

Reprogrammierung von 5-methyl- Cytosin in Säugetieren

Dissertation

zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich- Technischen Fakultät III Chemie,
Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der Universität des
Saarlandes

Vorgelegt von

Diplom Biologin Sabine Reither

Saarbrücken 2010

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichtersteller:

.....

.....

Vorsitz:

Akad. Mitarbeiter:

Danksagung

Herrn Professor Dr. Jörn Walter danke ich für die Bereitstellung des Themas, und für seine Geduld und Kompetenz, mit der er mich betreut und unterstützt hat.

Herrn Professor Peter Lipp danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Professor Zang und Frau Dr. Oehl-Jaschkowitz, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Eben so der Familie Seewald, dafür dass sie es immer wieder ermöglicht gemacht haben Blut und Hautproben der gesamten Familie zu analysieren. Ohne ihr Vertrauen und ihre Zusammenarbeit wäre ein wichtiger Teil meiner Arbeit nicht möglich gewesen.

Professor Albert Jeltsch möchte ich meinen Dank für die regen Diskussionen und vielen Anregungen und sein über meine Diplomarbeit hinausgehendes Interesse an meiner Arbeit aussprechen.

Ich möchte allen meinen Arbeitskollegen ganz herzlich für das sehr gute und Klima in dieser Arbeitsgruppe und vor allem für ihren langen Atem, den sie in vielen Diskussionen mit mir bewiesen haben, danken. Kostya möchte ich für die vielen Stunden danken, die er Zellen präparierend und sortieren mit mir und für mich im Keller verbracht hat. Ganz speziell möchte ich an dieser Stelle Corry und Katrin danken, die über die vier Jahre meine Freunde geworden sind und die mich in schwierigen Zeiten immer wieder aufgerichtet haben.

Meinen Eltern und meinen Schwiegereltern möchte ich für die intensive Unterstützung und Begleitung durch die Zeit meiner Doktorarbeit danken.

Ein ganz spezieller Dank gebührt meinem Ehemann Gregor Reither, ohne den ich nicht die wäre, die ich heute bin.

Zusammenfassung

Die Methylierung von DNA spielt in vielen essentiellen Prozessen, so auch in der Entwicklung eines Lebewesens, eine entscheidende Rolle. Sie wird zumindest nach der Befruchtung und während der Entwicklung der Keimzellen schnell, effizient und replikationsunabhängig reprogrammiert. Ich konnte einen Versuchsansatz entwickeln, mit dessen Hilfe man den biochemischen Mechanismus, und die an diesem Prozess beteiligten Komponenten studieren kann.

Außerdem war ich in der Lage zu zeigen, dass die Erhaltung der Methylierung von drei verschiedenen repetitiven DNA-Elementen des Mausgenoms während der Entwicklung der Keimzellen unterschiedlich effizient ist. Dazu habe ich ein Modell entworfen, das zeigt, wie der Histonkode im Zusammenspiel mit den Methyltransferasen zu dem jeweiligen Verlust oder Erhalt der Methylierung in diesen Regionen beitragen kann.

Die Untersuchung einer Familie mit männlichen monozygoten Zwillingen, diskordant für BWS, ergab, dass eine Hypomethylierung im IC2 der BWS Region nicht exklusiv bei weiblichen monozygoten Zwillingen, die diesen Phänotyp zeigen, auftritt. In diesem Zusammenhang konnte ich feststellen, dass in dem Promotorbereich des humanen Lit1 Gens des gesunden Zwillings zwei CpGs in den unmethylierten Klonen methyliert sind. Dies ist ein Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus dieser Region. Zudem habe ich ein Ungleichgewicht in der Expression von Igf2 und CDKN1C detektiert, was evtl. mit dem Auftreten von BWS in Zusammenhang steht.

Summery

In mammals methylation is an important developmental modification of DNA. During development this modification has to be reprogrammed in a fast, efficient and replication independent manner. To date it is not known how this is facilitated especially in a genome wide range after fertilization or during PGC development. In my thesis I was able to develop a suitable assay to study the basic biochemistry of this process and its participating compounds.

In addition I studied the maintenance of methylation in repetitive elements in the mouse genome during PGC development and designed a model how PGCs keep or lose their methylation in these regions.

A thorough analysis of a family with male monozygotic twins discordant for BWS revealed that aberrant methylation of IC2 is not exclusive for female monozygotic twins who are discordant for BWS. In addition I found two distinct CpGs in the promoter region of Lit1 which showed methylation on the unmethylated sequences especially in the healthy twin of a male monozygotic twin pair discordant for BWS, which might be correlated with allelic repression in this IC. At the end I was able to show, that an imbalance of the expression between Igf2 and Cdkn1C might be a cause for BWS.

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
bp	Basenpaare
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde(n)
LB	Luria-Bertani
me	methyliert
MZZ	Monozygote Zwillinge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
STE	NaCl/Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> (Enzymaktivität)
Vol.	Volumenteile
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

IV

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	EPIGENETIK	1
1.2	DNA METHYLIERUNG	2
1.3	CHROMATIN MODIFIKATIONEN	4
1.4	GENOMISCHE PRÄGUNG	5
1.5	GENOMISCHE PRÄGUNG UND METHYLIERUNG: EIN LEBENSLAUF	8
1.6	ENTWICKLUNG VON KEIMZELLEN IN DER MAUS	10
1.7	BECKWITH-WIEDEMANN-SYNDROM (BWS)	13
1.8	MOLEKULARGENETISCHER HINTERGRUND VON BWS	13
1.8.1	DIE BECKWITH- WIEDEMANN-SYNDROM REGION- ORGANISATION UND REGULATION	14
1.8.2	WIE KOMMT ES ZU BWS?	15
1.9	HUMANE EMBRYOGENESE UND ENTSTEHUNG VON ZWILLINGEN	18
1.10	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	23
2.1	PATIENTEN	23
2.2	MAUSSTÄMME	23
2.3	BAKTERIENSTÄMME	23
2.4	PLASMIDE	24
2.5	OLIGONUKLEOTIDE	24
2.5.1	OLIGONUKLEOTIDE FÜR BISULFIT PCRS	24
2.5.2	OLIGONUKLEOTIDE FÜR EXPRESSIONSANALYSEN UND SOUTHERN BLOT SONDEN	25
2.5.3	OLIGONUKLEOTIDE, DIE FÜR DIE SIRPH-ANALYSEN VERWENDET WURDEN	26
2.5.4	SUBSTRAT OLIGONUKLEOTIDE	26
2.5.5	WEITERE VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	26
2.6	PUFFER UND LÖSUNGEN	27
2.7	REAKTIONSKITS	28
2.8	ISOLIEREN VON GENOMISCHER DNA	28
2.9	FÄLLEN VON DNA	28
2.10	ISOLIEREN VON CHROMATIN AUS MÄUSELEBERN	29

2.11	BISULFIT MUTAGENESE	29
2.11.1	BISULFIT MUTAGENESE ISOLIERTER GENOMISCHER DNA.....	30
2.11.2	BISULFITMUTAGENESE VON WENIGER ALS 200 NG DNA	31
2.11.3	BISULFIT MUTAGENESE VON BIS ZU 100 ISOLIERTEN ZELLEN	31
2.11.4	ANALYSEN VON BISULFIT SEQUENZEN.....	32
2.12	PCR	33
2.13	SOUTHERN BLOT	33
2.14	AUSWERTUNG VON SOUTHERN BLOT ANALYSEN	34
2.15	SIRPH	34
2.16	FIBROBLASTEN ZELLKULTUR	36
2.17	RNA PRÄPARATION AUS FIBROBLASTEN ZELLKULTUR	36
2.18	RT-REAKTION	36
2.19	QUANTITATIVE PCR	37
2.20	AUSWERTUNG DER AMPLIFIKATIONSKURVEN DER QUANTITATIVEN ECHTZEIT-PCR	37
2.21	ANALYSE DER C_T-WERTE	39
2.22	PRÄPARATION VON PGC BZW. GONADEN ANLAGEN	40
2.23	IMMUNOLOGISCHE FÄRBUNGEN	41
2.24	PRÄPARATION VON EXTRAKTEN AUS DOTTERSÄCKEN	43
2.25	PRÄPARATION VON EXTRAKTEN AUS GONADENANLAGEN	44
2.26	NACHWEIS VON DNA DEMETHYLIERUNG MIT HILFE DER BISULFITMUTAGENESE	44
2.27	RADIOAKTIVES DETEKTIONSVERFAHREN ZUR ANALYSE VON DNA-DEMETHYLIERUNG	45
2.28	METHYLIERUNG DES DEMETHYLIERUNGSSUBSTRATS MIT H3 AdoMet	47
3	<u>ERGEBNISSE</u>	48
3.1	BIOCHEMISCHE NACHWEISMETHODEN VON DNA-DEMETHYLIERUNG	48
3.1.1	AUF BISULFIT BASIERENDE VERSUCHSANSÄTZE	49
3.1.2	RADIOAKTIVE DETEKTION VON DNA-DEMETHYLIERUNG	53
3.2	REPROGRAMMIERUNG IN PRIMORDIALEN KEIMZELLEN	57
3.2.1	VERGLEICHENDE ANALYSEN VON HISTONMODIFIKATIONEN UND DNA METHYLIERUNG WÄHREND DER ENTWICKLUNG VON KEIMZELLEN IN DER MAUS	57
3.2.2	UNTERSUCHUNG DER DNA METYLIERUNG VON REPETITIVEN ELEMENTEN WÄHREND DER KEIMZELLENTWICKLUNG IN DER MAUS	63
3.2.3	METHYLIERUNGSANALYSE EINES ELTERLICH GEPRÄGTEN GENS DER MAUS WÄHREND DER KEIMZELLENTWICKLUNG.....	71
3.3	PATIENTENANALYSE AN EINER FAMILIE MIT MZZ, DIE DISKORDANT FÜR BWS SIND	73

3.3.1	ANALYSE DES GESAMT METHYLIERUNGSSTATUS DER IMPRINTING CENTER I UND II DER BWS REGION.....	74
3.3.1.1	Lit1 (IC2).....	74
3.3.1.2	H19 (IC1).....	78
3.3.2	ANALYSE VON METHYLIERUNGSMUSTERN IN LIT1.....	80
3.3.2.1	Auszählung der analysierten Sequenzen.....	81
3.3.2.2	Untersuchung auf mosaikale Methylierung der Promotorregion des Lit1 Gens.....	84
3.3.2.3	Methylierungsanalyse einzelner CpGs in der Promotorregion des Lit1 Gens.....	85
3.3.2.4	Analyse des Cysteins 176	88
3.3.3	ANALYSE VON METHYLIERUNGSMUSTERN IM H19 GEN.....	89
3.3.3.1	Analyse des Framents H19 CTCF	91
3.3.3.1.1	Auszählung der Sequenzen von H19 CTCF	91
3.3.3.1.2	Untersuchung auf mosaikale Methylierung in H19 CTCF.....	93
3.3.3.1.3	Methylierungsanalyse einzelner CpGs in H19 CTCF	93
3.3.3.2	Methylierungsanalyse des Fragments H19 Smal.....	95
3.3.3.2.1	Auszählung der analysierten Sequenzen in H19 Smal	96
3.3.3.2.2	Untersuchung auf mosaikale Methylierung des H19 Smal PCR Fragments.....	97
3.3.3.2.3	Untersuchung auf Methylierungsmuster des H19 Smal PCR Fragments.....	97
3.3.4	EXPRESSIONSANALYSE VON CDKN1C UND IGF2 IN FIBROBLASTENKULTUREN.....	99
3.3.4.1	Bestimmen eines Referenzgens	99
3.3.4.2	Expressionsanalyse von CDKN1C.....	101
3.3.4.3	Epressionsanalyse von Igf2.....	102
4	<u>DISKUSSION.....</u>	104
4.1	DNA- DEMETHYLIERUNG.....	104
4.1.1	DEMETHYLIERUNG: EIN STREIFZUG DURCH DIE LITERAUR.....	105
4.1.2	POSTULIERTE DNA DEMETHYLASEN UND DIE DIESEN ENZYMEN ZU GRUNDE LIEGENDE MECHANISMEN AKTIVER DEMETHYLIERUNG VON DNA.....	106
4.1.3	BIOCHEMISCHE TESTVERFAHREN ZUR ANALYSE VON DNA-DEMETHYLIERUNG	110
4.2	REPROGRAMMIERUNG IN PRIMORDIALEN KEIMZELLEN.....	113
4.3	METHYLIERUNGSANALYSEN DER BWS-REGION EINER FAMILIE MIT MZZ, DIE DISKORDANT FÜR BWS SIND	120
4.3.1	METHYLIERUNGSANALYSE DER IMPRINTING CENTER I UND II.....	121
4.3.2	EXPRESSIONSANALYSE	124
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	128

6 ANHANG	136
6.1 TABELLEN ZUR AUSWERTUNG DER LIT1 SEQUENZEN.....	136
6.2 TABELLEN ZUR AUSWERTUNG DER H19 CTCF SEQUENZEN.....	138
6.3 TABELLEN ZUR AUSWERTUNG DER H19 SMAI SEQUENZEN	141

1 Einleitung

Vielzellige Lebewesen entstehen, in dem sich eine totipotente Zelle (meist eine befruchtete Eizelle) teilt und nach und nach alle für die Entstehung und Erhaltung des Lebens notwendigen Zelltypen bildet. Dies geschieht zunächst durch die Teilung der Zelle, wobei die daraus resultierenden Zellen anschließend ausdifferenzieren. Nach C.H. Waddington stellt man sich das als Abfolge von binären Entscheidungen vor (Waddington, C.H. *Strategy of the Genes* (GeoAllen & Unwin, London, 1957)). Zudem geht man davon aus, dass, je weiter die Differenzierung einer Zelle vorangeschritten ist, diese nahezu nicht mehr reversibel ist. Die Abfolge dieser Entscheidungen wird durch das Ablesen unterschiedlicher Gene beeinflusst, was erklärt, warum sich Zellen in ihrer Funktion sehr voneinander unterscheiden können, obwohl sie identische DNA Sequenzen aufweisen. Zu den interessantesten Aufgaben der heutigen Zeit gehört es herauszufinden, was eine Zelle dazu befähigt alle anderen Zelltypen bilden zu können, was eine ausdifferenzierte Zelle von einer totipotenten Zelle unterscheidet und wie man eine ausdifferenzierte Zelle in eine totipotente Zelle überführen kann. Diese Fragen versucht die Epigenetik zu klären.

1.1 Epigenetik

Ursprünglich ist der Begriff Epigenetik aus dem Zusammenschluss der Wörter Epigenese (die Entwicklung des Embryos nach der Befruchtung) und Genetik entstanden. Er bezieht sich auf die Tatsache, dass ein Organismus, der genetisch stabil ist, während der Entwicklung Phasen durchläuft, in denen jeweils unterschiedliche Gene exprimiert werden. Der Ausdruck Epigenetik geht auf C.H. Waddington (1905-1975) zurück. Einen Überblick über die Entstehung des Wissenschaftszweiges der Epigenetik gibt Van Speybroeck (Van Speybroeck 2002). Heute wird der Begriff Epigenetik, entgegen seines historischen Ursprungs, als „über der klassischen Genetik stehend“ verwendet. Dies bezieht sich vor allem auf die Vorstellung, dass die Modifikationen, die an der Regulation epigenetischer Prozesse beteiligt sind, hierarchisch über der Genetik stehen. Als Beispiel ist die DNA Methylierung zu nennen, die der Basenabfolge hinzugefügt wird.

Die Epigenetik versucht zu erklären, wie es trotz identischer DNA Sequenz zu unterschiedlichen Ausprägungen von Genen kommt. Im einfachsten Fall führt das zu

unterschiedlichen Zelltypen in Geweben, es kann aber bei Fehlregulation auch Krankheiten wie z.B. Krebs (Jones and Baylin 2002) oder das Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) (Walter and Paulsen 2003) zur Folge haben.

Die epigenetische Regulation von Genen oder ganzen Genomabschnitten erfolgt nach heutigem Verständnis im Wesentlichen durch Kombination von zwei Prozessen, die beide vererbbar sind. Zum einen ist das die Methylierung der DNA am fünften Kohlenstoff der Base Cytosin (zur Übersicht siehe (Jaenisch and Bird 2003)) und zum anderen die Modifikation der Histonproteine (zur Übersicht siehe (Hendrich and Willard 1995)). Dies erfolgt an unterschiedlichen Aminosäuren in den, die an unterschiedlichen Positionen der N-terminalen Bereiche dieser Proteine. (Peterson and Lanier 2004).

Zusätzlich können auch Faktoren wie die Lage eines DNA Abschnittes im Zellkern (Stief et al. 1989) oder auch RNA vermittelte Prozesse (Morey and Avner 2004; O'Neill 2005) eine Rolle spielen, auf die in dieser Arbeit allerdings nicht weiter eingegangen werden soll.

Epigenetische Modifikationen unterteilen die DNA im Zellkern grundlegend in zwei Bereiche: Euchromatin, das transkriptionell aktiv ist und Heterochromatin, das transkriptionell inaktiv ist. Heterochromatin wird in konstitutives Heterochromatin und fakultatives Heterochromatin unterteilt. Konstitutives Heterochromatin kann prinzipiell in Euchromatin überführt werden, fakultatives Heterochromatin hingegen nicht.

All diese epigenetischen Modifikationen darf man sich, obwohl sie vererbbar sind, nicht als festgeschrieben vorstellen. Selbst wenn das spezifische Muster einmal etabliert ist, bleibt es nicht zwingend in diesem Zustand. Es handelt sich vielmehr um einen hoch dynamischen Prozess, in dem die Modifikationen immer wieder angepasst und verändert werden. So lassen sich hoch komplexe Abläufe, wie z. B. die Entwicklung eines Embryos, bei der aufeinander folgend immer wieder andere Gene und Proteine benötigt werden, koordinieren und regulieren. In den folgenden zwei Abschnitten möchte ich die beiden für die Epigenetik nach heutigem Wissen wohl wichtigsten Komponenten, die Methylierung der DNA und die Modifikationen von Seitenketten der Histone näher erläutern.

1.2 DNA Methylierung

Seit fast einem halben Jahrhundert ist bekannt, dass DNA von Eukaryoten C⁵-Methylcytosin enthalten kann (Hotchkiss 1948). C⁵-Methylcytosin (5meC) ist neben Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) eine in der DNA natürlich

vorkommende Base, und entsteht, wenn DNA-Methyltransferasen mit Hilfe des Kofaktors S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) eine Methylgruppe auf ein Cytosin übertragen (Santi et al. 1983). In Eukaryoten ist bisher nur die Methylierung der Base Cytosin bekannt, die im Tierreich vermutlich ausschließlich an CG Dinukleotiden zu finden ist, während in Pflanzen auch Cytosin der Sequenz CNG oder CN methyliert wird (N steht für eine beliebige Base) (Gruenbaum et al. 1981a). Methylierung ist bei Eukaryoten nicht ausschließlich sequenzabhängig. Das hat zur Folge, dass nicht alle CG Sequenzen (auch als CpG bezeichnet) des Zellgenoms methyliert sind. Es entsteht ein zellspezifisches Muster aus methylierten und nicht methylierten CG-Sequenzen, das ich im weiteren Verlauf als Methylierungsmuster bezeichnen werde.

Methylierungsmuster werden während des Lebenszyklus eines Organismus etabliert und während der Teilung von Zellen vererbt (Stein et al. 1982) (Abbildung 1). Für diese verschiedenen Aufgaben gibt es zwei unterschiedliche Typen von Methyltransferasen, die Erhaltungsmethyltransferase Dnmt1 (Gruenbaum et al. 1982) und die *de novo* Methyltransferasen Dnmt3a und 3b (Okano et al. 1998).

Die Erhaltung der Methylierung nach der Replikation ist notwendig, da während der Replikation der DNA keine bereits prämethylierten Cytosine in die DNA eingebaut werden. Dies hat zur Folge, dass nach der Replikation nur der Elternstrang das Methylierungsmuster trägt, während der Tochterstrang keine Methylierung aufweist (Abbildung 1). Dieser Zustand wird als hemimethyliert bezeichnet. Da Dnmt1 während der S-Phase des Zellzyklus an der Replikationsgabel lokalisiert ist (Leonhardt et al. 1992) und zudem eine 15fache Präferenz für hemimethylierte DNA gegenüber unmethylierter DNA besitzt (Gruenbaum et al. 1981b), wird heute zweifelsfrei angenommen, dass Dnmt1 für die Erhaltung von Methylierung nach der Replikation verantwortlich ist. Wird die Methylierung nach der Replikation nicht erhalten, kommt es zu einem sukzessiven Verlust der Methylierung, der als replikationsabhängige oder passive Demethylierung bezeichnet wird (Howlett and Reik 1991).

Ein zweiter Typ von DNA Methyltransferasen sind die *de novo* Methyltransferasen, zu denen die Enzyme Dnmt3a und Dnmt3b zählen. Diese werden benötigt, da sich das Methylierungsmuster einer Zelle verändert. Während der Entwicklung werden bestimmte Bereiche demethyliert, aber auch zuvor unmethylierte Sequenzen neu methyliert (Santos et al. 2002). Das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Prozesse ist in Abbildung 1 verdeutlicht.

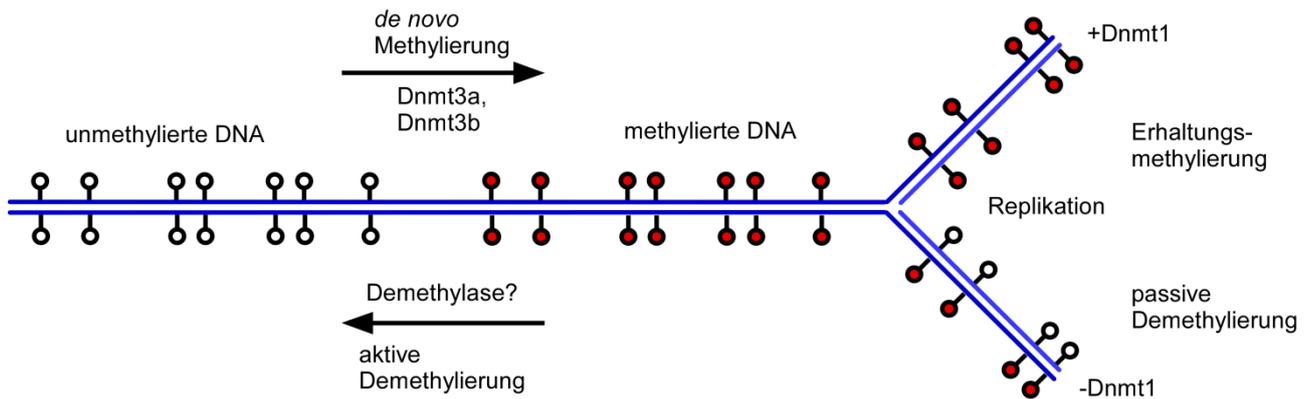


Abbildung 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Methylierungsprozesse von DNA. DNA kann frei von Methylierung vorliegen (dargestellt durch die nicht ausgefüllten Kreise) und mit Hilfe der *de novo* Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b in einen vollständig methylierten Zustand (dargestellt als rot ausgefüllte Kreise) überführt werden. Wird die DNA repliziert, ist der neu synthetisierte Strang nicht methyliert, wodurch hemimethylierte DNA entsteht, die, soweit Dnmt1 vorhanden ist, wieder in vollständig methylierte DNA überführt wird.

DNA Methylierung spielt in vielen biologischen Prozessen und vor allem während der Entwicklung eines Organismus eine wichtige Rolle. Dies wird nicht zuletzt dadurch belegt, dass Mäuse, die kein Dnmt1, Dnmt3a oder Dnmt3b Gen haben, früh in der Embryogenese sterben (Li et al. 1992; Okano et al. 1999).

DNA Methylierung ist darüber hinaus bedeutsam für die elterliche Prägung von Genen, dem *genomic imprinting* (Li et al. 1993) (siehe Abschnitt 1.4), und der Beibehaltung der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Säugetieren (Beard et al. 1995).

1.3 Chromatin Modifikationen

In der Regulation und Aufrechterhaltung epigenetischer Prozesse spielt neben der DNA Methylierung auch die Modifikation der N-terminalen Bereiche der Histone eine Rolle.

DNA ist im Zellkern nicht isoliert vorhanden, sondern liegt wohl organisiert im Verband mit vielen Proteinen vor. Zu den beständigsten Proteinkomponenten gehören die Histone (Kornberg 1977). Die Zusammensetzung von Histonen ist in jeder Zelle und in jedem Entwicklungsstadium etwa gleich. Dennoch kann die Zugänglichkeit der DNA und die Frage, ob bestimmte DNA Abschnitte transkribiert werden, maßgeblich und sehr dynamisch von Histonen bestimmt werden (zur Übersicht siehe (Zhang and Reinberg 2001)). Histone weisen an ihrem N-Terminus eine Abfolge von vielen positiv geladenen Aminosäuren auf. Diese Aminosäuren können durch chemische Modifikationen, wie

Azetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung, verändert werden. Einen genauen Überblick über mögliche Modifikationen und deren Funktionen geben die Übersichtsartikel (Turner 2002) und (Cosgrove et al. 2004).

In meiner Arbeit habe ich die Methylierung von Lysin 9 (H3K9) des Histons H3 und die Methylierung von Lysin 4 (H3K9) ebenfalls im Histon H3 näher untersucht, weswegen ich an dieser Stelle auf die Veränderung dieser beiden Positionen genauer eingehen werde.

Bei den Modifikationen an diesen beiden Positionen handelt es sich um Veränderungen, die sich auf die Transkribierbarkeit der DNA auswirken. Dabei ist die Methylierung von H3K9 in transkriptionell inaktivem Chromatin zu finden, während methyliertes K4 auf einen aktiven Chromatinstatus hinweist. (Eine Übersicht über die Wirkung der unterschiedlichen Modifikationen gibt (Jenuwein and Allis 2001).) Die Erstellung und jeweilige Erneuerung der Modifikationen wird durch Histonmethyltransferasen (Trievel 2004), eine Histondemethylase (Shi et al. 2004), Histonazethylasen und Deazethylasen (Hassig and Schreiber 1997) vermittelt, deren Aktivität ich in diesem Zusammenhang aber nicht untersucht habe.

1.4 Genomische Prägung

Sowohl DNA Methylierung als auch Histonmodifikationen spielen eine bedeutende Rolle bei der genomischen Prägung (*genomic imprinting*) (Li et al. 1993; Hu et al. 2000; Xin et al. 2001; Haig 2004; Lewis et al. 2004). Da ich mich in dieser Arbeit sowohl mit der Reprogrammierung von geprägten Genen, als auch mit Defekten, die bei einer solchen Reprogrammierung entstehen können, beschäftigt habe, will ich im Folgenden erklären, was genomische Prägung bedeutet.

Die genomische Prägung beschreibt das Phänomen, dass zwei Allele, die in ihrer DNA Sequenz völlig identisch sein können, unterschiedlich ausgeprägt werden, wobei die elterliche Herkunft des jeweiligen Allels eine Rolle spielt.

Ein Großteil aller Gene wird sowohl von der mütterlichen als auch von der väterlichen Kopie, die in jeder Zelle vorliegt, abgelesen. Bei elterlich geprägten Genen ist das nicht der Fall. Hier kommt es zur Dosiskompensation. Die Dosiskompensation bewirkt, dass nur eine der beiden elterlichen Kopien abgelesen wird, wobei für jedes geprägte Gen separat festgelegt ist, von welcher Kopie es abgelesen wird. Man spricht hier vom *parent of origin* Effekt. 1984 haben die Arbeitsgruppen um Davor Solter und Azim Surani herausgefunden,

dass nicht alleine die Tatsache, dass jedes Chromosom in doppelter Kopienzahl ($2n$) vorliegt, sondern auch das Vorhandensein beider elterlichen Genome unabdingbar für die vollständige Entwicklung von Säugetieren ist (McGrath and Solter 1984; Surani et al. 1984). Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich weder befruchtete Eizellen, die zwei mütterliche Genome, noch Eizellen, die zwei väterliche Genome enthielten zu einem lebenden Tier entwickelten. In diesen Studien hat man sich die vorgeburtlichen Stadien dieser rekonstituierten Eizellen angeschaut und dabei festgestellt, dass befruchtete Eizellen, die zwei väterliche Genome enthielten, ein relativ normales extraembryonales Gewebe (Trophoblast/Plazenta) entwickelten, aber deutlich unterentwickelte Embryonen aufwiesen. Aus befruchteten Eizellen, die zwei mütterliche Genome enthielten, entwickelten sich Embryonen zum Teil bis zum 25 Somitenstadium, was dem ersten Drittel der Schwangerschaft bei Mäusen entspricht ($\approx 9-9,5$ dpc), während das extraembryonale Gewebe deutlich degeneriert war. Die Autoren schlossen daraus, dass während der Entwicklung der Keimzellen (Gametogenese) die jeweiligen Genome geprägt werden und diese während der Entwicklung unterschiedliche Funktionen übernehmen.

Bis 1987 war nicht klar, welche molekularen Mechanismen dem *genomic imprinting* zu Grunde liegen. Dennoch postulierte man folgende vier Kriterien: (1) der *imprint* muss an den jeweiligen Pronukleus gebunden sein (kein zytoplasmatischer Faktor); (2) der *imprint* muss über DNA Replikation und Zellteilung stabil sein; (3) der Mechanismus muss in der Lage sein Genexpression zu regulieren und (4) es muss möglich sein, den *imprint* jeweils geschlechtsspezifisch neu zu etablieren (entnommen aus (Sapienza et al. 1987)). 1987 wurde dann in unterschiedlichen Veröffentlichungen gezeigt, dass die Methylierung eines in Mäuse eingebrachten Transgens geschlechtsspezifisch sein kann und dass dieses geschlechtsspezifische Methylierungsmuster zum einen vererbt und zum anderen, je nach Geschlecht des Embryos, in dessen Geschlechtszellen neu gesetzt wurde (Reik et al. 1987; Sapienza et al. 1987). Der Prozess und die Notwendigkeit der Neuprogrammierung der *imprints* ist in Abschnitt 1.5 ausführlicher erklärt. Die Tatsache, dass die allelspezifische Expression geprägter Gene tatsächlich von der in den männlichen und weiblichen Geschlechtszellen unterschiedlichen Methylierung bestimmt wird, wurde 1993 mit Mäusen gezeigt, die kein intaktes Dnmt1-Protein exprimierten (Li et al. 1993).

Die Regionen, die in den Keimzellen von Männchen und Weibchen unterschiedlich methyliert sind, werden als DMD (*differential methylated domain*) oder als DMR (*differential methylated region*) oder als *imprinting center* (IC) bezeichnet. Diese Regionen

sind entweder in Eizellen vollständig methyliert und in Spermien nicht methyliert oder umgekehrt.

Heute kennt man in der Maus 102 und im Menschen 61 geprägte Gene (*Imprinted Gene Catalogue* <http://igc.otago.ac.nz>; Stand 07.05.2010). Weitere Spezies, in denen geprägte Gene bisher nachgewiesen wurden, sind Rind (15), Beuteltier (6), Schwein (12), Ratte (6), Kaninchen (1), Hund (1) und Schaf (16). Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass noch weitere geprägte Gene entdeckt werden, da eine Grundvoraussetzung für die Suche nach geprägten Genen möglichst vollständige Sequenzinformationen sind, die bisher jedoch noch nicht von allen diesen Tieren vorliegen.

Die Frage warum es genomische Prägung gibt und wo der evolutive Vorteil liegt, ist bis heute nicht endgültig geklärt. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der Annahme spannend, dass ein diploides Genom einem haploiden insofern überlegen ist, als es zwei Kopien eines Gens aufweist und so rezessive Mutationen, die meist einen Funktionsverlust zur Folge haben, kompensiert werden können. Warum wurde dieser vermeintliche Vorteil bei den geprägten Genen aufgegeben? Hierzu gibt es drei verschiedene Theorien. Tycko, der die erste Theorie vertritt, vermutet, dass ein Organismus eine höhere genomische Variabilität und damit Anpassungsfähigkeit erlangen kann, wenn es zu aufeinander folgenden Mutationen in einer stillgelegten Genkopie kommt, die erst nach einigen Generationen wieder verwendet wird (Tycko and Morison 2002). Die *ovarian time bomb* Theorie (Varmuza and Mann 1994) geht davon aus, dass *imprinting* zum Schutz des weiblichen Organismus vor invasiven Teratomen entstanden ist. Teratome entstehen aus aktivierten, aber unbefruchteten Eizellen, die nicht invasiv sind. Dies ist insofern von Bedeutung, als die Zellen der Plazenta bei Menschen und bei Mäusen in die Uteruswand einwandern. Hierfür sind aber die Gene des väterlichen Genoms unabdingbar. Wenn in der weiblichen Keimbahn diese Gene abgeschaltet sind, ergibt sich daraus ein Vorteil, da die möglicherweise entstehenden Teratome harmloser sind. Der dritten Hypothese zufolge, die als *kinship theory* bezeichnet wird, entwickelte sich *imprinting* durch einen Interessenkonflikt direkter Verwandter (Eltern und Kindern). Danach wirkt sich das An- oder Ausschalten einer Genkopie für die Nachkommen so positiv aus, dass es die Nachteile, die dadurch für die Mutter entstehen, um ein Doppeltes überwiegt. Durch das An- bzw. Abschalten einer Kopie steigt die Nährstoffversorgung des Embryos und der Embryo wird größer. Wenn sich daraus ein deutlicher Vorteil für die Nachkommen ergibt, wird sich diese Mutation durchsetzen trotz der Nachteile für die Mutter (stärkere Abnutzung der eigenen Ressourcen oder eine höhere Sterblichkeit der Mütter aufgrund

größerer Babys). Dies ist aber auch umgekehrt möglich, wenn sich durch das An- oder Ausschalten einer Kopie Vorteile für die Mutter ergeben, die aber einen maximalen Nachteil für die Kinder nicht überschreiten dürfen. Entsprechendes gilt für väterliche Gene. Eine ausführliche Erklärung, einschließlich der mathematischen Ansätze, die diese Theorie stützen, findet sich in (Haig 2004).

Alle drei Erklärungsansätze bergen Schwachstellen. Der meiner Meinung nach schwächste Ansatz ist die Theorie von der höheren Variabilität der Organismen durch die Evolution geprägter Gene, da sie nicht nachweisbar ist. Mutationen sind meist Deletionen, auch wenn sich Mutationen akkumulieren, die zu einem Funktionsverlust führen. Außerdem besteht nur eine geringe Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Allel über viele Generationen still vererbt wird (Voraussetzung ist, dass über Generationen hinweg immer nur Nachkommen eines Geschlechts entstehen).

Gegen die Erklärung, dass genomische Prägung als Schutz gegen invasive Teratome entstanden ist, spricht die Tatsache, dass nicht nur solche Gene geprägt sind, die bei der Plazentaentwicklung eine Rolle spielen. Zudem gibt es mütterliche Allele die stillgelegt sind. Die *kinship theory* hingegen vermag die Evolution des *imprintings* unabhängig von der Genfunktion und der Frage, ob es sich um ein mütterliches oder väterliches Allel handelt, zu erklären. Dennoch hat auch diese Theorie einige Schwachstellen. Allerdings ist eine Stärke der *kinship theory*, dass sie nicht abhängig vom Mechanismus der Regulation ist. Dies ist sinnvoll, da die Regulation, Etablierung und Anwendung der geprägten Gene sehr unterschiedlich sind. Einen ausführlichen Überblick über die Stärken und die Schwächen der unterschiedlichen Theorien bietet (Wilkins and Haig 2003). In Abschnitt 1.8.1 erkläre ich die Regulation geprägter Gene, die für meine Arbeit von Bedeutung waren genauer.

1.5 Genomische Prägung und Methylierung: Ein Lebenslauf

Wie bereits in der Einleitung des Abschnitts über genomische Prägung erwähnt, müssen die Modifikationen, die an der Regulation und der Etablierung geprägter Gene beteiligt sind, während der Entwicklung gelöscht und neu etabliert werden. Wie, warum und zu welchen Zeitpunkten während der Entwicklung dies geschieht, will ich in diesem Abschnitt erläutern.

Nach der Befruchtung der Eizelle kommt es zur Demethylierung beider elterlicher Genome, wobei das väterliche Genom deutlich schneller und früher als das mütterliche Genom demethyliert wird. Abbildung 2, gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf dieser Prozesse. Dabei ist das väterliche Genom blau dargestellt und das mütterliche rot. Das väterliche Genom verliert bereits 4-6 h nach Befruchtung innerhalb von 4 h seine Methylierung. Dies geschieht vor der Replikation der DNA und der Teilung der Zygote. Das mütterliche Genom wird im Gegensatz dazu schrittweise mit jeder voranschreitenden Zellteilung demethyliert (Oswald et al. 2000; Santos et al. 2002) (siehe auch aktive und passive Demethylierung in Abbildung 1). Die geprägten Gene sind von dieser globalen Demethylierung nicht betroffen und behalten ihre Methylierung (grüne Linie in Abbildung 2) (Oswald et al. 2000). Die Remethylierung der DNA (eine Unterscheidung von mütterlichem und väterlichem Genom ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich, da sich beide Genome vollständig vermischt haben) erfolgt im Blastozystenstadium (Monk et al. 1987), wobei extraembryonales Gewebe (Ex) weniger Methylierung aufweist als embryonales (Em) (beides als schwarze Linien dargestellt).

Warum es zu dieser gravierenden Umstrukturierung in der DNA Methylierung kommt ist nicht klar, allerdings wird vermutet, dass es sich dabei um einen Prozess handelt, der entweder ein Zeichen für die Pluripotenz der Zygote sein mag oder aber eine notwendige Umstrukturierung zur Vorbereitung auf die Transkription ist.

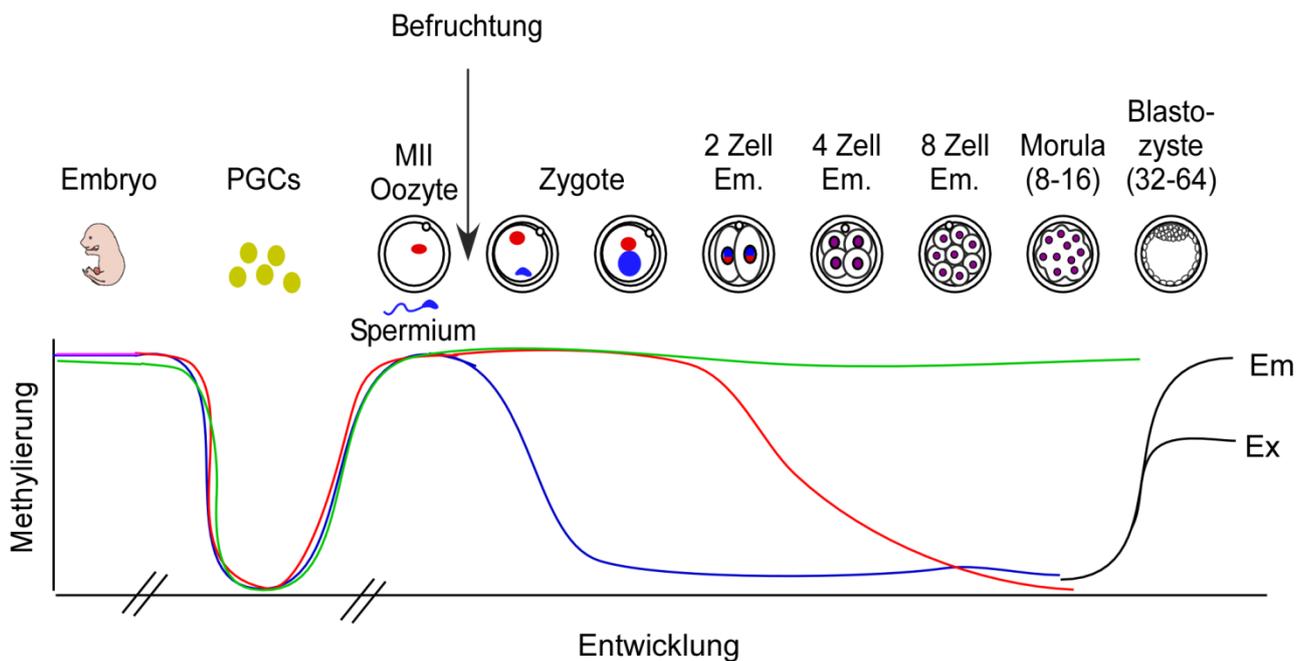


Abbildung 2: Verlauf von DNA-Methylierung in der Entwicklung der Maus und der Keimzellen. Während der Entwicklung eines Embryos wird die DNA in den PGCs demethyliert. Anschließend kommt es zur geschlechtsspezifischen Remethylierung des Genoms in den jeweiligen Keimzellen. Nach der Befruchtung einer Eizelle kommt es ebenfalls zu einer Demethylierung, wobei in diesem Fall die geprägten Gene (grüne Linie) nicht betroffen sind. Die Demethylierung erfolgt im väterlichen Genom aktiv (blaue Linie), während sie im mütterlichen Genom deutlich langsamer und passiv erfolgt (rote Linie). Ab dem Blastozystenstadium erfolgt die Remethylierung, wobei das extraembryonale Gewebe (Ex) weniger Methylierung aufweist, als das embryonale (Em)

Ein weiterer sehr wichtiger Zeitpunkt im Lebenszyklus eines geprägten Gens ist die Reprogrammierung bei der Entstehung der Keimzellen. Bei diesem Prozess werden die geprägten Gene in den Keimzellen dem Geschlecht des Embryos entsprechend neu gesetzt. Dies ist notwendig, da bei der Entstehung von Keimzellen, bei der Meiose, sowohl mütterliche als auch väterliche Chromosomen auf die jeweiligen Zellen verteilt werden. Deren Prägung entspricht demzufolge noch nicht dem Geschlecht des neuen Individuums. Das Reprogrammieren der *imprints* erfolgt zwischen 11,5 dpc und 12,5 dpc in der Keimbahn der Maus (Hajkova et al. 2002). In den anderen Geweben und Zellen des Embryos bleibt die Prägung zu diesem Zeitpunkt erhalten.

1.6 Entwicklung von Keimzellen in der Maus

Keimzellen entstehen aus Vorläuferzellen, den primordialen Keimzellen, im Folgenden als PGCs (*primordial germ cells*) bezeichnet. In der Maus entstehen PGCs erst in der Mitte

der Gastrulation (7-7,5 dpc). Sie entstehen als Gründerpopulation von ca. 40-50 Zellen im extraembryonalen Mesoderm an der Basis der Allantois (Wade et al. 1999). Die Vorfahren dieser Zellen (65 dpc), die sich noch alle 7 h teilen, liegen in der extrem proximalen Region des Epiblasten angrenzend an das extraembryonale Ektoderm (Lawson and Hage 1994). Von hier aus wandern diese Zellen durch den *primitive streak*, wo sie dann als alkalische Phosphatase (TNAP *tissue non specific alkaline phosphatase*), positive PGCs, nachgewiesen werden können. Die PGCs teilen sich jetzt alle 16-17 h (Tam and Snow 1981). Die Determination der PGCs wird durch die Expression von Blimp1 bestimmt und durch die Expression von TNAP begleitet (Ohinata et al. 2005). Zum Ende der Gastrulation wird das posteriore viszerale Endoderm eingefaltet und bildet den (Dick)-Darm (*hindgut*). Da das Endoderm die PGCs enthält, werden diese in den Darm mit eingefaltet. Die PGCs sind daher zunächst im Darm verteilt, wandern dann aber von der ventralen Seite des Darms in das dorsale Mesenterium und von da aus in die sich neu formierenden Gonadenanlagen (siehe Abbildung 3).

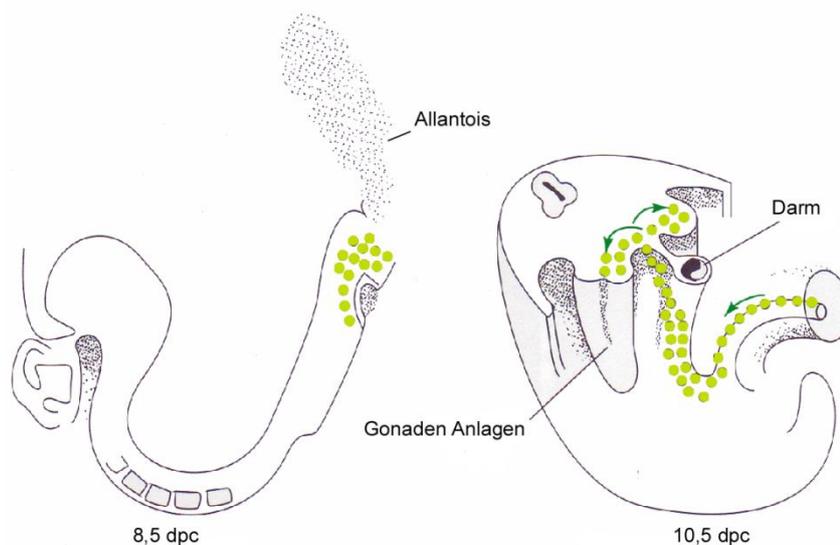


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Migrationswege von PGCs. An 8,5 dpc liegen die als gelbe Zellen dargestellten PGCs an der Basis der Allantois. An 9,5 dpc wandern sie den Darm entlang und anschließend durch das dorsale Mesenterium in die sich bildenden Gonaden Anlagen. Die Migrationsrichtung ist jeweils durch einen grünen Pfeil angegeben. (Modifiziert nach: *Manipulating the mouse embryo*, Brigid Hogan, Rosa Beddington, Frank Costantini und Elizabeth Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994, second edition, Seite 29)

Sie erreichen die Gonadenanlagen um 10-11 dpc (Molyneaux et al. 2001). Bis zu diesem Zeitpunkt sind die PGCs männlicher und weiblicher Embryonen noch völlig identisch (zur

Übersicht siehe (McLaren 2000; McLaren 2001)). Dann fangen männliche und weibliche PGCs an sich unterschiedlich zu entwickeln.

Nach Eintritt der PGCs in die Gonadenanlagen verändert sich deren Expressionsmuster drastisch. Bei den männlichen Keimzellen bilden sich ab 12,5 dpc die Sertolizellen. An 13,5 dpc gehen sie in einen mitotischen Arrest über, das heißt, sie haben zu diesem Zeitpunkt noch keine Meiose durchlaufen. Bei der Entstehung weiblicher Keimzellen werden an 12,5 dpc die Granulosazellen gebildet und ab 13,5 dpc treten die Zellen in die Meiose ein, wo sie im Diplotän in den meiotischen Arrest übergehen. Abbildung 4 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Embryonalentwicklung der Maus und der Entwicklung der PGCs.

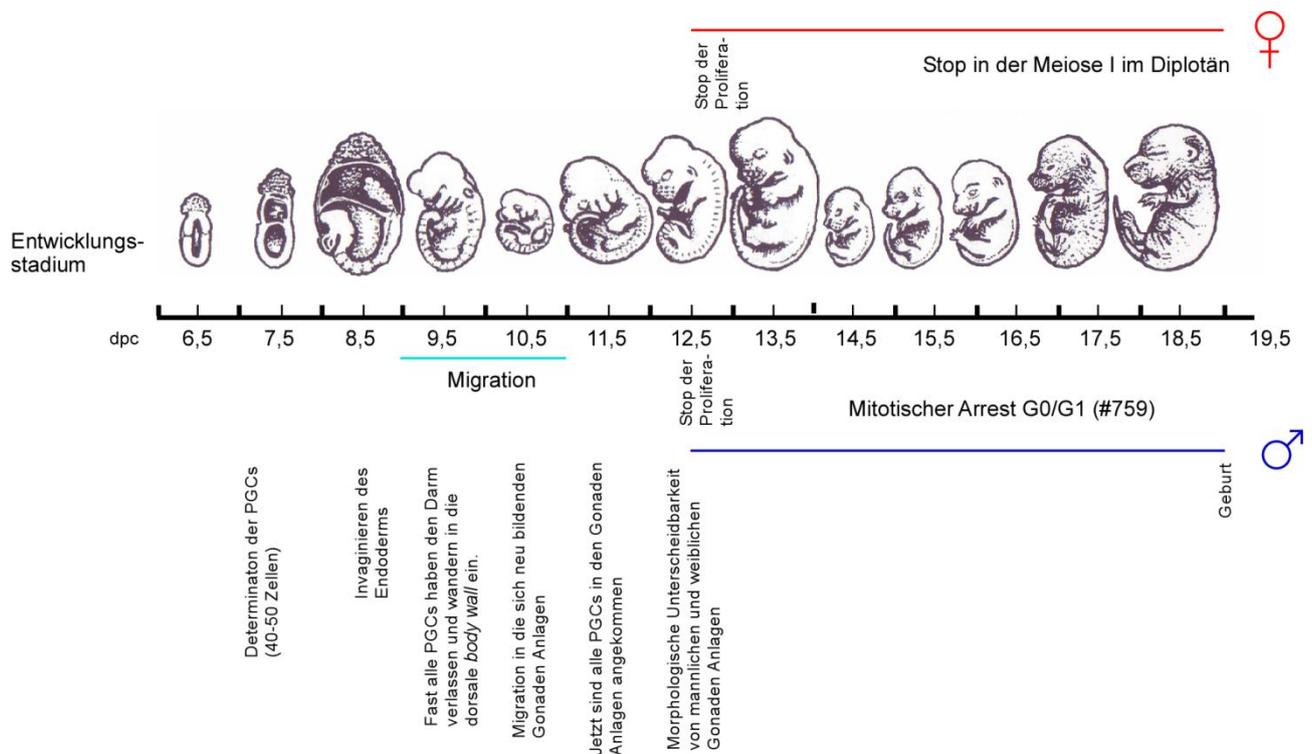


Abbildung 4: Überblick über die Embryonalentwicklung und die Entstehung von PGCs in der Maus. In der Mitte der Abbildung sind die Embryonalstadien der Maus abgebildet (aus *Manipulating the mouse embryo*, Brigid Hogan, Rosa Beddington, Frank Costantini und Elizabeth Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994, second edition, Seite 22). Darunter ist der zeitliche Verlauf der Schwangerschaft in dpc (*days post coitum*) angegeben. Die Phase, in der die aktive Migration der PGCs stattfindet ist durch einen türkisfarbenen Strich angezeigt. Der unterschiedliche Verlauf der Entwicklung von männlichen und weiblichen Keimzellen ist durch einen blauen bzw. roten Strich angezeigt.

1.7 Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS)

Beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom (OMIM #130650), auch als Wiedemann-Beckwith-Syndrom oder als Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus-Syndrom (EMG-Syndrom) bezeichnet, handelt es sich um ein phänotypisch diverses Großwuchs-Syndrom. Es wurde laut (Cohen 2005) erstmals 1963 von J.B. Beckwith besprochen und 1964 unabhängig davon von H.R. Wiedemann beschrieben (Wiedemann 1964). Zu den unterschiedlich ausgeprägten phänotypischen Merkmalen gehören der Nabelschnurbruch (Exomphalos), bei dem Darmschlingen aus dem sich nicht schließenden Nabel austreten können, eine große Zunge (Makroglossie), die aus dem Mund heraushängt und zu Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme des Säuglings führen kann, Großwuchs der Neugeborenen (Gigantismus), Vergrößerungen der inneren Organe, Einkerbungen an den Ohrläppchen, Hypoglykämie (sehr niedriger Blutzuckerspiegel) und ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Tumoren im Kindesalter (für Diagnosekriterien und Klassifikation der Erkrankung siehe (Bliet et al. 2001)). Die Auftretenshäufigkeit beträgt ca. 1:15000.

1.8 Molekulargenetischer Hintergrund von BWS

BWS kann durch viele verschiedene molekulare Veränderungen hervorgerufen werden. Dennoch beziehen sich all diese Veränderungen auf eine Region des kurzen Arms von Chromosom 11, die als Beckwith-Wiedemann-Syndrom-Region bezeichnet wird. Diese Region unterteilt sich wiederum in zwei Unterregionen, Region 1 (IC1) und Region 2 (IC2). IC steht in beiden Fällen für *imprinting center*. In diesen Bereichen liegen die differenziell methylierten Regionen, die die Expression der jeweiligen Gene reguliert. Die Gene, deren Fehlregulation bei der Ausprägung von BWS eine Rolle spielen, und deren Abfolge im Genom sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

1.8.1 Die Beckwith- Wiedemann-Syndrom Region- Organisation und Regulation

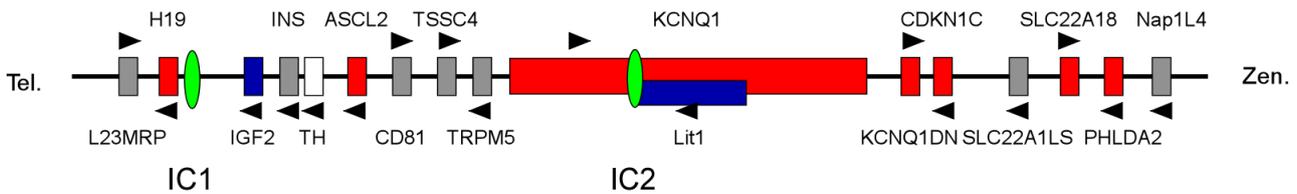


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Organisation der Beckwith-Wiedemann-Syndrom Region (abgeleitet von (Nakano et al. 2006)) im Menschen. Abgebildet sind die sich in der BWS Region befindenden Gene in Telomer → Zentromer Orientierung. Eingezeichnet sind die beiden Kontrollregionen (grün), väterlich exprimierte Gene (blau), mütterlich exprimierte Gene (rot) und biallelisch exprimierte Gene (grau). Die allelische Verteilung der Expression von Th (Tyrosindehydrolase) ist bisher noch geklärt (weiß).

