

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von Promotor-Enhancer-Spezifität mittels
CRISPR/Cas9-basiertem Austausch
cis-regulatorischer Elemente

Characterisation of promoter-enhancer specificity via CRISPR/Cas9-based exchange
of *cis*-regulatory elements

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cinzia Elena Giuliana Tarallo

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABSTRACT (deutsch).....	1
ABSTRACT (english).....	2
1. EINLEITUNG	3
1.1. REGULATION DER GENEXPRESSION	3
1.1.1 cis- und trans-regulatorische Elemente	3
1.1.2 Detektion und Identifizierung von CREs	5
1.1.3 Promotor-Enhancer-Interaktion im dreidimensionalen Raum	7
1.1.4 Superenhancer	10
1.2 EXTREMITÄTENENTWICKLUNG VON TETRAPODEN.....	12
1.2.1 Extremitätenentwicklung entlang drei Regulationsachsen	12
1.3 SONIC HEDGEHOG UND SEINE DISTALEN ENHANCER	15
1.3.1 <i>Shh</i> -Regulation während der Embryogenese.....	15
1.3.2 Chromatin-Architektur des <i>Shh</i> -Locus.....	19
1.4 SOX2 UND SEIN SUPERENHANCER.....	21
1.5 CRISPR/CAS9 ALS GENTHERAPEUTISCHES WERKZEUG.....	23
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
3. METHODEN UND MATERIAL	26
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	26
3.1.1 Primerdesign.....	26
3.1.2 Design und <i>Annealing</i> von <i>singleguide</i> RNAs.....	26
3.1.3 Klonieren	27
3.1.4 DNA-Isolation	29
3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.1.7 Sequenzierung nach Sanger.....	31
3.2 METHODEN DER ZELLKULTUR.....	32
3.2.1 Stammzellkultivierung	32
3.2.2 CRISPR/Cas9	33
3.2.3 Flp/FRT-System in C2-mES-Zellen.....	34
3.2.4 Transfektion von mES-Zellen	35
3.2.5 Morula-Aggregation	36
3.3 ANALYSE DER GENEXPRESSION.....	37
3.3.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	37
3.3.2 Quantitative-Real-Time-PCR (RT-qPCR)	37
3.3.3 Durchflusszytometrie und FACS	38
3.3.4 Immunzytochemie	38
3.3.5 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) und ChIP-qPCR	38

3.3.6 <i>LacZ</i> -Reporter-gen-Färbung	40
3.4 MATERIAL	41
3.4.1 Geräte	41
3.4.2 Softwares und Webseiten.....	41
3.4.3 Enzyme und Antikörper	42
3.4.4 Plasmide	43
3.4.5 Zelllinien	45
3.4.6 Kits, Puffer, Lösungen und weitere Reagenzien	46
3.4.7 Zellkulturmaterialien	46
3.4.8 ChIP und Immunzytochemie	47
3.4.9 Primer und sgRNAs.....	47
3.4.10 <i>Inserts</i> für Knock-In-Experimente	50
4. ERGEBNISSE	52
4.1 <i>GFP</i>- UND <i>Sox2</i>-ENHANCER-KNOCK-IN.....	52
4.2 ANALYSE DER REPORTERGEN-EXPRESSION IN GENEDITIERTEN G4-mES-ZELLEN	55
4.2.1 Durchflusszytometrie und FACS	55
4.2.3 Immunzytochemie	56
4.2.4 Enhancer-Aktivitätsmessung und Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR	58
4.3 POTENZIELLE REPRESSION DURCH HISTONMODIFIKATIONEN AM <i>Shh</i>-LOCUS NACH KNOCK-IN-EXPERIMENTEN	61
4.3.1 ChIP-qPCR zur Analyse der Histonmodifikationen am <i>Shh</i> -Locus.....	61
4.4 Analyse der ZRS300-Sequenzen verschiedener Spezies.....	66
4.4.1 <i>Alignment</i> der ZRS300 verschiedener Spezies	66
4.4.2 <i>In-vivo-LacZ</i> -Reportergenassays.....	68
5. DISKUSSION.....	70
5.1 <i>Sox2</i>-ENHANCER-INSERTION IST NICHT SUFFIZIENT ZUR AKTIVIERUNG DES <i>Shh</i>-PROMOTORS	71
5.1.1 Räumliche Nähe zwischen <i>Sox2</i> -Enhancer und <i>Shh</i> -Promotor führt nicht zu Genaktivierung	72
5.1.2 Faktoren jenseits der dreidimensionalen Chromatinstruktur.....	73
5.1.3 Grenzen der Experimente und mögliche zukünftige Experimente.....	75
5.2 BEDEUTUNG DER ZUR ZRS BENACHBARTEN ZRS300.....	78
5.2.1 ZRS300 zeigt keine Aktivität in der ZPA.....	78
5.3 ZUSAMMENFASSUNG.....	82
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	84
7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	97
8. LEBENS LAUF.....	98
9. DANKSAGUNG.....	99
10. BESCHEINIGUNG STATISTIK.....	100

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>Loop</i> -Extrusion einer Topologisch Assoziierten Domäne (TAD).....	9
Abbildung 2: Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme eines Maus-Embryo im Stadium E10.5-dpc.....	12
Abbildung 3: A Extremitätenknospe mit AP- und PD-Achse; B Schematische Darstellung der skelletalen Anteile eines menschlichen Arms.....	13
Abbildung 4: Die genregulatorische Landschaft des <i>Shh</i> -Locus.....	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der ZRS.....	17
Abbildung 6: Konservierung der ZRS in verschiedenen Spezies im Vergleich zum humanen Locus.....	18
Abbildung 7: <i>Sox2</i> -Locus.....	21
Abbildung 8: CRISPR/Cas9-System.....	24
Abbildung 9: sgRNAs für die Knock-In-Experimente.....	27
Abbildung 10: Homologe Rekombination nach einem Doppelstrangbruch.....	34
Abbildung 11: pKan-Plasmid für Klonierung der <i>Inserts</i> für die Knock-In-Experimente.....	44
Abbildung 12: pKan-ZRS-Homologiearme-Plasmid für das Klonieren der Plasmide für das <i>Sox2</i> -Enhancer-KI.....	44
Abbildung 13: A pKan- <i>Sox2</i> -SRR107-Plasmid B pKan- <i>Sox2</i> -SRR107-109-Plasmid.....	44
Abbildung 14: pKan- <i>GFP</i> -KI-Plasmid für das <i>GFP</i> -Knock-In.....	45
Abbildung 15: PX459-Plasmid.....	45
Abbildung 16: A pGkfrt- <i>LacZ</i> -Plasmid B pGkfrt- <i>LacZ</i> -Plasmid mit ZRS300-Insert.....	45
Abbildung 17: Insertfragment für <i>GFP</i> -Knock-In.....	51
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Knock-In-Experimente.....	53
Abbildung 19: Aufnahme eines <i>GFP</i> -Knock-In-Embryos in E10.5-dpc.....	54
Abbildung 20: <i>Dot Plot</i> der verschiedenen KI-mES-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.....	56
Abbildung 21: Immunzytochemie als Nachweis eines <i>GFP</i> - und <i>mCherry</i> -Signals.....	57
Abbildung 22: RT-qPCR: <i>GFP</i> -Expression in verschiedener KI-Zelllinien und embryonalen Geweben.....	59
Abbildung 23: RT-qPCR: <i>mCherry</i> -Expression verschiedener KI-Zelllinien und embryonalen Geweben.....	59
Abbildung 24: Primerpaar-Bindung der CHIP-qPCR.....	62
Abbildung 25: <i>Fold Change</i> der DNA-Menge von Histon-Trimethylierten Sequenzen nach CHIP-qPCR.....	63
Abbildung 26: <i>Fold Change</i> der DNA-Menge von Histon-Acetylierten Sequenzen nach CHIP-qPCR.....	64
Abbildung 27: Analyse der ZRS300 verschiedener Spezies mittels eines <i>Alignments</i>	67
Abbildung 28: <i>LacZ</i> -Reporterassays der ZRS300 verschiedener Spezies in Mausembryonen E10.5-dpc.....	69
Abbildung 29: Vergleich der <i>LacZ</i> -Reporterassays mit Beispielen aus der Literatur.....	80

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Beispiele für Histonmodifikationen mit deren Funktion und den Elementen, an denen sie zu finden sind.....	6
Tabelle 2: Vergleich zwischen den Eigenschaften von Superenhancer und regulären Enhancer.....	11
Tabelle 3: Temperaturprofil für <i>Annealing</i> -Reaktion.....	27
Tabelle 4: Durch <i>Gibson Assembly</i> klonierte Plasmide für die CRISPR/Cas9-Experimente.....	28
Tabelle 5: Verwendete Plasmide und Restriktionsenzyme für anschließendes <i>Gibson Assembly</i>	29
Tabelle 6: Reagenzien mit Volumenangabe für Genotypisierungs-PCRs.....	30
Tabelle 7: Temperaturprofil für Genotypisierungs-PCRs.....	30
Tabelle 8: Reagenzien für Kolonie-PCRs.....	31
Tabelle 9: Temperaturprofil für Kolonie-PCRs.....	31
Tabelle 10: Für diese Arbeit relevante Geräte.....	41
Tabelle 11: Softwares und Webseiten, die für diese Arbeit verwendet wurden.....	42
Tabelle 12: Enzyme und Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	42
Tabelle 13: Durch <i>Gibson-Assembly</i> klonierte Plasmide für Knock-In-Experimente.....	43
Tabelle 14: Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.....	45
Tabelle 15: Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	46
Tabelle 16: Puffer, Lösungen und weitere Reagenzien, die für diese Arbeit verwendet wurden.....	46
Tabelle 17: Media und Reagenzien für die Zellkulturarbeit.....	46f
Tabelle 18: Zusammensetzung der Puffer für das ChIP Experiment sowie Lösungen und Reagenzien des Immunzytochemie-Experiments.....	47
Tabelle 19: Liste aller verwendeter Oligonukleotide.....	48ff
Tabelle 20: Zusammenfassung der Knock-In-Experimente mit zugehörigen Zelllinien.....	53
Tabelle 21: Analytierte Gene und Sequenzen in der ChIP-qPCR mit Funktion sowie Histonmodifikationen.....	61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	LIF	<i>Leukemia Inhibiting Factor</i>
%	Prozent	<i>Lmbr1</i>	Limb Development Membrane Protein 1
∞	unendlich	μ	Micro
Abb.	Abbildung	m	milli
AER	Apical ectodermal ridge	Mb	Megabasen (1 000 000 bp)
AP	Anterior-Posterior	mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen
ATAC-seq	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>	mEF	murine embryonale Fibroblasten
ATP	Adenosin-Triphosphat	min	Minute
bp	Basenpaar	mRNA	Messenger RNA
Cas	<i>CRISPR-associated Protein</i>	n	nano
CCC	Chromatin conformation capture	Na	Natrium
ChIP	Chromatin immunoprecipitation	PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
Col1A1	Kollagen Typ I α1	PBS(-T)	Phosphat-gepufferte Saline (+0,1% Tween20)
CRE	cis-regulatorisches Element	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	PFA	Paraformaldehyd
Ct	cycle threshold	RIPA	Radioimmunoprecipitationassay
CTCF	CCCTC-binding factor	TE	Tris-EDTA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PIC	Preinitiationskomplex
DEPC	Diethylpyrocarbonat	qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
<i>Dhh</i>	Desert Hedgehog	PolyA	Poly-Adenin
DMEM	Dulbecco's modified ea-gle's medium	PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
DMSO	Dimethylsulfoxid	qPCR	quantitative PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid	Rpm	Runden pro Minute
dpc	days post coitum	RT-qPCR	Real-Time qPCR
E	Embryonalstadium	RT	Raumtemperatur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	s	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SBE4	<i>Shh</i> Brain Enhancer 4
ESC	Embryonale Stammzelle	SCC	Side Scatter
EtOH	Ethanol	SCR	Sox2 control region
g	Gramm	sgRNA	<i>singleguide</i> RNA
FACS	<i>Fluorescent-Activated-Cell-Sorting</i>	Shh	Sonic Hedgehog
FCS	Fetales Kälber Serum	SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
FFPT	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung	Sox2	Sex determining region y box 2
Flp	Flippase	SRR	Sox2 regulatory region
FRT	FLP recombinase target	TAD	Topologisch assoziierte Domäne
FSC	Format Scatter	<i>taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	TF	Transkriptionsfaktor
GFP	Green Fluorescent Protein	TSS	Transcriptionsstartstelle
gDNA	genomische DNA	UCSC	University of California, Santa Cruz
GTF	generelle TF	WT	Wildtyp
h	Stunde	x-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
H ₂ O	Dihydrogenoxid (Wasser)	ZPA	Zone of polarizing activity
H3K27ac	H3K27-Acetylierung	ZRS	ZPA regulatory sequence
H3K27me3	H3K27-Trimethylierung	ZNS	Zentrales Nervensystem
HAT	Histonacetyltransferase		
HSA	Horse Serum Albumin		
kb	Kilobasen (entspricht 1 000 bp)		
KI	Knock-In		
KO	Knock-Out		
LB	<i>lysogeny broth</i>		
l	Liter		

ABSTRACT (deutsch)

Die raumzeitlich koordinierte Regulation der Genexpression ist essenziell für die Funktionsweise und Entwicklung von Organismen. Ein zentraler genregulatorischer Mechanismus ist die spezifische Interaktion von Promotoren mit anderen *cis*-regulatorischen Elementen (CRE) wie Enhancern. Trotz zahlreicher Studien sind die zugrunde liegenden Prinzipien nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit wird die Spezifität der Promotor-Enhancer-Interaktion unter Verwendung des *Sonic-Hedgehog*-(*Shh*)-Locus näher charakterisiert. Dabei soll analysiert werden, ob die Aktivierung von Genen auf räumlicher Nähe basiert und Enhancer, wie angenommen, modular austauschbar sind.

Shh ist ein zentrales Morphogen während der Embryogenese. In der Extremitätenentwicklung ist die *Shh*-Expression auf den posterioren Teil der Extremitätenknospe beschränkt und wird dort allein durch den nicht redundanten Enhancer ZRS reguliert. Interessanterweise liegen *Shh*-Promotor und ZRS zelltypunabhängig durch eine vorgeformte Chromatinschleife in räumlicher Nähe zueinander.

Mittels eines CRISPR/Cas9-basierten Austausches der ZRS mit einem in Stammzellen aktiven *Sox2*-Enhancer und des *Shh*-Gens mit einem *GFP*-Reporter sollte in murinen Stammzellen eine ektope Aktivierung erzielt werden. In den generierten Stammzelllinien wurde jedoch keine *GFP*-Expression nachgewiesen. Epigenetische Analysen der geneditierten Zellen zeigten, dass der *Shh*-Promotor sowie der integrierte *Sox2*-Enhancer reprimiert und demnach inaktiv sind. Die räumliche Nähe des *Sox2*-Enhancers mit dem *Shh*-Promotor ist folglich nicht ausreichend für eine ektope Aktivierung in Stammzellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die *upstream* der ZRS liegende, hochkonservierte Sequenz – ZRS300 – mit potenziell *cis*-regulatorischer Funktion analysiert. Vorige Experimente zeigten einen letalen Verlauf beim Austausch der murinen ZRS300 mit der anderer Spezies. Eine Deletion der Sequenz in der Maus hatte jedoch keinen phänotypischen Effekt.

Im Vergleich zu der Sequenz anderer Spezies ist die murine ZRS300 partiell deletiert. *In-vivo*-Reporterassays der ZRS300 verschiedener Spezies in murinen Embryonen zeigten keine ZRS-ähnliche Aktivität, jedoch Aktivität im zentralen Nervensystem und in endodermalem Gewebe übereinstimmend mit der *Shh*-Expression. Eine potenziell ZRS300-induzierte *Shh*-Misexpression in diesen Geweben könnte den beobachteten letalen Phänotypen erklären.

Diese Arbeit zeigt, dass die aktivierende Wirkung von CREs nicht allein durch räumliche Nähe auf andere Loci im selben Zelltyp übertragbar ist. Darüber hinaus wurde die ZRS300 als neuer *Shh*-Enhancer mit zur ZRS differierendem Aktivitätsmuster charakterisiert.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit weitere Einblicke zur spezifischen Promotor-Enhancer-Interaktion, dessen Störung zur Entstehung verschiedenster Erkrankungen beiträgt. Die Charakterisierung der zugrunde liegenden Prinzipien ist wesentlich und kann folglich Erkenntnisse für zukünftige gentherapeutische Ansätze liefern.

ABSTRACT (english)

Spatiotemporally coordinated gene expression is crucial for functioning and development of organisms. An important mechanism of gene regulation is the specific interaction of promoters with other *cis*-regulatory elements (CRE), such as enhancers. Despite numerous studies, the underlying principles are not fully understood. The purpose of this work is to characterize the specificity of promoter-enhancer interactions utilizing the *Sonic Hedgehog* (*Shh*) locus as a model system and to analyze whether gene activation is based on spatial proximity and whether enhancers are modularly interchangeable, as assumed.

Shh is a central morphogen during embryogenesis. In limb development, *Shh* expression is restricted to the posterior part of the limb bud, where it is regulated exclusively by the not redundant enhancer ZRS. Interestingly, *Shh* promoter and ZRS lay cell type-independently in spatial proximity due to a preformed chromatin loop.

CRISPR/Cas9-based exchange of the ZRS with a *Sox2* enhancer which is active in stem cells and simultaneous exchange of the *Shh* gene with a *GFP* reporter should lead into ectopic gene activation in murine stem cells. However, no *GFP* expression was detected in the generated stem cell lines. Epigenetic analyses of the gene-edited cells showed that the *Shh* promoter and the integrated *Sox2* enhancer are repressed and therefore inactive. Spatial proximity of the *Sox2* enhancer and the *Shh* promoter is not sufficient for ectopic gene activation in stem cells.

In the second part of this work, ZRS300, a highly conserved sequence located upstream of ZRS, with potential *cis*-regulatory function was analyzed. Previous experiments showed that replacement of the murine ZRS300 with that of other species is lethal, yet, deletion of the sequence in the mouse has no phenotypic effects.

Compared to the sequence of other species the murine ZRS300 is partially deleted. *In vivo* reporter gene assays of ZRS300 from different species in murine embryos showed no ZRS-like activity, but activity in the central nervous system and endodermal tissue consistent with *Shh* expression. Potential ZRS300-induced *Shh* misexpression in these tissues could explain the lethal phenotype observed previously.

This work demonstrates that the activating effect of CREs is not transferable to other loci in the same cell type by spatial proximity alone. Furthermore, ZRS300 was characterized as a novel *Shh* enhancer with an activity pattern that differs from that of ZRS.

In summary, this work provides further insights into the specific promoter-enhancer interaction. The disruption of promoter-enhancer interaction contributes to the development of a wide range of disease. The characterization of the underlying principles is essential and may consequently provide insights for future gene therapy approaches.

1. EINLEITUNG

Das Genom eines jeden Organismus enthält mehrere Tausend Gene, das menschliche ca. 20.000 (International Human Genome Sequencing, 2004). Diese Gene codieren für viele verschiedene Proteine mit diversen Funktionen. Doch nicht jede Zelle benötigt und exprimiert jedes Gen. Um eine räumlich und zeitlich differenzierte Genexpression zu ermöglichen, ist eine kontrollierte Genregulation nötig, die an vielen verschiedenen Punkten der Genexpression ansetzt und eine Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen beinhaltet (Lee & Young, 2013). Allerdings ist die Genregulation trotz jahrzehntelanger Forschung noch nicht vollständig verstanden.

1.1. REGULATION DER GENEXPRESSION

Ein maßgebender Schritt in der Regulation der Genexpression ist die Transkription – das Umschreiben von Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Ribonukleinsäure (RNA) durch die RNA Polymerase II.

Seit der Entschlüsselung des humanen Genoms 2001 konnte gezeigt werden, dass erstaunlicherweise nur ca. 2 % des gesamten humanen Genoms protein-codierende Sequenzen enthält, während die restlichen 98 % nicht-codierende Bereiche sind und als „junk“-DNA („junk“ = engl. für Müll) bezeichnet wurden (Alexander et al., 2010; Consortium, 2001). In den nachfolgenden Jahren zeigte sich, dass diese nicht-codierenden Bereiche wichtige genregulatorische Information in Form von *cis*-regulatorischen Elementen (CREs) enthalten (Alexander et al., 2010; Consortium, 2012). Die wohl am besten charakterisierten CREs sind Promotoren und Enhancer, die zum Teil zwischen Spezies stark konserviert sind (Boffelli et al., 2004; Maeso et al., 2013; Panigrahi & O'Malley, 2021; Suryamohan & Halfon, 2015). Im Folgenden werden verschiedene Aspekte der Transkriptionskontrolle durch CREs genauer erläutert.

1.1.1 *cis*- und *trans*-regulatorische Elemente

cis- und *trans*-regulatorische Elemente sind wichtige Akteure der komplexen Genregulation in Eukaryonten. Chronologisch gesehen beginnt die Transkription mit der Initiation. Dafür werden Promotoren und Enhancer (CREs) benötigt, an denen u.a. Proteine sogenannte generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren (auch *trans*-regulatorische Elemente) binden können (Spitz & Furlong, 2012).

Die gut charakterisierten Promotoren und Enhancer weisen einige Gemeinsamkeiten auf, unterscheiden sich jedoch auch wesentlich durch ihre Position relativ zu ihrem Zielgen (Andersson, 2015; Bulger & Groudine, 2011).

1.1.1.1 Promotoren

Promotoren sind bis zu mehrere hundert Basenpaar (bp) lange Nukleotidsequenzen auf der DNA. Sie sind fester Bestandteil eines Gens und befinden sich am 5'-Ende des Nichtmatrizenstranges. Man

unterscheidet *core*-Promotoren, die sich unmittelbar an der Transkriptionsstartstelle (TSS) befinden von proximalen Promotoren, die definitionsgemäß 250 bp *upstream* der TSS liegen (Haberle & Stark, 2018; Lenhard et al., 2012). Durch die Wechselwirkung von Promotoren mit DNA-bindenden Proteinen, den Transkriptionsfaktoren (TF), wird die Transkription eines Gens initiiert (Haberle & Stark, 2018).

Die generellen TF (gTFs) erkennen spezifische Sequenzen wie beispielsweise eine TATA-Box im *core*-Promotor und bilden gemeinsam mit den rekrutierten Kofaktoren den Präinitiationskomplex (PIC) (Hampsey, 1998). Der PIC leitet im Weiteren die Transkription durch Rekrutierung der RNA-Polymerase II ein. *Core*-Promotoren haben nur eine geringe basale Aktivität, die ausreichend ist, die Transkription zu initiieren und durch andere Mechanismen verstärkt oder herunter reguliert werden kann (Haberle & Stark, 2018).

Durch Bindung von spezifischen TF an Sequenzen im proximalen Promotor kann die Transkription aktiviert beziehungsweise verstärkt werden (Haberle & Stark, 2018). Somit stellen Promotoren einen zentralen Aspekt der Transkriptionsinitiation dar.

1.1.1.2 Enhancer

Enhancer sind DNA-Sequenzen, demzufolge CREs, die durch Bindung verschiedener TF zur Aktivierung der Expression von assoziierten Genen führen (Buecker & Wysocka, 2012). Durch Interaktion eines Enhancers mit dem entsprechenden Promotor des Zielgens, kommt es zur Transkriptionsinitiation.

Enhancer sind typischerweise 100 bis 1000 bp lang und können *upstream* (Richtung 5'-Ende), *downstream* (Richtung 3'-Ende) oder innerhalb eines Gens, auch in ihrem Zielgen, liegen (Panigrahi & O'Malley, 2021; Tourmente et al., 1993). Die Entfernung zwischen Enhancer und dem Zielgen ist im Mittel um die 20 bis 50 Kilobasen (kb) lang (Furlong & Levine, 2018). Enhancer können jedoch auch sehr distal, bis zu 1,5 Megabasen (Mb), von ihrem Zielpromotor entfernt, sein (Lettice et al., 2003; Long et al., 2020) oder sogar auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (Lomvardas et al., 2006; Sanyal et al., 2012). In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass räumliche Nähe und so Interaktion zwischen distalen CREs durch sogenannte Chromatinschleifenbildung geschaffen wird (Tolhuis et al., 2002), worauf später in 1.1.3 detaillierter eingegangen wird.

Weitere Annahmen sind, dass Enhancer unabhängig von ihrer Orientierung funktionieren (Ong & Corces, 2011), mehrere Gene kontrollieren können (Nickol & Felsenfeld, 1988) und promiskuitiv agieren, was bedeutet, dass sie Gene wahllos aktivieren, sofern sie von diesen nicht räumlich isoliert sind (Core & Lis, 2009; Krijger & de Laat, 2016; Symmons et al., 2014). Dennoch zeigen mittlerweile auch andere Experimente, dass die ursprünglich angenommene Promiskuität nicht allgemein gültig ist (Catarino & Stark, 2018; Krijger & de Laat, 2016; Martinez-Ara et al., 2021; Zabidi et al., 2015).

1.1.1.3 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die als *trans*-regulatorische Elemente fungieren. Sie regulieren die Genexpression, indem sie an CREs binden (Ong & Corces, 2011; Spitz & Furlong, 2012). Sie erkennen dabei spezifische DNA-Motive mit einer variierenden Sequenzlänge von 6 – 12 bp innerhalb dieser CREs (Spitz & Furlong, 2012). Weitere TF und Koaktivatoren wie der Mediator-Komplex sowie letzten Endes die RNA-Polymerase II werden zu den Zielgenen rekrutiert, um die Transkriptionsinitiation zu ermöglichen (Lee & Young, 2000). Mittlerweile wurde eine Vielzahl an TFs charakterisiert, einige kommen ubiquitär in unterschiedlichen Zelltypen vor, andere sind zelltypspezifisch (Spitz & Furlong, 2012; Zhou et al., 2017). Beispielsweise werden in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) bestimmte TFs, wie die sogenannten Master-TF Sox2 (Sex determining region Y Box 2), Nanog und Oct4 (Oktamer-bindender TF) benötigt, um die Pluripotenz zu erhalten (Chambers & Tomlinson, 2009; Kashyap et al., 2009).

Ein anderes bemerkenswertes Beispiel für die bedeutende Funktion von Transkriptionsfaktoren sind *Homöobox (Hox)*-Gene. *Hox*-Gene sind hochkonservierte Gene, die zu Transkriptionsfaktoren exprimiert werden (Pearson et al., 2005). Sie steuern die Funktion von anderen Genen, die für die Morphogenese aller Tieren, die eine Körperachse besitzen, bedeutend sind (Pearson et al., 2005). Durch *Hox*-Gene und die Gene, die sie im weiteren Verlauf aktivieren, werden Körperbaupläne bzw. die Ausbildung von verschiedenen Segmenten entlang der Körperachse, bestimmt (Akam, 1995).

Das genetische Repertoire eines jeden Organismus ist vielfältig. Doch nicht alle Gene sollen in jeder Zelle und zu jeder Zeit exprimiert werden, wodurch deutlich wird, dass eine koordinierte Genregulation durch *cis*- und *trans*-regulatorische Elemente erforderlich ist. Unter anderem ist dabei der Aktivitätszustand der CREs von wichtiger Bedeutung (Consortium, 2012). Die Detektion von aktiven oder inaktiven CREs kann folglich auch Hinweise auf eine ablaufende Genregulation geben (Heintzman et al., 2009).

1.1.2 Detektion und Identifizierung von CREs

Der Aktivitätszustand von CREs kann unter anderem durch Modifikationen an DNA-bindenden Histonen beeinflusst werden (Creyghton et al., 2010). Durch Histonmodifikation wird die Zugänglichkeit der DNA für TF und damit der Aktivitätsstatus von CREs gesteuert (Creyghton et al., 2010; Heintzman et al., 2009). Die Analyse von Histonmodifikationen kann demzufolge Aufschluss darüber geben, ob CREs in einem aktiven oder reprimierten Zustand vorliegen (Creyghton et al., 2010).

1.1.2.1 Regulation und Identifikation von CREs durch Histonmodifikation

Chromatin bezeichnet die Gesamtheit aus Histon-Proteinen und DNA. Dabei assemblieren sich Oktamere aus Histon-Proteinen, um die wiederum 147 bp der DNA gewickelt sind, zu sogenannten Nucleosomen (Vasudevan et al., 2010). Diese Histonoktamere bilden sich aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4

(Eickbush & Moudrianakis, 1978). Durch posttranslationale Modifikation der Histone werden die Eigenschaften der Interaktion zur DNA verändert und Möglichkeit zur Regulation der Genexpression geschaffen (Wu et al., 1986). Vor allen Dingen die Modifikationen an den Lysinresten sind vielseitig und können unterschiedliche Auswirkungen haben (Consortium, 2012). Einige Beispiele sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Modifikation von Histonen stellt einen epigenetischen Mechanismus dar, durch den die Aktivität von Genen und auch von CREs für einen bestimmten Zeitraum festgelegt werden kann (Creyghton et al., 2010; Imhof & Becker, 2001). Demnach können sowohl Gene als auch CREs über die Detektion von Histonmodifikationen hinsichtlich ihrer Aktivität analysiert und identifiziert werden (Consortium, 2012). Dieses Prinzip wird genutzt, um mittels genomweiten Datensätzen (beispielsweise CHIP-seq von EnCode (Consortium, 2012)) eine zelltypspezifische Aktivität von CREs nachzuweisen bzw. aktive CREs zu identifizieren.

Für diese Arbeit sind die Acetylierung und Trimethylierung des Lysinrests an Position 27 von H₃ von besonderem Interesse. Eine Acetylierung (H₃K₂₇ac) findet sich vor allem an aktiven regulatorischen Elementen (Consortium, 2012). Durch Acetylierung wird die positive Ladung der Lysinreste maskiert und so die Interaktion zum negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA gesenkt. Die DNA wird zugänglicher für TF und der Bereich dadurch aktiviert (Bowman & Poirier, 2015). Aktive Promotoren und Enhancer können durch das Verhältnis von H₃K₄me und H₃K₄me₃ unterschieden werden (Heintzman et al., 2009; Heintzman et al., 2007).

Eine Trimethylierung (H₃K₂₇me₃) hingegen markiert inaktive Enhancer und DNA-Bereiche wie z.B. unexprimierte Entwicklungsgene (Barski et al., 2007; Consortium, 2012; Suganuma & Workman, 2011; Zhu et al., 2013). Histonacetylierungen werden von Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert. Der Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) führt durch Histontrimethylierungen als Teil der Polycomb-Gruppe zur Stilllegung von Genen (Di Croce & Helin, 2013; Margueron & Reinberg, 2011; Wiles & Selker, 2017).

Tabelle 1: Beispiele für Histonmodifikationen mit deren Funktion und den Elementen, an denen sie zu finden sind.
Nach Consortium, 2012.

Histonmodifikation	Funktion	Element
H ₃ K ₄ me ₁	markierend	für Enhancer und andere distale Elemente
H ₃ K ₄ me ₂	markierend	Promotoren und Enhancer
H ₃ K ₄ me ₃	markierend	Promotoren und TSS
H ₃ K ₉ ac	aktivierend	Promotor
H ₃ K ₉ me ₁	markierend	Am 5'-Ende des Gens
H ₃ K ₉ me ₃	repressiv	Heterochromatin und repetitive Elemente
H₃K₂₇ac	aktivierend	Enhancer und Promotor
H ₃ K ₂₇ me ₃	repressiv	Enhancer und Promotor (Barski et al., 2007; Zhu et al., 2013)

1.1.2.2 Validierung von potenziellen CREs

Die Identifikation potenzieller CREs auf Grundlage von Histonmodifikationen oder auch durch Detektion stark konservierter nicht-codierender Bereiche vermittelt vorerst einen Eindruck von *cis*-regulatorischer Funktion und Aktivität (Maeso et al., 2013; Vavouri & Lehner, 2009). Um diesen Eindruck bestätigen zu können, sollte die *cis*-regulatorische Funktion der Regionen validiert werden. Ein wichtiges Werkzeug, um aktive Promotoren und Enhancer zu validieren, sind unter anderem Reporter-gen-Assays (Kvon, 2015; Pennacchio et al., 2006). Die Evaluation von potenziellen Enhancern erfolgt dabei in der Regel durch ektopre transgene Reporter-Assays (Kvon, 2015). Hierbei wird ein inerter Minimalpromotor mit einem Reporter-gen und einem potenziellen Enhancer-Element fusioniert und an einer ektopen genomischen Stelle oder episomal inseriert (Fortes, Updated 2009; Kvon, 2015). Es sollte sich bei genomischer Insertion um einen *safe-harbour* Locus handeln, an dem eine vorhersehbare Expression ohne unerwünschten Auswirkungen auf die Zelle bzw. den Organismus gegeben ist (Sadelain et al., 2012). Die potenzielle Reporterexpression in Zellen oder Embryonen, kann anschließend detektiert werden und spiegelt das Aktivitätsmuster des zu untersuchenden Enhancers wider (Fortes, Updated 2009; Kvon, 2015). Als Reporter-gene können bspw. *LacZ*, *Luciferase* oder Gene für Fluoreszenzproteine fungieren. *LacZ* katalysiert eine Färbereaktion (Kothary et al., 1989), *Luciferase* eine Reaktion, die zu Biolumineszenz führt (Greer III & Szalay, 2002), Fluoreszenzproteine hingegen können direkt detektiert werden (Chiocchetti et al., 1997).

Alternativ können auch fluoreszierende Reporter-gene wie *GFP* oder *mCherry* *downstream* von Promotoren inseriert werden, um die spezifische Expression eines Zielgens zu analysieren (Allard, 2008; Li et al., 2018).

Mit Hilfe von Reporter-genen wird eine sowohl zeitliche als auch räumliche Detektion der Aktivität von CREs bzw. der Expression von Zielgenen möglich.

1.1.3 Promotor-Enhancer-Interaktion im dreidimensionalen Raum

CREs wie Promotoren und Enhancer regulieren im Zusammenspiel die Expression ihrer Zielgene sehr spezifisch in Zeit und Raum (Lee & Young, 2013). Die Mechanismen, die zur Aktivierung des Promotors durch den Enhancer und zur Spezifität zwischen den CREs führen, sind komplex und noch nicht vollständig verstanden (Zabidi & Stark, 2016). Dabei liegen sie mitunter mehrere Megabasen voneinander entfernt und interagieren dennoch sehr spezifisch miteinander (Lettice et al., 2003; Long et al., 2020; Noonan & McCallion, 2010). Mehrere Experimente deuten daraufhin, dass sogenannte Chromatinschleifenbildung Promotoren und Enhancer innerhalb des Nukleus in räumliche Nähe zueinander bringt, was letztendlich entscheidend für deren Aktivierung ist und letztlich zur aktiven Transkription führt (Furlong & Levine, 2018; Kagey et al., 2010; Tolhuis et al., 2002). Durch den technischen Fortschritt in den letzten Jahrzehnten konnten durch verschiedenste mikroskopische Methoden und Chromosomen-

Konformationserfassung (*Chromosome conformation capture* (3C)) diese Interaktion im dreidimensionalen Raum nachgewiesen werden und mit Genregulation in Kontext gebracht werden (Chen et al., 2018; Gu et al., 2018; Mifsud et al., 2015; van Arensbergen et al., 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der DNA-Strang entlang des Chromosoms in funktionale dreidimensionale Einheiten unterteilt, in denen ein präferenzzieller Kontakt zwischen einzelnen DNA-Bereichen gegeben ist (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). Diese Untereinheiten des DNA-Stranges werden als Topologisch Assoziierte Domänen (TADs) bezeichnet und werden im Folgenden hinsichtlich verschiedener Aspekte des Aufbaus und der Dynamik thematisiert.

1.1.3.1. Topologisch Assoziierte Domänen

Chromosome conformation capture (3C)-Experimente (Chromosomen-Konformationserfassung) werden genutzt, um die Konformation des Chromatins zu analysieren (Dekker et al., 2002). Loci, die in räumlicher Nähe zueinander liegen, können durch 3C-basierte Experimente charakterisiert und deren Interaktion quantifiziert werden (Davies et al., 2017). Unter anderem konnte durch 3c-basierte Experimente gezeigt werden, dass Promotoren und Enhancer räumlich miteinander interagieren (Mifsud et al., 2015; van Arensbergen et al., 2014).

Die genomweite Anwendung von 3c-basierten Experimenten ermöglichte den Nachweis von sogenannten Topologisch assoziierten Domänen (TADs) (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). TADs sind Domänen entlang des Chromosoms, in denen die Interaktionsfrequenz der Sequenzen erhöht ist und somit ein präferenzzieller Kontakt der einzelnen Sequenzen zueinander besteht (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). Im Durchschnitt sind TADs 850 kb lang und zwischen verschiedenen Zelltypen und auch Spezies hochkonserviert (Dixon et al., 2012). Durch die Insertion von Reportgenen konnte außerdem eine deutliche Überschneidung von CREs beinhaltenden genregulatorischen Landschaften von Entwicklungsgenen und TADs gezeigt werden (Despang et al., 2019; Ruf et al., 2011; Symmons et al., 2014). Diese und viele weitere Experimente führen zur Auffassung, dass TADs die räumliche Interaktion von Enhancern mit Promotoren vereinfachen bzw. helfen, diese zu etablieren (Dixon et al., 2012; Fudenberg et al., 2016).

Loop-Extrusion

Die linearen Enden von TADs werden durch sogenannte TAD-*Boundaries* begrenzt, an denen sich (wie in Abbildung 1 zu sehen) Bindestellen für Insulatorproteine wie das Zink-Fingerprotein CCCTC-binding factor (CTCF) befinden (Dixon et al., 2012).

Lange Zeit war unklar, wie die Ausbildung von TADs abläuft und was genau dazu beiträgt. Das gängige Modell ist das sogenannte *Loop-Extrusion-Modell* (Abbildung 1). CTCF und das ringförmige Cohesin-Molekül lagern sich an die DNA an, es kommt zur *Loop-Extrusion*, bei der sich eine wachsende

Chromatinschleife bildet, bis der Prozess durch Bindung von CTCF an eine CTCF-Bindestelle terminiert wird (Fudenberg et al., 2016; Nuebler et al., 2018; Sanborn Adrian et al., 2015). Depletions-Experimente von CTCF oder Untereinheiten des Cohesin-Komplexes führen zum Verschwinden der TADs und zeigen so die Relevanz der beiden Architekturproteine (Nora et al., 2017; Rao et al., 2017). Dabei scheinen auch CTCF-Bindestellen innerhalb der TAD bzw. die Redundanz mehrerer CTCF-Bindestellen wichtig für die Stabilität der TAD-Bildung zu sein (Despang et al., 2019). Die genomweite Depletion von CTCF hat allerdings nur einen geringen Einfluss auf die Genexpression (Nora et al., 2017). Die Bedeutung von CTCF bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Zu erkennen ist, dass Promotor und Enhancer innerhalb einer TAD in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion steigt (Kagey et al., 2010). TADs ermöglichen so, dass bis zu 1,45 Mb entfernte Sequenzen in räumliche Nähe gelangen (Long et al., 2020)

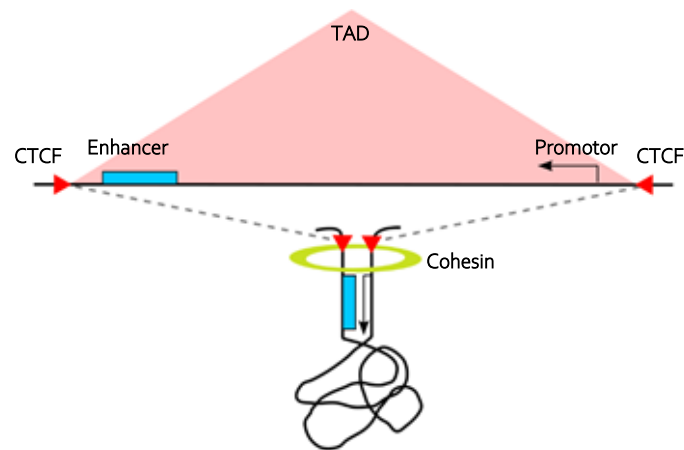


Abbildung 1: *Loop-Extrusion einer Topologisch Assoziierten Domäne (TAD)* Durch Interaktion der CTCF-Bindestellen und Cohesin bildet sich eine Chromatinschleife, in der die Wahrscheinlichkeit für Chromatininteraktion steigt. Promotor und Enhancer gelangen so in räumliche Nähe und der Enhancer kann sein Zielgen aktivieren. Der DNA-Bereich mit einer erhöhten Interaktionsfrequenz wird als TAD bezeichnet.

Neo-TADs

Die Ausbildung einer TAD führt zur Isolierung der enthaltenden Elemente gegenüber benachbarter Loci (Dixon et al., 2012). Größere strukturelle Varianten wie Deletionen, Duplikationen oder Inversionen, die mehrere TADs übergreifend betreffen, wurden mit Misexpression und den daraus resultierenden pathogenen Phänotypen wie kongenitale Malformationen oder auch Krebs in Verbindung gebracht (Ibrahim & Mundlos, 2020; Spielmann et al., 2018). Die Strukturvariationen betreffen in vielen Fällen die *TAD-Boundaries* und führen dazu, dass Enhancer von einer TAD in eine andere übernommen werden oder auch, dass mehrere TADs fusionieren und Interaktion von verschiedenen CREs ermöglicht wird (Ibrahim & Mundlos, 2020; Spielmann et al., 2018). Es entstehen mitunter neue TADs, die auch neo-TADs genannt werden. In diesen neo-TADs aktivieren Enhancer ektope falsche Zielgene im falschen Gewebe (Franke et al., 2016; Lupiáñez et al., 2015; Weischenfeldt et al., 2017).

1.1.3.2 Dynamik der räumlichen Interaktion

Die räumliche Interaktion von Enhancer und Promotor wird anhand zwei verschiedener Modelle beschrieben. Diese Modelle werden als *instructive* Modell und *permissive* Modell bezeichnet und für beide gibt es zahlreiche Beispiele in der Literatur (de Laat & Duboule, 2013; Schoenfelder & Fraser, 2019). Das *instructive* Modell beschreibt eine Promotor-Enhancer-Interaktion, die innerhalb einer TAD zelltypspezifisch *de novo* erst dann entsteht, wenn die Expression des zugehörigen Gens ablaufen soll (Deng et al., 2012; Deng et al., 2014).

Mit dem *permissive* Modell wird eine räumliche Interaktion von Enhancer und Promotor beschrieben, die zelltypunabhängig und auch bereits vor der Genexpression existiert (de Laat & Duboule, 2013; Ghavi-Helm et al., 2014). Promotor und Enhancer liegen demnach zelltypunabhängig in einer stabilen Chromatinschleife und sind mit einer gestoppten RNA-Polymerase II assoziiert (Ghavi-Helm et al., 2014). Die Inhibierung der Aktivierung durch den Enhancer wird dabei vermutlich durch den Polycomb repressive complex 2 (PRC2) erreicht (Cruz-Molina et al., 2017).

Ein Paradebeispiel für das *permissive* Modell ist, wie in 1.3 beschrieben, die Interaktion zwischen dem *Shh*-Promotor und der ZRS, dem während der Extremitätenentwicklung aktiven, nicht-redundanten *Shh*-Enhancer (Paliou et al., 2019).

Die räumliche Interaktion von Promotor und Enhancer ist jedoch nur ein Aspekt unter mehreren und führt nicht unbedingt zur aktiven Transkription (Kyrchanova & Georgiev, 2021; Paliou et al., 2019). Wie die Spezifität zwischen den beiden Elementen zu Stande kommt und was die Aktivierung der Transkription in den vorgeformten Chromatinschleifen triggert, bleiben weiterhin offene Fragen.

