionen relativ nah beieinander in Clustern angeordnet sind. So ist das H19-Gen lediglich 90 bzw. 115 kb stromabwärts von IGF2 und INS2 (Schreibweise in Großbuchstaben für humane Variante des Gens) auf dem Chromosom 11 lokalisiert. Es wird daher angenommen, dass die Prägung durch regulatorische Elemente vermittelt wird, die größere Bereiche und mehrere Gene kontrollieren. Beispielsweise konkurrieren bei der genannte Gruppe von Genen die Promotoren um die gleichen Enhancer, was zur beobachteten reziproken Expression führt: Aktivieren auf dem maternalen

Chromosom die Enhancer die H19-Expression, sind auf dem gleichen Chromosom Ins2 und Igf2 von der Expression ausgeschlossen, während auf dem paternalen Chromosom die Situation umgekehrt ist (Leighton *et al.*, 1996).

Tabelle 1. Geprägte Gene in Säugetieren

Gen	Imprinting (Prägung)		exprimiertes Allel	Wachstum	chromosomale Lokalisation		Funktion
	Mensch	Maus			Mensch	Maus	
IGF2	+	+	pat	+	11p	7	Wachstumsfaktor
INS1 & 2	-	+	pat	+	11p	7	Insulin
H19	+	+	mat	+	11p	7	RNA
p57 ^{KIP2}	kd	+	mat	+	11p	7	Regulator des Zellzyklus
MASH2	kd	+	mat	+	11p	7	Transkriptionsfaktor
WT1	+	kd	mat		11p	2	Zinkfinger, Tumorsuppressor
SNRPN	+	+	pat		15q	7	Splicing-Faktor
ZNF127	+	+	pat		15q	7	Zinkfinger Protein
PAR5 & 1	+	kd	pat		15q	kd	RNA
IPW	+	kd	pat		15q	kd	RNA
PEG3	kd	+	pat	+	19q	7	Zinkfinger Protein
IGF2R	-	+	mat	+	6q	17	Rezeptor
MAS	kd	+	pat		6q	17	Protooncogen
PEG1/MEST	kd	+	pat	+	kd	6	Hydrolase
CDC25Mm	kd	+	pat		kd	9	Ras-Aktivator
SP2/U2afbp-rs1	-	+	pat		kd	11	Splicing-Faktor
XIST	kd	+	pat/zufällig		X	X	RNA, X-Inaktivierung

+: geprägt; -: nicht geprägt; pat: paternales Allel; mat: maternales Allel; kd: keine Daten, Wachstum: Beeinflussung des fötalen Größenwachstums (aus Nakao und Sasaki, 1996 bzw. Tilghman 1999)

Obwohl geprägte Gene durch allelspezifische Expression charakterisiert sind, wird ihre Expression wesentlich komplexer reguliert. So ist die bevorzugte Expression während der Embryonalentwicklung mit anschließender Abschaltung für z.B. H19 bekannt (Goshen *et al.*, 1993) oder auch gewebespezifische Prägung bzw. biallelische Expression in bestimmten Organen sowie Prägung nur in bestimmten Individuen (polymorphe Prägung) (Nakao und Sasaki, 1996; Jinno *et al.*, 1993). Geprägte Gene werden oftmals entwicklungsabhängig in der frühen Embryonalphase (bis einschließlich Blastozyst) zunächst biallelisch und erst danach monoallelisch exprimiert (Barlow, 1995).

Soweit die Funktion der geprägten Genprodukte bisher aufgeklärt werden konnte, lassen sie sich grob in folgende Gruppen einteilen: Wachstumsfaktoren bzw. ihre Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Splicing-Faktoren, Regulatoren des Zellzyklus sowie nichttranslatierte funktionelle RNAs. Sie spielen daher eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und -differenzierung, also

Prozessen, die bei der Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung sind. Neben ihrer bedeutenden Rolle für das Wachstum zeichnet sich auch ein Einfluss bei der Entwicklung des Gehirns ab. So ist beispielsweise die Prägung der Expression von UBE3A auf das Gehirn beschränkt (Vu und Hoffmann, 1997). Die Ausschaltung des Gens *Peg1/Mest* bei Mäusen, das im adulten Hypothalamus stark exprimiert wird, wurde begleitet von reduziertem mütterlichem Pflegeverhalten gegenüber der Nachkommenschaft (Levebvre *et al.*, 1998). Bei chimären Embryonen, deren Hirnzellen neben normalen Zellen auch androgenetische bzw. gynogenetische Zellen enthielten, verringerten die androgenetischen insgesamt die Hirngröße und trugen hauptsächlich zum Hypothalamus aber nicht zum Cortex bei. Gynogenetische Zellen förderten das Wachstum des vorderen Hirnbereiches und leisteten einen Beitrag hauptsächlich zu Cortex, Striatum und Hippocampus (Keverne *et al.*, 1996).

Durch die Bedeutung der geprägten Gene für die Entwicklung ist es nicht verwunderlich, dass es beim Menschen einige genetische Erkrankungen gibt, die mit ihnen in Zusammenhang stehen und familiär geschlechtsabhängig vererbt werden. Die damit verbundenen chromosomalen Deletionen oder uniparentalen Disomien betreffen ausschließlich oder bevorzugt entweder das maternale oder paternale Chromosom mit Clustern von geprägten Genen. So wird das Prader-Willi-Syndrom (PWS) durch eine Deletion der paternalen Chromosomen-Region 15q11-q13 hervorgerufen, wo sich eine Reihe geprägter Gene befindet, oder durch Vererbung zweier maternalen Chromosomen 15, d.h., die paternale Region dieses Chromosom fehlt im Genom. Ist im umgekehrten Falle die gleiche Region des maternalen Chromosoms betroffen, so bildet sich das Angelman-Syndrom (AS) aus. Beide unterscheiden sich in ihren klinische Phänotypen. PWS-Kinder sind von kleiner Statur und haben kleine Hände und Füße und zunächst Ernährungsprobleme durch schwaches Saugverhalten, sie entwickeln später jedoch Übergewicht und bleiben geistig zurück. AS-Patienten bleiben geistig viel stärker zurück, sind ataxisch (bewegungsgestört) und hyperaktiv mit unkoordinierten Zungenbewegungen, Saug- und Schluckverhalten sowie häufigem Übergeben (Lalande, 1997, Moore und Haig, 1991). Für das PWS spielt das geprägte *Snrpn*-Gen eine entscheidende Rolle, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte. Dabei ist jedoch das korrekte Proteinprodukt für PWS von untergeordneter Bedeutung, wie Mutationsanalysen belegten. Dagegen bewirkten Mikrodeletionen im Promotorbereich dieses Gens sowohl die Ausschaltung der Expression von *Snrpn* als auch mind. dreier weiterer paternal exprimierter geprägter Gene, die bis zu 1 Mb entfernt auf dem Chromosom liegen und zur Ausprägung des PWS-Phänotyps führten (Yang *et al.*, 1998). AS hingegen scheint hauptsächlich durch einen Verlust der Funktion des o.g. UBE3A ausgelöst zu werden (Vu und Hoffmann, 1997).