Die BWS Region wird grundsätzlich in zwei Unterregionen unterteilt, die von zwei unterschiedlichen *imprinting centern* (IC) reguliert werden (Abbildung 5). Als IC1 wird die differenziell methylierte Region (CTCF-Bindestellen grüne Striche in Abbildung 6) im H19 Gen bezeichnet. Sie liegt ~5000-2000bp aufwärts vom Transkriptionsstart von H19 basierend auf der Sequenz AF087017 (für die genaue Position der CTCF-Bindestellen im H19 Gen siehe Abbildung 34). IC1 reguliert die reziproke Expression von IGF2 und H19, wobei IGF2 vom väterlichen Allel abgelesen wird und H19 vom mütterlichen (siehe Abbildung 6). Die Regulation erfolgt über die allelspezifische Methylierung des IC1. In diesem Fall ist das väterliche Allel methyliert (schwarze, ausgefüllte Kreise), während das mütterliche Allel unmethyliert ist (weiße, nicht ausgefüllte Kreise).

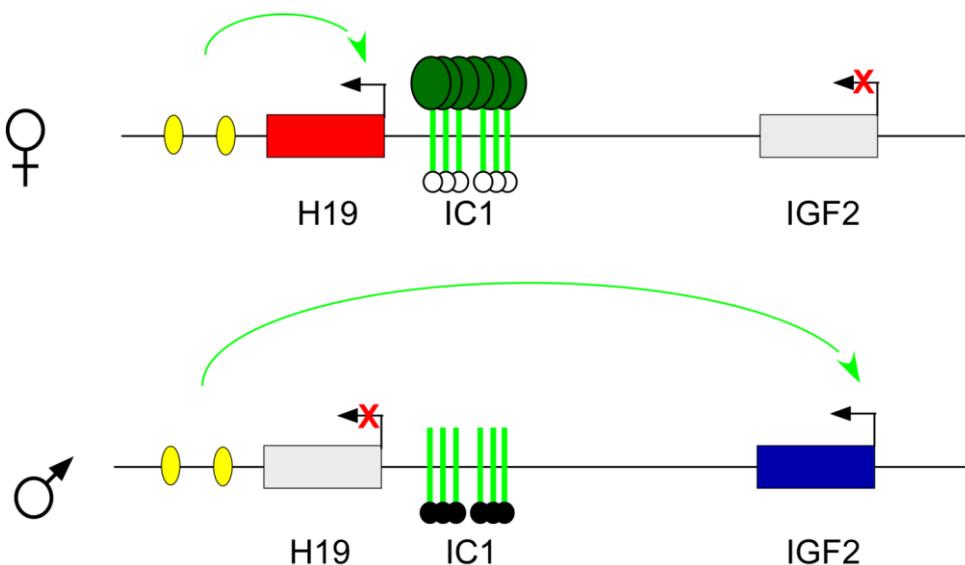


Abbildung 6: Darstellung der Regulation der Expression von IGF2 und H19 im IC1 der BWS Region (zur näheren Erläuterung siehe Text).

Weisen die CTCF Bindestellen wie im mütterlichen Allel keine Methylierung auf, bindet das als *insulator* wirkende Protein CTCF (dunkelgrüne Ovale) an diesen Stellen, wodurch eine Interaktion (grüner Pfeil) der abwärts von H19 liegenden *enhancer* (gelbe Kreise) mit dem Promotor (schwarzer Pfeil) von H19 ermöglicht wird und so H19 exprimiert werden kann. Kommt es an den CTCF Bindestellen zu Methylierung, wie in der väterlichen Keimbahn, kann CTCF nicht binden und die *enhancer* interagieren mit den Promotoren von IGF2 (hier vereinfacht als ein grüner Pfeil dargestellt), sodass IGF2 exprimiert wird (Hark et al. 2000). Ist das allelspezifische Methylierungsmuster der CTCF Bindestellen verändert, kommt es zu Veränderungen in der Expression von IGF2 und H19, die von biallelischer Expression bis hin zu keiner Expression des jeweiligen Gens reichen kann (Bell and Felsenfeld 2000), was dann zu BWS führt (siehe unten).

IC2 ist im Intron 10 des KCNQ1 Gens bzw. im Promotor von Lit1 lokalisiert und reguliert die monoallelische Expression von Lit1, KCNQ1, CDKN1C, KCNQ1DN, Ascl2, SLC22A18, SLC22A1LS und PHLDA2, wobei Lit1 väterlich exprimiert wird, während die anderen Gene mütterlich exprimiert werden. Wie genau diese Region reguliert wird, ist bisher nicht klar. Dennoch weiß man, dass sowohl die Methylierung der DNA an dieser Stelle eine Rolle spielt, als auch die vollständige Transkription der Lit1 RNA (Mancini-Dinardo et al. 2006).

1.8.2 Wie kommt es zu BWS?

Zum Auftreten von BWS können viele verschiedene molekulare Veränderungen führen, die alle in Abbildung 7 dargestellt sind (KCNQ1OT1 entspricht Lit1). Teil B der Abbildung beschreibt die Hypomethylierung von IC2 (DMR2), was bei ca. 50% der BWS Fälle zu beobachten ist. Hier wird Lit1 (KCNQ1OT1) von beiden Allelen abgelesen, was wiederum zu einer völligen Unterdrückung der Expression von CDKN1C und KCNQ1 führt. In Abschnitt C sind die Folgen zusätzlicher Methylierung des mütterlichen Allels im IC1 (DMR1, ca. 2-7% der Fälle) dargestellt. Diese führen zur biallelischen Expression von IGF2 und einer Stilllegung von H19 auf beiden Allelen. Bei den unter Punkt D beschriebenen Veränderungen handelt es sich um eine Mutation im mütterlichen CDKN1C Gen, die in ca. 10% der Fälle auftritt, was ebenfalls zur Ausbildung von BWS führt. (Eine Mutation im väterlichen Gen würde sich nicht auswirken, da CDKN1C nur vom mütterlichen Allel abgelesen wird.) Ein weiteres zu beobachtendes Phänomen sind chromosomale Veränderungen, die diese Region betreffen können. Dabei kann es zum

einen zu einer paternalen uniparentalen Disomie (UPD) kommen (ca. 20% der Fälle), Abschnitt E. Bei diesem Fall, weisen die Zellen zwei Allele väterlichen Ursprungs und kein mütterliches Allel auf. Das führt sowohl zu einer doppelten Dosis Lit1 und IGF2, aber auch zu einer Stilllegung von H19 und KCNQ1. Es kann allerdings auch zu einer paternalen Duplikation dieser Region kommen (Abschnitt F), was in weniger als 1% der Fälle auftritt. Hier weisen die Zellen zwei väterliche und zusätzlich ein mütterliches Allel auf, wodurch es zu einer doppelten Dosis von IGF2 und Lit1, aber nicht zu einer Stilllegung von H19 und KCNQ1 kommt. Im letzten in der Abbildung beschriebenen Fall (G) kommt es zu Translokationen, wodurch es zur Zerstörung des KCNQ1 Gens und damit auch zur Zerstörung des Lit1 Gens kommt (in weniger als 1% der Fälle). Diese Auflistung verdeutlicht, dass BWS nicht nur ein phänotypisch komplexes Syndrom ist, sondern sich auch auf molekularer Ebene sehr komplex darstellt.

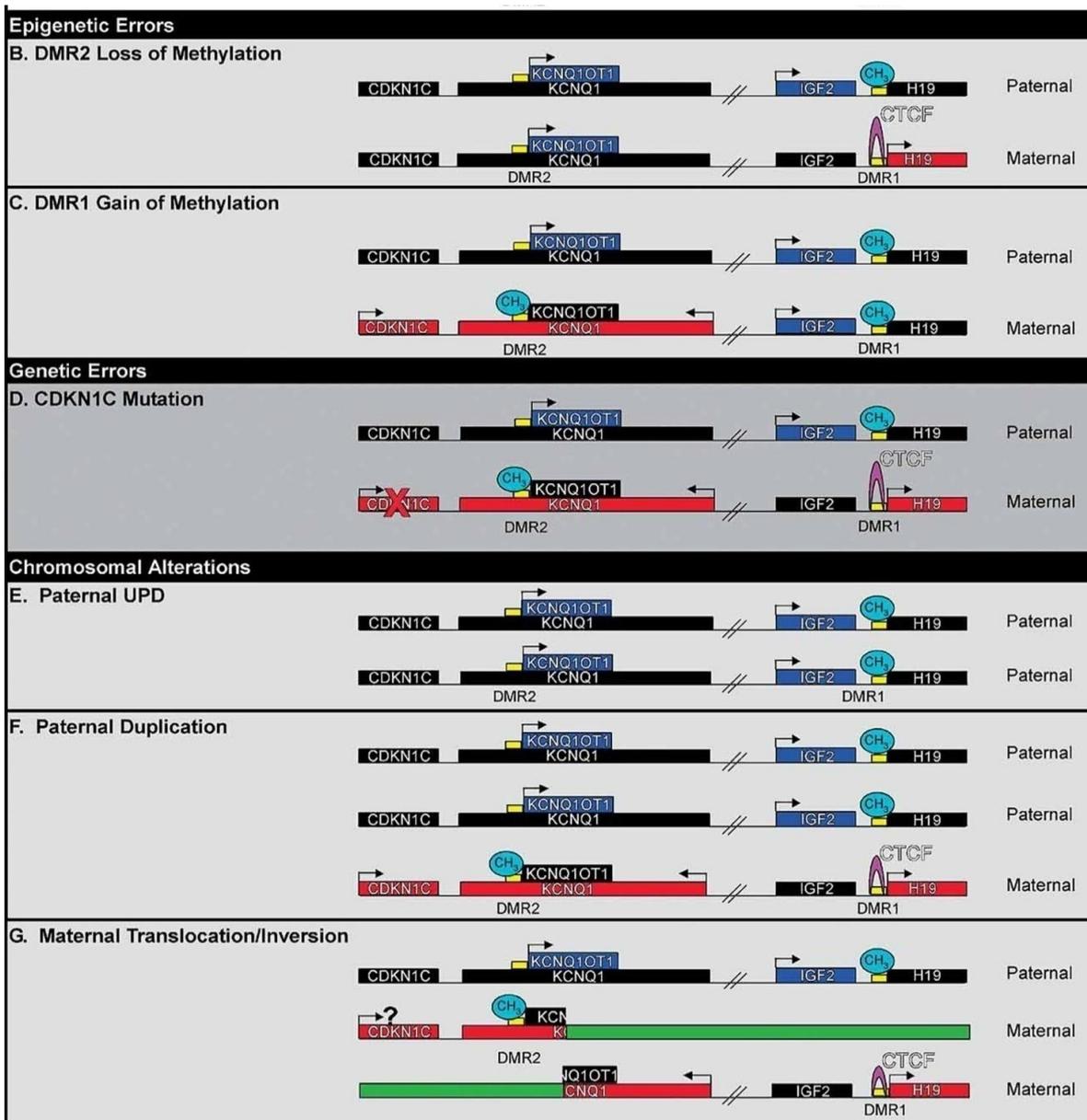


Abbildung 7: Übersicht über die genetischen und epigenetischen Veränderungen der BWS Region, die zum Auftreten von BWS führen können (entnommen aus (Weksberg et al. 2005)). In dieser Abbildung sind nur die Gene der Region aufgeführt, deren fehlerhafte Expression mit BWS in Verbindung gebracht werden. Väterlich exprimierte Gene sind blau und mütterlich exprimierte Gene rot und nicht exprimierte Gene schwarz dargestellt. Die jeweiligen ICs sind gelb und die Methylierung durch ein CH₃, CTCF durch einen violetten Bogen dargestellt.

Im Folgenden möchte ich die Gene, die bei der Entstehung von BWS eine Rolle spielen, kurz mit ihrer jeweiligen Funktion vorstellen.

IGF2 (OMIM 147470): IGF2 steht für *insulin like growth factor 2*. Hierbei handelt es sich um ein Polypeptid, das mit Insulin nah verwandt ist. Es führt bei kultivierten Zellen zum Wachstum der Zellen. Beim Menschen nimmt man an, dass es, wenn es nicht exprimiert wird, zu Zwergwuchs führt. IGF2 weist 4 verschiedene Promotoren auf (P0-P3), wobei P1-

P3 in allen Geweben verwendet werden, während es sich bei P0 um einen Plazenta spezifischen Promotor handelt (Reik et al. 2000). Die Expression von IGF2 beginnt kurz nach der Implantation der Blastozyste im extraembryonalen Gewebe. Im Anschluss daran weitet sich die Expression auf alle mesodermalen und endodermalen Gewebe des Embryos aus (Lee et al. 1990).

H19 (OMIM 103280): H19 wird auch als *adult skeletal muscle gene* (ASM) bezeichnet. Es kodiert für eine RNA, die nicht in ein Protein umgeschrieben wird. H19 wird während der Embryogenese für kurze Zeit in vielen Organen transkribiert (Bartolomei et al. 1991), während es bei Erwachsenen nur im Skelettmuskel zu finden ist (Zhang and Tycko 1992).

CDKN1C (p57^{kip2}) (OMIM 600856): Ist ein Zyklin abhängiger Kinaseinhibitor, der bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielt. Hier hat er eine hemmende Wirkung, weswegen dieses Gen auch als Tumorsupressor bezeichnet wird.

KCNQ1 (OMIM 607542): Bei diesem Gen handelt es sich um ein Protein, dass für einen spannungsregulierten Kaliumkanal kodiert. Es ist vornehmlich im Herzen exprimiert. Eine Mutation dieses Gens führt zu herzassoziierten Syndromen.

Lit1 (KCNQ1OT1) (OMIM 604115): Steht für *long QT intronic transcript 1* oder *KCNQ1 overlapping transcript 1*. Es wurde bei einer umfangreichen Expressionsanalyse zur Identifikation weiterer geprägter Gene dieser Region identifiziert (Mitsuya et al. 1999). Bis heute kennt man die Funktion dieses Gens nicht, dennoch geht man davon aus, dass die RNA nicht in ein Protein umgeschrieben wird. Man weiß allerdings, dass sowohl die Methylierung des Promotorbereichs der RNA als auch die Transkription durch das gesamte Gen für die korrekte Expression der Gene im IC2 notwendig ist (Mancini-Dinardo et al. 2006).

1.9 Humane Embryogenese und Entstehung von Zwillingen

Da ich in meiner Arbeit eineiige Zwillinge (MZZ) untersucht habe, die diskordant für BWS sind, und es bei der späteren Einordnung und Bewertung der Daten von Bedeutung ist, zu welchem Entwicklungszeitpunkt die MZZ entstanden sind, möchte ich an dieser Stelle einen kurzen Überblick über die Entstehung von Zwillingen beim Menschen geben, wobei das Hauptaugenmerk auf die Entstehung von eineiigen Zwillingen gerichtet ist. Zudem werde ich an dieser Stelle auf grundlegende Ereignisse in der Embryogenese des Menschen eingehen.

Humane Embryogenese (siehe Abbildung 8)

Bei der Befruchtung durchdringt das Spermium die die Eizelle umgebende Zona pellucida (grau) und anschließend die Plasmamembran der Eizelle. Daraufhin vollendet die Eizelle die zweite Reifeteilung und schleust den zweiten Polkörper aus. Anschließend beginnt sich die Zygote (befruchtete Eizelle) innerhalb der ersten 24 h zu teilen. (Alle hier genannten Zeiträume sind nur als ungefähre Angaben zu verstehen.) Nach ca. 4 Tagen ist eine frühe Blastozyste entstanden. Sie ist immer noch von der *Zona pellucida* umgeben. Bei ihrer Entstehung kommt es erstmals zur Spezialisierung einzelner Zellen. Die zur Zona pellucida hin gelegenen Zellen bilden den Trophoblasten (lila), dieser wird später ausschließlich extraembryonales Gewebe wie einen Teil des Chorions und Teile der Plazenta bilden. Die weiter Innen liegenden Zellen bilden die innere Zellmasse (ICM, dunkelblau). Die Zellen der ICM werden später sowohl den Embryo, als auch extraembryonales Gewebe wie z.B. die Amnionmembran oder den Dottersack bilden. Bei der weiteren Reifung der Blastozyste verlässt diese zwischen Tag 4 und 5 der Embryogenese die *Zona pellucida* und beginnt die Einnistung in die Uterusschleimhaut, indem sie an diese anhaftet. Die Einnistung der Zygote ist zwischen Tag 10 und 12 der Embryogenese vollständig abgeschlossen. Ich werde sie, da sie für die Aspekte dieser Arbeit nicht von Bedeutung ist, nicht weiter besprechen. Der Trophoblast unterteilt sich nun in Syncytiotrophoblast und Zytotrophoblast, wobei ersterer auf den Zytotrophoblasten aufgelagert ist und bei der Invasion der Uterusschleimhaut eine Rolle spielt, weswegen er nicht in Abbildung 8 abgebildet ist. In der ICM kommt es ebenfalls zu einer weiteren Spezialisierung, in dem sich die zur Blastozystenhöhle hin gelegenen Zellen zum Hypoblasten (gelb) differenzieren. Dieser bildet später sowohl das embryonale Endoderm als auch den embryonalen Dottersack, während sich die von der Blastozystenhöhle abgewandten Zellen später zum Epiblasten (blau) entwickeln, der sowohl das embryonale Ektoderm, den primitiv Streifen sowie das amniotische Ektoderm (hellblau) bildet (siehe auch BM Carlson, Human Embryologie and developmental biology, fourth edition Mosby Elsevier 2009 Abbildung 5-1). Etwa am siebten Tag bildet der Epiblast eine primäre Amnionhöhle, die sich an Tag acht noch einmal öffnet. Erst am neunten Tag bildet sich die Amnionhöhle erneut und ist dann von einer eigenen Amnionmembran bedeckt. Zwischen Tag 6 und 9 entwickelt sich der Hypoblast weiter und schließt sich am Ende zum primären Dottersack. Die zweikeimblättrige Keimscheibe besteht aus den aneinandergrenzenden Hypo- und Epiblasten.

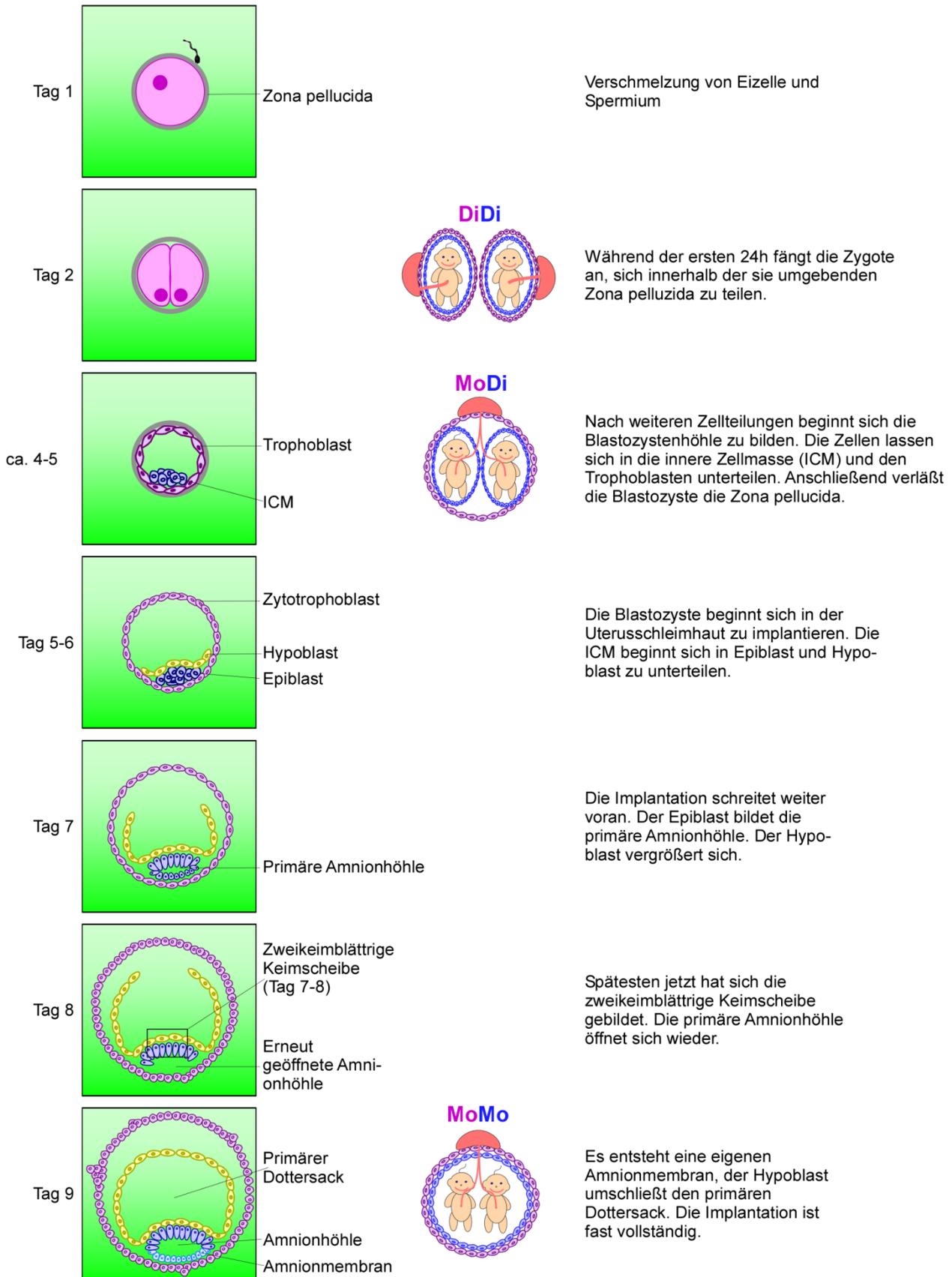


Abbildung 8: Frühe Embryonalentwicklung beim Menschen einschließlich der Entstehung der unterschiedlichen MZZ Typen. Erläuterung siehe Text.

Entstehung von Zwillingen

Grundsätzlich unterscheidet man zwei unterschiedliche Typen von Zwillingen: Monozygote (eineiige, identische oder echte Zwillinge) und dizygot (zweieiige, nicht identische oder unechte Zwillinge). Wie die Begriffe monozygot und dizygot ausdrücken, bezieht sich die Unterteilung auf die Frage, aus wie vielen Zygoten die Zwillinge hervorgegangen sind. Bei der Entstehung von zweieiigen Zwillingen kommt es zur Reifung von zwei Eizellen, die von jeweils einem Spermium befruchtet werden. Hierbei handelt es sich um zwei von einander völlig unabhängige Individuen, die in getrennten Fruchthölen heranreifen und von je eigenen Plazenten versorgt werden. Zweieiige Zwillinge gleichen sich nicht mehr als andere Geschwister, die die gleichen Eltern haben aber mit einem größeren Abstand zueinander geboren wurden. Aus diesem Grund werden sie auch manchmal als unechte Zwillinge bezeichnet.

MZZ entstehen aus nur einer befruchteten Eizelle, die sich während der ganz frühen Embryogenese teilt (bis zur zweiten Woche der Embryonalentwicklung, siehe auch Abbildung 8). Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt sich diese Trennung vollzieht, entstehen unterschiedliche Typen von MZZ, je nach der Anzahl der Eihäute. Dichorionale, diamniote (DiDi oder DC/DA siehe auch Abbildung 8) MZZ entstehen, wenn sich die Zygote vor Entstehung der Blastozyste teilt (Tag 1-3). Dies wird daraus abgeleitet, dass jeder Zwilling von einem eigenen Chorion sowie einem eigenen Amnion umgeben wird. Da das Chorion unter anderem vom Trophoblasten gebildet wird, muss die Teilung beider Zwillinge vor dessen Differenzierung erfolgt sein. Ca. 25-30% aller MZZ sind DiDi. Monochorionale, diamniote Zwillinge (MoDi oder MC/DA) entstehen, wenn sich die ICM innerhalb der Blastozyste teilt, bevor sich die Amnionhöhle gebildet hat (Tag 4-8). Die meisten aller MZZ sind MoDi (70-75%). Nur ein sehr geringer Teil der lebend geborenen MZZ (1-2%) sind monochorionisch, monoamniot (MoMo oder MC/MA). In diesem Fall teilt sich die zweikeimblättrige Keimscheibe nach der Entstehung der Amnionhöhle. Bis zu welchem Stadium dies möglich ist, ohne dass verwachsene Zwillinge entstehen, ist nicht ganz klar. Allerdings geht man davon aus, dass es vor der Entstehung des primitiv Streifens erfolgt sein muss, da sonst verwachsene Zwillinge entstehen.

MZZ sind sich phänotypisch sehr ähnlich und werden als genotypisch identisch angesehen. Dies stimmt allerdings nur bedingt, da sie zwar aus identischem Erbgut entstanden sind, es während der Entwicklung aber zu somatischen Mutationen kommt. So wie in einem Individuum das Erbgut nicht aller Zellen identisch ist, sind auch MZZ nur nahezu identisch und können in Extremfällen sogar unterschiedliche Geschlechter

aufweisen (Edwards et al. 1966). Zudem kann es während der Entwicklung zu epigenetischen Veränderungen kommen, was ebenfalls zur Diskordanz monozygoter Zwillinge führen kann (Weksberg et al. 2002; Fraga et al. 2005; Mill et al. 2006).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

In meiner Arbeit standen Untersuchungen zum Prozess der Reprogrammierung von Methylcytosin im Vordergrund. Dieser ist bis heute immer noch nicht im Detail beschrieben. Weder weiß man nach welchem molekularen Mechanismus dieser Prozess verläuft, noch konnte bisher eindeutig ein Enzym oder ein Proteinkomplex identifiziert werden, die diese Aufgabe übernehmen. Deshalb habe ich versucht diesen Prozess biochemisch zu charakterisieren. Hierfür sollte eine Strategie entwickelt werden, die sowohl Aufschluss über die Kinetik dieses Prozesses gibt, als auch wichtige Informationen über beteiligte Komponenten und einen eventuellen Reaktionsmechanismus.

Zusätzlich wollte ich mit Hilfe immunologischer Färbungen klären, ob unterschiedliche Histonmodifikationen dazu führen können, dass die DNA in PGCs demethyliert wird, nicht aber die in somatischen Zellen. Ebenso wollte ich untersuchen, ob auch in PGCs aktive und passive Demethylierung parallel verlaufen und inwieweit sich diese beiden Prozesse, außer in ihrer Dynamik, voneinander unterscheiden.

Abschließend wollte ich klären, wie sich fehlerhafte Reprogrammierung in monozygoten Zwillingen auswirkt, und welche DNA-Abschnitte von dieser fehlerhaften Reprogrammierung betroffen sind

2 Materialien und Methoden

2.1 Patienten

Die Zygote der Zwillinge wurde durch die Analyse von 10 hochpolymorphen Markern überprüft und eine Übereinstimmung von über 99% ermittelt. Zusätzlich wurde mit Hilfe von ECLIPSE2 die Wahrscheinlichkeit dafür ermittelt, dass es sich bei den Zwillingen um eineiige und nicht um zweieiige handelt (Sieberts et al. 2002).

2.2 Mausstämme

SD7	Ein kongener Mausstamm aus C57BL/6J x CBA, der den distalen Teil von Chromosom 7 des Stamms <i>Mus spretus</i> enthält.	
Oct4 GFP	Ein transgener Mausstamm, mit eGFP, das vom Oct4 Promotor reguliert ist (GOF18 Δ PE - (Yeom et al. 1996)), der so manipuliert wurde, dass die Expression nach dem Blastozystenstadium spezifisch für PGCs ab 8,5 dpc ist.	Erhalten von Azim Surani (Cambridge UK)
NMRI	Ein Auszuchtstamm, der bis zu 20 Jungtiere pro Wurf bekommt.	Elevage Janvier, LeGenest St. Isle, Bretagne

2.3 Bakterienstämme

Escherichia coli K12 Top10 F'

Invitrogen, Leek, Netherlands

2.4 Plasmide

pGEM, TA cloning kit	Promega, Mannheim
pBluescript II SK(+)	Stratagene

2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bezogen

2.5.1 Oligonukleotide für Bisulfit PCRs

Tabelle 1: Auflistung der für die Amplifikation von bisulfitmodifizierter DNA verwendeten Oligonukleotide

H-BI-H19-F	TGTATAGTATATGGGTATTTTTGGAGGTTT	(El-Maarri and Slim 2006)
H-BI-H19-R	TCCTATAAATATCCTATTCCCAAATAACC	(El-Maarri and Slim 2006)
H19_Hs_Sma-R	ACTCCAAATATCCAAAATACTCCTTAA	
H19_Hs_Sma_F	TGATGGGGTAATGTTTAGTTTTGTTT	
Th-L1h-P-F	GTTATTTTTATATTTAGTTAGTGTTTT	T. Mikeska
Th-L1h-P-R	CCCTAACAAAATCTTACTAAAA	T. Mikeska
M-cenSat-F	TTCGTTATATTTTAGGTTTTTTAGA	(Nguyen et al. 2002)
M-cenSat-R	TTCGTTATATTTTAGGTTTTTTAGA	(Nguyen et al. 2002)
H19_Mouse_2681-F	TGATAATGTTTAAGGGTTAAAGT	
H19 Maus Reimo R	CCCAAATTAACAACATTTAAA	R. Tetzner
Lane IAP F2	TTGTGTTTTAAGTGGTAAATAAATAATTTG	(Lane et al. 2003)
Lane IAP R2	AAAACACCACAAACCAAATCTTCTAC	(Lane et al. 2003)
Lane Line1 5' F2	TAGGAAATTAGTTTGAATAGGTGAGAGGG	(Lane et al. 2003)
Lane Line1 5'R2	TCAAACACTATATTACTTTAACAATTCCCA	(Lane et al. 2003)
Lane IAP F2	TTGTGTTTTAAGTGGTAAATAAATAATTTG	(Lane et al. 2003)

Lane IAP R2	AAAACACCACAAACCAAATCTTCTAC	(Lane et al. 2003)
litSD7 CpG18SAR	ACCAAAAACAAAATAATTCTATACC	
SD7binew	GTAAGTTTGGGTTATAAAGATGGAGT	
Lit1biR2	AAACTTTTCTATTCAACTTAATTCCCAAC	(Hajkova et al. 2002)

2.5.2 Oligonukleotide für Expressionsanalysen und *southern blot* Sonden

Tabelle 2: Oligonukleotide, die zur Expressionsanalyse oder zum Erstellen von *southern blot* sonden verwendet wurden

DMRP2 Lit1 Probe F	TCCTGGGGAGGTAGAAATG	(Smilinich et al. 1999)
DMRP2 Lit1 Probe R	TGTCTGCCTGCTTCCTCTG	(Smilinich et al. 1999)
H19_Bliek_rev-2	GACTCACCTGCCCGGCAGATG	(Bliek et al. 2001) modifiziert
h19_Bliek-for	TAGCTCGAGGCAGGGCTGGTG	(Bliek et al. 2001) modifiziert
H-IGF2-700-F	TTCTACTTCAGCAGGCCCGCAA	
H-IGF2_809-R	GTAGCACAGTACGTCTCCAGGA	
H_fibnec-for	GCAGTGGTCTTAACAAATCTCCTGC G	G. Reither
H_fibnec-rev	CCAGTTGGGGAATCAAGACCTGTTT	G. Reither
H_hup0-for	CTGAAAAGGTCAACGCCTTCTTGG	G. Reither
H_hup0-rev	TTAGCTGGGGCTGCAGCAGC	G. Reither
H-CDKN1C-Seq-2445-F	CTCTCCTCGCAGTTTAGAGC	
H-CDKN1C-2666-R	ACCAGTGACCTTCTCGTGCAAG	
H-CDKN1C_1542-Seq-F	TCAAGAGAGCGCCGAGCA	
H-CDKN1C_2083-Seq-R	CGCGCAATGTGCTGTGTAAGCAT	
H-IGF2-Seq-27666-F	CTTGTGCCCATTTTTTCATCTGA	
H-Igf2-Seq-28130-R	CCGAAGCCCTATTTCTCTGTCTCTA	

2.5.3 Oligonukleotide, die für die SIRPH-Analysen verwendet wurden

Tabelle 3: Oligonukleotide, die für die SIRPH-Analysen verwendet wurden

Lit1_CpG-4	GGGTTAATTTGAGTT
Lit1_CpG-11	TAAGTTTTTTTTTGTGTTGT
H19_CTCF-CpG-15	GGGTTATTTAAGTTA
H19 Sma 222	TTTAGTTAGAAAAAGTT

2.5.4 Substrat Oligonukleotide

Tabelle 4: Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Demethylierungssubstrate verwendet wurden

pBluSKP269F	CGTAAAGCACTAAATCGGAAC
Bt-pBluSKP269F	Biotin-CGTAAAGCACTAAATCGGAAC
pBluSKP780	ACTAAAGGGAACAAAAGCTGG
Bt-pBluSKP780	Biotin-ACTAAAGGGAACAAAAGCTGG

2.5.5 Weitere verwendete Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotide, die zur Kolonie PCR oder zur Sequenzierung verwendet wurden

Kol-PCR for	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTG
Kol-PCR rev	CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG
Seq for	GTTTTCCCAGTCACGACG
Seq Rev	AGGAAACAGCTATGACCAT

2.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen

Lösung A	25mM EDTA und 75mM NaCl
Lösung B	10mM EDTA, 10mM Tris HCl pH 8,0 und 1% SDS
1xDemethylierungspuffer	20mM KCl, 10mM Tris HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, 100µg/ml BSA
Puffer A (SIRPH Analyse)	0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA)
Puffer B (SIRPH Analyse)	0,1 M TEAA, 25% Acetonitril
Puffer C (SIRPH Analyse)	75% Acetonitril
TBS	10mM Tris pH 7,5, 3mM CaCl ₂ , 20mM MgCl ₂
PBST	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , pH mit HCl auf 7,4 eingestellt, 0,1% Tween 80
2,5 M NaBisulfit Lösung	1.9g Natriumdisulfit (Natriummetabisulfit) (Merck) in 2,5ml H ₂ O und 750µl 2M NaOH lösen, 55mg Hydrochinon (1,4-benzenediol) (Sigma) in 500µl H ₂ O lösen und anschließend beide Lösungen zusammen geben
20x SSC	3 M NaCl, 300mM Natriumcitrat
1xTBE	Tris- Base 90mM, Borsäure, 90mM, 1mM EDTA
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , pH mit HCl auf 7,4 eingestellt
TE pH 8	10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA

2.7 Reaktionskits

QiaExII Gelextraktion Kit	QIAGEN; Hilden, Deutschland
pGem T System I Ligationskit	Promega, Madison, USA
High Prime Kit	
Oragene DNA Self-collection Kit	DNA Genotek, Ottawa, Canada

2.8 Isolieren von genomischer DNA

Die Gewebe oder Zellen wurden über Nacht bei 55°C in einem adäquaten Volumen an Lösung A und Lösung B (1:1) und 2 mg/ml Proteinase K aufgelöst. Diese Lösung wurde am nächsten Tag mit ½ Vol. Phenol und ½ Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 15min auf dem Überkoprotator gemischt und für 15min bei 13000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und erneut 15min auf dem Überkoprotator gemischt, bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend wie unter Abschnitt 2.9 beschrieben gefällt.

Die DNA aus Mundschleimhaut wurde mit dem Oragene DNA Self-collection Kit isoliert.

2.9 Fällern von DNA

Die DNA Lösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3M NaAc und dreifachem Volumen absoluten EtOH versetzt und für je nach erwarteter DNA Menge 1 h – 3 h bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde 1 h bei 4°C 13000 rpm (Sigma 2K15, Rotor: 12143) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die präzipitierte DNA mit 70%igem EtOH gewaschen und erneut ½ h bei 13000 rpm (Sigma 2K15, Rotor: 12143) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA Pellet so lange an der Luft getrocknet, bis keine Flüssigkeitsreste mehr zu erkennen waren. Anschließend wurde die DNA in einem angemessenen Volumen H₂O gelöst.

Wurden geringe Mengen DNA gefällt (< 500 ng), wurde der Fällung 5µg Hefe t-RNA als Präzipitationskeim zugesetzt.

2.10 Isolieren von Chromatin aus Mäuselebern

Die Präparierte Leber wurde bis zur Chromatinpräparation bei -80°C eingefroren. Zur Präparation wurde jeweils eine Leber aufgetaut, zweimal mit ca. 10ml 1xPBS gewaschen und anschließend mit 5ml TBS mit 5mM NaButyrat in einem Homogenisator desintegriert. Das Homogenisat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 1min bei 500 g bei 4°C zentrifugiert, wobei sich nicht zerkleinerte Teilchen und Reste der *debris*, im Pellet absetzen. Dann wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (10min, 4°C , 1200rpm Beckman Allegra Zentrifuge), um die vereinzelt Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 20ml TBS mit 5mM NaButyrat resuspendiert und mit 20ml TBS mit 1% Tween 40 und 0,005% PMSF und 5mM NaButyrat versetzt. Dieses Gemisch wurde 1 h auf Eis vorsichtig geschüttelt. Das Gemisch wurde dann erneut homogenisiert, um die Zellen zu zerstören. Anschließend wurden die Nuklei durch 20minütiges Zentrifugieren bei 1200 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 25ml 25%iger TBS, 5mM NaButyrat Succroslösung resuspendiert und dann mit 50%iger TBS 5mM NaButyrat Succroslösung sehr vorsichtig unterschichtet. Das Pellet wurde anschließend in Puffer (0,32 M Succrose, 50mM Tis/HCl pH 7,5, 4mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 0,1mM PMSF und 5mM NaButyrat) aufgenommen und im Kühlschrank gelagert.

2.11 Bisulfit Mutagenese

Mit Hilfe der Bisulfit Mutagenese, deren Grundprinzip 1994 von M. Frommer und S. Clark entwickelt wurde, kann man DNA Methylierung im Sequenzkontext untersuchen. Dafür macht man sich zu Nutze, dass Cytosine durch Zugabe von Sulfitionen sulfoniert und anschließend unter alkalischen Bedingungen deaminiert werden können. Dieser Vorgang ist bei Cytosinen, die methyliert sind, nur bedingt oder gar nicht möglich. Amplifiziert man die so veränderte DNA und sequenziert Abschnitte von dieser, kann man an jeder Stelle, wo ein unmethyliertes Cytosin vor der Behandlung der DNA war, nun ein Thymin detektieren, während vormals methylierte Cytosine als Cytosin in der Sequenz erhalten bleiben. Mit dieser Methode ist es prinzipiell möglich jede beliebige Region im Genom auf ihren Methylierungsstatus zu untersuchen oder sogar eine Sequenzierung des Epigenoms durchzuführen.

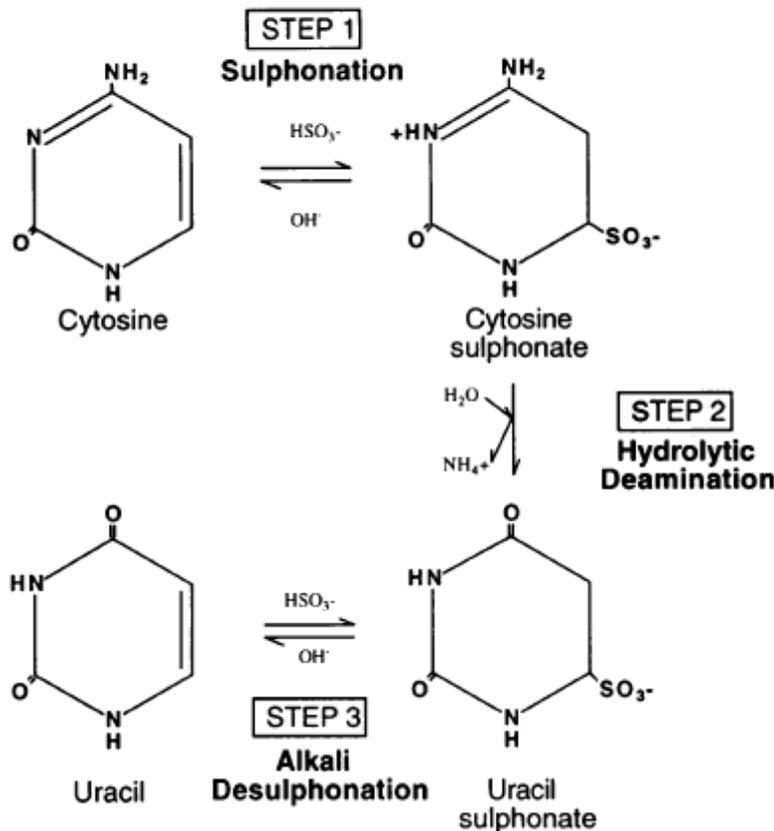


Abbildung 9: Schematische Darstellung der chemischen Veränderungen, die ein Cytosin während der Bisulfitmutagenese Behandlung erfährt. Das Cytosin wird zuerst unter sauren Bedingungen an der C6 Position zu einem Cytosinsulfonat sulfoniert und anschließend durch eine irreversible Hydrolyse deaminiert, sodass ein Uracilsulfonat entsteht. In einem letzten Schritt wird anschließend unter basischen Bedingungen die Sulfatgruppe abgelöst, sodass ein Uracil an der Stelle des ursprünglichen Cytosins entsteht.

2.11.1 Bisulfit Mutagenese isolierter genomischer DNA

500ng genomische DNA werden mit einem Restriktionsenzym nach Wahl (BamHI) über Nacht nach Angaben der Hersteller in einem Volumen von 21 μl verdaut. Anschließend wurde die DNA 10min gekocht und danach sofort auf Eis abgekühlt, um die DNA einzelsträngig vorliegend zu haben. Anschließend wurde die DNA 15min bei 50°C und Zugabe von 4 μl 2M NaOH inkubiert und mit 50 μl 2%iger LMP Agarose versetzt. Die mit der Agarose versetzte DNA wurde in eiskaltes Mineralöl pipettiert, die mit 2,5 M Natriumbisulfit Lösung (1.9g Natriumdisulfit (Natriummetabisulfit) (Merck) in 2,5ml H₂O und 750 μl 2M NaOH lösen, 55mg Hydrochinon (1,4-benzenediol) (Sigma) in 500 μl H₂O

lösen und anschließend beide Lösungen zusammen geben) unterschichtet war und so zu kleinen Kugeln geformt. Die Agarose Kugeln wurden zuerst eine halbe Stunde auf Eis inkubiert, um nicht methylierte Cytosine zu sulfonieren. Diese Reaktion läuft bevorzugt bei einem niedrigen pH Wert und bei niedrigen Temperaturen ab. Eine möglichst vollständige Sulfonierung ist dabei eine Voraussetzung für eine effizient ablaufende Umwandlung der Cytosine in Uracil. Die Deaminierung erfolgte durch Inkubation der Proben für 3,5 h bei 55°C und einem pH Wert von 5,5. Hierauf wurden die Agarose Kugeln dreimal mit 1ml 1xTE gewaschen und durch dreimalige Inkubation mit 500µl 0,3M NaOH desulfoniert. Die Agarose Kugeln wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit 1ml 1xTE neutralisiert.

2.11.2 Bisulfitmutagenese von weniger als 200 ng DNA

Wenn nur sehr geringe Mengen an genomischer DNA zur Verfügung standen, wurde das folgende Protokoll verwendet. Die isolierte genomische DNA wurde in einem Volumen von 4µl 1h bei 37°C verdaut (BamHI), mit 4µl 2M NaOH und 15µl 2% LMP Agarose versetzt, mit ca. 200µl Mineralöl überschichtet und 10min in einem Wasserbad gekocht. Die Agarose wurde dann 15-20min abgekühlt, das Mineralöl entfernt, das Agarosekügelchen mit 400µl Natriumbisulfitlösung (siehe Abschnitt 2.11.1) überschichtet und dann wie unter Abschnitt 2.11.1 beschrieben weiter behandelt.

2.11.3 Bisulfit Mutagenese von bis zu 100 isolierten Zellen

Die isolierten Zellen wurden, mit 15µl 2%iger *low melting point* Agarose versetzt, mit 300µl Mineralöl überschichtet und, um die Zellen zu zerstören, 10min im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Proben auf Eis solange abgekühlt, bis die Agarose fest war. Danach wurde das Mineralöl abgenommen. Die Proben wurden mit 200µl Lösung A (25mM EDTA, 75mM NaCl) und 1 mg/ml Proteinase K (Roche, PCR grade) über Nacht bei 55°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Proteinase K Lösung abgenommen und die Proben, um die DNA zu denaturieren, mit 1µl 2M NaOH 10min im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Das Agarose Kügelchen wurde mit 400µl Natriumbisulfitlösung (siehe Abschnitt 2.11.1) überschichtet und, wie unter Abschnitt 2.11.1 beschrieben, weiter behandelt, wobei alle Waschschrte mit einem Volumen von

400µl durchgeführt wurden. In diesem Fall wird kein Restriktionsverdau der genomischen DNA benötigt.

2.11.4 Analysen von Bisulfit Sequenzen

Da das Ergebnis der Analyse einer Bisulfitmutagenese sehr von der Auswertung der erhaltenen Sequenzen abhängt, soll diese hier genauer erläutert werden. Alle Kriterien für die Auswertung von Bisulfitsequenzen sind in das Programm Biq Analyzer (Bock et al. 2005) eingeflossen, an dessen Entwicklung ich beteiligt war.

Für die Auswertung der Bisulfitsequenzen wurde ein Sequenzalignment mit Hilfe des Clustal W Programms (Chenna et al. 2003) durchgeführt. Hierfür wurde zuerst eine sogenannte Referenzsequenz erstellt. Dabei handelt es sich um die genomische Sequenz der amplifizierten Region, bei der alle Cytosine, auf die kein Guanin folgt, durch Thymin ersetzt wurden. Ein erstes wichtiges Kriterium für die Auswertung der Sequenzen ist es zu überprüfen, ob die erhaltenen Sequenzen homolog zu der Referenzsequenz sind. Hierfür wurde eine Mindestübereinstimmung von ca. 70% ausgewählt. In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob die Bisulfitmutagenese mit einer Effizienz von mindestens 92% abgelaufen ist. Dafür wurde Anzahl und Position der Cytosine ermittelt, auf die in der genomischen Sequenz kein Guanin folgt. Diese Positionen wurden dann mit den entsprechenden Stellen in den erhaltenen Sequenzen verglichen und dabei überprüft, wie viele Cytosine nach Bisulfitmutagenese an diesen Positionen noch vorhanden sind. Sind nach Bisulfitmutagenese mehr als 8% dieser Cytosine in einer Sequenz noch vorhanden, werden diese Sequenzen aus der Analyse ausgeschlossen.

Wichtig ist es zu vermeiden, dass Sequenzen gleichen Ursprungs doppelt gezählt werden. Das ließ sich durch einen Vergleich von Methylierungsmuster und Konvertierungsmuster (nicht mutierte Cytosine) der einzelnen Sequenzen erreichen. Ließ sich hier kein Unterschied erkennen, wurden diese identischen Sequenzen ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen. Zum Schluss wurde der Methylierungsgrad der verbliebenen Sequenzen in Prozent ermittelt.

2.12 PCR

Alle PCRs wurden, wenn nicht im Text anders vermerkt, nach folgendem Protokoll angesetzt.

Oligonukleotide F	0,4nM
Oligonukleotide R	0,4nM
Template	variabel
dNTPs (je)	0,4mM
Taq	2,5U
Puffer	1x
MgCl ₂	1,5mM
Reaktionsvolumen	50µl

2.13 Southern blot

10µg genomische DNA wurden in einem Reaktionsansatz von 100µl mit je zwei Restriktionsenzymen in den vom Hersteller angegebenen Puffern geschnitten (Lit1: NotI und E.coRI; H19: PstI und SmaI), anschließend wie unter Abschnitt 2.9 beschrieben gefällt, in 15µl H₂O aufgenommen und auf einem 1% TBE Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (4µg/ml) angefärbt und das Auftrennungsergebnis dokumentiert. Das Agarosegel wurde dann 15-20min in ca. 250ml 0,25 M HCl inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, zweimal je 15min in 250ml einer Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH inkubiert, erneut in H₂O gewaschen und in 250ml 1 M Ammoniumacetat 0,02 M NaOH Lösung ca. 30min neutralisiert. Das Gel wurde danach in 20xSSC (3 M NaCl, 300mM Natriumcitrat) äquilibriert und mit der DNA Seite nach oben auf eine aus Whatman Papier bestehende Pufferbrücke, die in ein 20xSSC Reservoir hineinragt, gelegt. Dies wurde mit einer auf die Größe des Gels zugeschnittenen, ebenfalls in 20xSSC getränkten positiv geladenen Nylonmembran (Roche) bedeckt. Darüber kamen drei Blätter trockenes Whatman Papier und ein ca. 10 cm hoher Stapel Papierhandtücher. Der Aufbau wurde mit einem Gewicht beschwert und die DNA so über Nacht auf die Membran transferiert. Die DNA wurde am nächsten Morgen mit einer Energie von 0,12 Joules in einem UV Stratalinker 1800 (Stratagene) kovalent an die Membran gebunden. Die Membran konnte nun bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Um den gewünschten DNA Abschnitt sichtbar zu machen, musste die Membran mit einer für den Genabschnitt passenden komplementären DNA Sonde hybridisiert werden. Dafür wurde die Membran 2h bei 70°C mit 10ml Church Puffer (0,5 M Natriumphosphat pH 7,2, 7% (w/v) SDS, 1mM EDTA pH 7) prähybridisiert. Die Sonde, mit Hilfe des High Prime Kits von Roche nach Angaben des Herstellers hergestellt und mit Hilfe der ProbeQuant G-50 *micro columns* aufgereinigt, wurde anschließend denaturiert (10min bei 95°C erhitzt) und vollständig zur Prähybridisierungslösung dazugegeben. Die Membran wurde bei 65°C über Nacht in einem Hybridisierungsofen (Stratalinker) hybridisiert, am nächsten Morgen erst dreimal eine halbe Stunde bei 65°C mit 2xSSC und 0,1% SDS und anschließend dreimal eine halbe Stunde bei 60°C mit 0,5xSSC und 0,1% SDS gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran mit H₂O abgespült, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Kodak Fotokassette mit einem Kodak BiMax MS Film exponiert.

Der Film wurde nach angemessener Expositionszeit mit Liquid Röntgenentwickler von TETENAL entwickelt und mit Röntgen SUPERFIX von TETENAL fixiert. Zur Auswertung wurde der Film mit einem handelsüblichen Flachbildscanner digitalisiert.

2.14 Auswertung von Southern Blot Analysen

Der digitalisierte Film wurde mit Hilfe des Gelanalysemoduls der ImageJ Software ausgewertet. Es wurden die Laufspuren der unterschiedlichen Proben angegeben und das Programm erstellte daraufhin ein Intensitätsprofil über die angegebene Spur. Anschließend habe ich die Flächen, die die jeweiligen Fragmente repräsentieren definiert und von ImageJ die Anzahl der Pixel der jeweiligen Fläche bestimmen lassen. Ich habe für diese Analyse eine starre Basislinie gewählt.

2.15 SIRPH

Bei der SIRPH Analyse wird ein Oligonukleotid mit einem Didesoxynukleosidtriphosphat in einer Sequenzierreaktion um genau eine Base verlängert. Die so verlängerten Oligonukleotide wurden anschließend auf einem WAVE Nucleic Acid Analysis System (Transgenomics) über eine „DNA-sep column“ Säule aufgetrennt.

Die jeweils zur Auftrennung verwendeten Acetonitrilgradienten sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben, ebenso die verwendeten Puffer. Bei allen Analysen betrug die Ofentemperatur 50°C, die Durchflussrate 0,9ml/min.