Andere Faktoren, die wahrscheinlich die Promotor-Enhancer-Interaktion und der dadurch bedingten Transkription des Zielgens mitbestimmen, sind die Interaktion zwischen unterschiedlichen TF und den Elementen des Transkriptionsapparats wie dem Mediator-Komplex und ATP-abhängigen Chromatin-*Remodelling*-Faktoren sowie generell die Zugänglichkeit des Chromatins (Review (Vernimmen & Bickmore, 2015) und (Zabidi & Stark, 2016)). Aber auch das relativ neu beschriebene Konzept der Kondensatbildung durch Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, die wie im Folgenden genauer beschrieben, von Bedeutung für die Funktion von Superenhancer ist, trägt zur Promotor-Enhancer-Interaktion bei (Hnisz et al., 2017; Plys & Kingston, 2018).

1.1.4 Superenhancer

Mittlerweile konnte eine Vielzahl an verschiedenen CREs identifiziert und charakterisiert werden, wobei Superenhancer ein besonderes Phänomen darstellen (Noonan & McCallion, 2010; Pott & Lieb, 2015). Superenhancer werden definiert als Enhancercluster, die größer als reguläre Enhancer, dichter mit TF sowie dem Mediator-Komplex besetzt und stärker Histon-Acetyliert sind (Hnisz et al., 2013; Pott & Lieb,

2015; Wang et al., 2019; Whyte et al., 2013). Die wichtigsten Eigenschaften von Superenhancern im Vergleich zu „regulären“ Enhancern sind in Tabelle 2 gelistet.

Durch die dichte Besetzung mit TF und dem Mediator-Komplex, werden um Superenhancer herum biophysikalische Bedingungen geschaffen, die die Wahrscheinlichkeit für Kondensatbildung durch Flüssig-Flüssig-Phasentrennung erhöhen (Boija et al., 2018; Hnisz et al., 2017). Diese Kondensatbildung trägt vermutlich zu der räumlichen Interaktion von Superenhancer mit ihren Zielgenen und einer robusteren Transkription bei (Sabari et al., 2018).

Tabelle 2: Vergleich zwischen den Eigenschaften von Superenhancer und regulären Enhancer.

	Superenhancer	Reguläre Enhancer
Häufigkeit	100 – 1000	>10.000
Größe	sehr groß, 10 kb bis 60 kb	1 kb bis 4 kb
Master-TF	gebunden in hoher Dichte	Gebunden, aber nicht immer
Mediator-Komplex	dicht besetzt	weniger dicht besetzt
Aktivierende Histonmodifikationen	erhöht	weniger erhöht
Phasentrennung	wahrscheinlich	weniger wahrscheinlich

Superenhancer sind sehr viel seltener als reguläre Enhancer und bei den meisten Superenhancern lassen sich die beschriebenen Eigenschaften nur in bestimmten Zelltypen nachweisen, was für eine hohe Zellspezifität spricht (Wang et al., 2019; Whyte et al., 2013).

Es wurde gezeigt, dass terminale TF aus unterschiedlichen Signalwegen in Superenhancern (im Gegensatz zu regulären Enhancern) gleichzeitig gebunden sind, was vermutlich zu einer höheren Sensibilität gegenüber Veränderungen der extrazellulären Umgebung führt (Gosselin et al., 2014; Hnisz et al., 2015). Beispielsweise sind in ES-Zellen sind die Master-TF Oct4, Nanog und Sox2 in einer erhöhten Dichte an Superenhancern gebunden (Whyte et al., 2013). Die Master-TF werden selbst durch Superenhancer reguliert, die die Master-TF gebunden haben, wodurch eine *Feedback*-Schleife entsteht (Whyte et al., 2013). Insgesamt führen die Eigenschaften der Superenhancer dazu, dass ihre Zielgene stärker transkribiert werden als durch Genregulation mittels regulärer Enhancer (Khan et al., 2018; Wang et al., 2019).

1.2 EXTREMITÄTENENTWICKLUNG VON TETRAPODEN

Während der Embryogenese eines jeden Organismus entsteht eine Vielzahl komplexer Gewebe mit spezifischen Funktionen. Für die Entwicklung dieser zahlreichen unterschiedlichen Gewebe ist eine präzise kontrollierte Genregulation nötig. Die embryonale Entwicklung der Extremitäten von Landwirbeltieren (Tetrapoden) wie Reptilien, Vögel und Säugetiere beginnt durch die Ausstülpung mesenchymalen Gewebes der lateralen Mesodermplatte, welches von einer Ektodermis bedeckt wird (Tickle, 2015). Die in Abbildung 2 markierte Ausstülpung wird als Extremitätenknospe bezeichnet und bildet sich bei Mäusen am 9. Tag der Embryonalentwicklung (E9.5 *days post coitum* (dpc)) (Hill & Lettice, 2016).

Aufgrund der guten Beobachtbarkeit und Zugänglichkeit der Extremitätenknospe ist sie seit mehreren Jahrzehnten ein beliebtes

Modell für die Analyse von embryonalen Prozessen. Durch die Charakterisierung zahlreicher molekularer Prozesse sowie deren Interaktionen und raumzeitlicher Koordination hat die Extremitätenknospe mittlerweile eine paradigmatische Rolle für das Verständnis von Organo- bzw. Morphogenese sowie Genregulation eingenommen. In den nächsten Abschnitten, werden drei wesentliche Regulationsachsen der Extremitätenknospe mit den beteiligten Morphogenen, TFs und CREs genauer beschrieben.

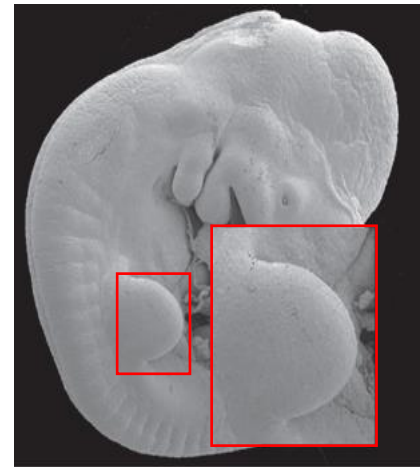


Abbildung 2: Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme eines Maus-Embryo im Stadium E10.5-dpc. Rot markiert ist die Extremitätenknospe der vorderen Extremität.

Aus Zeller et al. 2009 mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature

1.2.1 Extremitätenentwicklung entlang drei Regulationsachsen

Die Extremitätenknospe entwickelt sich entlang drei regulatorischer Achsen:

- die anterior-posterior Achse (Finger/Zehe I zu V)
- die proximo-distale Achse (von Schulter bzw. Hüfte zu den Fingern bzw. Zehen)
- die dorso-ventrale Achse (von Handrücken zu Handfläche)

Die Bildung der Achsen wird hauptsächlich durch zwei Signalzentren gesteuert, die *Apical ectodermal ridge* (AER) und die *Zone of Polarizing Activity* (ZPA), wo bestimmte Morphogene exprimiert werden (siehe Abbildung 3A) (Ohuchi et al., 1997; Riddle et al., 1993; Zeller et al., 2009). Die Interaktion der Morphogene, die an den unterschiedlichen Achsen beteiligt sind und die raumzeitliche Koordination dieser führt zur Bildung der letztlich vollentwickelten Extremität (Zeller et al., 2009).

1.2.1.1 Anterior-posterior Achse

Die Achse, die vom Daumen (Digit I) in Richtung des kleinen Fingers (Digit V) zieht, wird als anterior-posterior (AP) Achse beschrieben. Die Unterschiede der Strukturen entlang AP-Achse zeigt sich am

Beispiel der Hand durch unterschiedliche Anzahl, Länge und Form der Mittelhandknochen und der Phalangen der Finger (siehe Abbildung 3B).

Am posterioren Rand der Extremitätenknospe, dort wo sich später der kleine Finger bildet, liegt das Signalzentrum der Achse, die *Zone of polarizing activity* (ZPA). Hier wird das Morphogen *Sonic Hedgehog* (*Shh*) exprimiert (Riddle et al., 1993).

Bereits vor der Expression von *Shh* wird die Extremitätenknospe durch anteriore Expression von *GlizR* (*Glioma Associated Oncogene Homologue 3*) und posteriore Expression von *Hand2* (*Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2*) polarisiert (te Welscher, Fernandez-Teran, et al., 2002). Die beiden TF agieren antagonistisch zueinander und beschränken letztlich die *Shh*-Expression auf die posteriore ZPA (te Welscher, Fernandez-Teran, et al., 2002) (Abbildung 3).

Shh bildet ausgehend von der ZPA einen Gradienten aus. Dabei inhibiert *Shh* die Umwandlung von *GLI3A* (aktiv) in *GLI3R* (repressiv), wobei *GLI3R* selbst repressiv auf die *Shh*-Expression wirkt (te Welscher, Zuniga, et al., 2002; Wang et al., 2000). Der *Shh*-Gradient nimmt in anteriore Richtung ab, wo der Daumen (Digit I) gänzlich unabhängig von *Shh* gebildet wird (Harfe et al., 2004). Digit II bis V werden abhängig der *Shh*-Konzentration (Digit II und III) bzw. der *Shh*-Expositionsdauer (Digit III und IV) gebildet (Harfe et al., 2004).

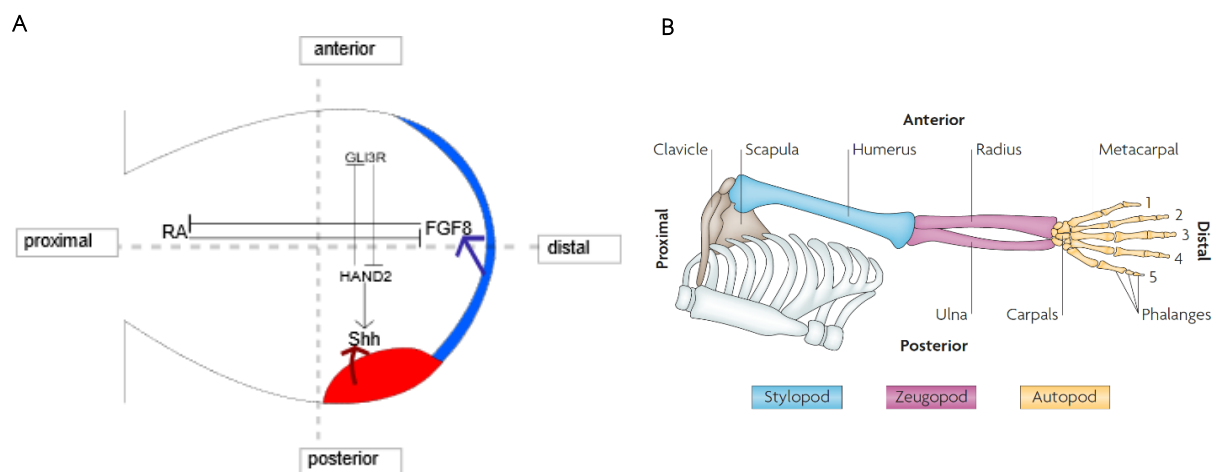


Abbildung 3: A Extremitätenknospe mit AP- und PD-Achse Die AP-Achse hat die ZPA (rot) als Signalzentrum und *Shh* als sezerniertes Morphogen. *HAND2* und *GLI3R* wirken antagonistisch zueinander und regulieren die *Shh*-Wirkung. Die PD-Achse wird von der AER (blau), die *FGF8* sezerniert reguliert. Von proximal wirkt Retinsäure (RA) antagonistisch zu *FGF8*. (nach (Lafage-Proust, 2015; Lettice et al., 2012)) und (Zeller et al., 2009)) **B Schematische Darstellung der skeletalen Anteile eines menschlichen Arms** Einteilung der vorderen Extremität von proximal nach distal in Stylopod, Zeugopod und Autopod (Aus Zeller et al. 2009 mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

1.2.1.2 Proximo-distale und dorso-ventrale Achse

Die proximo-distale Achse beschreibt die Entwicklung der Extremitäten vom Rumpf in Richtung Hand/Fuß (Siehe Abbildung 3B). Am distalen Ende der Extremitätenknospe bildet sich unter Einfluss von mesenchymal sezerniertem *Fgf10* eine sogenannte *Apical ectodermal Ridge* (AER) (Ohuchi et al., 1997).

1. EINLEITUNG

Die AER sezerniert Fibroblasten-Wachstumsfaktoren v.a. Fgf8 (siehe Abbildung 3A), die das Überleben sowie die Spezifizierung der AER-nahen also distalen Zellen fördern (Mariani et al., 2008). Von proximal wird Retinsäure als entgegengesetztes Morphogen sezerniert (Mercader et al., 2000)

Die dorso-ventrale Achse beschreibt die Entwicklung der Extremität von Hand-/Fußrücken in Richtung Handfläche/Fußsohle. Signalgebend ist dabei das dorsale Ectoderm, welches das Morphogen Wnt7a sezerniert sowie das ventrale Ectoderm mit EN-1 als Morphogen (Loomis et al., 1996; Riddle et al., 1995).

Die drei Hauptachsen der embryonalen Extremitätenentwicklung sind über verschiedene Signalmoleküle miteinander verknüpft und beeinflussen sich über *Feedback*-Schleifen gegenseitig (Zeller et al., 2009).

Die Signalwege sind zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert, dennoch sind die morphologischen Unterschiede zwischen Vögeln, unterschiedlichen Säugetieren und Reptilien nicht zu verkennen, was in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Genregulation deutlich macht (Montavon & Duboule, 2012; Petit et al., 2017).

Hauptakteur der PA-Achse ist das Morphogen *Shh*. Verschiedene Knock-Out-Experimente zeigten, dass es ohne *Shh* zu gravierenden Malformationen kommt, nicht nur der Extremitäten sondern auch anderer Organsysteme (Chiang et al., 1996). Im Folgenden soll *Shh* in seiner Vielseitigkeit als Morphogen genauer charakterisiert werden.

1.3 SONIC HEDGEHOG UND SEINE DISTALEN ENHANCER

Shh gehört zur *Hedgehog*-Familie, zu der neben *Shh* auch *Desert Hedgehog (Dhh)* und *Indian Hedgehog (Ihh)* zählen. Mechanistisch ähneln sich die drei *Hedgehog*-Gene in ihrer Funktion als Morphogene, wobei die Bildung eines Diffusionsgradienten in embryonalem Gewebe zur korrekten Organogenese ausschlaggebend ist (Ingham & McMahon, 2001). Die *Hedgehogs* wirken in der Polarisierung, der Zellproliferation und der Differenzierung zu verschiedenen Geweben mit (Ingham & McMahon, 2001). Während *Dhh* insbesondere an der Gonadenentwicklung beteiligt ist und *Ihh* vermehrt in der Osteogenese auftritt, wird *Shh* in drei verschiedenen Signalzentren exprimiert (Ingham & McMahon, 2001). Diese Signalzentren sind: die Chorda dorsalis, die Bodenplatte des Neuralrohrs (Placzek, 1995) und die ZPA in der Extremitätenknospe (siehe 1.2.1). *Shh* ist in unterschiedlichen Prozessen (Differenzierung, Proliferation und zelluläres Überleben) verschiedener Zellen wie u.a. der Extremitäten, der Neuralleiste, des Zerebellums, der Hypophyse und generell in Neuronen, in Blutzellen und in den Epithelien innerer Organen (Lunge, Herz, Darm) beteiligt (Ingham & McMahon, 2001). Mäuse in *Shh*-Knock-Out-Experimenten zeigen schwere Defekte in vielen der genannten Strukturen, wie in der Chorda dorsalis, in der Bodenplatte des Neuralrohrs sowie im Skelett (insb. Extremitäten), außerdem entstehen Zyklopien und Holopresencephalien (Chiang et al., 1996).

Die Komplexität der *Shh*-Expression in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten verlangt eine gut organisierte Genregulation. Es konnte bereits eine Vielzahl verschiedener Enhancer beschrieben werden, welche die *Shh*-Expression koordinieren und regulieren (Anderson et al., 2014; Sagai et al., 2019). Diese CREs befinden sich in einer ca. 800 kb großen telomeren Genwüste neben dem *Shh* (Anderson et al., 2014) und werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.3.1 *Shh*-Regulation während der Embryogenese

Shh wird in diversen sich entwickelnder embryonaler Gewebe exprimiert (u.a. Extremitäten, Zentralen Nervensystem (ZNS), Lunge, Herz), was eine hochkomplexe und organisierte Regulation erfordert (Anderson et al., 2014). Das murine *Shh* wird durch drei Exons codiert und liegt benachbart einer großen Genwüste in ca. 800 kb Entfernung des telomeren *limb development membrane protein 1 (Lmbr1)* (Anderson et al., 2014). Der nicht-codierende Bereich zwischen *Shh* und *Lmbr1* stellt die genregulatorische Landschaft von *Shh* dar und beinhaltet mehrere Enhancer, die in unterschiedlichen Gewebsstrukturen aktiv sind (Anderson et al., 2014; Benabdallah et al., 2016; Epstein et al., 1999; Jeong et al., 2006; Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2009; Sagai et al., 2005; Tsukiji et al., 2014; Yao et al., 2016).

In Abbildung 4 sind die bisher charakterisierten Enhancer mit Lokalisation in Bezug auf *Shh* und dem Gewebe, in dem sie aktiv sind, zusammengefasst. Die Mehrheit dieser Enhancer sind für die Regulation

1. EINLEITUNG

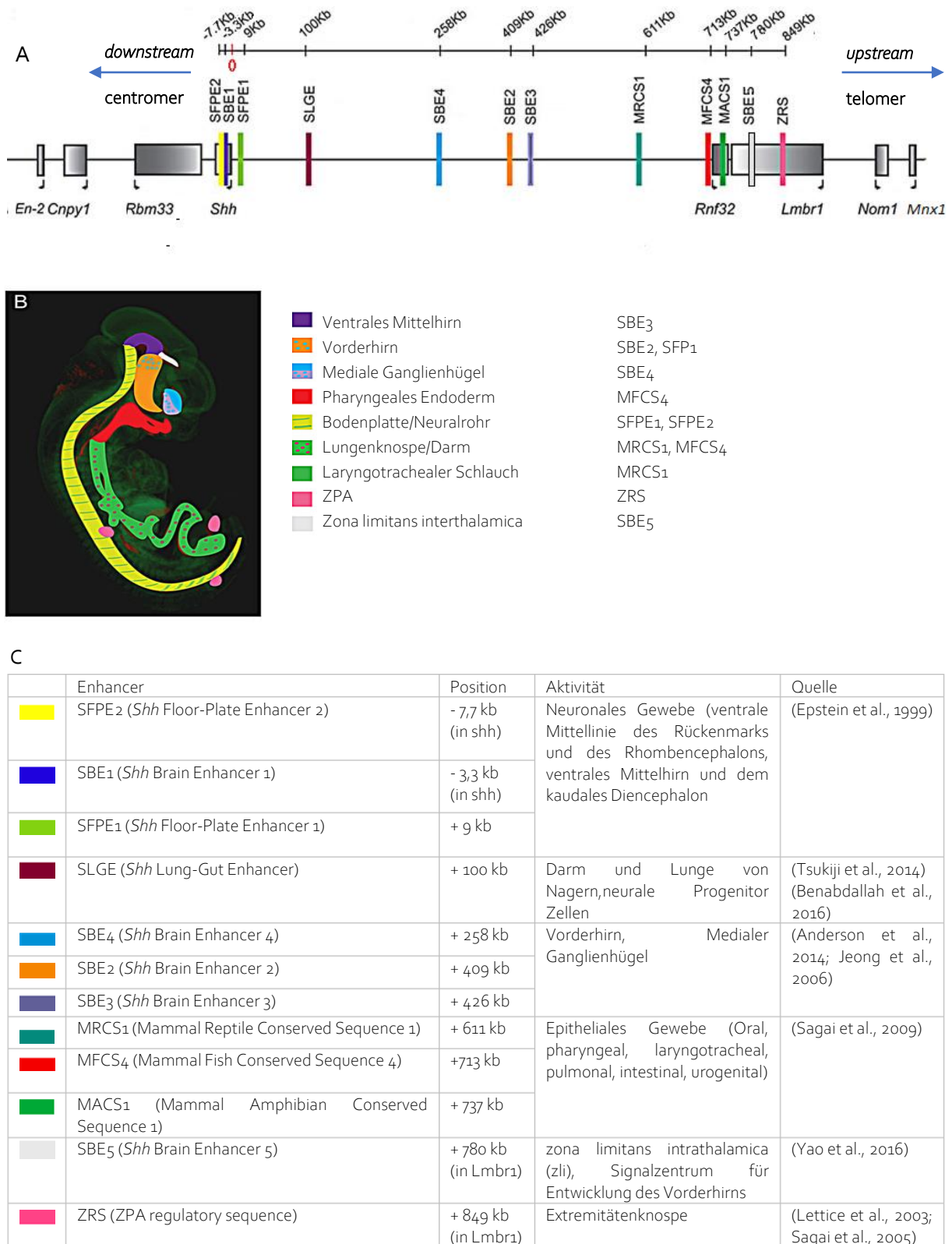


Abbildung 4: Die genregulatorische Landschaft des *Shh*-Locus.

A *Shh*-Locus auf Chromosom 5 *Upstream* des *Shh*-Gens liegt eine ca 1 Mb große Genwüste, in der sich 8 Enhancer befinden. Im *Shh*-Gen befinden sich zwei Enhancer, im Nachbarn *Lmbr1* weitere zwei. Nicht maßstabgerecht.

B Darstellung der *Shh*-Expression in einem E11.5 Mausembryo Die entsprechenden Enhancer sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Der Legende sind die entsprechenden Gewebe, in denen die Enhancer die *Shh*-Expression bedingen, zu entnehmen.

C Tabelle mit den bisher bekannten Enhancer und deren Charakteristika: Position in Bezug auf die TSS, dem embryonalen Gewebe, in dem sie aktiv sind und zugehörige Literaturangabe

(A und B modifiziert aus Anderson et al. 2014)

von *Shh* während der Entwicklung des ZNS oder in epithelialen Geweben von Bedeutung (Anderson et al., 2014). Für die Entwicklung der Extremität ist jedoch lediglich die *Zone of Polarizing Activity Regulatory Sequence* (ZRS) verantwortlich (Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2005). Die ZRS (auch *Mammal fish conserved Sequence 1* (MFSC₁) genannt) liegt im Intron 5 des *Lmbr1*-Gens und ist damit ca. 900 kb von der *Shh*-TSS entfernt (Lettice et al., 2003). Die ZRS ist der einzige beschriebene Extremitätenenhancer von *Shh*, außerdem ist ihre Aktivität auch auf die Extremitätenknospe beschränkt (Lettice et al., 2003).

Knock-Out (KO) Experimente der ca. 800 bp langen ZRS zeigten, dass bei homozygoter Deletion die *Shh*-Expression in den Extremitätenknospen vollständig unterbunden wird (Sagai et al., 2005). Unter Betrachtung der Extremitäten entspricht der Phänotyp der ZRS-KO-Mäuse dem Phänotypen der *Shh*-KO-Mäuse (Chiang et al., 2001; Sagai et al., 2005).

Der Ursprung von Fehlbildungen der Extremitäten ist häufig auf Mutationen der ZRS zurückzuführen (Lettice et al., 2003). Mittlerweile sind sowohl strukturelle Varianten wie beispielsweise Duplikation der ZRS, als auch mehr als 20 Punktmutationen als Grund für eine Vielzahl an Extremitätenfehlbildungen beschrieben, die auch als „ZRS-assoziierte Syndrome“ zusammengefasst werden (Anderson et al., 2012; Klopocki & Mundlos, 2011; Wieczorek et al., 2010)

1.3.1.1 Regulation der *Shh*-Expression durch die ZRS

Zu den TF, die die ZRS-Aktivität regulieren, gehören u.a. HAND2, posteriore 5'-HoxD-Proteine und ETS (Capellini et al., 2006; Galli et al., 2010; Kvon et al., 2016; Lettice et al., 2017; Lettice et al., 2012; Osterwalder et al., 2014; Tarchini & Duboule, 2006).

Betrachtet man die gesamte Sequenz der ZRS, kann man sie in einen 5'-Bereich und einen 3'-Bereich einteilen (siehe Abbildung 5) (Lettice et al., 2014). Der 5'-Bereich bindet HoxD insb. HoxD13 und reguliert die raumzeitliche und quantitative Expression von *Shh* (Leal & Cohn, 2016; Lettice et al., 2017; Lettice et al., 2012). Der 3'-Bereich hingegen ist vermutlich für die Aktivität des Enhancers über die lange Distanz von ca. 900 kb verantwortlich (Lettice et al., 2017; Paliou et al., 2019).

ZRS mit ca. 800 bp

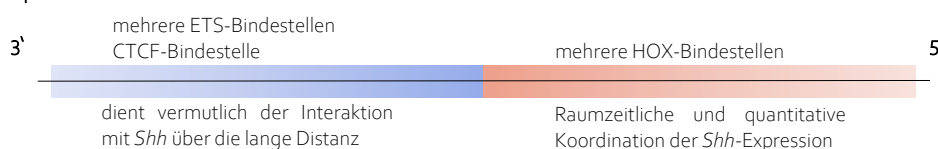


Abbildung 5: Schematische Darstellung der ZRS: Im 5'-Bereich der ZRS befinden sich vorwiegend HOX-Bindestellen, im 3'-Bereich vorwiegend ETS-Bindestellen sowie eine CTCF-Bindestelle. Die raumzeitliche und quantitative Koordination von *Shh* wird insbesondere über den 5'-Bereich reguliert, der 3'-Bereich dient vermutlich der Interaktion über die lange Distanz von 900 kb (Galli et al., 2010; Kvon et al., 2016; Leal & Cohn, 2016; Lettice et al., 2017; Lettice et al., 2012; Paliou, 2019).

Die ZRS ist zwischen verschiedenen Wirbeltieren hoch konserviert (Sagai et al., 2004). Zwischen Mensch und Huhn (*Gallus gallus domesticus*) stimmen beispielsweise mehr als 85 % überein (Lettice et al., 2014). Die große Ähnlichkeit und der starke Effekt von (Punkt)Mutationen spricht dafür, dass sowohl die TF, die

an den Enhancer binden als auch die Reihenfolge und die Anordnung, in der sie gebunden werden, streng definiert sind (Lettice et al., 2017; Lettice et al., 2014). TF können degenerierte Sequenzen von nur 5 bis 12 bp erkennen, die ZRS ist jedoch über lange Sequenzen absoluter Übereinstimmung konserviert. Dieser Widerspruch kann durch bisher gewonnene Erkenntnisse über die Funktion von Enhancern nicht erklärt werden, was zeigt, dass hier noch viel Raum für weitergehende Forschung existiert.

1.3.1.2 Benachbarte „ZRS300“

Die ZRS ist ca. 800 bp lang, hochkonserviert und liegt ca. 900 kb von der *Shh*-TSS entfernt (Lettice et al., 2003). Im Folgenden wird diese Sequenz als ZRS800 bezeichnet, denn ca. 720 bp *upstream* befindet sich eine weitere hochkonservierte Sequenz von etwa 300 bp, die hier als ZRS300 bezeichnet wird (siehe Abbildung 6).

In früheren nicht publizierten Experimenten der Arbeitsgruppe Mundlos hatte eine Deletion der ZRS300 in der Maus keine Auswirkungen auf den Phänotypen. Jedoch nahm der Austausch der murinen ZRS mit der anderer Spezies (u.a. *Gallus gallus domesticus* (im Folgenden „Huhn“), *Bos taurus* (im Folgenden „Kuh“) und *Equus caballus* (Im Folgenden „Pferd“) einen letalen Verlauf sobald das *Insert* sowohl ZRS800 als auch ZRS300 beinhaltet (AG Mundlos, unpubliziert, persönliche Kommunikation). Eine Insertion, die nur die ZRS800 anderer Spezies (ohne die ZRS300) beinhaltet, führt nicht zu Letalität, sondern zu einer veränderten ZRS-Aktivität und verändertem Phänotypen (Kvon et al., 2016).

Mittlerweile sind außerdem einige (Punkt)Mutationen der ZRS300 in Mensch (*Homo sapiens*) und Hund (*Canis lupus familiaris*) bekannt, die zu Polydaktylie führen, was wiederum für eine Funktion der ZRS300 im Zusammenhang mit der Extremitätenentwicklung spricht (Park et al., 2008; Potuijt et al., 2018; Xiang et al., 2017). Diese Beobachtungen scheinen jedoch im Widerspruch zu dem murinen ZRS300-Deletion ohne Phänotypen zu stehen.

Eine Analyse der Konservierung mittels PhyloP-Conservation (UCSC Genome Browser) zeigt, dass die ZRS300 bei Fischen (Tetrapodon, Fugu, Zebrafish) im Vergleich zu Säugetieren und Vögeln nicht konserviert ist (siehe Abbildung 6). Dies deutet, in Verbindung mit dem erwähnten letalen Phänotypen bei

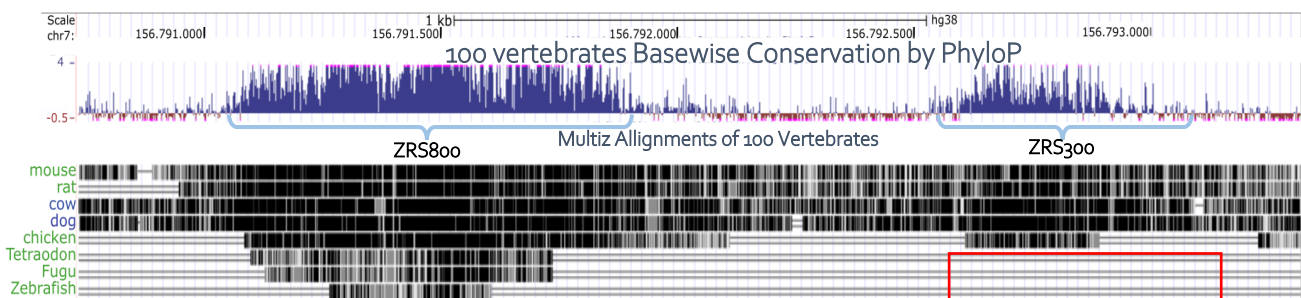


Abbildung 6: Konservierung der ZRS in verschiedenen Spezies im Vergleich zum humanen Locus (GRCh38/hg38 chr7:156,791,007-156,793,017). Die ZRS stellt eine 800bp lange hochkonservierte Sequenz auf der DNA dar (ZRS800). Etwa 700 bp *upstream* befindet sich eine zweite hochkonservierte Sequenz, die 300bp lang ist (ZRS300). Auffallend ist, dass letztere in Fischen nicht konserviert ist (siehe rote Markierung).

UCSC Genome Browser, PhyloP (genome.ucsc.edu; GRCh38/hg38 chr7:156,791,007-156,793,017) .

Austausch der ZRS₃₀₀, auf eine spezifische Funktion dieser hin, welche evolutionär gesehen möglicherweise erst bei Tetrapoden auftritt.

Die Bedeutung und Funktion der ZRS₃₀₀ sowie potenzielle Unterschiede zwischen den Spezies sind bisher weitestgehend ungeklärt. Verschiedene Experimente scheinen widersprüchliche Ergebnisse zu liefern, sodass im Rahmen dieser Arbeit, die ZRS₃₀₀ mit potenzieller *cis*-regulatorischer Funktion genauer charakterisiert werden soll.

1.3.2 Chromatin-Architektur des *Shh*-Locus

Die Vielzahl an *Shh*-Enhancer ermöglicht eine regulierte *Shh*-Expression in verschiedenen Geweben. Generell ist die Aktivität der Enhancer dabei vermutlich abhängig von der Bindung verschiedener TF, aber auch von der räumlichen Nähe zwischen Enhancer und Promotor (siehe Review (Zabidi & Stark, 2016)).

Chromosome conformation capture-Experimente am *Shh*-Locus zeigten eine ca. 1 Mb große TAD, die das *Shh*-Gen über die Genwüste bis zum *Lmbr1*-Gen einschließt (Anderson et al., 2014; Dixon et al., 2012; Paliou et al., 2019). Dabei wird die Domäne an ihren Enden von mehreren CTCF-Bindestellen und Cohesin-Kolokalisationen, sogenannten TAD-*Boundary*-Elementen begrenzt (Anderson et al., 2014). Durch *LacZ*-Reporterassays über die gesamte TAD hinweg konnte gezeigt werden, dass eine Expression stattfindet, wenn sich das Reporter gen innerhalb der Region befindet, die stark mit der TAD korreliert (Anderson et al., 2014). Eine solche Korrelation von genregulatorischen Landschaften und TADs, konnte darüber hinaus auch an anderen Loci nachgewiesen werden (Despang et al., 2019; Ruf et al., 2011; Symmons et al., 2014).

Im Gegensatz zu den Enhancern, die inmitten der Genwüste liegen, zeigte sich die Aktivität der ZRS in Reporterassays abhängig von der Position innerhalb des Genlocus (Anderson et al., 2014; Symmons et al., 2016). So nimmt die ZPA-spezifische *LacZ*-Expression gesteuert durch die ZRS in Richtung beider TAD-*Boundaries* zu während an verschiedenen Positionen innerhalb der TAD das Signal variiert (Anderson et al., 2014; Symmons et al., 2016).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass der räumliche Abstand zwischen *Shh* und der ZRS sowohl in *Shh*-exprimierenden als auch in nicht-*Shh*-exprimierenden Zellen stets kleiner ist als der Abstand zwischen *Shh* und SBE₄ bzw. zwischen SBE₄ und ZRS, obwohl in linearer Betrachtung die ZRS weiter von *Shh* entfernt ist (Williamson et al., 2016). Die verschiedenen Experimente deuten darauf hin, dass die Aktivität von der ZRS abhängig der räumlichen und nicht der linearen Nähe zum *Shh*-Promotor ist und dass durch eine stabile Chromatinschleife des *Shh*-Locus ZRS und *Shh*-Promotor in räumliche Nähe gebracht werden (Paliou et al., 2019; Symmons et al., 2016; Williamson et al., 2016). Diese Chromatinschleife existiert auch in Zellen, in denen *Shh* nicht exprimiert wird, es handelt sich folglich um einen vorgeformten Komplex, der unter 1.1.3 als *permissive* Modell der Promotor-Enhancer-Interaktion beschrieben wurde (de Laat & Duboule, 2013; Paliou et al., 2019).

Weiterhin konnten Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung-Experimente zeigen, dass der Abstand zwischen ZRS und *Shh* in unterschiedlichen Zellen stets bei ca. 400 nm liegt (Williamson et al., 2016). Hingegen zeigte sich in Zellen der ZPA, wo die ZRS die *Shh*-Expression aktiviert, ein verminderter Abstand auf 200 nm (Williamson et al., 2016). Welche Faktoren zur weiteren Annäherung beitragen, ist bisher nicht bekannt.

Nach Deletion mehrerer der CTCF-Stellen der *Shh*-ZRS-TAD konnte eine vergrößerte Distanz zwischen *Shh* und der ZRS und Beeinträchtigung der Chromatinarchitektur beobachtet werden (Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2019). Infolgedessen wurde eine Reduktion der *Shh*-Expression in der Extremitätenknospe um ca. 50 % beobachtet, wobei jedoch der Phänotyp der Mäuse unbeeinträchtigt blieb (Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2019). Eine hypomorphe Variante der ZRS, die zu einem oligo- bzw. syndaktylischen Phänotypen führt, verursachte in Kombination mit den deletierten CTCF Stellen auch in der Maus einen *Shh*-KO-Phänotypen mit einer Aplasie der Digits (Paliou et al., 2019). Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die CTCF-vermittelte Chromatinstruktur am *Shh*-Locus für die Aktivierung der Genexpression eine untergeordnete Rolle spielt und allenfalls zur Widerstandsfähigkeit gegen Veränderungen der Enhanceraktivität beiträgt (Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2019). Möglicherweise ist die TAD-Struktur während der Evolution wichtig für die Ansammlung der vielen *Shh*-Enhancer in der Genwüste gewesen (Williamson et al., 2019).

Interessanterweise ist eine Deletionsmutation im Menschen bekannt, bei der die Deletion einer 12 kb langen Sequenz im Exon 4 des *Lmbr1*-Gens, die mehrere CTCF-Bindestellen und keine Enhancerfunktion beinhaltet, zu einer Acheiropodie (bilaterales Fehlen von Händen und Füßen) führt (Ilanakiev et al., 2001; Ushiki et al., 2021). Dies deutet daraufhin, dass die Mechanismen der *Shh*-ZRS-Interaktion, wie sie im Mausmodell beschrieben sind, möglicherweise nicht vollumfänglich auf den Menschen übertragbar sind (Ushiki et al., 2021).

Bei der ZRS handelt es sich um den einzigen Enhancer für die *Shh*-Expression in der Extremitätenknospe (Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2005). Andere Entwicklungsgene (Kvon et al., 2021) und auch die Expression von *Shh* in anderen Geweben, werden durch eine additive und redundante Wirkung mehrerer Enhancer reguliert (Anderson et al., 2014; Osterwalder et al., 2018). Die Robustheit der Genregulation scheint bei der *Shh*-Transkription in der Extremitätenknospe durch räumliche Nähe zwischen Promotor und Enhancer sichergestellt zu werden (Paliou et al., 2019).

1.4 SOX2 UND SEIN SUPERENHANCER

Im Gegensatz zu *Shh* ist *Sex determining region Y (SRY)-Box 2 (Sox2)* nicht ausschließlich ein Entwicklungsmorphogen, sondern auch ein TF, der gemeinsam mit den TFs Nanog und OCT₄ von zentraler Bedeutung für die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen ist (Boyer et al., 2005; Chen et al., 2008).

In ES-Zellen findet sich im Gegensatz zu *Shh* erwartungsgemäß eine hohe *Sox2*-Expression (Avilion et al., 2003). Während der Differenzierung zu endodermalen und mesodermalen Keimblattzellen nimmt die Expression von *Sox2* ab, in Zellen des Neuroektoderms bleibt sie jedoch hoch, da *Sox2* ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielt (Komitova & Eriksson, 2004; Loh & Lim, 2011).

Die Expression von *Sox2* wird einerseits über zwei proximale Enhancer reguliert (Abbildung 7), *Sox2* regulatory region 1 (SRR1) und 2 (SRR2), wobei SRR1 keine Bedeutung für die Pluripotenz trägt, sondern eine Rolle in der Entwicklung des Neuroektoderms spielt (Ferri et al., 2004; Zhou et al., 2014).

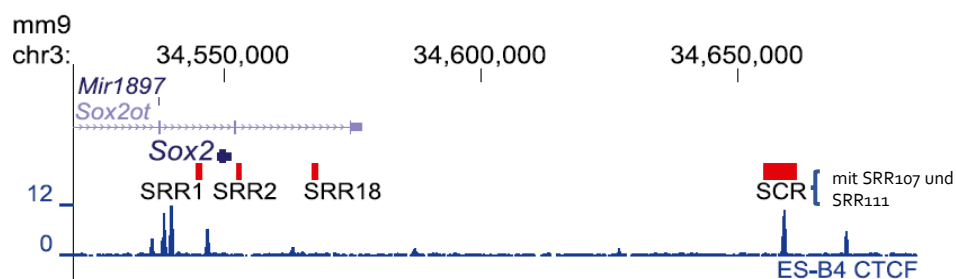


Abbildung 7: *Sox2*-Locus mit seinen proximalen Enhancern SRR1 und SRR2 sowie der distalen SCR, die die SRR107 und SRR111 enthält (aus (Zhou et al., 2014)) In blau sind ChIP-Seq Signale für CTCF-Stellen dargestellt.

Zhou et al. entdeckten etwa 100 kb *downstream* der *Sox2*-Transkriptionsstartestelle zwei distale Enhancer SRR107 (107 kb *downstream*) und SRR111 (111 kb *downstream*). Sie regulieren die *Sox2*-Transkription in ES-Zellen und sind wie in Abbildung 7 zu sehen in der distalen Kontrollregion *Sox2* control region (SCR) geclustert (Zhou et al., 2014). Die SCR ist Teil eines 27 kb großen *Sox2*-Superenhancers, der in ES-Zellen u.a. *Sox2*, Oct₄ und Nanog bindet (Li et al., 2014; Whyte et al., 2013; Zhou et al., 2014).

Es wurde beschrieben, dass Flüssig-Flüssig-Phasentrennung an Superenhancern besonders wahrscheinlich ist (Sabari et al., 2018). Die SCR wurde als Superenhancer charakterisiert, da sie viele Voraussetzungen erfüllt (Whyte et al., 2013). FFPT ist folglich auch bei der Regulation von *Sox2* durch die SCR zu erwarten (Alexander et al., 2019).

In *live cell imaging* Experimenten konnte keine Korrelation zwischen *Sox2*-Transkription und Annäherung von *Sox2* und SCR beobachtet werden, wodurch die allgemeine Annahme, dass zur Aktivierung der Genexpression Promotor und Enhancer in räumlichen Kontakt stehen müssen, in Frage gestellt wird (Alexander et al., 2019). Andererseits zeigten Experimente, in denen SCR und *Sox2* inkl. Promotor in eine fremde, CRE-freie und modifizierte TAD inseriert wurden, dass das Transkriptionslevel von *Sox2* abhängig

der SCR-*Sox2*-Distanz ist, was wiederum für einen Einfluss der räumlichen Nähe bzw. der Kontaktwahrscheinlichkeit von *Sox2* und SCR spricht (Zuin et al., 2021). Die unterschiedlichen Experimente mit ihren Ergebnissen scheinen im Widerspruch zueinander zu stehen, könnten jedoch durch die Hypothese, dass es einen gewissen „Memory-Effekt“ gibt, erklärt werden (Alexander et al., 2019; Zuin et al., 2021). Durch diesen Memory-Effekt führe der zeitlich kurze Kontakt von SCR und *Sox2*-Promotor vermutlich langanhaltend zu einer erhöhten Transkriptionsrate von *Sox2* auch nach Auflösen des SCR/*Sox2*-Kontaktes (Zuin et al., 2021). Das beschriebene Modell lässt dabei unbeachtet, ob die Enhancer-Promotor-Interaktion zufällig entsteht oder durch andere molekulare Interaktion bedingt ist (Zuin et al., 2021).

Das Entwicklungsgen *Shh* und das Pluripotenzgen *Sox2* unterscheiden sich wesentlich anhand ihrer raumzeitlichen Genexpression sowie anhand ihrer zugehörigen CREs (Anderson et al., 2014; Chen et al., 2008; Ingham & McMahon, 2001; Zhou et al., 2014).

Sox2 wird durch einen Superenhancer reguliert, der besonders in embryonalen Stammzellen aktiv ist (Zhou et al., 2014). Im Gegensatz dazu wird *Shh* durch eine Vielzahl von Enhancern mit unterschiedlichen Aktivitäten in verschiedenen Geweben reguliert, wobei der Extremitätenenhancer ZRS der einzige ist, der die *Shh*-Expression in der Extremitätenknospe reguliert (Anderson et al., 2014; Lettice et al., 2003). Inwieweit die Unterschiede der genregulatorischen Mechanismen jedoch in Zusammenhang mit der Spezifität zwischen den jeweiligen Enhancern und den zugehörigen Promotoren stehen, ist bisher noch weitestgehend unerforscht und soll in dieser Arbeit durch einen CRISPR/Cas9-basierten Austausch der CREs analysiert werden.

1.5 CRISPR/CAS9 ALS GENTHERAPEUTISCHES WERKZEUG

Eine Vielzahl genetischer Erkrankungen geht mit Mutationen im gencodierenden Bereich einher, die letztendlich zu einer Änderung der Proteinfunktion in verstärkender (*gain of function*) oder abschwächender (*loss of function*) Weise führen.

Der Großteil des Genoms (98 %) besteht jedoch aus nicht-codierenden Sequenzen, zu denen u.a. Elemente mit regulatorischer Funktion wie Promotoren und Enhancer zählen (Alexander et al., 2010; Consortium, 2012). In den letzten Jahrzehnten wurden zunehmend genetische Erkrankungen beschrieben, die ihren Ursprung in Veränderungen des nicht-codierenden Bereiches des Genoms haben (Zhang & Lupski, 2015). Es ist bekannt, dass bspw. Karzinogenese, Tumorprogression, seltene hereditäre Erkrankungen oder auch psychiatrische Erkrankungen mit Veränderungen der Genregulation und mit Mutationen, die die Enhancer-Promotor-Interaktion beeinflussen, zusammenhängen (Herz et al., 2014; Ibrahim & Mundlos, 2020; Spielmann et al., 2018; Xu et al., 2008).