Eine auffallend große Zahl geprägter Gene beeinflusst das fötale Größenwachstum (Tabelle 1). Eine genetische Erkrankung in diesem Zusammenhang ist das Beckwith-Wiedemann-

Syndrom (BWS), dass durch Wachstumsstörungen wie z.B. überdurchschnittliches Wachstum von Teilen oder einer Seite des Körpers und eine vergrößerte Zunge gekennzeichnet ist. In 20 % der Fälle zeigt der Karyotyp Abnormitäten der Chromosomenregion 11p15 (uniparentale Disomien, Trisomien, Duplikationen, Inversionen und Translokationen), die in einem Cluster geprägter Gene u.a. IGF2 und H19 enthält (Lalande, 1997). Die Beteiligung erhöhter Mengen des Wachstumsfaktors IGF2 scheint erwiesen (Reik und Maher, 1997). Auch zeigen BWS-Patienten eine erhöhte Anfälligkeit für Tumore, wobei der Wilms Tumor zu den häufigsten zählt. Zwei bisher identifizierte beteiligte Chromosomen-Loci sind in der geprägten Region 11p13-15 lokalisiert worden und unterliegen selbst der Prägung (Lalande, 1997). Außerdem zeigen diese Tumore veränderte Prägungs- und Expressionsmuster weiterer dort lokalisierter geprägter Gene, u.a. IGF2 und H19 (*ibid.*).

Wie sich bereits beim BWS und Wilms Tumor andeutet, gilt auch bei der Tumorgenese die Beteiligung geprägter Gene als wahrscheinlich. Extrembeispiele, bei denen das gesamte Genom nur von einem Elternteil stammt, wurden bereits erwähnt (Choriokarzinom, Ovarteratom). Bei Tumoren kommt es durch Anhäufung von genetischen Schädigungen zur klonalen Evolution von normalen, wachstumskontrollierten Zellen über vermehrt teilungsfähige Tochterzellen bis zu völlig unkontrolliert-proliferativen Krebszellen (Cavenee und White, 1995). Wesentlichen Anteil an dieser Entwicklung haben dabei zwei Ereignisse: die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen (wachstumsbegrenzend) bzw. die Aktivierung von Protooncogenen (wachstumsbeschleunigend) (Feinberg, 1993). Die Inaktivierung kann nach Knudsons Zwei-Treffer-Theorie erreicht werden durch die Mutation eines Allels und den Verlust des anderen durch chromosomale Deletion (Knudson, 1971). Dieser Prozess wird als Verlust der Heterozygotie bezeichnet (LOH = loss of heterozygosity). Bevorzugtes LOH für ein bestimmtes elterliches Allel wurde in mehreren Tumoren beobachtet, was eine Beteiligung der Prägung an diesen Prozess nahe legt (Nakao und Sasaki, 1996). Auch wird der Verlust der Prägung (LOI = loss of imprinting) bzw. fehlerhafte Prägungsmuster mit veränderter Expression geprägter Gene mit dem Tumorfortschritt in Verbindung gebracht (Rainier *et al.*, 1993). LOH und LOI von IGF2 und H19 wurden für eine Reihe von Tumoren beschrieben, insbesondere für die, die in der Kindheit auftreten (Übersicht in Nakao und Sasaki, 1996). Die Expression von H19 beispielsweise wird normalerweise nach der Geburt weitgehend abgeschaltet. In einer Reihe von Tumoren dagegen wird H19 z.T. sogar biallelisch exprimiert (*ibid.*, Elkin *et al.*, 1995). Dabei nimmt beim Blasenkarzinom die Menge der H19-Transkripte mit steigender Malignität zu, besonders im äußeren, invasiven Bereich des Tumors, so dass die Verwendbarkeit von H19 als Tumormarker diskutiert wird (Ariel *et al.*, 1995).

Die genannten pathologischen Erscheinungen machen deutlich, dass es für die normale Embryonalentwicklung extrem wichtig ist, zum richtigen Zeitpunkt über die richtige Dosis an Produkten geprägter Gene zu verfügen. Denn androgenetische oder gynogenetische Entwicklungen besitzen ja ebenfalls ein Prägungsmuster und geprägte Genprodukte, jedoch haben sie die doppelte Dosis eines Elternteils und keine Produkte des anderen. Das Muster unterliegt auch einer entwicklungsabhängigen zeitlichen Änderung und ist im erwachsenen ausdifferenzierten Organismus anders als im entwickelnden Embryo. In diesem Kontext sind sicherlich auch die Probleme zu sehen, die bei der Klonierung von Säugetieren mittels *in-vitro*-Embryontechnologien immer wieder auftreten. Viele Phänotypen der dabei auftretenden Anomalien weisen Parallelen zu jenen auf, die im Zusammenhang mit geprägten Genen stehen, darunter auch das "large offspring syndrome", das dem BWS ähnelt. Veränderte Prägungsmuster für mehrere geprägte Gene, darunter auch *Igf2* und *H19*, konnten nachgewiesen werden und sind auf *in-vitro*-Kulturtechniken der Zellen bzw. bereits etablierte Prägungsmuster bei Kerntransfertechniken zurückzuführen, die nicht dem einer vergleichbaren normalen Entwicklung entsprechen (Young und Fairburn, 2000).

Mechanismen der Prägung

Die genomische Prägung ist charakterisiert durch die Expression lediglich eines der beiden elterlichen Allele, während das jeweils andere durch Abschaltung von der Expression ausgeschlossen ist. Da beide Elternteile jedoch grundsätzlich das gleiche Genom mit der gleichen genetischen Ausstattung vererben, kann der der Prägung zugrunde liegende Mechanismus nicht in unterschiedlichen DNA-Sequenzen begründet sein. Dies wird auch dadurch deutlich, dass ein Genallel je nach Geschlechtsausprägung des Individuums in einer Generation beispielsweise paternal vererbt werden kann und in der nächsten maternal. Für dieses Phänomen der vererbaren Änderung der Genexpression ohne Änderung der primären DNA-Sequenz wird der Begriff "Epigenetik" verwendet.

Damit die geprägten Gene bereits in der Embryonalentwicklung ihre herkunftsabhängige Wirkung entfalten können, müssen die notwendigen Markierungen zur Unterscheidung der Allele bereits in den haploiden Gameten vor der Vereinigung zur diploiden Zygote bzw. vor der Vorkernfusion vorhanden sein. Die Markierung muss stabil während der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben werden, damit jede Zelle des Embryos die korrekte Prägung aufweist. Auch in diploiden Zellen muss die Markierung auf ein elterliches Chromosom beschränkt bleiben. Schließlich muss die Markierung reversibel sein, um in der Keimbahn nach der Festlegung des embryonalen Geschlechts neu etabliert zu werden (Barlow, 1995). Der genaue Mechanismus der gametenspezifischen Markierung in den beiden Keimbahnen, ihre notwendige Ausradierung und

Neuetablierung in der nächsten Generation ist bisher nur schwach verstanden. Der aussichtsreichste Kandidat jedoch für diese Markierung ist die Methylierung der Cytosin-Base an Position 5 in CpG-Dinukleotiden mittels enzymatischer Übertragung einer Methylgruppe aus S-Adenosyl-methionin.