Tabelle 7: Für die SIRPH-Analyse des Lit1 Promotors verwendeter Gradient

Ablauf	Zeit [min]	% Puffer A	% Puffer B
Laden	0	77	23
Start des Gradienten	0,1	75	25
Stopp des Gradienten	15,1	63	37
Start der Säulenreinigung	15,2	0	100
Stopp der Säulenreinigung	16,2	0	100
Start der Equilibrierung	16,3	77	33
Stopp der Equilibrierung	17,3	77	23

Tabelle 8: Für die SIRPH-Analyse der CTCF Bindungsstelle im H19 Gen verwendeter Gradient

Ablauf	Zeit [min]	% Puffer A	% Puffer B
Laden	0	77	23
Start des Gradienten	0,1	75	25
Stopp des Gradienten	10,1	67	33
Start der Säulenreinigung	10,2	0	100
Stopp der Säulenreinigung	11,2	0	100
Start der Equilibrierung	11,3	77	23
Stopp der Equilibrierung	12,3	77	23

Tabelle 9: Für die SIRPH-Analyse der Smal Restriktionsschnittstelle im Promotor des H19 Gens

Ablauf	Zeit [min]	% Puffer A	% Puffer B
Laden	0	78	22
Start des Gradienten	0,1	76	24
Stopp des Gradienten	12,6	66	34
Start der Säulenreinigung	12,7	0	100
Stopp der Säulenreinigung	13,7	0	100
Start der Equilibrierung	13,8	78	22
Stopp der Equilibrierung	14,8	78	22

2.16 Fibroblasten Zellkultur

Die Primären Fibroblasten wurden von der Arbeitsgruppe Zang der Universitätsklinik Homburg/Saar isoliert und in Kultur genommen.

Die weitere Kultivierung erfolgte in DEMEM, das mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin (Gibco BRL) versetzt war.

2.17 RNA Präparation aus Fibroblasten Zellkultur

Die Fibroblasten wurden von Medium befreit, einmal mit PBS (5-10ml, je nach Größe der verwendeten Kulturflaschen) gewaschen und anschließend mit 3ml Trizol Reagenz (Invitrogen) vom Boden der Kulturschale abgelöst, in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und mit 600µl Chloroform versetzt. Die Proben wurden 15min bei 4°C, 13000 rpm in einer „Beckman Coulter Allegra 25R Zentrifuge“ (Rotor: TS-5.1-500, Horizontal) zentrifugiert und die Überstände in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wurde am nächsten Tag 1 h bei 4°C und 13000 rpm pelletiert und mit 70% EtOH (angesetzt mit DEPC H₂O) gewaschen, anschließend erneut eine halbe Stunde bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA Pellets wurden solange bei Raumtemperatur getrocknet, bis im Reaktionsgefäß keine Flüssigkeit mehr zu sehen war. Anschließend wurde die RNA in 20µl DEPC H₂O gelöst und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm (in einem Bionate 3 UV-Photospektrometer von Thermo Spectronic) bestimmt, wobei 1OD 40µg/ml RNA entspricht.

2.18 RT-Reaktion

Die präparierte RNA wurde mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde 1µg total-RNA 10min bei 70°C denaturiert und anschließend in einem Reaktionsvolumen von 20µl in 1xRT Puffer mit 7units M-MLV Reverse Transkriptase RNase H minus, 5ng/µl *random* Hexamer Oligonukleotiden, 0,8units RNAsin (alle vier Komponenten von Promega), und 30mM dNTPs (alle zu gleichen Teilen) 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, in dem sie 10min auf 70°C erhitzt wurde.

2.19 Quantitative PCR

Die Reaktionen wurden in einem MX3000 qPCR System von Stratagene nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Volumen des Reaktionsansatzes	20µl
<i>Template</i> (1:100 verdünnte RT- Reaktion)	10µl
Rhodamin (Stratagene)	3×10^{-5}
SYBR green(BMA BioWhittaker Molecular Applications)	5×10^{-6}
Oligonukleotid1	0,25µM
Oligonukleotid 2	0,25µM
Taq (Platinum Taq DNA-Polymerase, Invitrogen)	0,025units/µl
MgCl ₂	1,5mM
dNTPs (je)	0,2mM

Das Temperaturprofil war wie folgt:

Initiale Denaturierung und Taq Aktivierung	10min	95°C	
Denaturierung	40sec	95°C	45 Wiederholungen
Anlagern der Oligonukleotide	40sec	63°C	
Elongation der DNA	1min	72°C	

Die Detektion der Amplifikation erfolgte jeweils nach dem Anlagern der Oligonukleotide, die Bestimmung der Schmelzkurve nach dem letzten Zyklus. Dafür wurde folgendes Temperaturprofil verwendet.

Denaturierung	45sec	94°C
Renaturierung	45sec	55°C
langsame Denaturierung	bis	94°C

2.20 Auswertung der Amplifikationskurven der quantitativen Echtzeit-PCR

Um aus den mit Hilfe der quantitativen Echtzeit PCR gewonnenen Daten ableiten zu können, ob in einer Probe mehr Ausgangs RNA enthalten war, als in einer anderen, wurde der C_T-Wert für jede einzelne Reaktion bestimmt. Er beschreibt den Zyklus, bei dem das gemessene Signal (SYBR green) über das Hintergrundsignal ansteigt. Nachfolgende Formel kann zur Berechnung der C_T-Werte herangezogen werden (Wilhelm and Pingoud 2003).

$$F = pN_0 (2\varepsilon)^C$$

F steht für das gemessene Fluoreszenzsignal, p ist ein Proportionalitätsfaktor, der das Verhältnis von Signal zu DNA-Menge beschreibt, N_0 entspricht der Anzahl der in die Reaktion eingesetzten Kopien der Zielsequenz, ε gibt die Effizienz der Amplifikation an und C steht für die Anzahl durchlaufener Zyklen. Idealerweise entspricht die Effizienz $\varepsilon=1$, das heißt, in jedem Zyklus wird die Anzahl der Kopien der Zielsequenz verdoppelt. Normalerweise gilt für Reaktionen eine Effizienz $\varepsilon < 1$, bedingt durch die Qualität der in die Reaktion eingesetzten DNA, Affinitätsunterschiede der DNA-Polymerase zu ihrem Substrat etc.. Daraus folgt, dass der Wert für ε bei jeder einzelnen Reaktion unterschiedlich ausfallen kann. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Reaktionen zu gewährleisten, wurde die Effizienz ε für jede Amplifikationskurve berechnet und anschließend auf 1 normiert.

Dazu wurde ein in der Arbeitsgruppe Lipp (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) programmiertes Makro in IGOR verwendet. Dieses Makro bildet über die Messwerte des 5. bis 18. Zyklus den Mittelwert, der als Basislinie verwendet wird. Der Schwellenwert (horizontale gestrichelte Linie in Abbildung 10) für ein Signal wurde bei dreifacher Standardabweichung (σ) festgelegt. Ein Signal ist definiert, als drei aufeinander folgende Zyklen deren Fluoreszenzwerte über dem Schwellenwert liegen (\oplus in Abbildung 10). Um ε für jede Amplifikationskurve zu bestimmen wird eine Anpassung (grüner Graph) der oben aufgeführten Gleichung an die Fluoreszenzwerte von 10 Zyklen um den Schwellenwert herum vorgenommen. Der Start der Anpassung wurde auf den 4. Wert unterhalb des Schwellenwertes festgelegt. So konnte ε berechnet werden und gleichzeitig ein korrigierter C_T -Wert (senkrechte, grün gestrichelte Linie) ermittelt werden.

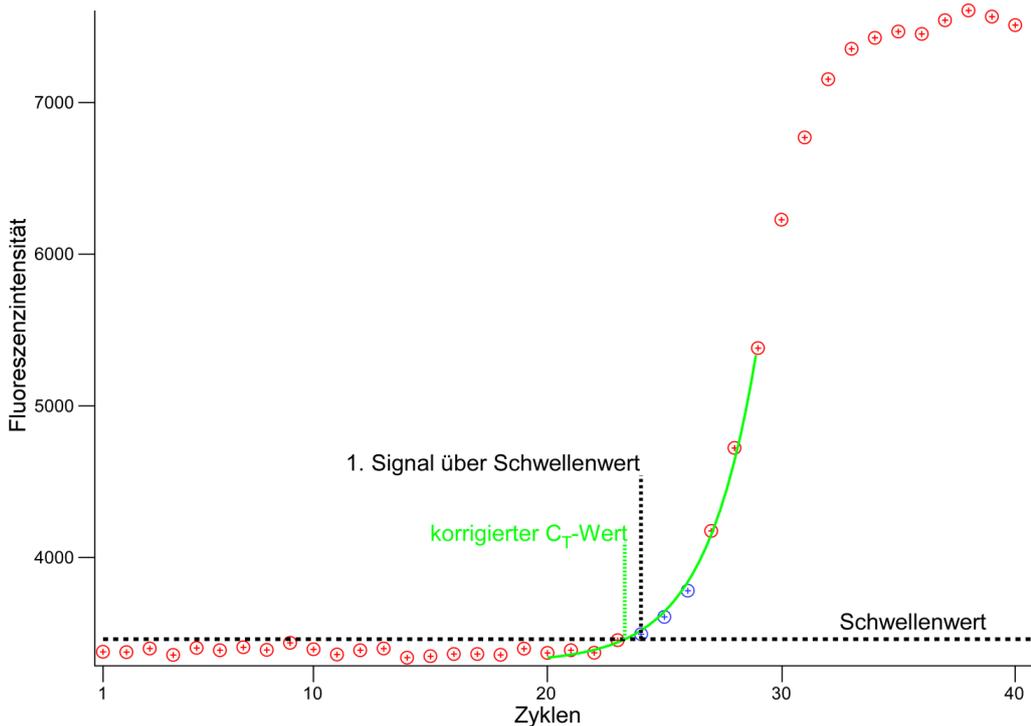


Abbildung 10: Repräsentative Amplifikationskurve einer Reaktion aus der quantitativen Echtzeit-PCR. Die während der Reaktion gemessenen Fluoreszenzsignale sind als Punkte (⊕) dargestellt. Der Schwellenwert, der 3σ über dem Mittelwert der Fluoreszenzsignale der Zyklen 5-18 liegt, ist als horizontale Linie eingezeichnet. Markiert ist der Zyklus, dessen Signal erstmals oberhalb des Schwellenwerts liegt. Von Zyklus 20 aus wurde über 10 Zyklen, wobei 4 unterhalb des Schwellenwerts liegen, eine Anpassung nach der oben erwähnten Gleichung vorgenommen (grüner Graph). So konnte der korrigierte C_T -Wert bestimmt werden.

Die absolute Anzahl der in jeder Reaktion eingesetzten Kopien (N_0) wurde nicht bestimmt, da sie in diesem Fall für jedes PCR-Produkt p durch viele Verdünnungsreihen hätte bestimmt werden müssen. Es sollten nur relative Unterschiede bestimmt werden.

2.21 Analyse der C_T -Werte

Der charakteristische Messwert der quantitativen Echtzeit-PCR ist der C_T -Wert. Wie in der Formel der Amplifikationsreaktion zu sehen ist (Abbildung 10), handelt es sich um den Exponenten, der in der Gleichung für die Anzahl (C) der Zyklen steht. Da sich in den Werten kein Nullpunkt festlegen lässt, wurden die Werte als ordinalskaliert betrachtet. Auf einer Ordinal- oder Rangskala können die Werte sinnvoll in einer Rangfolge angeordnet werden. Damit ist aber die Angabe von Mittelwerten nicht mehr zulässig (siehe L. Sachs; Angewandte Statistik; S. 204f; 2002). Stattdessen wird der Median, der mittlere Wert der Rangfolge, berechnet. Als Maß für die Schwankung wird der sog. Quartilabstand

angegeben, der das Intervall der Werte zwischen dem ersten Quartil (unteres Viertel der Werte) und dem dritten Quartil (drittes Viertel der Werte) beschreibt. Die Angabe von mittleren C_T -Werten als Mediane und deren Abweichungen als mittlere Quartilabstände scheint durchaus üblich zu sein (Bustin 2000; Grzeskowiak et al. 2003; Radonic et al. 2004). Die Ordinalskalierung hat den Vorteil, dass einerseits die Voraussetzungen, die die Messwerte erfüllen müssen, um dieser Art der Skalierung zu genügen, weniger einschränkend sind. Auf der anderen Seite werden mit dieser Methode Unterschiede erst später als signifikant erkannt. Für die Analysen der von mir gemessenen C_T -Werte habe ich folgende Methoden angewandt.

Zum Vergleich der Verteilung der C_T -Werte zwischen zwei Testpersonen habe ich den exakten Rangsummentests nach Wilcoxon als spezifische Form des U-Tests für kleine Stichproben (siehe Lienert, G. A., Verteilungsfreie Methoden der Biostatistik; Band 1, S. 230f, 1973) angewandt. Der U-Test ist ein verteilungsunabhängiges Testverfahren für unabhängige Stichproben, die rangskaliert sind.

Die Korrelationsanalysen der C_T -Werte wurden aufgrund der ordinalskalierten Werte als Rangkorrelationen nach Spearman (siehe L. Sachs; Angewandte Statistik; S. 512f; 2002) durchgeführt, um so den Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) zu bestimmen.

$$\textit{Verhältnis} = \frac{2^{\Delta C_T(\text{Median Gen } x_i - \text{Median Gen } x_j)}}{2^{\Delta C_T(\text{Median Referenz } g_{n_i} - \text{Median Referenz } g_{n_j})}}$$

Ich habe allerdings im Gegensatz zu der bei Pfaffl veröffentlichten Methode weiterhin mit den Medianen der C_T -Wert-Rangfolge gerechnet.

2.22 Präparation von PGC bzw. Gonaden Anlagen

Die Mäuse wurden über Nacht miteinander verpaart und 12:00 Uhr des Tages, an dem der *plug* (in der Vaginalöffnung eingetrocknetes Sperma) detektiert wurde, als 0,5 dpc definiert. Die Mütter wurden in den entsprechenden Stadien (9,5 – 11,5 dpc) durch Genickbruch getötet und der Uterus, in dem sich die Embryonen befinden, herauspräpariert. Zusätzlich zur Detektion des vaginalen *plugs* diente die Morphologie der Embryonen zur Bestimmung des jeweiligen Entwicklungsstadiums (siehe *Manipulating the*

mouse embryo, Brigid Hogan, Rosa Beddington, Frank Costantini und Elizabeth Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994, second edition, Seite 22).

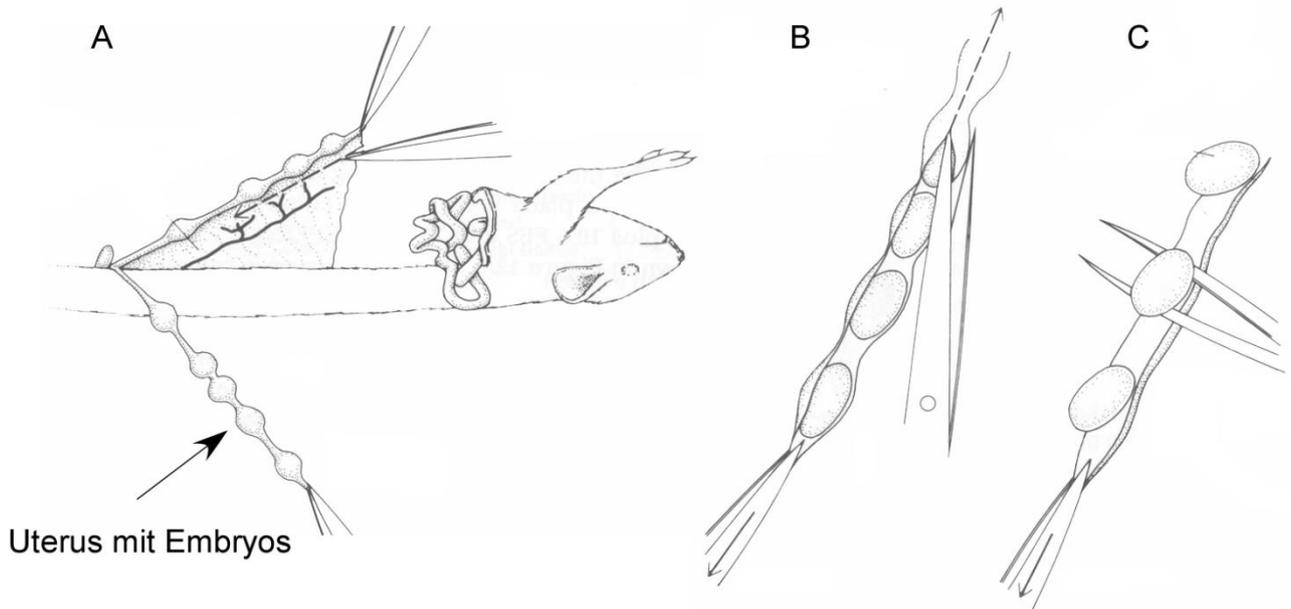


Abbildung 11: Schematische Darstellung der ersten Schritte der Präparation von PGCs. Erläuterungen siehe Text. (Modifiziert nach: *Manipulating the mouse embryo*, Brigid Hogan, Rosa Beddington, Frank Costantini und Elizabeth Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994, second edition, Seite 153)

Anschließend wurde der Uterus in eine Präparierschale transferiert und mit Nadeln in der Schale festgesteckt, sodass der Uterus leicht unter Zug stand. Dann wurde der Uterus vorsichtig mit einer Schere aufgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, die Embryonen nicht zu zerdrücken. Nun konnten die Embryonen aus dem geöffneten Uterus entnommen werden. Je nach Entwicklungsstadium wurden die Bereiche, in denen die PGCs lokalisiert waren, präpariert und isoliert.

2.23 Immunologische Färbungen

Die Zellen wurden in PBS auf Objektträger (Silanpräp von Sigma) pipettiert und anschließend bei 4°C mindestens eine halbe Stunde stehen gelassen, damit sich die Zellen auf dem Objektträger absetzen konnten. Dabei war es von besonderer Bedeutung, dass so wenig Medium wie möglich transferiert wurde, da schon Spuren von BSA eine effiziente Anheftung stören. Anschließend wurden die Zellen nach folgendem Protokoll weiter behandelt.

Fixierung	15min	Raumtemp.	PFA 3,7% in 1xPBS	Im Tropfen auf dem Objektträger
Waschen	1-2min	Raumtemp.	PBS	In einer Küvette
Permeabilisierung	5min	Raumtemp.	1xPBS 0,2% TritonX 100	In einer Küvette
<i>blocking</i>	Über Nacht	4°C	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃	In einer Küvette

Für die Färbung mit Antikörpern gegen methyliertes Cytosin müssen die Zellen nach dem Permeabilisieren noch weiteren Behandlungen unterzogen werden, die im folgenden aufgeführt sind.

Denaturieren der DNA	Ca. 30min	Raumtemp.	2,4 M HCl	In einer Küvette
Waschen	1-2min	Raumtemp.	PBS	In einer Küvette
Neutralisieren	10min	Raumtemp.	100mM Tris CL pH 8,0	In einer Küvette
Fixierung	15min	Raumtemp.	PFA 3,7% in 1xPBS	Im Tropfen auf dem Objektträger
Waschen	1-2min	Raumtemp.	PBS	In einer Küvette
Permeabilisierung	5min	Raumtemp.	1xPBS 0,2% TritonX 100	In einer Küvette
<i>blocking</i>	Über Nacht	4 °C	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃	In einer Küvette

Die weitere Behandlung ist für alle Proben gleich, unabhängig davon, ob die DNA denaturiert wurde oder nicht.

1. Antikörper	Über Nacht	4°C	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃ jeweiliger Antikörper	Objektträger rund um die fixierten Zellen trocknen, die ca. 50µl Antikörperlösung dazugeben und mit einem mit Abstandshaltern versehenen Deckglas abdecken
<i>blocking</i>	1h	Raumtemp.	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃	In einer Küvette

2. Antikörper	Über Nacht	4°C	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃ jeweiliger Antikörper	Objektträger rund um die fixierten Zellen trocknen, die ca. 50µl Antikörperlösung dazugeben und mit einem mit Abstandshaltern versehenen Deckglas abdecken
Waschen	1-2min	Raumtemp.	PBS	In einer Küvette
<i>blocking</i>	1h	Raumtemp.	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃	In einer Küvette
Waschen	1-2min	Raumtemp.	PBS	In einer Küvette
Fixierung	15min	Raumtemp.	PLP	Im Tropfen auf dem Objektträger
Waschen	1-2min	Raumtemp.	PBS	In einer Küvette
<i>blocking</i>	1h	Raumtemp.	1xPBS 0,1% TritonX 100 1% BSA 0,05% NaN ₃	In einer Küvette
<i>mounting</i>			mounting media (Vectashield) DAPI (0,5µg/ml)	Zellen mit ca. 3µl mounting media eindeckeln

2.24 Konfokalmikroskopie

Die Proben wurden mit einem VisiTec Int. QLC100 *confocal imaging system*, das an einem inversen Nikon TE-2000U Mikroskop angebracht war, welches mit einer ORCA-ER-Kameras (Hamamatsu) ausgestattet, analysiert. Die Detektion des Fluoreszenzsignals des Antikörpers erfolgte durch die Nutzung 541nm Linie eines Ar/Kr Gaslasers (LaserPhysics) zusammen mit den passenden Filtersätzen. Die Aufnahmen der Zellen erfolgte durch ein Plan Apo 100x/1.40 Ph3 DM Ölimmersionsobjektiv (Nikon).

2.25 Präparation von Extrakten aus Dottersäcken

Die Dottersäcke von Mausembryonen wurden in dem jeweils angegebenen Entwicklungsstadium präpariert und anschließend in 1x Demethylierungspuffer (1:10 Gewicht / Volumen) entweder durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder durch Pipettieren mit einer Kanüle desintegriert. Die desintegrierten Dottersäcke wurden

anschließend in einem Bioruptor (Diagenode USA) 10min (30sec an, 30sec aus) im Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt. In beiden Fällen wurden die Proben danach eine halbe Stunde bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in die jeweilige Reaktion eingesetzt.

2.26 Präparation von Extrakten aus Gonadenanlagen

Die Gonadenanlagen wurden in den entsprechenden Entwicklungsstadien präpariert und anschließend in 10µl 1x Demethylierungspuffer aufgenommen, dann entweder in einem Bioruptor (Diagenode USA) 10min (30sec an, 30sec aus) im Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt oder durch 5maliges Einfrieren in Stickstoff desintegriert. Diese Extrakte wurden nicht zentrifugiert, sondern direkt in die Reaktionen eingesetzt.

2.27 Nachweis von DNA Demethylierung mit Hilfe der Bisulfitmutagenese

Für diesen Nachweis wurden jeweils 50 ng (0,5µl) genomische DNA oder Chromatin (wie unter Abschnitt 2.8 und 2.10 beschrieben) mit 10µl Dottersack-, Plazenta- oder adulte Nierenextrakt mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Bei PGC Extrakten wurde ein Volumen von 2µl für die Inkubation verwendet.

Anschließend wurde die DNA wie in Abschnitt 2.8 beschrieben isoliert. Hier wurde allerdings sowohl zu dem Proteinase K Verdau als auch zur Fällung der DNA jeweils 5µg Hefe t-RNA zugegeben und der Proteinase K Verdau nur eine Stunde und bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA einer Bisulfitmutagenese (Abschnitt 2.11.2) unterzogen. Von dieser so modifizierten DNA wurde dann spezifisch für das SD7 Allel das Lit1 Gen amplifiziert. Dafür wurden die Oligonukleotide SD7binew, litSD7 CpG18SAR und Lit1 R2 verwendet. Die Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des QiaExII Kits aufgereinigt, in dem pGEM T Kit legiert und in Top 10 F⁻-Zellen transformiert. Von den transformierten Bakterien wurden einzelne Klone mit Hilfe der Kolonie PCR (Abschnitt 2.12) amplifiziert und anschließend sequenziert.

2.28 Radioaktives Detektionsverfahren zur Analyse von DNA-Demethylierung

Mit diesem Verfahren sollte ein Verlust von Methylierung, der als Reduktion eines radioaktiven Signals zu beobachten wäre, nachgewiesen werden. Wichtig war es hierbei sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um die Reduktion des Signals handelt und dass diese Reduktion nicht zufällig ist oder etwa dadurch entsteht, dass das Substrat degradiert. Hierfür wurde ein DNA Fragment ausgewählt, das Methylierungspositionen sowohl für eine CpG spezifische Methyltransferase als auch für solche, die von einer Adeninmethyltransferase erkannt werden, aufweist. Im Idealfall sollten die Erkennungssequenzen separat von einander in diesem Fragment liegen, so dass man anschließend den Verbleib von CpG Methylierung und Adeninmethylierung unabhängig von einander messen kann. Ich habe ein Substrat verwendet, das genau diesen Kriterien entspricht. Das Substrat und die Lage der Erkennungsstellen ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt. Die gelben Striche symbolisieren die Positionen die von der M.HhaI Methyltransferase (G^*CGC , wobei das $*C$ methyliert wird) erkannt und methyliert werden können, während die roten Striche die Erkennungsstellen der M.TaqI Methyltransferase (TCG^*A , wobei das $*A$ methyliert werden kann) anzeigen. Der schwarze Strich steht für die Erkennungsschnittstelle der KpnI Endonuklease, mit deren Hilfe man das Fragment zwischen den M.HhaI und M.TaqI Erkennungsstellen zerschneiden kann, um beides von einander zu trennen.



Abbildung 12: Schematische Darstellung der Demethylierungssubstrate. Das linke Fragment trägt ein Biotin (Bt) am vorderen Ende des Fragments. Das rechts abgebildete Substrat trägt ein Biotin am hinteren Ende. Die Erkennungsstellen der Methyltransferase M.HhaI und M.TaqI sind als gelbe bzw. rote Striche dargestellt.

5µl Demethylierungsextrakt (Abschnitt 2.25) wurden mit 10pmol Demethylierungssubstrat, bei dem es sich um ein PCR Produkt handelte, das auf einer Seite ein Biotin trägt, bei 37°C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 7µl dieses Reaktionsgemisches in eine mit Avidin beschichtete Mikrotiterplatte (immobilizer streptavidin F96, clear von Nunc), die mit 50µl PBST NaCl gefüllt war, überführt. Zu den

jeweiligen Zeitpunkten wurden zwei Proben abgenommen. Während einer halbstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das DNA Substrat an die Wand der Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wurde der nicht gebundene Überstand in Szintillationsgefäße, die mit 2ml Szintillationscocktail (ultima gold, Perkin Elmer) gefüllt waren, pipettiert und die Proben in einem Scintillation counter (Packhardt) gezählt. Die Mikrotiterplatte wurde dreimal mit je 200µl PBST NaCl gewaschen und das in der Mikrotiterplatte gebundene Substrat zum Teil durch Inkubation mit KpnI abgedaut. Der Verdau wurde wieder mit 2ml Szintillationscocktail gemessen. Die wells der Mikrotiterplatte wurden erneut dreimal mit 200µl PBST NaCl gewaschen. Der verbliebene Rest des Substrates wurde durch Verdau mit Mikrokokken Nuklease (Sigma) gelöst, dann ebenfalls mit 2ml Szintillationscocktail vermessen.

Zur Auswertung der Versuche wurden die Mittelwerte der einzelnen Messpunkte zu jedem Zeitpunkt errechnet und die im Substrat gebundene Radioaktivität ins Verhältnis zur Summe der Radioaktivität des Überstandes und der gebundenen Fraktion gesetzt. Dann folgte der Vergleich der Kurve des mit M.HhaI methylierten Substrats mit dem Verlauf der Kurve des mit TaqI methylierten Substrats. Zeigt sich hier ein Verlust von Radioaktivität in der gebundenen Fraktion des mit M.HhaI methylierten Substrats (in Abbildung 13 als blaue Linie dargestellt), nicht aber in dem mit M.TaqI methylierten Substrat (in Abbildung 13 als rote Linie dargestellt), ist von einem Verlust von Cytosin Methylierung auszugehen, s der nicht auf die Degradation des Substrates zurückzuführen wäre. Kommt es sowohl in dem mit M.HhaI methylierten Substrat als auch in dem mit M.TaqI methylierten Substrat zu einem Verlust von Radioaktivität, ist davon auszugehen, dass das Substrat degradiert wurde. In diesem Fall kann keine Aussage über den Verlauf der Demethylierung gemacht werden. Beispiele für die jeweiligen Kurvenverläufe sind in Abbildung 13 dargestellt.

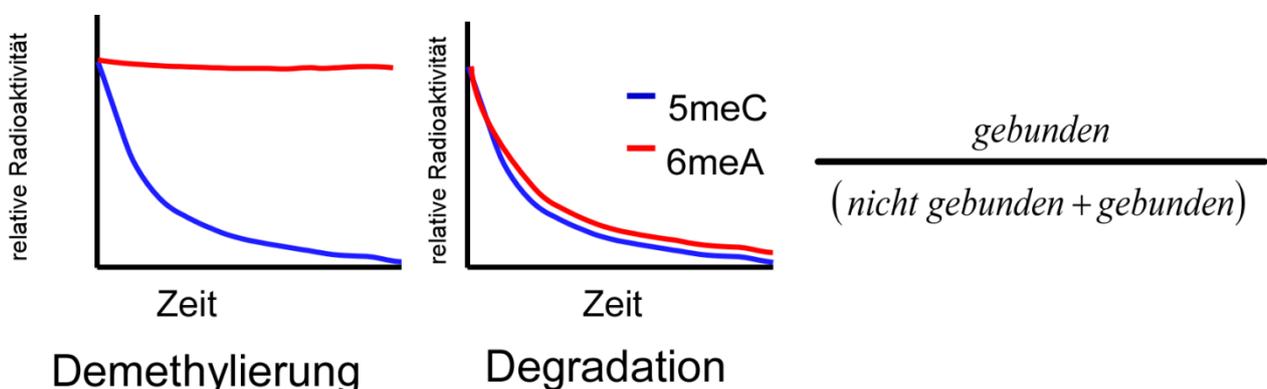


Abbildung 13: Schematische Darstellung von Demethylierung (links) und Degradation (rechts), die mit Hilfe des radioaktiven Detektionsverfahrens ermittelt werden können.

2.29 Methylierung des Demethylierungssubstrats mit H3 AdoMet

Es wurde eine PCR mit 5ng pBlu2SKP und den Oligonukleotiden pBluSKP269F, Bt-pBluSKP269F, pBluSKP780 und Bt-pBluSKP780 nach dem unter Punkt 2.12 aufgeführten Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wurden entweder pBluSKP269F und Bt-pBluSKP780 oder Bt-pBluSKP269F und pBluSKP780 mit einander kombiniert. Das PCR Produkt wurde anschließend mit Quick Clean (Bioline) aufgereinigt. 50 ng des aufgereinigten PCR Produkts wurden in dem vom Hersteller angegebenen 1x Puffer mit 5µl des jeweiligen Enzyms (beide NEB) und 5µl ³H markiertem AdoMet (spezifische Radioaktivität: $2,76 \times 10^{15}$ Bq/mol) 3h bei 37°C (M.HhaI) bzw. 65°C (M.TaqI) inkubiert. Anschließend wurde das methylierte Substrat von dem freien ³H markierten AdoMet durch Aufreinigung mit QiaExII (Qiagen) getrennt. Zuletzt wurden die Konzentration des markierten Substrats und die Menge an eingebauter Radioaktivität bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische Nachweismethoden von DNA-Demethylierung

In einzelnen Laboren (Jost 1993; Bhattacharya et al. 1999; Baumer 2002; Barreto et al. 2007) konnte aktive Demethylierung der DNA nachgewiesen werden, dies ließ sich allerdings nicht von anderen Gruppen als allgemeingültig wiederholen (Ng et al. 1999; Boeke et al. 2000; Bennett et al. 2006; Jin et al. 2008). Deshalb gehe ich davon aus, dass weder der Mechanismus noch die tatsächlich an diesem Prozess beteiligten Komponenten bekannt sind. Um die Prozesse, die in der Reprogrammierung der DNA während der Entwicklung eines Organismus eine Rolle spielen, besser verstehen zu können und um die daran beteiligten Komponenten zu identifizieren oder einzugrenzen, habe ich einen Versuchsansatz entwickelt. Mit dessen Hilfe ist es möglich, diese Prozesse zu studieren und evtl. einzelne Komponenten auf ihre Fähigkeit, DNA zu reprogrammieren, zu testen. Grundvoraussetzung für eine aussagekräftige Nachweismethode war es, sowohl ein geeignetes DNA-Substrat zu finden als auch geeignete Zellen. Für die Auswahl der Zellen habe ich in der Literatur nach Zellen gesucht, in denen eine möglichst umfangreiche Reprogrammierung des Genoms erfolgt.

Hinweise auf die aktive DNA Reprogrammierung in Mäusen hat man bisher aus befruchteten Eizellen (Santos et al. 2002), von primordialen Keimzellen (PGCs) (Hajkova et al. 2002) und der Mauszelllinie C2C12 (Jost et al. 2001). C2C12 Zellen sind Maus-Myoblasten, die, wenn man sie zur Differenzierung anregt, einige Gene, wie z.B. das Myogenin, aktiv demethylieren. C2C12 Zellen haben einen großen Vorteil gegenüber den beiden anderen genannten Zelltypen, da es sich um eine relativ einfach zu kultivierende Zelllinie handelt, die daher in fast beliebiger Menge herzustellen ist. Ein Nachteil dieser Zelllinien besteht darin, dass es sich um artifizielle Systeme handelt, damit bleibt unklar, ob sich evtl. nachgewiesene Prozesse auf die physiologischen Entwicklungsprozesse im lebenden Organismus übertragen lassen. Zusätzlich sind Zellkulturen heterogen. Hat man in einem Klon einer Zelllinie einen bestimmten Effekt gefunden, muss dieser nicht unbedingt auch in einem zweiten Klon zu finden sein. Ich verweise auf die Arbeit von Jost, bei der nur ein ganz bestimmter Klon der Zelllinie verwendet wurde. Zusätzlich sind die

Effekte, die in diesen Zellen gemessen wurden, als eher gering einzuschätzen (über zwei Tage wurden maximal 4% der CpGs demethyliert).

In Zygoten von Mäusen konnte mit Hilfe von immunologischen Färbungen nachgewiesen werden, dass das paternale Genom innerhalb von 4h demethyliert wird (Santos et al. 2002). Bei der Demethylierung, die von Hajkova et al. (Hajkova et al. 2002) in PGCs beobachtet wurde, sind geprägte Gene aktiv demethyliert worden, während repetitive DNA-Elemente passiv oder gar nicht demethyliert wurden. Zygoten und PGCs sind allerdings deutlich schwieriger zu präparieren als Zellkulturzellen. Befruchtete Eizellen sind im größeren Maßstab nur durch *in vitro* Fertilisation herzustellen, so dass man unter optimalen Bedingungen ca. 500 Zygoten pro Experiment erhalten kann. PGCs sind in ihrer Anzahl ebenfalls limitiert, aber doch in deutlich größeren Mengen zu präparieren als Zygoten. Zudem handelt es sich hier um Zellen, die aus einem lebenden Organismus gewonnen werden und die zu einem bestimmten Zeitpunkt *in vivo* Demethylierung zeigen. Deshalb habe ich für die ersten Versuche Extrakte aus PGCs verwendet. Könnte ein anderes Gewebe identifiziert werden, in dem Demethylierungsaktivität auszumachen ist, wäre dies von unschätzbarem Vorteil, da ein Gewebe immer deutlich mehr Zellen liefern würde als PGCs oder Zygoten und es sich dennoch um ein physiologisches System handelt.

Eine weitere Schwierigkeit ist es, das richtige Substrat für diese Experimente zu finden, da man bis heute nur sehr wenig über diesen Prozess weiß. Eine Ursache, warum bisher keine wirklich überzeugenden Hinweise auf die aktive Demethylierung vorliegen, könnte u.a. darin begründet sein, dass alle Experimente mit Hilfe artifizieller DNA-Substrate, wie synthetisierte Oligonukleotide oder Plasmide, durchgeführt wurden (Jost 1993; Jost and Jost 1994; Bhattacharya et al. 1999; Morgan et al. 2004).

3.1.1 Auf Bisulfit basierende Versuchsansätze

In einem ersten Versuchsansatz sollte herausgefunden werden, ob man mit PGC Extrakten, die mit unterschiedlichen DNA-Substraten inkubiert wurden, DNA-Demethylierung nachweisen kann. Hierfür wurden Gonadenanlagen aus Mausembryonen der Kreuzung NMR1xOct4 isoliert und durch schnelles Einfrieren und Auftauen in 1x Demethylierungspuffer desintegriert (siehe Abschnitt 2.26). Die so bereiteten Extrakte wurden anschließend 5 h bei 37 °C mit genomischer DNA oder Chromatin, welches in

beiden Fällen aus 12,5dpc alten Embryonen der Kreuzung SD7xBL6 präpariert wurde (Abschnitt 2.10 und Abschnitt 2.8), inkubiert. Anschließend wurde die DNA wie unter Abschnitt 2.8 beschrieben, isoliert und einer Bisulfit-Mutagenese (Abschnitt 2.11.2) unterzogen. Ein Grund für die Verwendung von aus 12,5 dpc Embryonen isolierter DNA war die zum Zeitpunkt 12,5 dpc abgeschlossene Demethylierung in den Keimzellen (Hajkova et al. 2002). So war gewährleistet, dass die in vitro verwendeten Komponenten denen in vivo am ähnlichsten sind.

Da Befunde vorliegen, wonach das Lit1 Gen in PGCs zwischen Tag 11,5 und 12,5 dpc demethyliert wird (Hajkova et al. 2002), wurde dieser DNA-Abschnitt für eine erste Untersuchung auf Demethylierung ausgewählt. Die Analyse dieses Gens hat folgende Vorteile: Zum einen sind die Sequenzen der Mausstämme SD7 und BL6 anhand eines 50 bp langen Sequenzabschnitts zu unterscheiden, zum anderen handelt es sich hierbei um ein geprägtes Gen, was bedeutet, dass nur eine der beiden parental Kopien methyliert ist, in diesem Fall das mütterliche Allel. Aus diesem Grund habe ich genomische DNA der Kreuzung SD7xBL6 als Substrat verwendet und mit PGCs inkubiert, deren DNA Sequenz der von BL6 entsprach. So konnte im Anschluss das zuvor vollständig methylierte SD7 Allel nach der Inkubation analysiert und dessen Methylierungsstatus bestimmt werden.

Hierfür wurde das Lit1 Gen mit den für das SD7 Allel spezifischen Oligonukleotiden (siehe Tabelle 1) amplifiziert. Die PCR Produkte wurden anschließend kloniert und sequenziert. Es folgten Experimente mit PGCs 11,5 dpc und mit PGCs 12,5 dpc. Außerdem wurden zusätzliche Inkubationen mit Extrakten aus adulten oder anderen embryonalen Geweben durchgeführt. Diese Experimente sollten einerseits als Referenz dienen, andererseits bestand die Möglichkeit Gewebe zu finden, in denen ebenfalls Demethylierungsaktivität nachweisbar ist.

In Abbildung 14 sind alle ausgewerteten Sequenzen dargestellt. Eine Zeile entspricht einer Sequenz, wobei ein schwarzes Kästchen für ein methyliertes CpG steht und ein weißes für ein unmethyliertes CpG. Schwarzweiß gestreifte Felder weisen darauf hin, dass die Position in der jeweiligen Sequenz nicht auszuwerten war. In Abbildung 14A sind Inkubationen mit Geweben einer Präparation 11,5 dpc, während in Abbildung 14B Inkubationen mit Geweben einer Präparation 12,5 dpc dargestellt.

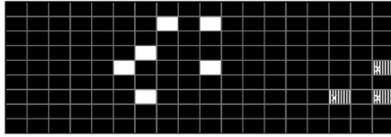
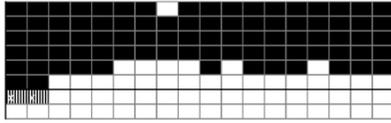
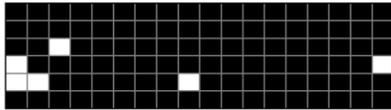
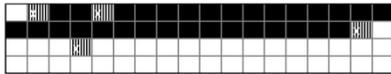
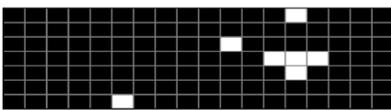
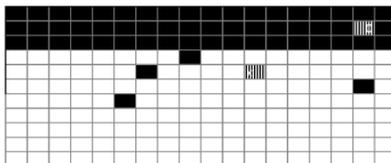
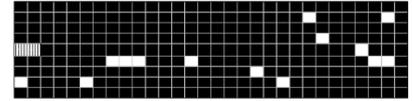
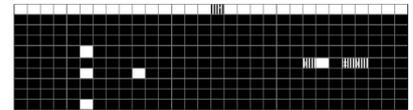
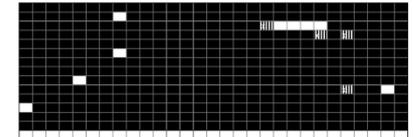
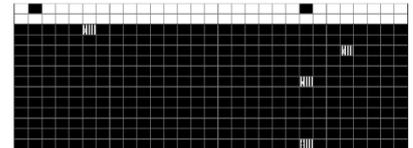
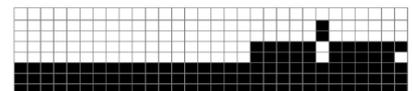
ADNA ohne
ExtraktChromatin
ohne ExtraktPGCs
11.5dpc mit
ChromatinPGCs
11.5dpc mit
DNADott1
11.5dpc mit
ChromatinDott2
11.5dpc mit
Chromatin**B**DNA ohne
ExtraktPlazenta
12.5dpc mit
ChromatinPlazenta
12.5dpc mit
DNAPGCs
12.5dpc mit
ChromatinPGCs
12.5dpc mit
DNADottersack
12.5dpc mit
DNA

Abbildung 14: Inkubationen von genomischer DNA und Chromatin mit unterschiedlichen Gewebeextrakten. A: Inkubation von DNA und Chromatin mit unterschiedlichen Geweben aus Embryonen 11,5 dpc isoliert. B: Inkubationen mit Geweben aus Embryonen 12,5 dpc.

Aus der Abbildung 14A ist zu erkennen, dass die eingesetzte DNA, die nicht mit Extrakten inkubiert wurde, auf dem amplifizierten, mütterlichen Allel vollständig methyliert ist (95% und 96%), während das untersuchte Chromatin ohne Inkubation einen Methylierungsgrad von 73% aufweist.

Bei der Inkubation mit Extrakten von 12,5 dpc Plazenten (Abbildung 14B) konnte weder bei der Verwendung von genomischer DNA noch bei Verwendung von Chromatin eine Reduktion der Methylierung festgestellt werden (genomische DNA: 98% Methylierung, Chromatin 99% Methylierung), auch wenn es in diesem Experiment keinen Wert für die Methylierung des Lit1 Gens in Chromatin ohne Extrakt gibt. Ebenfalls konnte weder bei der Inkubation von 11,5 dpc noch bei der Inkubation von 12,5 dpc PGC-Extrakten mit Chromatin eine Reduktion der Methylierung festgestellt werden (11,5 dpc PGCs: 94% Methylierung, 12,5 dpc: 86% Methylierung). Die Inkubation von DNA mit 12,5 dpc Dottersackextrakten führt hingegen zu einer Reduktion der Methylierung auf 47%. Ebenfalls zu erkennen ist eine Reduktion der Methylierung bei der Inkubation von 11,5 dpc Dottersackextrakten mit Chromatin als Substrat. Dabei konnte in einem Beispiel eine Reduktion der Methylierung gezeigt werden (Dottersack2 11,5 dpc 29% Methylierung). In einer weiteren Probe (Dottersack1 11,5 dpc 94% Methylierung) konnte keine Reduktion der Methylierung gegenüber der Chromatin-Probe, die nicht mit Extrakt inkubiert wurde, gemessen werden. Bei der Inkubation von genomischer DNA mit PGC Extrakten konnte bei 11,5 dpc PGC Extrakten eine Reduktion der Methylierung gezeigt werden (44% Methylierung), während bei der Inkubation mit 12,5 dpc PGC Extrakten keine Demethylierung gemessen werden konnte (84% Methylierung).

Aus diesem Experiment ist zu schließen, dass es grundsätzlich möglich zu sein scheint, genomische DNA mit Extrakten aus Dottersäcken sowie auch mit Extrakten aus PGCs zu demethylieren. Dabei konnte Demethylierungsaktivität in den Dottersackextrakten 12,5 dpc mit genomischer DNA gezeigt werden, während sich die Demethylierungsaktivität der PGC-Extrakte auf die Präparation 11,5 dpc beschränkt.

In wie weit isoliertes Chromatin ein geeignetes Substrat ist, ist aus diesen Experimenten nicht vollständig zu klären, da mit PGC-Extrakten keine Aktivität gezeigt werden konnte. Außerdem kann aufgrund der Variabilität in den Experimenten mit Dottersackextrakten keine konkrete Aussage getroffen werden. Dennoch geben diese Experimente den wichtigen Hinweis, dass genomische DNA, die nicht in einer Chromatinstruktur vorliegt, ein geeignetes Substrat für Demethylierungsreaktionen zu sein scheint. Dennoch bleibt zu bemerken, dass bei diesem Versuchsansatz immer nur verhältnismäßig wenige

Sequenzen zur Auswertung herangezogen werden können. Das macht diese Methode sehr rauschanfällig, sodass versucht werden sollte, diese Schwierigkeiten in einem alternativen Versuchsansatz zu umgehen.

3.1.2 Radioaktive Detektion von DNA-Demethylierung

Es konnte mit Hilfe des auf der Bisulfit-Mutagenese basierenden Versuchsansatzes gezeigt werden, dass die Demethylierung von DNA grundsätzlich mit Extrakten aus Dottersäcken und PGCs zu realisieren ist. Nun sollte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem bei geringerem Zeit- und Kostenaufwand das gleiche Ziel erreicht werden konnte. Dies war umso wichtiger, da Reaktionsbedingungen, wie z.B. Pufferbedingungen, benötigte Kofaktoren und vieles mehr, weiter untersucht und optimiert werden sollten.

Ich habe einen Reaktionsansatz gewählt, der in einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden kann, was das gleichzeitige Bearbeiten mehrerer Proben deutlich erleichtert. Der Versuchsansatz entspricht dem unter Abschnitt 2,27 beschriebenen. Das mit M.HhaI markierte Substrat diente zur Detektion der Demethylierung, während das mit M.TaqI methylierte Substrat als Referenz fungierte (zur weiteren Erläuterung siehe ebenso Abschnitt 2.28). Es ist anzunehmen, dass Adenin-Methylierung nicht betroffen ist, da es sich hier um die Methylierung eines Purins handelt, das die Methylgruppe an einem Stickstoffatom trägt.

Bei einer spezifischen Demethylierung sollte während der Inkubation die Radioaktivität im Überstand (ungebundene Fraktion) zunehmen, während die Radioaktivität im Substrat (gebundene Fraktion) abnehmen sollte. Dies konnte durch die Inkubation von Dottersäcken 11,5 dpc alter Embryonen mit den Substraten M.HhaI und M.TaqI erreicht werden (Abbildung 15A und B).

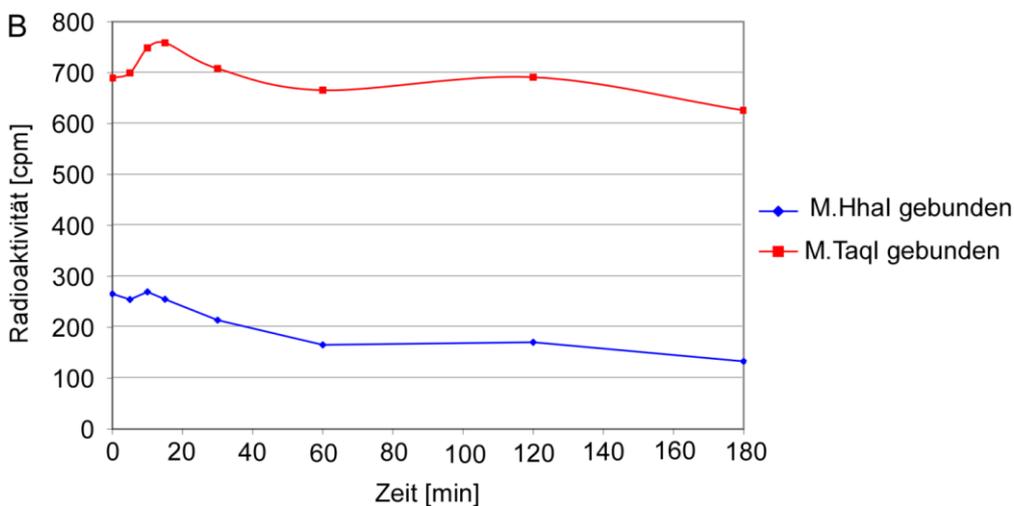
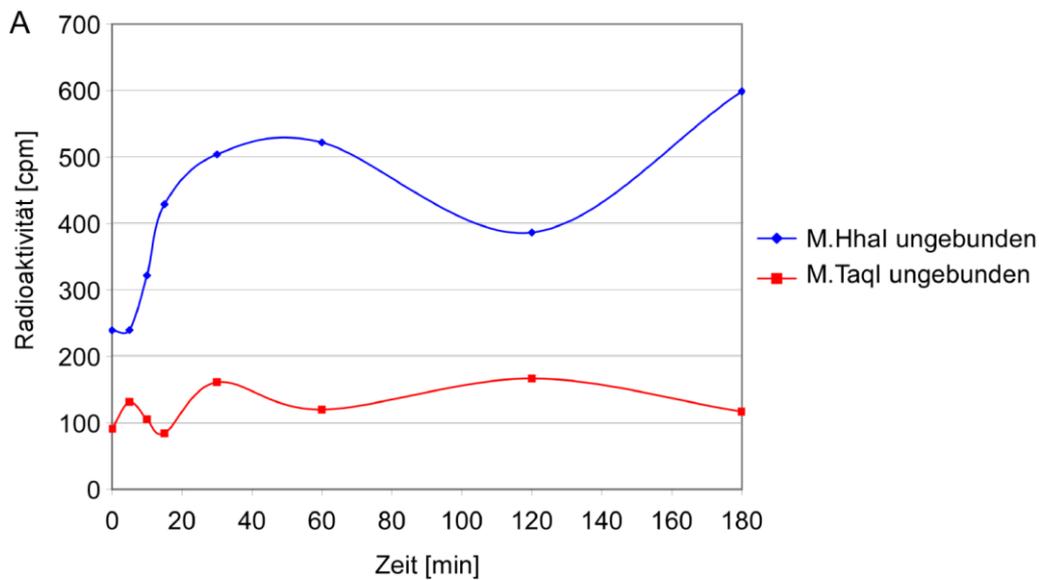


Abbildung 15: Demethylierungsexperiment mit 11,5 dpc Dottersäcken. Es sind jeweils die Mittelwerte der gemessenen Radioaktivität in cpm (counts per minute) angegeben. A zeigt die freigesetzte Radioaktivität, während B die im Substrat verbliebene Radioaktivität zeigt.

In Abbildung 15A ist zu erkennen, dass die Radioaktivität in dem Überstand des mit M.HhaI methylierten Substrats über die Zeit von 240 cpm auf 599 cpm zunimmt. Von der 60. bis zur 120. Minute ist ein Abfall der Aktivität zu sehen. Dieser Messwert kann aber als Ausreißer betrachtet werden, da es nicht möglich ist, dass die einmal freigesetzte Aktivität wieder in das PCR Produkt eingebaut wird. In der Probe, in der das mit M.TaqI methylierte Substrat mit Dottersäcken inkubiert wurde, ist keine gleichmäßige Zunahme der freien Radioaktivität zu detektieren. Hier schwankt die Radioaktivität um 100 cpm. In Abbildung 15B ist die Abnahme der Radioaktivität dargestellt, die in dem Substrat gebunden ist. Es ist zu erkennen, dass die Radioaktivität der Probe, die mit dem M.HhaI methylierten

Substrat inkubiert wurde, von 267 cpm auf 133 cpm stetig über die Zeit abnimmt. In der Probe, die mit dem M.TaqI methylierten Substrat durchgeführt wurde, ist eine solche Abnahme nicht zu erkennen. Hier sinkt die Aktivität von 690 cpm auf 626 cpm, schwankt aber zwischendurch deutlich und steigt sogar an, so dass dieser geringe Abfall als Rauschen interpretiert werden kann. Um auszuschließen, dass diese Effekte auf ungleichmäßiges Pipettieren zurückzuführen sind, die Zellextrakte sind sehr dickflüssig, wurden die für die gebundene Fraktion gemessenen cpm ins Verhältnis zu der zu diesem Zeitpunkten gemessenen gesamten cpm (gebunden/ (frei+gebunden) gesetzt. Die so erhaltenen Werte mit dem Ausgangswert verrechnet, ergeben das Ausmaß der Reduktion der Radioaktivität (Abbildung 156). Aufgetragen ist hier die relative Aktivität gegen die Zeit. Es ist zu sehen, dass die Radioaktivität der gebundenen Fraktion der Inkubation mit dem M.HhaI methylierten Substrat über die Zeit auf 38% des Ausgangswertes reduziert wurde, im Gegensatz zu dem Substrat, das zuvor mit M.TaqI methyliert wurde. Hier schwanken die Werte alle um den Ausgangswert und werden maximal auf 90% des Ausgangswertes reduziert.