Im Tier- sowie Zellmodell wurde gezeigt, dass durch biotechnologische Methoden CREs betreffende genetische Defekte behoben und eine fehlerhafte Genregulation unterbunden werden können (Matharu & Ahituv, 2020). Insbesondere die Verwendung von CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/*CRISPR-associated protein 9*) birgt dahingehend ein großes Potential und wurde bereits mehrfach im Tiermodell erfolgreich therapeutisch eingesetzt (Colasante et al., 2020; Liao et al., 2017; Matharu & Ahituv, 2020).

Ursprünglich wurde CRISPR/Cas9 als ein primitives Immunsystem von Bakterien gegenüber Viren entdeckt. Hauptakteure im CRISPR/Cas9-System sind, wie in Abbildung 8 dargestellt, eine *singleguide* RNA (sgRNA) und die Endonuclease Cas9 (siehe Review (Doudna & Charpentier, 2014)). Die sgRNA hybridisiert mit einem ihr komplementären Bereich der Ziel-DNA und führt durch ihre Cas9-Interaktionsregionen zur Rekrutierung der Cas9, die dann einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA erzeugt. Das Vorhandensein einer *Protospacer adjacent motif* (PAM)-Sequenz (Trinukleotid NGG) *downstream* der Hybridisierungsstelle auf der Ziel-DNA, dient der Erkennung der Cas9. Ohne PAM-Sequenz erzeugt die Cas9 keinen Doppelstrangbruch, wodurch der Schutz vor Zerstörung der eigenen DNA in Bakterien sichergestellt wird und nur die Ziel-DNA, sprich die virale DNA, zerstört wird. Mittlerweile wird CRISPR/Cas9 als optimierte Genomeditierungs-Methode verwendet, um Veränderung der DNA auf ein bestimmtes Basenpaar genau, gezielte Insertionen sowie strukturelle Varianten zu generieren (Andrey & Spielmann, 2017; Byrne & Church, 2015; Gasiunas et al., 2012; Kraft et al., 2015). Durch spezifische Wahl und Design der sgRNA kann an definierten Sequenzen der Ziel-DNA Doppelstrangbrüche erzeugt werden. Das CRISPR/Cas9-System kann jedoch auch unter Verwendung von modifizierten Cas-Proteinen, die keine Doppelstrangbrüche verursachen, genutzt werden. Dies ermöglicht durch Interaktion des CRISPR-Systems mit der Ziel-DNA die Modifizierung von CREs, ohne die DNA zu editieren (Colasante et al., 2020; Liao et al., 2017).

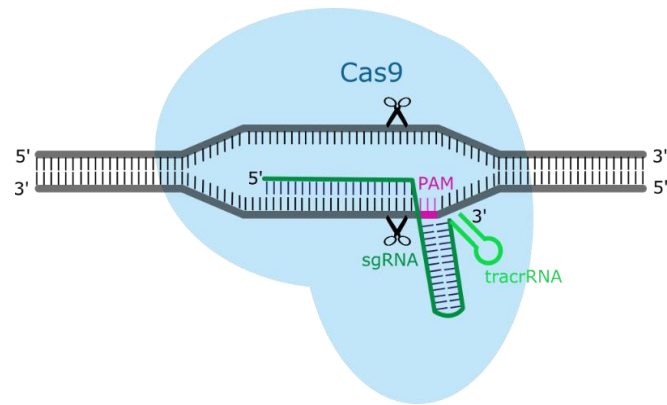


Abbildung 8: CRISPR/Cas9 System grau: Doppelstrang-DNA an der Locus-spezifisch ein Doppelstrangbruch durch Cas9 erzeugt wird (Scheren) ; Blau : Cas9-Endonuklease; Pink: PAM-Sequenz (Trinukleotid NGG); dunkelgrün: sgRNA, die Locus-spezifisch an die Doppelstrang-DNA bindet und Cas9 zum Locus rekrutiert. Hellgrün: tracrRNA Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplexes der Cas9

Darüber hinaus kann, wie auch in dieser Arbeit, CRISPR/Cas9 als Methode verwendet werden, um spezifische gezielte Mutationen einzuführen, welche die Funktionsweise von CREs genauer untersuchen. Das bessere Verständnis genregulatorischer Mechanismen, könnte dazu beitragen die Pathogenese von Erkrankungen besser zu verstehen und neue Ansatzpunkte für Therapien zu liefern.

Die vielversprechende Datenlage zu den CREs-betreffenden gentherapeutischen Methoden und daraus folgenden Erwartungen bezüglich des Nutzens für die Gentherapie im Menschen stehen im Kontrast zu aus ethischer Sicht problematischen Aspekten, wie der Forschung an humanen embryonalen Stammzellen oder die gentechnische Veränderung von Keimzellen und damit der potenziellen Weitervererbung der genetischen Veränderung (Hunt, 2008; King & Perrin, 2014; Rabino, 2003). Daraus resultieren weiterführende gesellschaftliche Fragen wie zum Beispiel: Würde eine ubiquitäre Verbreitung von Gentherapie dazu führen, dass Personen mit bestimmten genetischen Varianten in der Gesellschaft weniger Akzeptanz erfahren? Oder: Würde Gentherapie, durch hohe Kosten zu einem Privileg werden und damit Disparitäten bzgl. des sozioökonomischen Status verstärken? (Feinberg, 2006; Hunt, 2008; Rabino, 2003). Die Gegenüberstellung der verschiedenen Aspekte bietet einen großen Raum für eine wichtige intradisziplinäre Diskussion.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Enhancer und Promotoren sind CREs, die die Genexpression auf raumzeitlicher Ebene koordinieren. Die fehlerfreie Regulation komplexer Genexpressionsmuster ist insbesondere während der Embryogenese bedeutsam. CREs-enhaltende genregulatorische Landschaften von Entwicklungsgenen korrelieren häufig mit dreidimensionalen Chromatineinheiten, sogenannten TADs. Es wird angenommen, dass TADs dabei helfen, einen räumlichen Kontakt zwischen Enhancer und zugehörigen Promotoren zu schaffen und unangebrachte Kontakte zu beschränken. Auf welche Weise Enhancer und Promotor sich gegenseitig finden und was letztlich ausschlaggebend für die Genaktivierung ist, ist noch nicht vollständig verstanden. Frühe Definitionen von Enhancern schlossen eine gewisse Promiskuität ein, unter der angenommen wurde, dass Enhancer Promotoren wahllos aktivieren, sobald sie in räumlicher Nähe zueinander stehen. Mittlerweile entkräften einige Arbeiten diese Annahme und es stellt sich die Frage, welche Faktoren die Promotor-Enhancer-Spezifität definieren.

In dieser Arbeit wird die ZRS, der einzige Extremitätenenhancer des Entwicklungsgens *Shh*, in zwei unabhängigen Projekten charakterisiert.

1. Charakterisierung Promotor-Enhancer-Spezifität

Im ersten Projekt wird die Promotor-Enhancer-Spezifität von *Shh*-Promotor und ZRS analysiert. Die beiden CREs liegen in etwa 900 kb linearer Distanz und werden durch eine zelltypunabhängige vorgeformte Chromatinschleife in räumlicher Nähe zu einander gebracht. Eine genaktivierende Interaktion der CREs findet jedoch lediglich in der ZPA der Extremitätenknopse statt. In dieser Arbeit soll in mES-Zellen mittels CRISPR/Cas9 die ZRS durch einen in mES-Zellen aktiven, starken *Sox2*-Enhancer ersetzt werden und der *Shh*-codierende Bereich durch *GFP* als Reporter gen. Durch den Austausch der CREs soll analysiert werden, ob eine Genaktivierung durch räumliche Assoziation eines starken, in mES-Zellen aktiven Enhancer mit einem in mES-Zellen nicht aktiven Promotor erzielt werden kann.

2. Analyse der ZRS₃₀₀

Die ZRS ist ein hochkonservierter Enhancer und ca 720 bp *upstream* befindet sich eine weitere hochkonservierte Sequenz von ca. 300 bp Länge (ZRS₃₀₀). In vorigen nicht publizierten Versuchen der Arbeitsgruppe Mundlos ist aufgefallen, dass der Austausch der murinen ZRS durch die anderer Spezies zu Letalität führt, sobald die ZRS₃₀₀ mit ausgetauscht wird. In diesem Projekt soll die ZRS₃₀₀ verschiedener Spezies charakterisiert werden. Dazu wird zum einen ein *Alignment* der verschiedenen Sequenzen analysiert und zum anderen werden *LacZ*-Reporter genassays durchgeführt, um eine potenzielle Enhancerfunktion während der Embryonalentwicklung zu detektieren.

3. METHODEN UND MATERIAL

Eine Ausführliche Materialienliste mit Zusammensetzung von Puffern und Lösungen, Lotnummern und den verwendeten Geräten ist in Kapitel 3.4 zu finden. Sofern nicht anders vermerkt, sind die entsprechenden Informationen dort zu finden.

3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 Primerdesign

Mit Hilfe von spezifischen Primern konnten Genotypisierungen, Sequenzierungen und Vervielfältigung von DNA-Fragmenten für Klonierungen und quantitative Polymerase-Kettenreaktionen (qPCRs) gewährleistet werden. Die Primer wurden mit NetPrimer, Primer3 und NCBI Primer-Blast (siehe Tabelle 11) designt und von Eurofins Genomics synthetisiert.

Die Primer-Lösungen wurden stets in einer Konzentration von 1 pmol/μl angefertigt. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich Tabelle 19.

3.1.2 Design und *Annealing* von *singleguide* RNAs

Für die hier durchgeführten CRISPR/Cas9-basierten Knock-In-(KI)-Experimente sind spezifische sgRNAs nötig (siehe 1.5).

Für das *GFP*-Knock-In wurde eine sgRNA benötigt, die einer Sequenz in der Nähe des *Shh*-Startcodons entspricht (siehe Abbildung 9 (1)). Mit Hilfe des UCSC Genome Browsers und des CRISPR-*Designtools* des Feng Zhang lab (<http://www.genome-engineering.org/crispr/>) wurde eine sgRNA mit einem *Score* von 92 % (Wahrscheinlichkeit, dass kein *off-Target*-Effekt eintritt) gefunden. An der Insertionsstelle im Genom, befindet sich *downstream* der *singleguide* Sequenz eine PAM-Sequenz, die von der Cas9 für eine spezifische Bindung nötig ist.

Zur Klonierung spezifischer sgRNAs wurden komplementäre Oligonukleotide mit *BspI*-Überhängen designt (siehe Abbildung 9). Die *BspI*-Überhänge sind notwendig für eine Klonierung in das *BspI*-verdaute pSpCas9(BB)-2A-Puro-Plasmid mit *Puromycin-Resistenz* Kasette und *Cas9* (PX459 von Addgene) (siehe Abbildung 15).

Für die Knock-In-Experimente der *Sox2*-Enhancer-Konstrukte wurden laborinterne G4 mES-Zellen mit deletierter ZRS verwendet, sowie eine entsprechende sgRNA, (siehe Abbildung 9 (2)), die zur Insertion an dieser Stelle führt.

sgRNA *GFP*-Knock-In

1A 5' -CACC-GCATCTCGTCCGCGGAACCTG-3'
3' -CGTAGAGCAGGCGCCTTGGAC-CAA-5'

1B 5' -AGCAGCATCTCGTCCGCGGAACCTGAGGACTTGTGA-3'

sgRNA *Sox2*-Enhancer-Knock-In

2 5' -CACC-GACATATTTAGTTACACTGTC-3'
3' -CTGTATAAATCAATGTGACAG-CAA-5'

Abbildung 9: sgRNAs für die Knock-In-Experimente

1A sgRNA für *GFP*-Knock-In; Doppelstrangform mit *Bsbl*-Überhänge zu Klonierungszwecken,

1B entsprechende Sequenz im Genom (Chr5:28,466,755), in grün markiert ist die PAM-Sequenz

2 sgRNA für *Sox2*-Enhancer-Knock-Ins; Doppelstrangform mit *Bsbl*-Überhänge zu Klonierungszwecken

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics bezogen und jeweils 2µl (100 pmol/µl) der komplementären Oligonukleotid-Lösungen mit 16µl MilliQ H₂O versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 95°C wurde für das Aneinanderlagern (*Annealing*) der Oligonukleotide im Thermocycler ein Temperaturabfall von 95°C auf 4°C innerhalb von 4,5 min (- 0,3°C pro 10 s) durchlaufen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Temperaturprofil für *Annealing*-Reaktion

Temperatur	Zeit
95°C	15 min
94,7°C	10 s
94,3°C	10 s
94,1°C	10 s
...	...
4,3°C	10 s
4°C	∞

3.1.3 Klonieren

3.1.3.1 Ligation der sgRNA in PX459

Die aneinandergelagerten sgRNA wurden mittels T₄-Ligase nach Herstellerprotokoll in ein *Bsbl*-verdauten PX459-Plasmid ligiert und anschließend in chemisch-kompetenten Top10 *E. Coli* Zellen (laborintern von Asita Carola Stiege produziert) transformiert.

3.1.3.2 Ligation der *Targeting*-Konstrukte durch *Gibson Assembly*®

Für CRISPR/Cas9-vermittelte Insertionen von Ziel-DNA-Sequenzen wurden entsprechende *Targeting*-Konstrukte kloniert, die asymmetrische Homologiearme für eine homologe Rekombination (siehe 3.2.2) enthalten. Es wurden mehrere Plasmide für die *Sox2*-Enhancer-Knock-Ins sowie ein Plasmid für das Knock-In des *GFP*-Reporters kloniert. Tabelle 4 listet die verwendeten Plasmide mit den zugehörigen

Verwendungszweck sowie Hersteller. Die Plasmidkarten von verwendeten sowie klonierten Plasmide in Kapitel 3.4.4 in Abbildung 11 bis 16 sowie in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 4: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Plasmid	Hersteller	Verwendungszweck
PX459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro)	Addgene	Klonierung der sgRNAs Anschließend b
pKan	Daniel M. Ibrahim	Klonierung der <i>Insert</i> -DNA
Sox2-Enhancer enthaltende Plasmide	Michael Robson	Amplifizierung von Sequenzen
pGKfrt- <i>LacZ</i>	Addgene	Klonierung der ZRS300-Sequenzen

Vor Klonierung des *GFP-Inserts* in das pKan-Plasmid (laborintern von Daniel Ibrahim) wurde mittels Restriktionsverdau mit *Sall* und *NotI* und anschließender Ligation eine Poly-A-Sequenz (laborintern von Michael Robson) an das Ende des *GFPs* kloniert, um die bei der potenziellen *GFP*-Expression entstehende mRNA zu stabilisieren.

Die Ligation der *Targeting*-Konstrukte in die entsprechenden Plasmide erfolgte mittels *Gibson Assembly* nach Herstellerprotokoll (NEBuilder HiFi DNA Assembly Reaction Protocol). Beim *Gibson Assembly* werden die 5'-Enden der zu ligierenden DNA-Fragmente durch eine T5-Exonuklease verdaut, dabei entstehen 3'-Überhänge, die als *sticky ends* eine Hybridisierung aufgrund der homologen Sequenzen eingehen. Eine DNA-Polymerase mit DNA-Doppelstrang-trennenden Eigenschaften synthetisiert die DNA-Stränge, die zuvor durch die Exonuklease verdaut wurden und verdrängt dabei den zweiten Strang. Letztlich wird durch eine Ligase an den verbliebenen Einzelstrangbrüchen das 3'-Ende mit dem 5'-Ende verbunden (Gibson et al. 2008).

Die zu inserierenden DNA-Fragmente (*Inserts*) wurden mit passenden 5'-Überhängen von genewiz.de synthetisiert oder aus genomischer oder Plasmid-DNA amplifiziert, dabei entstanden die benötigten 5'-Überhänge durch Verwendung geeigneter Oligonukleotide. Die Amplifikation erfolgte mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase von NEB nach Herstellerprotokoll.

3.1.3.3 Restriktionsverdau

Die in Tabelle 5 gelisteten Plasmide wurden durch Restriktionsenzyme von Thermofisher nach Herstellerprotokoll linearisiert. Dafür fand eine Inkubation für mind. 3 Stunden bei 37°C statt sowie eine Aufreinigung über eine Gelelektrophorese mit 1 %-igem Agarosegel (siehe 3.1.6) und dem QIAquick PCR purification Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll.

Tabelle 5: Verwendete Plasmide und Restriktionsenzyme für anschließendes *Gibson Assembly*

	Ursprungs-Plasmide für Backbone	Restriktionsenzyme
sgRNA	PX459	<i>Bsbl</i>
<i>GFP</i> -KI	pKanHorse	<i>Sall</i> und <i>NotI</i>
Sox2-Enhancer-KI	pKanHorseZRS800	<i>AatII</i> und <i>PvuII</i>
ZRS300 Reporter-genassay	pGKfrt- <i>LacZ</i>	<i>PacI</i>

3.1.3.4 Transformation

Um die klonierten Plasmide zu vervielfältigen, müssen sie von Bakterienzellen aufgenommen werden und können dann von diesen über die zelleigene Replikation vervielfältigt werden. Jeweils 10 µl der Ligationsansätze wurden zu 100 µl chemisch-kompetenter Top10 *E. Coli* Zellen (laborintern von Asita Carola Stiege produziert) gegeben. Durch einen Hitzeschock (42°C für 60 s) wurde die Permeabilität der bakteriellen Zellwand erhöht. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 900 µl SOC-Medium hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Anteile (10 % und 90 %) der transformierten auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Im weiteren Verlauf wurden Klone, die auf den antibiotikahaltigen Platten gewachsen sind, mit einer Kolonie-PCR (siehe 3.1.5 PCR) auf korrekte Klonierung der Plasmide getestet und dann in Flüssigkulturen angereichert. Dadurch konnten größere Mengen der Plasmide erhalten werden, die dann mit dem NucleoBond® Xtra Midi EF-KIT von Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll aufgereinigt wurde.

3.1.4 DNA-Isolation

3.1.4.1 Plasmid-Isolation

Die Isolation von Plasmiden aus *E. Coli* erfolgte nach Herstellerprotokoll mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits (Macherey-Nagel). Plasmide, die im weiteren Verlauf zur Transfektion von mES-Zellen verwendet wurde, wurden mit dem NucleoBond® Xtra Midi EF Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

3.1.4.2 Isolation genomischer DNA (gDNA)

Genomische DNA von mES-Zellen aus 96-Well-Platten wurde mit dem KingFisher™ Flex 96 System-Roboter extrahiert. Dazu wurden die mES-Zellen mit Zell-Lysepuffer und Proteinkinase K (0,08 mg/ml) über Nacht bei 55°C inkubiert. 50 µl der Zellysate wurden mit 32 µl 85 % Ethanol zu 8 µl DNA magnetischen Beads (MagAttract® (Qiagen)) hinzugegeben. Das verwendete Protokoll ESC_gDNA_85_GADMI-protocol der BindIt 3.1 Software wurde vom Extraktionroboter durchgeführt und beinhaltete folgende Schritte: 1. Bindung der Beads, 2. 2x Waschen mit 85 % Ethanol, Endkonzentration 70 %, 3. Trocknung der Beads, 4. Elution in MilliQ H₂O. Darauf folgte eine Genotypisierungs-PCR (siehe 3.1.5).

Genomische DNA muriner Embryonen wurde mit Quick Extract DNA Extraction Solution (Lucigen) isoliert (siehe Herstellerprotokoll).

Genomische DNA für Genotypisierungen und Sequenzierungen nach Sanger wurde mit Zellysepuffer und anschließender DNA-Fällung mittels Isopropanol isoliert. Dafür wurden die zu analysierenden Zellen in 500 µl Lysepuffer für mind. 3 h bei 55°C inkubiert, dann mit 5 M NaCl versetzt und weitere 20 min bei

55°C inkubiert. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und anschließend eine 20-minütige Zentrifugation bei 9000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde mit Isopropanol in einem Verhältnis von 1:0,6 versetzt und wiederum bei 4°C und <13.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Das Pellett wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und danach in 100 µl MilliQ H₂O gelöst.

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.5.1 PCR für Genotypisierungen

PCR für Genotypisierungen (z.B. Stammzellen, embryonales Gewebe) wurde mit einer laboreigenen *Taq*-Polymerase (Asita Carola Stiege) durchgeführt. In Tabelle 6 und 7 sind Reaktionsansatz sowie Thermoprofil dargestellt.

Tabelle 6: Reagenzien mit Volumenangabe für Genotypisierungs-PCRs

Reagenz	Volumen
10x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs (12,5 mM)	0,1 µl
Vorwärtsprimer	0,1 µl
Rückwärtsprimer	0,1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
DNA	mind. 15 ng
MilliQ H ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 7: Temperaturprofil für Genotypisierungs-PCRs

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	25x
95°C	30 s	
55°C (oder Primer-spezifisch)	30 s	
72°C	60 s (oder abhängig der Fragmentlänge)	
72°C	1 min	
4°C	∞	

3.1.5.2 Kolonie-PCR

E. Coli-Kolonien, die auf Antibiotika-Platten gewachsen sind, mussten auf die Korrektheit des aufgenommenen Plasmids überprüft werden. Dies fand über eine PCR statt, die auf die Amplifikation eines Fragments abzielt, das nur bei einem korrekten Zusammenbau des Plasmids erfolgreich ist.

Mit Pipettenspitzen wurden die Kolonien von der Antibiotika-Platte gepickt und auf eine Replika-Platte übertragen. Dieselbe Pipettenspitze wurde dann in 20 µl eines PCR-Reaktionsansatzes (siehe Tabelle 8)

Tabelle 8: Reagenzien für Kolonie-PCRs

Reagenz	Volumen
10x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs (12,5 mM)	0,1 µl
Vorwärtsprimer	0,1 µl
Rückwärtsprimer	0,1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
MilliQ H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 9: Temperaturprofil für Kolonie-PCRs

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	25x
95°C	30 s	
55°C (oder Primer-spezifisch)	30 s	
72°C	60 s (oder abhängig der Fragmentlänge)	
72°C	1 min	
4°C	∞	

überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das in Tabelle 9 dargestellte Temperaturprofil durchlaufen.

3.1.5.3 Phusion® High-Fidelity PCR für Gibson-Assembly und Sequenzierung nach Sanger

Für DNA-Fragmente, die im weiteren Verlauf in ein Plasmid eingebaut oder nach Sanger sequenziert wurden, sollten mit einer geringeren Fehlerwahrscheinlichkeit amplifiziert werden. Dafür wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase von NEB nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase hat eine geringere Fehlerquote als die laboreigene *Taq*-Polymerase, da sie eine eigene *proof reading*-Funktion besitzt.

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der PCR-Produkte nach Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden 1 bis 1,5 %-ige Agarosegele angefertigt, die mit SYBR™ Safe DNA-Gel-Stain (Thermo Fisher) gefärbt wurden. Die PCR-Produkte wurden auf die Gele überführt und eine Spannung von 90 V angelegt.

3.1.7 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger wurde von der Sequencing Facility der Charité durch eine Kapillarelektrophorese an einem ABI3700 Kapillarsequenziergerät durchgeführt.

Vorher wurden die zu sequenzierende Fragmente mit dem BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerprotokoll vorbereitet.

3.2 METHODEN DER ZELLKULTUR

Katerina Kraft etablierte das mES-Zellkultur-Protokoll des Labors in Zusammenarbeit mit Heiner Schrewe und Lars Wittler (Developmental Genetics MPIMG Berlin), dabei werden Standardabläufe befolgt, die in Behringer et al., 1994; Kraft et al., 2015; Nagy and Nichols, 2011; Nagy et al., 2010; Robertson, 1987; Wassarman and Soriano, 2010 detaillierter beschrieben sind,

3.2.1 Stammzellkultivierung

3.2.1.1 Feeder-Zellen (Fütterzellen)

Murine embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) werden auf einem *Monolayer* (Einzelschicht) inaktiver muriner embryonaler Fibroblasten (mEF) in Kultur gehalten.

Die mEF bilden zum einen ein stabiles Gerüst, auf dem sich die mES-Zellen leicht anheften, zum anderen dienen sie der Ernährung der mES-Zellen und werden deshalb auch als *Feeder-Zellen* bzw. *Feeder* bezeichnet. Sie sekretieren beispielsweise den Leukämiehemmenden Faktor (LIF), welcher die Differenzierung der mES-Zellen inhibiert (Fleischmann et al., 2009).

mEFs werden aus (Puromycin/Hygromycin-resistenten) E13.5 und E14.5 CD1- und DR4-Mausembryonen gewonnen. Sie werden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % Fetalem Kälberserum, 1x Glutamin und 1x Penicillin/Streptomycin in Kultur gehalten und in fünf Schritten expandiert. Die mEFs werden in Mitomycin C-versetztem Medium für 2 Stunden inaktiviert, mit PBS gewaschen und jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen/Vial in Gefriermedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO bei -80°C eingefroren. Durch Mitomycin-C verlieren die mEFs die Fähigkeit zur Zellteilung, damit sie nicht mit den zu kultivierenden mES-Zellen mitwachsen.

3.2.1.2 Kultivierung von mES-Zellen

Zur Kultivierung von mES-Zellen wurden einen Tag zuvor Petrischalen mit 0,1 %-iger Gelatine (Sigma) 15 min bei 37°C , 7,5 % CO_2 inkubiert und darauf ca. 3×10^4 Zellen/cm *CD1-Feeder* ausgesät. Auf die sich bildende *Feeder-Monolayer* wurden dann (mind. 6h später) jeweils bis zu 500.000 mES-Zellen ausgesät. Die verwendeten mES-Zellen waren G4-Zellen (Hybridstamm aus 129Sv x C57BL/6) oder C2-Zellen (C57B/6 und 129svJae F1 Hybrid).

Das verwendete ES-Medium (siehe 3.4.7) wurde mit 1000 U/ml LIF (Murine Leukaemia Inhibitory factor ESGRO™) versetzt und ca. alle 24 h ersetzt, um einer Differenzierung der mES-Zellen vorzubeugen. Zusätzlich wurde zwei Stunden vor potenziell Zellstress auslösenden Schritten, wie Splitten, Einfrieren und Transfektionen, das ES+LIF-Medium gewechselt.

3.2.1.3 Splitten (Vereinzeln) von kultivierten Zellen

Unter bestimmten Umständen war es nötig, mES-Zellen von einem Kulturgefäß auf ein anderes zu überführen (z.B. Konfluenz von 80-90 %). Dafür wurden die Kulturschalen zwei Mal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA 0,05 % versetzt. Trypsin ist eine Protease, die die Proteinbindungen zwischen den einzelnen Zellen trennt, dadurch lösen sich die Zellen voneinander und können vereinzelt auf andere Kulturgefäße überführt werden. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Trypsin mit ES-Medium inhibiert. Die Zellen wurden dann unter Auf- und Abpipettieren vereinzelt, dann bei 300xg für 5 min zentrifugiert, in ES+LIF-Medium resuspendiert, ggf. mit einem Zellzähler gezählt und anschließend (in gewünschter Menge) auf die neuen Kulturgefäße mit *Feeder*-Zellen überführt.

3.2.1.4 Einfrieren von kultivierten Zellen

Um die mES-Zellen einzufrieren, wurden sie wie beim Vereinzeln mit Trypsin von den Kulturschalen abgelöst und abzentrifugiert. Handelte es sich um eine größere Anzahl an Zellen, wurden diese in Cryo-Gefäßen mit 1 ml Gefriermedium (ES-Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) überführt. Dabei wurden mindestens 1 Million Zellen pro Cryo-Gefäß bei -80°C in einer Isopropanol-Gefrierbox (Mr. Frosty) eingefroren.

MES-Zellen, die auf 96-Well-Platten kultiviert wurden, wurden mit 50 µl Trypsin abgelöst und nach 10-minütiger Inkubation mit 100 µl ES-Medium mit 20 % FCS versetzt. Zweimal 50 µl von diesem Ansatz wurden jeweils zu 50 µl ES-Medium mit 20 % FCS und 20 % DMSO gegeben und dann bei -80°C eingefroren. Der Rest wurde weiterhin kultiviert für die spätere Extraktion von genomischer DNA zur Genotypisierung der einzelnen Zelllinien.

3.2.2 CRISPR/Cas9

In dieser Arbeit wird CRISPR/Cas9 für die Insertion von *GFP* an Stelle des *Shh*-codierenden Bereichs und Insertion eines *Sox2*-Enhancer an Stelle der ZRS verwendet.

Durch spezifische Wahl und Design der *singleguide* RNAs (sgRNA) wird bestimmt, an welcher Stelle in der genomischen DNA der Zielzellen ein Doppelstrangbruch erzeugt wird. Die verwendeten sgRNA sind in Abbildung 9 dargestellt.

Nachdem durch die Cas9 in der Ziel-DNA ein Doppelstrangbruch erzeugt wurde, benutzt die Zelle ihre zelleigenen Reparaturmechanismen für Nicht-Homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder Homologe Endverknüpfung (HDR). Durch die homologe Rekombination beim HDR-Reparaturmechanismus kann bei Verwendung eines *Insert*-Konstruktes, das neben dem *Insert* entsprechende Homologiearme enthält, eine Insertion ermöglicht werden (siehe Abbildung 10). Beim Design des *Insert*-Konstrukts wurde sichergestellt, dass die PAM-Sequenz mutiert ist, damit die Cas9 lediglich die Sequenz in der Ziel-DNA

und nicht im *Insert* erkennt und spaltet (siehe Abbildung 17). Die PAM-Sequenz dient auf der Ziel-DNA dazu, dass die Casg aktiviert wird.

In dieser Arbeit wird das PX459-Plasmid von Addgene verwendet (siehe Abb. 15), in das die sgRNA kloniert wurde. Über eine nicht-liposomale Transfektion wurde das Plasmid in mES-Zellen eingeführt (siehe 3.2.4). Das zweite eingesetzte Plasmid bei der nicht-liposomalen Transfektion beinhaltete die zu inserierende DNA mit asymmetrischen Homologiearmen.

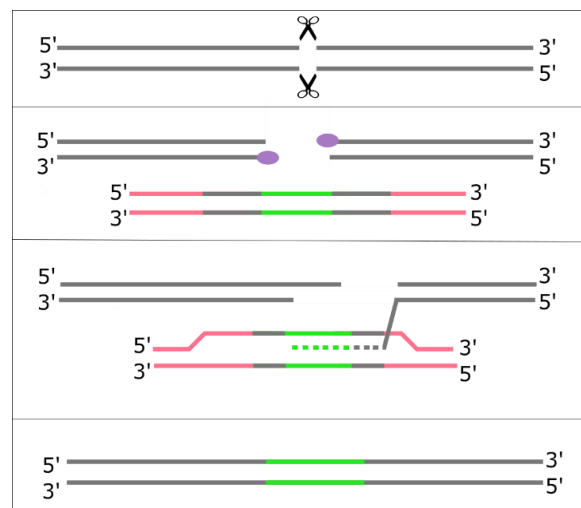


Abbildung 10: Homologe Rekombination nach einem Doppelstrangbruch. Durch zelleigene Mechanismen (lila) wird die DNA repariert. Wird dabei eine fremde DNA-Sequenz mit homologen Bereichen (grau) zur Bruchstelle verwendet, sind Insertionen von DNA-Sequenzen (grün) in die Ziel-DNA möglich.

3.2.3 Flp/FRT-System in C2-mES-Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein *LacZ*-Reportengenassay durchgeführt, um die Aktivität der 300 bp langen hochkonservierten Sequenz, die 720 bp *upstream* der ZRS liegt (hier ZRS300 genannt), zu analysieren. Dazu wurde ein Flp/FRT-System genutzt. Die C2-Zelllinie der Arbeitsgruppe Mundlos beinhaltet im *Col1A1*-Locus (mm8, chr11:94,752,360-94,767,937) eine PCK Neomycin Kasette, die von zwei FRT-Stellen flankiert ist sowie von einer ATG-losen, promotorfreien Hygromycin-Kasette und wurde bereits in vielen Experimenten verwendet (Beard et al., 2006). Das verwendete P_{gk}ATGf_{rt}-Plasmid (pGKf_{rt}-*LacZ*) (Addgene) enthält ebenfalls eine FRT-Kasette sowie das *LacZ*-Gen mit einem β -*Globin*-Minimalpromotor (Abb. 16) und die ZRS300 verschiedener Spezies (Kuh, Huhn, Pferd und Maus) wurden hinein kloniert.

Mit Hilfe des Flp-InTM-Kit von Thermo Fisher wurde eine liposomale Transfektion durchgeführt (siehe 3.2.4) und somit die ZRS300-Sequenzen auf den pGKf_{rt}-*LacZ*-Plasmiden in den *Col1A1*-Locus von C2-mES-Zellen inseriert. *Col1A1* ist das zugehörige Gen für das Kollagen Typ I $\alpha 1$ und der Locus und eignet

sich gut für Transgenanalyse, da in dem Locus eine Expression von Transgenen auch in Zellen möglich ist, die normalerweise das Typ I $\alpha 1$ Kollagen nicht exprimieren (McCreath et al., 2000).

3.2.4 Transfektion von mES-Zellen

3.2.4.1 Nicht-liposomale Transfektion von G4-Zellen für CRISPR/Cas9-Experimente

Einen Tag nach Aussaat von ca. 300.000-400.000 G4-mES-Zellen pro 6 cm Petrischale auf CD1-Feeder-Zellen in ES+LIF-Medium wurden die mES-Zellen auf die Transfektion vorbereitet. Dazu wurde das Medium zu ES+LIF ohne Penicillin und Streptomycin gewechselt, da dieses mit dem Transfektionsreagenz interferieren kann und so die Effizienz potenziell beeinträchtigen könnte.

In Ansatz 1 wurden 8 μg des sgRNA enthaltenden PX459-Plasmids und 4 μg des zu inserierenden DNA-Fragments bei Raumtemperatur auf 125 μl mit OptiMEM (Gibco) aufgefüllt und gut vermengt. In Ansatz 2 wurden 25 μl FuGENE HD (Promega) und 100 μl OptiMEM (Gibco) vermischt.

Die beiden Ansätze wurden zusammengeführt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tröpfchenweise auf die mES-Zellen gegeben.

Nach 16 bis 18 Stunden wurde das Medium zu ES+LIF-Medium gewechselt.

48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Selektion der plasmidhaltigen mES-Zellen (Andrey & Spielmann, 2017). Die transfizierten Zellen wurden auf Puromycin-resistente DR4-Zellen überführt und mit ES+LIF+Puromycin-Medium versetzt (Puromycin-Konzentration 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Das PX459-Plasmid enthält eine Puromycin-Resistenz, wodurch eine Selektion ermöglicht wird. Es wurde insgesamt für 48 Stunden selektiert und dann für weitere vier bis sechs Tage zurück zum ES+LIF-Medium gewechselt, damit sich die transfizierten und selektierten Zellen erholen können (Andrey & Spielmann, 2017). Am Tag 8-11 nach Transfektion konnten die einzelnen Zellklone (bestehend aus bis zu 30 Zellen) mit Hilfe einer Pipettenspitze in PBS auf 0,2 % Trypsin-EDTA (Gibco) enthaltenden 96-Well-Platten überführt werden. Nach 10 min Inkubation bei 37°C und Resuspension wurden die Zellansätze auf 96-Well-Platten mit CD1-Feeder-Zellen überführt, für drei Tage in Kultur gehalten und dann auf drei weitere 96-Well-Platten gesplittet. Von den drei 96-Well-Platten wurden zwei eingefroren und eine für Genotypisierung verwendet. Einige als positiv genotypisierte Klone wurden später in Kultur genommen und auf bis zu 6 cm-Platten expandiert, um dann unterschiedliche Experimente durchzuführen.

3.2.4.2 Liposomale Transfektion in C2-mES-Zellen für Flp/FRT-Experimente

Für die liposomale Transfektion in C2-mES-Zellen wurden am Tag 1 CD1-Feeder-Zellen in ES+LIF-Medium ausgesät und am Tag 2 darauf je 800.000 C2-mES-Zellen.

Am Tag 3, dem Transfektionstag, wurde ca. 2 h vor Transfektion das Medium zu ES+LIF ohne Penicillin und Streptomycin gewechselt. Dann wurde Ansatz 1 mit 4,5 μg des Plasmids mit dem zu inserierenden Konstrukt, 1 μg FLP recombinase, 1 μl PlusTM-Reagenz (Thermo Fisher) mit einem auf 125 μl auffüllendem

Volumen OptiMEM (Gibco) vorbereitet. Außerdem wurde Ansatz 2 mit 20 µl Lipofectamin® LTX (Thermo Fisher) und 105 µl OptiMEM (Gibco) vorbereitet. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde Ansatz 2 tröpfchenweise zu Ansatz 1 hinzugegeben und die beiden Ansätze vermengt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der vermengte Ansatz tröpfchenweise auf die C2-mES-Zellen gegeben. Außerdem wurden DR₄-Feeder-Zellen auf drei 6 cm Platten ausgesät.

An Tag 4 wurden die transfizierten Zellen vereinzelt und auf die drei DR₄-Feeder-Platten aufgeteilt. An Tag 5, einem Tag nach Transfektion, begann eine Selektion mit Hygromycin B (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 150 µg/ml. Die Selektion fand über mindestens 5 bis maximal 10 Tage statt. Sobald einige Klone gewachsen sind, wurden diese vereinzelt gepickt und wie bereits bei der nicht-liposomalen Transfektion beschrieben, weiter verfahren.

3.2.5 Morula-Aggregation

Um aus den gentechnisch veränderten C2-mES-Zellen Embryonen zu erhalten, wurden die mES-Zellen in Mausembryonen im Morulastadium injiziert. Der Vorgang wird als Komplementationsassay bezeichnet und kann mit diploiden und tetraploiden Morulae durchgeführt werden (Artus und Hadjantonakis, 2010). Die Morulae wurden im weiteren Verlauf pseudoschwangeren Mausammen implantiert.

Diploide Aggregationen generieren Mausembryonen, die sowohl aus Wildtyp- als auch als gentechnisch veränderten Zellen bestehen. Bei der tetraploiden Aggregation besteht die Morula aus durch Elektrofusion generierten tetraploiden Zellen, die durch ihren vierfachen Chromosomensatz nicht mehr einen vollständigen Organismus bilden können, sondern nur noch zu Zellen des Trophoblasten differenzieren, aus denen sich später Plazenta und Eihäute entwickeln (Nagy et al., 1990).

Die Morula-Aggregationen wurden freundlicherweise von der Transgeneinheit des Max Planck Institut für Molekulare Genetik durchgeführt. Alle Prozesse, die an und mit Tieren durchgeführt wurden, verliefen nach Regularien des Institutes, des Staates und der Regierung (Berlin: Landesamt für Gesundheit und Soziales; Aktenzeichen G0176/19, 07.12.2016).

3.3 ANALYSE DER GENEXPRESSION

3.3.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Die RNA-Extraktion für Quantitative-Real-Time-PCR (RT-qPCR) wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Embryonales Gewebe wurde mit 350 µl RLT-Puffer des Kits + 1 % β -Mercaptoethanol versetzt und durch eine Kanüle homogenisiert. Dann wurde 3 min bei >13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Mini Kit Säule (Qiagen) überführt. Anschließend verlief die RNA-Isolation nach Herstellerprotokoll des RNeasy Mini Kits (Qiagen).

Für die reverse Transkription von RNA in *complementary* DNA (cDNA) wurden jeweils 300 bis 500 ng der extrahierten RNA verwendet und nach Herstellerprotokoll mit dem Superscript III™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen) verfahren.

3.3.2 Quantitative-Real-Time-PCR (RT-qPCR)

Zur Analyse des RNA-Gehalts bestimmter exprimierter Gene in Stammzellen bzw. embryonalem Gewebe, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Dadurch war es möglich, den quantitativen Gehalt an RNA-Transkript im Vergleich zu Haushaltsgenen zwischen einzelnen Zelltypen zu vergleichen. Es erfolgte zu allererst einer reverse Transkription der isolierten RNA zu cDNA (siehe 3.3.1).

Bei der RT-qPCR zum Nachweis von *GFP* und *mCherry*-Expression wurde als Standard Wildtyp-(WT)-Zellen aus embryonalem Gewebe in einer 1:1 Verdünnung sowie die *GFP*- und *mCherry*-Sequenz enthaltenden Plasmide (siehe Abb. 13 und 14) in einer Startkonzentration von 10^6 Moleküle/µl und anschließender 10er Verdünnungsreihe verwendet.

Die RT-qPCR wurde für 4 µl cDNA (10 ng) mit jeweils 2 µl Primer-Mix (1 pmol/µl) mit je 6 µl SYBR Green Reagenz im ABIPrism 7900 HT Thermocycler durchgeführt. Die Reaktion wurden in Triplikaten durchgeführt, aus denen ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet wurde.

Es wurde ein Primerpaar für *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* als Haushaltsgen zur Referenz und jeweils zwei Primer für die *GFP*- und *mCherry*-Sequenz verwendet (siehe Primerliste in Tabelle 19). Analysiert wurden darauf bezogen verschiedene mES-Zellen der Knock-In Experimente, das Gewebe eines *GFP*-Knock-In-Embryos sowie *GFP*- und *mCherry*-enthaltende Plasmide als Referenz.

Es erfolgte zuerst eine Normierung der *GAPDH*-Ansätze der einzelnen Knock-In-Zellen gegen den *GAPDH*-Ansatz der Wildtyp-Zellen, um eine Normierung der generellen Genexpression der Zellen zu erreichen. Anschließend erfolgte eine Normierung der anderen Ansätze gegen den jeweiligen (gegen Wildtyp normierten) *GAPDH*-Ansatz der gleichen Zelllinie, so dass analysiert werden konnte, ob in einer bestimmten Zelllinie das untersuchte Gen stärker oder schwächer im Vergleich zu *GAPDH* transkribiert wurde.

3.3.3 Durchflusszytometrie und FACS

Für die Durchflusszytometrie wurden die mES-Zellen trypsinisiert und mit der gleichen Menge PBS versetzt. Anschließend konnten sie mit dem FACS-Gerät BDFACSARIA™ Fusion (BD Bioscience) und dem Durchflusszytometer Accuri™ C6 (BD Bioscience) auf GFP- und mCherry-Fluoreszenzsignale untersucht werden. Dies wurde in der FACS-Facility des MPI Molgen mit Hilfe von Uta Marchfelder durchgeführt.

Bei der Durchflusszytometrie werden die fluoreszierenden Eigenschaften einzelner Zellen analysiert. Dabei wird die durch die Zellen verursachte Streuung des Lichtes eines Laserstrahls benutzt, um eine *Side Scatter (SSC)* und eine *Format Scatter (FSC)* zu bestimmen. *SSC* ist proportional zur Granularität der Zellen und *FSC* zu der Zellgröße. Kleine Teile wie Zelldebris, die sich in der analysierten Probe befinden, zeigen eine kleine *SSC* und *FSC* und sollen aus der Datenanalyse ausgeschlossen werden. Zu jedem analysierten Partikel werden *SSC* und *FSC* bestimmt und anschließend wird mittels der BD FACSDiva 8.0.1 Software ein *Gating* durchgeführt. Durch das *Gating* werden nur Daten von intakten Zellen weiter verarbeitet.

3.3.4 Immunzytochemie

Die die geneditierten mES-Zellen wurden zur Detektion von GFP und mCherry mittels einer Immunzytochemie-Reaktion analysiert.

Dazu wurden die Zellen im ersten Schritt mit 4 % PFA (in PBS) 15 min bei Raumtemperatur auf Deckgläser für Objektträger fixiert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen.