Die Methylierung von CpG-Sequenzen scheint ein wichtiger Regulierungsmechanismus bei Wirbeltieren zu sein, der, obwohl auch in Bakterien vorhanden, parallel zur zunehmenden Komplexität der Genome auftrat (Tajima und Suetake, 1998). Das humane Genom weist lediglich 10 % der erwarteten Frequenz an CpGs auf, von denen 70-80 % methyliert sind. Daneben gibt es jedoch sog. CpG-Inseln, in denen dieses Dinukleotid mit hoher Frequenz vorkommt und in wesentlich geringerem Umfang methyliert ist. Diese Inseln sind assoziiert mit Transkriptionsstartpunkten in Promotorbereichen, wobei die Methylierung i.d.R. die Unterdrückung der Genexpression bewirkt, so dass Methylierungsmuster mit gewebespezifischen Expressionsmustern korrelieren (Baylin, 1997). Dabei ragt die Methylgruppe in die große Furche der Doppelhelix und verhindert so die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren oder Proteine binden spezifisch methylierte DNA und ändern dabei die Chromatinstruktur derart, dass die Transkription unterdrückt wird (Tajima und Suetake, 1998). Um als Markierung bei der Prägung wirken zu können, wäre durch enzymatische De- und Remethylierung die erforderliche Reversibilität des Methylierungsmusters erfüllt.

Allelspezifische Methylierung kann nachgewiesen werden durch den Verdau genomischer DNA eines Embryos, der durch eine Deletion homozygot ist für eines der elterlichen Allele, mit einer methyl-cytosinsensitiven Restriktionsendonuklease (*Hpa* II, *Hha* I). Beim Arbeiten ohne Deletionen müssen zusätzlich Polymorphismen zur Unterscheidung der Allele herangezogen werden. Da die Enzyme nicht schneiden, wenn die Erkennungssequenz methyliert ist, ist das Auftreten unterschiedlicher großer maternal- bzw. paternal-genomischer Fragmente nach der Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde diagnostisch für die differentielle Methylierung. Es können allerdings nur die Methylierungsstellen nachgewiesen werden, die Teil einer solchen Schnittstelle sind (Stöger *et al.*, 1993).

Einen direkteren und quantitativen Nachweis der Methylierung von Cytosin in DNA-Molekülen stellt die Bisulfit-Sequenzierung dar. Hierbei werden durch Behandlung mit Natriumbisulfit alle Cytosine, nicht jedoch die 5-methyl-Cytosine, von DNA-Einzelsträngen in Uracil umgewandelt. Anschließend werden beide Stränge PCR-amplifiziert (Uracil wird durch Thymin ersetzt), so dass nur die ursprünglich methylierten Cytosine als Cytosine amplifiziert und durch Sequenzierung schließlich identifiziert werden können (Clark *et al.*, 1994, Olek *et al.*, 1996).

In der Tat konnte durch mannigfaltige Untersuchungen gezeigt werden, dass die Methylierung bei der Prägung eine wichtige Rolle spielt. So katalysiert das Enzym DNA-Methyltransferase 1

(Dnmt1) die DNA-Methylierung, wobei ihr Substrat hemimethylierte DNA ist. Sie gibt somit bei der Replikation Methylierungsmuster an die Tochterstränge weiter und dient der Aufrechterhaltung der Muster. Fehlt Mäusen dieses Enzym, so sterben sie während der Embryonalentwicklung mit demethyliertem Genom, wobei H19 biallelisch und Igf2 bzw. Igf2r gar nicht mehr exprimiert werden, also keine geprägte, differentielle Genexpression mehr stattfindet (Li *et al.*, 1993). Für diese geprägten Gene konnten allelspezifisch unterschiedliche Methylierungen in Ei- und Samenzelle nachgewiesen werden (Tremblay *et al.*, 1995, Stöger *et al.*, 1993). In der frühen Embryonalentwicklung (bis zum Blastocyst) kommt es zu einer genomweiten Demethylierung, wonach durch *de-novo*-Methylierung die Differenzierung mit gewebespezifischer Expression etabliert wird. Von diesen Prozessen sind geprägte Gene durch bisher unbekannte Schutzmechanismen ausgenommen (Jaenisch 1997), sie behalten also ihr allelspezifisches Methylierungsmuster bei, was für eine geprägte Expression ab diesem Zeitpunkt absolut notwendig ist. In den Keimbahnzellen allerdings müssen auch die Markierungen der geprägten Gene ausgeradiert und neu etabliert werden. Eine DNA-Demethylierungsaktivität konnte *in vitro* in Zellkultur-Extrakten nachgewiesen werden, wobei an diesem Prozess eine RNA beteiligt zu sein scheint (RNase-Sensitivität, Weiss *et al.*, 1996). Schließlich konnte kürzlich ein Säugetier-Protein identifiziert werden, das 5-methyl-CpG-DNA demethylieren kann (Bhattacharya *et al.*, 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass somatische Zellkerne in ursprünglichen Keimbahnzellen durch Demethylierung quasi umprogrammiert werden und davon auch die geprägten Gene betroffen sind (Tada *et al.*, 1997). Werden hypomethylierte, Dnmt1-defiziente Zellen mit Dnmt1-cDNA transfiziert, werden die Methylierungsmuster nichtgeprägter Gene wiederhergestellt, nicht jedoch diejenigen der geprägten Gene. Erst die Passage durch die Keimbahn stellt auch ihre allelspezifische Methylierung wieder her, die demnach durch andere Methyltransferasen vermittelt wird (Tucker *et al.*, 1996). Kürzlich wurden schließlich *de-novo*-Methyltransferasen identifiziert und kloniert, die also unmethylierte DNA methylieren können (Okano *et al.*, 1998, 1999). Werden Mäuse-Methyltransferasen in *Drosophila* (hat keine endogene Methylierung) exprimiert, so werden Methylierungsmuster etabliert und aufrecht erhalten, was bei *Drosophila* zu letalen Entwicklungsstörungen führt (Lyko *et al.*, 1999). Methylierung scheint somit eine essentielle Rolle bei der Prägungsmarkierung zu spielen, da sie Einfluss auf die Genexpression hat und vererbbar und reversibel ist.

Methylierung ist somit zumindest Teil der Markierung zur Unterscheidung der Allele. Die eigentliche Steuerung der Genaktivität ist jedoch ein wesentlich komplexerer und noch weitgehend ungeklärter Prozess, an dem weitere Faktoren beteiligt sind. So können geprägte Gene trotz allelspezifischer Methylierung in der Embryonalentwicklung zunächst biallelisch und erst nach der Einpflanzung im Uterus monoallelisch exprimiert werden (Barlow 1995). Meist ist die Methylierung mit der Abschaltung des Gens verbunden, es gibt jedoch Ausnahmen: Bei Igf2

z.B. ist die Methylierung zur Expression notwendig (Barlow, 1997). Sicherlich ist die Bindung verschiedener Proteinfaktoren (Aktivatoren oder Repressoren) beteiligt, die u.a. Einfluss auf die Chromatinstruktur haben. So wurde gezeigt, dass DNA-Methylierung die Acetylierung von Histonen beeinflusst, wobei nichtmethylierte, transkribierte DNA mit acetylierten Histonen assoziiert ist (durch die Acetylierung der Aminogruppe des Lysinrestes geht eine positive Ladung verloren, was zur schwächeren Bindung an die negativ geladene DNA führt) (Eden *et al.*, 1998). Daneben sind die für geprägte Gene charakteristischen differentiell methylierten Regionen (DMR) im unmethylierten Zustand durch Hypersensitivität für DNase I bzw. Restriktionsendonukleasen gekennzeichnet (auch bei H19), die auf die Bindung von Nicht-Histon-Proteinen zurückzuführen ist (Feil und Koshla, 1999). Auch für das benachbarte Paar H19/Igf2, das bei der Expression um die gleichen Enhancer konkurriert, wurde kürzlich ein Nicht-Histon-Protein identifiziert (CTCF), das die Prägungs-Kontroll-Region 5' von H19 im unmethylierten Zustand bindet und als Chromatinbegrenzer oder Insulator die Wechselwirkung der 100 kb entfernten Igf2-Promotoren mit den Enhancern unterbindet, so dass H19 exprimiert wird (Adam und Felsenfeld, 2000, Hark *et al.*, 2000).

