

Streifen im Genom

Umlagerungen von DNA-Abschnitten im Genom können dazu führen, dass Gene zur falschen Zeit oder am falschen Ort aktiviert werden. Dadurch können Fehlbildungen oder Krankheiten entstehen. Forschende des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik in Berlin haben die Auswirkungen von genomischen Umlagerungen auf die 3D-Struktur der DNA untersucht. In der Zeitschrift Nature Cell Biology beschreiben sie, dass Inversionen zwischen genarmen und weniger strukturierten genreichen Regionen zur Ausbildung von speziellen genomischen Strukturen, sogenannten architektonischen Streifen führen können. Diese korrelieren mit der Position von aktiven Enhancern und sind für die Genregulation von Bedeutung.

Dreidimensionale Struktur der DNA als Regulator der Genaktivität

Jede Zelle eines Organismus enthält die gesamte DNA. Aber ein Daumen sieht anders aus als ein Zeigefinger; eine Hand sieht anders aus als ein Fuß. Woher also weiß eine Zelle, wann im Laufe der Embryonalentwicklung sie wachsen und welches Gewebe sie entwickeln soll? Entscheidend dafür ist die Aktivität ihrer Gene, die über viele verschiedene Mechanismen und auf verschiedenen Ebenen gesteuert wird. Schon lange bekannt sind bestimmte Sequenzabschnitte mit regulatorischen Funktionen innerhalb der DNA, wie zum Beispiel Enhancer oder Promoter. Sie binden im Allgemeinen andere Moleküle (Transkriptionsfaktoren), die für das Ablesen der Gene erforderlich sind. Daneben spielt die dreidimensionale Struktur der DNA eine wichtige Rolle. Bereits recht gut untersuchte Strukturen sind die sogenannten TADs (vom Englischen „topologically associated domains“). Diese „Schlaufen“ im Genom können ein oder wenige Gene und deren regulatorische Elemente (Enhancer, Promoter) enthalten. TADs sind räumlich klar definiert, ihre Grenzen legen fest, welche Gene durch die enthaltenen Enhancer beeinflusst werden können, und welche nicht. Für ihre Entstehung fädelt sich der DNA-Strang schlaufenförmig durch ringförmige Proteinkomplexe (Kohäsin) und gleitet bis zu den sogenannten CTCF-Elementen durch den Ring hindurch. Hier wird die Bewegung gestoppt, wodurch die CTCF-Elemente die Grenzen der TADs darstellen. Aber die Grenzen gelten nur in eine Richtung. Kommt das Kohäsin von der entgegengesetzten Seite oder wird das CTCF umgedreht, gleitet der Ring darüber hinweg und die Stoppfunktion entfällt an dieser Stelle.

Aufbau des Epha4-Locus

„Aber nicht alle Abschnitte im Genom sind klar in TADs unterteilt“, erklärt Stefan Mundlos, Leiter der Forschungsgruppe Entwicklung & Krankheit am Berliner Max-Planck-Institut für molekulare Genetik. „Neben den TADs finden wir auch Abschnitte im Genom, in denen zahlreiche Gene dicht beieinander liegen, ohne dass die DNA hier definierte 3D-Strukturen ausbildet, wie wir sie von den TADs kennen.“ Mundlos ist Humangenetiker. Er interessiert sich vor allem dafür, wie unterschiedliche Veränderungen im Genom angeborene Fehlbildungen oder Erkrankungen wie Krebs verursachen können. In den letzten Jahren hat er sich die Ausbildung der TADs untersucht, um herauszufinden, welche Folgen es haben kann, wenn die definierten Grenzen beispielsweise durch angeborene Mutationen verschoben werden. Jetzt hat sich sein Team gemeinsam mit den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern der Abteilung Bioinformatik mit dem Epha4-Locus beschäftigt. Dies ist eine Region im Genom, die zahlreiche unterschiedliche Entwicklungsgene

enthält. Bei der Untersuchung der dreidimensionalen Struktur dieser Region konnten die Forscherinnen und Forscher zeigen, dass sich drei Gene (*Epha4*, *Pax3*, *Pinc*) in klar definierten TADs befinden. Zwischen den *Epha4*- und *Pinc*-TADs liegt jedoch ein längerer DNA-Abschnitt mit zahlreichen weiteren Genen, der keine klare Struktur aufweist.

Inversion von Genabschnitten verändert Zeitpunkt der Genexpression

Die Forscherinnen und Forscher wollten wissen, welche funktionellen Auswirkungen genomische Veränderungen in diesem Bereich haben. Dafür wurden vier unterschiedlich lange Abschnitte aus der DNA herausgeschnitten und an der gleichen Stelle, aber in umgekehrter Richtung wieder eingesetzt (invertiert). Die Inversionen begannen alle an der gleichen Stelle bei einem Enhancer innerhalb der *Epha4*-TAD, der große Bedeutung für die Entwicklung der Gliedmaßen hat und umfassten das CTCF-Element an diesem Ende der TAD. Sie endeten jeweils unterschiedlich vor vier verschiedenen Genen innerhalb der genreichen Region. Das Team konzentrierte sich auf das Entwicklungsgeschehen am Tag 11,5 der Entwicklung von Mäusen. Im unveränderten Embryo ist zu diesem Zeitpunkt das *Epha4*-Gen aktiv, während die übrigen vier untersuchten Gene inaktiv sind. In Mausembryonen mit den veränderten Genomabschnitten konnten die Forscherinnen und Forscher jedoch zeigen, dass in dem veränderten Bereich bereits am Tag 11,5 die Gene aktiviert wurden, die durch die Inversion in die Nähe des *Epha4*-Enhancers gebracht worden waren. Bei den Inversionen 1 und 2 entwickelten die Mäuse darüber hinaus eine sogenannte Polydaktylie, das heißt, sie bekamen mehr als fünf Zehen an den Gliedmaßen. „Wir vermuten, dass dafür die Aktivierung des *Ihh*-Gens verantwortlich ist, welches mit zu den Genen gehört, die durch die Inversion in die Nähe des Enhancers gelangt sind“, erklärt Mundlos. „*Ihh* ist von großer Bedeutung für die Entstehung der Gliedmaßen, seine Aktivierung erfolgt aber normalerweise erst später im Entwicklungsgeschehen. Wird es vor dem Tag 12,5 aktiviert, kann es zur Ausbildung überzähliger Finger bzw. Zehen führen.“

