

Verteilung der fünften DNA–Base
5–Methyl–Desoxycytidin im Säuger genom:
DNA–Methylierungsmuster endogener retroviraler
Sequenzen des Syrischen Hamsters (*Mesocricetus
auratus*) und in den Promotoren menschlicher
Erythrozytenmembranskelettproteine (*Homo sapiens*)

Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
an der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Ralph Remus
aus Köln

Köln 2000

Berichtersteller:

Professor Dr. Walter Doerfler

Professor Dr. Börries Kemper

Professor Dr. Dr. Yoshihito Yawata

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2000

Für Christine

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1. DNA–Methylierung	1
1.1 DNA–Methylierung in Prokaryonten	1
1.2 DNA–Methylierung in Eukaryonten	2
1.3 Bedeutung der DNA–Methylierung	2
1.4 Methylierung und transkriptionelle Aktivität	4
1.5 Auswirkungen von Methylierungsänderungen	5
2. Auswirkungen der Integration von Fremd–DNA	6
2.1 Adenovirus Typ 12–transgene Hamsterzellen	6
2.2 Intrazisternale A–Partikel	7
3. Erythrozyten	8
3.1 Aufbau der Erythrozytenmembran	9
4. Zielsetzung der Arbeit	11
II. Material	12
1. Chemikalien	12
2. Sonstiges Verbrauchsmaterial	14
3. Laborgeräte	15
4. Oligodesoxyribonukleotide	16
5. Verwendete Zelllinien	17
6. Bakterienstamm	17
7. Enzyme	18
8. DNAs	18
9. Kits	18
10. Puffer und Lösungen	18
III. Methoden	21
1. Genomisches Sequenzieren nach der Bisulfit–Methode	21
1.1 Bisulfit–Behandlung von genomischer DNA	21
1.2 Polymerase–Ketten–Reaktion	22
1.3 Aufreinigung der PCR–Produkte	23
2. Klonierung von PCR–Produkten	23
2.1 Ligation	23
2.2 Transformation	23
2.2.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	23
2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	24
3. Plasmid–Präparation	24

4. Restriktionsanalyse der präparierten Plasmide	24
4.1 Restriktionsspaltung	25
4.2 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	25
4.3 Ammoniumacetat-Präzipitation	25
5. Sequenzierung	25
6. Auswertung der Sequenzen	26
7. Reverse Transkription (RT)-PCR	26
IV. Ergebnisse	27
1. Ergebnisse der Diplomarbeit	28
2. Genomisches Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode	30
2.1 Chemischer Hintergrund der Bisulfit-Behandlung	30
2.2 Vorteile dieser Technik gegenüber herkömmlichen Methylierungsanalysen	31
2.3 Bestimmung der Methylierungsgrade	32
3. Methylierungsmuster der IAP I-Gene	33
3.1 Abweichungen zu der publizierten IAP-Sequenz	33
3.2 Auswertung der IAP I-Sequenzen	36
3.3 Vergleich der transgenen Zelllinien	36
3.4 Variabilität des Methylierungsgrads in subklonierten BHK21-Zelllinien	40
4. Der Methylierungsstatus in den Promotoren von drei menschlichen Genen	42
4.1 Die Zelllinie UT-7	42
4.2 Kultivierte Erythroblasten	43
4.3 Nicht-erythroide Zelllinien	43
4.4 Patienten	43
4.5 Familienangehörige	44
4.6 Kontrollpersonen	45
4.7 DNA-Methylierung im Promotor des β -Spectrin-Gens (SPTB)	46
4.8 Methylierungsstatus des AE1-Gens EPB3 (Promotor und Exon 1)	46
4.9 Methylierungsstatus im Promotor und Exon 1 des Pallidin-Gens ELB42	50
5. Expression der erythroiden Gene	53
V. Diskussion	55
1. Auswirkungen der Integration fremder DNA	55
2. Methylierungsstatus der erythroiden Promotoren	57
3. Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit	59
VI. Zusammenfassung	61
VII. Summary	64
VIII. Literatur	66

Abbildungen

Abbildungen		Seite
Abb. 1	Karyotyp einer BHK21-Zelle	8
Abb. 2	Modell der Erythrozytenmembran	9
Abb. 3	Analyse Bisulfit-behandelter DNA	22
Abb. 4	Die Methylierungsmuster der IAP I-Gene sind in den BHK21-Klonen und der BHK21-Zelllinie identisch	29
Abb. 5	Genomisches Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode	30
Abb. 6	Auswertung der Sequenzdaten	32
Abb. 7	Verteilung der 5'-CG-3'-Dinukleotide im untersuchten IAP I-Fragment	34
Abb. 8	Karte der IAP I-Region	35
Abb. 9	Vergleich der DNA-Methylierungsgrade der transgenen Zelllinien und der Ursprungszelllinie BHK21	39
Abb. 10	Die verwendeten UT-7-Zelllinien	42
Abb. 11	Expression der Gene EPB3 und ELB42	54