Daneben beginnt sich die Beteiligung ungewöhnlicher Antisense-RNAs bei der Expression geprägter Gene abzuzeichnen, mit denen Genabschaltungen in Abwesenheit direkter Methylierungen in Promotorbereichen erklärbar wären. So konnten reziprok geprägte Antisense-Transkripte für UBE3A (Rougeulle *et al.*, 1998) und Igf2r bei der Maus (Wutz *et al.*, 1997) nachgewiesen werden, d.h., sie werden von dem Allel gebildet, dessen Sense-Produkt abgeschaltet ist. Im Falle von Igf2r ist im Intron Nr. 2 eine DMR und der Startpunkt des Antisense-Transkriptes, das sich über die enorme Länge von 107 kb erstreckt und somit auch die Grenzen zu anderen codierenden Sequenzen überquert. Auch innerhalb des KvLQT1-Gens, das im geprägten Cluster 11p15 lokalisiert ist und maternal exprimiert wird, wurde ein reziprok geprägtes Antisense-Transkript nachgewiesen, das im Bereich der DMR gebildet wird und dessen LOI in BWS auftritt (Lee *et al.*, 1998, Smilnich *et al.*, 1999). Für eine DMR von Igf2 konnten ebenfalls Antisense-Transkripte nachgewiesen werden, sie werden aber vom selben Allel gebildet wie die Sense-Transkripte (Moore *et al.*, 1997). Es werden daher Szenarien diskutiert, bei denen die Transkription der Antisense-RNA durch Methylierung reguliert wird und mit der Transkription der Sense-RNA auf demselben Chromosom konkurriert bzw. diese unterbindet, sei es durch Verschluss des Sense-Promotors, durch Anlagerung des Antisense-Transkriptes an das Chromosom mit Chromatin-Strukturänderung oder durch Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren bzw. Enhancer (Reik und Constancia, 1997). Daneben könnte jedoch auch die gleichzeitige Transkription beider RNAs und ihre Interaktion die Expression des Sense-Produktes unterdrücken (Tilghman, 1999). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass sich in jüngerer Zeit

doppelsträngige RNA-Moleküle von mehr als 500 bp Länge in einer ganzen Reihe von Organismen (darunter auch Mäuseembryonen) als effektive, sequenzspezifische Inhibitoren der Genexpression erwiesen haben (Fire, 1999, Tabara *et al.*, 2000).

Auch bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei weiblichen Säugetieren, die der Dosis-Kompensation von Genprodukten dieses Chromosoms in beiden Geschlechtern dient, haben RNA-Moleküle eine wichtige Funktion. Die Inaktivierung unterliegt ebenfalls einer Art Prägung, denn im Gegensatz zu den somatischen Zellen, in denen herkunftsunabhängig ein X-Chromosom zufällig inaktiviert wird, wird im extraembryonalen Plazentagewebe das paternale inaktiviert (Tagaki und Sasaki, 1975). Auch spielt die Methylierung eine entscheidende Rolle (Jaenisch, 1997). Vom inaktiven X-Chromosom wird beim Menschen ein 17 kb langes, wie H19 nicht-codierendes Transkript namens Xist produziert, das sich an dem X-Chromosom anhäuft und für die Inaktivierung essentiell ist, wobei auch hier die Assoziation von Proteinen und die Chromatinstruktur beeinflusst werden (Stuckenholz *et al.*, 1999, Constanzi und Pehrson, 1998). Auch für die Xist-RNA wurde eine entsprechende Antisense-Variante namens Tsix entdeckt, die als Regulator für Xist zu dienen scheint. Denn vor der Differenzierung und X-Inaktivierung werden beide kotranskribiert. Die Tsix-RNA verschwindet jedoch, wenn sich Xist auf dem zu inaktivierenden X-Chromosom anzureichern beginnt. Auf dem aktiven X-Chromosom dagegen wird Tsix weiter transkribiert, bis Xist nicht mehr nachweisbar ist (Stuckenholz *et al.*, 1999).

Ein weiteres Charakteristikum geprägter Genloci (auch Igf2/H19) ist ihre asynchrone Replikation, d.h., während der S-Phase werden die beiden elterlichen Allele nicht gleichzeitig, sondern zu unterschiedlichen Zeitpunkten repliziert, wobei der Unterschied ca. 1,0 - 1,5 h beträgt. Dies ist bereits bei der ersten Runde der embryonalen DNA-Synthese der Fall und wird in jeder Zellgeneration während der Entwicklung aufrecht erhalten (Simon *et al.*, 1999). In der Keimbahn jedoch werden bei der Differenzierung der Gameten unmittelbar vor der Meiose die geprägten Genloci wieder synchron repliziert (*ibid.*), ein Vorgang, der an das Ausradieren und Neuetablieren von Methylierungsmustern der geprägten Gene bei der Gametogenese erinnert. Ob die unterschiedlichen Replikationszeitpunkte ein weiterer Mechanismus der Prägung sind oder lediglich die Folge von differentieller Methylierung, Proteinbindung und Chromatinstruktur, ist unbekannt.

Somit zeichnet sich bei der genomischen Prägung ein komplexes Netzwerk ab aus CpG-reichen, differentiell methylierten und von direkten Wiederholungseinheiten flankierten DNA-Regionen, ungewöhnlichen RNAs (Antisense, nichtcodierend) und Proteinfaktoren, die sich in veränderten Chromatinstrukturen, Replikationszeitpunkten und schließlich entwicklungs- und gewebeabhängigen, allelspezifischen Expressionsmustern manifestieren, wobei die einzelnen Faktoren und ihre Wirkungsweisen noch weitgehend unbekannt sind (Reik und Walter, 1998).

Evolution und Sinn der genomischen Prägung

Die genomische Prägung und die damit verbundene allelspezifische Genexpression stellen eigentlich ein Paradox dar: Durch die Stilllegung eines der elterlichen Allele wird der Diploidie-Vorteil aufgegeben, bei dem bei Ausfall eines Allels das andere kompensatorisch wirken kann. Warum also beeinflussen Elterntiere die Genexpression ihrer Nachkommenschaft in dieser Art und Weise, was könnte die evolutionär treibende Kraft sein?