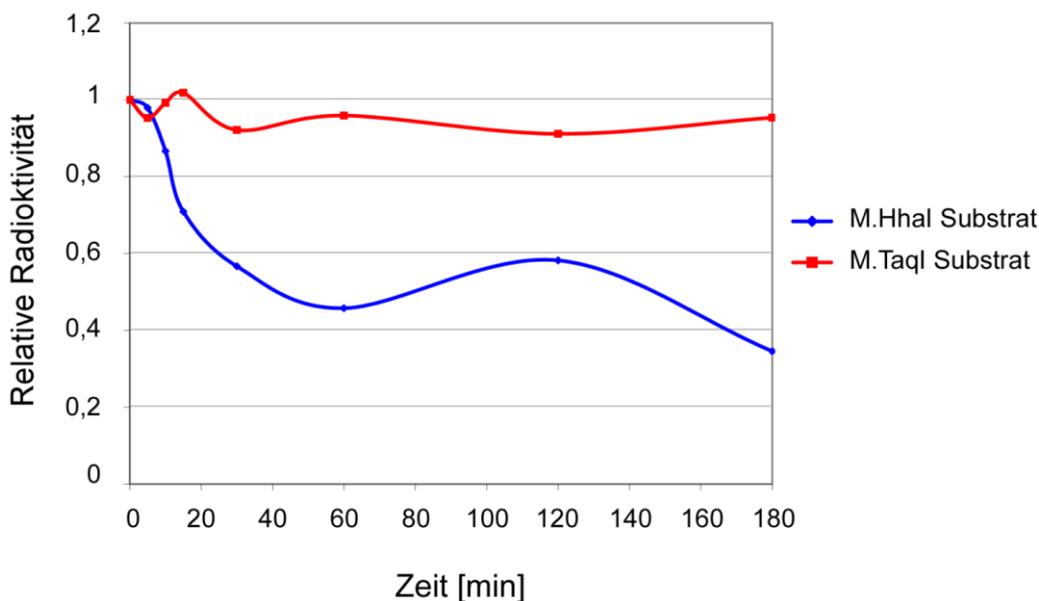


Abbildung 16: Inkubation von mit M.HhaI (blau) und M.TaqI (rot) methyliertem PCR-Substrat mit Dottersäcken von 11,5 dpc alten Embryonen. Es ist zu sehen, dass es nur bei der Inkubation des mit M.HhaI methylierten Substrats zu einer Reduktion der Radioaktivität der gebundenen Fraktion kommt, nicht aber bei dem mit M.TaqI methylierten Substrat.

Aus diesem Experiment ist zu schließen, dass die ursprünglich in das Substrat eingebrachte CpG-Methylierung durch Inkubation mit Extrakten aus 11,5 dpc Dottersäcken über die Zeit reduziert wurde, nicht aber die Adenin-Methylierung.

In weiteren Versuchen sollte nun überprüft werden, inwieweit bestimmte Pufferfaktoren Einfluss auf die Reaktion haben. Die gezeigte Demethylierung konnte jedoch durch weitere Experimente nicht bestätigt werden.

In allen weiteren Versuchen konnte allerdings die Degradation (Abbildung 17) der Substrate festgestellt werden. Dies ist daran zu erkennen, dass die gemessene Radioaktivität in der mit M.HhaI methylierten Probe und in der mit M.TaqI methylierten in gleicher Weise abnimmt oder aber gar keine Veränderung in der gebundenen Radioaktivität über die Zeit (Abbildung 18) festzustellen ist.

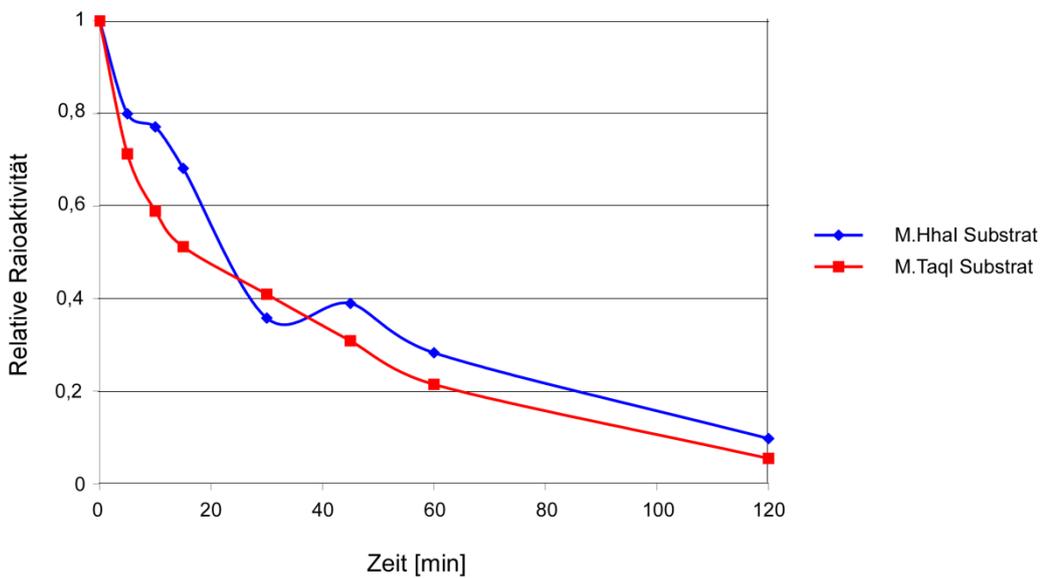


Abbildung 17: Inkubation von mit M.HhaI (blau) und M.TaqI (rot) methyliertem PCR-Substrat mit Dottersäcken von 11,5 dpc alten Embryonen. Es ist zu sehen, dass es sowohl bei der Inkubation mit dem M.HhaI Substrat, als auch bei der Inkubation mit dem M.TaqI Substrat zu einer Reduktion der Radioaktivität der gebundenen Fraktion über die Zeit kommt.

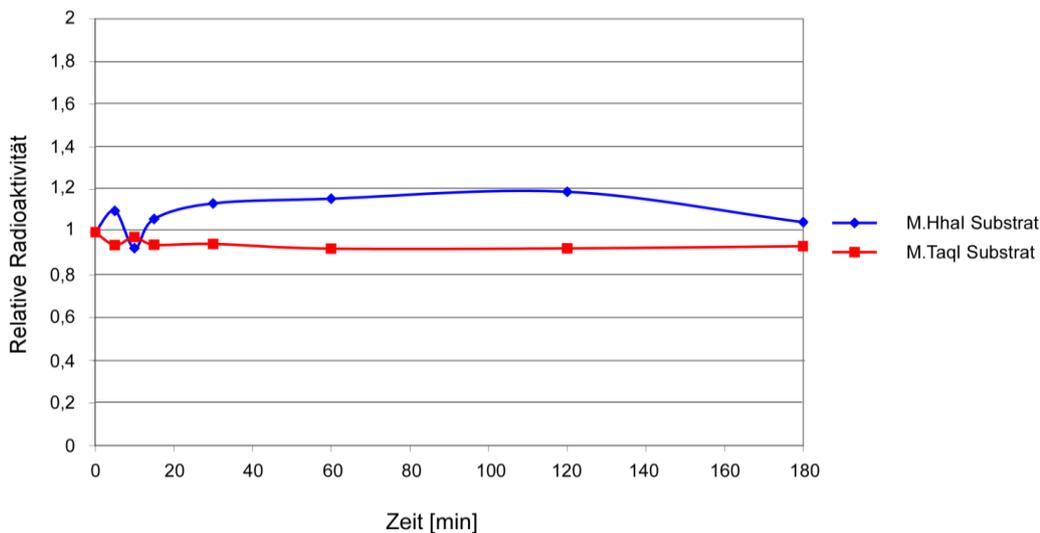


Abbildung 18: Inkubation von mit M.HhaI (blau) und M.TaqI (rot) methyliertem PCR-Substrat mit Dottersäcken von 11,5 dpc alten Embryonen. Es ist weder in der Inkubation mit dem M.HhaI methylierten Substrat noch in der Inkubation mit dem M.TaqI methylierten Substrats eine Veränderung der Radioaktivität in der gebundenen Fraktion zu detektieren.

3.2 Reprogrammierung in Primordialen Keimzellen

Bis heute ist nicht verstanden, was eine Zelle dazu veranlasst, ihr Genom zu reprogrammieren, welche Prozesse dabei von Bedeutung sind oder in welchem Zusammenhang sie zueinander stehen. Wenn eine Zelle von einem Zustand in einen anderen übergeht, d.h. sich entweder differenziert oder dedifferenziert, ist dies immer mit grundlegenden Veränderungen im Expressionsmuster der Proteine der Zelle verbunden. Um dies zu erreichen, wird die gesamte Chromatinstruktur der Zelle umorganisiert, was sowohl eine Veränderung der Histonmodifikation als auch des Methylierungsstatus der DNA zur Folge hat (Jost et al. 2001; Dean et al. 2003; Santos et al. 2003; Bernstein et al. 2006).

3.2.1 Vergleichende Analysen von Histonmodifikationen und DNA Methylierung während der Entwicklung von Keimzellen in der Maus

Mit diesem Teil meiner Arbeit wollte ich untersuchen wie die zuvor *in vitro* charakterisierte Reprogrammierung in lebenden Zellen verläuft. Von Interesse war dabei, in wieweit die Demethylierung der DNA in lebenden Zellen mit einer Veränderung der Modifikationen der Histone einhergeht oder dadurch geleitet wird. Zusätzlich sollte untersucht werden, in

wieweit die Kinetiken der DNA-Demethylierung in der Zygote mit denen in PGCs zu vergleichen sind.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Veränderungen des Methylierungsstatus einzelner Gene mit einer Veränderung von Histonmodifikationen in diesem Bereich, bzw. dem Gen einhergehen können (Fuks 2005). Zudem gibt es Studien, die zeigen konnten, dass DNA-Methylierung direkt von der Methylierung bestimmter Aminosäuren im Histon H3 abhängig ist (Tamaru and Selker 2001). Des Weiteren fand man Hinweise, dass in der Maus nach der Verschmelzung von Spermium und Eizelle der Verlust der DNA-Methylierung im paternalen Genom mit dem Verlust der Methylierung von Lysin 9 in Histon H3 (K9di Methylierung) (Lepikhov and Walter 2004) korreliert. Ich wollte nun der Frage nachgehen, ob die Prozesse der Demethylierung in der Zygote mit denen in PGCs zu vergleichen sind und ob sich daraus ein Leitsignal für die Demethylierung ableiten lässt.

Hierfür habe ich PGCs zwischen 9,5 dpc und 12,5 dpc gesammelt und entweder mit für di-methyliertes Lysin 9 in Histon H3 (H3K9diMe) bzw. Methylcytosin spezifischen Antikörpern angefärbt (siehe Abschnitt 2.23) oder den Methylierungsstatus einiger Genomabschnitte mit Hilfe der Bisulfitmethode (Abschnitt 2.11.3) untersucht. Zur Identifikation der PGCs wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen ein Oberflächenprotein, SSEA1 (stage specific embryonic antigen 1) angefärbt, das in diesem Entwicklungsstadium spezifisch für PGCs ist (Abbildung 19, grüne Markierungen).

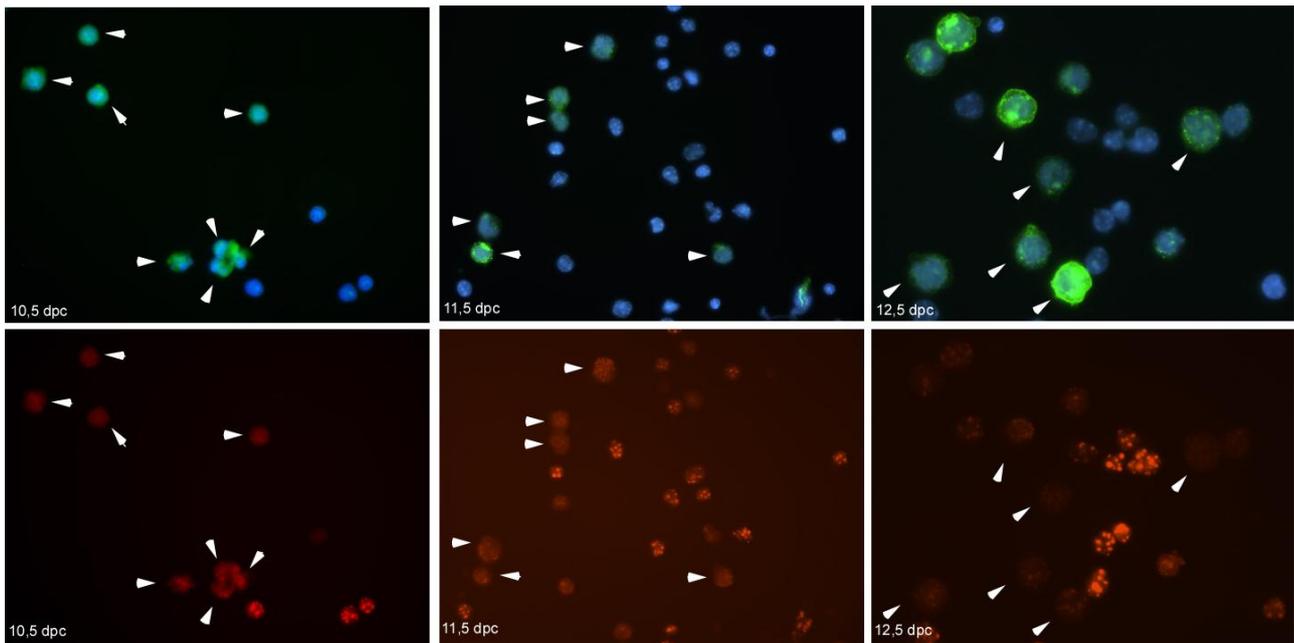


Abbildung 19: Färbung von PGCs mit Antikörpern gegen H3K9diMe. In der oberen Reihe ist die der DNA mit DAPI (blau) und die PGCs durch die Anfärbung des Oberflächenproteins SSEA1 (grün) dargestellt. In der unteren Reihe sind die gleichen Zellen mit Antikörper gegen H3K9diMe (rot) abgebildet. Die PGCs sind zusätzlich durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 19 zu sehen, weisen an 10,5 dpc sowohl PGCs als nicht-PGCs ein Signal für H3K9diMe auf. PGCs und nicht-PGCs unterscheiden sich aber hinsichtlich der Intensität des Signals. Nicht-PGCs weisen ein schwächeres Signal auf als PGCs. Zudem unterscheiden sich die Muster der Lokalisation der Fluoreszenzsignale. Die nicht-PGCs zeigen eine heterogene Verteilung der H3K9diMe, während das Signal in PGCs homogener ist. Dies ist in Abbildung 20 zu erkennen. Hier sind 12,5 dpc Zellen abgebildet. Die Fotos wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 M aufgenommen, das mit einem Apotom, einem Fluoreszenzmodul und einer schwarz weiß Digitalkamera ausgestattet war. Das Apotom ermöglicht pseudo-konfokale Aufnahmen.

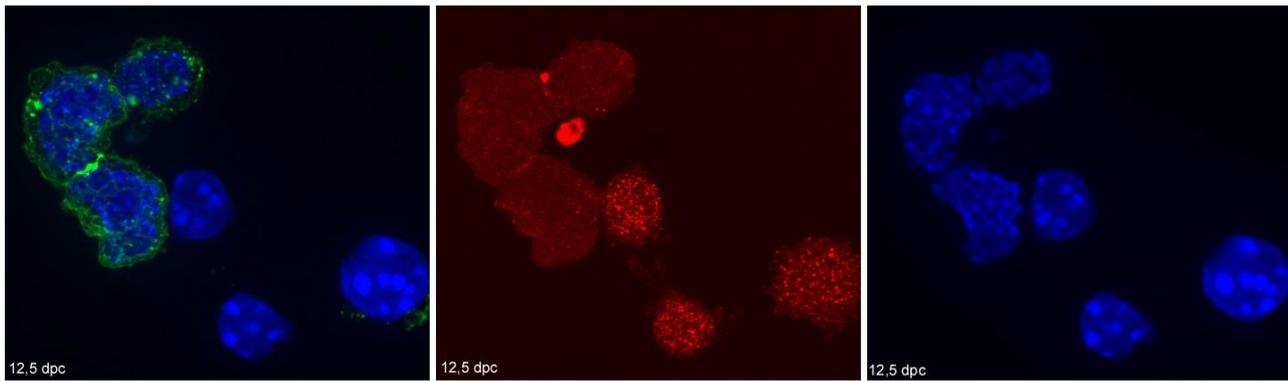


Abbildung 20: Unterschiedliche Verteilung von H3K9diMe in PGCs und nicht-PGCs. Aufnahmen von 12,5 dpc PGCs mit erweitertem Fokus. Die PGCs sind durch ein positives SSEA1 Signal zu identifizieren (grün), die DNA ist mit DAPI angefärbt (blau), H3K9 (rot).

Der Befund, dass in den PGCs das Signal für H3K9diMe deutlich reduziert ist gegenüber dem in nicht-PGCs, ist vergleichbar mit Beobachtungen in Mauszygoten, wo H3K9diMe nur im maternalen Vorkern, nicht aber im paternalen zu detektieren ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass eventuell die Abwesenheit von H3K9diMe ein Signal zur Demethylierung der DNA geben könnte. Aus diesem Grund sollte mit der Färbung von PGCs mit einem Antikörper gegen Methylcytosin untersucht werden, ob die Veränderungen in den Histonmodifikationen zeitgleich mit Veränderungen in der globalen DNA-Methylierung verlaufen. Allerdings ist es technisch nur sehr schwer möglich Proteine und DNA-Modifikationen in denselben Zellen anzufärben. Die DNA muss für das Anfärben mit Antikörpern durch Denaturieren zugänglich gemacht werden, was gleichzeitig zu einer Denaturierung der Proteine, die die DNA umgeben, führt. Diese sind dann nur sehr schwer oder gar nicht mehr mit spezifischen Antikörpern anzufärben. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, sowohl Histonmodifikationen als auch 5meC parallel mit immunologischen Färbungen nachzuweisen. Abbildung 21 zeigt eine charakteristische Methylcytosinfärbung. In der Probe der 11,5 dpc PGCs ist kein Signal für die Antikörperfärbung und in der Probe von 10,5 dpc PGCs ein sehr schwaches Signal zu detektieren, bei dem nicht eindeutig zu klären ist, ob es sich dabei nicht ausschließlich um ein unspezifisches Hintergrundsignal handelt. An Tag 9,5 dpc ist hingegen ein Signal deutlich zu erkennen. Es weist für die als PGCs identifizierten Zellen eine heterogene Verteilung auf. Auch in dieser Abbildung sind die PGCs grün und die DNA blau dargestellt.

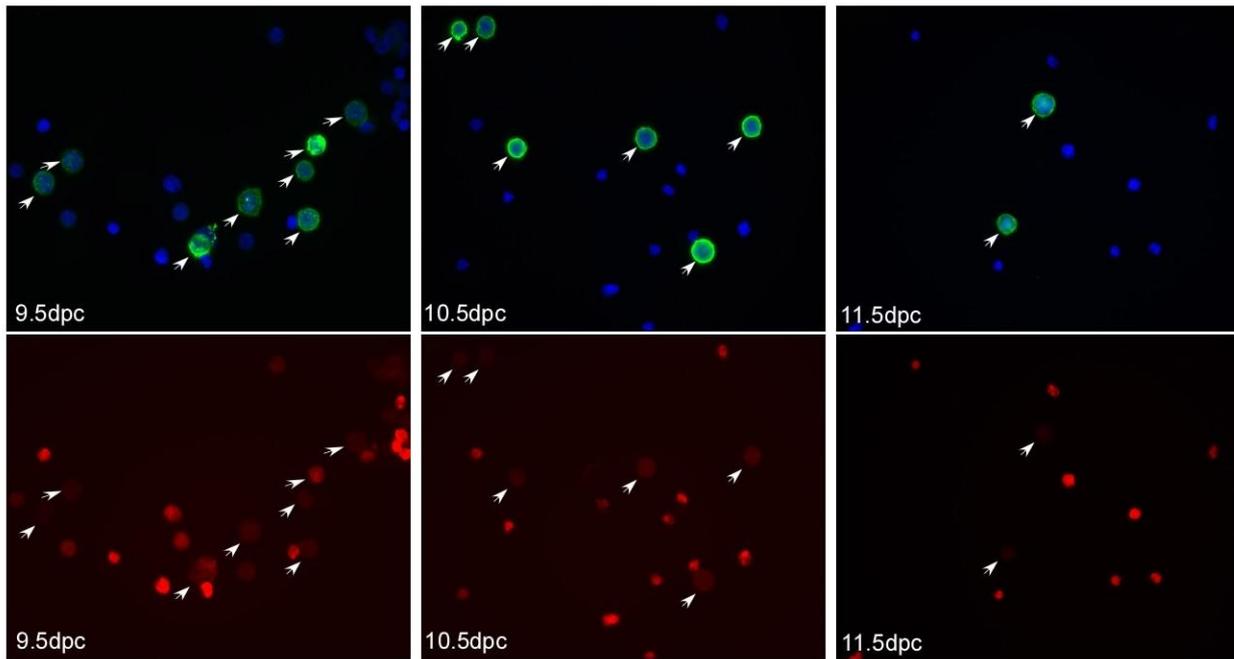


Abbildung 21: Detektion von Methylcytosin in PGCs während ihrer Entwicklung. In der oberen Reihe ist eine Mischung von PGCs und somatischen Zellen zu sehen, deren DNA mit DAPI (blau) angefärbt wurde. Die PGCs sind auf Grund des grünen Signals für SSEA1 zu identifizieren. Die untere Reihe zeigt die gleichen Zellen, die mit einem Antikörper gegen Methylcytosin angefärbt wurden. In jedem Bild ist das jeweilige Entwicklungsstadium angegeben.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem Eindruck von Heterogenität des DNA-Methylierungssignals in den PGCs von Tag 9,5 dpc um einen subjektiven Eindruck handelt, wurden Proben dieser Zellen unter einem Konfokalmikroskop (siehe 2.24) untersucht und anschließend mit ImageJ (W. Rasband, NIH, USA) quantitativ analysiert. Dafür wurden die Zellen vor der Färbung sortiert und dadurch angereichert. Es wurden Zellen gesammelt, die ein GFP Signal aufwiesen. Hierbei handelte es sich um ein Transgen, das unter der Kontrolle eines modifizierten Okt4 Promotors stand, sodass das GFP spezifisch in den PGC exprimiert wurde (Yeom et al. 1996).

Die vorsortierten Zellen wurden zuerst fotografiert (Abbildung 22A) und dann mit einem Antikörper für Methylcytosin angefärbt. Die Zellen wurden im Anschluss daran mit Hilfe eines Konfokalmikroskops analysiert (Abbildung 22B). Es war notwendig die Zellen vor der immunologischen Färbung zu fotografieren, um die Lage von PGCs und nicht-PGCs zu dokumentieren, da das GFP Signal durch die Färb- und Fixierungsbehandlungen verloren geht. So lassen sich anschließend durch Vergleich der beiden Aufnahmen PGCs und nicht-PGCs eindeutig von einander unterscheiden.

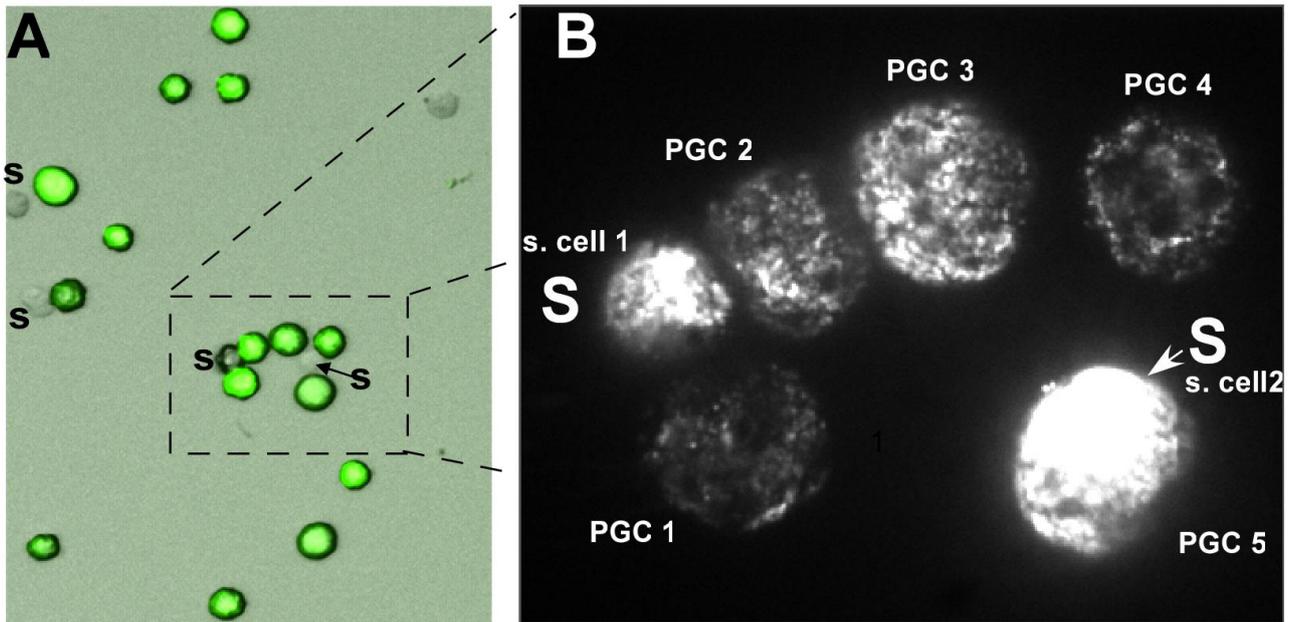


Abbildung 22: Aufnahmen von PGCs und somatischen Zellen (s) an 9,5 dpc. A: Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen von angereicherten PGCs 9,5 dpc vor Fixierung. Die Anreicherung erfolgte manuell, wobei Zellen mit einem grünen GFP-Signal, das unter der Kontrolle des Oct4 Promotors steht, als PGCs identifiziert wurden. B: Konfokale Aufnahme der in A hervorgehobenen Zellgruppe.

Anschließend wurden die konfokalen Aufnahmen und die Fotos, die vor der Behandlung aufgenommen wurden miteinander verglichen, um so eindeutig sagen zu können, bei welchen Zellen es sich um PGCs handelt und bei welchen um somatische Zellen. Das Foto der konfokalen Aufnahme wurde mit ImageJ analysiert.

Die Z-Rekonstruktion der konfokalen Aufnahmen macht deutlich, dass eine der somatischen Zellen (s. cell 2) während der Färbeprozedur unter die PGC 5 rechts unten gerutscht ist (wie in Abbildung 23 zu sehen), so dass PGC 5 nicht zur Auswertung verwendet wurde.

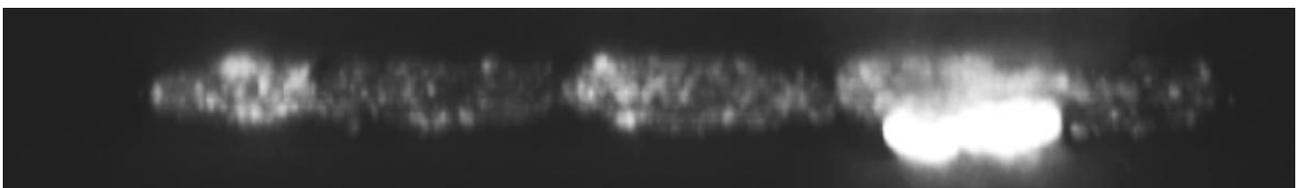


Abbildung 23: Z-Ansicht der in Abbildung 22A abgebildeten Zellen.

Um einen Vergleich der unterschiedlichen Helligkeitsintensitäten der einzelnen Zellen durchführen zu können, habe ich mit ImageJ die mittlere Intensität jeder Zelle und die des

Hintergrunds bestimmt. Anschließend habe ich die Hintergrundintensitäten von den Intensitätswerten der Zellen abgezogen und diese korrigierten Intensitäten zu der Zelle mit dem geringsten Signal (PGC 1) ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 10 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Intensitäten der PGCs von einander unterscheiden, so weist PGC 4 eine 4,4fach höhere Intensität auf als PGC 1, PGC 2 aber nur die 3fach höhere, wobei PGC 4 ähnlich intensiv angefärbt ist wie PGC 1. Alle PGCs weisen allerdings ein weniger starkes Signal für Methylierung auf als die somatische Zelle in diesem Bild (9,3fache Intensität).

Tabelle 10: Ergebnisse des Vergleichs der Helligkeitsintensitäten unterschiedlicher analysierter Zellen mit PGC 1.

PGC 1	1,0
PGC 2	3,0
PGC 3	4,4
PGC 4	1,5
Som cell 1	9,3

Daraus ist abzuleiten, dass die PGCs zu diesem Zeitpunkt zwar heterogen sind, was den Gesamtgehalt der Methylierung betrifft. Dennoch weisen sie aber deutlich weniger Methylierung auf als somatische Zellen. So ist analog zur Methylierung von H3K9 auch ein Unterschied zwischen somatischen Zellen und PGCs zu erkennen.

3.2.2 Untersuchung der DNA Methylierung von repetitiven Elementen während der Keimzellentwicklung in der Maus

Analysen von DNA-Methylierung, die auf immunologischen Färbemethoden basieren, können nur einen globalen Überblick über den Zustand in den Zellen geben. Sie liefern aber keinen genaueren Aufschluss darüber, in welchen Bereichen des Genoms Demethylierung stattfindet. Um eine genauere Vorstellung davon zubekommen, wie DNA-Demethylierung während der Entwicklung verläuft, ist es notwendig festzustellen, welche Regionen von der Demethylierung betroffen sind und ob innerhalb einer Sequenz bestimmte Bereiche besonders empfindlich gegenüber Demethylierung sind.

Hierfür habe ich PGCs aus Mäusen einer Kreuzung SD7xOct4 oder Oct4xSD7 isoliert, die dasselbe GFP-Transgen tragen, das auch in den Experimenten zuvor verwendet wurde.

Auch hier wurden PGCs durch das Fluoreszenzsignal des GFPs identifiziert und gesammelt. Die Proben wurden anschließend der Bisulfit-Mutagenese (siehe 2.11.3) unterzogen und einzelne Klone der interessanten Bereiche sequenziert.

Eine Vermutung war, dass das Signal der Antikörperfärbung vornehmlich auf Grund der hohen Dichte von methylierten Cytosinen in repetitiven Elementen entsteht, da davon auszugehen ist, dass eine Mindestintensität und damit Dichte an gebundenem Antikörper erreicht sein muss, um ein detektierbares Signal zu liefern. Es wurden nun drei unterschiedliche Kandidaten repetitiver Elemente analysiert. Dabei handelte es sich um LINE1 Elemente, die mit bis zu 590 000 Kopien im Mausgenom die häufigsten in dieser Spezies vorkommenden sind. Sie machen ca. 19% des gesamten Mausgenoms aus. Die Funktion dieser Elemente ist bisher nicht bekannt (Waterston et al. 2002). Zudem wurden IAPs (*intracisternal A particles*), die im Mausgenom in ca. 1000 Kopien vorliegen analysiert. Bei diesen Elementen handelt es sich, ebenfalls wie bei den Line1 Elementen, um retrovirale Elemente. Sie können zu vollständig proteinumhüllten Partikeln exprimiert werden, denen bisher aber keine Funktion nachgewiesen werden konnte (Lueders and Kuff 1977). Ein Charakteristikum dieser Elemente ist, dass sie, werden sie demethyliert, anfangen zu transponieren und dadurch das Genom destabilisieren. Als drittes Element sollte ein für die Zelle relevantes Element, die zentromerischen Satelliten *repeats*, deren Methylierung spätestens während der Zellteilung von Bedeutung ist, untersucht werden.

Es wurden jeweils PGCs unterschiedlicher Entwicklungsstadien isoliert und je ca. 50 Zellen einer Bisulfitmutagenese unterzogen, anschließend die Bereiche von Interesse amplifiziert, sequenziert und deren Methylierungsstatus und das Methylierungsmuster analysiert.

In Abbildung 24 sind alle Sequenzen abgebildet, die zur Untersuchung des Methylierungsgrads der unterschiedlichen Elemente verwendet wurden.

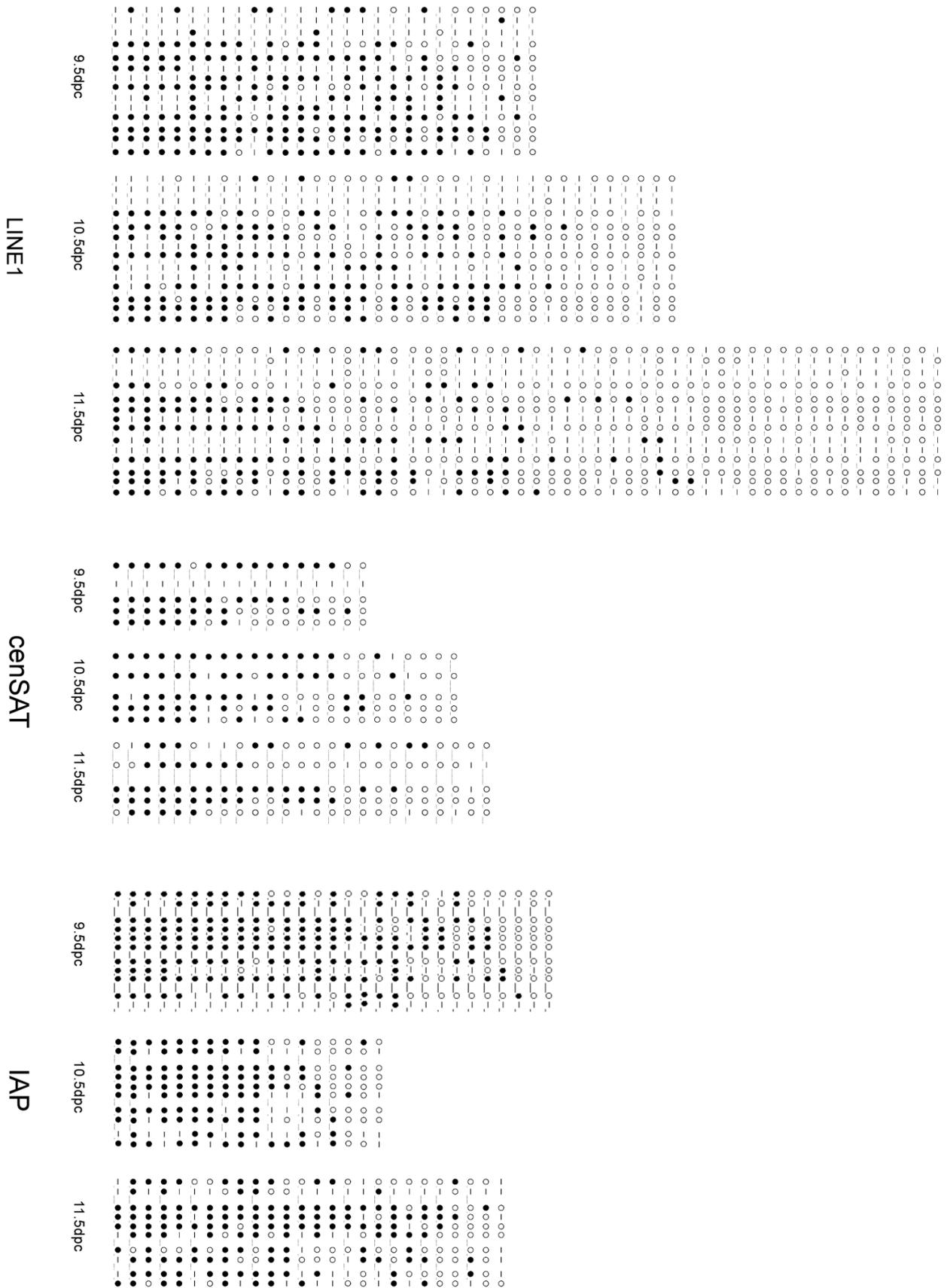


Abbildung 24: Methylierung von LINE1 Elementen, zentromerischen Satelliten (cenSAT) und IAPs. Die jeweiligen Sequenzen sind je Element und Entwicklungsstadium untereinander angeordnet.

Eine Reihe steht für eine analysierte Sequenz, wobei ausgefüllte Kreise (●) ein methyliertes CpG repräsentieren, offene Kreise (○) ein unmethyliertes CpG und ein Strich (–) ein CpG, das in dieser Sequenz nicht vorhanden ist. Übereinanderliegende Sequenzen gehören jeweils zu dem gleichen Entwicklungsstadium, das unter einem Sequenzblock angegeben ist (9,5-11,5 dpc). Dass zu verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlich viele Sequenzen analysiert wurden, ist nicht von Bedeutung.

Von Interesse war, inwieweit das Maß der Methylierung zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien und den verschiedenen Elementen variiert. Hierfür wurde für jedes Entwicklungsstadium die Menge an methylierten CpGs (MP, methylierte-Position) und nicht-methylierten CpGs (UP, unmethylierte-Position) gezählt und mit Hilfe des χ^2 -Tests auf signifikante Unterschiede innerhalb eines DNA Elements über die drei Entwicklungsstadien (2x3 Feldertafel) überprüft. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Auszählung der methylierten Positionen und der Klassifizierung der einzelnen Sequenzen als gemischt oder rein.

		UP	MP	n (Sequenzen)	gemischt	rein
Line1	9,5 dpc	63	186	28	13	15
	10,5 dpc	170	155	37	22	15
	11,5 dpc	336	154	54	24	30
cenSAT	9,5 dpc	63	112	17	11	6
	10,5 dpc	73	85	23	13	10
	11,5 dpc	65	50	25	18	7
IAP	9,5 dpc	72	180	29	10	19
	10,5 dpc	40	109	18	5	13
	11,5 dpc	75	135	26	18	8

Bei den LINE1 Elementen unterscheidet sich das Verhältnis von methylierten CpGs zu unmethylierten CpGs an 9,5 dpc 186/63, an 10,5 dpc 155/170 und an 11,5 dpc 154/336, signifikant zwischen den drei Entwicklungsstadien ($\chi^2=133,41$; $p < 0,001$). Die Methylierung in Prozent beträgt an 9,5 dpc: 75%; 10,5 dpc: 48% und an 11,5 dpc: 31%. Dies bedeutet, dass mit der voranschreitenden Entwicklung jeden Tag ein Drittel weniger Methylierung gemessen wurde. Die Unterschiede in der Methylierung von 9,5 dpc auf 10,5 dpc und von 10,5 dpc auf 11,5 dpc sind zudem ebenfalls signifikant (9,5 dpc verglichen mit 10,5 dpc: $\chi^2=42,64$; $p < 0,001$, und 10,5 dpc verglichen mit 11,5 dpc: $\chi^2=20,14$; $p < 0,001$). Dies wurde mit einer 2x2 Feldertafel ermittelt.

Bei cenSAT ist der Unterschied der Verteilung von methylierten CpGs zu unmethylierten CpGs über alle drei Entwicklungsstadien ebenfalls signifikant ($\chi^2=11,99$; $p<0,01$). An 9,5 dpc wurden 112 MP und 63 UP gezählt, während es an 10,5 dpc 85 MP und 73 UP waren und an 11,5 dpc 50 MP und 65 UP. Demzufolge ist die prozentuale Abnahme der Methylierung bei den cenSAT mit 15% von 9,5 dpc auf 10,5 dpc und 20% von 10,5 dpc auf 11,5 dpc nicht so stark wie bei den LINE1 Elementen. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass die Abnahme der Methylierung bei cenSAT weder von 9,5 dpc auf 10,5 dpc noch von 10,5 dpc auf 11,5 dpc signifikant ist (9,5 dpc zu 10,5 dpc: $\chi^2=3,58$; $p<0,1$ und 10,5 dpc zu 11,5 dpc $\chi^2=2,84$; $p<0,1$).

Bei den IAPs ist keine signifikante Veränderung der Methylierung über die drei Entwicklungsstadien zu beobachten ($\chi^2=4,06$; $p<0,2$). An 9,5 dpc wurden 180/72, an 10,5 dpc 109/40 und an 11,5 dpc 135/75 MP zu UP gezählt. Dies bedeutet, dass die Methylierung von 9,5 dpc auf 10,5 dpc von 71% auf 73% ansteigt, und dann von 10,5 dpc auf 11,5 dpc auf 64% abfällt. Auch diese Reduktion von 10,5 dpc auf 11,5 dpc ist nicht signifikant ($\chi^2=3,15$; $p<0,1$).

Die sich aus diesen Analysen ergebende Frage ist, wie es zur Reduktion der Methylierung der DNA kommt. Geht man allein von der prozentualen Reduktion der Methylierung der DNA aus, kann klar von einer passiven Demethylierung gesprochen werden, da die Methylierung von einem Entwicklungstag zum nächsten nicht mehr als 50% beträgt, was dem Verlauf einer replikationsabhängigen Demethylierung entspräche. Dennoch fällt auf, dass der Verlust der Methylierung in den untersuchten Elementen sehr unterschiedlich oder gar nicht vorhanden ist. Aus diesem Grund habe ich mir die Sequenzen der einzelnen Elemente genauer angesehen, um festzustellen, ob es weitere Unterschiede als die Verringerung der Gesamtmethylierung der einzelnen Elemente gibt.

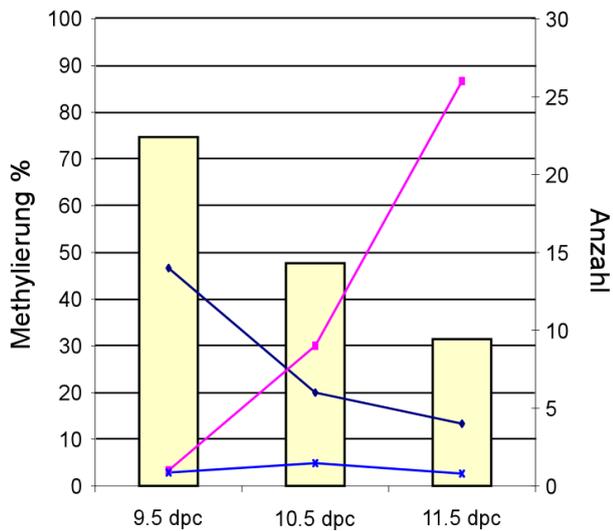
Zuerst habe ich das Methylierungsmuster der einzelnen Elemente auf Veränderungen hin analysiert.

Dazu habe ich die erhaltenen Einzelsequenzen, im Folgenden als Klone bezeichnet, in einheitlich methylierte Klone (rein) oder gemischt methylierte Klone (gemischt) unterteilt. Als rein wurden bei LINE1 Elementen und IAPs die Sequenzen eingestuft, in der alle analysierten Positionen mit maximal einer Abweichung den gleichen Methylierungsstatus aufwiesen. Alle anderen Sequenzen wurden als gemischt eingestuft. Bei cenSAT wurde für die Einstufung ‚rein‘ keine Abweichung einer Position vom Methylierungsstatus zugelassen, da pro Sequenz nur fünf Positionen analysiert wurden. Von Interesse war

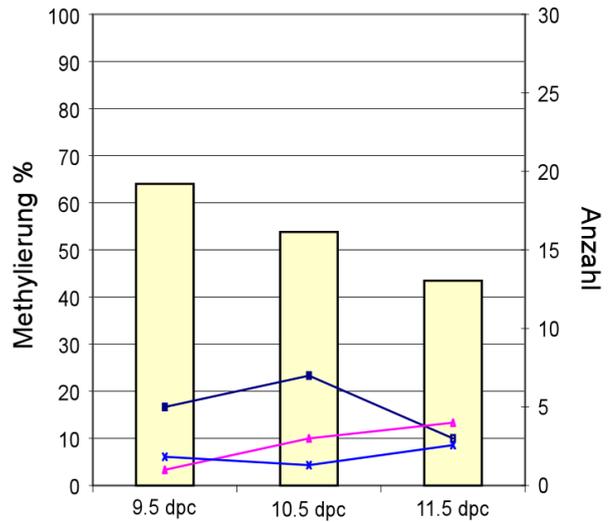
nun, ob die beobachtete Demethylierung der einzelnen Elemente dadurch zustande kommt, dass die Anzahl der vollständig unmethylierten Klone (UK) im Verhältnis zu den vollständig methylierten Klonen (MK) zunimmt oder dadurch, dass es zu einer Veränderung im Verhältnis von rein methylierten Sequenzen zu gemischt methylierten Sequenzen kommt.

Ich habe mit Hilfe des χ^2 -Tests oder, wenn Häufigkeiten $n < 5$ analysiert wurden, mit dem Craddock-Flood- χ^2 -Kontingenztest (Lienert, G.A. Verteilungsfreie Methoden der Biostatistik Verlag: Anton Hein, Meisenheim 1975 Bd. 2) untersucht, ob es über die drei Entwicklungsstadien zu einer Veränderung im Verhältnis von gemischt methylierten Sequenzen zu rein methylierten Sequenzen kommt und, sollte das nicht der Fall sein, ob sich das Verhältnis von vollständig methylierten Sequenzen zu vollständig unmethylierten Sequenzen verändert. Abbildung 25 zeigt nun die Gesamtmethylierung der einzelnen Elemente in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in Prozent (helle, gelbe Balken), die Anzahl der vollständig methylierten Sequenzen (dunkelblaue Linie) und die Anzahl der vollständig unmethylierten Sequenzen (rosa Linie) sowie das Verhältnis von einheitlich methylierten Sequenzen zu gemischt methylierten Sequenzen (gemischt/ rein hellblaue Linie).

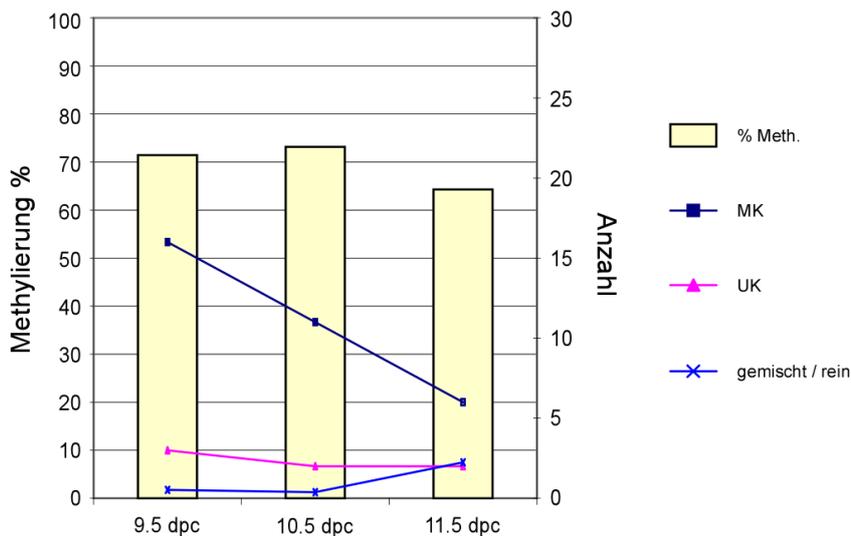
Bei den LINE1 Elementen ist zu erkennen, dass sich das Verhältnis von gemischt methylierten Sequenzen zu rein methylierten Sequenzen nicht verändert (9,5 dpc: 0,87; 10,5 dpc: 1,47; 11,5 dpc: 0,8). Selbst wenn zum Zeitpunkt 10,5 dpc im Verhältnis mehr rein methylierte Sequenzen gezählt wurden als an 9,5 dpc und an 11,5 dpc, sind diese Unterschiede nicht signifikant, wenn sie über alle drei Entwicklungsstadien betrachtet werden ($\chi^2=2,13$; $p \approx 0,5$). Leider kann mit dem Craddock-Flood- χ^2 -Kontingenztests nicht getestet werden, ob sich das Verhältnis von ‚gemischt‘ zu ‚rein‘ von 9,5 dpc auf 10,5 dpc signifikant verändert oder von 10,5 dpc auf 11,5 dpc, da dieser nicht für 2x2 Feldertafeln zulässig ist.



LINE1



cenSAT



IAP

Abbildung 25: Auswertung der Methylierungsanalysen von LINE1 Elementen, cenSAT und IAPs während der PGC-Entwicklung. Angegeben sind jeweils die Gesamtmethylierung in Prozent (gelbe Balken), die aus der Methylierung aller zu dem jeweiligen Entwicklungsstadium analysierten CpGs errechnet wurde (primäre Größenachse). Anzahl der gezählten methylierten Sequenzen (MK, dunkelblaue Linie) und unmethylierten Sequenzen (UK, rosa Linie, sekundäre Größenachse). Verhältnis von gemischt methylierten Sequenzen zu rein methylierten Sequenzen (gemischt/rein, ebenfalls sekundäre Größenachse, hellblaue Linie)

Bei cenSAT ist dies ähnlich. Hier kommt es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung zwischen den Verteilungen von ‚gemischt‘ zu ‚rein‘ (9,5 dpc: 1,83; 10,5 dpc: 1,30;

11,5 dpc: 2,57). Der χ^2 -Wert liegt hier bei $\chi^2 = 1,26$, was einem $p \approx 0,5$ entspricht. Bei den IAPs ist interessanterweise eine deutlich signifikante Veränderung im Verhältnis von ‚gemischt‘ zu ‚rein‘ zu erkennen, obwohl diese Elemente keine signifikante Veränderung in der Gesamtmethylierung über die Entwicklungsstadien zeigen. Hier liegen die Werte der Verhältnisse bei 0,53 an 9,5 dpc, 0,38 bei 10,5 dpc und bei 2,25 bei 11,5 dpc. Dies führt zu einem $\chi^2=9,61$, was einem $p \geq 0,01$ entspricht. Da die Verhältnisse für 9,5 dpc und 10,5 dpc sehr ähnlich sind, es aber zu einer Umkehrung der Verhältnisse von 10,5 dpc auf 11,5 dpc kommt, sollte zusätzlich überprüft werden, ob die Veränderungen innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien ebenfalls signifikant sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Veränderung von ‚rein‘ zu ‚gemischt‘ von 9,5 dpc auf 10,5 dpc nicht signifikant ist ($\chi^2=0,29$) wohl aber die Veränderung von 10,5 dpc auf 11,5 dpc ($\chi^2=7,32$; $p \geq 0,01$).

Nun sollte, wie schon angesprochen, überprüft werden, wie wahrscheinlich es ist, dass die signifikante Veränderung der Gesamtmethylierung auf eine Veränderung im Verhältnis von vollständig methylierten Sequenzen zu vollständig unmethylierten Sequenzen zurückzuführen ist. Dies wurde ebenfalls mit Hilfe des Craddock-Flood- χ^2 -Kontingenztests untersucht. Bei den LINE1 Elementen wurden, wie in Abbildung 25 zu erkennen, an 9,5 dpc 14 methylierte Sequenzen und 1 unmethylierte Sequenz gezählt, an 10,5 dpc 6 methylierte und 9 unmethylierte und an 11,5 dpc 4 methylierte und 26 unmethylierte. Dies ist eine hochsignifikante Veränderung ($\chi^2 = 26,67$; $p \geq 0,001$). Bei cenSAT sind die Ergebnisse nicht so eindeutig. Hier wurden an 9,5 dpc 5 methylierte und 1 unmethylierte Sequenz gezählt, an 10,5 dpc 7 methylierte und 3 unmethylierte und an 11,5 dpc 3 methylierte und 4 unmethylierte. Diese Veränderungen sind nicht signifikant ($\chi^2 = 2,51$; $p \approx 0,5$). Aus diesen Analysen ist zu erkennen, dass die drei untersuchten Elemente sich in Bezug auf die Demethylierung unterschiedlich verhalten. Line1 Elemente werden gleichmäßig über die drei Entwicklungsstadien demethyliert, wobei es zu einer Anreicherung von vollständig unmethylierten Sequenzen sowohl gegenüber gemischt methylierter, als auch vollständig methylierter Sequenzen kommt. cenSAT Sequenzen werden zwar über die drei Entwicklungsstadien demethyliert aber nicht so stark und nicht so gleichmäßig wie Line1. Zusätzlich lässt sich statistisch nicht klären, nach welchem Muster die Demethylierung erfolgt. IAP Sequenzen unterscheiden sich wiederum deutlich von Line1 und cenSAT, da diese nicht demethyliert werden, sich das Methylierungsmuster innerhalb der drei Entwicklungsstadien offensichtlich aber verändert.