Durch eine Permeabilisationslösung (10 % Pferde-Serumalbumin (HSA) + 0,2 % TritonX in PBS) wurden die Zellen permeabel gemacht. Dazu wurde mit der Permeabilitätslösung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit PBS gewaschen.

Im folgenden Schritt wurden Primärantikörper (anti-GFP und anti-mCherry; siehe Tabelle 12) hinzugegeben (1:500 in 10 % HSA/PBS-T), es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde nach zweimaligen Waschen mit PBS-T die Sekundärantikörper-Lösung hinzugegeben (10 % HSA/PBS-T, 1:1000 anti-Rabbit und anti-Rat (siehe Tabelle 12) sowie DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) (Sigma) und für 1h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T folgte das *Mounting*. Dabei wurden die Deckgläser mit der Seite, auf der die Zellen fixiert waren, auf die Objektträger mit 6 µl Fluoromount (Sigma Aldrich) fixiert. Am nächsten Tag konnten die Zellen mikroskopisch auf Fluoreszenz der Sekundärantikörper untersucht werden.

3.3.5 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) und ChIP-qPCR

Mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) kann eine Assoziation zwischen Proteinen und bestimmten DNA-Bereichen charakterisiert werden. In diesem Experiment wurden unterschiedliche DNA-

Sequenzen im geneditierten Locus auf Trimethylierung (H₃K₂₇me₃) und Acetylierung (H₃K₂₇ac) der H₃K₇₂-Lysinreste untersucht.

Dazu wurde im ersten Schritt fixiertes Chromatin aus mES-Zellen in 300 µl ChIP-Lysepuffer 3 gelöst und im Diagenode Bioruptor in 42 Zyklen mit Ultraschall sonifiziert. Dabei kommt es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA ohne Beeinflussung der DNA-Protein-Interaktionen.

Nach Zugabe von 30 µl 10 % Triton-X-100 wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert, bis er im weiteren Verlauf für die Immunpräzipitation verwendet wurde.

An Tag 1 der Immunpräzipitation wurden 15 µg des sonifizierten Chromatins in 1,2 ml in ChIP-Lysepuffer 3 gegeben. Dem Lysepuffer 3 wurden zuvor Triton-X-100 (Endkonzentration 1 %) sowie Protease-Inhibitor und Natrium-Butarat hinzugefügt. Einem Ansatz wurde 2,5 µl des H₃K₂₇-Acetylierung-Antikörpers einem anderen Ansatz der H₃K₂₇-Trimethylierung-Antikörper (2,5 µl) hinzugefügt (siehe Tabelle 12). Es folgte eine Inkubation auf einem Rotationsschüttler über Nacht bei 4°C.

An Tag 2 wurden 30 µl Protein G Beads in 0,25 % BSA (Bovines Serumalbumin) in PBS gewaschen und dann auf die Chromatin+Antikörper-Ansätze gegeben und bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag 3 wurden die Ansätze sieben Mal mit 1 ml RIPA (+Triton-X-100 (Endkonzentration 1 %), Protease-Inhibitor und Na-Butarat) gewaschen. Es folgte ein Waschschriff mit TE-Puffer (+Triton-X-100, Protease-Inhibitor + Na-Butarat) und eine Zentrifugation bei 4°C mit 960x g für 3 Minuten. Der TE-Puffer wurde abgenommen und 210 µl Elutionspuffer zugegeben. Danach wurde für 30 Minuten bei 65°C auf dem Thermomixer eluiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wurde abgenommen und zum reversiblen Crosslinking mit 20 µl 5 M NaCl, 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) vermischt und über Nacht bei 65°C inkubiert.

An Tag 4 wurden 4 µl RNaseA zu den Ansätzen gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol:Chloroform:IAA wurde bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 15 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der genomischen DNA wurde abgenommen, mit 500 µl Chloroform versetzt und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit dem dreifachen Volumen 100 % Ethanol 30 µg Glykogen sowie einem Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetat versetzt, vermischt und für 20 Minuten bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde für 45 Minuten bei 4°C und mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml kaltem 70 % Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert. Das trockene Pellet wurde dann in 40 µl MilliQ gelöst und im weiteren Verlauf durch qPCR analysiert.

3.3.5.1 ChIP-qPCR

Bei der ChIP-qPCR wurde DNA untersucht, die vorher durch eine ChIP aufgereinigt und isoliert wurde. Dabei wurden innerhalb der geneditierten mES-Zellen verschiedene Sequenzen (*Shh*-Promotor, *GFP*,

mCherry, Bruchpunktstellen) verglichen.

Es sollte ein quantitativer Vergleich des Knock-In-Locus zu Genen, die in mES-Zellen bekannterweise mit H3K27ac (*Zscan10*, *Nanog*) bzw. H3K27me3 (*Cbx2*, *Fgf8*) assoziiert sind, gezogen werden. Es wurden für jedes Gen zwei Primerpaare verwendet (siehe Primerliste in Tabelle 19) und aus jeweils drei durchgeführten Ansätzen ein Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Es wurden jeweils 15 ng DNA eingesetzt und die qPCR mit je 6 µl SYBR Green Reagenz und 2 µl Primerlösung im ABIPrism 7900 HT Thermocycler durchgeführt.

Der quantitative Vergleich wurde mit Hilfe $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). Für die Analyse der H3K27me3-Assoziation wurde die Differenz aus Ct-Wert vom (in mES-Zellen gering H3K27-trimethylierten) *Nanog* ($Ct_{me3\ nanog}$) und den Ct-Werten der anderen Reaktionen gebildet (im Beispiel $Ct_{me3\ pSHH}$). Es wurde dann der $\Delta\Delta Ct$ -Wert als Differenz der berechneten Differenz ΔCt_{me3} und der Differenz derselben Werte für DNA, die nur sonifiziert wurde und keiner CHIP ausgesetzt wurde (ΔCt_{DNA}) (siehe Beispiel am Ende des Absatzes). Dieser $\Delta\Delta Ct$ -Wert wurde dann als Exponent zur Basis 2 gesetzt, um einen *fold change* zu errechnen.

Für die Analyse der H3K27ac-Assoziation wurde die Differenz aus Ct-Wert des gering H3K27-acetylierten *Fgf8* zu den anderen Ct-Werten gebildet.

Anhand eines Beispiel (H3K27me3 am *Shh*-Promotor (*pShh*)) wird der Rechenweg veranschaulicht:

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{me3} &= Ct_{me3\ nanog} - Ct_{me3\ pSHH} \\ \Delta Ct_{DNA} &= Ct_{DNA\ nanog} - Ct_{DNA\ pSHH} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{me3} - \Delta Ct_{DNA} \\ \text{fold change} &= 2^{\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

3.3.6 LacZ-Reporter-gen-Färbung

Mutierte G4-mES-Zellen wurden in einer Dichte von 2 bis 4 x 10⁵ Zellen auf CD1-Feeder-Zellen ausgesät. Mutante Embryonen wurden durch diploide oder tetraploide Komplementierung in Kollaboration mit der institutsinternen Transgeneinheit erzeugt (Artus & Hadjantonakis, 2011). Als Pflegemütter wurden weibliche CD1-Mäuse verwendet. Für die LacZ-Reporter-genassays wurden gentechnisch veränderte Embryonen im E10.5 dpc Stadium mit X-Gal gefärbt. Dafür wurden die in PBS präparierten Embryonen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 25 Minuten fixiert, danach mit kaltem PBS gewaschen und bei 37°C in der LacZ-X-Gal-Färbelösung (siehe Material 3.4.6) inkubiert. War nach zwei Stunden Inkubation ein starkes Signal sichtbar, wurde die Färbung mit 4 % PFA in PBS gestoppt. Ansonsten wurde weiter über Nacht inkubiert und die Färbung am nächsten Tag gestoppt.

3.4 MATERIAL

Allgemein bekannte Puffer, Medien und Lösungen wurden nach (Green, 2012) angefertigt.

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth oder Sigma-Aldrich in analytischer Qualität bezogen.

3.4.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Für diese Arbeit relevante Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Automatischer Zellzähler (Automatic cell counter)	EVE	NonoEnTek
CO ₂ -Inkubator	HEPA Class 100	Thermo Scientific
Durchflusszytometer (Flow Cytometer)	AccuriTM C6	BD Bioscience
FACS-Gerät (FACS machine)	BD FACSArialI	BD Bioscience
Geldokumentationssystem (Gel documentation system)	EasyWin.32	Herolab
Hitzeblock (Heatblock)	Ori_black OV3	Techne
Kamera	DFC420	Leica
Konfokales Mikroskop (Confocal microscopy system)	LSM700	Zeiss
Kühlzentrifugen (Cooling centrifuges)	5417R	Eppendorf
	Avanti J-E	Beckman-Coulter
	JLA16.250	Beckman-Coulter
Lichtquelle (Light Source)	KL1500 LCD	Leica
Mikroskop für Immunostaining	Axiovert 200M	Zeiss
Photometer	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Pipetten	Research Plus	Eppendorf
Real-Time Thermocycler	ABIPrism HAT 79000RT	Applied Biosystems
Reinigungssystem	KingFisher Flex 96 System-Roboter	Thermo Scientific
Schüttler (Shaker)	G10 Gyrotory	New Bruswich Scientific
Sicherheitswerkbank (Clean Bench)	HERASafe	Thermo Scientific
Stereomikroskop	MZ12	Discovery V12
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2700, 2720 und 9700	Applied Biosystems
Tischzentrifuge (Table top centrifuge)	5414D	Eppendorf
Transilluminator		Hertenstein
Ultrasonicator	Biorptor Plus	Diagenode
Vortex	Microspin	FV-24,00 Lab4yo

3.4.2 Softwares und Webseiten

Die Softwares und Webseiten, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Softwares und Webseiten, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Software/Webseite	URL oder Herausgeber	Verwendungszweck
Ape	M. Wayne Davis	Bearbeitung und Visualisation von Plasmiden
BD FACS Diva 8.0.1	BD Bioscience	Durchflusszytometrie und FACS
CRISPR-Designtool	crispr.mit.edu	CRISPR-Design
CRISPR-Designtool by Feng Zhang lab	http://www.genome-engineering.org/crispr	CRISPR-Design
GIMP 2.10.12G	GIMP Team	Bildbearbeitung
Inkscape	Inkscape Community	Erstellung von Abbildungen
Jaspar 2020	jaspar.genereg.net	Analyse von TF-Bindestellen
Multalin	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/	Alignment der ZRS300
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Bezug von Literatur, Primerdesign
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer	Primerdesign
Primer3	http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi	Primerdesign
qPCR analysis Software Applied Biosystems SDS 2.4	Applied Biosystems	qPCR und ChIP-qPCR
SnapGene	Insightful Science	Bearbeitung und Visualisation von Plasmiden
UCSC Browser	http://genome.ucsc.edu/	Visualisation von Genomsequenzen, Konservierung mittels PhyloP-Conservation

3.4.3 Enzyme und Antikörper

Die Tabelle 12 zeigt die Enzyme und Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 12: Enzyme und Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Enzym	Hersteller	Verwendungszweck
<i>Bsbl</i> , <i>Sall</i> , <i>NotI</i> , <i>AatII</i> , <i>PvuII</i> , <i>PacI</i>	Applied Biosystems	Restriktionsverdau für Klonierungen
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs #M0530	PCR für Gibson-Assembly und Sequenzierungen
Proteinase K	Sigma-Aldrich #P2308	Protein-Abbau
RNaseA	Sigma-Aldrich #R4875	RNA-Verdau
T ₄ -Ligase	Thermo Scientific #EL0014	Ligation von DNA-Strangbrüchen
<i>Taq</i> -Polymerase	Laboreigen von Asita Carola Stiege	PCR
Antikörper	Hersteller	Verwendungszweck
Anti-GFP	Invitrogen #A11122; 2015993; Host: <i>Rabbit</i> (Kaninchen); Polyklonal	Polyklonale Primärantikörper gegen GFP
Anti-mCherry	Thermo Fisher Scientific #M11217; TG273067, Host: <i>Rat</i> (Ratte), Monoklonal	Monoklonale Primärantikörper gegen mCherry
Anti- <i>Rabbit</i>	Thermo Invitrogen AlexaFluor 568 (A10042), Polyklonal, Host: <i>Donkey</i> (Esel); anti <i>Rabbit</i> (Kaninchen)	Polyklonale Sekundärantikörper aus Esel gegen Kaninchen-Antikörper, demzufolge gegen Anti-GFP-Antikörper
Anti- <i>Rat</i>	Thermo Invitrogen AlexaFluor 488 (A11006), Polyklonal, Host: <i>Goat</i> (Ziege); anti <i>Rat</i> (Ratte)	Polyklonale Sekundärantikörper aus Ziege gegen Ratten-Antikörper. Demzufolge gegen Anti-mCherry-Antikörper
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma #D9542	Markierung der Zellkerne
Anti-H3K27ac	Diagenode #C15410174, Host: <i>Rabbit</i> (Kaninchen)	ChIP
Anti-H3K27me3	Merck #07-449; Host: <i>Rabbit</i> (Kaninchen)	ChIP

3.4.4 Plasmide

Tabelle 13 fasst die hier durch *Gibson-Assembly* klonierten Plasmide mit ihren einzelnen Fragmenten, zugehörigen Funktionen und der Bezugsquelle zusammen.

Tabelle 13: Durch *Gibson-Assembly* klonierte Plasmide für Knock-In-Experimente

Sox2-Enhancer-Knock-In: pKan_SRR107 und pKan_SRR107-109 siehe Abbildung 13)

Fragment	Funktion	Bezugsquelle der Fragmente
pKan-Plasmid (Abb. 11)	<i>Back bone</i>	Laborintern, Daniel Ibrahim
Homologiearme centromer 766 bp, telomer ca 2 kb	Insertion der Konstrukte an die ZRS-Position beim CRISPR/Cas9 Experiment durch homologe Rekombination	Laborintern, Alexandra Despang
<i>Sox2</i> -Enhancer SRR107 und SRR107-109 (Michael Robson) mit <i>mCherry</i> mit β -Globin-Minimalpromotor	Insert mit <i>mCherry</i> als Reportersystem für den Nachweis der <i>Sox2</i> -Enhancer-Aktivität	Laborintern, Michael Robson

GFP-Knock-In: pKan_GFP_KI (siehe Abbildung 14)

Fragment	Funktion	Bezugsquelle der Fragmente
pKan-Plasmid (Abb. 11)	<i>Back bone</i>	Laborintern, Daniel Ibrahim
<i>GFP</i>	Reportergen	Genewiz
Homologiearme	Insertion des <i>GFPs</i> durch homologe Rekombination im CRISPR/Cas9-Experiment	Genewiz
PolyA-Sequenz	Stabilisierung der mRNA	Laborintern, Michael Robson

ZRS300-Knock-In: pGkfrt-LacZ-ZRS300 (siehe Abbildung 16B)

Fragment	Funktion	Bezugsquelle der Fragmente
pGkfrt-LacZ-Plasmid (Abb. 16A)	<i>Back bone</i>	Addgene
ZRS300 von Huhn, Pferd, Kuh, Maus	Insert für FRT/Flp-Experiment	Verschiedene Gewebe der entsprechenden Spezies

In Abbildung 11 bis 14 sind die in dieser Arbeit verwendeten bzw. klonierten Plasmide aufgeführt. Das pKan-Plasmid (siehe Abbildung 11) wurde für die Klonierung der zu inserierenden Fragmente und den anschließenden CRISPR/Cas9-Experimenten verwendet. Die auf dem pKan-Plasmid aufbauenden weiteren verwendeten Plasmide sind in Abbildung 12 bis 14 dargestellt.

Das PX459-Plasmid, in Abbildung 15 dargestellt, wurde zur Klonierung der sgRNA und anschließend für die CRISPR/Cas9-Experiment verwendet.

Für das FLP/Frt-Experiment für die *LacZ*-Reportengenassays wurde das pGkfrt-LacZ-Plasmid und das darauf aufbauende pGkfrt-LacZ-Plasmid mit ZRS300-Insert verwendet (siehe Abb. 16).

3. METHODEN UND MATERIAL

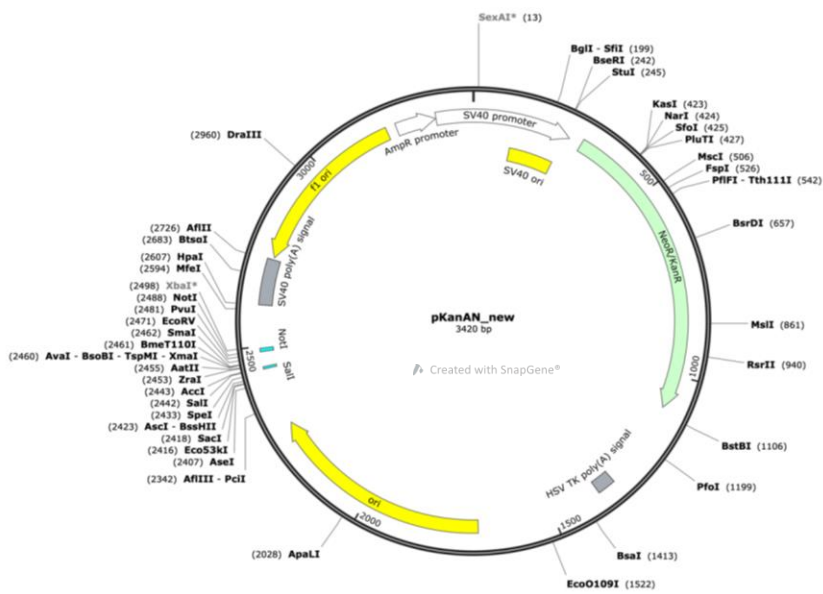


Abbildung 11: pKan-Plasmid für Klonierung der Inserts für die Knock-In-Experimente

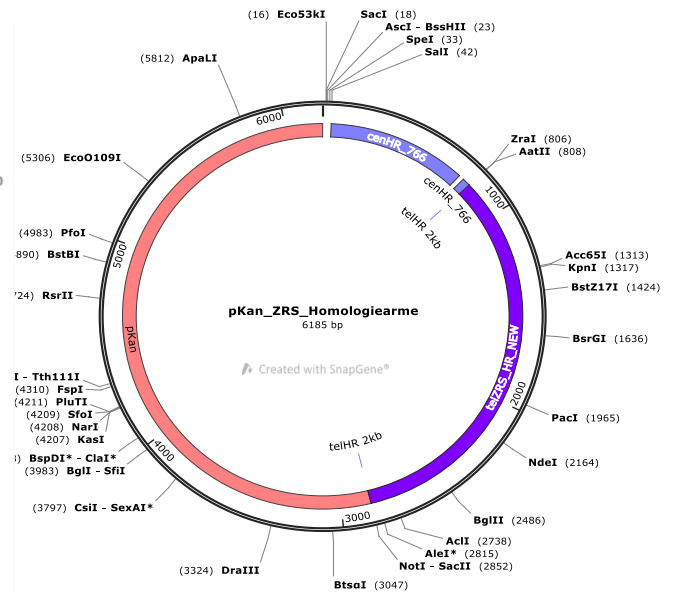


Abbildung 12: pKan-ZRS-Ho4ologiearme-Plasmid für das Klonieren der Plasmide für das Sox2-Enhancer-Knock-In. Enthalten sind das pKan-Backbone (Abb.11), sowie Homologiearme für das Knock-In an Stelle der ZRS.

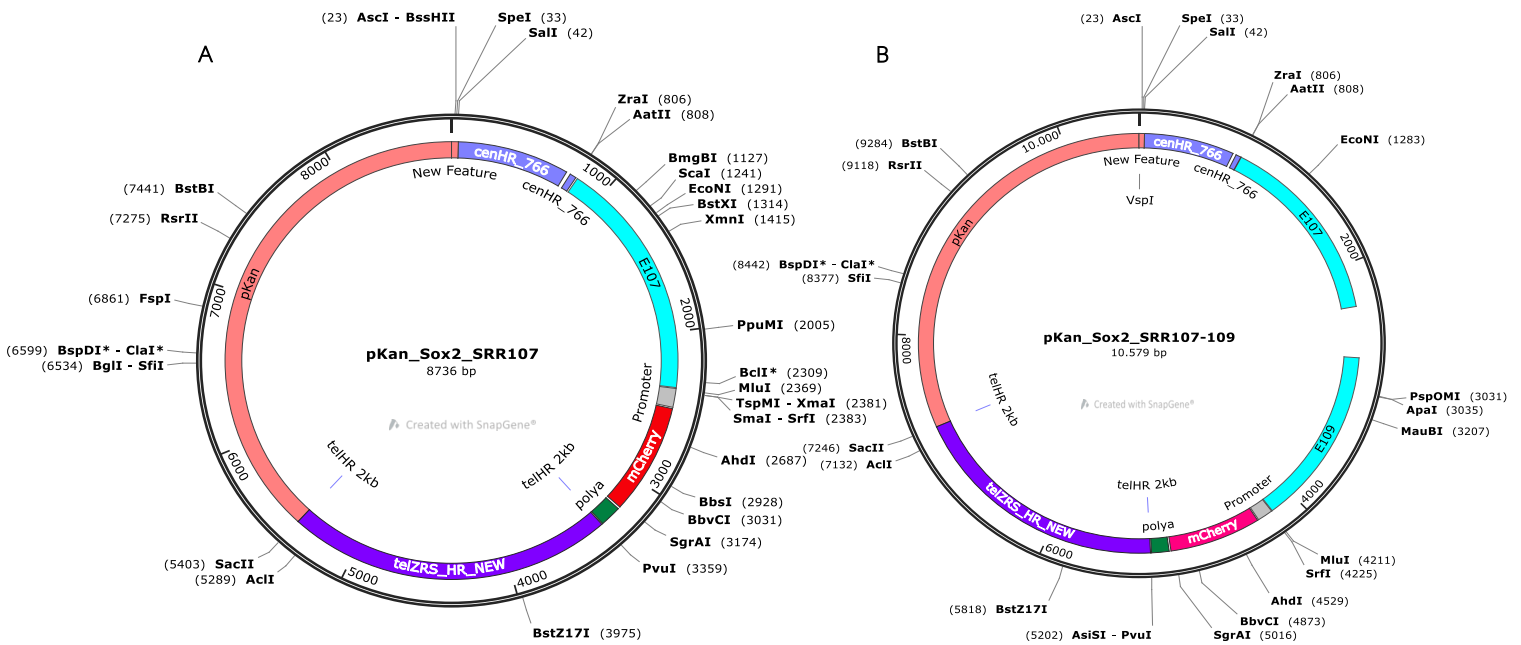


Abbildung 13: A pKan-Sox2-SRR107-Plasmid für das Knock-In von SRR107 anstelle der ZRS B pKan-Sox2-SRR107-109-Plasmid für das Knock-In von SRR107-109 anstelle der ZRS. Enthalten sind das pKan-Backbone (Abb. 11), SRR107 bzw. SRR107-109 mit *mCherry* und β -Globin-Minimalpromotor, sowie Homologiearme für das Knock-In an Stelle der ZRS.

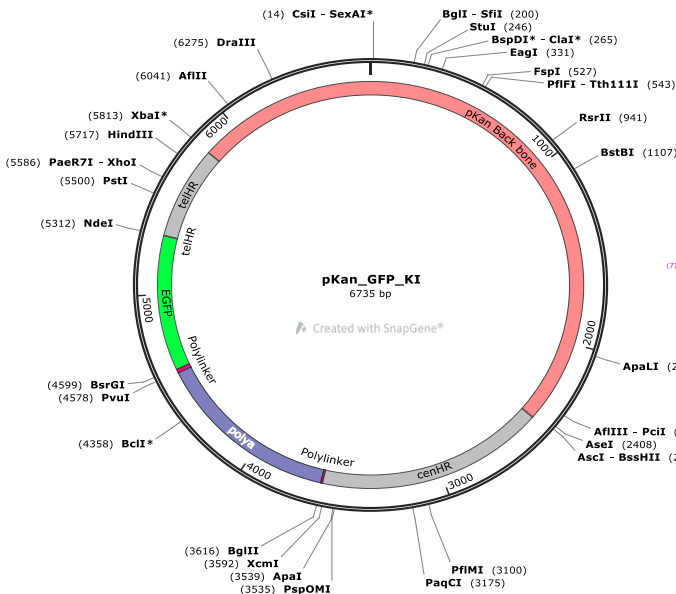


Abbildung 14: pKan-GFP-KI-Plasmid für das GFP-Knock-In
Enthalten sind als Backbone der in Abb. 11 dargestellte pKan-Plasmid, das GFP-Gen mit einer PolyA-Sequenz und entsprechenden Homologiearmen für das Knock-In in den gencodierenden Bereich von *Shh*.

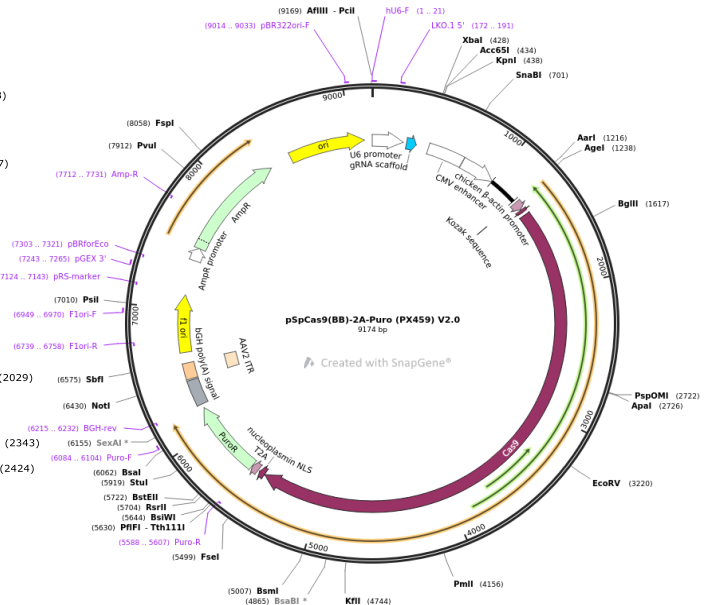


Abbildung 15: PX459-Plasmid: (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 zur Klonierung der sgRNA und darauf folgendem CRISPR/Cas9-Experiment

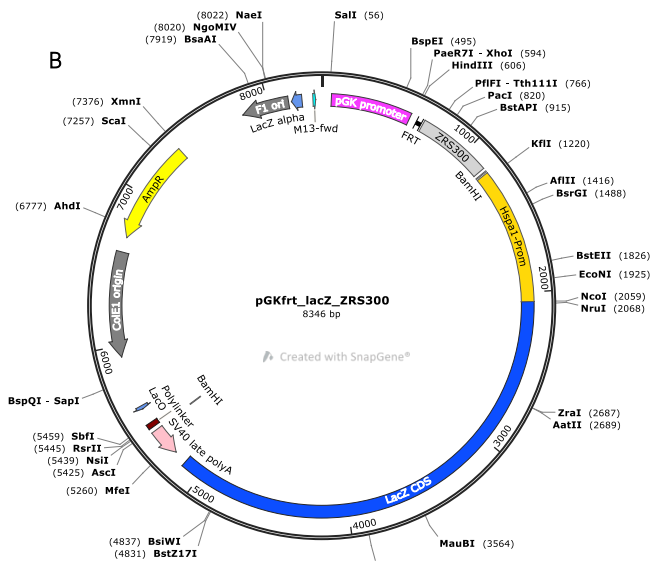
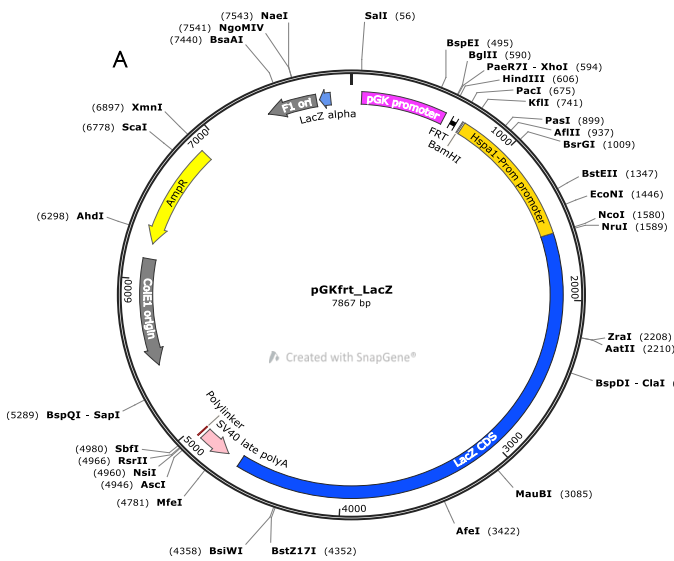


Abbildung 16 A pGKfrrt-LacZ-Plasmid für das Flp/FRT-Insert der ZRS300 von Addgene für die LacZ-Reportergenassays
B pGKfrrt-LacZ-Plasmid mit ZRS300-Insert (jeweils von Huhn, Kuh, Pferd und Maus).

3.4.5 Zelllinien

In Tabelle 14 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien gelistet.

Tabelle 14: Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Zellen	Hersteller
C2-Zellen (C57B/6 und 129svJae F1 Hybrid)	Laboreigen
CD1-Feeder-Zellen	Laboreigen
DR4-Feeder-Zellen	Laboreigen
G4-Zellen (Hybridstamm aus 129Sv x C57BL/6)	Laboreigen
Top10 <i>E. Coli</i> Zellen	Laborintern von Asita Carola Stiege produziert

3.4.6 Kits, Puffer, Lösungen und weitere Reagenzien

Die Kits, die hier verwendet wurden, sind in Tabelle 15 dargestellt, verwendete Puffer, Lösungen und weitere Reagenzien in Tabelle 16.

Tabelle 15: Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Kit	Hersteller	Verwendung
BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems	Sequenzierung nach Sanger
Flp-In™-Kit	Thermo Fisher	Liposomale Transfektion
NEBuilder HiFi DNA Assembly Reaction	New England Biolabs	Gibson-Assembly
NucleoBond® Xtra Midi EF-Kit	Macherey-Nagel	Aufreinigung von klonierten Plasmiden
NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit	Macherey-Nagel	Plasmid-Isolation
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen	PCR-Aufreinigung
RNeasy Mini Kit	Qiagen 74106	RNA-Extraktion
Superscript III™ First-Strand Synthesis System	Invitrogen 11917-010	cDNA-Synthese
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems 4367660	qPCR

Tabelle 16: Puffer, Lösungen und weitere Reagenzien, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Material	Zusammensetzung/Hersteller
10x PBS-DEPC	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20mM KH ₂ PO ₄ , pH-Einstellung auf 7,4 mit HCl, in DEPC- H ₂ O
10x PCR-Puffer	750 mM TRIS/HCl pH 8,0; 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0.1 % Tween20; 15 mM MgCl ₂
4 % PFA-PBS	40 mg/ml PFA in 1x PBS (DEPC) wird auf 55°C erhitzt bis das PFA aufgelöst ist, der pH wird mit mit HCl auf 7,4 eingestellt
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC in MilliQ
DNA-Ladepuffer	6 % Sucrose; 0,7 % Orange G in MilliQ.
LacZ-Puffer	2 mM MgCl ₂ , 0,01 % Natriumdesoxycholat, 0,02 % Nonidet-40 in PBS
LacZ-X-Gal-Färbelösung	0,5 mg/ml X-Gal-DMSO, 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II), 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) in LacZ-Puffer
MagAttract Beads	Qiagen
PBS	Lonza #BE17-512F
Quick Extract DNA Extraction Solution	Lucigen #QE0905
SYBR™ Safe DNA-Gel-Stain	Thermo Fisher # S33102
Zellysepuffer für DNA-Isolation	17 mM Tris, pH 7,5; 17 mM EDTA; 170 mM NaCl, 0,85 % SDS, Proteinase K 0,08 mg/ml
β-Mercaptoethanol	Gibco, #3150-010

3.4.7 Zellkulturmaterialien

Die Reagenzien und Media, die für die Zellkulturarbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Media und Reagenzien für die Zellkulturarbeit.

Medium/Reagenz	Zusammensetzung/Hersteller
Feeder-Zell-Medium	Reguläres Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % Fetalem Kälberserum (PAN Sera ES, #P30-2600), 1x Glutamin (100x Lonza, #BE17-605E) und 1x Penicillin/Streptomycin (Lonza, #DE17-603)
Gefriermedium	ES-Medium mit 20 % FCS (PAN Sera ES, #P30-2600) und 10 % DMSO (Sigma, #D-2650)

ES-Medium	Knock-Out DMEM 4,500 mg/ml Glucose mit NaPyruvat (Gibco, #10829-018), 15 % FCS (PAN Sera ES, #P30-2600), 10mM Glutamin (100x Lonza, #BE17-605E), 1x Penicillin/Streptomycin (Lonza, #DE17-603), 1x nicht-essenzielle Aminosäuren (100x Gibco, #11140-35), 1x Nukleoside (100x, Chemicon, ES-008D) und 1 mM β -Mercaptoethanol (Gibco, #3150-010)
ES+LIF-Medium	ES-Medium + 1000 U/ml LIF (Murine Leukemia Inhibitory Factor ESGRP™, 107 U/ml, Chemicon, #ESG1107)
Gelatine 0,1 %	Sigma #G-1393
LIF (Murine Leukemia Inhibitory Factor)	ESGRP™, 107 U/ml, Chemicon, #ESG1107
D-PBS	Gibco 14190-094
Trypsin-EDTA	Gibco #25300-054
OptiMEM	Gibco #51985-026
FuGENE HD	Promega #E2311
Puromycin	Sigma-Aldrich, #P8833
Mitomycin C	Sigma #M-0503
Hygromycin B	Invitrogen # 10687010
FLP Recombinase,	Invitrogen
Lipofectamine™ LTX Reagenz mit PLUS™ Reagenz	ThermoFisher #15338100

3.4.8 CHIP und Immunzytochemie

Tabelle 18 zeigt die Zusammensetzung der Puffer, die für das CHIP-Experiment verwendet wurden sowie die Reagenzien und Lösungen für das Immunzytochemie-Experiment.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Puffer für das ChiP Experiment sowie Lösungen und Reagenzien des Immunzytochemie-Experiments

Puffer für ChiP	Zusammensetzung
ChiP-Lysepuffer 3 (T. I. Lee et al., 2006)	50 mM Tris pH7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % Nonidet P- 40; 1,15 % Triton X-100; frisch dazu 1x Proteinase-Inhibitor (Roche # 04693116001)
RIPA-Puffer (T. I. Lee et al., 2006)	50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 % Nonidet-P 40; 0,7 % Na-Deoxycholate; 500 mM LiCl; frisch dazu 1x Proteinase Inhibitor (Roche # 04693116001)
TE-Puffer (T. I. Lee et al., 2006)	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; frisch dazu 1x Proteinase Inhibitor (Roche # 04693116001)
Elutionspuffer (T. I. Lee et al., 2006)	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1 % SDS
Reagenzien für Immunzytochemie	Zusammensetzung
Permeabilisationslösung	PBS, 10 % Pferde-Serumalbumin (HSA) (Vector Laboratories S-2000, 0,2 % Triton X100 (Sigma T9284-500ML)
PBS-T	PBS, 0,1 % Tween20 (SERVA 37470.01)
Antikörper-Lösung	PBS-T, 10 % HSA (Vector Laboratories S-2000)
Fluoromount	Sigma Aldrich

3.4.9 Primer und sgRNAs

Oligonukleotide wie Primer und sgRNAs wurden über NetPrimer, Primer3 und NCBI Primer-Blast designt und von IDT Eurofins MWG synthetisiert. Oligonukleotidlösungen wurden in einer Konzentration von 1 pmol/ μ l verwendet. In Tabelle 19 sind alle verwendete Sequenzen in 5' – 3' -Richtung gelistet.

Tabelle 19: Liste aller verwendeter Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung
mm9_ZRS_GT1	TTGGGAGCATGGTAATTAATAAG
ZRS_D300_GT_R	GGCCTAGAGAGCTGGTCACA
mZRS_GT11	TGGCATGTTACCAACACAGG
mouseZRS_f	CGATTTAATTAATGGTCCTAAAGAAAAAGCAACTC
mouseZRS_r	CATGTTAATTAATGTAAAGGTACCCAGTGACTTGA
PolyA_F_Kpnl	CGATGGTACCGCTGTACAAGTAACTCGAGAGATAATC
PolyA_R_BgIII	GACTAGATCTCATGGTGGCCTAGGATAACTTCG
Sox2_105_112_f_AatII	GACTGACGTCGCCGATCCAGACATGATAAG
Sox2_105_112_r_PvuII	GACTCGATCGTACCAAGTAAAGATGCTGGC
Sox2_107_f_AatII	GACTGACGTCGCCGATCCAGACATGATAAG
Sox2_107_r_PvuII	GACTCGATCGCGAGGGTACCAATCATCAGC
Sox2_107_109_AatII	GACTGACGTCCAATCATCAGCTTGCCAAA
Sox2_107_109_PvuII	GACTCGATCGCGCCGATCCAGACATGATAA
Sox2_109_112_AatII	GACTGACGTCCGCCGATCCAGACATGATAA
Sox2_109_112_PvuII	GACTCGATCGCACAGGGTTGGGAGGGTAAA
gG3_ZRS300_F_BamHI	CGATGGATCCTTTTGCACATCTCTGTGGAT
gG3_ZRS300_R_BamHI	CGATGGATCCTGGGTTTGATTAACCATCTT
horse_ZRS300_F_BamHI	CGATGGATCCTGGAAATAGTGAGGAGATGG
horse_ZRS300_R_BamHI	CGATGGATCCCAGGGCAATATTGACGAGAT
cow_ZRS300_F_BamHI	CGATGGATCCGGGAAAGAGCTAGGAGATGG
cow_ZRS300_R_BamHI	CGATGGATCCAAGCACCGTAATTGGTAGAT
gG3_ZRS300_F_Gib	AGGAACCTCGATATCTTAATTTTTGCACATCTCTGTGGATG
gG3_ZRS300_R_Gib	AGAGCGGCCGCCACCTTAATTGGGTTTGATTAACCATCTTCC
horse_ZRS300_F_Gib	AGGAACCTCGATATCTTAATTGGAAATAGTGAGGAGATGGTC
horse_ZRS300_R_Gib	AGAGCGGCCGCCACCTTAATCAGGGCAATATTGACGAGATCT
cow_ZRS300_F_Gib	AGGAACCTCGATATCTTAATGGGAAAGAGCTAGGAGATGGA
cow_ZRS300_R_Gib	AGAGCGGCCGCCACCTTAATAAGCACCGTAATTGGTAGATTGA
Nanog_gib_f	TCCCTCACATACACACACGGGACGTCTCCCCCTCTCCGGCGCGCC
Nanog_gib_R	AGGGATTTTACTTCTCTGTCGATCGCGCCCTCCCCGTCTTAGG
Sox107_109_gib_F	TCCCTCACATACACACACGGGACGTCCCAATCATCAGCTTGCCAAA
Sox107_109_gib_R	AGGGATTTTACTTCTCTGTCGATCGCGCCGATCCAGACATGATAA
Sox105_112_gib_F	AGGGATTTTACTTCTCTGTCGATCGCGCCGATCCAGACATGATAAG
Sox105_112_gib_R	TCCCTCACATACACACACGGGACGTCTACCAAGTAAAGATGCTGGC
Sox107_gib_F	AGGGATTTTACTTCTCTGTCGATCGCGCCGATCCAGACATGATAAG
Sox107_gib_R	TCCCTCACATACACACACGGGACGTCCGAGGGTACCAATCATCAGC
Sox109_112_gib_F	AGGGATTTTACTTCTCTGTCGATCGCGCCGATCCAGACATGATAA
Sox109_112_gib_R	TCCCTCACATACACACACGGGACGTCCACAGGGTTGGGAGGGTAAA
PolyA_Gib_f	CGTGGTACCGACTCGATCGAATTCTCTAGGCTTGGGATC
PolyA_Gib_r	AGCAGCAGCAGGCAAGATCTTCGACCTAGACTAGCTAGAA
frt_LacZ_KolPCR_f	CTTTCGACCTGCATCCATCT
frt_LacZ_KolPCR_r	GCTGCTCAGTTTGGATGTTC
107_1_R	TGCACCTCCGAACCCAGGTT
107_2_F	CGGAGGTGCAGTCAGGAAGA
107_3_R	TTACAAAGTGAGTTCTAGAA
107_4_F	ACTTTGTAAACCAGTAAACC
107_5_R	AGTGTGGTAAACAAAACAA
107_6_F	TTCAAACACTTCTCTCTCTG
109_1_r	TGAGACCCTGCCTTACACAG
109_2_f	CAGGGTCTCAATAAGTGGTT
109_3_r	TGCATGGGCAACCCCAGCTC
109_4_f	GCCCATGCATACCACCACAC
109_5_r	AGGACCTGGGTCTGTGCTCC
109_6_f	CCCAGGTCTCTGCAAGAGC

mCherry_4_R	GAGGGGACAGGATGTCCCAG
MCHERRY2_R	AGCTCGTCCATGCCGCCGT
MCHERRY1_F	TGGACGAGCTGTACAAGTAA
HR1_R	CATAGTTTTGAAAAGTAAAA
SHH_cHR1_f	ATCGTCGATTTGGCTGGGAGA
SHH_cHR2_r	TCCTCTAACTACCTGTATTC
SHH_cHR3_f	TAGTTAGAGGAGGTCGTCCC
SHH_cHR4_r	GTCGAAGATCTTGCCTGCTG
SHH_Pa1_f	CTTCGACCTAGACTAGCTAG
SHH_Pa2_r	AAATTCTCTAGGCTTGGGAT
SHH_GFP1_f	AGAATTTTCGATCGAGTCGGT
SHH_GFP2_r	AAGCTGACCCTGAAGTTCAT
SHH_GFP3_f	TCAGCTTGCCGTAGGTGGCA
SHH_tHR1_r	TCGAAACTGGAAGCCTTCAGG
SHH_GFP_Geno_tel_f	GCAGTAAAAAGGATGCTGAC
SHH_GFP_Geno_cen_r	GACTTTCTTTCTTTCTTTCT
SHH_GFP_Geno_cen_r	TCCAATAAACAGGCCTCCTC
ZRS_cenGen_r	TTCGTCTTTCATGGCACTGA
Gib_105112_v_f	TTTTACTTCCCTCGTGCGATCCGATCCAGACATGATAAGA
Gib_105112_v_r	ACATACACACACGGGACGTCTACCAAGTAAAGATGCTG
teil1_Gib_105112_r	TACTGAACAGGGTTGGGAGG
teil2_Gib_105112_f	CGCAGTACTCCTCACACGCT
ZRSCen_gen_r	TGTTGGGTGTAGGGTTGGTA
qPCR_ShH-fwd	ACCCCGACATCATATTTAAGGA
qPCR_ShH-rev	TTAACTTGTCTTTGACCTCTGA
seq111_1_f	TGGCATGTTACCAACACAGG
seq111_1_r	GCCACTGAGAGTTGTCTGAG
seq111_2_f	CGTCAGATACTTCACCAGGC
seq111_2_r	TTGAAGCGCATGAACTCCTT
seq111_3_f	TACAGGAGGTACCAAGCTTA
seq111_3_r	CTTTAGGACCATCTAGTCAC
seq_GFP_1_f	TTCATATCTGCCGCTGGCCC
seq_GFP_1_r	AGCTCGCCGACCACTACCAG
seq_GFP_2_f	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
seq_GFP_2_r	CAGCTCACAAGTAATCAGGT
seq_GFP_3_f	CACGCCGTAGGTCAGGGTGG
seq_GFP_3_r	AACAGGCCTCCTCCCTCCA
HR_f	TGGCATGTTACCAACACAGG
107_1_r	CAGCTAAGAAACCCTGTCTCA
107_2_f	GCTAAGGGCAAGTACTGTCA
107_2_r	AGGACAGCCTGAGCTACAGA
107_3_f	AGATCTGAGGACAACCTTGCT
109_3_r	TGGCAGAATACATTTCGCAGT
109_4_f	GATGACAAGCAAGCACTACC
109_4_r	GCCACTGAGAGTTGTCTGAG
109_5_f	CGTCAGATACTTCACCAGGC
109_5_r	TTGAAGCGCATGAACTCCTT
109_6_f	TACAGGAGGTACCAAGCTTA
107_3_r	TTGAAGCGCATGAACTCCTT
107_4_f	CAATAAAGACCATTTCATGCC
HR_r	CTTTAGGACCATCTAGTCAC
chq_mCherry_f	CACTACGACGCTGAGGTCAA
chq_mCherry_r	GTGGGAGGTGATGTCCAAC
chq_BP1_f	GCCTGAAAGCTGAGTGATGT
chq_BP1_107_r	GCTGGACACAAGGAAATTATCTC
chq_BP1_109r	ACGCTGTCAGTCTCTTACC

3. METHODEN UND MATERIAL

chq_BP2_f	CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
chq_BP2_r	AAGCTTGCTTTTGTGTAGGG
chq_GFP_1_f	GAAGCTCAGGGTCAGCTTGC
chq_GFP_1_r	GACGTAAACGGCCACAAGTT
chq_GFP_2_f	GGTCTTGTAGTTGCCGTCGT
chq_GFP_2_r	CACATGAAGCAGCAGCACTT
chq_Nanog_1_f	TCCAGCAGAAGCAGTTAGCA
chq_Nanog_1_r	GTTTGGGAAGGAGCACTGAGC
chq_Nanog_2_f	CTAGAGATCGCCAGGGTCTG
chq_Nanog_2_r	CCCCCAAAAAGAGGCTTTAC
chq_Zscan_1_f	CCAAGCAAAGAGGCCTACAC
chq_Zscan_1_r	TACGCGGAGACAGACTGATG
chq_Zscan_2_f	AGGGCCTCATTCTCAGTTT
chq_Zscan_2_r	GTGTAGGCCTCTTTGCTTGG
chq_Cbx2_1_f	ACTGACCCACGCTTAAAAAC
chq_Cbx2_1_r	CAGGGTGCTCTCTTTTCGAC
chq_Cbx2_2_f	TCCCTTGGGGATCCTATTTC
chq_Cbx2_2_r	AGAGCTCGGTCATAGGCAAA
chq_FGF8_1_f	GGTAGTTTGGGGCTGGATT
chq_FGF8_1_r	GGAACCCAGCTGACACTCTC
chq_FGF8_2_f	GAGAGTGTGAGCTGGGTTCC
chq_FGF8_2_r	TGTTGCACTTGCTGGTTCTC
chq_pSHH_1_f	CCCGAGACTTGTGTGGATT
chq_pSHH_1_r	TCTCCGAGGCTGTCTCCTA
chq_pSHH_2_f	CCCTCCCTATTTGCTCAGGT
chq_pSHH_2_r	CACATCTCGAGTGCTTGAA
<i>Single guides</i>	
SG_SHH_GFP_KI_F	CACCGCATCTCGTCCGCGGAACCTG
SG_SHH_GFP_KI_R	AAACCAGGTTCCGCGGACGAGATGC
SG_Sox2E_KI_F	CACCGACATATTTAGTTACTACTGTC
SG_Sox2E_KI_R	AAACGACAGTGTAACATAAATATGTC

3.4.10 Inserts für Knock-In-Experimente

Das DNA-Fragment für das *GFP*-Knock-In wurde von GENEWIZ (genewiz.com, FragmentGENE) synthetisiert und ist in Abbildung 17 dargestellt. Das DNA-Fragment besteht aus der Sequenz für das *GFP* (grün), der sgRNA-Sequenz (gelb) mit mutierter PAM-Sequenz (rot) und einer weiteren Mutation zu Klonierungszwecken (rot), einem Polylinker für die Klonierung (pink), asymmetrischen Homologiearmen (blau) sowie Überhänge für Klonierungszwecke (schwarz). In den Homologiearmen mussten teilweise kürzere Sequenzen deletiert werden, da eine Synthetisierung aufgrund erhöhter Cytosin-Abfolgen nicht möglich war.