Das Phänomen der genomischen Prägung scheint innerhalb der Wirbeltiere auf die Säugetiere beschränkt zu sein und dort auch nur in Plazentatieren aufzutreten, nicht jedoch in Beutel- oder eierlegenden Kloakentieren (es gibt jedoch erste Hinweise, dass *Igf2* und *Igf2r* auch in Beuteltieren geprägt werden (John und Surani, 2000)). Bei den Plazentatieren geht die Entwicklung der Nachkommenschaft innerhalb des Mutterkörpers besonders weit unter Ausbildung einer hochentwickelten invasiven Plazenta zur Versorgung des Embryos. Diese Entwicklung ist bei Beuteltieren weniger ausgeprägt und erfolgt meist ohne bzw. mit einer nichtinvasiven Plazenta. Bei eierlegenden Tieren schließlich findet gar kein Austausch zwischen Muttertier und Nachkommenschaft mehr statt, sobald die Eier gelegt sind. Bei Plazentatieren dagegen entwickelt sich der Embryo in einem parasitenähnlichen Verhältnis und ist ganz auf die permanente Nährstoffzufuhr seiner Mutter angewiesen. Diese Zufuhr über die Plazenta muss wegen der rasanten Proliferation von Embryo und Plazenta während der ganzen Entwicklung reguliert werden, weil Störungen katastrophale Folgen haben können für den Embryo, seine Geschwister desselben Wurfes und das Muttertier. Die meistdiskutierte Hypothese bei der Evolution der Prägung wurde 1991 von Moore und Haig entwickelt, die einen Konflikt der Interessen der elterlichen Genome um die Zuteilung der mütterlichen Ressourcen an die Nachkommenschaft vorschlugen. Das Interesse des väterlichen Genoms ist dabei, dass der Embryo möglichst viel von den begrenzten Ernährungsressourcen der Mutter nutzt, um möglichst wohlgenährt nach der Geburt bessere Überlebenschancen zu haben und sich wiederum fortpflanzen zu können. Dies geschieht auf Kosten des Muttertieres und der zukünftigen Würfe, die bei den im allgemeinen polygamen Säugetieren von anderen Vätern stammen. Das Interesse des mütterlichen Genoms hingegen ist es, die Ressourcen gleichmäßig zwischen den Würfen zu verteilen, damit die Zahl der Nachkommen zu maximieren und nicht die Nachkommen eines einzelnen Vaters zu bevorzugen. Es kommt daher zum Tauziehen: Ein väterlich kontrollierter Funktionsgewinn, der das Wachstum verstärkt, erzeugt einen Selektionsdruck auf das mütterliche Genom, dies durch einen Antagonisten auszugleichen, bis schließlich eine Kompromiss-Wachstumsrate als Gleichgewicht erreicht wird.

Dieses Modell sagt also voraus, dass geprägte Gene die embryonale Wachstumsrate beeinflussen und dabei väterlich exprimierte Gene das Wachstum fördern, während mütterliche es

begrenzen. In der Tat trifft diese Vorhersage für eine erstaunlich große Zahl geprägter Gene zu, von denen keines zum Zeitpunkt der Aufstellung der Hypothese bekannt war. Wird beispielsweise bei Mäusen der paternal exprimierte fötale Wachstumsfaktor *Igf2* deletiert, so resultiert ein Phänotyp, der um 40 % kleiner ist als normalerweise. Werden dagegen die maternal exprimierten Gene *H19* oder *Igf2r* deletiert (*Igf2r* ist ein Rezeptor für *Igf2*, der dessen lysosomalen Abbau vermittelt und so die *Igf2*-Konzentration vermindert), so entstehen übergroße Phänotypen, wobei die *Igf2r*-Mutanten zusätzlich nicht lebensfähig sind. Doppelmutanten mit Deletionen von *Igf2* und *H19* bzw. *Igf2* und *Igf2r* sind von normaler Größe und lebensfähig (Jaenisch, 1997, Tilghman, 2000). Werden chimäre Embryonen erzeugt aus biparentalen und androgenetischen (AG, 2x pat. Genom) bzw. parthenogenetischen (PG, 2x mat. Genom) Stammzellen, so sind die Embryonen nicht lebensfähig, wobei die AG-Chimären größer und die PG-Chimären kleiner als normal sind. AG-Zellen tragen dabei im Wesentlichen zu Muskel und Hypothalamus bei, aber nicht zum Cortex, während PG-Zellen genau umgekehrt wesentlich zum Cortex beitragen, aber kaum zu Muskel und Hypothalamus (Jaenisch, 1997). Interessant ist hierbei der Vergleich mit Chimären aus biparentalen und "geretteten" *Dnmt1*-defizienten Zellen (durch Einführung einer *Dnmt1*-cDNA (Methyltransferase) wird das Methylierungsmuster nichtgeprägter Gene wieder hergestellt, die geprägten Gene jedoch bleiben demethyliert). Diese chimären Tiere entwickelten sich normal, wobei die defizienten Zellen gleichmäßig zu Muskel und Gehirn beitrugen. Somit besteht also die von Jaenisch vorgeschlagene Möglichkeit, dass die genomische Prägung ein entbehrlicher Prozess ist, sofern die Prägung von beiden elterlichen Genomen entfernt wird (1997).

Eine weitere Vorhersage aus der dargestellten Hypothese wäre, dass die Prägung durch das Reproduktionsverhalten einer Art beeinflussbar wäre und nicht zwangsläufig zwischen den Säugetierarten konserviert sein muss. Hierzu führt Jaenisch (1997) das Beispiel der Mäusestämme *P. polionotus* (monogam) und *P. maniculatus* (polygam) an, die vergleichbare Körpergewichte aufweisen. Werden beide Stämme gekreuzt, so hängt das Körpergewicht der Nachkommen vom elterlichen Ursprung ab: Nachkommen eines *P. polionotus*-Weibchens und eines *P. maniculatus*-Männchens sind größer als die der Einzelstämme, während die umgekehrte Kreuzung kleinere Nachkommen produziert. Somit scheint das Ausmaß der Prägung in beiden Stämmen verschieden zu sein, so dass die wachstumsverstärkende Wirkung paternal exprimierter Gene des polygamen Männchens nicht oder kaum ausgeglichen werden durch maternal kontrollierte Gene des monogamen Weibchens. In der monogamen Population ist die genomische Prägung als Selektionsdruck von geringerer Bedeutung, da beide Elternteile das gleiche Interesse an all ihren Nachkommen haben, was mit der dargestellten Hypothese gut übereinstimmt. Allerdings unterliegen bei *P. polionotus* gerade die erwähnten Gene *Igf2*, *Igf2r* und *H19* ebenfalls der genomischen Prägung, was der Theorie widerspricht (Tilghman, 2000). Dennoch könnten die

beobachteten Phänotypen durch andere, wachstumsregulierende geprägte Gene in Übereinstimmung mit der Hypothese hervorgerufen werden.

Andere paternal exprimierte Gene wie *Peg3* bzw. *Peg1/Mest* führen bei Deletionen oder Mutationen neben dem reduzierten Wachstum auch zu reduziertem mütterlichen Pflegeverhalten gegenüber der Nachkommenschaft (Li *et al.*, 1999). Während das reduzierte Wachstum von der Hypothese vorhergesagt wird, wird die Verhaltensänderung in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Denn das paternal vererbte, verstärkte Pflegeverhalten käme erst in der Tochter zum Ausdruck und würde demnach erst die Enkel positiv beeinflussen. Diese erhalten jedoch von der Tochter Gene, die mit gleicher Wahrscheinlichkeit vom Vater oder von der Mutter stammen können, so dass ein evolutionärer Selektionsdruck angezweifelt wird (Hurst *et al.*, 2000).