3.2.3 Methylierungsanalyse eines elterlich geprägten Gens der Maus während der Keimzellentwicklung

Es ist bekannt, dass geprägte Gene während der Entwicklung und Differenzierung von Keimzellen demethyliert werden (Hajkova et al. 2002; Li et al. 2004). In diesen Arbeiten wurde festgestellt, dass die DMRs der untersuchten Gene Snrpn, Peg3, Lit1, IGF2 und H19 im Verlauf von Tag 11,5 auf Tag 12,5 während der Embryogenese der Maus demethyliert werden. Da die beobachtete Demethylierung innerhalb von einem Tag geschieht und sich der Methylierungsstatus um mehr als 50% verringert, wurde argumentiert, dass es sich hierbei nicht um einen ausschließlich von der Zellteilung abhängigen Prozess handeln kann. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit, wie auch in der Arbeit von Lane (Lane et al. 2003) die Dynamik der Methylierung von Line1 Elementen und IAPs untersucht. Hajkova et al. haben ebenfalls einen passiven Verlust von Methylierung dieser Elemente feststellen können, aber zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (11,5 - 13,5 dpc). Um nun festzustellen, ob sich die von mir beobachtete Dynamik der Demethylierung grundsätzlich von der von Hajkova und Lane beobachteten unterscheidet oder ob die gleichen Phänomene nur zu einem früheren Zeitpunkt beobachtet wurden, sollte zusätzlich der Methylierungsstatus des H19 Gens untersucht werden.

Hierfür wurden ebenfalls die Mausekreuzungen BL6xSD7 bzw. SD7xBL6 verwendet, sodass in diesem Fall aufgrund von in der Region vorhandenen SNPs (*single nucleotide polymorphism*) das jeweilige väterliche und mütterliche Allel identifiziert werden konnte. So lässt sich erkennen, ob dem Verlust von Methylierung nicht nur eine Fehlinterpretation der ungleichmäßigen Amplifikation beider parental Allele zu Grunde liegt. Die Zellen wurden per Hand sortiert, einer Bisulfitmutagenese unterzogen (wie in Abschnitt 30 aufgeführt) und anschließend einzelne Klone sequenziert und analysiert. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 26 dargestellt.

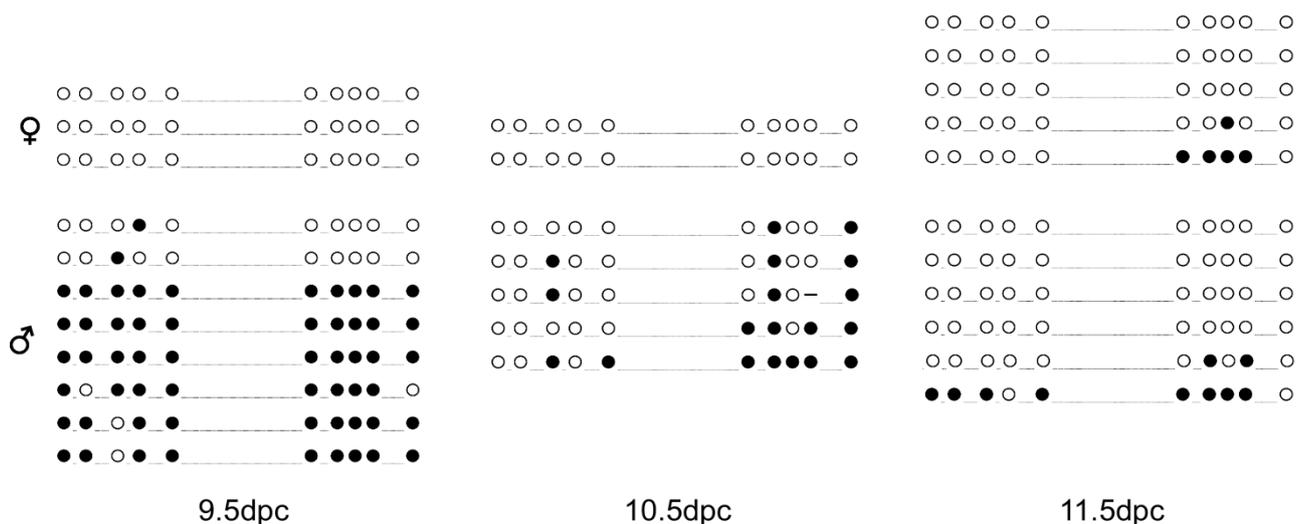


Abbildung 26: Methylierungsanalyse der CTCF Bindungsstelle Nr.3 in der Maus während der Entwicklung der Keimzellen. Jede Zeile repräsentiert eine analysierte Sequenz, ein ausgefüllter Kreis (●) ein methyliertes CpG, ein offener Kreis (○) ein nicht methyliertes CpG. Die Sequenzen sind sortiert nach maternalem (♀) oder paternalem (♂) Ursprung.

Es ist zu sehen, dass an 9,5 dpc das maternale Allel wie erwartet unmethyliert vorliegt, während das paternale Allel bis auf zwei Sequenzen vollständig methyliert ist (75% Methylierung). An 10,5 dpc bleibt das mütterliche Allel weiter unmethyliert, während das väterliche deutlich weniger Methylierung als an 9,5 dpc aufweist (38%). An Tag 11,5 dpc ist das väterliche Allel fast vollständig unmethyliert (16% Methylierung). Die Abnahme der gemessenen Gesamtmethylierung ist hochsignifikant ($\chi^2=44,43$; $p<0,001$). Achtet man nun aber nicht nur auf die Gesamtmethylierung des paternalen Allels an Tag 10,5 dpc, sondern auch auf die Verteilung der Methylierung innerhalb der Sequenzen, fällt auf, dass die rechten fünf CpGs mit 16% deutlich weniger methyliert sind, als die linken fünf CpGs mit 62,5% Methylierung. Dieser Unterschied zwischen den CpGs auf der linken Seite und denen der rechten Seite ist mit einem $\chi^2=10,63$; $p<0,01$ ($\chi^2=10,82$ entspricht $p<0,001$) nahezu hoch signifikant. Ein solcher Unterschied ist weder an 9,5 dpc (in beiden Fällen 72,5%, $\chi^2=0,0$) noch an 11,5 dpc (13,3% für die CpGs auf der linken Seite und 20% Methylierung des CpGs auf der rechten Seite, $\chi^2=0,43$) zu erkennen.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in den von mir analysierten Proben die Demethylierung der untersuchten repetitiven Elemente und des geprägten Gens H19 von 9,5 dpc auf 10,5 dpc der Embryonalentwicklung erfolgt. Dies weicht ab von den bisher in der Literatur veröffentlichten Analysen, in denen die Demethylierung von 11,5 dpc auf

12,5 dpc der Embryonalentwicklung beschrieben wird (Hajkova et al. 2002; Lane et al. 2003; Li et al. 2004; Hajkova et al. 2008).

3.3 Patientenanalyse an einer Familie mit MZZ, die diskordant für BWS sind

Während unterschiedlicher Reprogrammierungsereignisse im Laufe der embryonalen Entwicklung kommt es beim Menschen immer wieder zu Fehlern, die sich unter anderem im Auftreten von epigenetisch bedingten Krankheiten bemerkbar machen können. Am einfachsten sind diese Reprogrammierungsfehler in MZZ zu studieren, da diese als Klone bezeichnet und somit als genetisch identisch angesehen werden. So kann bei MZZ ein Defekt, der nur in einem der beiden Zwillinge auftritt, nicht auf eine von den Eltern stammende Mutation zurückzuführen sein, da in einem solchen Fall beide Zwillinge von dieser Mutation betroffen wären. Man geht daher davon aus, dass es während der sehr frühen Embryogenese zu einem Reprogrammierungsfehler gekommen ist und es sich somit um einen epigenetischen Effekt handelt.

In meiner Arbeit wollte ich den jeweiligen Methylierungsstatus unterschiedlicher Gene wie auch die Expressionsrate der Gene *Igf2* und *CDKN1C* der einzelnen Familienmitglieder analysieren. Untersucht werden sollte, ob neue bisher in der Literatur nicht beschriebene Abweichungen im Bezug auf DNA Methylierung der *Imprinting Center* der BWS Cluster und der Expression von *Igf2* und *CDKN1C* gefunden werden können. Dies ist deshalb interessant und wichtig, da in der untersuchten Familie männliche MZZ geboren wurden, die diskordant für das Beckwith-Wiedemann-Syndrom sind. Bisher sind in der Literatur nur 28 Zwillingspaare beschrieben, von denen 20 weiblich sind (Weksberg et al. 2002; Smith et al. 2006) und die diskordant für dieses Syndrom sind. Bei der Methylierungsanalyse dieser Familie wurde die ältere Schwester der Zwillingenbrüder in die Analyse mit einbezogen, da diese bei ihrer Geburt eine übergroße Zunge (ein Merkmal des BWS) aufwies, die sich allerdings im Laufe der Zeit verwachsen hat. Dies könnte von Bedeutung sein, da es vielleicht auf eine Prädisposition für BWS in dieser Familie hinweist.

3.3.1 Analyse des gesamt Methylierungsstatus der Imprinting center I und II der BWS Region

Um das Methylierungsniveau der Gene Lit1 und H19 zu bestimmen, habe ich DNA aus Vollblut wie unter Abschnitt 2.13 mit Hilfe des *southern blots* untersucht, da diese Methode die Möglichkeit bietet, den Methylierungsgrad mit relativ wenigen Arbeitsschritten direkt von der Ausgangs-DNA abzulesen. Hierfür wurden große Mengen isolierter genomischer DNA mit einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym und einem, das nicht CpG methylierungssensitiv ist, geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die auf dem Gel aufgetrennte DNA auf eine Membran transferiert und mit einer für das zu untersuchenden Gen spezifischen Sonde hybridisiert. Aus der Menge der mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym geschnittenen DNA lässt sich direkt der Grad an Methylierung an dieser spezifischen Position ableiten.

3.3.1.1 Lit1 (IC2)

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der Methylierungsanalyse des Lit1 Gens von DNA aus Blut und die daraus generierten Daten. Untersucht wurde die von Weksberg (Weksberg et al. 2002) untersuchte Restriktionsschnittstelle. Sie ist in Abbildung 31 eingezeichnet.

Rechts oben ist der Ausschnitt aus dem *southern blot* zu sehen, der analysiert wurde. Die obere geschwärmte Bande zeigt die DNA des Lit1 Gens, die nicht mit dem methylierungssensitiven Enzym NotI zu schneiden war, während die untere geschwärmte Bande die geschnittene und damit unmethylierte DNA zeigt. Die Intensität der Schwärzung des Röntgenfilms, die mit Hilfe von ImageJ bestimmt wurde (Graphen in Abbildung 27), ist dabei proportional zur detektierten Menge DNA (siehe auch Abschnitt 2.14). Die prozentuale Methylierung wurde wie folgt berechnet: Intensität der oberen Bande geteilt durch die Summe der Intensitäten der oberen und der unteren Bande. Diese Verhältnisse sind in der Tabelle in Abbildung 27 angegeben. Es ist zu erkennen, dass die beiden Frauen (Mutter und Tochter) ein erwartetes Methylierungsniveau mit 48% und 47% Methylierung aufweisen, während die beiden Zwillinge ein zu niedriges Methylierungsniveau zeigen. Für den gesunden Zwilling wurden 23% Methylierung gemessen und für den erkrankten Zwilling 8%. Der Vater liegt mit 40% Methylierung genau auf der von (Weksberg et al. 2001) angegebenen Grenze zur Hypomethylierung. Die für die Zwillinge geltenden Methylierungsquotienten entsprechen den von Weksberg et. al beobachteten

(Weksberg et al. 2002). Um herauszufinden, ob bei dem Vater tatsächlich eine Hypomethylierung vorliegt, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

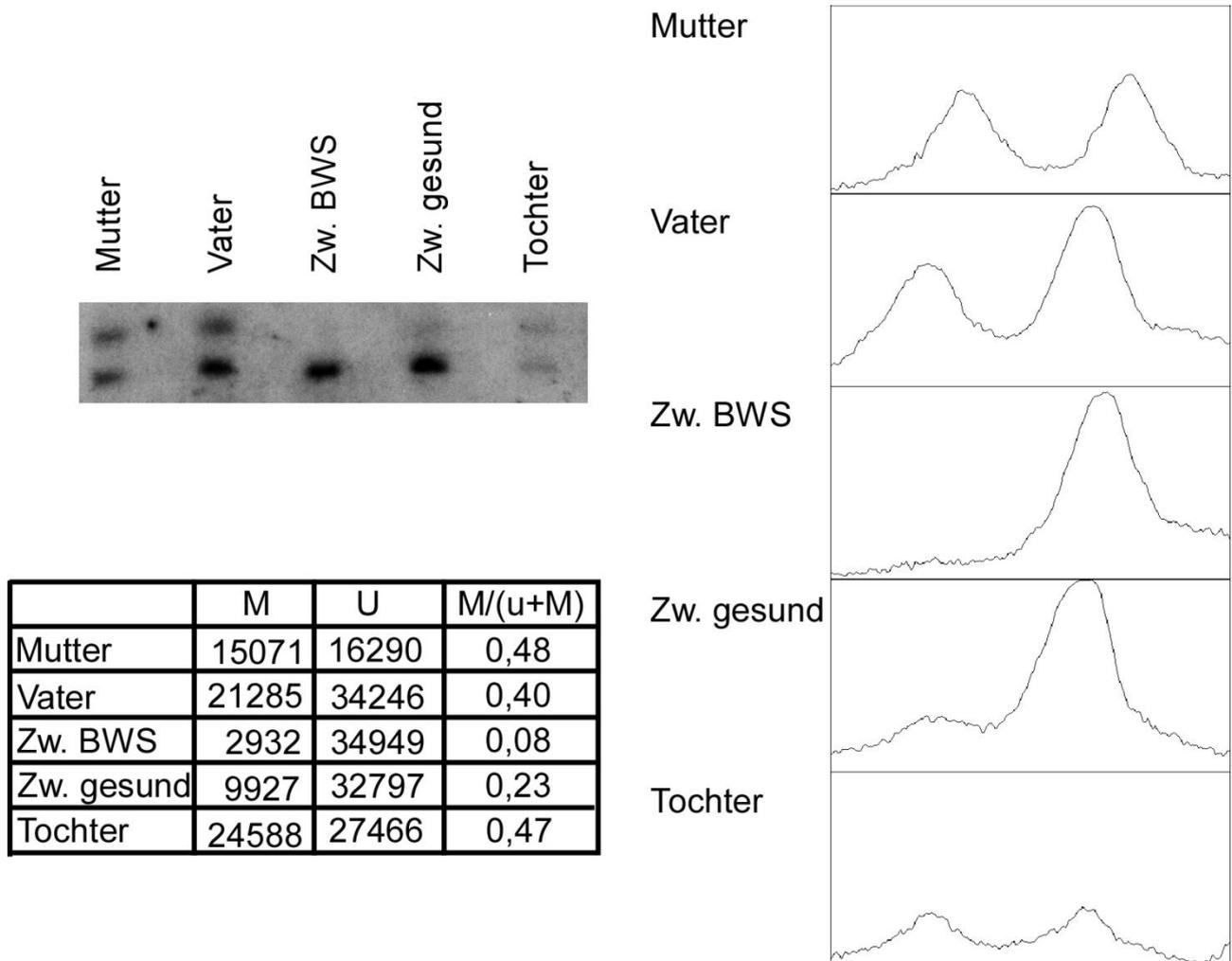


Abbildung 27: Southern blot Analyse des Lit1 Gens. Erläuterung siehe Text.

Weiter wurde untersucht, ob sich auch bei diesem Zwillingsspaar das Methylierungsniveau des Lit1 1 Gens von DNA aus Vollblut von dem aus Hautzellen unterscheidet. Diese Analyse konnte leider nicht mit einem *southern blot* durchgeführt werden, da nicht ausreichend genomische DNA zu Verfügung stand. Eine weitere Methode, um den Methylierungsstatus eines einzelnen CpG zu überprüfen, ist die SIRPH Methode (siehe Abschnitt 2.15).

Hierzu wurden mit Bisulfit behandelte genomische DNA PCR-Produkte generiert. Die Bisulfit-Behandlung führt, wie unter Abschnitt 2.11 beschrieben, zur Umwandlung von unmethylierten Cytosinen in Thyminen, während methylierten Cytosine erhalten blieben. Diese Mutationen können mit Hilfe der SIRPH-Methode analysiert werden. Hierfür wird der

eine SNUPE (*single nucleotide polymorphism primer extension*) Reaktion, bei der ein Oligonukleotid um genau eine Base verlängert wird, auf einem speziellen HPLC-System (WAVE transgenomics) aufgetrennt. Dabei macht man sich zunutze, dass sich die unterschiedlich verlängerten Oligonukleotide in ihrer Hydrophobizität voneinander unterscheiden.

Zur Auswertung der Daten wird die Höhe unter dem Scheitelpunkt des Elutionssignals für das mit einem Cytosin verlängerte Oligonukleotid ins Verhältnis zu der Gesamtsumme der Höhen unter den Scheitelpunkten aller verlängerten Oligonukleotide gesetzt ($h_C/(h_C+h_T)$).

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der *southern blot* Analyse ist die Tatsache, dass nur sehr wenig Ausgangsmaterial benötigt wird (im Nanogramm-Bereich). Die mit SIRPH analysierten Positionen sind in Abbildung 34 eingezeichnet.

Abbildung 28 zeigt die Zusammenfassung dreier von einander unabhängigen Analysen der Mundschleimhaut. In diesem Fall kann man von den Quotienten nicht direkt auf den Grad der Methylierung schließen. El-Maarii et al. zeigen zwar, dass der Quotient direkt proportional zum Verhältnis der methylierten zu den nicht methylierten DNA steht. Dies ist aber für meine Untersuchung bedeutungslos, da mit dem beschriebenen Ansatz nur nachgewiesen wird, dass die SNUPE und die anschließende HPLC Analyse zu keiner Verzerrung der Analyse führen (El-Maarii et al. 2002). Nicht berücksichtigt wurde hier, dass die zu untersuchende Ausgangs DNA nach der Bisufit-Mutagenese amplifiziert wurde. Diese Amplifikation ist exponentiell und führt damit unweigerlich zu einer Verzerrung der Ergebnisse, die sich vor allem in den Randbereichen der Analyse auswirken. Dieses Problem kann umgangen werden, indem man Referenzproben mit bekanntem Methylierungsstatus analysiert und dann versucht, den Quotienten einer Probe mit nicht bekanntem Methylierungsniveau in diese einzuordnen. Auf dieses sehr zeitaufwendige Verfahren wurde verzichtet, da vor allem von Bedeutung war, inwieweit sich der Methylierungsstatus des gesunden Zwillings von dem des erkrankten und denen der restlichen Familienmitglieder unterscheidet. Dies wurde mit Hilfe des exakten Rangsummen Tests nach Wilcoxon als spezifische Form des U-Tests für kleine Stichproben (siehe Lienert, G. A., Verteilungsfreie Methoden der Biostatistik; Band 1, S. 230f, 1973) analysiert.

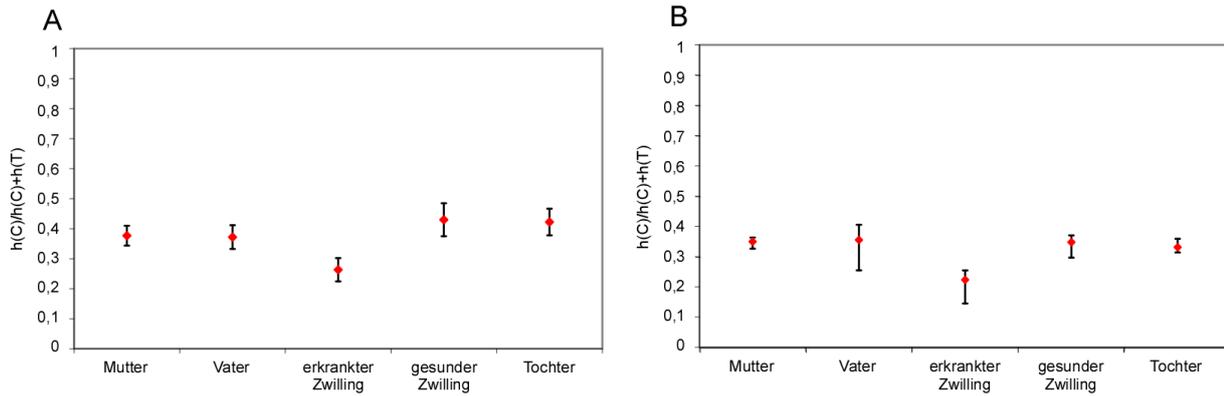


Abbildung 28: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Lit1 Gens in Mundschleimhautproben. Abgebildet sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen. Der mittlere Messwert ist als roter Punkt dargestellt, während die anderen beiden Messwerte als Abweichung angegeben sind. A: Ergebnisse für CpG 4 (siehe auch Abbildung 31); B: Ergebnisse für CpG 11 (ebenfalls Abbildung 31). Verwendete Oligonukleotide siehe Tabelle 3.

Wie aus Abbildung 28 zu erkennen ist, weist der erkrankte Zwilling die geringste Methylierung auf. Zudem unterscheidet er sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (dies ist bei drei Messpunkten die geringst mögliche Irrtumswahrscheinlichkeit) statistisch signifikant von allen anderen Familienmitgliedern. Alle anderen Familienmitglieder unterscheiden sich nicht signifikant von einander.

Zur Kontrolle wurden die Blutproben auch mit der SIRPH-Methode untersucht. Dies war notwendig, da in der *southern blot* Analyse der Blutproben andere Positionen auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden als in den Mundschleimhautproben. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen analysierten Positionen zustande gekommen sind.

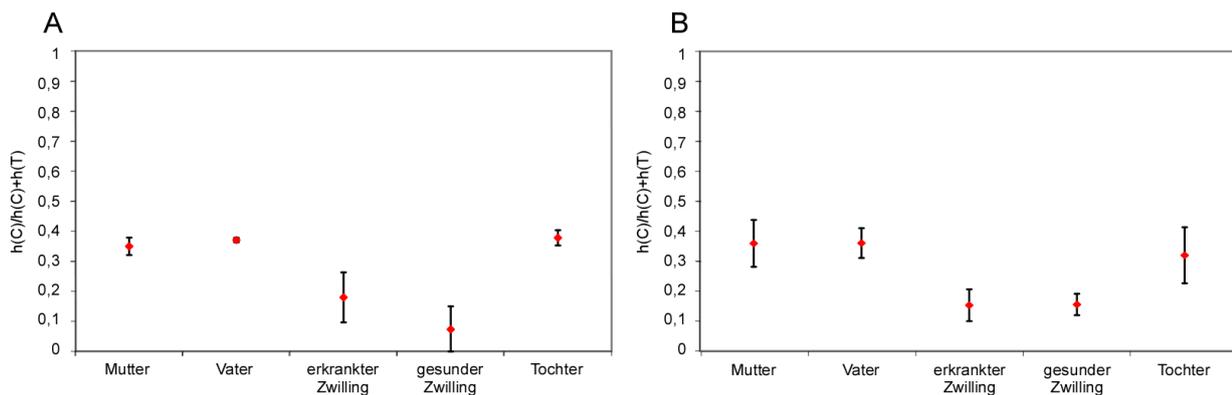


Abbildung 29: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Lit1 Gens in Blutproben. Abgebildet sind die Ergebnisse von mindestens vier unabhängigen Messungen. Der Median ist als roter Punkt dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Differenz des dritten und ersten Quartilabstands an. A: Ergebnisse für CpG 4 (siehe Abbildung 31); B: Ergebnisse für CpG 12 (ebenfalls Abbildung 31). Verwendete Oligonukleotide siehe Tabelle 3.

Abbildung 29 zeigt den der Methylierungsindex der beiden Zwillinge, der deutlich unter denen der anderen Familienmitglieder liegt. Dies stimmt mit den Beobachtungen aus dem *southern blot* überein. In diesen Analysen zeigt der Vater keinen geringeren Methylierungsindex als die Mutter und die Tochter. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten für die jeweiligen Vergleiche sind in Tabelle 12 angegeben. Auch hier ist die Irrtumswahrscheinlichkeiten für die jeweilige Probenanzahl die jeweils kleinst mögliche.

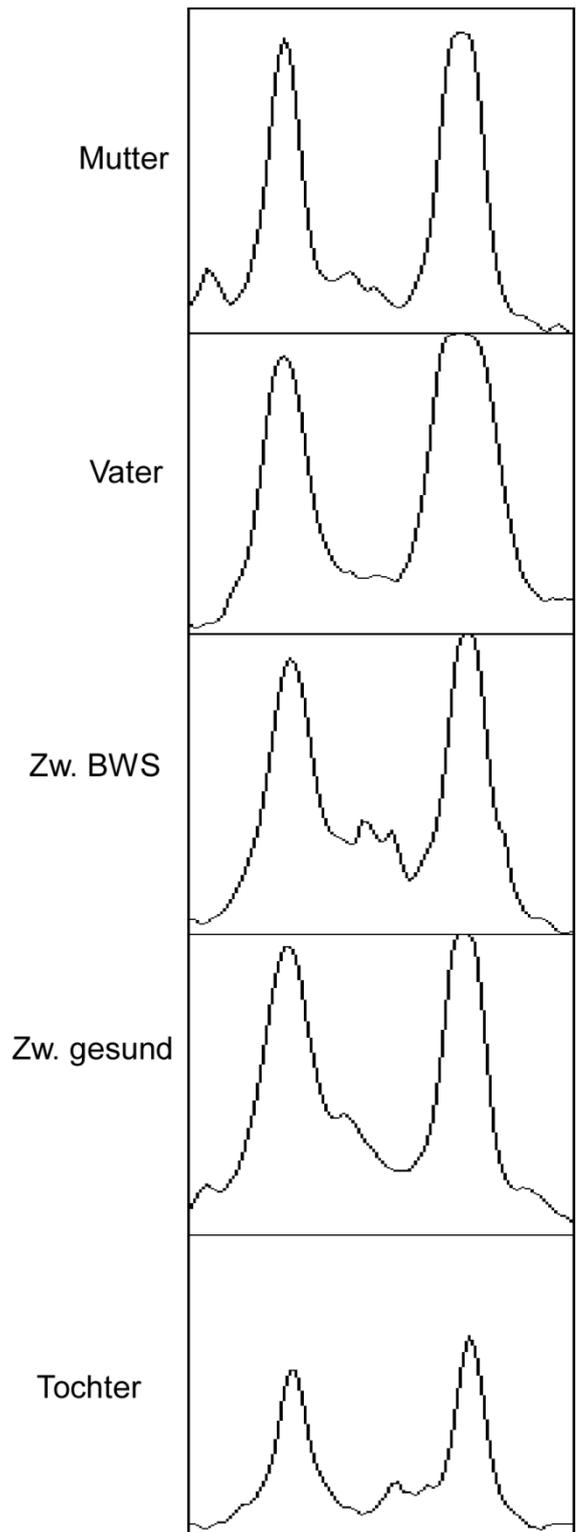
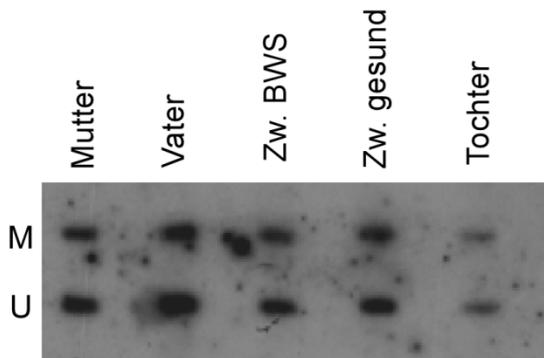
Tabelle 12: Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Hypothese, dass die beiden Zwillinge in Blut im Lit1 Gen einen niedrigeren Methylierungsstatus aufweisen als die anderen Familienmitglieder.

	Erkrankter Zwillling		Gesunder Zwillling	
	CpG 4	CpG 12	CpG 4	CpG 12
Vater	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
Mutter	0,5%	1%	0,5%	1%
Tochter	0,5%	2,5%	0,5%	2,5%

Es konnte gezeigt werden, dass auch in diesem untersuchten Zwillingsspaar Methylierungsunterschiede zwischen Hautzellen und Blutzellen bestehen. Die im Blut für beide ermittelte Hypomethylierung ist in Hautzellen nur in den Proben des erkrankten Zwillingss zu erkennen.

3.3.1.2 H19 (IC1)

Da BWS, wie in der Einleitung beschrieben (siehe Abschnitt 1.7ff), auch durch epigenetische Veränderungen des H19 Gens hervorgerufen werden kann, wurde auch dieses Gen mittels *southern blot* auf seinen Methylierungsstatus untersucht. Die genaue Lage der untersuchten Position ist in Abbildung 34 angegeben. Es handelt sie hierbei um die gleiche Position, die auch Weksberg und Blik untersucht haben (Blik et al. 2001; Weksberg et al. 2002)



	M	U	M/(M+U)
Vater	8908	9142	0,43
Mutter	12743	13530	0,47
Zw. BWS	8690	9678	0,49
Zw. gesund	14706	8421	0,53
Tochter	5765	6072	0,54

Abbildung 30. Southern blot Analyse der Promotorregion des H19 Gens. Erläuterungen siehe Text

In Abbildung 30 ist auf der linken Seite das Autoradiogramm der hybridisierten Membran zu sehen. Oben sind die jeweiligen Familienmitglieder, deren DNA untersucht wurde,

angegeben. Die Intensitäten der detektierten Banden wurden, ebenso wie bei der Analyse des Lit1 Gens, mit Hilfe von ImageJ bestimmt, anschließend wurde der Methylierungsindex ermittelt. Dieser ist in der unteren Tabelle in Abbildung 30 (M/M+U) angegeben. Keines der Familienmitglieder hatte hierbei einen Methylierungsindex unter 0,42 oder über 0,58, was nach den Kriterien von Weksberg et al. einer erwarteten Methylierung von 50% entspricht. Es wurde bei keinem Familienmitglied eine Veränderung in der Methylierung dieser Region festgestellt.

Auch in der Analyse der Blutproben mit SIRPH sowie mit dem exakten Rangsummentests konnten keine Unterschiede zwischen einzelnen Familienmitgliedern festgestellt werden.

3.3.2 Analyse von Methylierungsmustern in Lit1

Da die *southern blot* Analysen des Lit1 Gens keine neuen Erkenntnisse gegenüber der Literatur ergeben haben, wollte ich mir die Methylierung dieser Region sequenzaufgelöst ansehen, um festzustellen, ob damit neue Erkenntnisse gewonnen werden könnten.

Zur Analyse von Methylierungsmustern wurde das *imprinting center 1* der BWS-Region analysiert, das im Intron 10 des KCNQ1 Gens liegt. Die analysierte Region umschließt den von Lee als Promotor charakterisierten Bereich (Lee et al. 1999) des Lit1 Gens. Die Position der analysierten CpGs und ihre Lage im KCNQ1 Gen sind in Abbildung 31 dargestellt, wobei die Positionen in Basen nach UCSC Browser Version Mai 2004 (<http://genome.ucsc.edu>) angegeben sind.

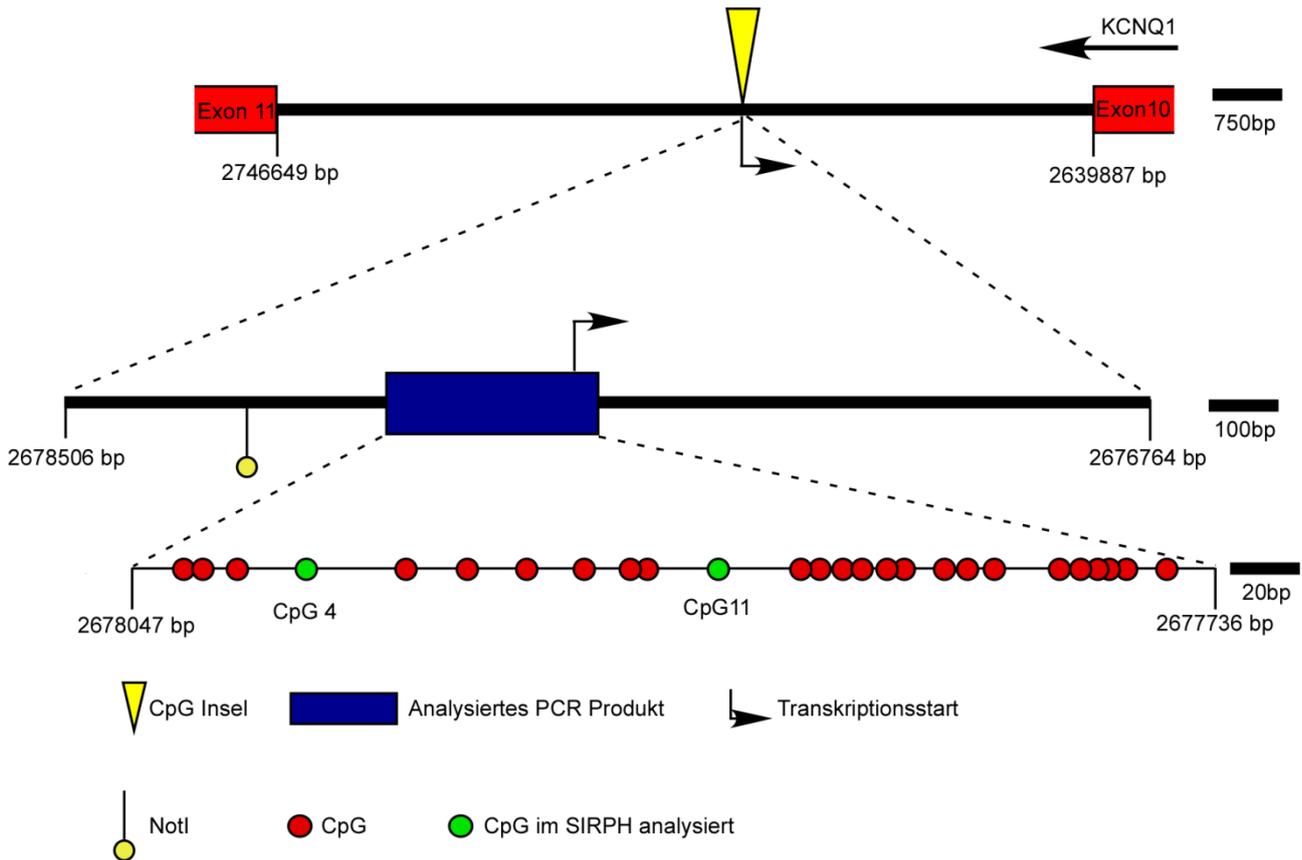


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Intron 10 Region des KCNQ1 Gens, in dem der Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil) von Lit1 lokalisiert ist. Die Darstellung verläuft in Expressionsrichtung von Lit1. Der obere Balken der Abbildung zeigt die CpG Insel (gelbes Dreieck), die sich in Intron 10 befindet und die nach Lee postulierte Promotorregion (Lee et al. 1999) des von (Mitsuya et al. 1999) postulierten Lit1 Gens. Der mittlere Balken zeigt eine Vergrößerung des Bereichs der CpG Insel, die genaue Lage des analysierten PCR Produkts (blauer Kasten) und die Lage der für die Methylierungsanalyse verwendeten NotI Restriktionsschnittstelle (gelb ausgefüllter Kreis). Der untere Balken zeigt eine Vergrößerung des amplifizierten Bereichs, in dem alle analysierten CpGs eingezeichnet sind (rot und grün ausgefüllte Kreise, die grün dargestellten CpGs zeigen die Positionen an, die mit der SIRHP Methode analysiert wurden). CpG 5 wurde aus der Karte entfernt, da an dieser Stelle ein C zu T Polymorphismus in dieser Familie vorliegt.

3.3.2.1 Auszählung der analysierten Sequenzen

Für die Analyse wurde genomische DNA aus Vollblut, wie unter Abschnitt 2.11.1 beschrieben, mit Natriumdisulfit modifiziert. Die zu untersuchende Region wurde anschließend mit Hilfe der in Tabelle 1 angegebenen Primer Th-hLit1-P-F und Th-hLit1-P-R amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Im Anschluss daran wurden die von Einzelklonen generierten Kolonie-PCR-Produkte sequenziert. Die Analyse wurde mit DNA aus zwei unterschiedlichen Blutproben und mindestens zwei unterschiedlichen Bisulfitpräparationen durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Biq Analyzer Software (Bock et al. 2005) ausgewertet. Die Konvertierungsrate der einzelnen

Sequenzen mußte mindestens 90% betragen. Zur Bestimmung der Konvertierungsrate wurden alle Cs der Ausgangssequenz, die nicht in CpGs liegen, gezählt und durch die Differenz der nicht CpG Cs der Ausgangssequenz und der nicht konvertierten Cs dividiert. Eine Sequenz, die mehrheitlich methylierte Positionen aufwies, wurde als methyliert (M) bezeichnet, während Sequenzen (Klone), die mehrheitlich unmethylierte Positionen aufwiesen, als unmethyliert (U) gewertet wurden. Als Abweichungen bezeichne ich CpGs, die in einem methylierten Klon unmethyliert sind oder unmethylierte CpGs in einem methylierten Klon.

Abbildung 32 zeigt die Zusammenfassung aller ausgewerteten, zu Blöcken zusammengefassten Sequenzen der einzelnen Familienmitglieder. Zur besseren Übersicht wurden die methylierten Sequenzen jeweils oberhalb der unmethylierten gruppiert. Insgesamt wurden 149 Klone analysiert. Davon waren 97 unmethyliert und 52 methyliert. Die Anzahl der für die Familienmitglieder jeweils analysierten Sequenzen unterscheidet sich nur aufgrund ihrer Auswertbarkeit und ist nicht von Bedeutung.

Für den Vater habe ich insgesamt 25 Sequenzen ausgewertet, wovon 9 als methyliert und 16 als unmethyliert eingestuft wurden. Die 9 methylierten Klone weisen nur eine unmethylierte Position auf, während in den unmethylierten Klonen 5 je eine Abweichung aufweisen (Abbildung 32 und Tabelle 20).

Für die Mutter wurden insgesamt 33 Sequenzen ausgewertet. Davon waren 22 Sequenzen methyliert und 11 unmethyliert. Von den methylierten Sequenzen wiesen 4 je eine abweichende Position auf und eine weitere Sequenz zeigte zwei Abweichungen. Von den unmethylierten Sequenzen haben vier jeweils eine Abweichung und zwei je zwei Abweichungen (Abbildung 32 und Tabelle 21).

Für den erkrankten Zwilling waren insgesamt 31 Sequenzen auswertbar, von denen 5 methyliert waren und 26 unmethyliert. Von den methylierten Klonen wies kein einziger ein unmethyliertes CpG auf, während 12 der unmethylierten Klone insgesamt 17 methylierte CpG aufwiesen (siehe Tabelle 22 und Abbildung 32).

Für den gesunden Zwilling wurden 36 Klone analysiert, von denen 3 Klone vollständig und ein weiterer Klon in allen Positionen bis auf eine methyliert waren. 32 Klone waren unmethyliert, von denen 19 mindestens eine methylierte Position aufwiesen. Bei dem gesunden Zwilling war insgesamt die höchste Anzahl methylierter CpGs in unmethylierten Klonen zu finden (Tabelle 23 und Abbildung 32).

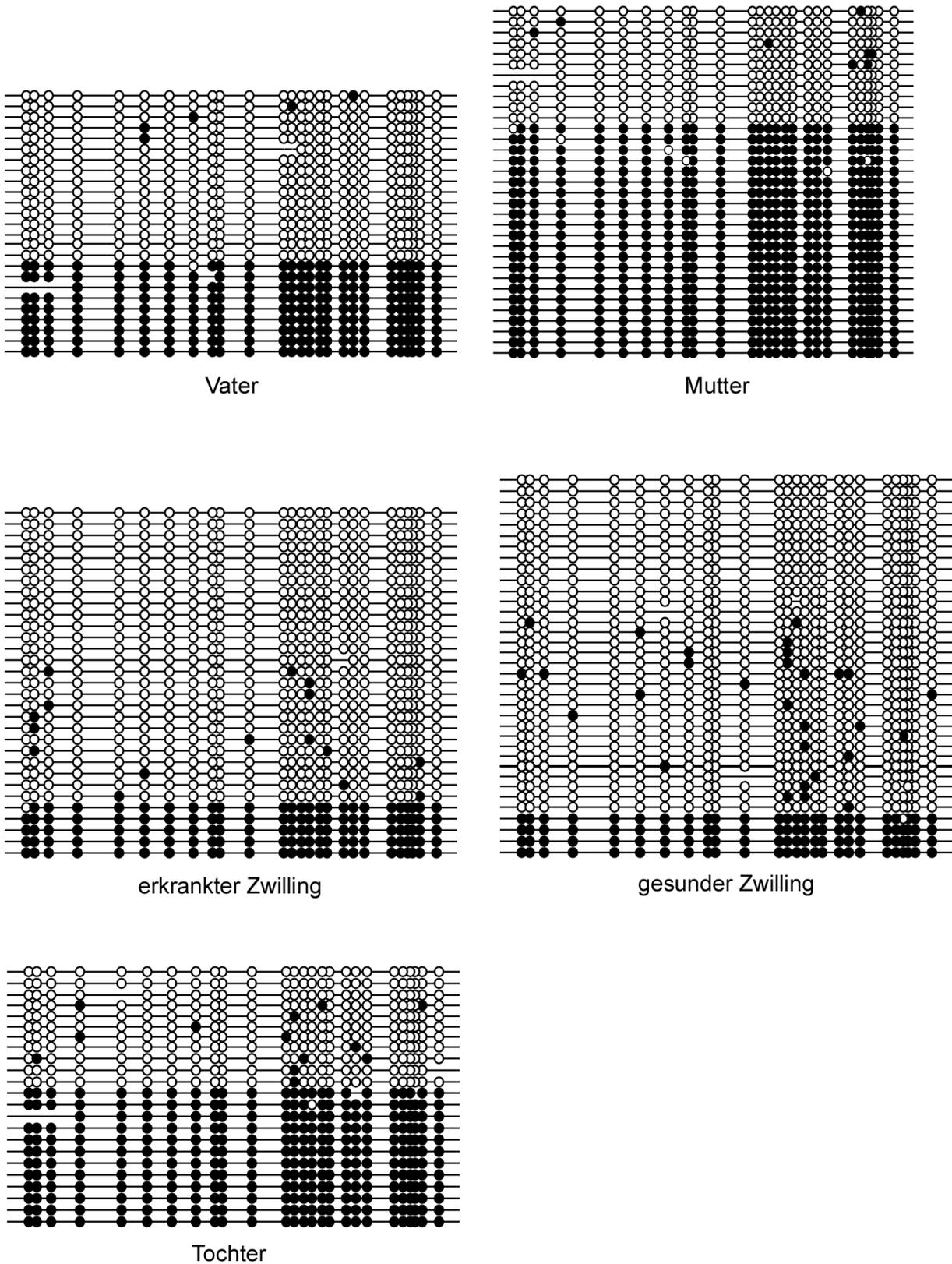


Abbildung 32: Alle Sequenzen, die für die Analyse von Methylierungsmustern in der Promotorregion des Lit1 Gens verwendet wurden. Sequenzen einzelner Familienmitglieder sind als Blöcke dargestellt. Eine Zeile entspricht einer Sequenz, die Kreise repräsentieren CpGs, wobei ausgefüllte Kreise für methylierte CpGs stehen und offene für unmethylierte.

Für die Tochter wurden 23 Sequenzen analysiert. 12 waren methyliert, wobei ein einziges CpG dieser Klone keine Methylierung aufwies. Die restlichen 11 Klone waren unmethyliert und wiesen insgesamt 13 methylierte Positionen auf, die sich auf 8 der 11 unmethylierten Klone verteilten (Tabelle 24 und Abbildung 32).

Die detaillierte Auszählung der Sequenzen findet sich im Anhang in den Tabelle 20 - Tabelle 24

3.3.2.2 Untersuchung auf mosaikale Methylierung der Promotorregion des Lit1 Gens

Wie aus Abbildung 32 und den Tabelle 20 -Tabelle 24 hervor geht, sind methylierte Sequenzen in den meisten Fällen in jeder analysierten Position methyliert (44 von 52), zudem wurde nur einmal mehr als eine unmethylierte Position in einem methylierten Klon beobachtet. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass sich Positionen bezüglich ihrer Methylierung nicht von einander unterscheiden. Es gibt auch bezüglich der Häufung von Klonen, bei denen eine Position unmethyliert ist, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Familienmitgliedern. Bei den methylierten Sequenzen kann demzufolge nicht von mosaikaler Methylierung gesprochen werden. Dies habe ich mit dem Craddock-Flood- χ^2 -Kontingenztest (2x5 Feldertafel) analysiert.

Es fällt hingegen auf, dass gut die Hälfte aller ausgewerteten unmethylierten Sequenzen mindestens eine bis maximal fünf methylierte Positionen aufweisen.

Als erstes wurde mit Hilfe einer Vierfeldertafel überprüft, ob es Unterschiede zwischen einzelnen Familienmitgliedern bezüglich der Häufigkeit der Methylierung des unmethylierten Allels gibt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die gesunden Kinder signifikant vom Vater unterscheiden (dieser hat die geringste Methylierung).

Ob es sich hierbei möglicherweise nur um ein technisch bedingtes Artefakt handelt, wurde überprüft, in dem die Methylierung der unmethylierten Allele mit der korrespondierenden Konvertierungsrate verglichen wurde. Mit einer Vierfeldertafel wurde auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft (Daten siehe Tabelle 20 -Tabelle 24). Leider hat sich bei keinem Familienmitglied die Methylierung des unmethylierten Allels signifikant von einer unspezifischen Nichtkonvertierung unterschieden (χ^2 zwischen 2,9 und 0,04), sodass man nicht mit Sicherheit davon ausgehen kann, dass der Unterschied der mosaikalen Methylierung der gesunden Kinder zum Vater von Bedeutung ist.

3.3.2.3 Methylierungsanalyse einzelner CpGs in der Promotorregion des Lit1 Gens

Anschließend habe ich mich dafür interessiert, ob es einzelne CpG Positionen gibt, die überdurchschnittlich häufig in dem von mir analysierten Genabschnitt von Lit1 methyliert sind. Diese Analyse bezieht sich wieder auf die unmethylierten Sequenzen, da es wie oben beschrieben, in den methylierten Sequenzen keine Unterschiede in der Methylierung einzelner Positionen gibt.

Für die Analyse habe ich die unmethylierten Sequenzen aller Familienmitglieder zusammengefasst. Da die Methylierung eines CpGs in einer unmethylierten Sequenz ein eher seltenes Ereignis ist, wäre bei einer Einzelbetrachtung keine sinnvolle statistische Auswertung möglich. Ich habe dann analysiert, in wievielen Fällen welches CpG methyliert war. Anschließend habe ich mit einer 2x2 Felder Tafel untersucht, ob sich die Häufigkeit des Auftretens von Methylierung eines bestimmten CpGs von der durchschnittlichen Methylierungswahrscheinlichkeit aller CpGs unterscheidet. Die durchschnittliche Methylierungshäufigkeit beträgt 2,85. Die Anzahl auswertbarer CpGs betrug 96 für die CpG Nr. 1-3, 5, 7, 11-13, 15, 18, 23 und 97 für die CpGs Nr. 4, 6, 8-10, 14, 16-17, 19-22, 24-26. Es sind nicht immer für alle CpGs gleich viele Sequenzen vorhanden, da die Sequenzierdaten nicht immer an jeder Stelle auswertbar waren.

Tabelle 13: Positionenbezogene Methylierungsanalyse des Lit1 Gens

Methylierungshäufigkeit einzelner CpGs	Position des CpGs
0 mal	9,10
1 mal	1, 5, 7, 12, 17, 21, 22, 24, 26
2 mal	11, 14, 16, 18, 20
3 mal	23, 25
4 mal	3, 8
5 mal	2, 4, 6, 19
9 mal	15
10 mal	13

Die Häufigkeit methylierter CpGs je analysierter Position ist in Tabelle 13 aufgelistet. In der Analyse wurden zwei Positionen gefunden, die in keiner der analysierten unmethylierten Sequenzen methyliert waren. 9 Positionen waren jeweils einmal methyliert und 5

Positionen jeweils zweimal. Drei- und viermal methyliert waren je 2 Positionen und 4 Positionen fünfmal. Diese Häufigkeiten weichen vom Mittelwert statistisch nicht signifikant ab. Für die sechsmal methylierte Position 4 ist $\chi^2 = 1,7$ (die Signifikanzgrenze mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% liegt bei 3,84). Anders verhält es sich bei CpG 13 und 15, die in zehn bzw. neun Fällen methyliert waren. Diese Häufigkeiten sind statistisch höchst signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit ist $< 0,5\%$). Außerdem unterscheiden sich die Methylierungsraten von CpG 13 und 15 ebenfalls statistisch höchst signifikant von der gesamten Konvertierungsrate. Um auszuschließen, dass die überdurchschnittliche Häufigkeit der Methylierung von CpG 13 und 15 darauf zurückzuführen ist, dass die Konvertierung in diesem speziellen Sequenzabschnitt generell schlechter ist als im restlichen, wurde analysiert, ob die Konvertierung der nicht-CpGs in diesem Bereich ebenfalls überdurchschnittlich hoch ist. Hierfür wurde ausgezählt, wie oft welches nicht-CpG Cytosin nicht konvertiert war, und ob in diesem Bereich überdurchschnittlich viele nicht-CpG Cytosine nicht konvertiert waren.

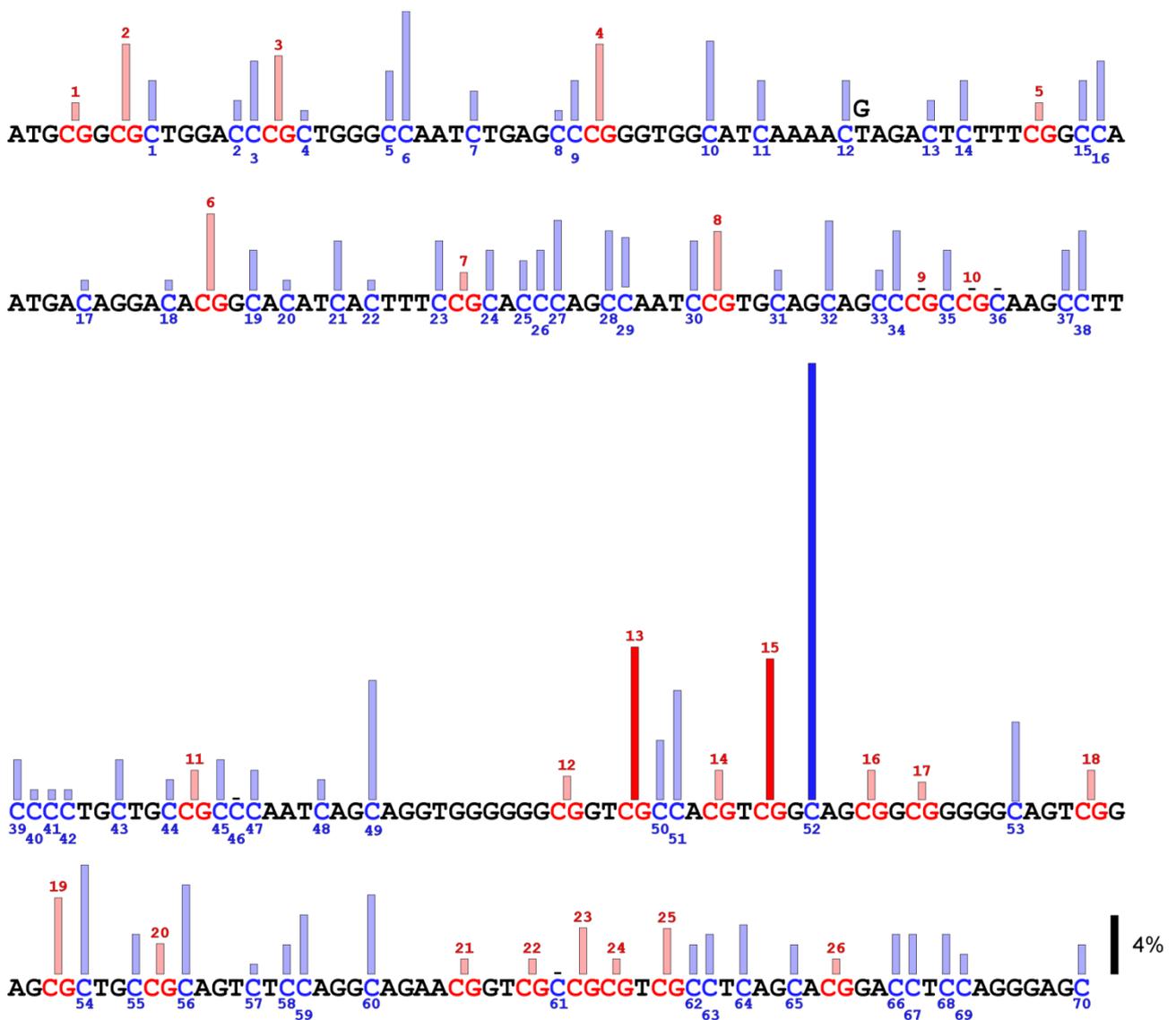


Abbildung 33: Konvertierungsanalyse aller nicht-CpG Cytosine des analysierten Lit1 Fragments. Ausgewertet wurden Cytosine von 148 Sequenzen. Die gesamte Sequenz des analysierten Abschnitts ist als Text wiedergegeben. Die Nichtkonvertierung bzw. Methylierung wurde in% als Balken über jedem C bzw. CpG dargestellt. Heller eingefärbte Balken bedeuten eine statistisch nicht signifikante Abweichung zum Mittelwert, während dunkler eingefärbte Balken einen statistisch signifikanten Unterschied zum Mittelwert darstellen.