Die PolyA-Sequenz für das *GFP*-Knock-In-Experiment wurde aus laboreigenen Plasmiden von Michael Robson mittels Phusion-Polymerase amplifiziert. Die Sequenzen für die *Sox2*-Enhancer-Knock-Ins wurden ebenfalls aus laboreigenen Plasmiden von Michael Robson mittels Phusion-Polymerase amplifiziert.

Die Enhancer-Sequenzen für die ZRS300-Knock-In-Konstrukte wurden aus genomischer DNA der entsprechenden Spezies mittels QuickExtract extrahiert und mittels Phusion-Polymerase amplifiziert.

5´-GTTATTAATGAGAGCTCATGGCGGCCATGACTAGTATCGTCGATTTGGCTGGGAGATTGGCAGCCTGGAAATCTCAAAGGAGGTGGGATG
 GGAAGAGAGGCTCGTGCCTTGGCTTTGCCGTCTGTCCATCCACCCTCGTCGCCGAATATTTATTCGCTTTTAATTCCTATGCAAGCAGGTAAAA
 ATTTAAAGCGATTGCAAAGCCAGCAAGTTCCAAGTCCCTCCCTTAAGGTACCGCGGGCTCTGGAGAAATGAGGAGCATCCTTAAAGAAATATCAA
 TACATTTCTGTGACCGGCACAATFGAGGACGATGGGATCGCAGTCAGGCTACCGGATACAGTGGGGACAAGACGGGCGCTCTGGAGCTCTGCC
 TTTTGTGAGAACTGCCCCAGGCTTTCTCAGTTACAGTCTTTTGGTGGTGGTGGGTAAGGGTGGGGTGGTCTTGGGAGAAAAACACAGAAAA
 GGAAAGGTAGGAGCTAGGGGACGAAATGCTCCAGGCTATGTTTGCAGTGACCTGGAGGCCCTTGAAGTGTATAGGGGCATCCCCTCTCCCTC
 CATTTTCTGAAAGAGGAGTGTAGGTGGGACAGTGGGTGGGGAGGAGAGCAAGCCGCTTCTACCTGCCAAAGAGCAAAACAGACAGAGGG
 CTGACTGCTTGGTACACGCATCCCGGAAGGAGTCTGTTTCCCACCCGAATGGGTCTCTACCTGAGTCATCAGCCGGTCTGCTCCCGTGT
 TCCTCATCCTTAAATATGATGTCGGGGTGTAAATGGGGTGTAGTTCCTTAAATCGTTCGGAGTTCTTGTGATCTTCCCTTCATATCTGCCG
 TGGCCCTAGGGTCTTCTCGGCTACGTTGGGAATAAAGTCTTGTAGGCTAAAGGGTCTAGCTTTTGGGGTGGCCCTCTTTCCAAACCCCT
 GCCGGGCCACAGGCCAGCCCGGGGCACACCAGCAGGAGGAAGCAAGGATCACCAGAAAAATCTGGCCAGCAGCAGCAGCAGAGATCTGACT
 CGATCGAGTGGTACACGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGCGGGGTCACGAACCTCCAGCAGGACCATGTGATCGCG
 CTCTCTGTTGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTGTGCGGGCAGCAGCAGGGGCCCTCGCCGATGGGGGTGTTCTGC
 TGGTAGTGGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGA
 TATAGACGTTGTGGCTGTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTT
 CACCAGGGTGTGCCCTCGAATTCACCTCGGCGGGGCTTGTAGTGTGCCGCTCGTCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCG
 GGCATGGCGGACTTGAAGAAGTGTGCTGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAGGGTGGTACAGGGTGG
 GCCAGGGCAGGGCAGCTTCCGGTGGTGCAGATGAATTCAGGGTCACTTGCCTAGGTGGCATGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAA
 CTTGTGGCCGTTTACGTGCCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGGCACACCCCGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCAACCATaTgTCCCGGAA
 CCTGAttACTTGTGAGCTGTCCCGGCTGTCTGTGCGCGAGCGGGTACGCGCGGGTGTGTGCGTGTGCGCTCCTCCTTGGCGTCCGCTCCTCC
 TTCTCGCTCGGCTCGTTCGTTCCCTCTGGCGCTGCCTGGCTCTTTCTCTTCCATATAACCTTGCCTGCCGCTGCTGCAGGGGACTTGTCTCC
 GATCCCCACCCAGACTGGGGTGCATGGCAGGCTGCCGGTGCCTGGTAAACGGAACACATCGGAGTTGGGTCTCGAGACAGCAATTTAAAGACA
 AAAAGAGCCTGATTTTAAATGGTAGCAAGGCTGGAGAGCTTGTGAGACAGGCTGCCTTTCGCACTATATTATAGCTGGCAGGGGCGCATCTGAT
 TGGCCAAGCCGCACAAGCTTGTCTTCTGATGTTAACCTTGAGAAAGACTACATTTCTCCCCCTCTGGCTGCTGTGGCTTTATTTTACCTGAA
 GGCTTCCAGTTTCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG-3´

Abbildung 17: Insertfragment für GFP-Knock-In: Das DNA-Fragment, wurde von GENEWIZ erhalten. Die verschiedenen Bestandteile sind farbig markiert: Schwarz – Überhänge zu Klonierungszwecken; Blau – Homologiearme (teilweise mussten Sequenzen deletiert werden, da eine Synthesisierung aufgrund erhöhter Cytosin-Abfolgen nicht möglich war); Pink – Polylinker für Klonierungszwecke; Grün – GFP; Gelb – sgRNA mit mutierter PAM-Sequenz (rot) und einer weiteren Mutation (lila) zu Klonierungszwecken.

4. ERGEBNISSE

Enhancer und Promotoren regulieren in ihrem Zusammenspiel die spezifische Expression von Zielgenen in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Einige Studien lassen vermuten, dass eine räumliche Nähe zwischen den CREs bestehen muss, damit letztlich eine aktive Transkription resultieren kann (Chen et al., 2018; Gu et al., 2018; Mifsud et al., 2015; van Arensbergen et al., 2014). Darüber wie diese Interaktion im Detail abläuft und welche Bedingungen dafür gegeben sein müssen, ist bislang nur wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte Anhand der Insertion eines in mES-Zellen aktivem Enhancer (*Sox2*-Enhancer) an Stelle der ZRS im *Shh*-Locus und gleichzeitiger Insertion des Reportergens *GFP* anstelle von *Shh*, die Interaktion von CREs analysiert werden. Eine Reihe von Versuchen wurde angeschlossen, um die potenzielle Expression von *GFP* zu detektieren bzw. um Aktivitätszustände der CREs beurteilen zu können. Im ersten Teil dieser Arbeit dient die beschriebene räumlichen Assoziation der ZRS zum *Shh*-Promotor (Paliou et al., 2019; Symmons et al., 2016) als theoretischer Ansatzpunkt, im zweiten Teil dieser Arbeit sollte hingegen die zur ZRS benachbarte Sequenz ZRS300 genauer charakterisiert werden. Dazu wurde sie mittels eines Reportergenassays hinsichtlich einer potenziellen *cis*-regulatorischen Aktivität analysiert.

4.1 *GFP*- UND *Sox2*-ENHANCER-KNOCK-IN

Bereits bevor die ZRS die Expression von *Shh* aktiviert, liegen Enhancer und Promotor bereits durch CTCF-vermittelte Chromatinschleifenbildung in räumlicher Nähe. Diese vorbestehende Struktur existiert auch in Geweben, in denen die ZRS nicht aktiv ist, wie bspw. in mES-Zellen (Paliou et al., 2019). *Sox2* hingegen ist ein TF für den Pluripotenzerhalt in ES-Zellen, dessen Expression durch einen Superenhancer (Enhancer-Cluster) aktiviert wird (Zhou et al., 2014).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob für die Aktivierung des *Shh*-Promotors (*pShh*) die räumliche Nähe zu einem aktiven Enhancer ausreichend ist.

Unter der Annahme die ektope Expression von *Shh* könne in mES-Zellen zu Differenzierung führen, wurde in einem ersten Schritt, wie in Abbildung 18 dargestellt, mittels CRISPR/Cas9 ein *GFP*-Reportergen an Stelle von *Shh* inseriert und damit *Shh* ersetzt (*disrupted*). *GFP* selbst fungiert als Reportergen, dessen Expression in mES-Zellen nicht zu Differenzierung führt und gleichzeitig die Detektion der Expression vereinfacht. Der endogene *Readout* des *Shh*-Locus sowie das *Shh*-Codon blieben durch homologen Rekombination und Verwendung von Homologiearmen im *Insert*-Konstrukt (siehe Abb. 14) unverändert. Nach dem *Shh*-Startcodon folgte direkt das zweite Codon des *GFPs*.

In einem zweiten Schritt wurde ebenfalls durch CRISPR/Cas9 der *Sox2*-Superenhancer (in variierender Sequenzlänge) von *Sox2* anstelle der ZRS inseriert sowie nachgeschaltet *mCherry* mit dem β -Globin-Minimalpromotor, die gemeinsam als Reportergensystem für den Nachweis der Aktivität des *Sox2*-Enhancer agieren. Zhou et. al haben die Aktivität einzelner Sequenzen des *Sox2*-Superenhancers mittels

Luciferase-Assays in ES-Zellen analysiert (Zhou et al., 2014). SRR107 zeigte dabei in ES-Zellen eine starke Enhancer-Aktivität, SRR109 eine geringe (Zhou et al., 2014). Um nicht nur die SRR107 sondern auch einen etwas größeren Abschnitt des Superenhancers zu analysieren, wurden verschiedene Klonierungsversuche mit Sequenzen unterschiedlicher Länge durchgeführt, wobei nur die mit der SRR107 sowie SRR107-109 (schließt eine Sequenz von SRR107 bis zur SRR109 ein) erfolgreich waren und im weiteren Verlauf für die Knock-Ins verwendet wurden (Zhou et al., 2014).



Abbildung 18: Schematische Darstellung der Knock-In-Experimente.

Mittels CRISPR/Cas9 wurde in Schritt 1 *Shh* durch GFP ersetzt und in Schritt 2 die ZRS durch Sox2-Enhancer + *mCherry* mit β -Globin-Minimalpromotor. Die schwarzen Pfeile zeigen die Primerpaarbindung für die Validierungs-PCRs an (nicht maßstabgerecht).

Die durch die CRISPR/Cas9-Experimente generierten Zelllinien mit den zugehörigen Knock-Ins und Insertionen sowie den Primerpaaren zur Validierung sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Knock-In-Experimente mit zugehörigen Zelllinien

Name	Knock-In	Verwendete Zellreihen	Primerpaare zur Validierung (Vgl. Primerliste in Tabelle 19)
GFP-KI	GFP anstatt <i>Shh</i>	#G4	SHH_GFP_Geno_tel_f / SHH_Pa2_r
GFP-SRR107-KI	GFP anstatt <i>Shh</i> und SRR107 anstatt ZRS	#B4 und #D1	(1) mm9_ZRS_GT1 / 107_1_R
GFP-SRR107-109-KI	GFP anstatt <i>Shh</i> und SRR107 – SRR109 anstatt ZRS	#D10	(2) mm9_ZRS_GT1 / ZRS_D300_GT_R

Die Validierung der korrekten Insertion wurde mittels verschiedener Standard-PCRs durchgeführt (siehe Abbildung 18). Nur Zelllinien mit PCR-Produkt der zu erwartenden Größe wurden für weitere Experimente verwendet. Sanger-Sequenzierungen zur Validierung der Knock-Ins wurden ebenfalls durchgeführt, lieferten jedoch wegen Gerätestörungen keine auswertbaren Ergebnisse. Die Funktionsfähigkeit des GFP-Knock-In-Systems wurde einerseits durch qPCR des mRNA-Transkriptes (siehe 4.2.4) andererseits in nachfolgenden Experimenten durch Analyse eines heterozygoten GFP-Knock-In-Embryos im E10.5-dpc Stadium gesichert (Ibrahim, unpubliziert). Der Embryo wurde aus den in dieser Arbeit geneditierten mES-

4. ERGEBNISSE

Zellen mit heterozygotem *GFP*-Knock-In generiert. Es zeigte sich den Erwartungen entsprechend, wie in Abbildung 19 zu sehen ein starkes, mit der *Shh*-Expression übereinstimmendes GFP-Fluoreszenzsignal im posterioren Anteil der Extremitätenknospe (ZPA) sowie in der Chorda dorsalis.

Durch die Generierung dieser Embryonen konnte sichergestellt werden, dass das erzeugte *GFP*-Knock-In-Konstrukt mitsamt *Shh*-Promotor und dem *GFP*-Gen funktionsfähig, *GFP* also exprimierbar und fluoreszierend ist.

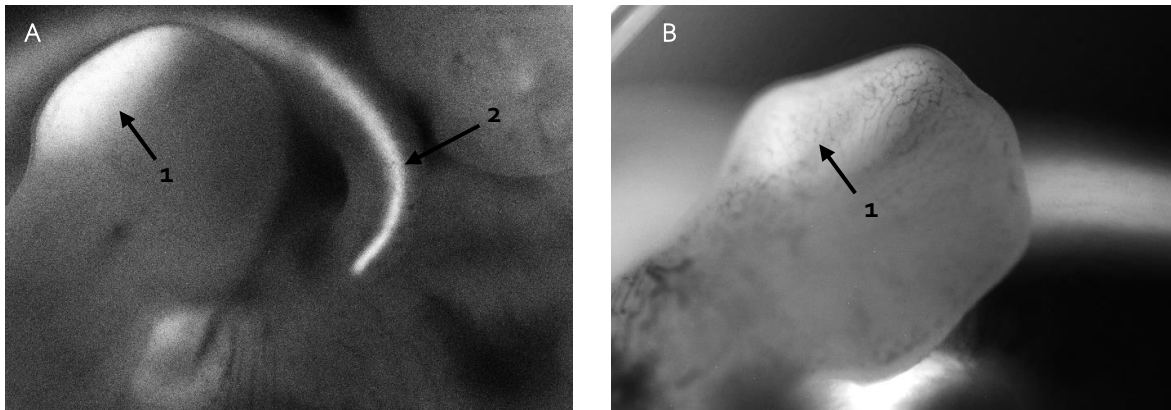


Abbildung 19: Aufnahme eines *GFP*-Knock-In-Embryos in E10.5-dpc

Dargestellt sind Aufnahmen eines heterozygoten *GFP*-Knock-In-Embryos in E10.5-dpc. Entsprechend der *Shh*-Expression ist ein Fluoreszenzsignal (1) in der posterioren Extremitätenknospe (ZPA) sowie in der (2) Chorda dorsalis zu erkennen. Dieses Experiment kann als Positivkontrolle der Integrität des *GFP*-Knock-Ins interpretiert werden.

A Aufnahme der Extremitätenknospe sowie von kaudalen Anteilen des Embryos; 1 ZPA, 2 Chorda dorsalis

B Aufnahme der Extremitätenknospe

4.2 ANALYSE DER REPORTERGEN-EXPRESSION IN GENEDITIERTEN G4-mES-ZELLEN

Nach erfolgreichem *Targeting* und Validierung der gewünschten *GFP*- und *mCherry*-Insertionen mittels locus-spezifischer PCRs in den Knock-In-G4-mES-Zellen wurde die potenzielle Expression von *GFP* und *mCherry* durch den inserierten *Sox2*-Enhancer mittels Durchflusszytometrie und FACS, Immunzytochemie sowie RT-qPCR analysiert.

4.2.1 Durchflusszytometrie und FACS

In einer ersten Reihe von Experimenten wurde die potenzielle *GFP*- sowie *mCherry*-Expression der Zellen via Durchflusszytometrie und FACS untersucht. Hierfür wurden *GFP*-SRR107-KI-mES-Zellen *Feeder*-frei in mehreren Schritten gewaschen, um ein Hintergrundsignal der *Feeder*-Zellen zu vermeiden.

Sobald die mES-Zellen erfolgreich *GFP* exprimieren, fluoreszieren sie mit einem Emissionsspektrum bei ca. 510 nm. Die Aktivität des *Sox2*-Enhancers kann mittels des im Konstrukt des Enhancers inserierten, *mCherry* inkl. β -*Globin*-Minimalpromotor nachgewiesen werden. Sollte der *Sox2*-Enhancer einen aktiven Zustand erreichen, würde er theoretisch zur Aktivierung des Minimalpromotors und dadurch zur Expression des Fluoreszenzprotein mCherry (615 nm) führen.

Die Daten der, wie unter 3.3.3 beschrieben, gegateten Zellen wurden verwendet, um eine Analyse hinsichtlich der mCherry- sowie GFP-Fluoreszenz durchzuführen. Sogenannte Punktdarstellungen (*Dot Plots*) zeigen eine zweidimensionalen Darstellung der mCherry- und GFP-Intensitäten der einzelnen Zellen. Das *Dot Plot* lässt sich in vier Quadranten einteilen, die in Abbildung 20D dargestellt sind: Q₁ (keine GFP-Fluoreszenz, starke mCherry-Fluoreszenz), Q₂ (starke GFP- UND mCherry-Fluoreszenz), Q₃ (wenig bis keine Emission für mCherry UND GFP), Q₄ (starke GFP-Fluoreszenz, wenig mCherry-Fluoreszenz).

Neben der *GFP*-SRR107- und *GFP*-SRR107-109-Knock-In-mES-Zelllinie wurden zum Vergleich auch *GFP*- und *mCherry*-negative Wildtyp-mES-Zellen analysiert. Wie in Abbildung 20A-C zu sehen befinden sich sowohl bei den geneditierten als auch bei den Wildtyp-Zellen $\geq 99,7\%$ der Zellen in Q₃, weisen demzufolge weder eine GFP- noch eine mCherry-Fluoreszenz auf.

Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellen, die sich in Q₁, Q₂ und Q₄ befinden um Hintergrundsignale durch Autofluoreszenz von verschiedenen biochemischen Strukturen handelt, da die Wildtyp-Zellen kein Gene für die Fluoreszenzproteine besitzen.

4. ERGEBNISSE

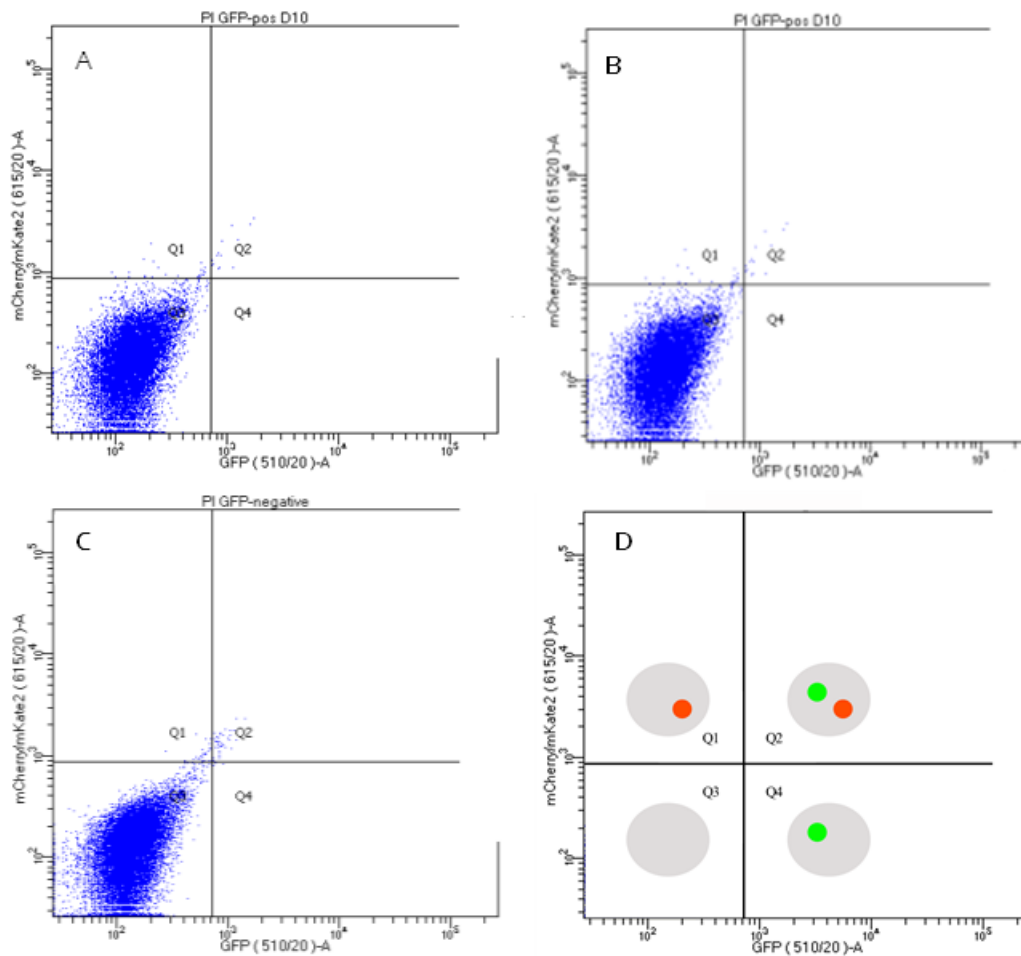


Abbildung 20: Dot Plot der verschiedenen KI-mES-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen

Zweidimensionale Darstellung der GFP- und mCherry-Fluoreszenz der einzelnen Zellen.

A GFP-SRR107-109-KI #D10 99,7 % der KI-Zellen befinden sich in Q3 und weisen weder eine GFP- noch eine mCherry-Fluoreszenz auf. In Q1, Q2 und Q4 befinden sich nur je 0,1 % der Zellen. **B** GFP-SRR107-KI #D1 99,7 % der KI-Zellen befinden sich in Q3 (keine GFP- und mCherry-Fluoreszenz). Q1 enthält 0,1 % der Zellen, Q2 0,2 % und Q4 0 %. **C** GFP-negative Wildtyp-Zellen 99,7 % der Wildtyp-Zellen befinden sich in Q3 (keine GFP- und mCherry-Fluoreszenz). Q1 enthält 0,1 % der Zellen, Q2 0,2 % und Q4 0 %. **D** veranschaulicht die Einteilung der Zellen in die vier Quadranten abhängig der Fluoreszenzgenexpression, GFP ist grün dargestellt, mCherry rot.

4.2.3 Immunzytochemie

Unter der Annahme, dass geringe Mengen an exprimiertem GFP und mCherry zu einem sehr schwachen GFP-Signal und dadurch geringe Fluoreszenz führen würden, die durch FACS nachgewiesen werden kann, wurde eine Immunzytochemie durchgeführt. Dabei sollte über Bindung von Antikörpern an GFP und mCherry und fluoreszierenden Sekundärantikörpern ein verstärktes Fluoreszenzsignal erzeugt werden.

Die Immunzytochemie wurde mittels anti-GFP- und anti-mCherry-Antikörpern und darauffolgendem Goat-Anti-Rabbit- bzw. Goat-Anti-Rat-Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 12) durchgeführt und mit dem Axiovert 200M Mikroskop von Zeiss auf Fluoreszenz analysiert.

Es konnte nach ausgiebiger Mikroskopie kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzsignale zwischen der GFP-SRR107-KI mES-Zellen-Linie und Wildtyp-mES-Zellen (WT) gefunden werden. In Betrachtung der einzelnen Signale in Abbildung 21 scheint es zwar als wären die Signale für anti-mCherry und anti-

GFP in den Knock-In-Zellen stärker ausgeprägt, doch die Fluoreszenzsignale sind nicht spezifisch und nicht stark genug, um als ein Positivsignal der Immunzytochemie gewertet werden zu können, vor allem unter Berücksichtigung des DAPI-Signals und dessen Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knock-In-Zellen. Es ist anzunehmen, dass es sich um unspezifische Hintergrundfärbungen der Antikörper handelt. Eine Optimierung der Antikörper-Konzentrationen wäre sinnvoll, um weniger Hintergrundfärbung zu erhalten.

Möglicherweise liefern kleine Mengen der Fluoreszenzproteine keine sichtbaren Signale in der Immunzytochemie, ebenso könnten *loss-of-function* Punktmutationen fehlende Signale in der Immunzytochemie erklären. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass eine sensitivere

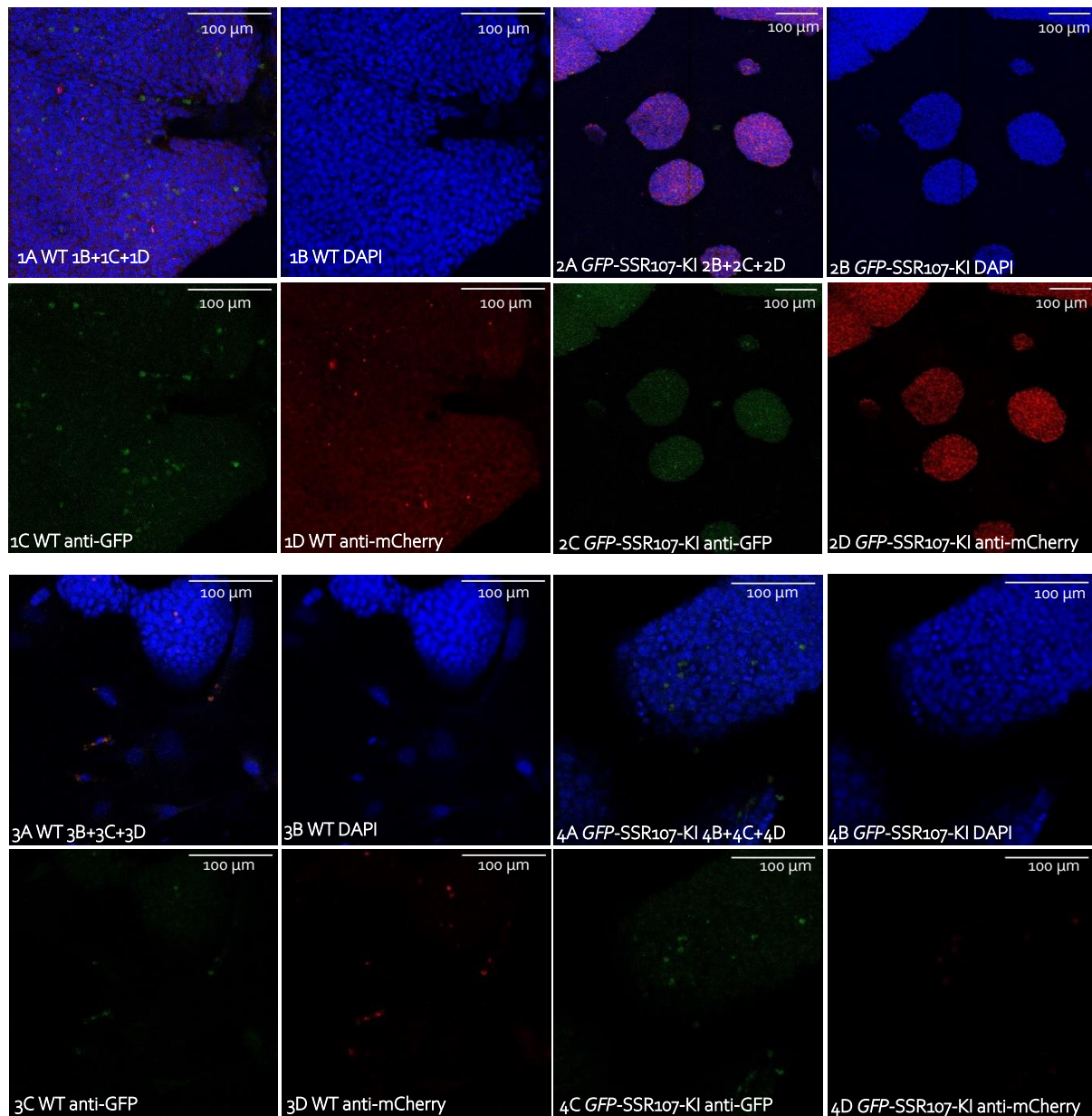


Abbildung 21: Immunzytochemie als Nachweis eines GFP- und mCherry-Signals **1** Wildtyp- Zellen, DAPI Signal (1B), anti-GFP Signal (1C), anti-mCherry-Signal (1D) und Überlagerung der verschiedenen Signale (1A). **2** *GFP-SSR107-KI*-Zellen, DAPI Signal (2B), antiGFP Signal (2C), anti-mCherry-Signal (2D) und Überlagerung der verschiedenen Signale **3** Wildtyp-Zellen, DAPI Signal (3B), anti-GFP Signal (3C), anti-mCherry-Signal (3D) und Überlagerung der verschiedenen Signale (3A). **4** *GFP-SSR107-KI*-Zellen, DAPI Signal (4B), antiGFP Signal (4C), anti-mCherry-Signal (4D) und Überlagerung der verschiedenen (4A).

Nachweismethode, bei der weniger Hintergrundsignale zu erwarten sind und bei der die Expression der Fluoreszenzproteine bereits auf Transkriptionsebene nachgewiesen wird, sinnvoll wäre. In diesem Sinne wurde eine quantitative PCR mit vorgeschalteter cDNA-Synthese als anschließende Detektionsmethode durchgeführt.

4.2.4 Enhancer-Aktivitätsmessung und Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR

Die Expression von Proteinen erfordert die vorangegangene Transkription der Gene in mRNA. Mittels RT-qPCR, eine hoch sensitive Nachweismethode von Transkripten, sollte die Transkription von *mCherry* und *GFP* nachgewiesen werden, um die Expression dieser Reportergene genauer zu analysieren.

Es wurden jeweils zwei verschiedene Primerpaare zur Detektion von *mCherry* und *GFP*-Transkripten mittels RT-qPCRs durchgeführt. Die Normierung erfolgte auf das Haushaltsgen *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)*. Die folgende Zelllinien unterschiedlicher Genotypen wurden analysiert:

- *GFP*-KI (homozygote G₄-mES-Zellen, Zelllinie #G₄)
- *GFP*-SSR107-KI (G₄-mES-Zellen, Zelllinie #B₄ und #D₁)
- *GFP*-SRR107-109-KI (G₄-mES-Zellen, Zelllinie #D₁₀)
- *GFP*-KI whole Embryo E10.5 (Zellen eines kompletten Embryos im E10.5-Stadium mit homozygotem *GFP*-KI) als Positivkontrolle

Die Zellen eines kompletten Embryos im E10.5-dpc-Stadium mit homozygotem *GFP*-KI wurde hier als Positivkontrolle verwendet. *Shh* ist ein Entwicklungsmorphogen, das während der Embryogenese in vielen verschiedenen Gewebe aktiv ist (siehe 1.3.1). In dieser Arbeit wurde *Shh* durch *GFP* ersetzt. Der *Shh*-Promotor wurde beibehalten und der restliche Locus blieb in dieser Zelllinie unverändert, demzufolge dient *GFP* bei den hier beschriebenen Embryonen als *In-vivo*-Reportergen für *Shh* und sollte in vielen verschiedenen Geweben exprimiert werden.

Die Daten dieser Zelllinien wurden mit denen von Zellen einer Extremitätenknospe im E10.5-dpc-Stadium eines Wildtyp-Embryos (WT E10.5 limb) als Negativkontrolle verglichen und normiert, da bei Wildtyp-Zellen keine *GFP*- oder *mCherry*-Transkription zu stattfindet.

Um eine mögliche *GFP*-Expression durch die potenzielle Aktivierung des *Shh*-Promotor nachzuweisen, wurden die verschiedenen beschriebenen Zelllinien mittels RT-qPCR analysiert (Abb. 22).

Die quantitative Analyse der *GFP*-Expression war lediglich in den Zellen des kompletten *GFP*-KI-Embryos im E10.5-dpc-Stadium im Vergleich zum Wildtyp-Embryo um ein Vielfaches erhöht. Die Erhöhung beträgt ca. das 62,3-Fache ($62,3 \pm 8,5$) für das GFP₁-Primerpaar sowie das 64,4-Fache ($64,4 \pm 11,5$) für das GFP₂-Primerpaar.

Alle anderen Zelllinien ergaben keinen Unterschied zum Wildtyp, was daraufhin deutet, dass dort wie auch im Wildtyp keine *GFP*-Expression stattfindet (alle im Bereich zwischen $0,5 \pm 0,1$ und $0,8 \pm 0,2$).

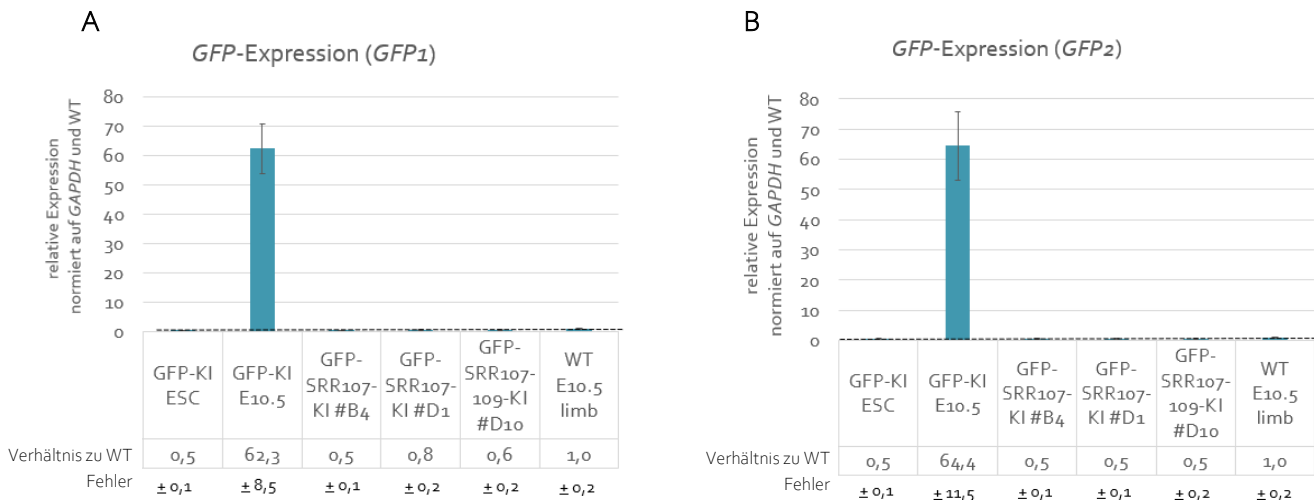


Abbildung 22: RT-qPCR: *GFP*-Expression in verschiedener KI-Zelllinien und embryonalen Geweben

Es wurden verschiedene KI-Zelllinien auf *GFP*-Transkription mittels RT-qPCR analysiert. Im Vergleich zu Zellen eines Wildtyp-Embryos ergab sich für die Zellen des *GFP*-Knock-Ins Embryos eine ca. 60-fach erhöhte *GFP*-Transkription. Alle anderen Knock-In-Zelllinien zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp-Embryo (=1; gestrichelte Linie). Die beiden RT-qPCRs unterscheiden sich anhand der Primer, die für die Vervielfältigung des *GFP*-Transkriptes verwendet wurden. **A** Primerpaar *GFP1*; **B** Primerpaar *GFP2*

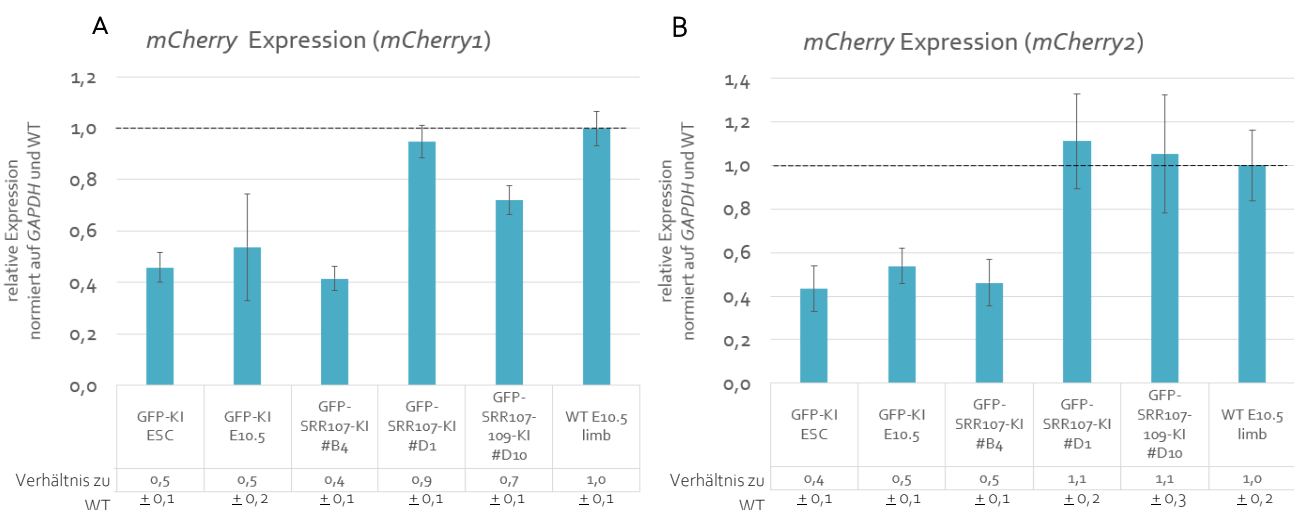


Abbildung 23: RT-qPCR: *mCherry*-Expression verschiedener KI-Zelllinien und embryonalen Geweben:

Es wurden verschiedene KI-Zelllinien auf *mCherry*-Transkription mittels RT-qPCR analysiert. Im Vergleich zu Zellen eines Wildtyp-Embryos ergab keine der genetisch veränderten Zelllinien ein Signal für *mCherry*-Expression. Die Expression in Wildtyp wird mit 1 gleich gesetzt (gestrichelte Linie) und die Expression der anderen Zellen ins Verhältnis gesetzt. Die beiden RT-qPCRs unterscheiden sich anhand der Primer, die für die Vervielfältigung des *mCherry*-Transkriptes dienen sollten.

A Primerpaar *mCherry1*; **B** Primerpaar *mCherry2*

Die *mCherry*-Transkription wurde als Nachweis der Aktivität des inserierten *Sox2*-Enhancers analysiert. Bei allen Zelllinien ergab sich im Vergleich zum Wildtyp-Embryo eine geringfügig verringerte *mCherry*-Expression (siehe Abbildung 23). Da jedoch im Wildtyp kein *mCherry* exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein unspezifisches Signal handelt und keine der Zelllinien *mCherry* nachweisbar transkribiert.

4. ERGEBNISSE

Die hier erzielten Ergebnissen stehen im Kontrast zur beschriebenen und damit auch hier erwarteten Aktivität des *Sox2*-Enhancers in mES-Zellen (Avilion et al., 2003). Möglicherweise befindet sich in mES-Zellen der *Shh*-Locus und demzufolge auch der inserierte *Sox2*-Enhancer in einem reprimierten Zustand. Inaktivierende Histonmodifikationen, die die Zugänglichkeit der DNA für TFs erschwert, könnten diesen Zustand erklären. In dieser Arbeit schloss sich, um diese Annahme zu überprüfen, eine Analyse der Histonmodifikationen an.

4.3 POTENZIELLE REPRESSION DURCH HISTONMODIFIKATIONEN AM *Shh*-LOCUS NACH KNOCK-IN-EXPERIMENTEN

Durch keine der oben erläuterten Versuchen konnte eine Transkription bzw. Expression von *GFP* und *mCherry* in mES-Zellen detektiert werden. Lediglich die RT-qPCR zeigte, dass eine *GFP*-Transkription in *GFP*-Knock-In-Mausembryonen im E10.5 Stadium stattfindet, dieses Gewebe diente als Positivkontrolle in der RT-qPCR.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass in ES-Zellen Entwicklungsgene mit dem Polycomb repressive complex 2 (PRC2) assoziiert und durch H3K27me3 Markierungen reprimiert sind (Boyer et al., 2006; Tong Ihn Lee et al., 2006)

Um weiterführend zu analysieren ob die fehlende Aktivierung durch eine Repression des *Sox2*-Enhancers durch repressive Histonmodifikationen wie H3K27me3 zurückzuführen ist, wurden verschiedenen Zelllinien mittels ChIP-qPCR auf die aktivierenden H3K27ac und reprimierenden H3K27me3 Histonmodifikationen untersucht.