Die gestörten Verhaltensweisen in Bezug auf die Ernährung des Neugeborenen (Saug- und Schluckverhalten, veränderte Wachstumsraten) bei den bereits erwähnten genetischen Erkrankungen, bei denen geprägte Chromosomenregionen betroffen sind, werden von der Hypothese ebenfalls vorhergesagt. Denn neben dem Plazentawachstum werden mütterliche Ressourcen durch das Neugeborene in Anspruch genommen durch sein Verhalten, das Saugen als zunächst einziger Nahrungsquelle, den Appetit, den Nährstoffmetabolismus und insgesamt durch dessen Wachstumsrate auch auf Kosten der Geschwister, die innerhalb eines Wurfes von anderen Vätern stammen können (Moore und Haig, 1991).

Andere Hypothesen besagen, dass die genomische Prägung der Verhinderung von Trophoblasterkrankungen oder von Keimbahntumoren der Ovarien dienen könnte (Varmuza und Mann, 1994) oder durch Verhinderung der Parthenogenese die sexuelle Reproduktion obligatorisch wurde. Auch wurde vermutet, dass die genomische Prägung wichtig sein könnte im frühen Embryo für die Bereitstellung haploider Genprodukte zur Zuordnung säugetierspezifischer Zelllinien wie dem Trophoctoderm oder als Überwachungsmechanismus gegen Chromosomenverlust und Krebs (erwähnt bei Jaenisch, 1997). Auch als Nachkomme eines Restriktions-Modifikationssystems gegen Fremd-DNA wurde die Prägung erwähnt (Barlow, 1993).

In Anbetracht jedoch der Komplexität der genomischen Prägung und seiner Bedeutung für Wachstum, Differenzierung und Hirnfunktionen erscheint die Konflikt-Hypothese als die wahrscheinlichste, da sie mit den meisten beobachteten Phänomenen kompatibel ist und sich die aus ihr abgeleiteten Vorhersagen als erstaunlich zutreffend erwiesen.

1.2 Die H19-RNA

Ursprünglich entdeckt wurde die H19-cDNA im Jahre 1984 auf der Suche nach Genen, deren Expression wie das α -Fetoprotein (Oncofötaler Proteinmarker, Tumormarker) unter der Kontrolle der *trans*-agierenden Gene *Rif* und *raf* auf das Embryonalstadium beschränkt ist und nach der Geburt abgeschaltet wird (Pachnis *et al.*, 1984). Die H19-Sequenz der Maus wurde 1988 veröffentlicht (Pachnis *et al.*), die des Menschen 1990 (Brannan *et al.*). Beide mRNA-Sequenzen sind zu 77 % identisch, mit knapp 2.300 gleich lang, und die Gene weisen nur wenige (4) außergewöhnlich kleine Introns auf (Σ Maus: 270, Mensch: 347 Nukleotide), was für geprägte Gene charakteristisch zu sein scheint (Hurst *et al.*, 1996). Die Sequenzen zeigen viele Start- und dicht dahinter liegende Stop-Codons in allen drei Leserastern (Mensch: 21 Start- und 45 Stop-Codons), und es konnte kein konservierter ORF identifiziert werden. Der jeweils längste theoretische ORF würde bei der Maus ein Polypeptid von 135 Aminosäuren codieren, beim Menschen 256 Aminosäuren. Alle Versuche, die mRNA *in vitro* zu translatieren oder mittels eines Antikörpers gegen das theoretische Polypeptid ein endogenes Protein in H19-produzierenden Zelllinien nachzuweisen, scheiterten (Brannan *et al.*, 1990, Lippmann *et al.*, unpublished). Dabei übt die 5'-Sequenz vor dem theoretischen ORF einen stark inhibierenden Einfluss auf die Translatierbarkeit aus (Joubel *et al.*, 1996). Obwohl die H19-RNA wie eine mRNA gespliced und polyadenyliert wird, codiert sie offenbar für kein Protein; ihre Funktion scheint also an das RNA-Molekül geknüpft zu sein. Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass die H19-RNA nicht mit Ribosomen assoziiert ist (Brannan *et al.*, 1990). Allerdings belegen neuere Untersuchungen doch die Möglichkeit einer Assoziation der RNA mit Polysomen (Li *et al.*, 1998). Die H19-RNA scheint dennoch zur ungewöhnlichen Klasse nichtcodierender, mRNA-ähnlicher RNAs zu gehören, von denen bisher nur wenige bekannt sind und deren Funktionen oder Wirkungsweisen weitgehend unbekannt sind (Erdmann *et al.*, 1999). Diese RNAs, zu denen die bereits erwähnte Xist-RNA gehört, werden auch als Riboregulatoren bezeichnet. Die cytosolische H19-RNA sedimentiert im Saccharose-Gradienten mit einem Koeffizienten von 28S, der nicht dem der nackten RNA entspricht, so dass eine Assoziation mit Proteinen angenommen wird (Brannan *et al.*, 1990). Keines dieser Proteine war zum Beginn der vorliegenden Arbeit identifiziert.

1991 wurde die monoallelische, maternale Expression der Maus-H19-RNA mittels RNase-Protection-Assay nachgewiesen (Bartolomei *et al.*) und 1992 mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus für die humane H19-RNA (Zhang und Tycko). Die Expression der H19-RNA in der Maus beginnt mit dem Blastozyst-Stadium und ist während der Embryonalentwicklung eine der häufigsten mRNAs in Endoderm- und Mesodermgeweben (1% der mRNA bzw. in Plazenta vergleichbar mit β -Actin (Rachmilewitz, 1995)), während sie im Ektoderm (u.a. zentrales

Nervensystem) gar nicht vorkommt. Nach der Geburt wird die H19-Expression abgeschaltet mit Ausnahme von Herz- und Skelettmuskel, wo sie auf verringertem Niveau nachzuweisen ist (Tilghman *et al.*, 1992). Der H19-RNA wird eine Rolle bei der zellulären Entwicklung und Differenzierung zugeschrieben, da die H19-Expression im Embryonalstadium mit einsetzender Differenzierung ansteigt und in Zellkultur durch Differenzierung induzierbar ist (Glassman *et al.*, 1996). Weiterhin sind die zeitlichen und gewebespezifischen Expressionsmuster von H19 und dem geprägten, paternal exprimierten fötalen Wachstumsfaktor Igf2 weitgehend identisch (Leighton *et al.*, 1996). Beide Gene sind in nur 100 kb Entfernung (Maus: 90 kb) auf demselben Chromosom lokalisiert (Mensch: 11p15.5, Maus: 7). Die Promotoren beider Gene benutzen zur Expression die selben Enhancer, die 9 bzw. 11 kb stromabwärts vom H19-Transkriptionsstartpunkt lokalisiert sind, wie durch Deletionen des entsprechenden Bereiches gezeigt werden konnte (Leighton *et al.*, 1995). Außerdem ist eine Region stromaufwärts von H19 von Bedeutung: Eine maternale 10 kb-Deletion von H19 und der angrenzenden 5'-Region bewirkt die Expression des normalerweise abgeschalteten Igf2-Gens (Leighton *et al.*, 1995a). Dies führte zur Entwicklung des Enhancer-Kompetitionsmodells, bei dem die Promotoren beider Gene um dieselben Enhancer konkurrieren und sich so wechselseitig ausschließen, dass vom maternalen Chromosom H19 exprimiert und Igf2 unterdrückt wird, während auf dem paternalen Chromosom die Situation umgekehrt ist. Dementsprechend gibt es eine 2 kb große DMR stromaufwärts von H19, deren Hypermethylierung das inaktive paternale H19-Allel charakterisiert und dessen Deletion die geprägte Expression sowohl von H19 als auch Igf2 zerstört, beide also koexprimiert werden (Thorvaldsen *et al.*, 1998).