Abbildung 33 gibt wieder, wie häufig einzelne nicht CpG Cytosine in den insgesamt 148 analysierten Sequenzen nicht konvertiert waren. In diese Betrachtung wurden auch die als methyliert eingestuft Sequenzen einbezogen, da es mir darum ging, zu prüfen, ob es Bereiche gibt, die sich grundsätzlich schlechter konvertieren lassen als andere, unabhängig von der Frage des Methylierungszustandes der Sequenz. Die durchschnittliche Häufigkeit für ein nicht konvertiertes nicht-CpG Cytosin ist 5. Von diesem Mittelwert weicht nur ein nicht-CpG Cytosin statistisch signifikant ab. Hierbei handelt es

sich um Cytosin 52, das sich in der Sequenz an Position 176 befindet. Es liegt wie in Abbildung 33 eingezeichnet hinter CpG 15. Cytosin 50, das direkt hinter CpG 13 liegt, wurde sechsmal nicht konvertiert. Cytosin 51, das in der Basenabfolge direkt neben Cytosin 63 liegt, wurde elfmal nicht konvertiert. Dies ist in beiden Fällen kein statistisch signifikanter Unterschied ($\chi^2 = 2,37$ für Cytosin 51). Cytosin 62 war in 44 von 48 Fällen nicht konvertiert, was statistisch höchst signifikant ist ($\chi^2 = 38,4$).

Aus dieser Analyse ist zu schließen, dass die überdurchschnittlich hohe Methylierung der CpGs 13 und 15 höchst wahrscheinlich nicht auf eine schlechte Konvertierung zurückzuführen ist. Für diese Schlussfolgerung spricht zudem, dass die beiden CpGs verglichen mit anderen CpGs überdurchschnittlich häufig methyliert sind, bezüglich der Konvertierungsrate sogar deutlich überdurchschnittlich. Zudem sind zwei der drei nicht-CpG Cytosine, die diese beiden CpGs umgeben nicht überdurchschnittlich häufig nicht konvertiert. Die überdurchschnittlich häufige Nichtkonvertierung von Cytosin 52 ist eigens zu betrachten, da diese eine Besonderheit zu sein scheint (siehe nächster Abschnitt). Dennoch können nur weitere Experimente endgültig Klarheit darüber bringen, ob diese beiden CpGs einen Sonderstatus gegenüber anderen CpG einnehmen. Aufgrund der geringen Häufigkeit, mit der einzelne CpGs in unmethylierten Klonen nicht methyliert sind, konnte nicht überprüft werden, ob es bezüglich der Häufigkeit der Methylierung von CpG 13 und 15 Unterschiede zwischen einzelnen Familienmitgliedern gibt.

3.3.2.4 Analyse des Cysteins 176

Die überdurchschnittlich hohe nicht-Konvertierung von Position 176 (nicht-CpG Cytosin 52) war so augenfällig, dass sie einer genaueren Untersuchung bedurfte. Dabei fiel auf, dass sich 40 dieser nicht konvertierten Cytosine in unmethylierten Klonen befanden, während nur 4 in methylierten Klonen zu finden waren. Das bedeutet, dass fast die Hälfte der unmethylierten Klone (40 von 96) an dieser Position ein nicht konvertiertes Cytosin aufweisen.

Ob sich dies statistisch signifikant von der durchschnittlichen Konvertierungsrate unterscheidet, wurde mit dem Craddock - Flood χ^2 - Kontingenztest überprüft. Die Verteilung zwischen methylierten und unmethylierten Klonen von nicht konvertierten Cs an Position 176 (die diesem Test zugrundeliegenden Werte sind Tabelle 14 zu entnehmen)

unterscheidet sich höchst signifikant ($\chi^2 = 44,58$), vergleicht man sie mit den Durchschnittswerten der anderen nicht-CpG Cytosine.

Tabelle 14: Verteilung nicht konvertierter Cytosine an Position 176 in methylierten und unmethylierten Klonen im Vergleich zur durchschnittlichen Nichtkonvertierung. Cs in UK gibt an, wie viele Cytosinen in unmethylierten Klonen nicht konvertiert waren, Ts in UK gibt an, wie viele konvertiert waren. MK steht auch hier für methylierte Klone.

	Cs in Uk	Ts in UK	Cs in MK	Ts in MK
Position 206	40	56	4	49
Durchschnitt	3	93	2	51

Bei der Verteilung von nicht konvertierten Cytosinen an Position 176 zwischen methylierten und unmethylierten Klonen konnten zwischen den einzelnen Familienmitgliedern keine Unterschiede festgestellt werden (χ^2 Werte von 0,027 bis 0,767) Dies wurde mit einem normalen χ^2 Test überprüft. Die diesem Test zugrundeliegenden Werte sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Ergebnis der Auszählung von Cytosinen (C) und Thyminen (T) an Position 176 in unmethylierten (UK) und methylierten (MK) Klonen.

	C 176 in UK	C 176 in MK	T 176 in UK	T 176 in MK
Vater	6	0	10	9
Mutter	6	2	5	20
Erk. Zw	11	2	15	3
Ges. Zw.	12	0	18	4
Tochter	6	0	6	13

Mit dieser Analyse konnte nachgewiesen werden, dass Position 176 des analysierten Fragments in unmethylierten Klonen überdurchschnittlich oft nicht konvertiert war. Dies gilt für alle Familienmitglieder und kann demzufolge weder als ein Phänomen des BWS noch der Geschlechtszugehörigkeit gewertet werden.

3.3.3 Analyse von Methylierungsmustern im H19 Gen

Analog zu dem Lit1 Gen wurde bei H19 analysiert, ob es auffällige Muster in der Methylierung gibt. In diesem Fall wurden zwei verschiedene Sequenzabschnitte untersucht, die sich aus der Methylierungsanalyse mittels *southern blot* ergeben hatten (siehe Abschnitt 3.3.1 H19). Abbildung 34 zeigt die beiden untersuchten Regionen und

ihre Lage im H19 Gen sowie die Struktur des Gens. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Sequenz mit der Referenznummer AF087017. Die Fragmente wurden von mir als H19 CTCF und H19 SmaI bezeichnet, da sie entweder eine der 6 CTCF Bindestellen oder die von Weksberg et al. (Weksberg et al. 2002) untersuchte SmaI Restriktionsschnittstelle einschließen. H19 CTCF wurde mit den Primern H-BI-H19-F und H-BI-H19-R, H19 SmaI mit den Primern H19_Hs_SmaI_F und H19_Hs_SmaI_R amplifiziert (siehe Tabelle 1).

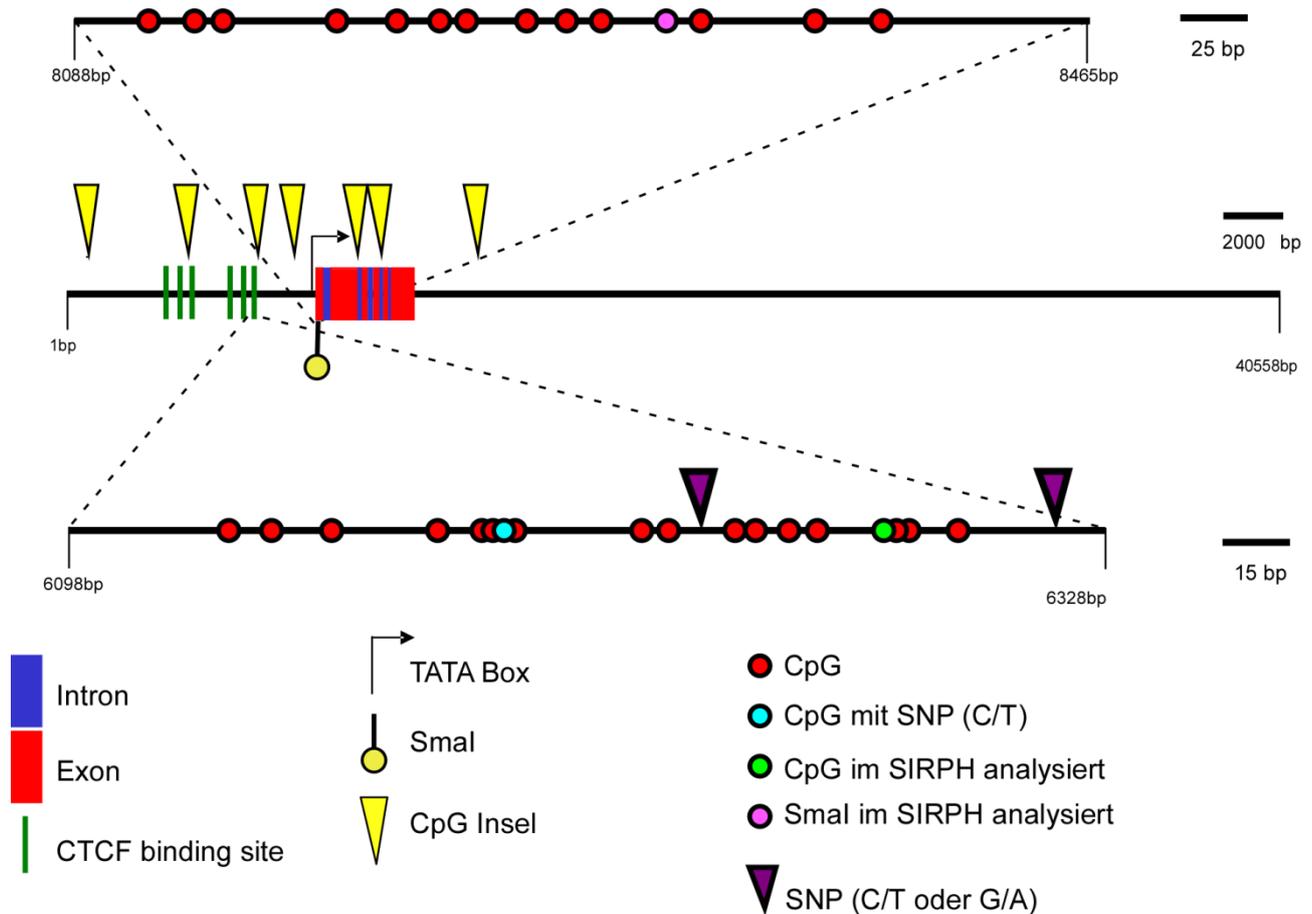


Abbildung 34: Übersicht über die Region des Gens H19 im Menschen (AF087017). Der mittlere Balken zeigt eine Übersicht über das gesamte Gen, in dem die Introns (blau) und Exons (rot), der Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil), CpG Islands (gelbe Dreiecke) und die CTCF Bindestellen (grün) angegeben sind. Der obere Balken zeigt eine Vergrößerung des PCR-Produkts (H19 SmaI), das die in der Untersuchung von (Weksberg et al. 2002) analysierte SmaI Restriktionsschnittstelle (violetter Punkt) enthält. Der untere Balken zeigt die Vergrößerung des PCR Produkts, das zur Bestimmung der Methylierung der CTCF Bindestelle (H19 CTCF) analysiert wurde.

3.3.3.1 Analyse des Framents H19 CTCF

3.3.3.1.1 Auszählung der Sequenzen von H19 CTCF

In diesem ersten Abschnitt wird die Analyse der sechsten CTCF Bindstelle des H19 Gens vorgestellt. Die Position des analysierten Fragments sowie die für diese Analyse ausgewerteten Sequenzen aller Familienmitglieder sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellt. Auch hier sind die Sequenzen einzelner Familienmitglieder zu Blöcken zusammengefasst. Die Sequenzen wurden in methyliert (M), wenn die CpGs mehrheitlich methyliert waren, und in unmethyliert (U), wenn die CpGs mehrheitlich unmethyliert waren, eingeteilt. Eine Zeile entspricht dabei einer Sequenz (Klon). Insgesamt wurden für diese Region 141 Sequenzen ausgewertet, von denen 80 unmethyliert und 61 unmethyliert waren.

Für den Vater wurden insgesamt 15 Sequenzen, von denen 8 Sequenzen methyliert und sieben unmethyliert waren analysiert. Von den methylierten Klonen wiesen zwei jeweils ein methyliertes CpG auf, während bei den unmethylierten Sequenzen zwei Klone jeweils zwei methylierte CpGs aufwiesen (Tabelle 25 und Abbildung 32).

Für die Mutter wurden 29 Sequenzen analysiert, von denen 16 methyliert und 13 unmethyliert sind. Von den methylierten Sequenzen weist eine 1 unmethyliertes und eine andere 2 unmethylierte CpGs auf. Von den unmethylierten Klonen weisen insgesamt 8 methylierte CpGs auf, wobei 7 Sequenzen nur eine unmethylierte und eine Sequenz 5 methylierte Positionen aufweisen (Tabelle 26 und Abbildung 32).

Für die Analyse des Methylierungsmusters des erkrankten Zwillings wurden insgesamt 35 Sequenzen ausgewertet, von denen 10 methyliert und 25 unmethyliert waren. Von den methylierten Klonen wiesen 2 je eine unmethylierte Position auf, während bei den unmethylierten Sequenzen 17 eine oder mehr methylierte CpGs aufwiesen (Tabelle 27 und Abbildung 32).

Von dem gesunden Zwillings wurden 24 Sequenzen analysiert. 14 dieser Sequenzen sind methyliert, 10 unmethyliert. Von den methylierten Sequenzen weisen 3 je 1 unmethyliertes CpG auf, während bei den unmethylierten Klonen 3 Sequenzen je 1 methyliertes CpG aufwiesen und 2 Sequenzen je 3 methylierte Positionen (Tabelle 28 und Abbildung 32).

Für die Tochter wurden 39 Klone untersucht. Von den 39 untersuchten Sequenzen waren 14 methyliert und 25 unmethyliert. Von den als methyliert eingestuften Sequenzen wiesen 2 zwei unmethylierte CpGs auf und eine Sequenz eine unmethylierte Position. Von den

unmethylierten Sequenzen hatten insgesamt 16 mindestens 1 oder mehrere methylierte CpGs (Tabelle 29 und Abbildung 32).

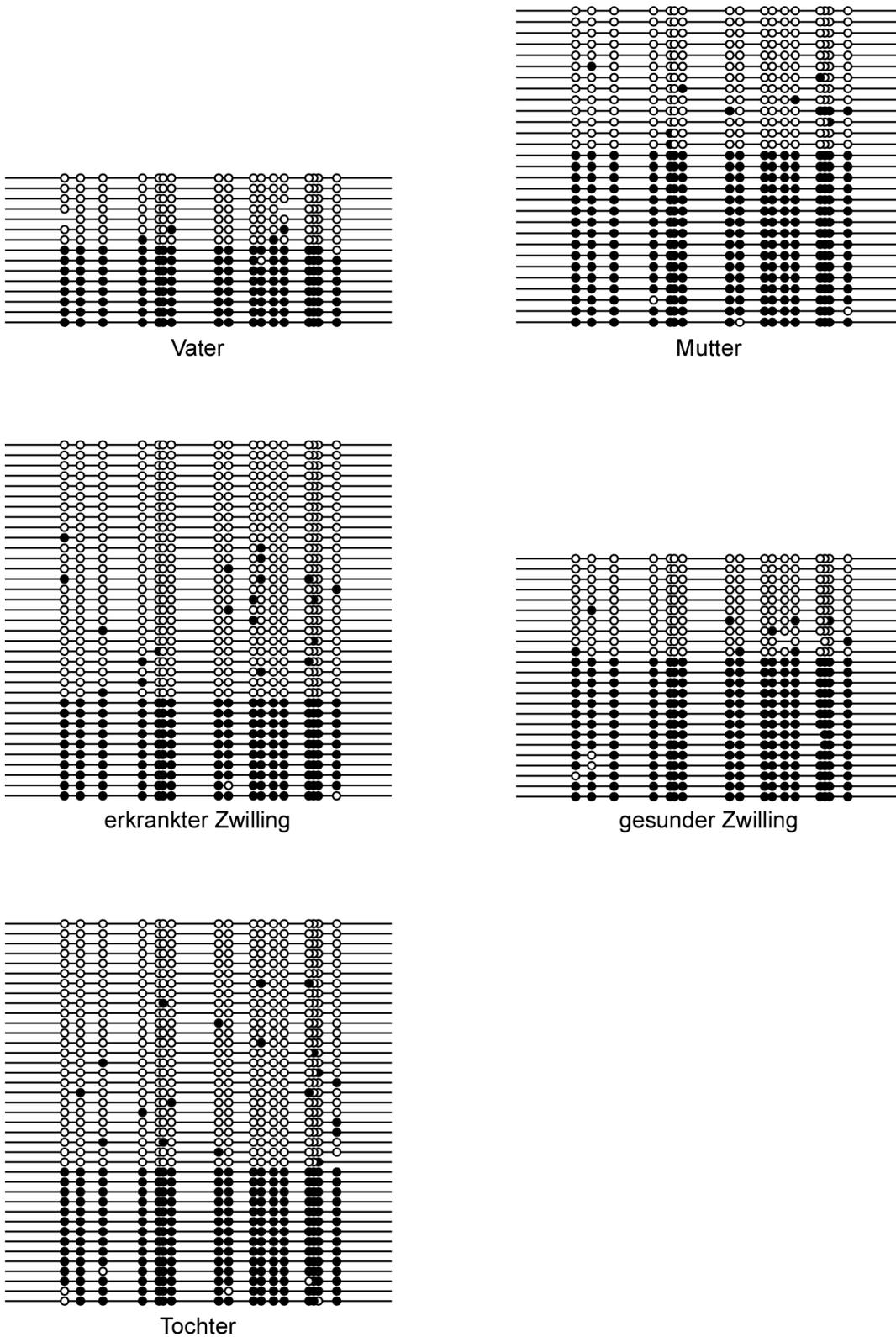


Abbildung 35: Zusammenfassung aller für die Methylierungsmusteranalyse herangezogenen Sequenzen des Fragments H19 CTCF. Sequenzen einzelner Familienmitglieder sind als Blöcke dargestellt. Eine Zeile entspricht einer Sequenz. Die Kreise repräsentieren CpGs, wobei ausgefüllte Kreise für methylierte CpGs stehen und offene für unmethylierte.

Weitere Ergebnisse der umfassenden Sequenzanalyse, die für die im nachfolgenden Abschnitt besprochene statistische Auswertung der Sequenzen benötigt wurden, sind den Tabelle 25 Tabelle 29 zu entnehmen.

3.3.3.1.2 Untersuchung auf mosaikale Methylierung in H19 CTCF

Wie schon bei der Analyse der Methylierungsmuster des Lit1 Gens gibt es bei den methylierten Sequenzen in Bezug auf die Häufung von unmethylierten CpGs keine Unterschiede zwischen einzelnen Familienmitgliedern. Dies habe ich mit einem Craddock-Flood- χ^2 -Kontingenztest untersucht ($\chi^2= 0,72$).

Ebenso gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Häufung von methylierten CpGs in unmethylierten Sequenzen zwischen einzelnen Familienmitgliedern ($\chi^2= 0,89$; Craddock-Flood- χ^2 -Kontingenztest). Die Tatsache, dass keine sigifikanten Unterschiede in der mosaikalen Methylierung zu finden sind, kann auch darin begründet sein, dass sich die Konvertierungsraten zum Teil signifikant voneinander unterscheiden.

Bei der Tochter ist eine signifikant höhere Methylierung der unmethylierten Sequenzen zu messen, die aber hinreichend durch eine unvollständige Konvertierung zu erklären ist ($\chi^2= 5,25$).

3.3.3.1.3 Methylierungsanalyse einzelner CpGs in H19 CTCF

Unabhängig von der Frage, ob es Unterschiede zwischen einzelnen Familienmitgliedern in diesem Genabschnitt gibt, war für mich interessant, ob sich auch in diesem Abschnitt einzelne CpGs finden lassen, die in unmethylierten Sequenzen überdurchschnittlich häufig methyliert sind.

Hierfür wurden die unmethylierten Sequenzen aller Familienmitglieder gemeinsam untersucht und ausgezählt, welches CpG wie oft methyliert war, ob es einzelne CpGs gibt, die statistisch signifikant überdurchschnittlich oft methyliert sind und ob sich diese Häufung signifikant von der Konvertierungsrate unterscheidet.

Tabelle 16: Methylierungshäufigkeit einzelner CpGs in der sechsten CTCF Bindestelle des H19 Gens

Methylierungshäufigkeit einzelner CpGs	Position des CpGs
1 mal	12
2 mal	6; 10
3 mal	1; 2; 4; 7; 8
4 mal	3; 5; 9; 13; 15
5 mal	16
6 mal	14; 17
7 mal	11

In Tabelle 16 ist aufgelistet, in wie vielen der insgesamt untersuchten 80 unmethylierten Sequenzen welches CpG methyliert war. Aus der Tabelle ist zu erkennen, dass die meisten CpGs drei- oder viermal methyliert waren. Auffällig oft waren CpG 11, 14 und 17 methyliert. Ob diese Häufung von Methylierung statistisch signifikant ist, wurde mit Hilfe einer Vierfeldertafel und dem χ^2 Test überprüft. Die Analyse weist die CpGs 17, 14 und 12 als signifikant überdurchschnittlich oft methyliert aus. Um auszuschließen, dass die überdurchschnittlich häufige Nichtkonvertierung dieser Positionen spezifisch für diese CpGs ist, oder ob es sich hier um einen Sequenzabschnitt handelt, der sich grundsätzlich schlecht konvertieren lässt, habe ich hier wie bei Lit1 eine Konvertierungsanalyse der nicht-CpG Cytosine durchgeführt.

Für diese Analyse habe ich die Sequenzen aller Familienmitglieder ausgezählt und überprüft, wie oft welches Cytosin nicht konvertiert war und ob es statistisch gesehen Unterschiede zwischen einzelnen Cytosinen gibt. Insgesamt waren 43 Cytosine von insgesamt 1333 analysierten nicht-CpG Cytosinen nicht konvertiert. Fünf der 39 in einem analysierten Fragment vorkommenden nicht-CpG Cytosine waren dabei statistisch signifikant häufiger nicht konvertiert als andere. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 36 die Sequenz des analysierten Fragments dargestellt und die Häufigkeit der Methylierung von CpGs oder der Nichtkonvertierung anderer Cytosine durch Balken oberhalb der Sequenz angegeben. Die Häufigkeit ist relativ zur Gesamtzahl der an der jeweiligen Stelle auswertbaren Sequenzen angegeben. CpGs sind in rot dargestellt, wobei hellrote Balken für CpGs stehen, die statistisch nicht signifikant überdurchschnittlich methyliert sind, die dunkelroten Balken stehen für signifikant überdurchschnittlich oft methylierte CpGs.

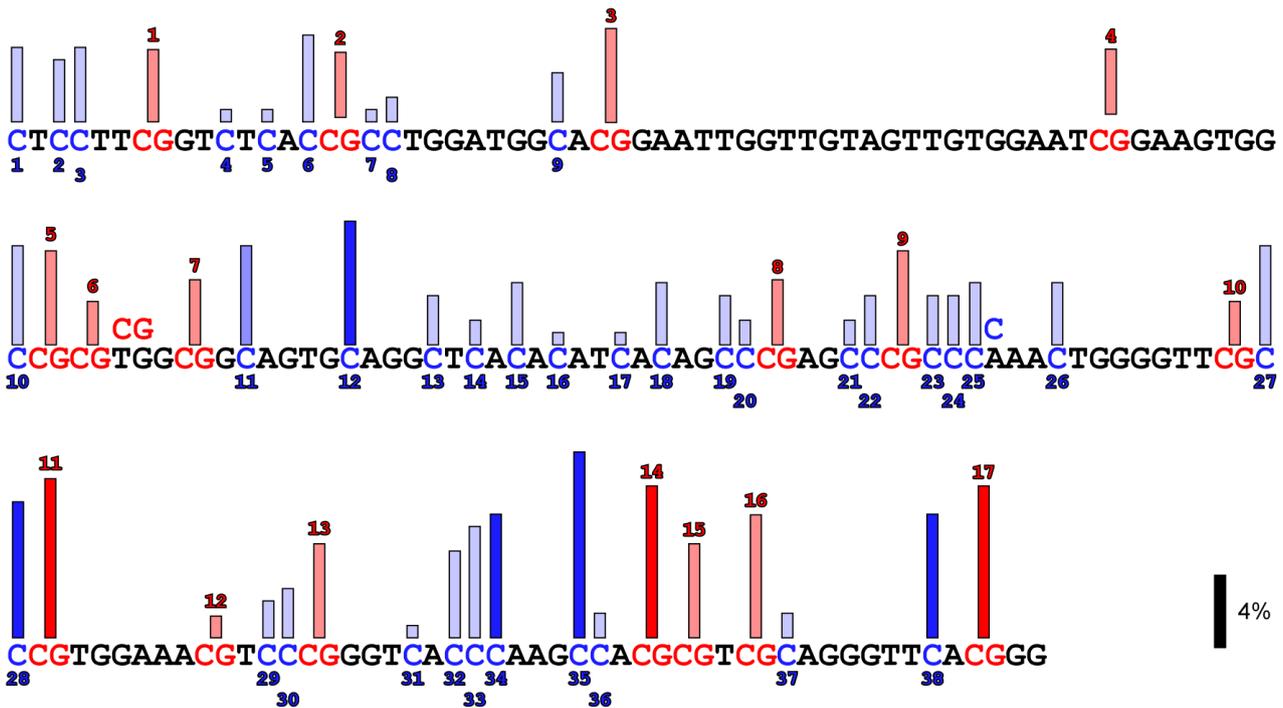


Abbildung 36: Darstellung der relativen Häufigkeit der Methylierung von CpGs in unmethylierten Sequenzen und der Nichtkonvertierung von nicht-CpG Cytosinen in der sechsten CTCF-Bindestelle des H19 Gens. CpGs sind rot, Cytosine blau dargestellt, wobei nicht signifikante Häufigkeiten jeweils hell und signifikante Häufigkeiten in kräftigeren Farben abgebildet sind.

Blaue Balken beschreiben die relative Häufigkeit der Nichtkonvertierung der nicht-CpG Cytosine, wobei auch hier helle Balken für durchschnittlich häufige Nichtkonvertierung und dunklere für signifikant überdurchschnittliche Nichtkonvertierung stehen. Zu sehen ist, dass es CpGs gibt, die überdurchschnittlich häufig nicht konvertiert sind aber auch fünf nicht-CpG Cytosine. Diese liegen zum Teil in enger räumlicher Nähe zu den überdurchschnittlich häufig nicht konvertierten CpGs. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass die überdurchschnittliche Nichtkonvertierung von CpG 11, 14 und 17 nicht auf Methylierung, sondern auf eine schlechte Konvertierbarkeit dieser Region zurückzuführen ist.

Es gibt in der Region der CTCF Bindestellen von H19 keine auffälligen Methylierungsmuster.

3.3.3.2 Methylierungsanalyse des Fragments H19 Smal

Das von mir an dieser Stelle besprochene Element H19 Smal ist in Abbildung 34 eingezeichnet. Es beinhaltet die von Weksberg et al. und von mir in Abschnitt 3.3.1

untersuchte SmaI Restriktionsschnittstelle. Auch in diesem Fall war es mein Ziel herauszufinden, ob interessante Methylierungsmuster in diesem Fragment zu finden sind.

3.3.3.2.1 Auszählung der analysierten Sequenzen in H19 SmaI

Hierfür habe ich die drei Kinder der Familie untersucht. Für die Klassifizierung der Klone wurden die gleichen Kriterien wie für die anderen Fragmente (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3.1) angelegt.

Die graphische Darstellung der ausgewerteten Sequenzen ist in Abbildung 37 wiedergegeben. Insgesamt habe ich 38 Sequenzen ausgewertet von denen sich 21 als methyliert und 16 als unmethyliert einstufen ließen. Eine Sequenz des gesunden Zwillings hatte genauso viele methylierte CpGs (7) wie unmethylierte (ebenfalls 7).

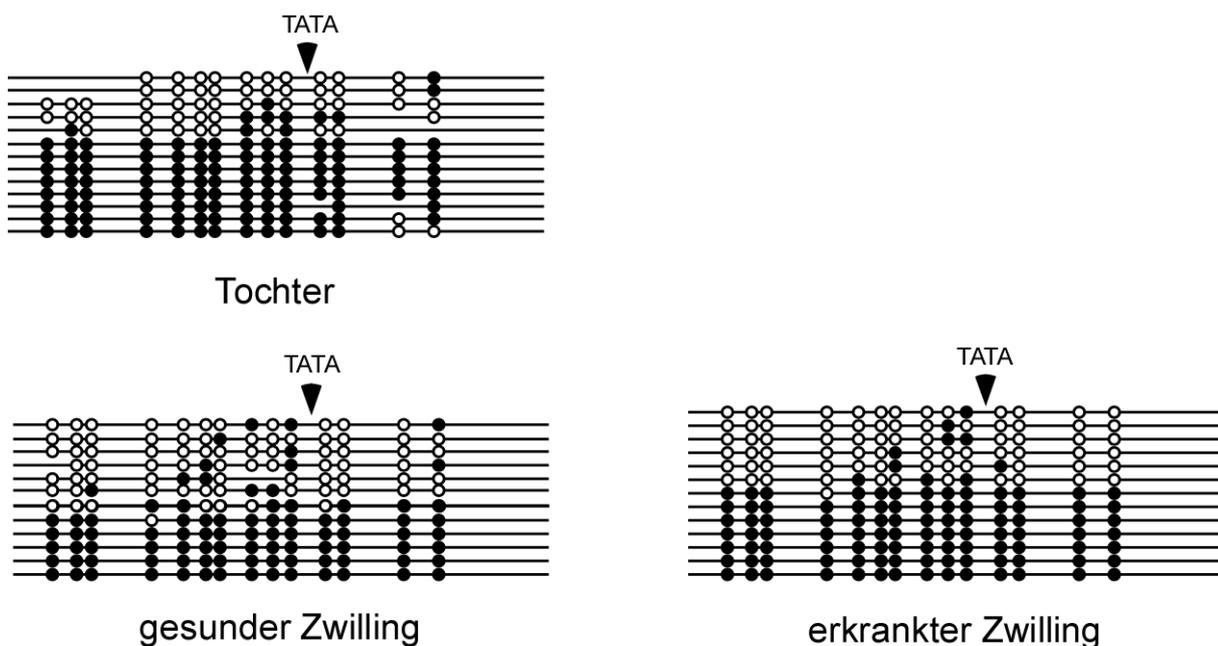


Abbildung 37: Zusammenstellung aller analysierten Sequenzen des H19 SmaI PCR Fragments. Eine Zeile repräsentiert eine Sequenz. Ausgefüllte Kreise stehen für methylierte CpGs, während offene Kreise für unmethylierte CpGs stehen. Die Position der TATA Box ist durch einen schwarzen Pfeil und die Bezeichnung TATA gekennzeichnet.

Auch bei diesem Fragment habe ich eine genaue Auszählung der Sequenzen durchgeführt. Die Ergebnisse sind für jedes der Kinder in den Tabelle 30 Tabelle 32 (siehe Anhang) aufgeführt.

Für den erkrankten Zwilling habe ich, wie aus Tabelle 30 und Abbildung 37 hervorgeht, insgesamt 13 Sequenzen ausgewertet und dabei 7 als methyliert und 6 als unmethyliert eingestuft. Von den methylierten Sequenzen hatte eine ein unmethyliertes CpG, während bei den unmethylierten alle Sequenzen mindestens ein methyliertes CpG aufwiesen.

Für den gesunden Zwilling habe ich, wie aus Tabelle 31 Abbildung 37 hervorgeht, insgesamt 12 Sequenzen ausgewertet, von denen 5 methyliert und 6 unmethyliert waren. Von den methylierten Sequenzen wies eine einzige ein unmethyliertes CpG auf, während die unmethylierten Klone alle ausschließlich methylierte CpGs aufwiesen. Zwei unmethylierte Klone wiesen je ein methyliertes CpG, eine Klon zwei und drei Klone je drei methylierte CpGs auf. Eine Sequenz konnte nicht zugeordnet werden, da sie ebenso viele methylierte CpGs aufwies wie unmethylierte (jeweils 7).

Für die Tochter wurden 13 Sequenzen ausgewertet, von denen 8 methyliert und 5 unmethyliert waren. Zwei der 8 methylierten Klone wiesen unmethylierte CpGs auf. In den unmethylierten Sequenzen waren in jeder Sequenz mindestens ein oder mehr CpGs methyliert.

3.3.3.2.2 Untersuchung auf mosaikale Methylierung des H19 Smal PCR Fragments

Auffällig ist bei diesem PCR Fragment, dass jede unmethylierte Sequenz mindestens eine oder mehrere methylierte CpGs aufweisen. Dies ist für alle Kinder ähnlich, sodass sich auch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kindern ermitteln lässt. Dies vergleichsweise hohe Maß an Methylierung der unmethylierten Sequenzen lässt sich nicht durch schlechte Konvertierung in der Bisulfitreaktion erklären, da die Methylierung in den unmethylierten Sequenzen hochsignifikant ($p > 0,5\%$) unterschiedlich zu der jeweiligen Konvertierungsrate ist. Dies gilt für alle drei Kinder.

3.3.3.2.3 Untersuchung auf Methylierungsmuster des H19 Smal PCR Fragments

Auch im Fragment H19 Smal, dies umgibt den Transkriptionsstart von H19 (siehe Abbildung 34), wurde untersucht, ob es einzelne CpGs gibt, die besonders häufig methyliert sind. Es fiel auf, dass nicht einzelne Positionen herausragen, sondern vielmehr die Methylierung mit der Nähe zur TATA Box zuzunehmen scheint. Dies ist in Abbildung 37 und deutlicher noch in Abbildung 38 zu sehen. In Abbildung 38 habe ich die

Methylierung der jeweiligen Position relativ zur Anzahl der an dieser Stelle auswertbaren Sequenzen dargestellt, da für eine Analyse am Anfang des Fragments zum Teil deutlich weniger auswertbare Sequenzen vorlagen als im mittleren Abschnitt.

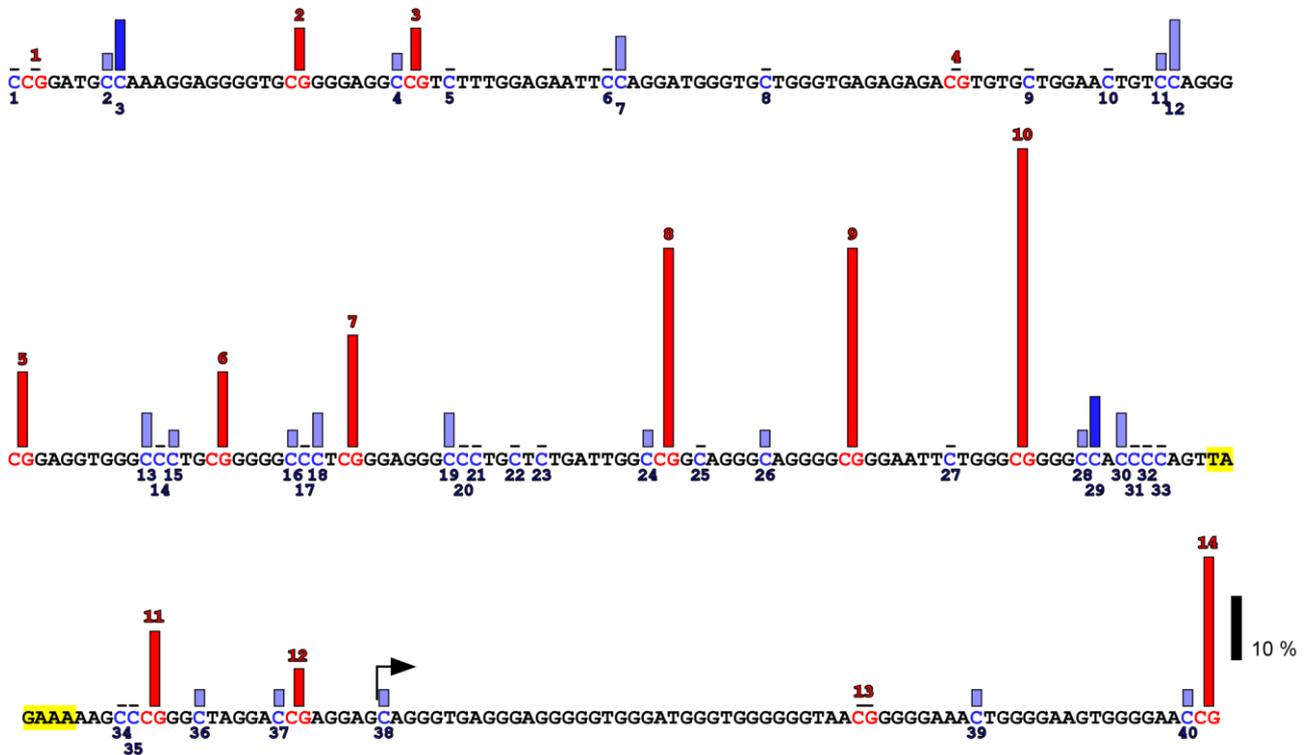


Abbildung 38: Graphische Darstellung der relativen Methylierung der unmethylierten Sequenzen des H19 Smal PCR Fragments. CpGs sind rot hervorgehoben, deren Methylierung, relativ zur Anzahl der an dieser Stelle auswertbaren Sequenzen, durch einen roten Balken dargestellt. Nicht CpG Cytosine sind blau, deren Rate der nicht konvertierten Cs an der jeweiligen Stelle durch einen blauen Balken angegeben. Dunkelblaue Balken beschreiben Cs, die statistisch signifikant überdurchschnittlich oft nicht konvertiert waren. Die TATA-Box ist gelb hinterlegt.

Um zu überprüfen, ob diese augenscheinliche Zunahme an Methylierung hin zur TATA Box auch statistisch von Bedeutung ist, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde überprüft, ob die Position eines CpGs relativ zur TATA Box mit der relativen Methylierung dieses CpGs korreliert. Es wurde der Korrelationskoeffizient, das Bestimmtheitsmaß und die Prüfgröße ermittelt. Der Korrelationskoeffizient zwischen relativer Methylierung und Entfernung des CpGs zur TATA Box beträgt vom 5. bis zum 10. CpG 0,96 und hat ein Bestimmtheitsmaß (r^2) von 0,92. Diese Korrelation ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,5\%$ hoch signifikant. Um auszuschließen, dass Cytosine, die näher an der TATA Box liegen sich grundsätzlich schlechter konvertieren lassen als andere, wurde ein Profil für die Konvertierung der nicht-CpG Cytosine erstellt.

Dieses ist als blaue Balken in Abbildung 38 eingezeichnet. Ebenfalls wurde überprüft, ob sich die Konvertierungsraten vor und nach der TATA Box voneinander unterscheiden. Prozentual betrachtet sind vor der TATA Box zwar mehr nicht-CpG Cytosine nicht konvertiert als nach der TATA Box, dieser Unterschied ist aber mit einem $\chi^2=0,81$ statistisch nicht signifikant. Dies gilt auch, wenn nur die zwischen CpG 5 und 10 liegenden Cytosine 13-34 in diese Berechnung mit einbezogen werden, selbst wenn der Unterschied in diesem Fall etwas deutlicher ist ($\chi^2=1,48$). Ebenso gibt es keine Korrelation zwischen einer unvollständigen Konvertierung von nicht-CpG Cytosinen und ihrer Lage zur TATA ($r^2=0,11$)

3.3.4 Expressionsanalyse von CDKN1C und Igf2 in Fibroblastenkulturen

Desweiteren sollte die Expression von Igf2 und CDKN1C der Familie untersucht werden, da diese in BWS häufig verändert sind.

Für die Untersuchung wurden Hautproben aller Familienmitglieder genommen und anschließend kultiviert. Aus diesen Zellen wurden dann aus je 3 unterschiedlichen Passagen Total-RNA präpariert (siehe Abschnitt 2.17) und diese mittels reverser Transkription (Abschnitt 2.18) in cDNA umgeschrieben. Mit den cDNAs wurde anschließend eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt (Abschnitt 2.19).

3.3.4.1 Bestimmen eines Referenzgens

Untersucht wurden zusätzlich zu der Expression von Igf2 und CDKN1C die Expression von zwei Haushaltsgenen, humanes saures ribosomales Protein 0 und Fibronectin. Diese sollte als Referenzgene dienen, mit deren Hilfe generelle Unterschiede in den RNA Präparationen oder zwischen den Passagennummern der Zellen festzustellen sind. Die Analysen wurden auf allen drei RNA-Präparationen als Triplikate durchgeführt. In Abbildung 39 sind die C_T -Werte aller durchgeführten Analysen als Box-Whisker Plot dargestellt. Für Hup0 liegt der mittlere C_T bei 18,8 und schwankt zwischen den einzelnen Familienmitglieder nur wenig (ca. 2 Zyklen). Der mittlere C_T von Fibronectin liegt hingegen höher (24,6) und schwankt deutlich mehr, sowohl bezogen auf ein Familienmitglied (bis ca. 4 Zyklen) als auch zwischen den einzelnen Familienmitgliedern (bis zu ca. 5 Zyklen).

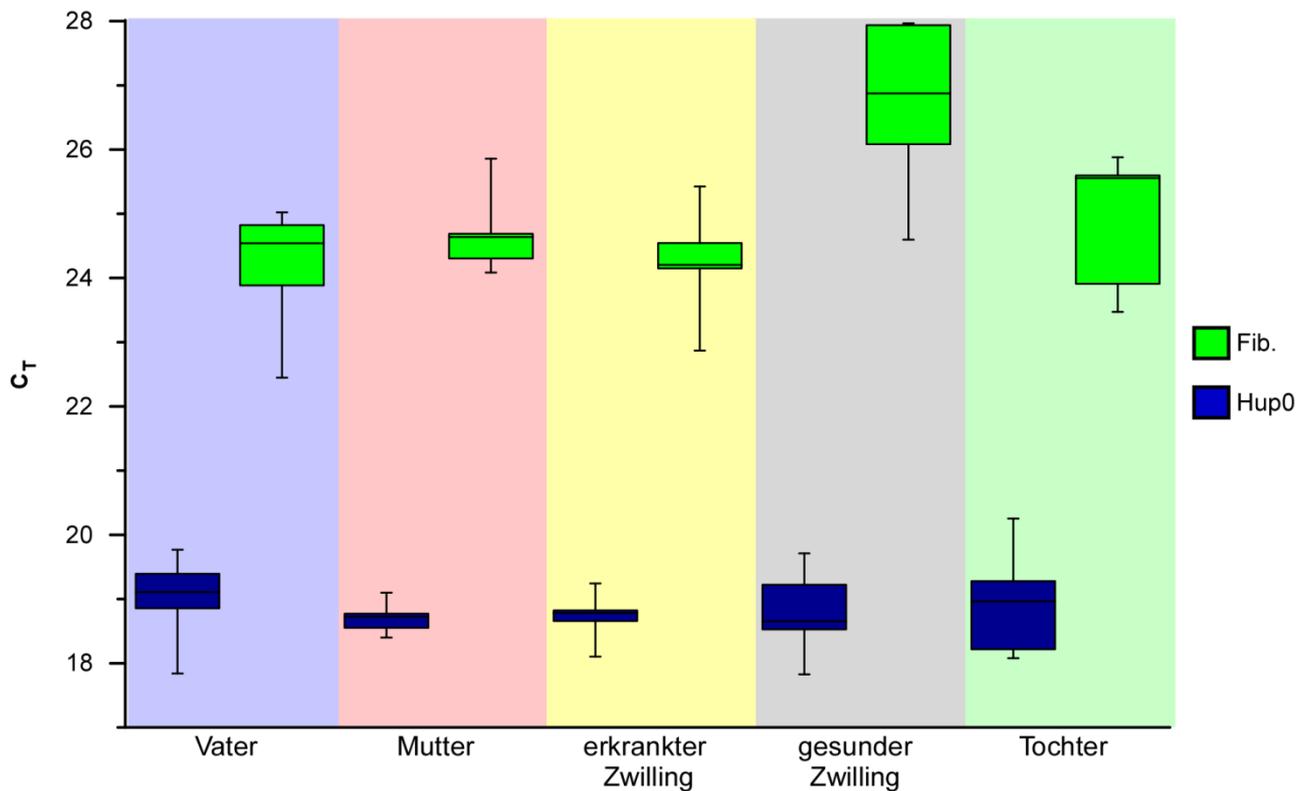


Abbildung 39: Ergebnisse der Expressionsanalyse der Haushaltsgene Fibronectin (Fib.) und Hup0. Abgebildet sind die C_T Werte in einem Box whisker plot. Die Mediane sind als Linien in den einzelnen Kästen dargestellt.

Geeignete Markergene sollten sich dadurch auszeichnen, dass sie sich zwischen den einzelnen Individuen nicht signifikant unterscheiden und ihre Expression unabhängig vom jeweiligen Zustand der Zelle ist. Dies ist von Bedeutung, da ein Referenzgen Unterschiede in der Qualität der RNA-Präparation aufzeigen können soll. Kommt es bei einem Referenzgen zu signifikanten Unterschieden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese eventuell durch Krankheit oder andere Faktoren begründet sind, nicht nur durch Unterschiede in der RNA-Qualität.

Ob es signifikant Unterschiede in der Expression der beiden Haushaltsgene zwischen einzelnen Familienmitgliedern gibt, wurde mit Hilfe des exakten Rangsummentests nach Wilcoxon überprüft (siehe Lienert, G. A., Verteilungsfreie Methoden der Biostatistik; Band 1, S. 230f, 1973). Mit diesem Test sind für Hup0 keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Familienmitgliedern zu erkennen, sehr wohl aber für Fibronectin. So hat der gesunde Zwilling (mittlerer $C_T = 26,64$) (die Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden jeweils im Vergleich zu einem Familienmitglied ermittelt. P war in allen Fällen kleiner als 0,1%) weniger Fibronectin als alle anderen Familienmitglieder (Vater: $C_T = 24,19$; Mutter:

$C_T = 24,60$; erkrankter Zwilling: $C_T = 24,25$; Tochter: $C_T = 24,87$). Aus diesem Grund wurde Hup0 und nicht Fibronectin als Referenzgen verwendet.

3.3.4.2 Expressionsanalyse von CDKN1C

Da bei Patienten mit BWS, die eine Hypomethylierung im IC2 zeigen, die Expression von CDKN1C betroffen ist, wurde diese mittels qPCR untersucht. Die mittleren C_T -Werte der einzelnen Personen sowie die relative Transkriptmenge bezogen auf den erkrankten Zwilling sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Ergebnisse der Expressionsanalyse von CDKN1C. Angegeben sind die mittleren C_T Werte der jeweiligen Person, das Verhältnis der Transkriptmenge bezogen auf den erkrankten Zwilling und die signifikanten Unterschiede der Personen zueinander. Die Signifikanz der ermittelten Unterschiede ist in% angegeben.

	Mittlerer C_T	$2^{ct_{erk. Zw.} - CT_x}$	Signifikante Unterschiede zu anderen Familienmitgliedern
Vater	32,23	23,64	Mehr als die Mutter ($p < 0,25\%$), mehr als der erk. Zwilling ($p < 0,1\%$), mehr als die Tochter ($p < 0,1\%$),
Mutter	34,28	5,36	Weniger als der Vater ($p < 0,25\%$), mehr als der erk. Zwilling ($p < 0,25\%$),
Erkrankter Zwilling	36,40	1	Weniger als der Vater ($p < 0,1\%$), als die Mutter ($p < 2,5\%$) und als der gesunde Zwilling ($p < 0,1\%$)
Gesunder Zwilling	32,43	19,37	Mehr als der erkrankte Zwilling ($p < 0,1\%$) und mehr als seine Schwester ($p < 0,5\%$)
Tochter	34,97	2,79	Weniger als ihr Vater ($p < 0,1\%$) und weniger als der gesunde Zwilling ($p < 0,5\%$)

Der Vater weist den kleinsten C_T und damit die höchste Menge an CDKN1C mRNA auf. Er hat signifikant mehr CDKN1C mRNA als alle anderen Familienmitglieder außer dem gesunden Zwilling, bei dem ähnlich viel CDKN1C mRNA nachgewiesen wurde. Die niedrigste mRNA Menge weist der erkrankte Zwilling auf. Ob dies mit dem Auftreten von BWS in Verbindung gebracht werden kann, ist fraglich, da die Schwester eine statistisch nicht unterscheidbar ähnlich geringe Menge an RNA aufweist.

3.3.4.3 Expressionsanalyse von Igf2

Da die Expression von Igf2 in Patienten mit BWS häufig verändert ist, wurde die Expression von Igf2 in dieser Familie untersucht. Dies wurde unabhängig von einer Veränderung des Methylierungsstatus des H19/Igf2 *imprinting centers* durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.1, Abbildung 30, für die Ergebnisse der Methylierungsanalyse und Abbildung 5 und Abbildung 6 zur Übersicht über die Lage der *imprinting centern* und deren Regulation), da mehrere Arbeitsgruppen veränderte Igf2 Expression ohne Veränderung der Methylierung des IC1 berichten (Brown et al. 1996; Prawitt et al. 2005).

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Igf2 sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Ergebnisse der Expressionsanalyse von Igf2. Angegeben ist der mittlere C_T der jeweiligen Person und die signifikanten Unterschiede der Personen zueinander. Für die Signifikanz der ermittelten Unterschiede wurde jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,1% errechnet.

	Mittlerer C _T	$2^{ct_{erk.Zw.}-CTx}$	Signifikante Unterschiede zu anderen Familienmitgliedern
Vater	22,73	45,20	Deutlich mehr Igf2 als alle andern Familienmitglieder
Mutter	27,43	1,74	Weniger Igf2 als der gesunde Zwilling und weniger als der Vater
Erkrankter Zwilling	28,23	1,00	Weniger Igf2 als der gesunde Zwilling und weniger als der Vater
Gesunder Zwilling	25,15	8,51	Mehr Igf2 als die Tochter und die Mutter aber weniger als der Vater
Tochter	28,82	0,66	Weniger Igf2 als der gesunde Zwilling und weniger als der Vater

Überraschenderweise weist der Vater den niedrigsten C_T und damit die stärkste Igf2 Expression auf, während der erkrankte Zwilling und die Tochter die größten C_T Werte und damit die geringste Igf2 Expression zeigen. Die Mutter hat ähnlich wenig Igf2 wie die Tochter und der gesunde Zwilling und unterscheidet sich auch statistisch nicht signifikant in der Igf2 Expression von diesen. Niedrigere C_T Werte für Igf2, aber signifikant mehr als

der erkrankte Zwilling, seine Schwester und seine Mutter weist der gesunde Zwilling auf. Dennoch hat er signifikant weniger Igf2 als sein Vater. Auch hier konnte kein eindeutiger Zusammenhang einer überdurchschnittlich hohen oder niedrigen Igf2 Expression zu BWS hergestellt werden.

4 Diskussion

4.1 DNA- Demethylierung

Eines der wohl bestgehütetsten epigenetischen Geheimnisse einer Zelle ist die Frage, nach der Reprogrammierung von Methylierungsmustern der DNA. Zudem gibt es wohl kaum einen Aspekt im Feld der Epigenetik, in dem so viel Widersprüchliches publiziert wurde. Es scheint sich auch bisher kein Konsens zu bilden, vielmehr werden Daten und Publikationen von Kollegen sogar angezweifelt.

Da ich mich während meiner Arbeit ganz grundsätzlich mit der Reprogrammierung beschäftigt habe, erschienen mir die Fragen nach deren Komponenten und den ihr ihr zu Grunde liegen Mechanismen von Bedeutung. So stellte sich mir unter anderem die Aufgabe, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe sich Komponenten und Prozesse der Reprogrammierung von DNA-Methylierung nachweisen und untersuchen lassen. Die Herangehensweise an diese Fragestellung war von den sich in den einschlägigen Veröffentlichungen widerspiegelnden sehr unterschiedlichen Vorstellungen von diesen Prozessen beeinflusst. So sind inzwischen z.B. mehrere Kandidaten für die Demethylase publiziert (Jost 1993; Bhattacharya et al. 1999; Zhu et al. 2000; Morgan et al. 2004; Yamazaki et al. 2005; Barreto et al. 2007; Kangaspeska et al. 2008; Metivier et al. 2008), die aber bislang keine allgemeine Anerkennung finden und weiterhin kontrovers diskutiert werden (Hendrich et al. 1999; Ng et al. 1999; Wade et al. 1999; Hardeland et al. 2003; Armstrong et al. 2006; Jin et al. 2008; Ooi and Bestor 2008; Schmitz et al. 2009). Viele dieser Publikationen zeigen sehr wohl, dass die darin beschriebenen Enzyme in der Lage sind DNA *in vitro* und oder *in vivo* zu demethylieren. Uneinigkeit herrscht aber über die Frage, ob diese Enzyme bzw die vorgeschlagenen Mechanismen in der Lage sind ein gesamtes Genom zu reprogrammieren. So steht zwar außer Frage, dass mit Hilfe reparaturvermittelter Prozesse oder eines Deaminase-Prozesses, der zusammen mit Reparaturenzymen arbeitet, einzelne Gene demethyliert werden können. Ob diese aber bei den globalen Ereignissen von Bedeutung sind, ist immer noch ungeklärt. So wollte ich mit meinem Analysesystem in der Lage sein, alle bisher für möglich erachteten Prozesse analysieren und nachweisen zu können. Außerdem war für mich von großer Wichtigkeit,

zunächst einmal ein geeignetes Zellsystem zu finden, um diesen Prozess detailliert studieren zu können.