4.3.1 ChIP-qPCR zur Analyse der Histonmodifikationen am *Shh*-Locus

Die geneditierten mES-Zellen des *GFP*-SRR107-Knock-Ins sollten durch die ChIP-qPCR hinsichtlich ihrer Histonmodifikationen charakterisiert werden, um den Aktivitätszustand des Locus zu beschreiben.

Dazu wurden die mES-Zellen zunächst *Feeder*-frei kultiviert und anschließend geerntet und für ChIP mit PFA fixiert. Anschließend wurde das sonifizierte Chromatin mittels Antikörper gegen H3K72-Trimethylierungen (H3K27me3) und H3K27-Acetylierungen (H3K27ac) präzipitiert. Eine qPCR gab Aufschluss über das Vorhandensein von bestimmten DNA-Sequenzen in Assoziation mit den untersuchten Histonmodifikationen. Histone aktiver Gene bzw. aktiver Enhancer sind generell H3K27-acetyliert, inaktive Loci hingegen H3K27-trimethyliert (Consortium, 2012). In Tabelle 21 sind alle Referenzgene, sowie die analysierten Sequenzen mit ihrer Bedeutung für die hier durchgeführte ChIP-qPCR zusammengefasst.

Tabelle 21: Analyierte Gene und Sequenzen in der ChIP-qPCR mit Funktion sowie Histonmodifikationen

Gen/Sequenz	Funktion	H3K27ac	H3K27me3
<i>Fgf8</i>	Referenzgen in mES-Zellen inaktiv	niedrig (<i>Fgf8</i> . 2 = 1) (Negativkontrolle)	hoch (Positivkontrolle)
<i>Cbx2</i>	Referenzgen in mES-Zellen inaktiv	niedrig (Negativkontrolle)	hoch (Positivkontrolle)
BP	Bruchpunkt am SRR107-Knock-In	(zu analysieren)	(zu analysieren)
<i>mCherry</i>	SRR107-Knock-In	(zu analysieren)	(zu analysieren)
<i>pShh</i>	<i>Shh</i> -Promotor	(zu analysieren)	(zu analysieren)
<i>GFP</i>	<i>GFP</i> -Knock-In	(zu analysieren)	(zu analysieren)
<i>Nanog</i>	Referenzgen in mES-Zellen aktiv	hoch (Positivkontrolle)	niedrig (<i>Nanog</i> 1 = 1) (Negativkontrolle)
<i>Zscan10</i>	Referenzgen in mES-Zellen aktiv	hoch (Positivkontrolle)	niedrig (Negativkontrolle)

4. ERGEBNISSE

Es wurden verschiedene Kontroll-Loci verwendet. *Zscan10* und *Nanog* sind beides Transkriptionsfaktoren, die zum Erhalt der Pluripotenz dienen, also in mES-Zellen aktiv sind (Chambers & Tomlinson, 2009; Wang et al., 2007). Die zugehörigen Gene weisen folglich eine hohe H3K27ac und eine geringe H3K27me₃ auf.

Cbx2 und *Fgf8* hingegen sind Gene für zelltypspezifische Proteine (Morey et al., 2012; Zhang et al., 2006), die in mES-Zellen inaktiv und damit stark H3K27-trimethyliert und gering H3K27-acetyliert sind.

In den Knock-In (KI)-Zellen wurden unterschiedliche Positionen an den beiden KI-Stellen analysiert. An der *Sox2*-Enhancer-KI-Stelle wurden qPCRs am Bruchpunkt (BP) und für das inserierte *mCherry*-Gen (*mCherry*) durchgeführt. An der *GFP*-KI-Stelle wurde die qPCR über den *Shh*-Promotor (*pShh*) und über das inserierte *GFP* durchgeführt.

Für alle analysierten Gene bzw. Sequenzen wurden in der ChIP-qPCR je zwei Primerpaare verwendet, deren Bindung im geneditierten *Shh*-KI-Locus in Abbildung 24 dargestellt sind.



Abbildung 24: Primerpaar-Bindung der ChIP-qPCR

Mittels ChIP-qPCR wurde der geneditierte Locus mit anderen Referenzloci hinsichtlich der Häufung von Histonmodifikationen untersucht. Die Primerpaare für die ChIP-qPCR wurden so gewählt, dass jeweils 2 im inserierten *GFP*, im *Shh*-Promotor (*pShh*), im *mCherry*, sowie am Bruchpunkt des inserierten *Sox2*-Enhancers in den *Shh*-Locus binden. (nicht maßstabgerecht).

Die qPCRs der KI-Zellen wurden anschließend mit der *Nanog1*-qPCR bezüglich H3K27me₃ und mit der *Fgf8*.2-qPCR bezüglich H3K27ac verglichen, um angeben zu können, um ein wie viel (*fold change*) die DNA-Menge im Vergleich zu einem nicht-trimethylierten bzw. einem nicht-acetylierten Locus erhöht ist. Die anderen beiden Referenzgene *Zscan10* und *Cbx2* sollen hier dazu dienen, die Aussagekraft der ChIP-qPCR zu überprüfen. Analog zu *Nanog* wird bei *Zscan10* ebenfalls eine niedrige H3K27me₃ und erhöhte H3K27ac erwartet, umgekehrt bei *Cbx2* analog zu *Fgf8*.

4.3.1.2 ChIP-qPCR H3K27-Trimethylierung

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der ChIP-qPCR für die H3K27-Trimethylierung dargestellt.

Jedes analysierte Gen, bzw. jede analysierte Sequenz, wurde mittels zwei verschiedener Primerpaare analysiert (jeweils als 1 und 2 gekennzeichnet).

Für die in mES-Zellen aktiven Pluripotenzgene *Nanog* und *Zscan10* (Chambers & Tomlinson, 2009; Wang et al., 2007) wird eine geringe Assoziation zu H3K27me₃ erwartet. Sie dienen hier als Negativkontrolle und der nach ChIP-qPCR erhaltene Wert für *Nanog1* wird mit 1 gleichgesetzt (gestrichelte Linie), die durch die ChIP-qPCR erhaltene DNA-Menge der anderen analysierten Sequenzen wird im Verhältnis zu *Nanog1*

gesetzt. Auch das in mES-Zellen aktive *Zscan10* zeigte entsprechend der Erwartung eine ähnliche DNA-Menge wie *Nanog*.

Fgf8 und *Cbx2* sind in mES-Zellen inaktiv (Morey et al., 2012; Zhang et al., 2006), demzufolge wird eine hohe Assoziation zu H3K27me₃ erwartet, die beiden Gene dienen hier als Positivkontrolle. Sie zeigen eine 15- bis 30-fach erhöhte DNA-Menge im Vergleich zum nicht-acetylierten *Nanog1*.

Alle analysierten Sequenzen der *GFP-SRR107*-KI-mES-Zellen der Zelllinie #B₄ zeigten, wie in Abbildung 25 zu sehen, durchweg eine höhere DNA-Menge als *Nanog1*. Die CHIP-qPCR am *SRR107*-Knock-In (BP und *mCherry*) ergab eine ca. 5-fach erhöhte DNA-Menge. Die CHIP-qPCR am *GFP*-Knock-In (*pShh*, *GFP*) eine ca. 10 bis 27-fache.

Es kann daraus geschlossen werden, dass im Vergleich zum *Nanog*- und *Zscan10*-Gen alle anderen analysierte Sequenzen stärker H3K27-trimethyliert und damit als inaktiv zu werten sind.

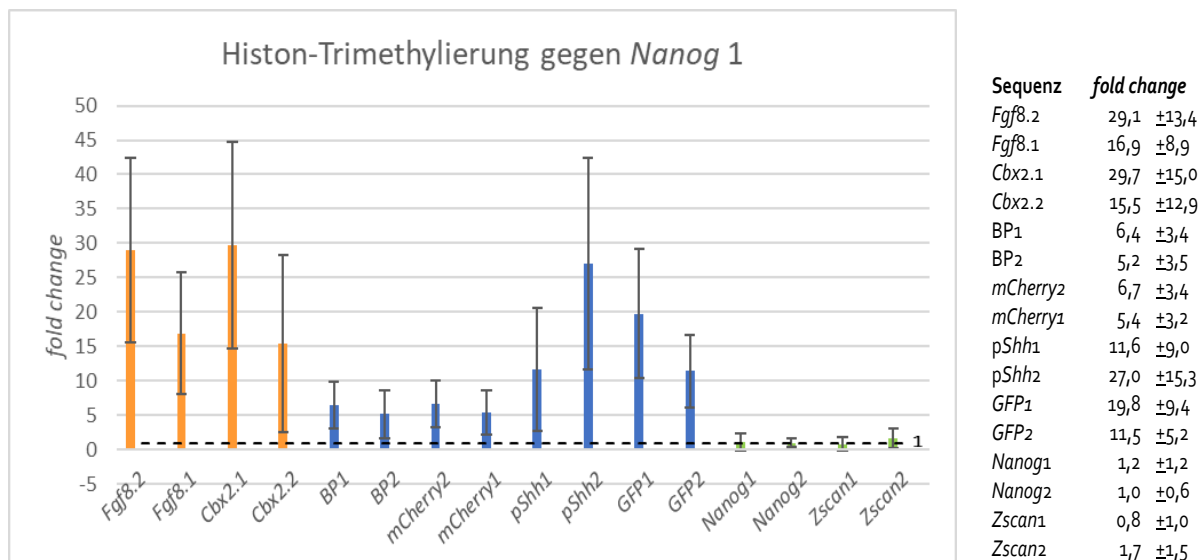


Abbildung 25: Fold Change der DNA-Menge von H3K27-trimethylierten Sequenzen nach CHIP-qPCR

Als Vergleichswert wird die DNA-Menge des nicht-trimethylierten *Nanog*-Locus verwendet und mit 1 gleichgesetzt (gestrichelte Linie). Die Ergebnisse aller analysierten Sequenzen werden als ein Vielfaches der *Nanog1*-DNA-Menge angegeben (y-Achse). Die in mES-Zellen inaktiven Referenzgene *Cbx2* und *Fgf8* sind in orange dargestellt und ergeben eine ca. 15 bis 30-fache DNA-Menge als das *Nanog* und sind daher als trimethyliert zu deuten.

Die analysierten Knock-In-Sequenzen (blaue Balken) zeigen auch eine im Vergleich zu *Nanog* 5 bis 27-fache DNA-Menge und sind auch als stärker trimethyliert und damit inaktiviert zu deuten. Die Werte wurden mittels $\Delta\Delta Ct$ berechnet.

4.3.1.2 CHIP-qPCR H3K27-Acetylierung

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der CHIP-qPCR für die H3K27-Acetylierung dargestellt.

Jedes analysierte Gen, bzw. jede analysierte Sequenz, wurde mittels zwei verschiedener Primerpaare analysiert (jeweils als 1 und 2 gekennzeichnet).

Die Referenzgene *Fgf8* und *Cbx2* sind zelltypspezifische Gene, die in mES-Zellen inaktiv sind (Morey et al., 2012; Zhang et al., 2006) und folglich eine geringe Assoziation zu H3K27ac erwartet wird. Sie dienen hier als Negativkontrolle und der nach CHIP-qPCR erhaltene Wert für *Fgf8.2* wird mit 1 gleichgesetzt (gestrichelte Linie), die durch die CHIP-qPCR erhaltene DNA-Menge der anderen analysierten Sequenzen

4. ERGEBNISSE

wird im Verhältnis zu *Fgf8.2* gesetzt. Auch das inaktive *Cbx2* zeigte entsprechend der Erwartung eine ähnliche DNA-Menge wie *Fgf8*.

Nanog und *Zscan10* sind in mES-Zellen aktiv (Chambers & Tomlinson, 2009; Wang et al., 2007), demzufolge wird eine hohe Assoziation zu H3K27ac erwartet, die beiden Gene dienen hier als Positivkontrolle. Sie zeigen eine 5 bis 12-fache DNA-Menge im Vergleich zum nicht-acetylierten *Fgf8.2*. Alle analysierten Sequenzen (BP, *pShh*, *mCherry*, *GFP*) der *GFP-SRR107-KI*-mES-Zellen der Zelllinie #B4 zeigten eine ähnliche oder noch niedrigere DNA-Menge als für *Fgf8* (0,3 bis 1,2-fach).

Im Vergleich zum *Fgf8* und *Cbx2*-Gen ergab sich nur für die aktiven Referenzgene (*Nanog* und *Zscan10*) eine höhere H3K27-Acetylierung. Alle anderen analysierte Sequenzen sind ähnlich stark H3K27-acetyliert (Abbildung 26). Es kann daraus geschlossen werden, dass im Vergleich zum *Fgf8* und *Cbx2*-Gen wie erwartet nur die Referenzgene *Nanog* und *Zscan10* in einem aktiven Zustand liegen. Alle anderen analysierten Sequenzen sind ähnlich schwach H3K27-acetyliert wie *Fgf8* (Abbildung 26) und damit als inaktiv zu werten.

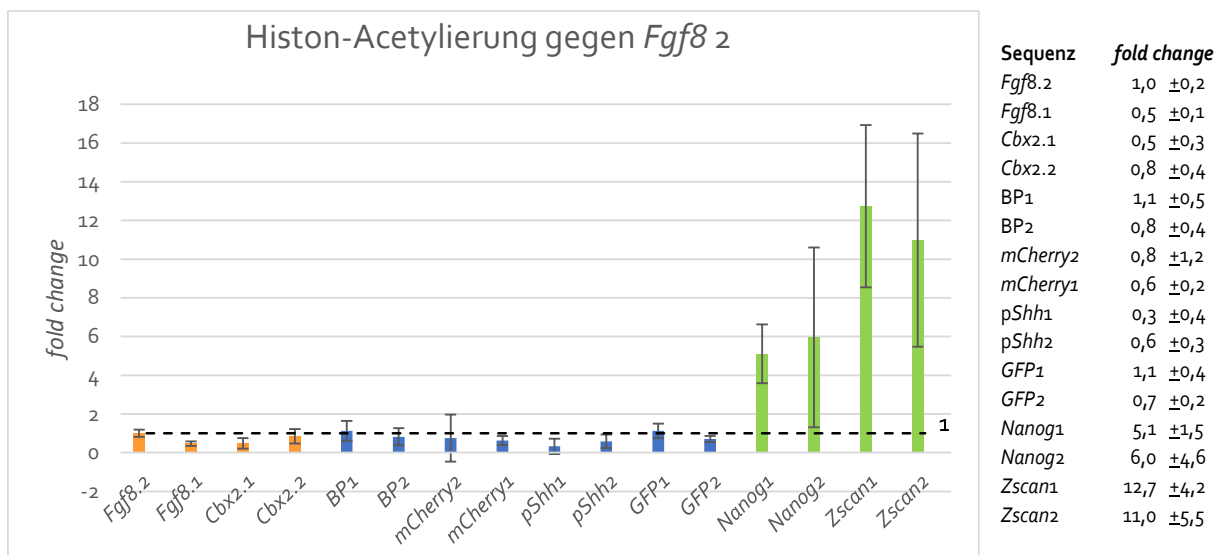


Abbildung 26: **Fold Change** der DNA-Menge von H3K27-acetylierten Sequenzen nach CHIP-qPCR

Als Vergleichswert wird die DNA-Menge des nicht-acetylierten *Fgf8*-Locus verwendet und mit 1 gleichgesetzt (gestrichelte Linie). Die Ergebnisse aller analysierten Sequenzen werden als ein Vielfaches der *Fgf8.2*-DNA-Menge angegeben (y-Achse).

Die in mES-Zellen aktiven Referenzgene *Nanog* und *Zscan10* sind in grün dargestellt und ergeben eine ca. 6- bis 13-fache DNA-Menge als das *Fgf8* und sind daher als acetyliert zu deuten.

Die analysierten Knock-In-Sequenzen (blaue Balken) zeigen eine ähnliche DNA-Menge wie das *Fgf8* und sind demzufolge als wenig acetyliert und inaktiv zu deuten. Die Werte wurden mittels $\Delta\Delta Ct$ berechnet.

Die Analyse der H3K27-Modifikationen im Vergleich zu *Nanog* und *Zscan10* als Referenzgene für geringe H3K27-Trimethylierung und *Fgf8* und *Cbx2* als Referenzgene für geringe H3K27-Acetylierung zeigt, dass der geneditierte Locus an den SRR107-KI-Bruchpunkten, dem inserierten Genen (*mCherry* und *GFP*), sowie den *Shh*-Promotor gering H3K27-acetyliert und vergleichsweise stärker H3K27-trimethyliert ist. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es trotz zunehmender Nähe des inserierten Sox2-Enhancers an Position der ZRS und des *Shh*-Promotors keine Expression der Reportergene mittels

verschiedener Methodiken festzustellen war. Die Ergebnisse der CHIP-qPCR deuten darauf hin, dass der Locus vermutlich durch eine Polycomb-vermittelte H3K27-Trimethylierung reprimiert wird, wie es für inaktive Entwicklungsgene und inaktive CREs bekannt ist (Boyer et al., 2006; Consortium, 2012; Tong Ihn Lee et al., 2006; Zhu et al., 2013).

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte die hochkonservierte Sequenz *upstream* der ZRS, die hier ZRS300 genannt wird (siehe Einleitung 1.3.1), auf ihre Funktion untersucht werden und mögliche differenzielle Aktivitäten zwischen verschiedenen Spezies analysiert werden.

4.4 Analyse der ZRS300-Sequenzen verschiedener Spezies

Die ZRS ist ein hochkonserviertes CRE, das *Shh* spezifisch in der ZPA der Extremitätenknospe aktiviert (Lettice et al., 2003; Paliou et al., 2019; Sagai et al., 2005). Als ZRS wird dabei eine ca. 800 bp lange Sequenz, die ca. 900 kb *upstream* vom *Shh*-Gen liegt, bezeichnet (hier auch als ZRS800 bezeichnet). Weitere 720 bp *upstream* der ZRS800 befindet sich ebenfalls eine hochkonservierte Sequenz von ca. 300 bp, die hier als ZRS300 bezeichnet wird (siehe Abbildung 6). Diese Sequenz ist bislang nicht unabhängig der ZRS charakterisiert worden, jedoch spricht die hohe Konservierung der Sequenz für eine *cis*-regulatorische Funktion (Boffelli et al., 2004; Maeso et al., 2013). In früheren unpublizierten Experimenten der AG Mundlos fiel auf, dass ein Austausch der murinen ZRS300 mit der anderer Spezies letal ist. Bei Analyse der Konservierung über PhyloP (PhyloP-Conservation, UCSC Genome Browser) konnte außerdem festgestellt werden, dass die ZRS300 bei Fischen (Tetraodon, Fugu, Zebrafish) im Vergleich zur Maus nicht konserviert ist. Zusätzlich sind mittlerweile einige (Punkt)Mutationen der ZRS300 in Mensch und Hund bekannt, die zu Polydaktylie führen, was wiederum für eine Funktion der ZRS300 im Zusammenhang mit der Extremitätenentwicklung spricht (Park et al., 2008; Potuijt et al., 2018; Xiang et al., 2017).

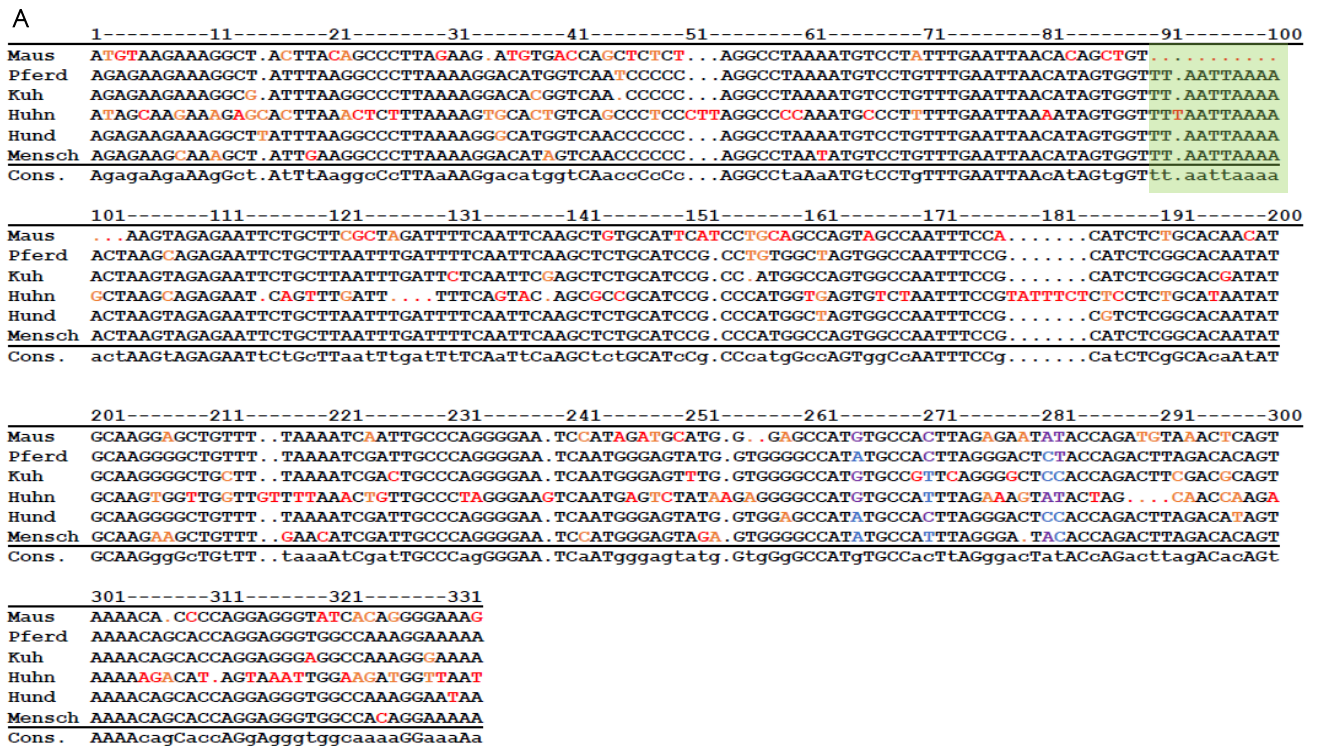
Um die ZRS300 genauer zu charakterisieren und weitere Erkenntnisse bezüglich des beobachteten letalen Phänotypen zu erlangen, wurde in einem ersten Schritt ein *Alignment* der konservierten ZRS300 verschiedener Spezies durchgeführt. Weiterführend wurden funktionale *LacZ*-Reporterassays der ZRS300 verschiedener Spezies in murinen Embryonen im E10.5-dpc Stadium durchgeführt, um eine potenzielle *cis*-regulatorische Funktion zu detektieren.

4.4.1 *Alignment* der ZRS300 verschiedener Spezies

Zum Vergleich der ZRS300 verschiedener Spezies wurde mittels Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) das in Abbildung 27A dargestellte *Alignment* erstellt.

Es wurden die Sequenzen der ZRS300 von Maus (*Mus musculus*), Huhn (*Gallus gallus*), Kuh (*Bos taurus*), Pferd (*Equus caballus*), Hund (*Canis lupus familiaris*) und Mensch (*Homo sapiens*) miteinander verglichen.

In der Tabelle in Abbildung 27B sind die absoluten sowie relativen Angaben der differierenden Basenpaaren zusammengefasst. Rot markierte Basenpaare sind Spezies-spezifische Mutationen (Differenz A), orange markierte Mutationen treten in zwei bis drei Spezies auf (Differenz B). Generell variiert die Sequenz der ZRS300 des Huhns am stärksten zu den der anderen Spezies. 29,6 % der 321 bp der Huhn-ZRS300 unterscheiden sich zu den Sequenzen der anderen Spezies (18,1 % sind Huhn-spezifische Mutation, 11,5 % Mutationen, die sich in mind. einer anderen Spezies zeigen). Das Huhn ist als Vogelart evolutionär gesehen weiter von den anderen Spezies (allesamt Säugetiere) entfernt als diese zueinander, wodurch sich die Abweichung der ZRS300-Sequenz erklären lässt.



B

	Länge	Differenz A ¹ : spezies- spezifisch (rot)		Differenz B ² : in 2 oder 3 Spezies (orange)		Differenz A ¹ + Differenz B ²	Deletionen (% von Konsens von 316 bp)	
		Spezies	Anteil	Spezies	Anteil		Anteil	Anteil
Maus	300 bp	30 bp	10%	25 bp	8,3%	18,3%	17 bp	5,4%
Pferd	316 bp	0 bp	0%	5 bp	1,6%	1,6%	0 bp	0%
Kuh	314 bp	8 bp	2,5%	7 bp	2,2%	4,7%	2 bp	0,6%
Huhn	321 bp	58 bp	18,1%	37 bp	11,5%	29,6%	11 bp	3,5%
Hund	317 bp	1 bp	0,3%	6 bp	1,9%	2,2%	0 bp	0%
Mensch	315 bp	6 bp	1,9%	7 bp	2,2%	4,1%	1 bp	0,3%

¹ spezies-spezifische Differenz eines Basenpaares
² Differenz eines Basenpaares in zwei oder drei Spezies

Abbildung 27: Analyse der ZRS300 verschiedener Spezies mittels eines Alignments

A Alignment der ZRS300 zwischen Maus, Pferd, Kuh, Huhn, Hund und Mensch. Cons. Bezeichnet die Sequenz mit dem höchsten Konsenz (3 oder mehr Spezies weisen das entsprechende Basenpaar auf. Großbuchstaben sind zwischen allen Spezies konserviert. Auffallend ist u.a. ein degenerierter Bereich (grün) der murinen ZRS300.

Differenzen die rot markiert sind, sind auf eine Spezies begrenzt; orange markierte Differenzen finden sich in 2 oder 3 Spezies. Blau bzw. lila markierte Basen zeigen sich in 50:50 Aufteilung.

B Auswertung des Alignments

In der Tabelle findet sich die Auswertung des Alignments mit absoluten und relativen Angaben der Unterschiede der verschiedenen ZRS300. Differenz Rot bezeichnet Basenpaare, die sich nur in einer Spezies unterscheiden. Differenz Orange bezeichnet Basenpaare, die sich in 2 oder 3 Spezies unterscheiden. Die Anzahl der Deletionen wurden relativ auf die Konsenssequenz (von 316 bp) bezogen.

Auffällig ist jedoch, dass unter den hier charakterisierten Säugetierarten die Maus die größten Unterschiede zu den anderen Spezies aufweist. Dabei liegt der relative Anteil von differierenden Basen bei insgesamt 18,3 % (von 300 bp). Die anderen Spezies weisen maximal 4,7 % differierende Basenpaare auf. Zusätzlich ist ein Abschnitt der murinen ZRS300 deletiert (Bereich von 10 bp, siehe grüne Markierung in Abbildung 27A). Der Unterschied der murinen ZRS300 zu der der anderen Spezies, sowie der deletierte Bereich könnten möglicherweise einen sekundären Funktionsverlust verursacht haben, wodurch sich die

Ergebnisse des unauffälligen ZRS300-Knock-Out-Experiments sowie der letale Verlauf des Austausches der murinen ZRS300 mit der anderer Spezies erklären lassen könnten.

Um zu Testen in welchen Geweben die beschriebene Sequenz potenziell aktiv sein könnte und um diese funktional zu validieren, wurden *LacZ*-Reportergerneassays der ZRS300 verschiedener Spezies in murinen E10.5-dpc Embryonen durchgeführt.

4.4.2 *In-vivo-LacZ-Reportergerneassays*

Um eine potenzielle *cis*-regulatorische Funktion der ZRS300 genauer zu analysieren, wurden zunächst mittels eines Flip-In-Systems mES-Zelllinien (C2) mit den entsprechenden ZRS300-Sequenzen von *Bos taurus* (Kuh), *Gallus gallus domesticus* (Huhn) und *Equus caballus* (Pferd) generiert. Dabei wurden die ZRS300 in den *Col1A1*-Locus der mES-C2-Zellen integriert (siehe Methoden 3.2.3 und 3.2.4).

Anschließend wurde durch diploide Komplementation Embryonen des E10.5-dpc-Stadiums generiert (siehe 3.2.5). Mittels *LacZ*-Reportergerneassays wurde anschließend die potenziell differenzielle Aktivität der unterschiedlichen ZRS300 in Mausembryonen im E10.5-dpc-Stadium über eine X-Gal-Färbung analysiert und aktives Gewebe detektiert (siehe 3.3.6).

Bei allen Embryonen, die erfolgreich das *LacZ*-Reportergerneassay im *Col1A1*-Locus integriert hatten, wurde nach X-Gal-Färbung ein durchgehendes axiales Signal von kranial nach kaudal detektiert. Das Signal erschien bereits nach einigen Stunden Färbung, verstärkte sich jedoch bei Färbung über Nacht nicht weiter. In Abbildung 28 sind exemplarisch jeweils ein E10.5-dpc-*LacZ*-Embryo mit der ZRS300 verschiedener Spezies mit Nahaufnahme der Extremitätenknospe dargestellt (A: Pferd-ZRS300-*LacZ*-Embryo; B: Kuh-ZRS300-*LacZ*-Embryo; C: Huhn-ZRS300-*LacZ*-Embryo).

Das erhaltende Signal ähnelt der Aktivität des SFPE2-Enhancers und v.a. zeigt sich eine Übereinstimmung mit der *Shh*-Aktivität in der Chorda dorsalis und der Bodenplatte des Neuralrohrs (1 roter Pfeil) (Anderson et al., 2014; Epstein et al., 1999; Ericson et al., 1995).

Außerdem entstanden zwei weitere Signale ventral des axialen Signals ca. auf Herzhöhe (2 grüner und 3 blauer Pfeil).

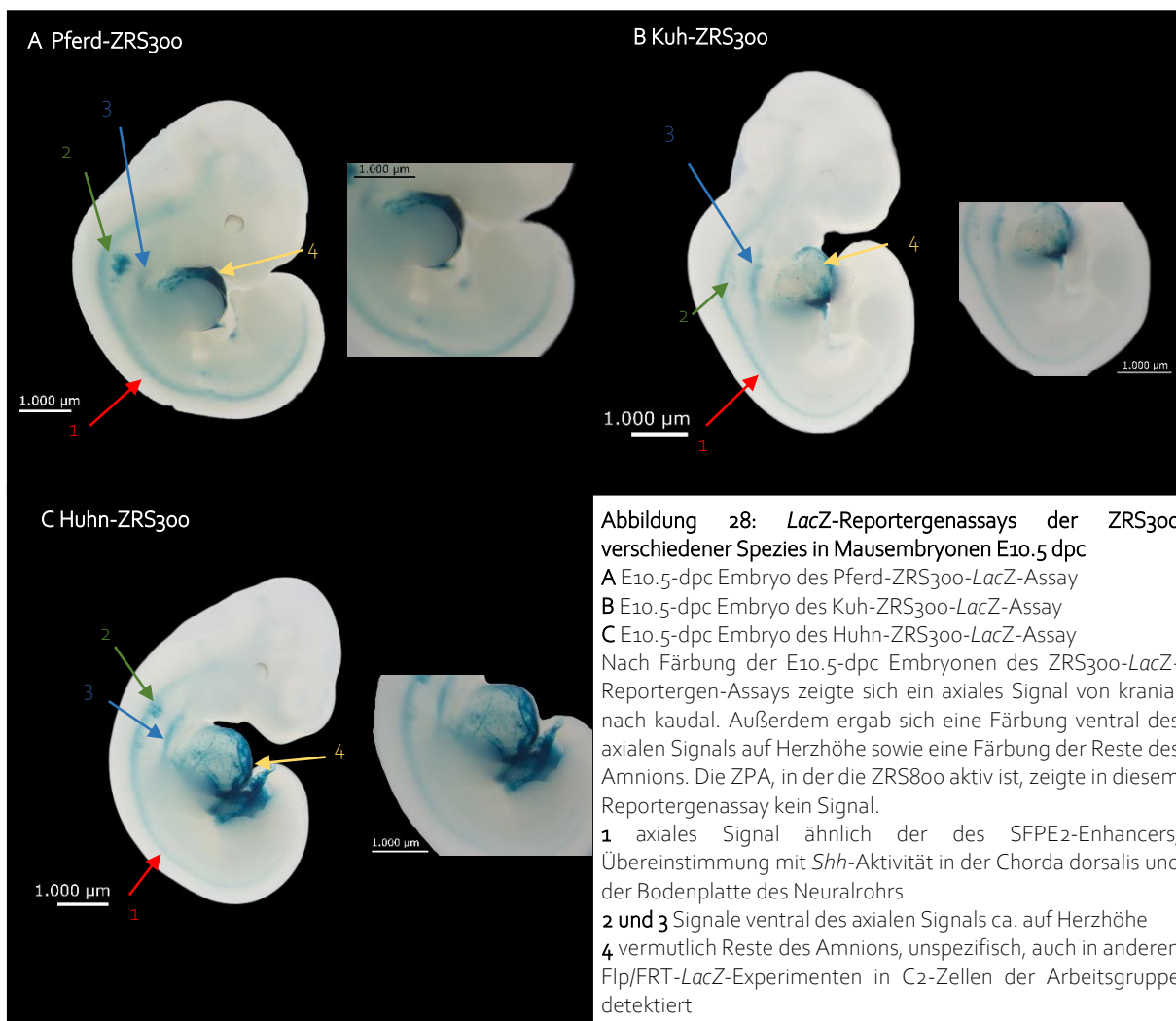
Bei allen Embryonen fand eine Färbung von vermutlich Resten des Amnions statt, was jedoch auch in anderen Flp/FRT-*LacZ*-Experimenten in C2-Zellen der Arbeitsgruppe Mundlos festgestellt werden konnte und daher als unspezifisch zu werten ist (4 gelber Pfeil).

Interessanterweise zeigte sich entgegen der Erwartung kein Aktivitätssignal in den Extremitätenknospen, insbesondere nicht in der ZPA, die das Zentrum der Aktivität der ZRS ist und wo folglich auch eine Aktivität der ZRS300 zu erwarten gewesen wäre. Auch nach Färbung über Nacht, zeigte sich kein Signal in der Extremitätenknospe. Insgesamt wurden mehrere Replikate (4 bis 8 pro Reportergerneassay), die alle dasselbe Signal zeigten.

Die mES-Zelllinie der murinen ZRS300 (Maus-ZRS300) konnte erfolgreich generiert werden und verschiedene C2-mES-Zelllinien konnten ausreichend kultiviert werden. Jedoch scheiterte mehrfach die Morula-Aggregation der mES-Zellen, sodass keine Embryonen für ein *LacZ*-Reporterassay der Maus-ZRS300 generiert werden konnten. Ein Vergleich zwischen Aktivitäten der verschiedenen ZRS300 der anderen Spezies mit der Aktivität der Sequenz in der Maus selbst, konnte daher nicht erfolgen.

Zusammenfassend kann hier festgehalten werden, dass in den erfolgten *LacZ*-Reporterassays der ZRS300 von Pferd, Huhn und Kuh nach X-Gal-Färbung ein durchgehendes axiales Signal detektiert werden konnte. Dieses axiale Signal zeigt eine Übereinstimmung mit der *Shh*-Aktivität in der Chorda dorsalis und der Bodenplatte des Neuralrohrs. Es konnten außerdem zwei weitere Signale ventral des axialen Signals ca. auf Herzhöhe detektiert werden. Die beschriebenen Signale deuten auf eine *cis*-regulatorische Aktivität der ZRS300 in den genannten Lokalisationen hin, die unter 5.2.1 weiter diskutiert wird.

Zusätzlich fällt auf, dass in der ZPA, der Lokalisation mit der stärksten ZRS-Aktivität, kein *LacZ*-Signal detektiert wird. Die ZRS300 zeigt dort dementsprechend keine *cis*-regulatorische Aktivität.



5. DISKUSSION

Die spezifische Interaktion zwischen Promotoren und Enhancer ist grundlegend für die präzise Regulation komplexer Expressionsmuster in spezifischen Zelltypen und Geweben und folglich entscheidend während der Entwicklung und Embryogenese von Organismen. CREs sind dabei in komplexen genregulatorischen Landschaften eingebettet, welche mit architektonischen dreidimensionalen Chromatineinheiten, sogenannten TADs, korrelieren (Despang et al., 2019; Ruf et al., 2011; Symmons et al., 2014). Es wird angenommen, dass TADs dabei helfen, Kontakte zwischen Promotoren und Enhancer zu etablieren und gleichzeitig ektopische Kontakte beschränken (Dixon et al., 2012; Fudenberg et al., 2016). Dabei liegen zwischen CREs mitunter große Distanzen (Lettice et al., 2003; Long et al., 2020). Im Falle des *Shh*-Locus, ein klassisches Beispiel für Genregulation über eine weite lineare Distanz, liegt die ZRS, der nicht redundante Enhancer, der die *Shh*-Expression in der Extremitätenknospe aktiviert, 900 kb von der *Shh*-TSS entfernt und innerhalb des konstitutiv exprimierten *Lmbr1*-Gens (Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2005). Bei Betrachtung der Chromatinstruktur des Locus konnte festgestellt werden, dass *Shh*-Promotor und ZRS in einer zelltypunabhängigen Chromatinschleife liegen und dadurch die Möglichkeit zur räumlichen Interaktion geschaffen wird (Anderson et al., 2014; Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2016). Eine Aktivierung der Expression von *Shh* durch die ZRS findet trotz zelltypunabhängiger Chromatinarchitektur nur in der ZPA statt, wobei die Distanz beider Elemente bei Aktivierung weiter minimiert wird (Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2005; Williamson et al., 2016).

Die Bildung von Chromatinschleifen wird durch Bindung von CTCF und Cohesin ermöglicht, jedoch führte in einigen Experimenten die Deletion von CTCF-Bindestellen nur zu einer geringen Veränderung der Genexpression in mES-Zellen (Dixon et al., 2012; Fudenberg et al., 2016; Nora et al., 2017; Nuebler et al., 2018). Auch im *Shh*-Locus zeigt eine Störung der Chromatinstruktur durch Deletion von CTCF-Bindestellen keine phänotypischen Effekte (Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2019). Die Bedeutung der Chromatinarchitektur für die Aktivierung der Genexpression bleibt hierbei unklar, vermutlich hat die TAD-Struktur eine evolutionsbezogene Bedeutung für die Ansammlung der vielzähligen CREs im *Shh*-Locus (Williamson et al., 2019). Außerdem wird vermutet, dass sie zu Widerstandsfähigkeit gegenüber Veränderungen der Enhanceraktivität beiträgt (Paliou et al., 2019). Es wird deutlich, dass insbesondere in dem hier untersuchten *Shh*-Locus die Kommunikation zwischen Promotor und Enhancer neben der räumlichen Interaktion von weiteren Mechanismen abhängig ist. Nicht unbeachtet sollten hierbei mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies bleiben (siehe 1.3.2). Beim Menschen ist bspw. eine CTCF-betreffende Deletionsmutation im *Shh*-Locus bekannt, die zu Acheiropodie (bilaterales Fehlen von Händen und Füßen) führt (Ilanakiev et al., 2001; Ushiki et al., 2021).

Im Gegensatz zur Regulation von *Shh* in der Extremitätenknospe durch die ZRS, einem regulären distalen Enhancer, wird der Pluripotenzfaktor *Sox2* in mES-Zellen durch einen sogenannten Superenhancer reguliert (Zhou et al., 2014). Superenhancer unterscheiden sich von regulären Enhancer hinsichtlich

einiger Eigenschaften und fungieren zum Teil durch andere Mechanismen (siehe 1.1.4). Eine wichtige Rolle nimmt dabei bspw. die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (FFPT) ein. FFPT ist bei der Regulation durch Superenhancer wahrscheinlicher als bei regulären Enhancer und bestimmt demzufolge möglicherweise auch die Regulation von *Sox2* mit (Alexander et al., 2019; Hnisz et al., 2017; Sabari et al., 2018).

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte Enhancer-Promotor-Spezifität anhand eines Enhancer-Austauschs am *Shh*-Locus analysiert werden. Dazu wurde die endogene ZRS mit Teilen des in mES-Zellen aktiven *Sox2*-Enhancer-Clusters (SCR) substituiert, um eine Aktivierung des *Shh*-Promotors in mES-Zellen zu erzielen. Zusätzlich wurde *Shh* durch *GFP* als Reporter gen ersetzt, um mögliche Nebeneffekte durch Differenzierung der Zellen nach potenzieller Aktivierung zu umgehen und um eine Genexpression einfach detektierbar zu machen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine hochkonservierte Sequenz (siehe Abbildung 6) von etwa 300 bp Länge, die sich ca. 720 bp *upstream* der ZRS befindet und hier als ZRS300 bezeichnet wird, auf ihre Funktion in verschiedenen Spezies analysiert. In früheren nicht publizierten Experimenten der Arbeitsgruppe Mundlos fiel auf, dass im Mausmodell der Austausch der ZRS mit derer anderer Spezies letal ist, sobald die ZRS300 mit inseriert wird. Um dies besser zu verstehen, wurde in diesem Projekt die ZRS300 des Genoms von *Gallus Gallus Domesticus* (Huhn), *Bos taurus* (Kuh) und *Equus caballus* (Pferd) mittels eines *Alignments* der verschiedenen Sequenzen und *LacZ*-Reporter genassays in Mausembryonen im E10.5-dpc-Stadium untersucht.

5.1 *Sox2*-ENHANCER-INSERTION IST NICHT SUFFIZIENT ZUR AKTIVIERUNG DES *Shh*-PROMOTORS

Die ZRS, ein Extremitätenenhancer, der in mES-Zellen inaktiv ist und durch eine vorgefertigte Chromatinschleife in direkter räumlicher Nähe zum *Shh*-Promotor liegt (Paliou et al., 2019), wurde in dieser Arbeit durch SRR107, einem starken, in mES-Zellen aktiven Enhancer des Pluripotenzgens *Sox2* (Zhou et al., 2014), ersetzt. Die transgenen mES-Zellen (*GFP* anstatt *Shh* und *Sox2*-Enhancer SRR107 der SCR anstatt ZRS) wurden mittels Durchflusszytometrie, FACS, RT-qPCR sowie Immunzytochemie auf Expression von *GFP* und *mCherry* als Signal für die Aktivität des *Sox2*-Enhancers untersucht.

Keines der durchgeführten Experimente wies eine *GFP*- oder *mCherry*-Expression in mES-Zellen nach. Durch Analyse eines kompletten Embryos mit *GFP*-KI mittels RT-qPCR konnte gezeigt werden, dass *GFP* prinzipiell transkribiert werden kann, sodass ein Fehlschlagen des Experiments durch eine fehlerhafte *GFP*-Transkription ausgeschlossen wurde. Des Weiteren wurden aus den durch diese Arbeit erzeugten geneditierten mES-Zellen mit heterozygotem *GFP*-Knock-In (ohne *Sox2*-Enhancer-Knock-In) E10.5-dpc Embryonen generiert und eine *GFP*-Expression, erwartungsgemäß der *Shh*-Expression entsprechend, in der ZPA und der Chorda dorsalis nachgewiesen (siehe Abb.19, Ibrahim, unpubliziert). Durch dieses Kontrollexperiment konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das verwendete System aus *GFP* mit dem *Shh*-

Promotor funktionsfähig ist und *GFP* exprimiert werden kann. Die positiven Ergebnisse der Kontrollexperimente in Verbindung mit der fehlenden *GFP*-Expression in den durchgeführten Experimenten lassen auf eine fehlende Aktivierung des *Shh*-Promotors in mES-Zellen durch den *Sox2*-Enhancer SRR107 schließen.