Neuere Daten waren jedoch mit einer reinen Enhancer-Kompetition nicht vereinbar: Wird beispielsweise nur das H19-Gen ohne die Promotorbereiche durch ein Protein-codierendes Gen ersetzt, so führte dies zur sporadischen Expression des Proteins vom paternalen Allel, während gleichzeitig die allelspezifische Expression von Igf2 unbeeinflusst blieb (Jones *et al.*, 1998). Dies bedeutete gleichzeitig, dass die H19-RNA nicht an der Prägung von Igf2 beteiligt ist, wie aus den o.g. Deletionsexperimenten mit veränderter Igf2-Expression und der Beteiligung der Xist-RNA an der Inaktivierung des X-Chromosoms vermutet werden konnte. Die geprägte Expression von Igf2 ist nicht abhängig von der Methylierung von Igf2, sondern von der Nähe zum H19-Gen und seiner 5'-flankierenden Bereiche (Jones *et al.*, 1998). Auch wird nach der Deletion des H19-Gens inklusive des Promotors, also bei Abwesenheit jeglicher Transkriptionseinheit, Igf2 normal geprägt, die Stilllegung des maternalen Allels also nicht durch Konkurrenz zwischen Igf2- und H19-Promotoren vermittelt (Schmidt *et al.*, 1999). Werden die von beiden Genen genutzten Enhancer von ihrer normalen Position stromabwärts von H19 in den Bereich zwischen Igf2 und H19 (also stromaufwärts) verschoben, so wird deren geprägte Expression umgekehrt: Auf dem

unmethylierten maternalen Chromosom ist das Igf2-Gen aktiviert, während H19 trotz fehlender Methylierung stillgelegt ist (Webber *et al.*, 1998). Diese Indizien führten schließlich zur Annahme, dass die 2 kb stromaufwärts von H19 gelegene Prägungs-Kontrollregion (eine DMR) als Chromatin-Begrenzer oder Insulator dient, die die produktive Interaktion zwischen den Enhancern und den Igf2-Promotoren behindert (Schmidt *et al.*, 1999). Die Begrenzung wird vermittelt durch ein Zinkfinger-Protein namens CTCF, das an diese Region im unmethylierten Zustand bindet und dadurch Igf2 reprimiert, während H19 exprimiert wird und umgekehrt (Hark *et al.*, 2000, Bell und Felsenfeld, 2000).

Bisher konnte kein Zusammenhang festgestellt werden zwischen der Produktion der H19-RNA und der Stilllegung von Genen, sie scheint an der geprägten Expression nicht beteiligt zu sein. Es gibt daher Vermutungen, dass das H19-Gen und der Vorgang seiner Expression lediglich der Regulierung von Igf2 dienen, während das Produkt des Gens, die H19-RNA, entbehrlich und überflüssig ist (Jones *et al.*, 1998). Die konservierte Primär- und Sekundärstruktur würde in diesem Modell die Notwendigkeit widerspiegeln, diese sehr reichliche RNA zu verpacken und zu isolieren (*ibid.*). Dies wäre dann eine völlig neue Funktion für ein Gen. Dabei stellt sich die Frage, ob die Evolution einen derartigen Weg der Energieverschwendung einschlagen würde, denn neben der Produktion einer sinnlosen RNA müssten auch die entsprechenden Bindungsproteine zur Verfügung gestellt werden.

Gegen eine Funktionslosigkeit der H19-RNA spricht die bereits früh gemachte Beobachtung, dass in bestimmten embryonalen Tumorzelllinien, die selbst praktisch keine H19-RNA produzieren, die Induktion der H19-Expression nach der Transfektion mit einem entsprechenden H19-Vektor zur deutlichen Verlangsamung des Wachstums bzw. zu morphologischen Veränderungen der Zellen führten sowie zur Unterdrückung der verankerungsunabhängigen Kolonieformation in Soft-Agar und der Tumorbildung *in vivo* (Hao *et al.*, 1993). Die H19-RNA wurde daraufhin als Tumorsuppressor diskutiert. Dies korrelierte mit der gleichzeitigen Entdeckung, dass der 3'-nichttranslatierte Bereich (3'UTR) der α -Tropomyosin-mRNA ebenfalls Tumorsuppressor-Aktivität zeigte (Rastinejad *et al.*, 1993). Die Tumorsuppressor-Aktivität von H19 ist jedoch umstritten, da diese Ergebnisse nur mit bestimmten Zelllinien zu erzielen waren, während bei anderen Zelllinien die Tumorbildung nach subkutaner Injektion von verstärkter H19-Produktion begleitet wurde und eine Reihe von Tumoren H19 z.T. biallelisch exprimieren (Rachmilewitz *et al.*, 1995, Elkin *et al.*, 1995, Ariel *et al.*, 1997). Dabei schien die H19-Expression mit der Tumorbildung zu korrelieren, wobei H19 auch in Tumoren auftrat, die von Geweben stammen, in denen normalerweise nie H19 exprimiert wird (Nervengewebe). Ob dabei H19 eine aktive Rolle bei der Tumorgenese spielt oder sie als Folge der Tumorbildung auftritt, ist unbekannt (Lustig-Yariv *et al.*, 1997). Da sie sowohl in Embryonal- als auch in Tumorgewebe

auftritt, wird sie als oncofötale RNA bezeichnet (Ariel *et al.*, 1997). Es wird daher diskutiert, ob H19 als Tumormarker verwendbar ist ähnlich wie andere oncofötale Produkte, wie z.B. das carcinoembryonic antigen (CEA) oder das α -Fetoprotein (AFP, *ibid.*). Die Benutzung des H19-Gens als Tumormarker mittels *in-situ*-Hybridisierung von Gewebeproben mit markierten H19-Antisense-Sonden zum Zwecke der Diagnose und Prognose ist seit 1995 patentiert (Hochberg, Abraham und Ariel, Ilana, PCT/EP95/00823, Pub. No. WO 95/24503, Date 14.09.95 und US5955273 vom 21.09.99).

Weiterhin wurde gezeigt, dass in Wilms Tumoren die Abwesenheit des H19-Transkripts mit einem erhöhten Niveau an IGF2-Transkripten korreliert und die H19-Expression die Translatierbarkeit (Polysomenassoziation) der IGF2-mRNA negativ beeinflusst, was eine aktive Rolle der H19-RNA an der Regulierung von IGF2 nahelegt (Li *et al.*, 1998). Dies wurde bestätigt durch Wilkin *et al.*, die zeigten, dass bei einer IGF2- und H19-produzierenden Zelllinie die Überexpression von H19-Sense-RNA nach stabiler Transfektion zwar keinen Einfluss auf die IGF2-Produktion hatte, wohl aber die Expression geringerer Mengen an H19-Antisense-RNA. Die IGF2-mRNA wurde proportional zur H19-Antisense-RNA bis zu achtfach angereichert, vermutlich durch Inaktivierung der endogenen H19-Sense-RNA mittels Antisense-RNA (2000). Hierbei wurde auch die Expression eines Reportergens unter IGF2-Promotorkontrolle durch die Expression von H19-Sense-RNA negativ beeinflusst, nicht jedoch durch H19-Antisense-RNA. Juan *et al.* reproduzierten schließlich die Unterdrückung der Kolonieformation in Soft-Agar durch Expression des H19-Transkriptes in derselben Zelllinie wie Hao *et al.* 1993 (2000). Darüber hinaus zeigten sie, dass für diese Funktion die ersten 700 Nukleotide der RNA und die Abwesenheit der Introns entbehrlich sind. Antisense-Konstrukte hatten keinerlei Effekt auf die Unterdrückung der Proliferation.