Quantifikation von Kontaktpunkten innerhalb der DNA

Besonders interessierten sich die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler jedoch dafür, welche Elemente der DNA mit welchen anderen Bereichen interagieren. Dafür untersuchten sie die DNA der veränderten Mausembryonen im Bereich der wachsenden Extremitäten (Extremitätenknospen) mit der sogenannten HiC-Methode. Mit dieser Methode kann die räumliche Nähe von DNA-Fragmenten in ihrer 3D-Struktur im Zellkern bestimmt werden kann – unabhängig davon, wie weit die Fragmente auf dem langgestreckten DNA-Strang auseinander liegen. Die grafische Darstellung der Kontaktpunkte erfolgt über Heat Maps (siehe Abbildung), dabei wird die Intensität beziehungsweise Anzahl der Kontakte in einer roten Farbskala angegeben. So entstehen HiC-Karten des Genoms, die die Wechselwirkungen innerhalb einzelner Abschnitte des Genoms quantitativ wiedergeben. TADs erscheinen in dieser Darstellung genomweit und auch bei unterschiedlichen Tierarten und Zelltypen als Dreiecke. „Im Bereich der Bruchpunkte der DNA zeigte sich eine asymmetrische Verteilung der DNA-Kontakte“, erklärt Verena Heinrich, die die bioinformatischen Analysen durchgeführt hat. „Sie begann bei den umgedrehten CTCF-Elementen und erstreckte sich über eine bestimmte Strecke im Genom.“

Ausbildung architektonischer Streifen

Solche Elemente wurden bereits von anderen Gruppen gefunden und als architektonische Streifen (stripes) beschrieben. Das Team konnte zeigen, dass die unter den Streifen liegenden Gene im Vergleich mit nicht veränderten Mäusen aktiviert bzw. hochreguliert waren, was unter anderem durch die Ausbildung der überzähligen Finger zum Ausdruck kam. Wurden die CTCF-Elemente an dieser Stelle jedoch aus dem Genom entfernt, gingen auch die Streifen verloren. „Wir gehen davon aus, dass sich die dreidimensionale Anordnung der DNA in diesem Bereich durch die Entfernung der CTCF-Anker so verändert, dass bestimmte Kontakte, beispielsweise zwischen Enhancer und Gen, in

diesem Bereich nicht mehr zustande kommen. Dadurch sinkt auch die Aktivität der betreffenden Gene. Interessanterweise führt das Entfernen der CTCF-Bindungsstelle in den genetisch veränderten Mäusen wieder zu einer normalen Entwicklung der Finger ohne Polydaktylie“, sagt Mundlos.

Um herauszufinden, ob architektonische Streifen auch im normalen Entwicklungsgeschehen vorkommen, untersuchten die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler Hi-C-Daten des gesamten Genoms mit eigens dafür entwickelten bioinformatischen Methoden. Sie konnten diese Strukturen auch in nicht genetisch veränderten Bereichen des Genoms nachweisen. Insbesondere in der Nähe der Anker wurden dabei vermehrt aktive Enhancer unter den architektonischen Streifen gefunden wurden. „Unsere Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass das Genom nicht nur aus den klar definierten TADs besteht, sondern dass insbesondere im Verlauf der Embryonalentwicklung auch weniger strukturierte Bereiche auftreten, die als architektonische Streifen nachgewiesen werden können“, erklärt Mundlos. „Die Streifen korrelieren mit der Position von aktiven Enhancern. Wir gehen davon aus, dass ihre Ausbildung für die Regulation bestimmter Gene von Bedeutung ist. Außerdem können Veränderungen der DNA, wie beispielsweise Inversionen, dazu führen, dass Gene zur falschen Zeit oder am falschen Ort im Organismus aktiviert werden, wodurch verschiedene Krankheiten oder Fehlbildungen entstehen können.“

Originalpublikation:

Katerina Kraft*, Andreas Magg*, Verena Heinrich*, Christina Riemenschneider, Robert Schöpflin, Julia Markowski, Daniel M. Ibrahim, Rocío Acuna-Hidalgo, Alexandra Despang, Guillaume Andrey, Lars Wittler, Bernd Timmermann, Martin Vingron & Stefan Mundlos.

*equal contribution

Serial genomic inversions induce tissue-specific architectural stripes, gene misexpression and congenital malformations.

Nature Cell Biology 2019 Feb 11. [Epub ahead of print]

<https://doi.org/10.1038/s41556-019-0273-x>