Es zeigte sich in einer anschließenden ChIP-qPCR, dass der geneditierte *Shh*-Locus histontrimethyliert (H3K27me3) ist (siehe 4.3), möglicherweise durch Polycomb repressive Complex 2 (Di Croce & Helin, 2013; Margueron & Reinberg, 2011; Wiles & Selker, 2017). Damit liegen *Sox2*-Enhancer sowie des *Shh*-Promotor vermutlich in einem inaktiven Zustand und eine räumliche Interaktion konnte trotz entsprechenden Zelltyps des *Sox2*-Enhancers keine Genaktivierung bewirken.

Der Austausch der CREs in diesem Experiment ist nicht ausreichend, um die Genexpression zu aktivieren.

5.1.1 Räumliche Nähe zwischen *Sox2*-Enhancer und *Shh*-Promotor führt nicht zu Genaktivierung

Eine verbreitete Annahme bzgl. Enhancer-Promotor-Kommunikation ist, dass aktive Enhancer promiskuitiv agieren und somit Gene wahllos aktivieren, sofern sie von diesen nicht räumlich isoliert sind (Krijger & de Laat, 2016; Symmons et al., 2014). Dies wurde bspw. durch sogenannte Enhanceradoption gezeigt; Hier aktivieren Enhancer, die durch strukturelle Varianten mit einer fremden TAD fusioniert werden, ektop Gene, die sich in dieser TAD befinden (Lupiáñez et al., 2016; Weischenfeldt et al., 2017). Dennoch zeigen mittlerweile auch einige Experimente, dass diese Annahme nicht allgemein gültig ist (Catarino & Stark, 2018; Krijger & de Laat, 2016; Martinez-Ara et al., 2021; Zabidi et al., 2015).

Auch durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Annahme nicht auf alle Enhancer und auf alle Loci, vor allem nicht auf *Shh* und die ZRS, übertragbar ist.

Der *Sox2*-Enhancer ist in mES-Zellen aktiv und bindet demzufolge zelltypspezifische TF (Zhou et al., 2014). Nach Insertion in die *Shh*-TAD anstelle der ZRS konnte der *Sox2*-Enhancer nicht zur Genaktivierung von *Shh* in mES-Zellen führen.

In anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe Mundlos wurde das Verhalten einer repositionierten ZRS in die TADs der Nachbargene *Nom1*, *Mnx1*, *En2* und *Cnpy1* (siehe Abbildung 4A) analysiert. Dabei konnte in der Extremitätenknospe transgener E10.5-dpc-Embryonen keine Aktivierung der benachbarten Gene *Nom1* (Haushaltsgen) und *Mnx1* nachgewiesen werden (Despang, 2021). Es konnte jedoch bei Reposition der ZRS in die centromer benachbarten TAD bei den Genen *En2* und *Cnpy1*, die normalerweise in E10.5-dpc im Mittelhirn exprimiert werden, eine starke ZPA-spezifische Expression nachgewiesen werden (Despang, 2021). Schlussfolgernd stützen diese Ergebnisse die These, dass ZRS und der *Shh*-Promotor eine Spezifität bzw. Selektivität besitzen, die nicht ganz allgemein auf andere Enhancer und Promotoren übertragbar ist.

Die Ergebnisse bestätigen die Annahmen, dass Enhancer-Promotor-Interaktionen von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst werden und der beschriebene Mechanismus der räumlichen Interaktion zwischen CREs nicht genomweit übertragbar ist. Wahrscheinlich wird die Genregulation unterschiedlicher Loci, insbesondere von Loci streng regulierter Entwicklungsgene – wie *Shh* – durch individuelle Faktoren und Mechanismen bestimmt.

Interessanterweise konnte in Arbeiten, die die Interaktion des *Sox2*-Superenhancers SCR mit dem *Sox2*-Promotor analysieren, keine zeitliche Korrelation zwischen *Sox2*-Transkription und Annäherung von *Sox2* und SCR beobachtet werden (Alexander et al., 2019). Da in anderen Experimenten jedoch gezeigt wurde, dass das *Sox2*-Transkriptionslevel abhängig der linearen SCR-*Sox2*-Distanz ist, wird angenommen, dass bei der Interaktion von SCR mit dem *Sox2*-Promotor einen gewissen „Memory-Effekt“ gibt (Alexander et al., 2019; Zuin et al., 2021). Der zeitlich kurze Kontakt von SCR mit dem *Sox2*-Promotor führt vermutlich langanhaltend zu einer erhöhten Transkriptionsrate von *Sox2* auch nach Auflösen des SCR-*Sox2*-Kontaktes (Zuin et al., 2021). Dieses Modell der Promotor-Enhancer-Interaktion steht in dieser Arbeit dem *permissiven* Modell der räumlichen Interaktion zwischen ZRS und *Shh* gegenüber (de Laat & Duboule, 2013; Zuin et al., 2021). Beide Modelle setzen zwar eine räumliche Interaktion zwischen Promotor und Enhancer voraus, jedoch unterscheiden sie sich wesentlich hinsichtlich ihrer Dynamik. Es wird durch die hier gezeigten Ergebnisse deutlich, dass die verschiedenen Mechanismen von Promotor-Enhancer-Interaktion nicht ohne weiteres durch Austausch der CREs auf andere Loci übertragbar ist. Dabei bleibt jedoch unklar, welche Faktoren letzten Endes eine vollständige Aktivierung der Genexpression ermöglichen.

5.1.2 Faktoren jenseits der dreidimensionalen Chromatinstruktur

Die spezifische Kommunikation zwischen Promotoren und Enhancern ist bisher nur unvollständig verstanden. Das bereits beschriebene Konzept der Interaktion durch räumliche Nähe scheint eine wichtige, jedoch nicht die letztlich entscheidende Rolle zu spielen (Despang et al., 2019; Ghavi-Helm et al., 2019; Paliou et al., 2019; Williamson et al., 2019).

Ein anderer beschriebener Mechanismus ist die Bindung von zelltypspezifischen TF und einer homotypischen Interaktion von *trans*-agierenden Elementen zwischen Promotoren und Enhancern (Robson et al., 2019; Zabidi & Stark, 2016). Dabei wird eine sogenannte molekulare Brücke erschaffen (Pombo & Dillon, 2015). Promotor und Enhancer gelangen durch Interaktion ähnlicher, kompatibler *trans*-Elemente und Kofaktoren in Kontakt miteinander (Robson et al., 2019).

Das Bild dieser molekularen Brücke sollte jedoch vermutlich nicht als starr und statisch interpretiert werden (Zabidi & Stark, 2016). Es konnte beobachtet werden, dass ein Enhancer zwei Promotoren gleichzeitig aktivieren kann (Fukaya et al., 2016). Diese Erkenntnis spricht gegen eine statische Verbindung durch *trans*-Elemente. Sie spricht viel eher dafür, dass eine dynamische, biochemische

Mikroumgebung, die durch TF-Bindung und Interaktion mit Kofaktoren an Enhancer geschaffen wird, ausschlaggebend für die Promotor-Enhancer-Interaktion ist (Muerdter & Stark, 2016; Zabidi & Stark, 2016).

Zabidi et al. beschreibt außerdem, dass sich *cis*-regulatorische Elemente verschiedener Gene, hinsichtlich der TF-Bindemotive unterscheiden (Zabidi et al., 2015). Dabei fällt allgemein ein Unterschied zwischen Haushaltsgenen und Entwicklungsgenen auf. TF sowie Kofaktoren weisen Präferenzen für bestimmte Promotoren auf und scheinen ein bedeutender Faktor für die Enhancer-Promotor-Spezifität zu sein (Zabidi et al., 2015).

Möglicherweise spielt auch der Unterschied von TF- und Kofaktor-Interaktion zwischen Pluripotenzgenen und Entwicklungsgenen oder aber auch individuell von spezifischen Loci, wie dem *Shh*-Locus, zu anderen Loci eine Rolle.

Die ZRS besitzt mehrere HoxD- und Ets1-Bindestellen (Lettice et al., 2014). Mutationen der ZRS in Schlangen vermindern die Bindung von HoxD und Ets1 und führen dadurch in diesen Spezies zum Verlust der Extremitäten (Kvon et al., 2016; Leal & Cohn, 2016). Auch am *Shh*-Promotor befinden sich HoxD-Bindestellen (jaspar.genereg.net).

Außerdem ist anzunehmen, dass auch die Bindung von Gli3, die Funktion der ZRS beeinflusst, da dieser TF maßgeblich die Regulation der *Shh*-Expression in der ZPA bestimmt (te Welscher, Fernandez-Teran, et al., 2002; te Welscher, Zuniga, et al., 2002).

Der *Sox2*-Enhancer hingegen ist durch eine Cluster-Bindung von Nanog und anderen Pluripotenzfaktoren gekennzeichnet (Zhou et al., 2014). Möglicherweise verhindert der Unterschied der TF-Bindestellen des *Sox2*-Enhancers im Vergleich zur ZRS die Bildung einer homotypischen Interaktion bzw. kompatiblen biochemischen Mikroumgebung und damit die Genaktivierung (Boija et al., 2018; Zabidi & Stark, 2016). Insgesamt ist jedoch die Bindung von TF am *Shh*-Promotor und der ZRS noch nicht weit genug beschrieben, sodass es schwer fällt, genauere Aussagen über dessen Interaktionen und über die biochemische Mikroumgebung zu treffen. Eine detaillierte bioinformatische Analyse der verschiedenen Sequenzen könnte möglicherweise Informationen über deren Ausstattung von TF-Bindestellen liefern und mehr Erkenntnisse liefern.

Hinzukommend ist bekannt, dass Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (FFPT) ebenfalls zur Entstehung einer bestimmten biochemischen Mikroumgebung und damit zur Interaktion von Promotor und Enhancer beiträgt (Boija et al., 2018). Die Entstehung von FFPT der regulatorischen Einheit von *Sox2* wurde bereits beschrieben (Sabari et al., 2018). Es wäre zusätzlich denkbar, dass die Etablierung einer FFPT bei der Genregulation von *Sox2* lediglich erfolgreich ist, wenn der gesamte Superenhancer zur Interaktion beitragen kann, in dieser Arbeit wurde, wegen gescheiteter Klonierung größerer Fragmente des

Superenhancers, lediglich kürzere Sequenzen (SRR107 und SRR107-109), die in einem *Luciferase*-Assay als besonders aktive CREs identifiziert wurden, verwendet (Zhou et al., 2014).

Auch bei der Interaktion zwischen ZRS und *Shh* könnte FFPT bedeutend sein. Beide CREs enthalten HoxD-Bindestellen, die präferenziell HoxD13 binden (Lettice et al., 2017). HoxD13 scheint als TF eine Rolle bei der FFPT auf Chromatinebene zu spielen (Basu et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in HoxD13 zur Störung der Phasentrennung führen können und dadurch auch zur Störung der Transkription mit Auswirkungen auf den Phänotypen (Basu et al., 2020).

Man nimmt an, dass auch das Carboxyl-Ende der RNA-Polymerase II zu FFPT beitragen kann (Boehning et al., 2018). Über die ZRS läuft die Transkription des *Lmbr1*-Gens, welches konstitutiv exprimiert wird (Paliou et al., 2019; Yue et al., 2014). Es kann also vermutet werden, dass es auch bei der ZRS zu einer FFPT kommen kann. Möglicherweise unterscheiden sich die Mechanismen der Phasentrennung der beiden Loci jedoch, sodass es nicht zu einer Übertragung des Mechanismus von einem Element auf das andere ausreicht. Das Prinzip der FFPT ist jedoch noch nicht lange erforscht und teils noch nicht gut verstanden, sodass keine sichere Annahme getroffen werden kann.

Durch Insertion des *Sox2*-Enhancers an die ZRS-Stelle und somit in das Intron des *Lmbr1*-Gens könnte es außerdem zu einer Störung der *Lmbr1*-Transkription kommen. Die Störung der Transkription von *Lmbr1* stört möglicherweise die Funktionsweise des Enhancers. Paliou et al. zeigten bereits, dass nach Deletion des *Lmbr1*-Promotor im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant geringere *Shh*-Transkription stattfindet (Paliou et al., 2019). In anderen Arbeiten wurde außerdem beschrieben, dass auch die Transkription von Enhancern bedeutend für deren Spezifität und Funktion sein kann (Henriques et al., 2018).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Interaktion zwischen Enhancer und ihren Zielpromotoren durch viele verschiedene Faktoren bestimmt wird. Die räumliche Nähe zueinander ist nur ein Aspekt unter mehreren. Vielmehr sind beispielsweise homotypischen Interaktionen von TFs, die sowohl an Promotoren als auch an Enhancern binden, sowie FFPT ebenfalls von Bedeutung. Für eine aktivierende Interaktion zwischen Teilen des in ES-Zellen aktiven *Sox2*-Superenhancers und dem *Shh*-Promotor ist die räumliche Nähe, wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht suffizient und es bleibt eine offene Frage, welche Faktoren letztlich ausschlaggebend sind.

5.1.3 Grenzen der Experimente und mögliche zukünftige Experimente

Ziel dieser Arbeit sollte sein, durch den Austausch von CREs zwei verschiedener Loci, die Spezifität zwischen Promotor und Enhancer zu untersuchen. Als Testbett für die Versuche diente der *Shh*-Locus. *Shh* ist ein Entwicklungsmorphogen, der extremitätenspezifische Enhancer ZRS liegt in ca. 900 kb weiter Distanz zum Promotor (Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2005). *Sox2* hingegen ist u.a. ein wichtiger

Pluripotenzfaktor, der durch einen Superenhancer reguliert wird (Zhou et al., 2014). Dieser Superenhancer sollte anstelle der ZRS inseriert werden, um die Interaktion in einem ektope Locus zu analysieren. Bei Durchführung der Experimente ist das Klonieren des kompletten *Sox2*-Superenhancer-Clusters (insg. 27 kb; Bereich der höchsten Aktivität 7,5 kb) jedoch gescheitert und es konnte nur der besonders aktive Enhancer SRR107 sowie einen Bereich der SCR, der SRR107 bis SRR109 einschließt, an Stelle der ZRS inseriert werden. Dadurch ist es am Ende nicht möglich gewesen, den Einfluss des gesamten Superenhancers zu analysieren und die gewonnenen Erkenntnisse sind nur auf den besonders aktiven distalen Enhancer von *Sox2* (SRR107) zu beziehen. Die Analyse der Interaktion des kompletten Superenhancer mit dem *Shh*-Promotor hätte möglicherweise andere und wahrscheinlich mehr Erkenntnisse geliefert.

Außerdem wäre eine mögliche Kontrolle gewesen, den *Sox2*-Enhancer zu deletieren und anschließend den klonierten *Sox2*-Enhancer an seine endogene Stelle zu inserieren, um zu analysieren, ob er zu einer Aktivierung von *Sox2* führen kann. Dadurch wäre die erhaltene Funktion des *Sox2*-Enhancers gesichert worden. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass in keinem der durchgeführten Experimente eine *mCherry*-Expression nachgewiesen werden konnte. Es kann folglich nicht sicher gesagt werden, ob der *Sox2*-Enhancer einen aktivierenden Zustand erreichen kann. Zur Überprüfung, ob das *mCherry* evtl. beschädigt ist, hätte das *mCherry*-Konstrukt episomal in mES-Zellen transferiert werden können. Dabei wäre es zu einer genomunabhängigen Aufnahme des *mCherry*-Plasmids in mES-Zellen gekommen und durch den zelleigenen Transkriptions- und Translationsapparat hätte das *mCherry* exprimiert werden können. Allerdings sind Experimente mit episomalen Reportergenen nicht unbedingt mit Experimenten, in denen die Reportergene ins Genom inseriert werden, gut vergleichbar (Inoue et al., 2017). Ein solches Kontrollexperiment würde lediglich Hinweise auf die erhaltene Funktion des *mCherry*s liefern und nicht auf die zu untersuchende Enhanceraktivität im analysierten Locus, da es potenzielle Repression durch genomische, epigenetische Mechanismen unbetrachtet lässt.

Durch Austausch des *Shh*-Promotors mit dem Promotor von *Sox2* in den geditierten Zellen könnte gezeigt werden, ob die Promotor-Enhancer-Spezifität von *Sox2* und SRR107 auf die endogene Lokalisation begrenzt ist oder sich auf andere Loci übertragen lässt und ob die Konstitution des *Shh*-Locus eine Interaktion von fremden Promotoren und Enhancer zulässt. In diesem hypothetischen Experiment könnte auch *GFP* als Reportergen fungieren. Ebenso interessant wäre ein Experiment in umgekehrter Reihenfolge, bei dem der *Shh*-Promotor und evtl. die ZRS an den *Sox2*-Locus und auch in andere Loci inseriert werden würde und analysiert werden könnte, ob eine Genaktivierung in einem ektope Locus ausgelöst werden kann. Die Beobachtung aus solch einem Experiment könnte Daten liefern, die zum Verständnis der Interaktion des *Shh*-Promotors mit seinem Enhancer, unabhängig der genomischen Lokalisation des Locus, beitragen könnten.

Generell ist anzumerken, dass sowohl die RT-qPCR als Expressionsanalyse von *GFP* und *mCherry* als auch die CHIP-qPCR zur Detektion der Histonmodifikationen in einfacher Ausführung durchgeführt wurden. Es wurde für jeden analysierten Genotypen (Knock-In bzw. Wildtyp) jeweils eine Zelllinie charakterisiert, dabei erfolgten die Messungen jeweils an Triplikaten. Aufgrund der geringen Fallzahl der charakterisierten Zelllinien pro Genotyp ($n = 1$) erfolgte die Analyse der Zelllinien rein deskriptiv.

An dieser Stelle kann festgehalten werden, dass das hier erzielte Ergebnis einer in mES-Zellen nicht suffizienten Interaktion zwischen *Sox2*-Enhancer und *Shh*-Promotor anhand einer Reihe weiterführender Experimente weiter analysiert werden sollte. Dadurch könnten weitere Informationen über die spezifische Interaktion der CREs erzielt werden, wie ob die Interaktion möglicherweise sequenzabhängig bzw. auf den endogenen Locus begrenzt ist.

5.2 BEDEUTUNG DER ZUR ZRS BENACHBARTEN ZRS₃₀₀

Neben der Analyse von zelltypspezifischen Histonmodifikationen, die Aufschluss über den Aktivitätszustand von Enhancern liefern, ist ein generelles Charakteristikum von Enhancern die hohe Konservierung, die häufig zwischen vielen Spezies besteht (Boffelli et al., 2004; Maeso et al., 2013). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die 720 bp *upstream* der ZRS liegende, hochkonservierte Sequenz von 300 bp (hier ZRS₃₀₀ genannt) auf potenziell differenzielle Aktivität mittels *LacZ*-Reportergergenassays *in vivo* charakterisiert werden.

Interessanterweise ist die ZRS₃₀₀ im Gegensatz zur ZRS (hier als ZRS₈₀₀ bezeichnet) bei Fischen nicht konserviert (PhyloP-Conservation, UCSC Genome Browser, Abbildung 6). Fische sind evolutionär früher als Säugetiere entstanden, folglich sind Säugetiere höher entwickelt. Es ist davon auszugehen, dass die ZRS₃₀₀ evolutionär gesehen jünger als die ZRS₈₀₀ ist und mit einer höheren Entwicklung der Spezies korreliert. In vorigen Experimenten der Arbeitsgruppe Mundlos wurde beobachtet, dass eine Insertion der ZRS anderer Spezies an die endogene Stelle im Mausgenom zu Letalität der Embryonen führt, wenn diese Insertion sowohl ZRS₈₀₀ als auch ZRS₃₀₀ beinhaltet. Bei alleiniger Insertion der ZRS₈₀₀ wurde diese Letalität nicht beobachtet. In anderen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der ZRS₃₀₀ in der Maus als Knock-Out-Experiment keine Auswirkungen auf den Phänotyp hat. Das hier erstellte *Alignment* zeigt, dass sich die ZRS₃₀₀ des Huhns am stärksten von denen der anderen Spezies (allesamt Säugetierarten) unterscheidet, was möglicherweise durch die evolutionär gesehene Entfernung des Huhns als Vogelart zu den Säugetieren erklärt werden kann. Unter den Säugetieren weicht die ZRS₃₀₀ der Maus jedoch am stärksten ab. Es fiel insbesondere ein in der Maus deletierter Bereich von 10 bp auf, der hingegen in allen anderen Spezies, ebenfalls im Huhn, konserviert ist (siehe Abbildung 27). Möglicherweise kommt es durch die Abweichung der murinen ZRS₃₀₀ bei der Maus zu einem Funktionsverlust und durch Insertion der konservierten Sequenzen der anderen Spezies könnte diese Funktion im Sinne einer *gain-of-function*-Mutation wieder zurückgewonnen werden, was letzten Endes die Letalität erklären könnte. Die Analyse des *Alignments* liefert jedoch keine direkte Information über die Funktion der ZRS₃₀₀ und hier getroffene Aussagen sind lediglich Hypothesen, die weiterführend validiert werden sollten. Um genauere Aussagen über eine potenzielle *cis*-regulatorische Funktion der ZRS₃₀₀ und dahingehende Differenzen zwischen verschiedenen Spezies zu treffen, wurden *In-vivo-LacZ*-Reportergergenassays durchgeführt.

5.2.1 ZRS₃₀₀ zeigt keine Aktivität in der ZPA

Es konnte durch die hier durchgeführten *LacZ*-Reportergergenassays gezeigt werden, dass die ZRS₃₀₀ von Huhn, Pferd und Kuh im murinen embryonalen Stadium E10.5-dpc eine spezifische Aktivität besitzt, die durchgängig axial von kranial nach kaudal verläuft (siehe **roter Pfeil** Abbildung 29). Diese Aktivität ähnelt der der SFPE₁- und SFPE₂-Enhancer (siehe Abbildung 4 in 1.3.1). Es zeigt sich eine Übereinstimmung mit

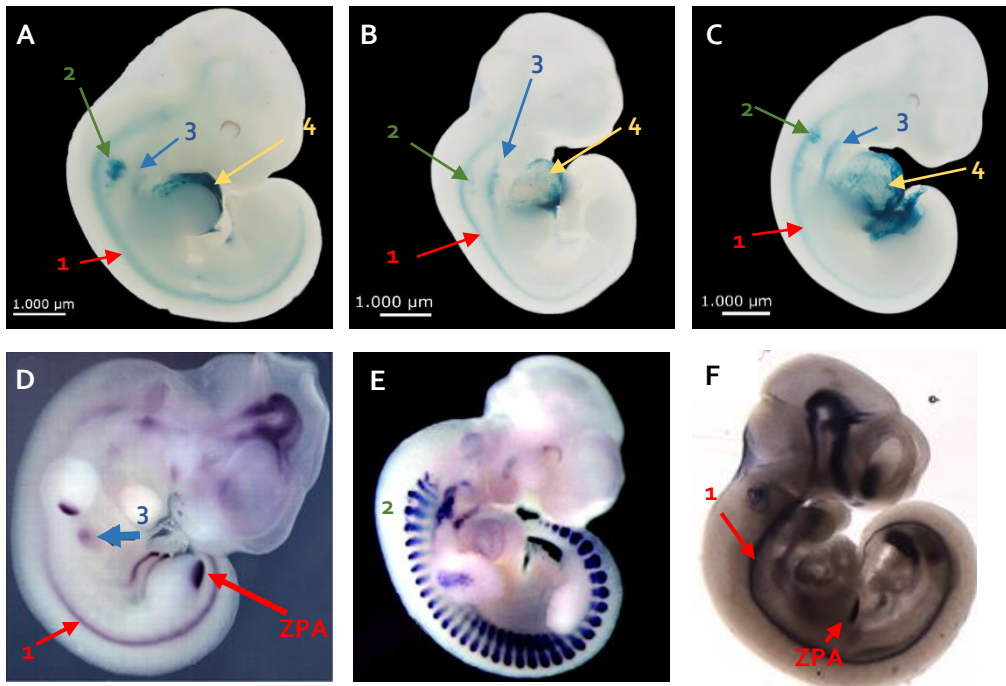
der *Shh*-Expression in der Chorda dorsalis als auch in der Bodenplatte des Neuralrohrs (Abb. 29) (Anderson et al., 2014; Epstein et al., 1999; Ericson et al., 1995).

Zusätzlich zeigten sich ventral des axialen Signals zwei weitere Signale (Abb. 29 grüner und blauer Pfeil, Abb. 29E). Abb. 29E zeigt die Färbung von Myogenin, das in Myotom-Anteil der Somiten exprimiert wird (Lee et al., 2004). Im Vergleich mit der weiter dorsal liegenden Struktur (Abb. 29 grüner Pfeil) könnte man vermuten, dass es sich auch hier um den Myotom-Anteil der ersten differenzierenden Somiten handelt. Die weiter ventral liegende Struktur (Abb. 29 blauer Pfeil) könnte ein Teil des Vorderdarm-Endoderms sein. Aus dem Vorderdarm entwickeln sich Pharynx, Larynx, Ösophagus, Magen, Duodenum, Gallengang sowie Trachea und Lunge. In der Literatur ist eine *Shh*-Expression sowie aktive Enhancer in vielen dieser Gewebe beschrieben (Anderson et al., 2014; Hoffmann et al., 2009; Sagai et al., 2009). Außerdem wurde eine essenzielle *Shh*-Expression im ersten Schlundbogen demnach im pharyngealen Endoderm beschrieben (Sagai et al., 2009; Yamagishi et al., 2006).

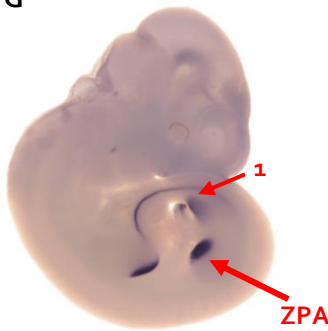
Bei allen Embryonen fand die Färbung einer ventralen Struktur statt, vermutlich handelt es sich um Reste des Amnions (Siehe Abb. 29 gelber Pfeil). Die Färbung dieser Struktur wurde auch in anderen *LacZ*-Reporterassays bei Verwendung der laborinternen C2-Zellen beschrieben und wurde daher als nicht-spezifisch interpretiert. Möglicherweise ist diese unspezifische Färbung auf eine verstärkte Aktivität des *Col1A1*-Locuses in diesem Gewebe zurückzuführen. Die anderen beschriebenen Aktivitätsmuster wurden in anderen laborinternen *LacZ*-Reporterassays mit der gleichen Zellreihe und im selbem Embryonalstadium nicht gesehen. Ein genauer Vergleich zwischen der reinen *Col1A1*-Aktivität und der Aktivität der inserierten ZRS300 könnte durch Insertion des „leeren“ *LacZ*-Plasmids (ohne ZRS300) an die selbe Stelle in den *Col1A1*-Locus in C2-Zellen erfolgen.

Rein nach topologischen Kriterien, Aussagen zum Gewebetyp zu treffen, ist schwierig. Die bloße Aufnahme und Darstellung, wie sie hier herausgearbeitet wurde, ist ungenau und liefert nur einen allgemeinen Überblick über die Aktivität des CREs. Das gefärbte Gewebe sollte durch genauere zytologische Methoden untersucht werden, um spezifischere Aussagen über Zugehörigkeit zu Organanlagen treffen zu können.

Ohne Zweifel kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass die ZRS300 der untersuchten Spezies weder in der vorderen noch in der hinteren Extremität eine Aktivität in der ZPA von murinen E10.5-dpc zeigt. Ganz im Gegensatz zur ZRS800, die ausschließlich dort und v.a. im E10.5-dpc Stadium aktiv ist (Lettice et al., 2003). Die hier beschriebene fehlende Enhanceraktivität in der Extremitätenknospe steht im Kontrast zu Beobachtungen, dass Punktmutationen der ZRS300 in Mensch bzw. Hund zu Polydaktylie führen (Park et al., 2008; Potuijt et al., 2018; Xiang et al., 2017).



G



- 1** Axiales Signal; vermutlich Chorda dorsalis oder Bodenplatte des Neuralrohrs
- 2** Vermutlich Myotom-Anteil von sich differenzierenden Somiten
- 3** Vermutlich Endoderm des Vorderdarms oder Schlundbögenanteile
- 4** Unspezifische Färbung vermutlich Amnion
- ZPA** Aktivität in den Extremitätenknospen. fehlt bei A. B und C

Abbildung 29: Vergleich der *LacZ*-Reportergenassays mit Beispielen aus der Literatur
A *LacZ*-Färbung Pferd-ZRS300 in E10.5-dpc der Maus **B** *LacZ*-Färbung Kuh- ZRS300 in E10.5-dpc der Maus **C** *LacZ*-Färbung Huhn-ZRS300 in E10.5-dpc der Maus
D *Shh*-*In-Situ*-Hybridisierung E10.5-dpc der Maus (Hoffmann et al., 2009)
E *LacZ*-Färbung von Myogenin im Myotomanteil der Somiten (Lee et al., 2004)
F *Shh* In Situ Hybridisierung E10.5-dpc der Maus (Patterson et al., 2009) mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press)
G *Shh* In Situ Hybridisierung E10.5-dpc der Maus (Alexandra Despang, unpubliziert)
 Die farbigen Pfeile zeigen Vergleiche zwischen dem *LacZ*-Reportergenassay der ZRS300 und Beispielen der Literatur.

Eventuell hat die ZRS300 verschiedene Funktionen. Einerseits könnte sie als Enhancer in den hier beschriebenen Lokalisationen agieren und andererseits, durch bisher nicht genauer definierte Mechanismen, die Enhanceraktivität der ZRS als Extremitätenenhancer unterstützen. Um diese verschiedenen Informationen zur ZRS300 genauer zu verstehen und in Konsens zueinander zu bringen, sind genauere Analysen wie bspw. eine detaillierte bioinformatische Analyse von TF-Bindemotiven v.a. auch der ZRS300 der Maus und des Menschen oder auch die Analyse der Aktivität in anderen Stadien der Embryonalentwicklung nötig. Außerdem wäre die Analyse von Unterschieden der Aktivitätsmuster der einzelnen Sequenzen (ZRS300 und ZRS800) zur Aktivität der zusammenhängenden Sequenzen als Gesamtheit interessant.

Aufgrund misslungener Morulaaggregationen war es nicht möglich, das Reportergenassay für die ZRS300 der Maus durchzuführen. Die Kontrolle zur murinen ZRS300 ist von besonderer Wichtigkeit, um einen möglichen sekundären Verlust der Aktivität zu erklären. Der Vergleich zu der ZRS300-Aktivität der anderen Spezies könnte Hinweise darauf geben, warum der Austausch der murinen ZRS mit der anderer

Spezies in vorherigen Versuchen einen letalen Verlauf nimmt, wenn das *Insert* die ZRS300 mit einschließt und warum jedoch ein ZRS300-Knock-Out in der Maus keinen phänotypischen Effekt zeigte. Möglicherweise könnte die hier beschriebene Aktivität (in mutmaßlich endodermalen Gewebe und ZNS) in der Maus variieren und mit dem letalen Phänotypen im Zusammenhang stehen.

Durch diese Arbeit konnte dennoch erstmals gezeigt werden, dass die ZRS300 keinen regulatorischen Einfluss auf die Extremitätenentwicklung hat. Die Sequenz zeigt vielmehr eine Enhanceraktivität im ZNS und in endodermalem Gewebe.

5.3 ZUSAMMENFASSUNG

Cis-regulatorische Elemente wie Promotoren und Enhancer tragen zur komplex regulierten raumzeitlichen Expression ihrer Zielgene in maßgebender Weise bei. Die Interaktion von Promotoren und Enhancer sowie die Spezifität der CREs zueinander sind bisher nur unvollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass Mutationen, die die Promotor-Enhancer-Interaktion beeinflussen, zur Entstehung von Malignomen, seltenen hereditären und auch psychiatrischen Erkrankungen beitragen können (Herz et al., 2014; Ibrahim & Mundlos, 2020; Spielmann et al., 2018; Xu et al., 2008).

Bisher wurde der räumlichen Nähe zwischen den CREs eine zentrale Bedeutung für ihre Interaktion zueinander zugeschrieben (Furlong & Levine, 2018; Mifsud et al., 2015; Tolhuis et al., 2002; van Arensbergen et al., 2014). In sogenannten TADs, dreidimensionalen Chromatineinheiten, interagieren Enhancer und Promotoren räumlich miteinander (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). So auch im *Shh*-Locus, wo u.a. die ZRS, der einzige Extremitätenenhancer von *Shh*, mit dem *Shh*-Promotor in räumliche Nähe gebracht wird, wobei eine lineare Distanz von ca. 900 kb überwunden wird (Anderson et al., 2014; Dixon et al., 2012; Paliou et al., 2019).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Promotor-Enhancer-Spezifität zwischen ZRS und *Shh*-Promotor (*pShh*) mittels eines CRISPR/Cas9-basiertem Austausch der ZRS mit einem Teil des *Sox2*-Superenhancers (SRR107) charakterisiert. Der *Shh*-codierende Bereich wurde ebenfalls mittels CRISPR/Cas9 durch *GFP* als Reporter gen ersetzt. Ob in mES-Zellen die räumliche Assoziation eines starken, in mES-Zellen aktiven Enhancers (SRR107) mit einem in mES-Zellen nicht aktiven Promotor (*pShh*) ausreichend für eine Genaktivierung ist, war dabei die zugrundeliegende Fragestellung. Anschließend konnte jedoch durch keine der durchgeführten Expressionsanalysen (Durchflusszytometrie, Immunhistochemie, RT-qPCR) eine *GFP*-Expression detektiert werden. Genauso wenig wie eine Expression von *mCherry*, das als Reporter gen für die Enhanceraktivität diente. Mittels einer anschließend durchgeführten ChIP-qPCR, zur Analyse der Histonmodifikationen an H3K27 im geneditierten *Shh*-Locus, konnte gezeigt werden, dass der komplette Locus stark H3K27-trimethyliert ist und damit in einem inaktiven Zustand liegt. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die räumliche Assoziation von Promotor und Enhancer in diesem Beispiel nicht suffizient zur Genaktivierung ist. Es müssen weitere Faktoren, wie beispielsweise Bindung homotypischer TF sowie FFPT, maßgeblich zur Genaktivierung beitragen. Die hier erzielten Ergebnisse sind lediglich auf den *Shh*-Locus und dem *Sox2*-Enhancer bezogen. In anderen Loci können die Mechanismen variieren. Interessant wären weiterführende Experimente mit anderen Promotor-Enhancer-Paaren oder in anderen genomischen Loci. Eine detaillierte bioinformatische Analyse der TF-Bindestellen in *Shh*-Promotor und *Sox2*-Enhancer würden Aufschluss über eine mögliche Kompatibilität für beispielsweise homotypische Interaktion dieser geben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine 300 bp lange, hochkonservierte, ca. 720 bp *upstream* der ZRS liegende Sequenz, die hier als ZRS₃₀₀ bezeichnet wird, auf eine potenzielle *cis*-regulatorische Funktion

hin analysiert. In früheren nicht publizierten Versuchen der Arbeitsgruppe Mundlos fiel auf, dass der Austausch der murinen ZRS300 mit der anderer Spezies letal verläuft, wobei eine Deletion dieser Sequenz in der Maus keinen phänotypischen Effekt hatte. Wir vermuteten daher, dass sich die ZRS300 der Maus von den anderer Spezies durch einen Funktionsverlust unterscheidet, und diese Funktion durch Insertion der ZRS300 anderer Spezies wieder zurückgewonnen wird, was den letalen Verlauf erklären könnte.

Zur Charakterisierung der ZRS300 verschiedener Spezies wurde zunächst ein *Alignment* dieser durchgeführt. Anschließend wurde die genregulatorische Aktivität der analysierten Sequenzen der verschiedenen Spezies funktional durch *In-vivo-LacZ*-Reporterassays validiert.

Ein *Alignment* zeigt, dass die murine ZRS300 zu der ZRS300 anderer Säugetierarten am stärksten variiert und einen deletierten Bereich von 10 bp aufweist. Zur Analyse der potenziellen *cis*-regulatorischen Aktivität der ZRS300 wurden *LacZ*-Reporterassays der ZRS300 von Pferd, Kuh und Huhn in murinen Embryonen E10.5-dpc durchgeführt. Überraschenderweise konnte in keinem der Reporterassays eine ZRS-ähnliche Aktivität der ZRS300 detektiert werden. Die ZRS300 zeigte jedoch eine Aktivität im ZNS entsprechend dem *Shh*-Expressionsmuster, sowie außerdem Aktivität in vermutlich endodermalen Gewebe. Diese Ergebnisse ergeben den Verdacht, dass die ZRS300 eine *cis*-regulatorische Funktion in den benannten Strukturen haben kann, jedoch muss diese Vermutung durch weitere Experimente validiert werden. Bedauerlicherweise konnten aufgrund fehlgeschlagener Morulaaggregationen keine transgenen Embryonen für die *LacZ*-Reporterassays der murinen ZRS300, eine wichtige Kontrolle in diesem Experiment, gewonnen werden. Demzufolge konnten keine Unterschiede der Aktivitäten zwischen den Spezies noch ein Aktivitätsverlust in der Maus final nachgewiesen werden. Dennoch zeigen die erzielten Ergebnisse, dass in die ZRS300 der hier untersuchten Spezies eine zur ZRS differierende *cis*-regulatorische Aktivität aufweist. Als Ansatzpunkt für weiterführende Experimente, können diese Daten zum Erlangen weiterer Erkenntnisse bezüglich der komplexen Genregulation von *Shh* und deren Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies dienen.

Abschließend kann hier zusammengefasst werden, dass die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse bezüglich der Funktion *cis*-regulatorischer Elemente liefert. Insbesondere sind hinsichtlich Promoter-Enhancer-Spezifität Einblicke in Bezug auf die räumliche Interaktion der CREs geschaffen worden.

Durch zahlreiche Studien wurde gezeigt, dass eine gestörte Promoter-Enhancer-Interaktionen zur Entstehung von vielen verschiedenen Erkrankungen beiträgt (Ibrahim & Mundlos, 2020; Spielmann et al., 2018). Eine wie hier erfolgte Auseinandersetzung und nähere Charakterisierung der zugrunde liegenden Mechanismen ist für ein genaueres Verständnis entscheidend und kann zukünftig auch für potenzielle (gen)therapeutische Ansätze wegweisend sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akam, M. (1995). Hox genes and the evolution of diverse body plans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 349(1329), 313-319. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0119>
- Alexander, J. M., Guan, J., Li, B., Maliskova, L., Song, M., Shen, Y., Huang, B., Lomvardas, S., & Weiner, O. D. (2019). Live-cell imaging reveals enhancer-dependent Sox2 transcription in the absence of enhancer proximity. *Elife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.41769>
- Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M., & Gerstein, M. B. (2010). Annotating non-coding regions of the genome. *Nat Rev Genet*, 11(8), 559-571. <https://doi.org/10.1038/nrg2814>
- Allard, S. T. M. (2008). Bioluminescent Reporter Genes. *Promega Corporation Web site*.
- Anderson, E., Devenney, P. S., Hill, R. E., & Lettice, L. A. (2014). Mapping the *Shh*-long-range regulatory domain. *Development*, 141(20), 3934. <https://doi.org/10.1242/dev.108480>
- Anderson, E., Peluso, S., Lettice, L. A., & Hill, R. E. (2012). Human limb abnormalities caused by disruption of hedgehog signaling. *Trends Genet*, 28(8), 364-373. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.012>
- Andersson, R. (2015). Promoter or enhancer, what's the difference? Deconstruction of established distinctions and presentation of a unifying model. *BioEssays*, 37(3), 314-323. <https://doi.org/10.1002/bies.201400162>
- Andrey, G., & Spielmann, M. (2017). CRISPR/Cas9 Genome Editing in Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 1468, 221-234. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4035-6_15
- Artus, J., & Hadjantonakis, A. K. (2011). Generation of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Methods Mol Biol*, 693, 37-56. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-974-1_3
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17(1), 126-140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Basu, S., Mackowiak, S. D., Niskanen, H., Knezevic, D., Asimi, V., Grosswendt, S., Geertsema, H., Ali, S., Jerković, I., Ewers, H., Mundlos, S., Meissner, A., Ibrahim, D. M., & Hnisz, D. (2020). Unblending of Transcriptional Condensates in Human Repeat Expansion Disease. *Cell*, 181(5), 1062-1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.018>
- Beard, C., Hochedlinger, K., Plath, K., Wutz, A., & Jaenisch, R. (2006). Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis*, 44(1), 23-28. <https://doi.org/10.1002/gene.20180>
- Benabdallah, N. S., Gautier, P., Hekimoglu-Balkan, B., Lettice, L. A., Bhatia, S., & Bickmore, W. A. (2016). SBE6: a novel long-range enhancer involved in driving sonic hedgehog expression in neural progenitor cells. *Open Biol*, 6(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.160197>
- Boehning, M., Dugast-Darzacq, C., Rankovic, M., Hansen, A. S., Yu, T., Marie-Nelly, H., McSwiggen, D. T., Kovic, G., Dailey, G. M., Cramer, P., Darzacq, X., & Zweckstetter, M. (2018). RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(9), 833-840. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0112-y>
- Boffelli, D., Nobrega, M. A., & Rubin, E. M. (2004). Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nat Rev Genet*, 5(6), 456-465. <https://doi.org/10.1038/nrg1350>
- Boija, A., Klein, I. A., Sabari, B. R., Dall'Agnesse, A., Coffey, E. L., Zamudio, A. V., Li, C. H., Shrinivas, K., Manteiga, J. C., Hannett, N. M., Abraham, B. J., Afeyan, L. K., Guo, Y. E., Rimel, J. K., Fant, C. B., Schuijers, J., Lee, T. I., Taatjes, D. J., & Young, R. A. (2018). Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell*, 175(7), 1842-1855. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.042>
- Bowman, G. D., & Poirier, M. G. (2015). Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. *Chemical Reviews*, 115(6), 2274-2295. <https://doi.org/10.1021/cr500350x>
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005).

- Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 122(6), 947-956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441(7091), 349-353. <https://doi.org/10.1038/nature04733>
- Buecker, C., & Wysocka, J. (2012). Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends Genet*, 28(6), 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.02.008>
- Bulger, M., & Groudine, M. (2011). Functional and Mechanistic Diversity of Distal Transcription Enhancers. *Cell*, 144(3), 327-339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.024>
- Byrne, S. M., & Church, G. M. (2015). Crispr-mediated Gene Targeting of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 35(Suppl 35), 5a.8.1-5a.8.22. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sco5a08s35>
- Capellini, T. D., Di Giacomo, G., Salsi, V., Brendolan, A., Ferretti, E., Srivastava, D., Zappavigna, V., & Selleri, L. (2006). Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development*, 133(11), 2263-2273. <https://doi.org/10.1242/dev.02395>
- Catarino, R., & Stark, A. (2018). Assessing sufficiency and necessity of enhancer activities for gene expression and the mechanisms of transcription activation. *Genes & Development*, 32, 202-223. <https://doi.org/10.1101/gad.310367.117>
- Chambers, I., & Tomlinson, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development (Cambridge, England)*, 136(14), 2311-2322. <https://doi.org/10.1242/dev.024398>
- Chen, H., Levo, M., Barinov, L., Fujioka, M., Jaynes, J. B., & Gregor, T. (2018). Dynamic interplay between enhancer-promoter topology and gene activity. *Nature Genetics*, 50(9), 1296-1303. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0175-z>
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., Wong, E., Orlov, Y. L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y.-H., Yeo, H. C., Yeo, Z. X., Narang, V., Govindarajan, K. R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W.-K., Clarke, N. D., Wei, C.-L., & Ng, H.-H. (2008). Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 133(6), 1106-1117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.043>
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M. P., Simandl, B. K., Li, Y., Beachy, P. A., & Fallon, J. F. (2001). Manifestation of the limb prepatterning: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol*, 236(2), 421-435. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0346>
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., & Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599), 407-413. <https://doi.org/10.1038/383407a0>
- Chiocchetti, A., Tolosano, E., Hirsch, E., Silengo, L., & Altruda, F. (1997). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*, 1352(2), 193-202. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(97\)00010-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(97)00010-9)
- Colasante, G., Lignani, G., Brusco, S., Di Bernardino, C., Carpenter, J., Giannelli, S., Valassina, N., Bido, S., Ricci, R., Castoldi, V., Marenga, S., Church, T., Massimino, L., Morabito, G., Benfenati, F., Schorge, S., Leocani, L., Kullmann, D. M., & Broccoli, V. (2020). dCas9-Based Scn1a Gene Activation Restores Inhibitory Interneuron Excitability and Attenuates Seizures in Dravet Syndrome Mice. *Mol Ther*, 28(1), 235-253. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.018>
- Consortium, E. P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Consortium, I. H. G. S. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Core, L. J., & Lis, J. T. (2009). Paused Pol II captures enhancer activity and acts as a potent insulator. *Genes & Development*, 23(14), 1606-1612. <https://doi.org/10.1101/gad.1827709>
- Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Frampton, G. M., Sharp, P. A., Boyer, L. A., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences, 107(50), 21931-21936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>
- Cruz-Molina, S., Respuela, P., Tebartz, C., Kolovos, P., Nikolic, M., Fueyo, R., van Ijcken, W. F. J., Grosveld, F., Frommolt, P., Bazzi, H., & Rada-Iglesias, A. (2017). PRC2 Facilitates the Regulatory Topology Required for Poised Enhancer Function during Pluripotent Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*, 20(5), 689-705.e689. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.004>
- Davies, J. O., Oudelaar, A. M., Higgs, D. R., & Hughes, J. R. (2017). How best to identify chromosomal interactions: a comparison of approaches. *Nat Methods*, 14(2), 125-134. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4146>
- de Laat, W., & Duboule, D. (2013). Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. *Nature*, 502(7472), 499-506. <https://doi.org/10.1038/nature12753>
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., & Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science*, 295(5558), 1306-1311. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
- Deng, W., Lee, J., Wang, H., Miller, J., Reik, A., Gregory, P. D., Dean, A., & Blobel, G. A. (2012). Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell*, 149(6), 1233-1244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.051>
- Deng, W., Rupon, J. W., Krivega, I., Breda, L., Motta, I., Jahn, K. S., Reik, A., Gregory, P. D., Rivella, S., Dean, A., & Blobel, G. A. (2014). Reactivation of developmentally silenced globin genes by forced chromatin looping. *Cell*, 158(4), 849-860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.050>
- Despang, A. (2021). *The Role of Topologically Associating Domains for Developmental Gene Regulation - A Systematic Functional Analysis at the Sox9 and Shh Loci* [Freie Universität Berlin]. Berlin.
- Despang, A., Schöpflin, R., Franke, M., Ali, S., Jerković, I., Paliou, C., Chan, W.-L., Timmermann, B., Wittler, L., Vingron, M., Mundlos, S., & Ibrahim, D. M. (2019). Functional dissection of the Sox9-Kcnj2 locus identifies nonessential and instructive roles of TAD architecture. *Nature Genetics*, 51(8), 1263-1271. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0466-z>
- Di Croce, L., & Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 20(10), 1147-1155. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2669>
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Eickbush, T. H., & Moudrianakis, E. N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*, 17(23), 4955-4964. <https://doi.org/10.1021/bio0616a016>
- Epstein, D. J., McMahon, A. P., & Joyner, A. L. (1999). Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development*, 126(2), 281-292.
- Ericson, J., Muhr, J., Jessell, T. M., & Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *Int J Dev Biol*, 39(5), 809-816.
- Feinberg, R. S. (2006). Ethical Issues in Gene Therapy Research: An American Perspective. In J. Niewöhner & C. Tannert (Eds.), *Gene Therapy* (pp. 99-107). Elsevier Science B.V. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044452806-3/50010-X>
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S., & Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805-3819. <https://doi.org/10.1242/dev.01204>
- Fleischmann, G., Müller, T., Blasczyk, R., Sasaki, E., & Horn, P. A. (2009). Growth characteristics of the nonhuman primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment. *Cloning Stem Cells*, 11(2), 225-233. <https://doi.org/10.1089/clo.2008.0064>
- Fortes, P. a. R., N. . (Updated 2009). In Vivo Evaluation of Regulatory Sequences by Analysis of Luciferase Expression. *Promega Corporation Web site*.

- Franke, M., Ibrahim, D. M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., Schöpflin, R., Kraft, K., Kempfer, R., Jerković, I., Chan, W.-L., Spielmann, M., Timmermann, B., Wittler, L., Kurth, I., Cambiaso, P., Zuffardi, O., Houge, G., Lambie, L., Brancati, F., Pombo, A., Vingron, M., Spitz, F., & Mundlos, S. (2016). Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature*, *538*(7624), 265-269. <https://doi.org/10.1038/nature19800>
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., & Mirny, L. A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell reports*, *15*(9), 2038-2049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>
- Fukaya, T., Lim, B., & Levine, M. (2016). Enhancer Control of Transcriptional Bursting. *Cell*, *166*(2), 358-368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.025>
- Furlong, E. E. M., & Levine, M. (2018). Developmental enhancers and chromosome topology. *Science*, *361*(6409), 1341-1345. <https://doi.org/10.1126/science.aau0320>
- Galli, A., Robay, D., Osterwalder, M., Bao, X., Bénazet, J.-D., Tariq, M., Paro, R., Mackem, S., & Zeller, R. (2010). Distinct Roles of Hand2 in Initiating Polarity and Posterior Shh Expression during the Onset of Mouse Limb Bud Development. *PLOS Genetics*, *6*(4), e1000901. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000901>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(39), E2579. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Ghavi-Helm, Y., Jankowski, A., Meiers, S., Viales, R. R., Korbel, J. O., & Furlong, E. E. M. (2019). Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nature Genetics*, *51*(8), 1272-1282. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0462-3>
- Ghavi-Helm, Y., Klein, F. A., Pakozdi, T., Ciglar, L., Noordermeer, D., Huber, W., & Furlong, E. E. (2014). Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase. *Nature*, *512*(7512), 96-100. <https://doi.org/10.1038/nature13417>
- Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., Stender, J. D., Chun, H. B., Garner, H., Geissmann, F., & Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*, *159*(6), 1327-1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>
- Green, M. R. S. J. S. J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Greer III, L. F., & Szalay, A. A. (2002). Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*, *17*(1), 43-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bio.676>
- Gu, B., Swigut, T., Spencley, A., Bauer, M. R., Chung, M., Meyer, T., & Wysocka, J. (2018). Transcription-coupled changes in nuclear mobility of mammalian cis-regulatory elements. *Science (New York, N. Y.)*, *359*(6379), 1050-1055. <https://doi.org/10.1126/science.aao3136>
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *19*(10), 621-637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(2), 465-503. <https://doi.org/10.1128/mmlr.62.2.465-503.1998>
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., & Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*, *118*(4), 517-528. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.024>
- Heintzman, N. D., Hon, G. C., Hawkins, R. D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., Ye, Z., Lee, L. K., Stuart, R. K., Ching, C. W., Ching, K. A., Antosiewicz-Bourget, J. E., Liu, H., Zhang, X., Green, R. D., Lobanenkov, V. V., Stewart, R., Thomson, J. A., Crawford, G. E., Kellis, M., & Ren, B. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, *459*(7243), 108-112. <https://doi.org/10.1038/nature07829>
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., & Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, *39*(3), 311-318. <https://doi.org/10.1038/ng1966>

- Henriques, T., Scruggs, B. S., Inouye, M. O., Muse, G. W., Williams, L. H., Burkholder, A. B., Lavender, C. A., Fargo, D. C., & Adelman, K. (2018). Widespread transcriptional pausing and elongation control at enhancers. *Genes Dev*, *32*(1), 26-41. <https://doi.org/10.1101/gad.309351.117>
- Herz, H.-M., Hu, D., & Shilatifard, A. (2014). Enhancer malfunction in cancer. *Molecular Cell*, *53*(6), 859-866. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.033>
- Hill, R. E., & Lettice, L. A. (2016). 15 - Limb Development. In R. Baldock, J. Bard, D. R. Davidson, & G. Morriss-Kay (Eds.), *Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement* (pp. 193-205). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800043-4.00015-4>
- Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A., & Young, R. A. (2013). Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, *155*(4), 934-947. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>
- Hnisz, D., Schuijers, J., Lin, C. Y., Weintraub, A. S., Abraham, B. J., Lee, T. I., Bradner, J. E., & Young, R. A. (2015). Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers. *Mol Cell*, *58*(2), 362-370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.014>
- Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K., & Sharp, P. A. (2017). A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell*, *169*(1), 13-23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.007>
- Hoffmann, A. D., Peterson, M. A., Friedland-Little, J. M., Anderson, S. A., & Moskowitz, I. P. (2009). sonic hedgehog is required in pulmonary endoderm for atrial septation. *Development*, *136*(10), 1761. <https://doi.org/10.1242/dev.034157>
- Hunt, S. (2008). Controversies in treatment approaches: Gene therapy, IVF, stem cells, and pharmacogenomics. *Nature Education*, *1*(1).
- Ianakev, P., van Baren, M. J., Daly, M. J., Toledo, S. P. A., Cavalcanti, M. G., Neto, J. C., Silveira, E. L., Freire-Maia, A., Heutink, P., Kilpatrick, M. W., & Tsiouras, P. (2001). Acheiropodia Is Caused by a Genomic Deletion in *C7orf2*, the Human Orthologue of the *Lmbr1* Gene. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(1), 38-45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/316955>
- Ibrahim, D. M., & Mundlos, S. (2020). Three-dimensional chromatin in disease: What holds us together and what drives us apart? *Current Opinion in Cell Biology*, *64*, 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.003>
- Imhof, A., & Becker, P. B. (2001). Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"? *Mol Biotechnol*, *17*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1385/mb:17:1:01>
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, *15*(23), 3059-3087. <https://doi.org/10.1101/gad.938601>
- Inoue, F., Kircher, M., Martin, B., Cooper, G. M., Witten, D. M., McManus, M. T., Ahituv, N., & Shendure, J. (2017). A systematic comparison reveals substantial differences in chromosomal versus episomal encoding of enhancer activity. *Genome Res*, *27*(1), 38-52. <https://doi.org/10.1101/gr.212092.116>
- International Human Genome Sequencing, C. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, *431*(7011), 931-945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Jeong, Y., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., & Epstein, D. J. (2006). A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development*, *133*(4), 761. <https://doi.org/10.1242/dev.02239>
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J., & Young, R. A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, *467*(7314), 430-435. <https://doi.org/10.1038/nature09380>
- Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J., & Mongan, N. P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev*, *18*(7), 1093-1108. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0113>
- Khan, A., Mathelier, A., & Zhang, X. (2018). Super-enhancers are transcriptionally more active and cell type-specific than stretch enhancers. *Epigenetics*, *13*(9), 910-922. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1514231>

- King, N. M., & Perrin, J. (2014). Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem cell research & therapy*, 5(4), 85-85. <https://doi.org/10.1186/scrt474>
- Klopocki, E., & Mundlos, S. (2011). Copy-Number Variations, Noncoding Sequences, and Human Phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12(1), 53-72. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082410-101404>
- Komitova, M., & Eriksson, P. S. (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, 369(1), 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.07.035>
- Kothary, R., Clapoff, S., Darling, S., Perry, M. D., Moran, L. A., & Rossant, J. (1989). Inducible expression of an hsp68-lacZ hybrid gene in transgenic mice. *Development*, 105(4), 707-714.
- Kraft, K., Geuer, S., Will, A. J., Chan, W. L., Paliou, C., Borschiwer, M., Harabula, I., Wittler, L., Franke, M., Ibrahim, D. M., Kragestein, B. K., Spielmann, M., Mundlos, S., Lupiáñez, D. G., & Andrey, G. (2015). Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of Structural Variants using CRISPR/Cas in Mice. *Cell reports*, 10(5), 833-839. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.016>
- Krijger, P. H. L., & de Laat, W. (2016). Regulation of disease-associated gene expression in the 3D genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(12), 771-782. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.138>
- Kvon, E. Z. (2015). Using transgenic reporter assays to functionally characterize enhancers in animals. *Genomics*, 106(3), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.06.007>
- Kvon, E. Z., Kamneva, O. K., Melo, U. S., Barozzi, I., Osterwalder, M., Mannion, B. J., Tissières, V., Pickle, C. S., Plajzer-Frick, I., Lee, E. A., Kato, M., Garvin, T. H., Akiyama, J. A., Afzal, V., Lopez-Rios, J., Rubin, E. M., Dickel, D. E., Pennacchio, L. A., & Visel, A. (2016). Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell*, 167(3), 633-642.e611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.028>
- Kvon, E. Z., Waymack, R., Gad, M., & Wunderlich, Z. (2021). Enhancer redundancy in development and disease. *Nature Reviews Genetics*, 22(5), 324-336. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00311-x>
- Kyrchanova, O., & Georgiev, P. (2021). Mechanisms of Enhancer-Promoter Interactions in Higher Eukaryotes. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 671. <https://doi.org/10.3390/ijms22020671>
- Lafage-Proust, M. (2015). *Physiology of Bone Development*.
- Leal, F., & Cohn, M. J. (2016). Loss and Re-emergence of Legs in Snakes by Modular Evolution of Sonic hedgehog and HOXD Enhancers. *Curr Biol*, 26(21), 2966-2973. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.020>
- Lee, C. T., Li, L., Takamoto, N., Martin, J. F., DeMayo, F. J., Tsai, M.-J., & Tsai, S. Y. (2004). The Nuclear Orphan Receptor COUP-TFII Is Required for Limb and Skeletal Muscle Development. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10835-10843. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.24.10835-10843.2004>
- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K.-i., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolsheimer, E., Hannett, N. M., Sun, K., Odom, D. T., Otte, A. P., Volkert, T. L., Bartel, D. P., Melton, D. A., Gifford, D. K., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2006). Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 125(2), 301-313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.043>
- Lee, T. I., Johnstone, S. E., & Young, R. A. (2006). Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nat Protoc*, 1(2), 729-748. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.98>
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, 34, 77-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.77>
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6), 1237-1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.014>
- Lenhard, B., Sandelin, A., & Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*, 13(4), 233-245. <https://doi.org/10.1038/nrg3163>
- Lettice, L. A., Devenney, P., De Angelis, C., & Hill, R. E. (2017). The Conserved Sonic Hedgehog Limb Enhancer Consists of Discrete Functional Elements that Regulate Precise Spatial Expression. *Cell reports*, 20(6), 1396-1408. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.037>

- Lettice, L. A., Heaney, S. J. H., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., & de Graaff, E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human Molecular Genetics*, *12*(14), 1725-1735. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg180>
- Lettice, L. A., Williamson, I., Devenney, P. S., Kilanowski, F., Dorin, J., & Hill, R. E. (2014). Development of five digits is controlled by a bipartite long-range cis-regulator. *Development*, *141*(8), 1715. <https://doi.org/10.1242/dev.095430>
- Lettice, Laura A., Williamson, I., Wiltshire, John H., Peluso, S., Devenney, Paul S., Hill, Alison E., Essafi, A., Hagman, J., Mort, R., Grimes, G., DeAngelis, Carlo L., & Hill, Robert E. (2012). Opposing Functions of the ETS Factor Family Define Shh Spatial Expression in Limb Buds and Underlie Polydactyly. *Developmental Cell*, *22*(2), 459-467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.010>
- Li, S., Chen, L.-x., Peng, X.-h., Wang, C., Qin, B.-y., Tan, D., Han, C.-x., Yang, H., Ren, X.-n., Liu, F., Xu, C.-h., & Zhou, X.-h. (2018). Overview of the reporter genes and reporter mouse models. *Animal Models and Experimental Medicine*, *1*(1), 29-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ame2.12008>
- Li, Y., Rivera, C. M., Ishii, H., Jin, F., Selvaraj, S., Lee, A. Y., Dixon, J. R., & Ren, B. (2014). CRISPR Reveals a Distal Super-Enhancer Required for Sox2 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE*, *9*(12), e114485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114485>
- Liao, H. K., Hatanaka, F., Araoka, T., Reddy, P., Wu, M. Z., Sui, Y., Yamauchi, T., Sakurai, M., O'Keefe, D. D., Núñez-Delicado, E., Guillen, P., Campistol, J. M., Wu, C. J., Lu, L. F., Esteban, C. R., & Izpisua Belmonte, J. C. (2017). In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell*, *171*(7), 1495-1507.e1415. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.025>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loh, Kyle M., & Lim, B. (2011). A Precarious Balance: Pluripotency Factors as Lineage Specifiers. *Cell Stem Cell*, *8*(4), 363-369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.013>
- Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D. J., Mendelsohn, M., Kirkland, J., & Axel, R. (2006). Interchromosomal Interactions and Olfactory Receptor Choice. *Cell*, *126*(2), 403-413. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.035>
- Long, H. K., Osterwalder, M., Welsh, I. C., Hansen, K., Davies, J. O. J., Liu, Y. E., Koska, M., Adams, A. T., Aho, R., Arora, N., Ikeda, K., Williams, R. M., Sauka-Spengler, T., Porteus, M. H., Mohun, T., Dickel, D. E., Swigut, T., Hughes, J. R., Higgs, D. R., Visel, A., Selleri, L., & Wysocka, J. (2020). Loss of Extreme Long-Range Enhancers in Human Neural Crest Drives a Craniofacial Disorder. *Cell Stem Cell*, *27*(5), 765-783.e714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.001>
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M., & Joyner, A. L. (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*, *382*(6589), 360-363. <https://doi.org/10.1038/382360a0>
- Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., Spielmann, M., Visel, A., & Mundlos, S. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, *161*(5), 1012-1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>
- Lupiáñez, D. G., Spielmann, M., & Mundlos, S. (2016). Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. *Trends in Genetics*, *32*(4), 225-237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.01.003>
- Maeso, I., Irimia, M., Tena, J. J., Casares, F., & Gómez-Skarmeta, J. L. (2013). Deep conservation of cis-regulatory elements in metazoans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *368*(1632), 20130020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0020>
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, *469*(7330), 343-349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., & Martin, G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*, *453*(7193), 401-405. <https://doi.org/10.1038/nature06876>

- Martinez-Ara, M., Comoglio, F., van Arensbergen, J., & van Steensel, B. (2021). Systematic analysis of intrinsic enhancer-promoter compatibility in the mouse genome. *bioRxiv*, 2021.2010.2021.465269. <https://doi.org/10.1101/2021.10.21.465269>
- Matharu, N., & Ahituv, N. (2020). Modulating gene regulation to treat genetic disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(11), 757-775. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0083-7>
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H., Colman, A., Schnieke, A. E., & Kind, A. J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405(6790), 1066-1069. <https://doi.org/10.1038/35016604>
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M. E., Martinez-A, C., Ros, M. A., & Torres, M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development*, 127(18), 3961. <http://dev.biologists.org/content/127/18/3961.abstract>
- Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. N., Sugar, R., Schoenfelder, S., Ferreira, L., Wingett, S. W., Andrews, S., Grey, W., Ewels, P. A., Herman, B., Happe, S., Higgs, A., LeProust, E., Follows, G. A., Fraser, P., Luscombe, N. M., & Osborne, C. S. (2015). Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C. *Nature Genetics*, 47(6), 598-606. <https://doi.org/10.1038/ng.3286>
- Montavon, T., & Duboule, D. (2012). Landscapes and archipelagos: spatial organization of gene regulation in vertebrates. *Trends in Cell Biology*, 22(7), 347-354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.003>
- Morey, L., Pascual, G., Cozzuto, L., Roma, G., Wutz, A., Benitah, S. A., & Di Croce, L. (2012). Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10(1), 47-62. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.006>
- Muerdter, F., & Stark, A. (2016). Gene Regulation: Activation through Space. *Curr Biol*, 26(19), R895-r898. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.031>
- Nagy, A., Góczy, E., Diaz, E. M., Prideaux, V. R., Iványi, E., Markkula, M., & Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110(3), 815-821. <https://doi.org/10.1242/dev.110.3.815>
- Nickol, J. M., & Felsenfeld, G. (1988). Bidirectional control of the chicken beta- and epsilon-globin genes by a shared enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(8), 2548-2552. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2548>
- Noonan, J. P., & McCallion, A. S. (2010). Genomics of Long-Range Regulatory Elements. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 11(1), 1-23. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141651>
- Nora, E. P., Goloborodko, A., Valton, A. L., Gibcus, J. H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L. A., & Bruneau, B. G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell*, 169(5), 930-944.e922. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.004>
- Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N. L., Meisig, J., Sedat, J., Gribnau, J., Barillot, E., Blüthgen, N., Dekker, J., & Heard, E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 485(7398), 381-385. <https://doi.org/10.1038/nature11049>
- Nuebler, J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Abdennur, N., & Mirny, L. A. (2018). Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(29), E6697-e6706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717730115>
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., & Noji, S. (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, 124(11), 2235. <http://dev.biologists.org/content/124/11/2235.abstract>
- Ong, C.-T., & Corces, V. G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 12(4), 283-293. <https://doi.org/10.1038/nrg2957>

- Osterwalder, M., Barozzi, I., Tissières, V., Fukuda-Yuzawa, Y., Mannion, B. J., Afzal, S. Y., Lee, E. A., Zhu, Y., Plajzer-Frick, I., Pickle, C. S., Kato, M., Garvin, T. H., Pham, Q. T., Harrington, A. N., Akiyama, J. A., Afzal, V., Lopez-Rios, J., Dickel, D. E., Visel, A., & Pennacchio, L. A. (2018). Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. *Nature*, *554*(7691), 239-243. <https://doi.org/10.1038/nature25461>
- Osterwalder, M., Speziale, D., Shoukry, M., Mohan, R., Ivanek, R., Kohler, M., Beisel, C., Wen, X., Scales, S. J., Christoffels, V. M., Visel, A., Lopez-Rios, J., & Zeller, R. (2014). HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Dev Cell*, *31*(3), 345-357. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.018>
- Paliou, C. (2019). *The role of chromatin architecture in regulating Shh gene during mouse limb development* [Humboldt-Universität zu Berlin].
- Paliou, C., Guckelberger, P., Schöpflin, R., Heinrich, V., Esposito, A., Chiariello, A. M., Bianco, S., Annunziatella, C., Helmuth, J., Haas, S., Jerković, I., Brieske, N., Wittler, L., Timmermann, B., Nicodemi, M., Vingron, M., Mundlos, S., & Andrey, G. (2019). Prefomed chromatin topology assists transcriptional robustness of *Shh* during limb development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(25), 12390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900672116>
- Panigrahi, A., & O'Malley, B. W. (2021). Mechanisms of enhancer action: the known and the unknown. *Genome Biol*, *22*(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02322-1>
- Park, K., Kang, J., Subedi, K. P., Ha, J.-H., & Park, C. (2008). Canine Polydactyl Mutations With Heterogeneous Origin in the Conserved Intronic Sequence of LMBR1. *Genetics*, *179*(4), 2163-2172. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.087114>
- Patterson, V. L., Damrau, C., Paudyal, A., Reeve, B., Grimes, D. T., Stewart, M. E., Williams, D. J., Siggers, P., Greenfield, A., & Murdoch, J. N. (2009). Mouse hitchhiker mutants have spina bifida, dorso-ventral patterning defects and polydactyly: identification of *Tulp3* as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway. *Human Molecular Genetics*, *18*(10), 1719-1739. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp075>
- Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet*, *6*(12), 893-904. <https://doi.org/10.1038/nrg1726>
- Pennacchio, L. A., Ahituv, N., Moses, A. M., Prabhakar, S., Nobrega, M. A., Shoukry, M., Minovitsky, S., Dubchak, I., Holt, A., Lewis, K. D., Plajzer-Frick, I., Akiyama, J., De Val, S., Afzal, V., Black, B. L., Couronne, O., Eisen, M. B., Visel, A., & Rubin, E. M. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature*, *444*(7118), 499-502. <https://doi.org/10.1038/nature05295>
- Petit, F., Sears, K. E., & Ahituv, N. (2017). Limb development: a paradigm of gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, *18*(4), 245-258. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.167>
- Placzek, M. (1995). The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Current Opinion in Genetics & Development*, *5*(4), 499-506. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)90055-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)90055-L)
- Plys, A. J., & Kingston, R. E. (2018). Dynamic condensates activate transcription. *Science*, *361*(6400), 329-330. <https://doi.org/10.1126/science.aau4795>
- Pombo, A., & Dillon, N. (2015). Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(4), 245-257. <https://doi.org/10.1038/nrm3965>
- Pott, S., & Lieb, J. D. (2015). What are super-enhancers? *Nature Genetics*, *47*(1), 8-12. <https://doi.org/10.1038/ng.3167>
- Potuijt, J. W. P., Baas, M., Sukenik-Halevy, R., Douben, H., Nguyen, P., Venter, D. J., Gallagher, R., Swagemakers, S. M., Hovius, S. E. R., van Nieuwenhoven, C. A., Galjaard, R. H., van der Spek, P. J., Ahituv, N., & de Klein, A. (2018). A point mutation in the pre-ZRS disrupts sonic hedgehog expression in the limb bud and results in triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *Genet Med*, *20*(11), 1405-1413. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.18>
- Rabino, I. (2003). Gene Therapy: Ethical Issues. *Theoretical Medicine and Bioethics*, *24*(1), 31-58. <https://doi.org/10.1023/A:1022967623162>
- Rao, S. S. P., Huang, S. C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J. M., Perez, E. M., Kieffer-Kwon, K. R., Sanborn, A. L., Johnstone, S. E., Bascom, G. D., Bochkov, I. D., Huang, X., Shamim, M. S., Shin, J., Turner,

- D., Ye, Z., Omer, A. D., Robinson, J. T., Schlick, T., Bernstein, B. E., Casellas, R., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2017). Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell*, *171*(2), 305-320.e324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.026>
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M., & Tabin, C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT6a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, *83*(4), 631-640. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90103-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90103-5)
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, *75*(7), 1401-1416. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2)
- Robson, M. I., Ringel, A. R., & Mundlos, S. (2019). Regulatory Landscaping: How Enhancer-Promoter Communication Is Sculpted in 3D. *Mol Cell*, *74*(6), 1110-1122. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.032>
- Ruf, S., Symmons, O., Uslu, V. V., Dolle, D., Hot, C., Ettwiller, L., & Spitz, F. (2011). Large-scale analysis of the regulatory architecture of the mouse genome with a transposon-associated sensor. *Nat Genet*, *43*(4), 379-386. <https://doi.org/10.1038/ng.790>
- Sabari, B. R., Dall'Agnesse, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Hannett, N. M., Zamudio, A. V., Manteiga, J. C., Li, C. H., Guo, Y. E., Day, D. S., Schuijers, J., Vasile, E., Malik, S., Hnisz, D., Lee, T. I., Cisse, I. I., Roeder, R. G., Sharp, P. A., Chakraborty, A. K., & Young, R. A. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science (New York, N.Y.)*, *361*(6400). <https://doi.org/10.1126/science.aar3958>
- Sadelain, M., Papapetrou, E. P., & Bushman, F. D. (2012). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nature Reviews Cancer*, *12*(1), 51-58. <https://doi.org/10.1038/nrc3179>
- Sagai, T., Amano, T., Maeno, A., Ajima, R., & Shiroishi, T. (2019). SHH signaling mediated by a prechordal and brain enhancer controls forebrain organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(47), 23636-23642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901732116>
- Sagai, T., Amano, T., Tamura, M., Mizushina, Y., Sumiyama, K., & Shiroishi, T. (2009). A cluster of three long-range enhancers directs regional *Shh* expression in the epithelial linings. *Development*, *136*(10), 1665-1674. <https://doi.org/10.1242/dev.032714>
- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushina, Y., Tamura, M., & Shiroishi, T. (2005). Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific *Shh*-expression and truncation of the mouse limb. *Development*, *132*(4), 797. <https://doi.org/10.1242/dev.01613>
- Sagai, T., Masuya, H., Tamura, M., Shimizu, K., Yada, Y., Wakana, S., Gondo, Y., Noda, T., & Shiroishi, T. (2004). Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (*Shh*). *Mamm Genome*, *15*(1), 23-34. <https://doi.org/10.1007/s00335-033-2317-5>
- Sanborn Adrian, L., Rao Suhas, S. P., Huang, S.-C., Durand Neva, C., Huntley Miriam, H., Jewett Andrew, I., Bochkov Ivan, D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., Geeting Kristopher, P., Gnirke, A., Melnikov, A., McKenna, D., Stamenova Elena, K., Lander Eric, S., & Aiden Erez, L. (2015). Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(47), E6456-E6465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>
- Sanyal, A., Lajoie, B. R., Jain, G., & Dekker, J. (2012). The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature*, *489*(7414), 109-113. <https://doi.org/10.1038/nature11279>
- Schoenfelder, S., & Fraser, P. (2019). Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, *20*(8), 437-455. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0128-0>
- Spielmann, M., Lupiáñez, D. G., & Mundlos, S. (2018). Structural variation in the 3D genome. *Nature Reviews Genetics*, *19*(7), 453-467. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0007-0>
- Spitz, F., & Furlong, E. E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet*, *13*(9), 613-626. <https://doi.org/10.1038/nrg3207>
- Suganuma, T., & Workman, J. L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem*, *80*, 473-499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-175347>
- Suryamohan, K., & Halfon, M. S. (2015). Identifying transcriptional cis-regulatory modules in animal genomes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, *4*(2), 59-84. <https://doi.org/10.1002/wdev.168>

- Symmons, O., Pan, L., Remeseiro, S., Aktas, T., Klein, F., Huber, W., & Spitz, F. (2016). The Shh Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances. *Developmental Cell*, 39(5), 529-543. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.015>
- Symmons, O., Uslu, V. V., Tsujimura, T., Ruf, S., Nassari, S., Schwarzer, W., Ettwiller, L., & Spitz, F. (2014). Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains. *Genome Res*, 24(3), 390-400. <https://doi.org/10.1101/gr.163519.113>
- Tarchini, B., & Duboule, D. (2006). Control of Hoxd genes' collinearity during early limb development. *Dev Cell*, 10(1), 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.11.014>
- te Welscher, P., Fernandez-Teran, M., Ros, M. A., & Zeller, R. (2002). Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev*, 16(4), 421-426. <https://doi.org/10.1101/gad.219202>
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H. J., Meijlink, F., & Zeller, R. (2002). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science*, 298(5594), 827-830. <https://doi.org/10.1126/science.1075620>
- Tickle, C. (2015). How the embryo makes a limb: determination, polarity and identity. *Journal of Anatomy*, 227(4), 418-430. <https://doi.org/10.1111/joa.12361>
- Tolhuis, B., Palstra, R.-J., Splinter, E., Grosveld, F., & de Laat, W. (2002). Looping and Interaction between Hypersensitive Sites in the Active β -globin Locus. *Molecular Cell*, 10(6), 1453-1465. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00781-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00781-5)
- Tourmente, S., Chapel, S., Dreau, D., Drake, M. E., Bruhat, A., Couderc, J. L., & Dastugue, B. (1993). Enhancer and silencer elements within the first intron mediate the transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in Drosophila Kc cells. *Insect Biochem Mol Biol*, 23(1), 137-143. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90092-7](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90092-7)
- Tsukiji, N., Amano, T., & Shiroishi, T. (2014). A novel regulatory element for Shh expression in the lung and gut of mouse embryos. *Mechanisms of Development*, 131, 127-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.09.003>
- Ushiki, A., Zhang, Y., Xiong, C., Zhao, J., Georgakopoulos-Soares, I., Kane, L., Jamieson, K., Bamshad, M. J., Nickerson, D. A., Shen, Y., Lettice, L. A., Silveira-Lucas, E. L., Petit, F., & Ahituv, N. (2021). Deletion of CTCF sites in the SHH locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia. *Nat Commun*, 12(1), 2282. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>
- van Arensbergen, J., van Steensel, B., & Bussemaker, H. J. (2014). In search of the determinants of enhancer-promoter interaction specificity. *Trends in Cell Biology*, 24(11), 695-702. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.07.004>
- Vasudevan, D., Chua, E. Y. D., & Davey, C. A. (2010). Crystal Structures of Nucleosome Core Particles Containing the '601' Strong Positioning Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 403(1), 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.039>
- Vavouri, T., & Lehner, B. (2009). Conserved noncoding elements and the evolution of animal body plans [<https://doi.org/10.1002/bies.200900014>]. *BioEssays*, 31(7), 727-735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bies.200900014>
- Vernimmen, D., & Bickmore, W. A. (2015). The Hierarchy of Transcriptional Activation: From Enhancer to Promoter. *Trends in Genetics*, 31(12), 696-708. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.004>
- Wang, B., Fallon, J. F., & Beachy, P. A. (2000). Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/Posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. *Cell*, 100(4), 423-434. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80678-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80678-9)
- Wang, X., Cairns, M. J., & Yan, J. (2019). Super-enhancers in transcriptional regulation and genome organization. *Nucleic Acids Research*, 47(22), 11481-11496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1038>
- Wang, Z.-X., Kueh, J. L. L., Teh, C. H.-L., Rossbach, M., Lim, L., Li, P., Wong, K.-Y., Lufkin, T., Robson, P., & Stanton, L. W. (2007). Zfp206 Is a Transcription Factor That Controls Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 25(9), 2173-2182. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0085>
- Weischenfeldt, J., Dubash, T., Drinas, A. P., Mardin, B. R., Chen, Y., Stütz, A. M., Waszak, S. M., Bosco, G., Halvorsen, A. R., Raeder, B., Efthymiopoulos, T., Erkek, S., Siegl, C., Brenner, H., Brustugun, O. T.,

- Dieter, S. M., Northcott, P. A., Petersen, I., Pfister, S. M., Schneider, M., Solberg, S. K., Thunissen, E., Weichert, W., Zichner, T., Thomas, R., Peifer, M., Helland, A., Ball, C. R., Jechlinger, M., Sotillo, R., Glimm, H., & Korbel, J. O. (2017). Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates *IRS4* and *IGF2* in enhancer hijacking. *Nature Genetics*, 49(1), 65-74. <https://doi.org/10.1038/ng.3722>
- Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 153(2), 307-319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
- Wieczorek, D., Pawlik, B., Li, Y., Akarsu, N. A., Caliebe, A., May, K. J., Schweiger, B., Vargas, F. R., Balci, S., Gillissen-Kaesbach, G., & Wollnik, B. (2010). A specific mutation in the distant sonic hedgehog (SHH) cis-regulator (ZRS) causes Werner mesomelic syndrome (WMS) while complete ZRS duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (PPD) with or without triphalangeal thumb. *Hum Mutat*, 31(1), 81-89. <https://doi.org/10.1002/humu.21142>
- Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.11.001>
- Williamson, I., Kane, L., Devenney, P. S., Flyamer, I. M., Anderson, E., Kilanowski, F., Hill, R. E., Bickmore, W. A., & Lettice, L. A. (2019). Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations. *Development*, 146(19), dev179523. <https://doi.org/10.1242/dev.179523>
- Williamson, I., Lettice, L. A., Hill, R. E., & Bickmore, W. A. (2016). *Shh* and ZRS enhancer colocalisation is specific to the zone of polarising activity. *Development*, 143(16), 2994. <https://doi.org/10.1242/dev.139188>
- Wu, R. S., Panusz, H. T., Hatch, C. L., & Bonner, W. M. (1986). Histones and their modifications. *CRC Crit Rev Biochem*, 20(2), 201-263. <https://doi.org/10.3109/10409238609083735>
- Xiang, Y., Jiang, L., Wang, B., Xu, Y., Cai, H., & Fu, Q. (2017). Mutational screening of *GLI3*, *SHH*, *preZRS*, and *ZRS* in 102 Chinese children with nonsyndromic polydactyly. *Dev Dyn*, 246(5), 392-402. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24488>
- Xu, B., Roos, J. L., Levy, S., van Rensburg, E. J., Gogos, J. A., & Karayiorgou, M. (2008). Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet*, 40(7), 880-885. <https://doi.org/10.1038/ng.162>
- Yamagishi, C., Yamagishi, H., Maeda, J., Tsuchihashi, T., Ivey, K., Hu, T., & Srivastava, D. (2006). Sonic Hedgehog Is Essential for First Pharyngeal Arch Development. *Pediatric Research*, 59(3), 349-354. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000199911.17287.3e>
- Yao, Y., Minor, P. J., Zhao, Y.-T., Jeong, Y., Pani, A. M., King, A. N., Symmons, O., Gan, L., Cardoso, W. V., Spitz, F., Lowe, C. J., & Epstein, D. J. (2016). Cis-regulatory architecture of a brain signaling center predates the origin of chordates. *Nature Genetics*, 48(5), 575-580. <https://doi.org/10.1038/ng.3542>
- Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B. D., Shen, Y., Pervouchine, D. D., Djebali, S., Thurman, R. E., Kaul, R., Rynes, E., Kirilusha, A., Marinov, G. K., Williams, B. A., Trout, D., Amrhein, H., Fisher-Aylor, K., Antoshechkin, I., DeSalvo, G., See, L. H., Fastuca, M., Drenkow, J., Zaleski, C., Dobin, A., Prieto, P., Lagarde, J., Bussotti, G., Tanzer, A., Denas, O., Li, K., Bender, M. A., Zhang, M., Byron, R., Groudine, M. T., McCleary, D., Pham, L., Ye, Z., Kuan, S., Edsall, L., Wu, Y. C., Rasmussen, M. D., Bansal, M. S., Kellis, M., Keller, C. A., Morrissey, C. S., Mishra, T., Jain, D., Dogan, N., Harris, R. S., Cayting, P., Kawli, T., Boyle, A. P., Euskirchen, G., Kundaje, A., Lin, S., Lin, Y., Jansen, C., Malladi, V. S., Cline, M. S., Erickson, D. T., Kirkup, V. M., Learned, K., Sloan, C. A., Rosenbloom, K. R., Lacerda de Sousa, B., Beal, K., Pignatelli, M., Flicek, P., Lian, J., Kahveci, T., Lee, D., Kent, W. J., Ramalho Santos, M., Herrero, J., Notredame, C., Johnson, A., Vong, S., Lee, K., Bates, D., Neri, F., Diegel, M., Canfield, T., Sabo, P. J., Wilken, M. S., Reh, T. A., Giste, E., Shafer, A., Kutayin, T., Haugen, E., Dunn, D., Reynolds, A. P., Neph, S., Humbert, R., Hansen, R. S., De Bruijn, M., Selleri, L., Rudensky, A., Josefowicz, S., Samstein, R., Eichler, E. E., Orkin, S. H., Levasseur, D., Papayannopoulou, T., Chang, K. H., Skoultschi, A., Gosh, S., Disteche, C., Treuting, P., Wang, Y., Weiss, M. J., Blobel, G. A., Cao, X., Zhong, S., Wang, T., Good, P. J., Lowdon, R. F., Adams, L. B., Zhou, X. Q., Pazin, M. J., Feingold, E. A., Wold, B., Taylor, J., Mortazavi, A., Weissman, S. M., Stamatoyannopoulos, J. A., Snyder, M. P., Guigo, R., Gingeras, T. R., Gilbert, D. M., Hardison, R. C., Beer, M. A., & Ren, B. (2014). A

- comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*, 515(7527), 355-364. <https://doi.org/10.1038/nature13992>
- Zabidi, M. A., Arnold, C. D., Scherhuber, K., Pagani, M., Rath, M., Frank, O., & Stark, A. (2015). Enhancer-core-promoter specificity separates developmental and housekeeping gene regulation. *Nature*, 518(7540), 556-559. <https://doi.org/10.1038/nature13994>
- Zabidi, M. A., & Stark, A. (2016). Regulatory Enhancer-Core-Promoter Communication via Transcription Factors and Cofactors. *Trends Genet*, 32(12), 801-814. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.10.003>
- Zeller, R., López-Ríos, J., & Zuniga, A. (2009). Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 10(12), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nrg2681>
- Zhang, F., & Lupski, J. R. (2015). Non-coding genetic variants in human disease. *Human Molecular Genetics*, 24(R1), R102-R110. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv259>
- Zhang, X., Ibrahim, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., & Ornitz, D. M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, 281(23), 15694-15700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601252200>
- Zhou, H. Y., Katsman, Y., Dhaliwal, N. K., Davidson, S., Macpherson, N. N., Sakthidevi, M., Collura, F., & Mitchell, J. A. (2014). A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential. *Genes & Development*, 28(24), 2699-2711. <https://doi.org/10.1101/gad.248526.114>
- Zhou, Q., Liu, M., Xia, X., Gong, T., Feng, J., Liu, W., Liu, Y., Zhen, B., Wang, Y., Ding, C., & Qin, J. (2017). A mouse tissue transcription factor atlas. *Nature Communications*, 8(1), 15089. <https://doi.org/10.1038/ncomms15089>
- Zhu, Y., Sun, L., Chen, Z., Whitaker, J. W., Wang, T., & Wang, W. (2013). Predicting enhancer transcription and activity from chromatin modifications. *Nucleic Acids Research*, 41(22), 10032-10043. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt826>
- Zuin, J., Roth, G., Zhan, Y., Cramard, J., Redolfi, J., Piskadlo, E., Mach, P., Kryzhanovska, M., Tihanyi, G., Kohler, H., Meister, P., Smallwood, S., & Giorgetti, L. (2021). Nonlinear control of transcription through enhancer-promoter interactions. *bioRxiv*, 2021.2004.2022.440891. <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440891>

7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Cinzia Elena Giuliana Tarallo, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung von Promotor-Enhancer-Spezifität mittels CRISPR/Casg-basiertem Austausch *cis*-regulatorischer Elemente“ (engl. Characterisation of promoter-enhancer specificity via CRISPR/Casg-based exchange of *cis*-regulatory elements) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Stefan Mundlos für die Möglichkeit, in seiner herausragenden Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Daniel Ibrahim bedanken. Danke Daniel für dein Vertrauen in meine Person und in mein Können, für deinen Optimismus und vor allem auch für deine Ausdauer. Dass meine kleine Hausarbeit bei dir über die Mendel'schen Regeln diese Arbeit ins Rollen bringt, hätte ich 2018 niemals zu träumen gewagt!

Liebe Alex (Dr. Alexandra Despang), ohne dich hätte ich mich wahrscheinlich nicht gewagt diese Arbeit anzugehen oder sie wäre vielleicht niemals fertig geworden. Ich wünsche jeder/m Promovierenden jemanden wie dich an der Seite. Danke für deine Mühe und für deinen Einsatz und dass du mir immer wirklich jede Frage beantwortest hast. Du bist eine tolle Frau und die beste Lehrerin, die ich je hatte. In meiner Zeit im Labor hast du mich jeden Tag aufs Neue inspiriert und motiviert und ich hoffe, dass du noch ganz viele anderen Menschen so bereichern wirst wie mich und dass Karma dir genauso viel Gutes wieder zurück bringt.

Der gesamten Arbeitsgruppe Mundlos mit ihrer wertvollen Atmosphäre möchte ich unbedingt auch meinen Dank aussprechen. Die Zeit bei euch war großartig und bleibt mir in wundervoller Erinnerung. Danke Ute, Asita und Norbert für eure unermüdliche Hilfsbereitschaft und eure Antworten auf meine vielen Fragen.

Mama, Papa, Tizi, Giuli, meine Ningios und Linus: Danke für euren Halt, das schöne Leben, das ihr mir bereitet und dass ihr immer für mich da und stolz auf mich seid. Ihr macht mich glücklich und die Welt für mich zu einem schöneren und besseren Ort.

10. BESCHEINIGUNG STATISTIK



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Tarallo, Cinzia
Emailadresse: cinzia.tarallo@charite.de
Matrikelnummer: 221905
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Stefan Mundlos
Promotionsinstitution / Klinik: Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Cinzia Tarallo innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei Janine Wiebach und mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 22.02.2022 (Janine Wiebach)
- Termin 2: 26.07.2022 (Kerstin Rubarth)

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Reine Deskription der Daten.
- Keine statistischen Signifikanztests möglich aufgrund von geringer Fallzahl, Replikate erhöhen die Fallzahl nicht.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 26.07.2022

Name des Beraters\ der Beraterin: Kerstin Rubarth

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