Weitere Hinweise darauf, dass die H19-RNA eine Funktion hat, stammen aus Analysen der Sequenz bzw. Sequenzvergleichen. So untersuchten Hurst und Smith die Basensubstitutionsrate von H19, d.h. ob sie unter einem stabilisierenden Selektionsdruck steht oder sich ohne Druck frei evolutionär verändern kann (1999). Hierzu verglichen sie von mehreren hundert orthologen Genen von Ratte und Maus die Evolutionsrate an vierfach degenerierten Stellen (an diesen Stellen spezifiziert jede der vier Basen an der dritten Codonstelle dieselbe Aminosäure) mit der Evolutionsrate jeder Base der Exons von H19. Es zeigte sich, dass H19 die niedrigste Substitutionsrate aufwies. Da die Introns von H19 jedoch deutlich höhere Raten aufwiesen als die Exons, kann dies nicht nur auf eine allgemein geringere Mutationsrate zurückzuführen sein, sondern ist vielmehr ein Indiz, dass die Exonsequenzen von H19 unter einem stabilisierenden Druck stehen und die RNA somit eine Funktion hat.

Juan *et al.* (2000) klonierten weitere H19-Sequenzen aus Säugetieren, so dass für ein Alignment schließlich 6 Sequenzen zur Verfügung standen (allerdings ohne die ersten nichtkonservierten 700 Nukleotide, die für die proliferationsbegrenzende Eigenschaft entbehrlich waren). Sie stellten fest, dass es drei hochkonservierte Inseln von 20 bis 40 Nukleotiden Länge gibt, die von Regionen schwacher Konservierung flankiert werden. Die allgemeinen Plotmuster der Nukleotid-identität als Funktion der Sequenzposition waren zwischen H19 und der 16S-RNA sehr ähnlich, während das Protein-codierende Erythropoetin-Gen im Bereich des ORF eine wesentlich uniformere Konservierung der Sequenz mit starker Sequenzfluktuation lediglich in den angrenzenden, nichttranslatierten Bereichen aufwies. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Struktur der H19-RNA für ihre Funktion von Bedeutung ist und nicht die Codierung eines Proteins, wie auch das Fehlen eines konservierten ORF belegt.

Dieselbe Arbeitsgruppe nutzte die Alignments zur theoretischen Berechnung von Sekundärstrukturmotiven der H19-RNA unter Berücksichtigung der freien Faltungsenthalpie und der covariationalen Watson-Crick-Paarungen (konservierte Basenpaarungspotentiale in Abwesenheit von konservierter Primärsequenz). Insgesamt 17 Helices werden vorhergesagt, dabei bilden die meisten lokale Hairpins, einige aber auch Paarungen, die das 5'-Ende (ohne die ersten, für die Unterdrückung der Proliferation entbehrlichen 700 Nukleotide) und das 3'-Ende der RNA in räumliche Nähe bringen. Für die entbehrlichen 700 Nukleotide des 5'-Endes werden keinerlei konservierte Paarungsbereiche prognostiziert. Eine der vorhergesagten Helices, die die Enden der RNA in räumliche Nähe bringen, wurde durch RNase H-Behandlung in Anwesenheit eines komplementären Oligonukleotids bestätigt (Juan *et al.*, 2000). Ansonsten gibt es in der Literatur keine experimentellen Daten zur Sekundärstruktur der H19-RNA. Insgesamt mehren sich aber Indizien, die dafür sprechen, dass die H19-RNA eine Funktion hat und diese mit ihrer konservierten Struktur in Verbindung steht. Da bereits sehr früh die Assoziation der H19-RNA mit Proteinen vermutet wurde (Brannan *et al.*, 1990), könnte die Funktion gerade in der Bindung von Proteinen und der Regulierung ihrer Funktion zu suchen sein.

Im September 2000 schließlich wurden die ersten humanen H19-bindenden Proteine veröffentlicht, die mittels UV-Crosslinking aus Lysaten einer Leberkrebszelllinie an die RNA gebunden wurden (Runge *et al.*, 2000). Es handelte sich um IMP1, einem Mitglied einer kürzlich entdeckten Familie von IGF2 mRNA-Bindungsproteinen (IMP, Nielsen *et al.*, 1999) sowie das "polyprymidine tract-binding protein". Dabei binden vier Moleküle von IMP1 an die 3'-terminalen 700 Nukleotide von H19, was zu einer zellulären Lokalisation der H19-RNA führt, die der IGF2-mRNA nach Bindung der IMPs entspricht (*ibid.*). Die genaue Funktion der IMPs ist unbekannt, jedoch beeinträchtigen sie nach der Bindung an die IGF2-mRNA deren Translatierbarkeit. Die gemeinsame Bindung der IMPs durch die IGF2-mRNA und die H19-RNA

ist ein weiteres Indiz dafür, dass IGF2 und H19 auch auf posttranskriptionellem Niveau in einem Zusammenhang stehen, wie bereits die zuvor erwähnte Negativ-Regulierung der IGF2-Expression durch das H19-Transkript andeutete (Li *et al.*, 1998). Der genaue Zusammenhang ist jedoch unbekannt genauso wie die Frage, ob die H19-RNA mit weiteren Proteinen interagiert und wie diese Interaktion die Funktion der Proteine beeinflusst.

1.3 Aufgabenstellung

Bis heute ist die Funktion der rätselhaften, geprägten H19-RNA unbekannt. Dieser normalerweise vom maternalen Allel exprimierten oncofötalen RNA werden sowohl Tumorsuppressor- als auch Tumormarker-Eigenschaften zugeschrieben. Ihre Expression ist reziprok gekoppelt mit der des fötalen Wachstumsfaktors IGF2 und scheint diesen sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene negativ zu regulieren. Es wird nicht ausgeschlossen, dass die H19-RNA eventuell gar keine Funktion hat und überflüssig ist. Jedoch verdichten sich die Hinweise, dass diese RNA eine konservierte Sekundärstruktur aufweist und eine Funktion hat, die mit ihrer Struktur in Verbindung stehen könnte. Eine strukturierte cytosolische RNA dieser Größenordnung legt den Verdacht nahe, dass es ein oder mehrere Proteinliganden gibt, die spezifisch mit dieser RNA interagieren. Es gab bereits sehr früh (1990) Hinweise auf eine Proteinassoziation dieser RNA, jedoch war zu Beginn dieser Arbeit keines der Proteine identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher spezifische Proteinliganden der humanen H19-RNA identifiziert werden.

Dazu müssen jedoch zuerst die experimentellen Grundlagen etabliert werden. Zunächst muss die cDNA-Sequenz kloniert werden, um die RNA *in vitro* in großen Mengen herstellen zu können. Dann muss die RNA so modifiziert werden, dass sie an einer Matrix immobilisiert werden kann, um sie schließlich mit isolierten Proteinen aus Humangewebe unter physiologischen Bedingungen zu inkubieren und die spezifischen Bindungspartner identifizieren zu können.