Um besser nachvollziehbar zu machen, warum ich Substrate und Extrakte so ausgewählt habe, wie in Abschnitt 3.1 meiner Arbeit beschrieben, möchte ich an dieser Stelle genauer auf die Literatur zu diesem Thema eingehen.

4.1.1 Demethylierung: Ein Streifzug durch die Literatur

Schon 1987 wurde von Monk et al. (Monk et al. 1987) vermutet und beschrieben, dass die Methylierung von DNA während der Entwicklung reprogrammiert wird. In ihrer Publikation konnten sie zeigen, dass es nach der Befruchtung von Mauseizellen zu einem globalen Verlust von Methylierung kommt (es wurde die Gesamtmethylierung der DNA mit Hilfe eines HpaII und MspI Verdau analysiert). Des Weiteren wird beschrieben, dass sich nach der Implantation der Methylierungsgehalt von extraembryonalem und embryonalem Gewebe unterscheidet, wobei das extraembryonale Gewebe weniger Methylierung aufweist als das embryonale. 2002 konnten diese Beobachtungen von Santos et al. (Santos et al. 2002) dank immunologischer Färbungen verfeinert werden. Santos et al. zeigten, dass die Demethylierung zuerst nur das paternale Genom betrifft. Sie setzt 4h nach der Befruchtung ein und ist bereits innerhalb von 90-120min abgeschlossen, deutlich vor dem Einsetzen der Replikation. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das mütterliche Genom anschließend ebenfalls demethyliert wird und zwar in einem sehr viel langsameren, vermutlich replikationsabhängigen Prozess. Inzwischen haben viele andere Arbeitsgruppen auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen, dass geprägte Gene (H19) nicht von der Demethylierung betroffen sind (Howlett and Reik 1991; Olek and Walter 1997; Warnecke et al. 1998; Oswald et al. 2000). Dafür, dass es sich bei der Demethylierung in der Zygote um einen enzymatisch katalysierten Prozess handeln muss, lieferten erstmals Kafri et al. Hinweise. In ihrer Arbeit zeigen sie, dass prämethylierte Plasmid-DNA, die in das Mausgenom nach der Befruchtung integriert wurde, nicht replikationsabhängig demethyliert wird. Zusätzlich zu diesen grundlegenden Arbeiten gibt es heute neuere, in denen nachgewiesen werden konnte, dass sowohl Eizellen von *Xenopus* (Simonsson and Gurdon 2004) als auch Kaninchenembryos (Zhang et al. 2005) in der Lage sind, DNA aktiv zu demethylieren. Ebenso konnten Haykova (Haykova et al. 2002) und Li (Li et al. 2004) zeigen, dass in PGCs geprägte Gene und zum Teil auch

repetitive Elemente ihre Methylierung verlieren. Für den Verlust der Methylierung in den geprägten Genen wird ein aktiver Prozess angenommen.

Auch in Pflanzen kommt es bei der Samenbildung zu aktiver Demethylierung der DNA. Hierbei schneidet eine Glykosylase (DEMETER) das methylierte Cytosin aus dem DNA-Strang heraus (Gehring et al. 2006). Bei diesem Prozess werden jedoch nicht das ganze Genom oder große Teile des Genoms demethyliert, sondern nur einzelne spezifische Bereiche.

Die neueste Arbeit hierzu wurde von Okada (Okada et al. 2010) vorgelegt. Sie beschreibt nicht nur die Demethylierung des paternalen Genoms als einen replikationsunabhängigen Prozess, sondern ist sogar in der Lage zu zeigen, dass das Ausschalten eines bestimmten Komplexes (elongator complex) dazu führt, dass die Demethylierung des paternalen Genoms deutlich inhibiert wird. Diese Überlegungen konnten bei dem Entwurf meines Demethylierungsnachweises nicht mehr berücksichtigt werden, da die Publikation erst im Januar 2010 erschienen ist. Diese Arbeit und ein zu dieser Arbeit veröffentlichter Übersichtsartikel (Wu and Zhang 2010) schlagen einen bisher nicht berücksichtigten sehr eleganten Mechanismus für die Demethylierung vor. Daher werden sie in die folgende Besprechung mit einbezogen.

4.1.2 Postulierte DNA Demethylasen und die diesen Enzymen zu Grunde liegende Mechanismen aktiver Demethylierung von DNA

Zusätzlich zu den während der Entwicklung beobachteten Demethylierungsprozessen haben viele Arbeitsgruppen versucht, dem Enzym, das diese Reaktion katalysiert, auf die Spur zu kommen. Die wohl bekannteste und zugleich umstrittenste Publikation hierzu ist die Publikation von Bhattacharya (Bhattacharya et al. 1999). Das von dieser Gruppe postulierte Enzym MBD2 (*methyl binding domain* Protein 2) soll die Methylgruppe als Methanol freisetzen (es handelt sich um unpublizierte Daten, die in dieser Arbeit jedoch erwähnt werden). Der Mechanismus ist in Abbildung 40 dargestellt, die aus dem Artikel von Cedar und Kollegen (Cedar and Verdine 1999) entnommen wurde. Es wird vermutet, dass die Demethylase einen kovalenten Komplex mit der zu demethylierenden Base ausbildet und die Methylgruppe durch Hinzufügen einer Hydroxylgruppe aktiviert wird, so dass als Abgangsgruppe Methanol entsteht. Dieser Prozess ist thermodynamisch deutlich

günstiger, als wenn die Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung ohne eine vorherige Aktivierung gespalten würde.

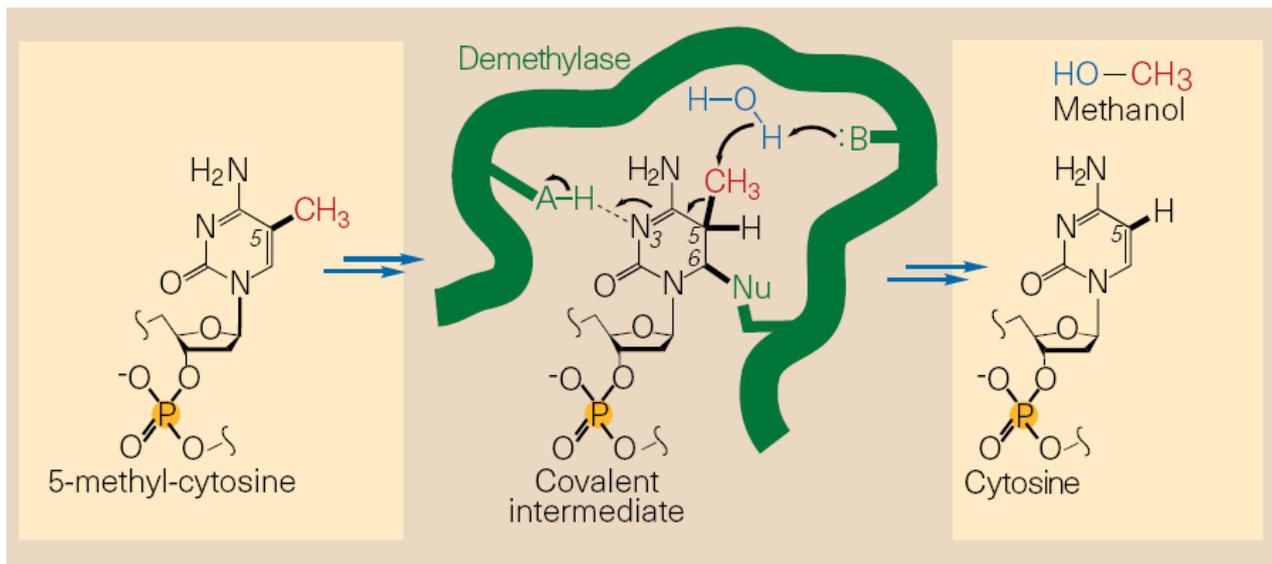


Abbildung 40: Von Cedar (Cedar and Verdine 1999) auf Grund der Publikation von Bhattacharya (Bhattacharya et al. 1999) postulierter Demethylierungsmechanismus

Die Fähigkeit von MBD2 DNA zu demethylieren, konnte allerdings von keiner weiteren Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Ng et al. 1999; Wade et al. 1999). Zudem wurde zwei Jahre später gezeigt, dass MBD2 *knock out* Mäuse lebensfähig sind und keine auffällige Veränderung des Methylierungsniveaus gegenüber Wildtypmäusen aufweisen (Hendrich et al. 2001). Ein neuer Artikel, der einen Reaktionsweg vorschlägt, bei dem die C-C Bindung zwischen Base und Methylgruppe gelöst wird, wurde von (Wu and Zhang 2010) publiziert. Die Arbeitsgruppe von Zhang (Okada et al. 2010) konnte zeigen, dass Komponenten des *elongator complexes* ELP1-3 (*elongator complex protein 1-3*) offensichtlich in der Lage sind, das paternale Genom nach der Befruchtung maßgeblich zu demethylieren. Bei dem für diesen Faktor vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus entsteht ebenfalls, so wie von Cedar angegeben, 5-Hydroxymethylcytosin als Zwischenprodukt. Nach weiteren Reaktionsschritten könnte dann Cytosin entstehen und die Methylgruppe als Formaldehyd freigesetzt werden. Ebenso können Mitglieder der TET (*ten-eleven translocation*) Proteinfamilie 5-Methylcytosin mit α -Ketoglutarat als Kofaktor zu 5-Hydroxymethylcytosin oxydieren (Tahiliani et al. 2009).

Alle weiteren in der Literatur beschriebenen Demethylasen verwenden reparaturgebundene Reaktionswege. Hierbei müssen sicherlich besonders die Arbeiten von

J.P. Jost hervorgehoben werden (Jost 1993; Jost and Jost 1994; Jost et al. 1995; Fremont et al. 1997; Jost et al. 1999), der bereits 1993 Demethylierung von DNA durch eine Glykosylase (TDG), die aus Hühnerembryonen gewonnen wurde, beschrieben hat. TDG steht für Thymin DNA Glykosylase, zu der es auch im Menschen ein Homolog gibt. Jost hat zwar in mehreren Arbeiten zeigen können, dass TDG DNA demethylieren kann, dennoch wird es weiterhin für unwahrscheinlich erachtet, dass TDG ein gesamtes Genom reprogrammiert (Cortazar et al. 2007). Mit Ausschlag gebend dafür ist, dass TDG aus Hühnerembryonen eine 30-40fach höhere Spezifität für T-G Fehlpaarungen aufweist als für 5meC-G Paare. Zudem scheint das menschliche Homolog biochemisch nicht in der Lage zu sein, die N-glykosidische Bindung von Cytosin zu brechen (Bennett et al. 2006). Zudem hat Ulrike Hardeland zeigen können, dass 5meC kein signifikantes Substrat der humanen TDG ist (Hardeland et al. 2003). Darüber hinaus hat die Arbeitsgruppe von Jost selbst publiziert, dass eine Überexpression von humaner TDG in humanen Zellen nur zur partiellen Demethylierung ganz bestimmter Regionen führt, nicht aber zu einer globalen Demethylierung (Zhu et al. 2001). Allerdings wurde noch im gleichen Jahr eine genomweite Demethylierungsaktivität für TDG in Maus Myoblasten publiziert (Jost et al. 2001).

Ein weiteres Enzym, das ähnlich wie TDG arbeiten soll, ist MBD4. Aber auch hier ist die Aktivität als Demethylase umstritten. So hat Brian Hendrich (Hendrich et al. 1999) keine Demethylase-Aktivität von MBD4 feststellen können, während Zuh et. al ein Jahr später eben diese Aktivität nachwies (Zhu et al. 2000). Aber auch diesem Fall ist die Demethylase-Aktivität 30-40mal schlechter als die T-G-Reparatur-Aktivität, was auch hier Zweifel aufkommen lässt, ob dieses Enzym für die Demethylierung eines gesamten Genoms in Frage kommt. Zudem zeigen MBD4 defiziente Oozyten keine Einschränkung bei der Demethylierung des paternalen Vorkerns (Santos and Dean 2004).

Bei beiden Kandidaten handelt es sich um Enzyme, die jeweils die Base aus der DNA entfernen und so eine abasische Stelle zurücklassen. Diese wird von einer AP-Endonuklease erkannt, die den Zuckerphosphatrest aus der DNA entfernt. Anschließend wird eine neue Base in den DNA Strang eingefügt.

Aber möglicherweise schneiden nicht TDG oder MBD4 selbst 5meC aus der DNA heraus, sondern sind ihrerseits nur Teil eines mehrstufigen Prozesses. So wird 5meC natürlicherweise im Genom zu Thymin deaminiert, was zu T-G-Fehlpaarungen in der DNA führt. Diese Fehlpaarungen wiederum werden sehr effizient von Reparaturenzymen wie TDG oder MBD4 entfernt. Wenn es nun ein Enzym gäbe, was gezielt 5meC deaminiert, würde die anschließende Reparatur dieser Fehlpaarung zur Demethylierung führen.

Dieser Ansatz wurde von Marilyn Diaz und Thomas Kunkel 2002 diskutiert (Kunkel and Diaz 2002) und von H. Morgan 2004 weiterverfolgt. In seiner Publikation konnte Morgan zeigen, dass die RNA *editing* Enzyme AID und APOBEC in der Lage sind 5meC zu deaminieren und TDG und MBD4 in *in vitro* Experimenten die entstandenen Fehlpaarungen anschließend reparieren können (Morgan et al. 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zwar bisher nicht in Zweifel gezogen worden, dennoch ist es so, dass für AID *knock out* Mäuse keine entwicklungsspezifischen Phänotypen beschrieben wurden. Darauf verweist Morgan selbst in seiner Publikation. W. Dean, die an dieser Arbeit beteiligt war, zieht in einer späteren Veröffentlichung selbst in Zweifel, dass dieser Prozess für die Demethylierung eines gesamten Genoms in Frage kommt, da er zu energieaufwendig sei (Armstrong et al. 2006).

Ein weiterer Ansatz, der ebenfalls die Idee der vorangehenden Deaminierung und anschließenden Reparatur von 5meC verfolgt, basiert auf der Eigenschaft von DNA-Methyltransferasen nicht nur DNA methylieren, sondern auch 5meC deaminieren zu können (Kangaspeska et al. 2008 ; Metivier et al. 2008). Es ist schon lange bekannt, dass Methyltransferasen 5meC deaminieren (Shen et al. 1992). Diese Reaktion ist sehr langsam und findet zudem nur unter Ausschluss von AdoMet statt. Es fällt schwer, sich vorzustellen, wie Bedingungen in der Zelle geschaffen werden können, damit ein ganzes Genom unter Ausschluss von AdoMet demethyliert wird, während gleichzeitig bestimmte Bereiche im Genom methyliert bleiben und alle anderen Prozesse, bei denen AdoMeth essentiell ist, trotzdem stattfinden (Loenen 2006). Geprägte Gene werden nach der Befruchtung nicht demethyliert (Olek and Walter 1997),

Die einzige wirklich akzeptierte aktive Demethylase ist DEMETER, die in Pflanzen gefunden wurde (Gehring et al. 2006). Hierbei handelt es sich um eine Glykosylase, die sowohl die glykosidische Bindung zwischen Base und Zucker als auch die Phosphodiesterbindung des DNA Rückgrats spalten. Inzwischen hat man in Pflanzen weitere Glykosylasen entdeckt, die 5meC aus der DNA herausschneiden (Gong et al. 2002; Penterman et al. 2007).

Alle bisher vorgestellten reparaturvermittelten Ansätze beziehen sich auf einen Prozess, der als Basenexzision bezeichnet wird (BER). Es gibt eine weitere Publikation, bei der ein Nukleotid-Exzisionsprozess vorgeschlagen wird (Weiss et al. 1996). Inzwischen beschreiben neuere Publikationen die Beteiligung von Gadd45a bei der Demethylierung einzelner Gene (Barreto et al. 2007; Schmitz et al. 2009). Gadd45a ist ein Enzym, das unter anderem bei der Nukleotidexzisions-Reparatur (NER) eine Rolle spielt. Hierbei wird

im Gegensatz zum BER ein vollständiges Nukleotid aus der DNA entfernt und anschließend ein Bereich von 25-30 Nukleotiden neusynthetisiert. Aber auch hier gibt es keine eindeutigen Erkenntnisse, da andere Arbeitsgruppen diese Ergebnisse zum Teil nicht wiederholen (Jin et al. 2008) oder zumindest keine signifikante Veränderung der Methylierung in *Gadd45a knock out* Mäusen festzustellen konnten.

4.1.3 Biochemische Testverfahren zur Analyse von DNA-Demethylierung

Aus den beiden vorangegangenen Abschnitten wird deutlich, dass es sehr schwierig ist, ein geeignetes Testsystem für die Demethylierung von DNA zu finden. Zuerst stellte sich mir die Frage, in welchen Zellen ich nach der Demethylaseaktivität suchen sollte. Hierbei standen mir mehrere verschiedene Zelltypen zur Verfügung: Zelllinien, Zygoten oder PGCs. Die grundlegenden Unterschiede beider Zelltypen sind folgende:

1. Zellkulturzellen stehen in fast unbegrenzter Menge zur Verfügung, während es sehr schwierig und zeitaufwendig ist, PGCs oder gar Zygoten in größerer Menge zu isolieren.
2. Die bisher in Zellkulturzellen nachgewiesene DNA-Demethylierung bezieht sich immer nur auf einzelne Gene und niemals auf das gesamte Genom, während in Zygoten und auch in PGCs schlüssig nachgewiesen werden konnte, dass die beobachtete Demethylierung ein globales Ausmaß hat.

Vor allem aufgrund des zweiten Punktes habe ich mich dagegen entschieden, in meinen Experimenten Zellkulturzellen zu verwenden. Mir erscheint es unzweifelhaft, dass einzelne Gene durch reparaturvermittelte Prozesse demethyliert werden. Dies macht vor dem Hintergrund Sinn, dass es sich dabei um Enzyme handelt, die zu jeder Zeit in der Zelle zur Verfügung stehen. Zudem bleibt auch die Genomintegrität gewährleistet, wenn es nur regional begrenzt zur Öffnung des DNA-Rückgrats kommt. Dennoch scheint es bisher noch nicht möglich gewesen zu sein, die in diesen Zellen beobachteten Prozesse auf die Demethylierung des Genoms zu übertragen. Die Entscheidung, PGCs zu verwenden und nicht Zygoten, ist vor allem darin begründet, dass PGCs im Vergleich zu Zygoten in größerer Menge zur Verfügung stehen.

In einem ersten Ansatz wollte ich klären, ob es mir überhaupt gelingt, Demethylierung mit Hilfe von PGC-Extrakten nachzuweisen. Zudem wollte ich untersuchen, ob es für eine eventuelle Demethylierung von Bedeutung ist, ob die DNA in Chromatinstruktur vorliegt oder nicht. Hieraus ließen sich dann Erkenntnisse für ein weiteres Vorgehen gewinnen.

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, ist es mir gelungen mit 11,5 dpc Demethylierung nachzuweisen, nicht aber mit 12,5 dpc PGCs. Des Weiteren hat sich erwiesen, dass Dottersäcke Demethylaseaktivität aufweisen. In beiden Experimenten, sowohl mit Dottersäcken 11,5 dpc als auch 12,5 dpc, konnte die Demethylierung sowohl von DNA als auch von Chromatin nachgewiesen werden. Warum bei den Dottersackextrakten von Tag 11,5 dpc nur in einer Probe Demethylierung zu sehen ist, konnte nicht geklärt werden. Eventuell ist Chromatin ein schlechteres Substrat für die Demethylierungsreaktion als unverpackte DNA. Mit PGC Extrakten des gleichen Entwicklungsstadiums konnte keine Demethylierung von Chromatin, sehr wohl aber von unverpackter DNA gezeigt werden, ebenso wie in einer Probe von Dottersäcken 12,5 dpc. Da ich diese Experimente ganz zu Anfang meiner Arbeit durchgeführt habe, habe ich hier mit PGCs der Entwicklungsstufe 11,5 und 12,5 dpc gearbeitet. Zu dieser Zeit lagen nur die Daten von Hajkova von 2002 vor, nicht aber die von Seki (Seki et al. 2005) oder meine eigenen (Abschnitt 3.2). Aus damaliger Sicht, war es für mich nicht verwunderlich, dass ich mit PGCs 12,5 dpc keine oder kaum Demethylierung nachweisen konnte, da laut (Hajkova et al. 2002) die Demethylierung zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen sein sollte.

Das Ergebnis dieser Experimente war für mich insofern bedeutsam, als ich zeigen konnte, dass isoliert vorliegende genomische DNA ein geeignetes Substrat für die Demethylierung zu sein scheint. Dies hat mir die Planung eines weiteren Analyseverfahrens erleichtert, mit dessen Hilfe sich der Mechanismus der Demethylierung einfacher, kostengünstiger und weniger zeitaufwendig untersuchen lassen sollte. Ziel bei diesem nächsten Schritt war für mich zeigen zu können, wie die Methylierung entfernt wird. Dafür musste es mir gelingen, die bei einer Demethylierung entstehenden Produkte nachzuweisen und gleichzeitig sicherstellen, dass diese Produkte nicht etwa aufgrund einer Degradation der DNA durch Nukleasen entstanden waren. Hierfür habe ich ein Substrat gewählt, das ich einmal mit einer Adenin Methyltransferase (M.TaqI) und einmal mit einer Cytosin C5 spezifischen Methyltransferase (M.HhaI) methyliert habe. Dabei wollte ich mit dem M.HhaI methylierten Substrat die Demethylierung nachweisen und mit dem M.TaqI methylierten Substrat eine evtl. unspezifische Reaktion sichtbar machen.

Grundsätzlich ist es mir gelungen dieses Versuchssystem erfolgreich aufzubauen. Ich habe zeigen können, dass die Bindung des Substrats an die Mikrotiterplatte erfolgreich war und sich die gebundene Fraktion durch einen Nukleaseverdau wieder aus der Mikrotiterplatte rückgewinnen und analysieren lässt (Abbildung 15 gebundene Fraktion). Ich konnte sowohl eine Demethylierung (Abbildung 16) als auch eine Degradation

(Abbildung 17) nachweisen. Darüberhinaus habe ich ein Untersuchungsverfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, im Mikrotiterplattenformat Demethylierung zu studieren. Ich habe belastungsfähige erste Hinweise dafür, dass Extrakte aus Dottersäcken von Mäuseembryonen Demethylierungsaktivität zeigen (Abbildung 14 und Abbildung 16). Es ist mir nicht gelungen, den Mechanismus der Demethylierung zu studieren, da ich aufgrund der sehr heterogenen Qualität der Extrakte nicht in der Lage war konstante Reaktionsbedingungen zu schaffen.

Ausschlaggebend dafür scheint mir zu sein, dass ich mit Extrakten aus Geweben gearbeitet habe. Dabei handelt es sich um ein nicht genau definiertes System, d.h. es ist nicht möglich zu bestimmen, mit wie vielen Zellen man arbeitet. Daraus ergibt sich, dass man die Ionenkonzentrationen nicht bestimmen und damit auch nicht konstant halten kann. Ich gehe davon aus, dass ein unkontrollierbarer und entscheidender Faktor in meinem System $MgCl_2$ ist. So wird $MgCl_2$ wahrscheinlich bei der Demethylierungsreaktion eine Rolle spielen und zwar entweder direkt, bei reparaturvermittelten Prozesse, oder indirekt, bei Reaktionen die ATP abhängig sind, da $MgCl_2$ die räumlichen Struktur von ATP stabilisiert. Gleichfalls benötigen unspezifische Nukleasen $MgCl_2$. So habe ich in meinen Reaktionspuffern (siehe Tabelle 6) eine definierte Menge EDTA verwendet, um das Magnesium zu komplexieren und dem unspezifischen Verdau durch Nukleasen entgegenzuwirken. Dies ist mir trotz immer gleicher Pufferbedingungen nicht gelungen, wie die sehr heterogen verlaufenen Experimente zeigen. Entweder habe ich mit beiden Substraten eine Degradation detektiert (Abbildung 18) oder aber keine Reaktion. Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen gelten nicht nur für $MgCl_2$, sondern selbstverständlich für alle anderen Faktoren, die möglicherweise an diesem Prozess beteiligt sind. $MgCl_2$ habe ich herausgegriffen, da ich davon überzeugt bin, dass sich die oben beschriebenen Effekte damit erklären lassen. Alle hier besprochenen und vorgestellten Experimente habe ich mit Extrakten aus Dottersäcken durchgeführt. Parallel dazu habe ich auch Experimente mit Extrakten aus PGCs gemacht. Diese sind allerdings noch schwieriger durchzuführen als Experimente mit Dottersack-Extrakten, da die Gewebemenge sehr gering ist. Aus diesem Grund ist es nicht möglich zeitabhängige Kinetiken durchzuführen, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Dennoch gab es auch in diesen Experimenten Hinweise auf Demethylierung, aber genauso auch Experimente, in denen das Demethylierungssubstrat (M.HhaI) nicht vom Degradationssubstrat (M.TaqI) zu unterscheiden war. Es ist mir nicht gelungen, die von mir beschriebenen Schwierigkeiten zu überwinden. So besteht immer noch das Problem,

dass die Zellen, in denen nachweislich globale aktive Demethylierung erfolgt, in sehr geringen Mengen zur Verfügung stehen. Sie sind damit eine sehr ungünstige Quelle für Extrakte. Selbst wenn ich gute Hinweise dafür gefunden habe, dass es in Dottersäcken auch eine Demethylierungsaktivität gibt, ist es mir aus diesem Grund nicht gelungen, diese soweit zu erhärten, dass Dottersäcke als zuverlässige Alternativen zu Zygoten oder PGCs angesehen werden könnten. Zudem konnte ich die entstehenden Reaktionsprodukte nicht analysieren, da dies nur sinnvoll nach einem erfolgreichen Demethylierungsexperiment gewesen wäre. Da es mir nicht möglich war, Aussagen bezüglich des Mechanismus der aktiven Demethylierung zu machen, war es auch nicht möglich, das volle Potential meines Demethylierungssubstrats auszuschöpfen. Ursprünglich wollte ich Degradation und Demethylierung gleichzeitig in einer Reaktion testen. Zu diesem Zweck wurde das Demethylierungssubstrat so entworfen, dass sich die methylierten Cytosine in der einen Hälfte des Substrats befinden und die methylierten Adenine in der anderen. Beide Hälften des Substrats sind durch eine KpnI Restriktionstelle von einander getrennt. So wäre es möglich gewesen, beide Hälften nach der Reaktion zu entkoppeln und zu analysieren. Dies habe ich zumindest ansatzweise getestet. So ist die Demethylierung des doppelt methylierten Substrats mit dem Extrakt aus Abbildung 15 ebenfalls zu detektieren.

Trotz dieser Schwierigkeiten würde ich weiterhin versuchen, die Experimente zur Klärung der globalen Demethylierung mit PGCs oder Zygoten weiter zu verfolgen, da alle anderen Ansätze diesen globalen Prozess aufzuklären bisher gescheitert sind. Dottersäcke würde ich meinen Daten entsprechend als potentielle Alternative überprüfen.

Selbst wenn ich noch keine Aussagen über den Mechanismus der Demethylierung machen kann, glaube ich, dass mein Versuchsansatz das Potential hat den Reaktionsmechanismus der Demethylierung aufzuklären. Es wird nötig sein, das Bereiten von Extrakten weiter zu verfeinern.

4.2 Reprogrammierung in Primordialen Keimzellen

Biochemische Untersuchungen des Prozesses der Demethylierung sind von enormer Wichtigkeit, da sie die Möglichkeit bieten den Reaktionsmechanismus aufzuklären und im Detail zu charakterisieren, um sowohl die Dynamik dieses Prozesses als auch die daran beteiligten Kofaktoren und am Ende selbstverständlich das Protein oder den Komplex, der diese Reaktion katalysiert, zu isolieren und zu identifizieren. Dennoch ist es genauso

wichtig diese Prozesse *in vivo* und während der Entwicklung von Lebewesen zu studieren. Es liegen bisher noch zu wenige konkrete Informationen über die Demethylierung der DNA vor, was das Etablieren sinnvoller biochemischer Versuchsansätze ungemein erschwert. Zudem ist es notwendig, sich noch einmal Gedanken über die Verwendung der Begriffe ‚aktive‘ und ‚passive‘ Demethylierung zu machen und vor allem über deren Definition. Nach meiner Kenntnis beschreibt der Begriff passive Demethylierung letztendlich nur eine Form der Demethylierung, bei der nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie auf eine unzureichende Erhaltung der Methylierung nach der Replikation zurückzuführen ist. Sollte ein Genomabschnitt nur 30% seiner Methylierung verlieren und passiert das prinzipiell in einem Zeitraum, in dem eine Zellteilung nicht ausgeschlossen werden kann, wird dieser Prozess automatisch als passiv oder replikationsabhängig bezeichnet, unabhängig davon, ob eine Demethylase oder ein Demethylasekomplex diese Reaktion katalysiert hat. Diese Klassifikation erfolgt auch unabhängig davon, ob überprüft wurde, ob Dnmt1 vorhanden ist, wodurch die Erhaltung der Methylierung prinzipiell gewährleistet wäre.

Aufgrund der nicht eindeutigen Abgrenzung von aktiver und passiver Demethylierung habe ich in dieser Arbeit versucht, diese Prozesse während der Entwicklung von Keimzellen in der Maus umfassender zu charakterisieren und die Frage zu beantworten, ob es bei der Entwicklung von PGCs, ebenso wie während der Entwicklung der Zygote der Maus, gleichzeitig ablaufende aktive und passive Demethylierung gibt. Zudem habe ich mit Hilfe statistischer Analysen versucht eine passive Demethylierung genauer zu charakterisieren und unter Berücksichtigung der Literatur zu klären, ob es sich hierbei tatsächlich um eine mangelnde Remethylierung oder eher um eine enzymatisch gesteuerte Demethylierung handelt.

In diesen Untersuchungen konnte ich mit Hilfe immunologischer Färbungen gegen Methylcytosin zeigen, dass es in den Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, bereits beginnend von 9,5 dpc zu einer Demethylierung großer Teile des Genoms in PGCs kommt (Abbildung 19). Dies konnte auf molekularbiologischer Ebene anhand des Methylierungsstatus einzelner untersuchter repetitiver Elemente wie Line1 Elementen und zentromerischen Satelliten nachvollzogen werden (siehe Abschnitt 3.2.2 und Abbildung 24). Der Zeitpunkt der beschriebenen Demethylierung unterscheidet sich damit von der von Hajkova und von Lane (Hajkova et al. 2002; Lane et al. 2003) beschriebenen Demethylierung von Line1 Elementen und IAPs, die zwischen 11,5 dpc und 13,5 dpc beobachtet wurde. Seki (Seki et al. 2005) hat hingegen 2005 ebenfalls deutlich früher einen dramatischen Verlust von 5meC mittels immunologischer Färbungen nachweisen

können (schon von 8,5 dpc auf 9,5 dpc). Der Unterschied des Zeitpunktes der Demethylierung mag darin begründet sein, dass in den Arbeiten von Hajkova und Lane Zellen verwendet wurden, die mit Hilfe eines FACS sortiert und gesammelt wurden. Hierbei werden Zellen sowohl nach Größe, als auch nach Intensität der Expression des PGC spezifischen fluoreszenten Transgens (siehe Abschnitt 2.2 Mausstamm Oct4 GFP) sortiert. PGCs sind aber in allen Stadien sehr heterogen, sowohl was ihre Größe als auch die Expression des Transgens betrifft. Dies spiegelt sich in der aktuellen Arbeit von Hajkova et. al (Hajkova et al. 2008) wieder, in der unter anderem auf diese Heterogenität eingegangen wird, die sich nicht zuletzt auch auf die Reprogrammierung der Zellen auswirkt. Der Unterschied zwischen der Arbeit von Seki und meiner Arbeit ist, dass Seki in seiner Arbeit Gonadenanlagen angefärbt hat und die von mir verwendeten Zellen per Hand sortiert wurden. So glaube ich, dass die Unterschiede der Zeitpunkte der Demethylierung auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellproben zurückzuführen ist.

Nun ging es um die Frage, ob es sich bei der von mir gefundenen Reduktion der Methylierung um eine enzymatische Demethylierung oder um eine mangelnde Remethylierung handelt. Es galt herauszufinden, ob sich die von mir beobachteten Effekte hinreichend durch eine unvollständige Remethylierung erklären lassen. Andernfalls wäre ein aktiver Prozess in Betracht zu ziehen und, zu überprüfen, ob sich dafür weitere Hinweise finden lassen.

Die einfachste Erklärung für eine mangelnde Remethylierung wäre die Abwesenheit von DNA-Methyltransferasen. Dies wird aber schon durch die Arbeit von Seki (Seki et al. 2005) widerlegt, der an 9,5 dpc und an 10,5 dpc nachweisen kann, dass Dnmt1 in diesen Stadien deutlich in PGCs exprimiert wird. Dnmt3a und Dnmt3b sind hingegen kaum zu detektieren. Dies wird von Versuchen von Yabuta (Yabuta et al. 2006) gestützt, der in Expressionsanalysen einzelner Zellen feststellen konnte, dass die Menge an Dnmt1 mRNA von 6,75 dpc - 8,25 dpc gegenüber somatischen Zellen deutlich ansteigt und mittelstark exprimiert ist, während die mRNA-Menge von Dnmt3b in dieser Zeit und im Vergleich zu somatischen Zellen abnimmt und ab 7,75 dpc nicht mehr nachzuweisen ist. Dnmt3a hingegen ist sowohl in PGCs als auch in somatischen Zellen über die Zeit in sehr geringen Mengen vorhanden. Diese Analysen sind zwar an jüngeren Entwicklungsstadien durchgeführt worden, als die von mir analysierten, decken sich aber mit den Daten von Seki und lassen evtl. in ihren Tendenzen Rückschlüsse auf die anschließenden Stadien zu. So lässt sich die unterschiedliche Veränderung der Methylierung in den einzelnen von

mir analysierten repetitiven Elementen nicht schlicht aus der Expression der DNA Methyltransferasen erklären. Dennoch glaube ich, dass sich die von mir beobachteten Effekte durch eine unterschiedlich effiziente Remethylierung erklären lassen. Man bedenke nur, dass die unterschiedlichen Methyltransferasen die verschiedenen repetitiven Elemente unterschiedlich effizient methylieren und die Methyltransferasen zudem durch andere Enzyme und unterschiedliche Histonmodifikationen zu ihrem Substrat geleitet werden. So scheint für die Aufrechterhaltung der Methylierung in IAPs vor allem Dnmt1 verantwortlich zu sein (Okano et al. 1999), auch wenn Bourc'his (Bourc'his and Bestor 2004) zeigt, dass 17,5 dpc Keimzellen für eine vollständige Methylierung von IAPs Dnmt3L benötigen, was eine Beteiligung von Dnmt3a vermuten ließe. Für die Methylierung von *major* Satelliten Sequenzen wird hingegen Dnmt3b und Dnmt1 benötigt, während für die Methylierung von *major* Satelliten (cenSAT) Dnmt1 und Dnmt3a ausreichen (Okano et al. 1999; Chen et al. 2003; Ueda et al. 2006). Die Line1 Elemente werden von Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3L (Liang et al. 2002; Chen et al. 2003) ausreichend remethyliert.

Histonmodifikationen und Enzyme, die Histone modifizieren, scheinen nun zusätzlich die unterschiedlichen Methyltransferasen zu ihren entsprechenden Zielorten zu leiten und sich zudem auf deren Effizienz auszuwirken (zur Übersicht siehe (Cedar and Bergman 2009)). In vielen Fällen werden die *de novo* Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b durch Dnmt3L zu ihren Zielregionen geleitet. Dnmt3L wiederum interagiert mit Histon H3, wobei diese Interaktion von jeglicher Methylierung des Lysins 4 in Histon H3 inhibiert wird (Ooi et al. 2007). Im Gegenzug dazu kann die Histonmethyltransferase G9a, die Histon H3K9 einfach oder zweifach methyliert, Dnmt3a rekrutieren (Feldman et al. 2006). Zudem haben Lehnertz und Kollegen (Lehnertz et al. 2003) gezeigt, dass die Histonmethyltransferase SUV39H1 und 2, Dnmt3a und 3b rekrutieren. SUV39H1/2 vermitteln Trimethylierung im Histon H3 an Lysin 9 in *major* Satelliten Sequenzen.

Abbildung 41 gibt eine Zusammenfassung aus den Arbeiten von Hajkova, Seki und meinen eigenen Daten (Seki et al. 2007; Hajkova et al. 2008) bezüglich der von mir oben beschriebenen Histonmodifikationen und der Expression der Methyltransferasen wieder, außerdem den Methylierungsstatus der einzelnen repetitiven Elemente. Es ist deutlich zu sehen, dass H3K9 Dimethylierung über die Zeit abnimmt, während das Signal für H3K9 Trimethylierung zwar eher schwach ist aber konstant bleibt. Hajkova hat in ihrer Arbeit von 2008 an Tag 10,5 der Embryonalentwicklung deutlich mehr H3K4 Dimethylierung nachgewiesen als an Tag 8,5. Die Methyltransferase Dnmt1 ist in allen Stadien konstant

zu detektieren, ebenso wie Dnmt3a, die allerdings nur sehr schwach exprimiert ist. Dnmt3b hingegen ist nicht oder kaum zu detektieren.

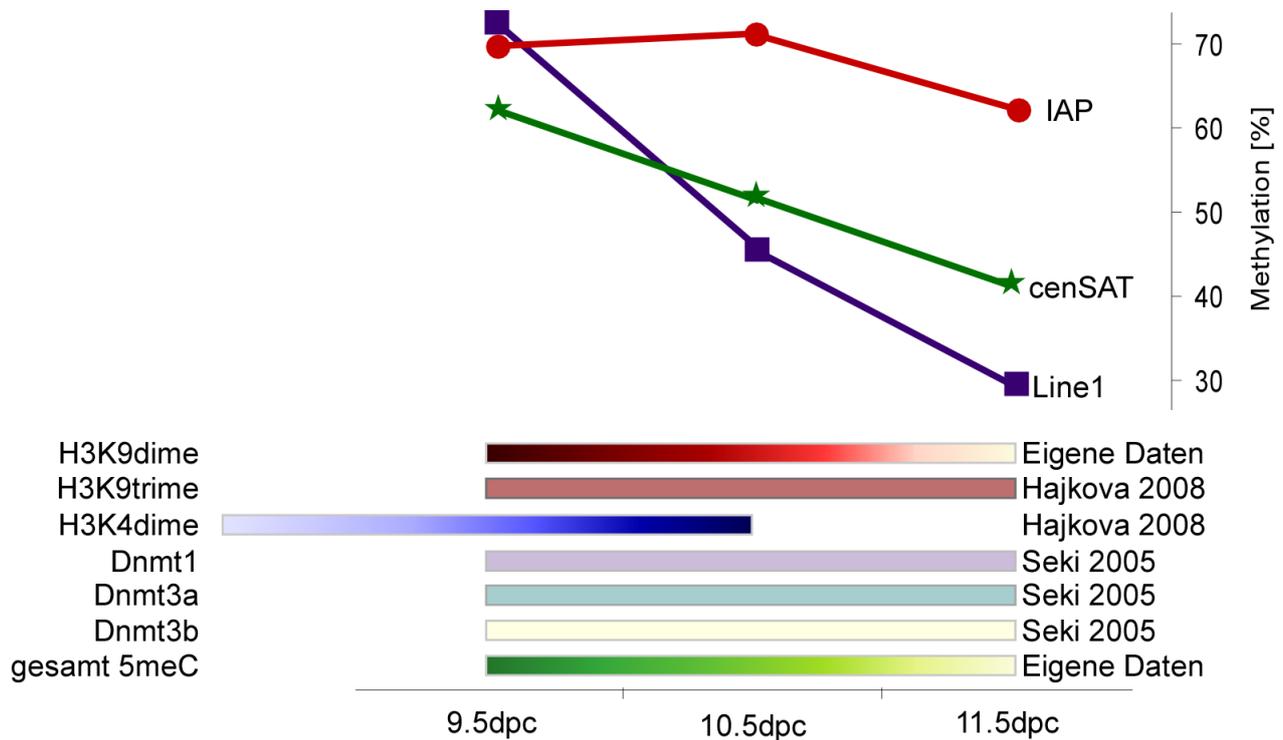
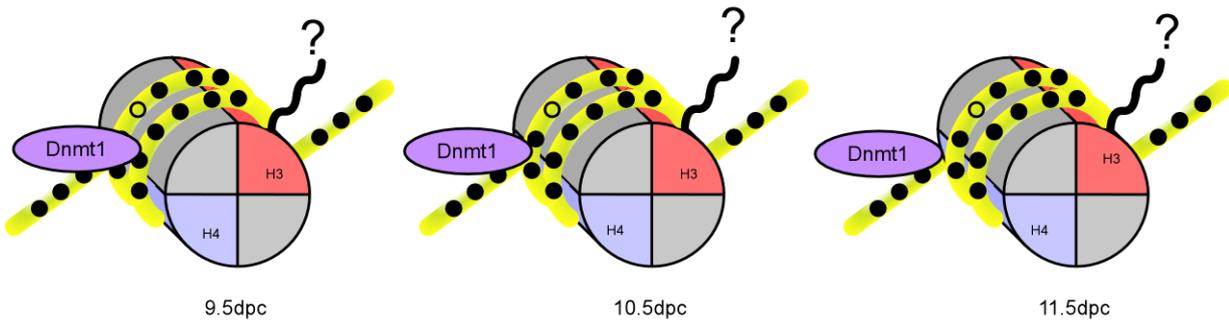


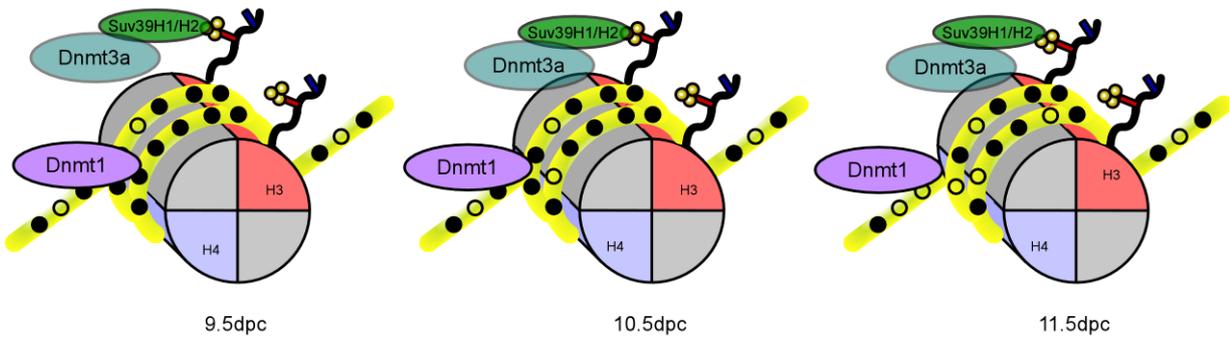
Abbildung 41: Zusammenstellung einiger in PGCs vorhandenen Modifikationen des Histons H3, der Methyltransferasen und des Methylierungsstatus der Zellen (unterer Teil), sowie die von mir gemessene Gesamtmethylierung der einzelnen untersuchten repetitiven Elemente (oberer Teil). Wiedergegeben sind hier im unteren Bereich schematisch Signalintensitäten immunologischer Färbungen. Es handelt sich um eine relative Darstellung. Grundsätzlich sollen dunkle Farben stärkere Signale wiedergeben als helle. Ein Farbverlauf von dunkel nach hell bedeutet eine Abnahme des Signals, einer von hell nach dunkel eine Zunahme, während eine gleich bleibenden Farbintensität keine Veränderung in der Signalstärke bedeutet.

Daraus ergibt sich für die unterschiedliche Reprogrammierung der drei von mir untersuchten repetitiven Elemente aus meiner Sicht folgendes Modell, das in Abbildung 42 veranschaulicht ist. Für den Erhalt der Methylierung in IAPs scheint laut Literatur, wie oben dargelegt, das Vorhandensein von Dnmt1 ausreichend zu sein. Da, wie Abbildung 41 zu entnehmen, Dnmt1 in allen von mir untersuchten Entwicklungsstadien vorhanden ist und sich der Methylierungsstatus der IAPs in meinen Analysen nicht signifikant verändert (Abschnitt 3.2.2), gehe ich davon aus, dass in PGCs die Methylierung der IAPs von Dnmt1 ausreichend erhalten werden kann.

IAP



CenSAT



Line1

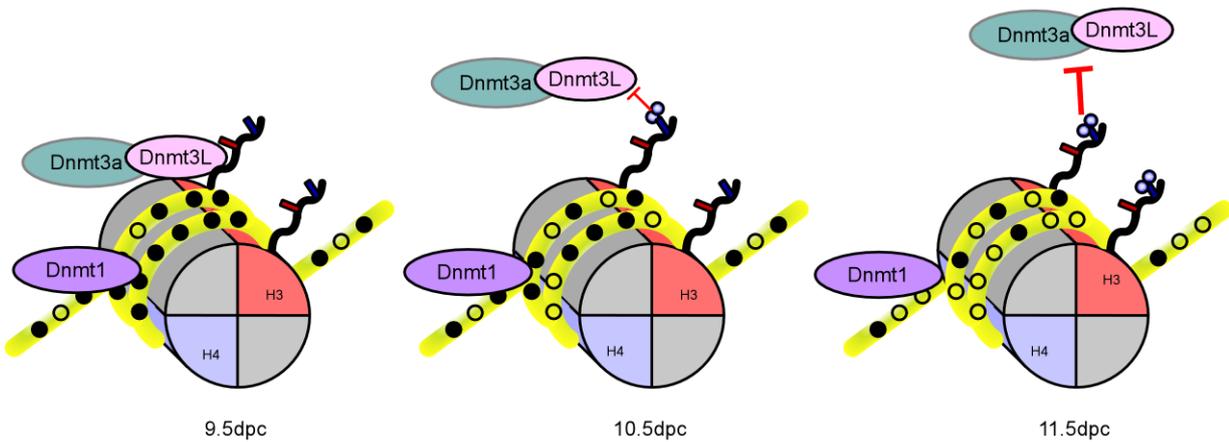


Abbildung 42: Modell zur Remethylierung verschiedener repetitiver Elemente während der Entwicklung von Keimzellen.

Bei den Line1 Elementen scheint dies nicht auszureichen. Bei diesen Elementen konnte ich einen hoch signifikanten Verlust der Methylierung von jeweils 30% zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien nachweisen (Abschnitt 3.2.2) und das obwohl die für den Erhalt der Methylierung in Line1 Elementen verantwortlichen Dnmt1 und Dnmt3a

vorhanden sind (siehe auch Abbildung 41). Heute weiß man, dass Dnmt3a im Komplex mit Dnmt3L vorliegt und Dnmt3L Dnmt3a zu seinen Zielsequenzen dirigiert (Jia et al. 2007; Ooi et al. 2007). Die Interaktion von Dnmt3L mit dem Nukleosom, und damit die Interaktion von Dnmt3a mit ihrem Substrat, wird durch Dimethylierung von Histon H3 an Lysin 4 inhibiert (ebenfalls (Ooi et al. 2007)). Da Dnmt3L in PGCs vorhanden zu sein scheint (präliminäre Daten aus der Arbeitsgruppe J. Walter), die Dimethylierung an H3K4 aber von Tag 8,5 bis Tag 10,5 deutlich zunimmt, nehme ich an, dass Line1 Elemente an H3K4 Dimethylierung aufweisen, die über die Zeit zunimmt. So kommt es, dass die für den vollständigen Erhalt der Methylierung der Line1 Elemente benötigte Methylierung durch Dnmt3a unter zu Hilfenahme von Dnmt3L nicht uneingeschränkt gewährleistet ist und Line1 Elemente deshalb signifikant an Methylierung verlieren.

Der Unterschied zu den von mir untersuchten *major* Satelliten Sequenzen (CenSAT), diese werden effektiver remethyliert, besteht meiner Meinung nach darin, dass diese durchgehend Trimethylierung an Histon H3 Lysin 9 aufweisen. Diese Modifikation wird durch SUV39H1 oder 2 katalysiert. Lehnertz et. al. konnten zeigen, das SUV39H1 und 2 Dnmt3a zu den *major* Satelliten Sequenzen dirigieren ebenso, wie gezeigt werden konnte, dass *major* Satelliten H3K9 Trimethylierung aufweisen. Dies wird zudem dadurch gestützt, dass in den Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe Walter zu H3K9 Trimethylierung durchgeführt wurden, diese in stark kondensierten Foci vorlag. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um perizentromerisches Chromatin handelt.

Aufgrund der von mir zusammengetragenen Fakten und den sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen bin ich davon überzeugt, dass es sich bei der Demethylierung der repetitiven Elemente um eine unvollständige Remethylierung und nicht um eine langsame aktive Demethylierung handelt.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist das Phänomen, dass IAPs zwar nicht signifikant an Gesamtmethylierung verlieren, es aber zu einer Zunahme an unmethylierten Einzelpositionen kommt (siehe Abschnitt 3.2.2, Abbildung 24 und Abbildung 25). Die Arbeitsgruppe von A. Jeltsch konnte zeigen, dass es eine so genannte *exit site* für Dnmt1 gibt (Goyal et al. 2006). So stellte sie fest, dass die Methylierung von Dnmt1 an CpGs, auf die ein CTC folgt, signifikant überdurchschnittlich abbricht. In keiner der von mir untersuchten Sequenzen ist ein CGCTC zu finden. Dennoch weist die Sequenz der IAPs neunmal die Basenfolge CTC auf, während in der Sequenz von cenSAT keine CTC Abfolge und in Line 1 Elementen ganz am Ende der Sequenz ein CTC zu finden ist.

Vielleicht stört diese Basenabfolge auch unabhängig von CpGs die Prozessivität von Dnmt1, was zu der Häufung einzelner unmethylierter CpGs führen könnte.

Bei der Demethylierung des geprägten Gens H19 sind die Schlussfolgerungen nicht ganz so eindeutig. Betrachtet man die Veränderung der Gesamtmethylierung des Genabschnitts, beträgt diese jeweils 50%, was durch eine nicht erfolgte Remethylierung hinreichend erklärt wäre. Betrachtet man aber die beiden Teilbereiche (die vorderen 5 CpGs und die hinteren 5 CpGs) des analysierten Abschnitts, gilt dies nicht für die vorderen fünf CpGs. Hier habe ich an 9,5 dpc in beiden Hälften jeweils 75% Methylierung des väterlichen Allels gemessen, während ich an 10,5 dpc für die vorderen CpGs nur 16% Methylierung und für die hinteren CpGs 62,5% Methylierung messen konnte. Dies spricht zum einen für eine enzymatische Demethylierung der hinteren CpGs, da die Reduktion der Methylierung nicht durch einen durchlaufenen Zellzyklus zu erklären ist, und ebenso für einen gleichzeitig ablaufenden Remethylierungsprozess, da die vorderen CpGs nur 12,5% Methylierung verloren haben.

Deshalb nehme ich an, dass es sich hier eher um eine enzymatisch katalysierte Demethylierung handelt als um einen Remethylierungseffekt. Für eine belastbare Aussage hierüber müssten allerdings mehr Experimente gemacht und mehr Sequenzen herangezogen werden.

Leider konnte ich in meinen Analysen zu Reprogrammierung in Keimzellen keine weiteren Hinweise auf einen Mechanismus der Demethylierung der DNA finden.

4.3 Methylierungsanalysen der BWS-Region einer Familie mit MZZ, die diskordant für BWS sind

Während meiner Arbeit habe ich mich mit der Methylierung der DNA bei *imprinting* Defekten beschäftigt. Hierfür habe ich den Methylierungsstatus der beiden ICs der BWS Region (H19 und Lit1) einer Familie mit MZZ untersucht, die diskordant für das *imprinting* Syndrom BWS sind. Zusätzlich habe ich den Expressionsstatus je eines Gens aus dem IC1 (Igf2) und dem IC2 (CDKN1C) untersucht, um zu überprüfen, ob es hier signifikante Unterschiede in dem Verhältnis der Expression der beiden Gene gibt. Zudem hatte die ältere Tochter dieser Familie bei der Geburt eine vergrößerte Zunge, was kein vollständiges BWS bedeutet, aber einen Hinweis auf eine Veranlagung in dieser Familie für BWS sein kann.

4.3.1 Methylierungsanalyse der imprinting center I und II

Bei dem Auftreten von BWS können viele verschiedene molekularbiologische Veränderungen in der BWS Region eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 1.8). Selbst wenn es sich bei diskordanten MZZ in der überwiegenden Zahl um eine Hypomethylierung im IC2 handelt, ist dies nicht immer der Fall (Weksberg et al. 2002; Smith et al. 2006; Bliet et al. 2009). Dennoch habe ich als erstes den Methylierungsstatus beider *imprinting center* analysiert. Wie aus Abschnitt 3.3.1 und den Abbildung 27 und Abbildung 30 hervorgeht zeigen beide Zwillinge eine deutliche Hypomethylierung im IC2 (Lit1) und keine abweichende Methylierung im IC1 (H19; jeweils Blut). Bei der Analyse des Methylierungsstatus von IC2 in Mundschleimhautzellen weist nur der erkrankte Zwilling eine Hypomethylierung auf, während bei dem gesunden Zwilling kein Unterschied zu den anderen Familienmitgliedern zu erkennen ist. Dies entspricht den von Weksberg beschriebenen Daten (Weksberg et al. 2002) und der Tatsache, dass bei MZZ in den meisten Fällen eine Hypomethylierung des IC2 vorliegt.

Eine genaue Analyse der Methylierungsmuster in IC1 und IC2 bei diskordanten MZZ mit BWS ist mir hingegen bisher nicht bekannt. Daher wollte ich untersuchen, ob es über den Gesamtmethylierungsstatus hinaus Unterschiede gibt, anhand derer sich der erkrankte und der gesunde Zwilling unterscheiden lassen. Eine Idee war, dass es vielleicht einzelne Positionen gibt, die für den Erhalt einer Prägung von Bedeutung sind, so dass der Gesamtmethylierungsstatus zwar eine Hypomethylierung ausweist, die Regulation des ICs aber durch die Methylierung von Schlüsselpositionen oder einer Minimalmethylierung dennoch gewährleistet ist. Dazu habe ich die nicht methylierten Sequenzen der einzelnen Personen daraufhin untersucht, ob sie sich in Bezug auf methylierte CpGs innerhalb dieser Sequenzen unterscheiden und ob es einzelne Positionen gibt, die signifikant häufiger methyliert sind als andere. Ich konnte zwar feststellen, dass sich die gesunden Kinder von ihrem Vater hinsichtlich mosaikaler Methylierung unterscheiden, aber leider nicht völlig ausschließen, dass es sich hierbei um ein experimentell bedingten Unterschied handelt (siehe Abschnitt 3.3.2.2). Um dem weiter nachzugehen, müsste untersucht werden, in wieweit man von der Nichtkonvertierung einzelner Cytosine auf die Konvertierbarkeit anderer Cytosine rückschließen kann. Dies bedarf einer sehr sorgfältigen statistischen Analyse, die an unterschiedlichen Sequenzabschnitten und Proben durchgeführt werden sollte. Zudem sollten andere Personen, die von BWS betroffen sind, und weitere nicht betroffene Personen auf eine mosaikale Methylierung

untersucht werden, um zu ermitteln, ob es sich hierbei um eine für diese Familie spezifische Beobachtung handelt, oder ob es sich hierbei tatsächlich um ein Phänomen handelt, das mit einer BWS Vorstufe oder einer sehr milden Form von BWS assoziiert werden kann.

Ein Hinweis kann es aber sein, dass ich in der von mir analysierten Region zwei CpGs identifizieren konnte, die höchst signifikant überdurchschnittlich häufig methyliert sind (9/10 mal). Davon entfallen jeweils 5 Sequenzen auf den gesunden Zwilling.

Interessanterweise liegen CpG13 und 15 angrenzend an sogenannte G-reiche Abschnitte, die nach einer Analyse mit Quadfinder (Scaria et al. 2006) grundsätzlich in der Lage sind G-Quadruplexe auszubilden. Diese Quadruplexe finden sich häufig in Promotorbereichen von Genen (Eddy and Maizels 2008) und wirken unter anderem verstärkend auf die Bindung des Transkriptionsfaktors MyoD (Shklover et al. 2010), dessen spezifische Erkennungssequenz ebenfalls in direkter Nähe zu CpG13 und 15 liegt. Bei der Ausbildung von G-Quadruplexen entstehen durch die Umorientierung der O6 Positionen der Guanine negative Kavitäten

(<http://www.rsc.org/ebooks/archive/free/BK9780854043743/BK9780854043743-00001.pdf>) die durch das Binden von monovalenten Metallionen wie Na⁺ oder K⁺ stabilisiert werden. Zudem erkennt MyoD, das zu den klassischen basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren gehört, die DNA über seine basischen Aminosäuren. So könnte es sein, dass die sich bildenden negativen Kavitäten bei der Ausbildung der G-Quadruplexe die Bindung von MyoD verstärkt. Bei der Ausbildung der G-Quadruplexe konnte gezeigt werden, dass in den *linker* Bereichen dieser Strukturen ein Austausch von Methylgruppen (T→U) zu einer Stabilisierung der Quadruplexe führt (Olsen and Marky 2009). Überträgt man das auf Cytosine, könnte deren Methylierung in nächster Nähe zu den Quadruplexen oder deren *linker* Bereichen evtl. zur Destabilisierung der Quadruplexe führen und die Bindung von MyoD verhindern. So würde der Transkriptionsstatus dem des mütterlichen Allels angenähert (keine Expression von Lit1), was zu einer Abmilderung des molekularen BWS Phänotyps führen könnte. Darüberhinaus fördern Quadruplexstrukturen das Entstehen sehr stabiler DNA/RNA Hybride (Eddy and Maizels 2008). Dies könnte der Status des nicht methylierten Allels sein.

Ob, und wenn ja, wie sich die auffällige Methylierung des Cytosins 176 (Abschnitt 3.3.2.4) in dieses Bild einfügt, vermag ich nicht zu sagen, zumal hier erst überprüft werden muss, ob es sich vielleicht doch nur um ein technisches Artefakt handelt.

Bei der Musteranalyse des IC1 (H19) (Abschnitt 3.3.3) konnte ich zwar auch eine mosaikale Methylierung feststellen, doch sind hier die Konvertierungsraten einzelner Familienmitglieder zu unterschiedlich zu einander. Zudem habe ich zwar CpGs gefunden, die überdurchschnittlich häufig methyliert waren, aber diese Häufigkeit unterscheidet sich nicht von einer unvollständigen Konvertierung. Ebenso gab es in diesem Fragment mehrere nicht-CpG Cytosine, die überdurchschnittlich häufig nicht konvertiert waren und zudem in räumlicher Nähe zu den überdurchschnittlich häufig methylierten CpGs lagen. Hinzu kommt, dass der Gesamtmethylierungsstatus in diesem Bereich als normal anzusehen ist, so dass es mir unwahrscheinlich erscheint, dass hier ähnliche Effekte zu beobachten wären wie im IC2. Der von mir analysierte Promotorbereich des IC1 zeigt eine interessante Zunahme an Methylierung zum Transkriptionsstart. Dies gilt allerdings für alle drei Kinder. Da die DNA der Eltern in diesem Abschnitt nicht untersucht wurde, kann ich keine Aussagen darüber machen, ob es sich hier um einen grundsätzlichen Epigenotyp handelt oder um etwas, was für die Kinder spezifisch ist.

Die bisher umfassendste Methylierungsanalyse an MZZ, die diskordant für BWS sind, wurde 2002 von Weksberg et al. (Weksberg et al. 2002) durchgeführt. In dieser Studie wurden 10 MZZ-Paare untersucht. Von diesen waren 8 weiblich und nur 2 Paare männlich. Dies bedeutet laut Weksberg eine signifikante Überrepräsentation von weiblichen MZZ gegenüber männlichen ($P < 0,007\%$ (Weksberg et al. 2002)). Zusätzlich sind aus der Literatur laut Weksberg 17 weitere Paare diskordanter MZZ bekannt, von denen 12 weiblich und 5 männlich sind. Spekuliert wird in der Arbeit von Weksberg ob, die Überrepräsentation von weiblichen Zwillingen gegenüber männlichen etwas mit nicht zufälliger X-Inaktivierung zu tun haben könnte, was auch an anderen Stellen in der Literatur vermutet wird (Lubinsky and Hall 1991; Orstavik et al. 1995). In der Zwischenzeit konnte festgestellt werden, dass die X-Inaktivierung tatsächlich in vielen Frauen nicht immer zufällig erfolgt. Dies lässt sich aber nicht mit dem Auftreten von BWS korrelieren (Weksberg et al. 2002; Bliok et al. 2009).

Warum die gesunden Zwillinge dieser Zwillingspaare bei der Methylierungsanalyse im Blut ebenfalls eine Hypomethylierung aufweisen, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Auszuschließen ist aber, dass dies durch einen Blutaustausch zwischen den Geschwistern während der Entwicklung entstanden ist (analog dem Feto-Fetalen-Transfusionssyndrom (FFTS) und sich so die Stammzellen des erkrankten Zwillings im Rückenmark des gesunden Zwillings ansiedeln konnten. Bei den hier untersuchten Zwillingen kam es zwar zu einem FFTS, allerdings war hier der gesunde Zwilling der Donor und der erkrankte der

Akzeptor. Ich schließe mich Bliok und Kollegen an, die die Erklärung für dieses Phänomen in der Entstehung des blutbildenden Systems suchen (Bliok et al. 2009). So sind laut Bliok die allerersten Hinweise auf die Entstehung von haematopoetischen Stammzellen (HSC) im Mesoderm des Dottersacks zu finden, also während der zweiten Entwicklungswoche. Hier könnte die Ursache liegen, da sich MZZ häufig einen Dottersack und damit auch die fehlprogrammierten HSCs teilen. Da die ersten Anlagen eines Dottersacks vor der Teilung beider Zwillinge entstehen, könnten beide Kinder auch fehlprogrammierte Zellen dieses Gewebes erhalten haben (siehe auch Abschnitt 1.9). Außerdem darf man nicht außer Acht lassen, dass es sich bei BWS in diskordanten MMZ immer um einen mosaikalen BWS handelt. Dies bedeutet, dass nicht alle Zellen von dem epigenetischen Effekt betroffen sind.

Eine weitere spannende Frage ist, warum MZZ so viel häufiger von BWS betroffen sind als nicht-Zwillinge. Bestor schlägt vor, dass es während der frühen Zellteilungen zu einem unvollständigen Erhalt der Methylierung durch Dnmt1 kommt. Dies könnte besonders bei Mädchen der Fall sein, da bei diesen zusätzlich ein X-Chromosom mittels Methylierung stillgelegt werden muss. Im Zuge dieser unvollständigen Remethylierung kommt es in einzelnen Zellen schon zu einem Großwuchs, was das Auseinanderbrechen der Zygote und damit die Zwillingsbildung begünstigt. Dieser Denkansatz soll auch erklären, warum signifikant soviel mehr weibliche MZZ gibt, die von BWS betroffen sind.

Vielleicht handelt es sich aber auch um ein Problem bei dem Heranführen der Methyltransferasen an ihre Zielsequenz. Denkt man an das Modell für die Reprogrammierung der Keimzellen, mag auch eine unvollständige Modifikation der Histone dazu führen, dass die Methyltransferasen ihre Ziele nicht ausreichend schnell finden und deshalb die Methylierung nicht aufrechterhalten können.

4.3.2 Expressionsanalyse

Da dem Auftreten von BWS häufig, wie auch in dem hier beschriebenen Fall, eine Veränderung der Methylierung in mindestens einer *imprinting* Kontrollregion zugrunde liegt und diese wiederum die monoallelische Expression der dieser Region angeschlossenen Gene verändert, habe ich überprüft, ob sich Unterschiede in der Expression der Gene IGF2 und CDKN1C ($p57^{kip2+}$) zwischen einzelnen Familienmitgliedern finden lassen. Man geht davon aus, dass BWS entweder durch eine erhöhte IGF2 Expression oder durch eine

verminderte CDKN1C Expression hervorgerufen wird. Manche Publikationen gehen sogar so weit, dass sie annehmen, eine Erhöhung der IGF2 Expression habe dieselben Effekte wie eine verminderte CDKN1C Expression (Caspary et al. 1999).

Um dies zu prüfen, habe ich, die aus Fibroblastenkulturen isolierte mRNA Menge der beiden Gene mit Hilfe einer Echtzeit PCR bestimmt und die Werte der einzelnen Familienmitglieder miteinander verglichen.

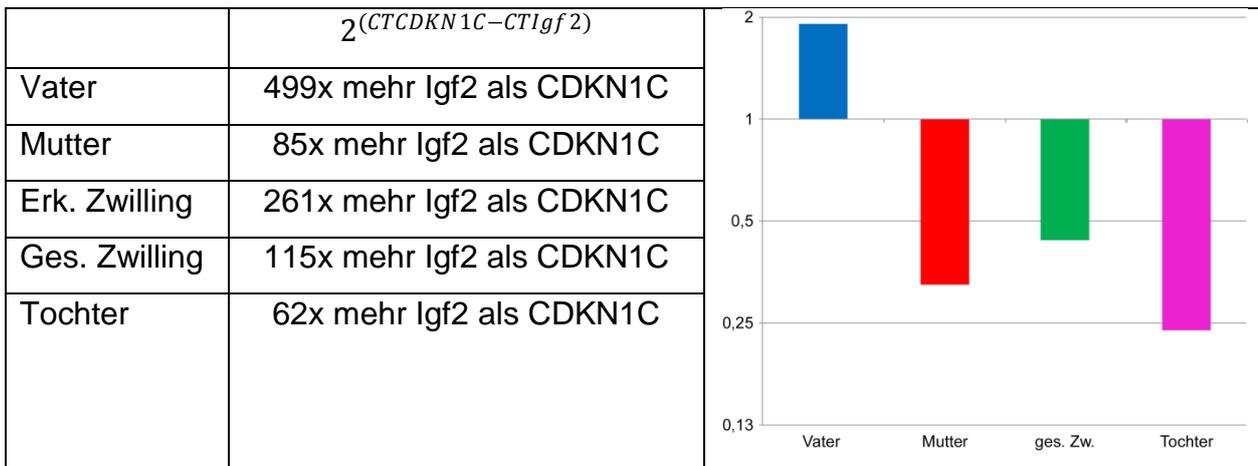
In der Literatur wird häufig ausschließlich überprüft, ob der monoallelische Expressionsstatus des jeweiligen Gens aufrecht erhalten bleibt, es wird aber nicht die Menge an Transkript verglichen. Da es in der von mir untersuchten Familie leider keine informativen Polymorphismen gibt, konnte ich nicht auf diese Methode zurückgreifen, sondern musste die Transkriptmengen miteinander vergleichen. Zudem ist es bei CDKN1C so, dass die monoallelische Expression im Menschen nicht so restriktiv ist (Matsuoka et al. 1996) wie in der Maus.

Der Vergleich der Transkriptmengen an CDKN1C geht vor allem darauf zurück, dass der erkrankte Zwilling eine Hypomethylierung der *imprinting* Kontrollregion dieser Domäne aufweist (hier ist die Methylierungsanalyse der Fibroblasten/ Mundschleimhaut zugrunde zu legen, Abschnitt 3.3.1, da die Expressionsanalyse mit RNA aus Fibroblastenkulturen durchgeführt wurde). Wie aus Abschnitt 3.3.4.2 hervor geht, weist der erkrankte Zwilling die geringste Menge an CDKN1C auf, was mit seiner BWS Erkrankung zusammenhängen könnte. Dies lässt sich allerdings nicht eindeutig mit dem Methylierungsstatus in Zusammenhang bringen, da in den Mundschleimhautproben keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede nachzuweisen waren, wohl aber in der Transkriptmenge (siehe Abschnitt 3.3.4.2).

Da in der Literatur vermutet wird, dass für die Ausprägung von BWS das Zusammenspiel der Expression von CDKN1C und IGF2 eine Rolle spielt (Caspary et al. 1999), habe ich untersucht, ob es vielleicht ein definiertes Verhältnis von CDKN1C zu IGF2 in dieser Familie gibt und ob sich hierin evtl. ein Grund für die Erkrankung des einen Zwilling erkennen lässt. Auffällig bei der Betrachtung der IGF2 Expression ist es, dass die Reihenfolge der Familienmitglieder hinsichtlich der Frage, wer die stärkste Expression aufweist und wer die geringste, ähnlich der von CDKN1C ist. Hier weist der Vater das meiste IGF2 auf und der gesunde Zwilling am zweitmeisten. Mutter, Tochter und der erkrankte Zwilling sind nicht voneinander zu unterscheiden, weisen aber weniger IGF2 auf, als der Vater und der gesunde Zwilling.

Um einen genaueren Einblick in das Verhältnis von IGF2 zu CDKN1C der einzelnen Familienmitglieder zu bekommen, habe ich für jedes Familienmitglied das Verhältnis von IGF2 zu CDKN1C bestimmt ($2^{(CT_{CDKN1C}-CT_{Igf2})}$). Hier ist nun zu erkennen, dass bei der Mutter, der Tochter und dem gesunden Zwilling das Verhältnis von IGF2 zu CDKN1C ähnlich ist (62; 85; 115), das bedeutet, dass sie sich um weniger als Faktor zwei in diesem Verhältnis unterscheiden.

Tabelle 19: Relative Expression von Igf2 in Bezug auf CDKN1C und im Vergleich zum erkrankten Zwilling



Anders hingegen beim erkrankten Zwilling und bei dem Familienvater. Mit 261 ist die relative Expression des erkrankten Zwillings 4-mal höher als bei der Tochter und 3-mal höher als bei der Mutter. Interessant ist die Tatsache, dass der Vater mit 499 einen wiederum doppelt so hohen Wert aufweist wie der erkrankte Zwilling.

Daraus könnte man schließen, dass es hier tatsächlich, unabhängig von den einzelnen C_T -Werte für die beiden Gene, einen Unterschied im Verhältnis der Expression beider Gene zu einander gibt, der das Auftreten von BWS erklären mag. Ich denke, dass der beobachtete Effekt auf eine verminderte CDKN1C Expression des erkrankten Zwillings zurückzuführen ist, da hier die C_T -Werte weiter auseinander lagen als bei IGF2. Außerdem gab es bei der IGF2 Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen dem erkrankten Zwilling, der Mutter und der Tochter. Die Tatsache, dass der Vater den größten Unterschied zwischen der IGF2 und CDKN1C Expression aufweist, führe ich hingegen auf den sehr hohen IGF2 Wert zurück. Warum dies so ist und ob dies auch etwas mit BWS zu tun hat, vermag ich nicht zu sagen, zumal ich hier die Transkriptmenge gemessen habe. Daraus lässt sich nur sehr schwer auf die Menge IGF2 schließen, die tatsächlich im Blut frei zirkuliert, da diese von vielen weiteren Faktoren bestimmt wird. Zudem spielt IGF2 bei

vielen Stoffwechselprozessen eine Rolle, so dass eine hohe Menge an IGF2-Transkript im Erwachsenen nicht zwingend etwas mit BWS zu tun haben muss.

5 Literaturverzeichnis

- Armstrong, L., Lako, M., Dean, W., and Stojkovic, M. 2006. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells* **24**(4): 805-814.
- Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., and Niehrs, C. 2007. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* **445**(7128): 671-675.
- Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. 1991. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* **351**(6322): 153-155.
- Baumer, A. 2002. Analysis of the methylation status of imprinted genes based on methylation-specific polymerase chain reaction combined with denaturing high-performance liquid chromatography. *Methods* **27**(2): 139-143.
- Beard, C., Li, E., and Jaenisch, R. 1995. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* **9**(19): 2325-2334.
- Bell, A.C. and Felsenfeld, G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**(6785): 482-485.
- Bennett, M.T., Rodgers, M.T., Hebert, A.S., Ruslander, L.E., Eisele, L., and Drohat, A.C. 2006. Specificity of human thymine DNA glycosylase depends on N-glycosidic bond stability. *J Am Chem Soc* **128**(38): 12510-12519.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., and Lander, E.S. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**(2): 315-326.
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., and Szyf, M. 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**(6720): 579-583.
- Bliek, J., Alders, M., Maas, S.M., Oostra, R.J., Mackay, D.M., van der Lip, K., Callaway, J.L., Brooks, A., van 't Padje, S., Westerveld, A., Leschot, N.J., and Mannens, M.M. 2009. Lessons from BWS twins: complex maternal and paternal hypomethylation and a common source of haematopoietic stem cells. *Eur J Hum Genet* **17**(12): 1625-1634.
- Bliek, J., Maas, S.M., Ruijter, J.M., Hennekam, R.C., Alders, M., Westerveld, A., and Mannens, M.M. 2001. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* **10**(5): 467-476.
- Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J., and Lengauer, T. 2005. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* **21**(21): 4067-4068.
- Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U., and Renkawitz, R. 2000. The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* **275**(45): 34963-34967.
- Bourc'his, D. and Bestor, T.H. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**(7004): 96-99.
- Brown, K.W., Villar, A.J., Bickmore, W., Clayton-Smith, J., Catchpoole, D., Maher, E.R., and Reik, W. 1996. Imprinting mutation in the Beckwith-Wiedemann syndrome leads to biallelic IGF2 expression through an H19-independent pathway. *Hum Mol Genet* **5**(12): 2027-2032.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-193.
- Caspary, T., Cleary, M.A., Perlman, E.J., Zhang, P., Elledge, S.J., and Tilghman, S.M. 1999. Oppositely imprinted genes p57(Kip2) and igf2 interact in a mouse model for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genes Dev* **13**(23): 3115-3124.
- Cedar, H. and Bergman, Y. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* **10**(5): 295-304.
- Cedar, H. and Verdine, G.L. 1999. Gene expression. The amazing demethylase. *Nature* **397**(6720): 568-569.
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., and Li, E. 2003. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5594-5605.

- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., and Thompson, J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3497-3500.
- Cohen, M.M., Jr. 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr Dev Pathol* **8**(3): 287-304.
- Cortazar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R., and Schar, P. 2007. The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* **6**(4): 489-504.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., and Wolberger, C. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1037-1043.
- Dean, W., Santos, F., and Reik, W. 2003. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* **14**(1): 93-100.
- Eddy, J. and Maizels, N. 2008. Conserved elements with potential to form polymorphic G-quadruplex structures in the first intron of human genes. In, pp. 1321-1333.
- Edwards, J.H., Dent, T., and Kahn, J. 1966. Monozygotic twins of different sex. *J Med Genet* **3**(2): 117-123.
- El-Maarri, O., Herbiniaux, U., Walter, J., and Oldenburg, J. 2002. A rapid, quantitative, non-radioactive bisulfite-SNuPE- IP RP HPLC assay for methylation analysis at specific CpG sites. *Nucleic Acids Res* **30**(6): e25.
- El-Maarri, O. and Slim, R. 2006. Familial hydatidiform molar pregnancy: the germline imprinting defect hypothesis? *Curr Top Microbiol Immunol* **301**: 229-241.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., and Bergman, Y. 2006. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* **8**(2): 188-194.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.Z., Plass, C., and Esteller, M. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10604-10609.
- Fremont, M., Siegmann, M., Gaulis, S., Matthies, R., Hess, D., and Jost, J.P. 1997. Demethylation of DNA by purified chick embryo 5-methylcytosine-DNA glycosylase requires both protein and RNA. *Nucleic Acids Res* **25**(12): 2375-2380.
- Fuks, F. 2005. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* **15**(5): 490-495.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. 2006. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* **124**(3): 495-506.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.K. 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* **111**(6): 803-814.
- Goyal, R., Reinhardt, R., and Jeltsch, A. 2006. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **34**(4): 1182-1188.
- Gruenbaum, Y., Cedar, H., and Razin, A. 1982. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* **295**(5850): 620-622.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., and Razin, A. 1981a. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **292**(5826): 860-862.
- Gruenbaum, Y., Stein, R., Cedar, H., and Razin, A. 1981b. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett* **124**(1): 67-71.
- Grzeskowiak, R., Witt, H., Drungowski, M., Thermann, R., Hennig, S., Perrot, A., Osterziel, K.J., Klingbiel, D., Scheid, S., Spang, R., Lehrach, H., and Ruiz, P. 2003. Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **59**(2): 400-411.
- Haig, D. 2004. Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annual review of genetics* **38**: 553-585.
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., and Surani, M.A. 2008. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* **452**(7189): 877-881.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* **117**(1-2): 15-23.
- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J., and Schar, P. 2003. The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res* **31**(9): 2261-2271.

- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**(6785): 486-489.
- Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. 1997. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol* **1**(3): 300-308.
- Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A., and Bird, A. 2001. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* **15**(6): 710-723.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J., and Bird, A. 1999. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* **401**(6750): 301-304.
- Hendrich, B.D. and Willard, H.F. 1995. Epigenetic regulation of gene expression: the effect of altered chromatin structure from yeast to mammals. *Hum Mol Genet* **4 Spec No**: 1765-1777.
- Hotchkiss, R.D. 1948. THE QUANTITATIVE SEPARATION OF PURINES, PYRIMIDINES, AND NUCLEOSIDES BY PAPER CHROMATOGRAPHY. *Journal of Biological Chemistry* **175**(1): 315-332.
- Howlett, S.K. and Reik, W. 1991. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* **113**(1): 119-127.
- Hu, J.F., Pham, J., Dey, I., Li, T., Vu, T.H., and Hoffman, A.R. 2000. Allele-specific histone acetylation accompanies genomic imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene. *Endocrinology* **141**(12): 4428-4435.
- Jaenisch, R. and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**(5532): 1074-1080.
- Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A., and Cheng, X. 2007. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**(7159): 248-251.
- Jin, S.G., Guo, C., and Pfeifer, G.P. 2008. GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet* **4**(3): e1000013.
- Jones, P.A. and Baylin, S.B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**(6): 415-428.
- Jost, J.P. 1993. Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10): 4684-4688.
- Jost, J.P. and Jost, Y.C. 1994. Transient DNA demethylation in differentiating mouse myoblasts correlates with higher activity of 5-methyldeoxycytidine excision repair. *J Biol Chem* **269**(13): 10040-10043.
- Jost, J.P., Oakeley, E.J., Zhu, B., Benjamin, D., Thiry, S., Siegmann, M., and Jost, Y.C. 2001. 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation. *Nucleic Acids Res* **29**(21): 4452-4461.
- Jost, J.P., Schwarz, S., Hess, D., Angliker, H., Fuller-Pace, F.V., Stahl, H., Thiry, S., and Siegmann, M. 1999. A chicken embryo protein related to the mammalian DEAD box protein p68 is tightly associated with the highly purified protein-RNA complex of 5-MeC-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* **27**(16): 3245-3252.
- Jost, J.P., Siegmann, M., Sun, L., and Leung, R. 1995. Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* **270**(17): 9734-9739.
- Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F., and Reid, G. 2008. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**(7183): 112-115.
- Kornberg, R.D. 1977. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* **46**: 931-954.
- Kunkel, T.A. and Diaz, M. 2002. Enzymatic cytosine deamination: friend and foe. *Mol Cell* **10**(5): 962-963.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., and Reik, W. 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* **35**(2): 88-93.
- Lawson, K.A. and Hage, W.J. 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* **182**: 68-84; discussion 84-91.
- Lee, J.E., Pintar, J., and Efstratiadis, A. 1990. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* **110**(1): 151-159.
- Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M., and Feinberg, A.P. 1999. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5203-5208.

- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, A.H. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**(14): 1192-1200.
- Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**(5): 865-873.
- Lepikhov, K. and Walter, J. 2004. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol* **4**: 12.
- Lewis, A., Mitsuya, K., Umlauf, D., Smith, P., Dean, W., Walter, J., Higgins, M., Feil, R., and Reik, W. 2004. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* **36**(12): 1291-1295.
- Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**(6453): 362-365.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**(6): 915-926.
- Li, J.Y., Lees-Murdock, D.J., Xu, G.L., and Walsh, C.P. 2004. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* **84**(6): 952-960.
- Liang, G., Chan, M.F., Tomigahara, Y., Tsai, Y.C., Gonzales, F.A., Li, E., Laird, P.W., and Jones, P.A. 2002. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* **22**(2): 480-491.
- Loenen, W.A. 2006. S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochemical Society transactions* **34**(Pt 2): 330-333.
- Lubinsky, M.S. and Hall, J.G. 1991. Genomic imprinting, monozygous twinning, and X inactivation. *Lancet* **337**(8752): 1288.
- Lueders, K.K. and Kuff, E.L. 1977. Sequences associated with intracisternal A particles are reiterated in the mouse genome. *Cell* **12**(4): 963-972.
- Mancini-Dinardo, D., Steele, S.J., Levorse, J.M., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. 2006. Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev* **20**(10): 1268-1282.
- Matsuoka, S., Thompson, J.S., Edwards, M.C., Bartletta, J.M., Grundy, P., Kalikin, L.M., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Feinberg, A.P. 1996. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 3026-3030.
- McGrath, J. and Solter, D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**(1): 179-183.
- McLaren, A. 2000. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* **163**(1-2): 3-9.
- . 2001. Mammalian germ cells: birth, sex, and immortality. *Cell Struct Funct* **26**(3): 119-122.
- Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F., and Salbert, G. 2008. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**(7183): 45-50.
- Mill, J., Dempster, E., Caspi, A., Williams, B., Moffitt, T., and Craig, I. 2006. Evidence for monozygotic twin (MZ) discordance in methylation level at two CpG sites in the promoter region of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **141**(4): 421-425.
- Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yoshida, M.A., Niikawa, N., Feinberg, A.P., and Oshimura, M. 1999. LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum Mol Genet* **8**(7): 1209-1217.
- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* **240**(2): 488-498.
- Monk, M., Boubelik, M., and Lehnert, S. 1987. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99**(3): 371-382.
- Morey, C. and Avner, P. 2004. Employment opportunities for non-coding RNAs. *FEBS Lett* **567**(1): 27-34.
- Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S.K. 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* **279**(50): 52353-52360.
- Nakano, S., Murakami, K., Meguro, M., Soejima, H., Higashimoto, K., Urano, T., Kugoh, H., Mukai, T., Ikeguchi, M., and Oshimura, M. 2006. Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Sci* **97**(11): 1147-1154.

- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., and Bird, A. 1999. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* **23**(1): 58-61.
- Nguyen, C.T., Weisenberger, D.J., Velicescu, M., Gonzales, F.A., Lin, J.C., Liang, G., and Jones, P.A. 2002. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **62**(22): 6456-6461.
- O'Neill, M.J. 2005. The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R113-120.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., Saitou, M., and Surani, M.A. 2005. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* **436**(7048): 207-213.
- Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T., and Zhang, Y. 2010. A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* **463**(7280): 554-558.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-257.
- Okano, M., Xie, S., and Li, E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**(3): 219-220.
- Olek, A. and Walter, J. 1997. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet* **17**(3): 275-276.
- Olsen, C.M. and Marky, L.A. 2009. Energetic and hydration contributions of the removal of methyl groups from thymine to form uracil in G-quadruplexes. *The journal of physical chemistry* **113**(1): 9-11.
- Ooi, S.K. and Bestor, T.H. 2008. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**(7): 1145-1148.
- Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., Cheng, X., and Bestor, T.H. 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**(7154): 714-717.
- Orstavik, R.E., Tommerup, N., Eiklid, K., and Orstavik, K.H. 1995. Non-random X chromosome inactivation in an affected twin in a monozygotic twin pair discordant for Wiedemann-Beckwith syndrome. *American journal of medical genetics* **56**(2): 210-214.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. 2000. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**(8): 475-478.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S., and Fischer, R.L. 2007. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(16): 6752-6757.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol* **14**(14): R546-551.
- Prawitt, D., Enklaar, T., Gartner-Rupprecht, B., Spangenberg, C., Oswald, M., Lausch, E., Schmidtke, P., Reutzel, D., Fees, S., Lucito, R., Korzon, M., Brozek, I., Limon, J., Housman, D.E., Pelletier, J., and Zabel, B. 2005. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(11): 4085-4090.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., and Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4): 856-862.
- Reik, W., Collick, A., Norris, M.L., Barton, S.C., and Surani, M.A. 1987. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* **328**(6127): 248-251.
- Reik, W., Constancia, M., Dean, W., Davies, K., Bowden, L., Murrell, A., Feil, R., Walter, J., and Kelsey, G. 2000. Igf2 imprinting in development and disease. *Int J Dev Biol* **44**(1): 145-150.
- Santi, D.V., Garrett, C.E., and Barr, P.J. 1983. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* **33**(1): 9-10.
- Santos, F. and Dean, W. 2004. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* **127**(6): 643-651.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., and Dean, W. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **241**(1): 172-182.
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W., and Dean, W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* **13**(13): 1116-1121.
- Sapienza, C., Peterson, A.C., Rossant, J., and Balling, R. 1987. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. *Nature* **328**(6127): 251-254.
- Scaria, V., Hariharan, M., Arora, A., and Maiti, S. 2006. Quadfinder: server for identification and analysis of quadruplex-forming motifs in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server issue): W683-685.

- Schmitz, K.M., Schmitt, N., Hoffmann-Rohrer, U., Schafer, A., Grummt, I., and Mayer, C. 2009. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell* **33**(3): 344-353.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* **278**(2): 440-458.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Saitou, M. 2007. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* **134**(14): 2627-2638.
- Shen, J.C., Rideout, W.M., 3rd, and Jones, P.A. 1992. High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell* **71**(7): 1073-1080.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., and Casero, R.A. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-953.
- Shklover, J., Weisman-Shomer, P., Yafe, A., and Fry, M. 2010. Quadruplex structures of muscle gene promoter sequences enhance in vivo MyoD-dependent gene expression. In, pp. gkp1208.
- Sieberts, S.K., Wijsman, E.M., and Thompson, E.A. 2002. Relationship inference from trios of individuals, in the presence of typing error. *Am J Hum Genet* **70**(1): 170-180.
- Simonsson, S. and Gurdon, J. 2004. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol* **6**(10): 984-990.
- Smilnich, N.J., Day, C.D., Fitzpatrick, G.V., Caldwell, G.M., Lossie, A.C., Cooper, P.R., Smallwood, A.C., Joyce, J.A., Schofield, P.N., Reik, W., Nicholls, R.D., Weksberg, R., Driscoll, D.J., Maher, E.R., Shows, T.B., and Higgins, M.J. 1999. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8064-8069.
- Smith, A.C., Rubin, T., Shuman, C., Estabrooks, L., Aylsworth, A.S., McDonald, M.T., Steele, L., Ray, P.N., and Weksberg, R. 2006. New chromosome 11p15 epigenotypes identified in male monozygotic twins with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Cytogenet Genome Res* **113**(1-4): 313-317.
- Stein, R., Gruenbaum, Y., Pollack, Y., Razin, A., and Cedar, H. 1982. Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(1): 61-65.
- Stief, A., Winter, D.M., Stratling, W.H., and Sippel, A.E. 1989. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* **341**(6240): 343-345.
- Surani, M.A., Barton, S.C., and Norris, M.L. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**(5959): 548-550.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., and Rao, A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**(5929): 930-935.
- Tam, P.P. and Snow, M.H. 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* **64**: 133-147.
- Tamaru, H. and Selker, E.U. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**(6861): 277-283.
- Trievel, R.C. 2004. Structure and function of histone methyltransferases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**(3): 147-169.
- Turner, B.M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**(3): 285-291.
- Tycko, B. and Morison, I.M. 2002. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol* **192**(3): 245-258.
- Ueda, Y., Okano, M., Williams, C., Chen, T., Georgopoulos, K., and Li, E. 2006. Roles for Dnmt3b in mammalian development: a mouse model for the ICF syndrome. *Development* **133**(6): 1183-1192.
- Van Speybroeck, L. 2002. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci* **981**: 61-81.
- Varmuza, S. and Mann, M. 1994. Genomic imprinting--defusing the ovarian time bomb. *Trends Genet* **10**(4): 118-123.
- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., and Wolffe, A.P. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**(1): 62-66.
- Walter, J. and Paulsen, M. 2003. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol* **14**(1): 101-110.
- Warnecke, P.M., Mann, J.R., Frommer, M., and Clark, S.J. 1998. Bisulfite sequencing in preimplantation embryos: DNA methylation profile of the upstream region of the mouse imprinted H19 gene. *Genomics* **51**(2): 182-190.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T.

- Church, D.M. Clamp, M. Clee, C. Collins, F.S. Cook, L.L. Copley, R.R. Coulson, A. Couronne, O. Cuff, J. Curwen, V. Cutts, T. Daly, M. David, R. Davies, J. Delehaunty, K.D. Deri, J. Dermitzakis, E.T. Dewey, C. Dickens, N.J. Diekhans, M. Dodge, S. Dubchak, I. Dunn, D.M. Eddy, S.R. Elnitski, L. Emes, R.D. Eswara, P. Eyra, E. Felsenfeld, A. Fewell, G.A. Flicek, P. Foley, K. Frankel, W.N. Fulton, L.A. Fulton, R.S. Furey, T.S. Gage, D. Gibbs, R.A. Glusman, G. Gnerre, S. Goldman, N. Goodstadt, L. Grafham, D. Graves, T.A. Green, E.D. Gregory, S. Guigo, R. Guyer, M. Hardison, R.C. Haussler, D. Hayashizaki, Y. Hillier, L.W. Hinrichs, A. Hlavina, W. Holzer, T. Hsu, F. Hua, A. Hubbard, T. Hunt, A. Jackson, I. Jaffe, D.B. Johnson, L.S. Jones, M. Jones, T.A. Joy, A. Kamal, M. Karlsson, E.K. Karolchik, D. Kasprzyk, A. Kawai, J. Keibler, E. Kells, C. Kent, W.J. Kirby, A. Kolbe, D.L. Korf, I. Kucherlapati, R.S. Kulbokas, E.J. Kulp, D. Landers, T. Leger, J.P. Leonard, S. Letunic, I. Levine, R. Li, J. Li, M. Lloyd, C. Lucas, S. Ma, B. Maglott, D.R. Mardis, E.R. Matthews, L. Mauceli, E. Mayer, J.H. McCarthy, M. McCombie, W.R. McLaren, S. McLay, K. McPherson, J.D. Meldrim, J. Meredith, B. Mesirov, J.P. Miller, W. Miner, T.L. Mongin, E. Montgomery, K.T. Morgan, M. Mott, R. Mullikin, J.C. Muzny, D.M. Nash, W.E. Nelson, J.O. Nhan, M.N. Nicol, R. Ning, Z. Nusbaum, C. O'Connor, M.J. Okazaki, Y. Oliver, K. Overton-Larty, E. Pachter, L. Parra, G. Pepin, K.H. Peterson, J. Pevzner, P. Plumb, R. Pohl, C.S. Poliakov, A. Ponce, T.C. Ponting, C.P. Potter, S. Quail, M. Raymond, A. Roe, B.A. Roskin, K.M. Rubin, E.M. Rust, A.G. Santos, R. Sapojnikov, V. Schultz, B. Schultz, J. Schwartz, M.S. Schwartz, S. Scott, C. Seaman, S. Searle, S. Sharpe, T. Sheridan, A. Showkeen, R. Sims, S. Singer, J.B. Slater, G. Smit, A. Smith, D.R. Spencer, B. Stabenau, A. Stange-Thomann, N. Sugnet, C. Suyama, M. Tesler, G. Thompson, J. Torrents, D. Trevaskis, E. Tromp, J. Ucla, C. Ureta-Vidal, A. Vinson, J.P. Von Niederhausern, A.C. Wade, C.M. Wall, M. Weber, R.J. Weiss, R.B. Wendl, M.C. West, A.P. Wetterstrand, K. Wheeler, R. Whelan, S. Wierzbowski, J. Willey, D. Williams, S. Wilson, R.K. Winter, E. Worley, K.C. Wyman, D. Yang, S. Yang, S.P. Zdobnov, E.M. Zody, M.C. and Lander, E.S. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**(6915): 520-562.
- Weiss, A., Keshet, I., Razin, A., and Cedar, H. 1996. DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell* **86**(5): 709-718.
- Weksberg, R., Nishikawa, J., Caluseriu, O., Fei, Y.L., Shuman, C., Wei, C., Steele, L., Cameron, J., Smith, A., Ambus, I., Li, M., Ray, P.N., Sadowski, P., and Squire, J. 2001. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet* **10**(26): 2989-3000.
- Weksberg, R., Shuman, C., Caluseriu, O., Smith, A.C., Fei, Y.L., Nishikawa, J., Stockley, T.L., Best, L., Chitayat, D., Olney, A., Ives, E., Schneider, A., Bestor, T.H., Li, M., Sadowski, P., and Squire, J. 2002. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* **11**(11): 1317-1325.
- Weksberg, R., Shuman, C., and Smith, A.C. 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **137**(1): 12-23.
- Wiedemann, H.R. 1964. [Familial Malformation Complex with Umbilical Hernia and Macroglossia--a "New Syndrome"?]. *J Genet Hum* **13**: 223-232.
- Wilhelm, J. and Pingoud, A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* **4**(11): 1120-1128.
- Wilkins, J.F. and Haig, D. 2003. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat Rev Genet* **4**(5): 359-368.
- Wu, S.C. and Zhang, Y. 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 607-620.
- Xin, Z., Allis, C.D., and Wagstaff, J. 2001. Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at the Prader-Willi syndrome imprinting center. *Am J Hum Genet* **69**(6): 1389-1394.
- Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., and Saitou, M. 2006. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* **75**(5): 705-716.
- Yamazaki, Y., Low, E.W., Marikawa, Y., Iwahashi, K., Bartolomei, M.S., McCarrey, J.R., and Yanagimachi, R. 2005. Adult mice cloned from migrating primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11361-11366.
- Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H.R. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**(3): 881-894.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**(18): 2343-2360.
- Zhang, Y. and Tycko, B. 1992. Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet* **1**(1): 40-44.

- Zhang, Y.L., Chen, T., Jiang, Y., Zhong, Z.S., Liu, S.Z., Hou, Y., Schatten, H., Chen, D.Y., and Sun, Q.Y. 2005. Active demethylation of individual genes in intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* **72**(4): 530-533.
- Zhu, B., Benjamin, D., Zheng, Y., Angliker, H., Thiry, S., Siegmann, M., and Jost, J.P. 2001. Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5031-5036.
- Zhu, B., Zheng, Y., Angliker, H., Schwarz, S., Thiry, S., Siegmann, M., and Jost, J.P. 2000. 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* **28**(21): 4157-4165.

6 Anhang

6.1 Tabellen zur Auswertung der Lit1 Sequenzen

Tabelle 20: Auszählung der für die Methylierungsanalyse des Lit1 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen des Vaters.

Vater	
Anzahl Klone	25
Anzahl der analysierten CpGs	644
Konvertierungsrate gesamt	97,01
Anzahl M Klone gesamt	9
Anzahl M Klone mit Abweichung	1
Anzahl M Positionen in M Klonen	229
Anzahl U Positionen in M Klonen	1
Konvertierungsrate in M Klonen	97,12
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	621
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	22
Anzahl U Klone gesamt	16
Anzahl U Klone mit Abweichung	5
Anzahl U Positionen in U Klonen	409
Anzahl M Positionen in U Klonen	5
Konvertierungsrate in U Klonen	97,31
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	1116
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	30

Tabelle 21: Auszählung der für die Methylierungsanalyse des Lit1 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen der Mutter.

Mutter	
Anzahl Klone	33
Anzahl der analysierten CpGs	855
Konvertierungsrate gesamt	96,60
Anzahl M Klone gesamt	22
Anzahl M Klone mit Abweichung	5
Anzahl M Positionen in M Klonen	566
Anzahl U Positionen in M Klonen	6
Konvertierungsrate in M Klonen	96,55
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	1536
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	53
Anzahl U Klone gesamt	11
Anzahl U Klone mit Abweichung	6
Anzahl U Positionen in U Klonen	275
Anzahl M Positionen in U Klonen	8
Konvertierungsrate in U Klonen	96,71
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	759
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	25

Tabelle 22: Auszählung der für die Methylierungsanalyse des Lit1 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen des erkrankten Zwillings.

Erkrankter Zwilling	
Anzahl Klone	31
Anzahl der analysierten CpGs	805
Konvertierungsrate gesamt	96,72
Anzahl M Klone gesamt	5
Anzahl M Klone mit Abweichung	0
Anzahl M Positionen in M Klonen	130
Anzahl U Positionen in M Klonen	0
Konvertierungsrate in M Klonen	95,99
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	349
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	14
Anzahl U Klone gesamt	16
Anzahl U Klone mit Abweichung	12
Anzahl U Positionen in U Klonen	658
Anzahl M Positionen in U Klonen	17
Konvertierungsrate in U Klonen	96,86
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	1818
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	57

Tabelle 23: Auszählung der für die Methylierungsanalyse des Lit1 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen des gesunden Zwillings.

Gesunder Zwilling	
Anzahl Klone	36
Anzahl der analysierten CpGs	932
Konvertierungsrate gesamt	97,12
Anzahl M Klone gesamt	4
Anzahl M Klone mit Abweichung	1
Anzahl M Positionen in M Klonen	103
Anzahl U Positionen in M Klonen	1
Konvertierungsrate in M Klonen	96,30
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	270
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	10
Anzahl U Klone gesamt	32
Anzahl U Klone mit Abweichung	19
Anzahl U Positionen in U Klonen	799
Anzahl M Positionen in U Klonen	29
Konvertierungsrate in U Klonen	97,22
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	2233
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	62

Tabelle 24: Auszählung der für die Methylierungsanalyse des Lit1 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen der Tochter.

Tochter	
Anzahl Klone	23
Anzahl der analysierten CpGs	593
Konvertierungsrate gesamt	96,07
Anzahl M Klone gesamt	12
Anzahl M Klone mit Abweichung	1
Anzahl M Positionen in M Klonen	308
Anzahl U Positionen in M Klonen	1
Konvertierungsrate in M Klonen	96,41
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	836
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	30
Anzahl U Klone gesamt	11
Anzahl U Klone mit Abweichung	8
Anzahl U Positionen in U Klonen	271
Anzahl M Positionen in U Klonen	13
Konvertierungsrate in U Klonen	95,71
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	769
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	33

6.2 Tabellen zur Auswertung der H19 CTCF Sequenzen

Tabelle 25: Auszählung der für die Methylierungsmusteranalyse der sechsten CTCF Bindestelle des H19 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen des Familienvaters.

Vater	
Anzahl Klone	15
Anzahl der analysierten CpGs	253
Konvertierungsrate gesamt	97,75
Anzahl M Klone gesamt	8
Anzahl M Klone mit Abweichung	2
Anzahl M Positionen in M Klonen	134
Anzahl U Positionen in M Klonen	2
Konvertierungsrate in M Klonen	97,12
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	304
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	9
Anzahl U Klone gesamt	7
Anzahl U Klone mit Abweichung	2
Anzahl U Positionen in U Klonen	113
Anzahl M Positionen in U Klonen	4
Konvertierungsrate in U Klonen	98,53
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	273
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	4

Tabelle 26: Auszählung der für die Methylierungsmusteranalyse der sechsten CTCF Bindestelle des H19 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen der Mutter.

Mutter	
Anzahl Klone	29
Anzahl der analysierten CpGs	493
Konvertierungsrate gesamt	95,91
Anzahl M Klone gesamt	16
Anzahl M Klone mit Abweichung	2
Anzahl M Positionen in M Klonen	269
Anzahl U Positionen in M Klonen	3
Konvertierungsrate in M Klonen	95,39
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	607
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	28
Anzahl U Klone gesamt	13
Anzahl U Klone mit Abweichung	8
Anzahl U Positionen in U Klonen	209
Anzahl M Positionen in U Klonen	12
Konvertierungsrate in U Klonen	96,56
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	494
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	17

Tabelle 27: Auszählung der für die Methylierungsmusteranalyse der sechsten CTCF Bindestelle des H19 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen des erkrankten Zwilling.

Erkrankter Zwilling	
Anzahl Klone	35
Anzahl der analysierten CpGs	595
Konvertierungsrate gesamt	96,46
Anzahl M Klone gesamt	10
Anzahl M Klone mit Abweichung	2
Anzahl M Positionen in M Klonen	168
Anzahl U Positionen in M Klonen	2
Konvertierungsrate in M Klonen	94,74
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	380
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	20
Anzahl U Klone gesamt	25
Anzahl U Klone mit Abweichung	17
Anzahl U Positionen in U Klonen	405
Anzahl M Positionen in U Klonen	20
Konvertierungsrate in U Klonen	97,15
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	949
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	27

Tabelle 28: Auszählung der für die Methylierungsmusteranalyse der sechsten CTCF Bindestelle des H19 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen des gesunden Zwilling.

Gesunder Zwilling	
Anzahl Klone	24
Anzahl der analysierten CpGs	405
Konvertierungsrate gesamt	95,39
Anzahl M Klone gesamt	14
Anzahl M Klone mit Abweichung	3
Anzahl M Positionen in M Klonen	234
Anzahl U Positionen in M Klonen	3
Konvertierungsrate in M Klonen	95,67
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	531
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	23
Anzahl U Klone gesamt	10
Anzahl U Klone mit Abweichung	5
Anzahl U Positionen in U Klonen	159
Anzahl M Positionen in U Klonen	9
Konvertierungsrate in U Klonen	95,00
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	380
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	19

Tabelle 29: Auszählung der für die Methylierungsmusteranalyse der sechsten CTCF Bindestelle des H19 Gens aus Blut DNA analysierten Sequenzen der Tochter.

Tochter	
Anzahl Klone	39
Anzahl der analysierten CpGs	662
Konvertierungsrate gesamt	96,81
Anzahl M Klone gesamt	14
Anzahl M Klone mit Abweichung	3
Anzahl M Positionen in M Klonen	232
Anzahl U Positionen in M Klonen	6
Konvertierungsrate in M Klonen	95,10
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	531
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	26
Anzahl U Klone gesamt	25
Anzahl U Klone mit Abweichung	16
Anzahl U Positionen in U Klonen	405
Anzahl M Positionen in U Klonen	19
Konvertierungsrate in U Klonen	97,77
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	942
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	21

6.3 Tabellen zur Auswertung der H19 Smal Sequenzen

Tabelle 30: Ergebnisse der Sequenzanalyse des H19 Smal PCR Produkts für den erkrankten Zwilling.

Erkrankter Zwilling	
Anzahl Klone	13
Anzahl der analysierten CpGs	182
Konvertierungsrate gesamt	95,55
Anzahl M Klone gesamt	7
Anzahl M Klone mit Abweichung	1
Anzahl M Positionen in M Klonen	97
Anzahl U Positionen in M Klonen	1
Konvertierungsrate in M Klonen	94,92
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	315
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	16
Anzahl U Klone gesamt	6
Anzahl U Klone mit Abweichung	6
Anzahl U Positionen in U Klonen	74
Anzahl M Positionen in U Klonen	10
Konvertierungsrate in U Klonen	96,28
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	269
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	10

Tabelle 31: Ergebnisse der Sequenzanalyse des H19 Smal PCR Produkts für den gesunden Zwilling.

Gesunder Zwilling	
Anzahl Klone	12
Anzahl der analysierten CpGs	165
Konvertierungsrate gesamt	94,41
Anzahl M Klone gesamt	5
Anzahl M Klone mit Abweichung	1
Anzahl M Positionen in M Klonen	69
Anzahl U Positionen in M Klonen	1
Konvertierungsrate in M Klonen	94,81
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	270
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	14
Anzahl U Klone gesamt	6
Anzahl U Klone mit Abweichung	6
Anzahl U Positionen in U Klonen	68
Anzahl M Positionen in U Klonen	13
Konvertierungsrate in U Klonen	94,01
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	267
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	16
Anzahl nicht zu klassifizierender Klone	1

Tabelle 32: Ergebnisse der genauen Sequenzanalyse des H19 Smal PCR Produkts für die Tochter

Tochter	
Anzahl Klone	13
Anzahl der analysierten CpGs	172
Konvertierungsrate gesamt	95,19573
Anzahl M Klone gesamt	8
Anzahl M Klone mit Abweichung	2
Anzahl M Positionen in M Klonen	107
Anzahl U Positionen in M Klonen	3
Konvertierungsrate in M Klonen	95,76271
Anzahl nicht-CpG Cs in M Klonen	354
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in M Klonen	15
Anzahl U Klone gesamt	5
Anzahl U Klone mit Abweichung	5
Anzahl U Positionen in U Klonen	51
Anzahl M Positionen in U Klonen	11
Konvertierungsrate in U Klonen	94,23077
Anzahl nicht-CpG Cs in U Klonen	208
Anzahl nicht konvertierter nicht-CpG Cs in U Klonen	12