Tabellen

Tabellen		Seite
Tab. 1	Humane Erythrozytenmembranproteine	10
Tab. 2	Die verwendeten Primer	16
Tab. 3	Zelllinien	33
Tab. 4	DNA-Methylierung der einzelnen 5'-CG-3'-Dinukleotide in den transgenen Zelllinien und der Ursprungszelllinie BHK21	37
Tab. 5	Zur Ursprungszelllinie BHK21 relativierte Methylierung der 5'-CG-3'-Dinukleotide in den transgenen Zelllinien	38
Tab. 6	Zur Ursprungszelllinie BHK21 relativierte Methylierung der 5'-CG-3'-Dinukleotide in den subklonierten BHK21-Zelllinien und der Zelllinie T637	41
Tab. 7	Liste der Patienten mit Störungen im Erythrozytenmembranskelett	44
Tab. 8	Liste der Familienangehörigen und anderen Kontrollpersonen	45
Tab. 9	Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der Erythroblastenkultur und der verschiedenen Zelllinien	47
Tab. 10	Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der Kontrollpersonen und der Spermien-DNA	48
Tab. 11	Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der Patienten	49
Tab. 12	Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der heterozygoten Mutationsträger	49
Tab. 13	Methylierungsstatus der 5'-Region des ELB42-Gens in DNAs der Erythroblastenkultur und der UT-7-Zelllinien	50
Tab. 14	Methylierungsstatus der 5'-Region des ELB42-Gens in DNAs von Patienten, heterozygoten Mutationsträgern und Kontrollpersonen	51
Tab. 15	Methylierungsstatus der vier 5'-CG-3'-Dinukleotide des ELB42-Promotors in DNAs der Erythroblastenkultur und der UT-7-Zelllinien	51
Tab. 16	Methylierungsstatus der vier 5'-CG-3'-Dinukleotide des ELB42-Promotors in DNAs von Patienten, heterozygoten Mutationsträgern und Kontrollpersonen	52

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
A	Desoxyadenin
Abb.	Abbildung
Ad12	Adenovirus Typ 12
ADPRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
BFU-E	erythroide „blast-forming unit“
Bp	Basenpaar(e)
C	Desoxycytidin
CFU-E	erythroide „colony-forming unit“
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Gemisch der vier Desoxyribonukleotide
EPO	Erythropoetin
et al.	und andere (Autoren)
G	Desoxyguanosin
GM-CSF	Kolonie-stimulierender Faktor für Granulozyten und Makrophagen
H	Heterozygoter Proband
H ₂ O	doppelt destilliertes und autoklaviertes Wasser
IAP	Intrazisternales A-Partikel
IAP I	Intrazisternales A-Partikel, Segment I
K	Kontrollperson mit normalen Phänotyp
kBp	Kilobasenpaar(e)
M	molar
M.	Methyltransferase
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
ml	Milliliter
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n.a.	nicht auswertbar
ng	Nanogramm
O.D. ₅₅₀	Extinktion bei der Wellenlänge von 550 nm
P	Patient
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT-PCR	PCR nach Reverser Transkription von RNA in DNA
S	aus Spermien gewonnene DNA
T	Desoxythymidin
Tab.	Tabelle
xg	-fache Erdbeschleunigung

I. Einleitung

1. DNA-Methylierung

Im Erbgut von Pro- und Eukaryonten liegen neben den vier bekannten Nukleotiden auch sogenannte modifizierte DNA-Basen vor. Obwohl diese nur einen geringen Anteil an der Gesamtmenge ausmachen, üben sie doch einen entscheidenden Einfluß auf regulatorische Funktionen und bei der Erkennung von „fremder“ DNA aus. Die häufigste Modifikation ist die nachträgliche Übertragung einer Methylgruppe auf bereits in die DNA eingebaute Nukleotide. Diese Reaktion wird durch Enzyme katalysiert, die als DNA-Methyltransferasen bezeichnet werden.

1.1 DNA-Methylierung in Prokaryonten

Das Bakterium *Escherichia coli* besitzt im Wildtyp mehrere DNA-Methyltransferasen. Eine von ihnen (*M. Eco dam I*) erkennt die Sequenz 5'-GATC-3' und methyliert das darin enthaltene Desoxyadenin an der N6-Position des Purinringes, eine andere (*M. Eco dcm I*) wandelt in der Sequenz 5'-CC(A/T)GG-3' das außen gelegene Desoxycytidin in 5-Methyl-Desoxycytidin um. Dieselbe Sequenz wird auch von der Restriktionsendonuklease *Eco RII* erkannt, deren Aktivität durch diese Modifikation verhindert wird. In anderen Bakterien finden sich ebenfalls solche Restriktionssysteme. Als Beispiel können zwei Vertreter der Gattung *Haemophilus* dienen: Die Enzyme von *Haemophilus haemolyticus* erkennen die Sequenz 5'-GCGC-3' (*M. Hha I* und *Hha I*), während die von *Haemophilus parainfluenzae* spezifisch für 5'-CCGG-3' (*M. Hpa II* und *Hpa II*) sind. Beide Methyltransferasen modifizieren das innere Desoxycytidin, wodurch die korrespondierenden Restriktionsendonukleasen in ihrer Aktivität gehemmt werden. Die Restriktionsendonuklease *Msp I* (aus *Moraxella* spezie) erkennt dieselbe Sequenz wie *Hpa II*, spaltet im Gegensatz dazu aber auch methylierte DNA. Einen Überblick über sequenzspezifische Methylierungsdaten liefert McClelland et al. (1994). Durch dieses System von DNA-modifizierenden und DNA-spaltenden Enzymen sind Bakterien in der Lage, aus der Umgebung aufgenommene DNA abzubauen, ohne ihr eigenes Erbgut anzugreifen, da dieses durch Methylgruppen geschützt ist. Zusätzlich stellt dieses System eine wirksame Abwehr gegen Viren dar. Bakteriophagen-DNA trägt das Methylierungsmuster der Wirtszelle und kann daher von Bakterien anderer Spezie als „fremd“ erkannt und zerstört werden.

1.2 DNA-Methylierung in Eukaryonten

Eukaryontische DNA enthält als einzige modifizierte Base 5-Methyl-Desoxycytidin, das in der Regel in 5'-CG-3'-Dinukleotiden vorliegt. Dabei sind die Desoxycytidinreste dieses Dinukleotid-Paares in beiden Strängen symmetrisch methyliert (Riggs und Jones, 1983; Doerfler, 1981, 1983). Nicht alle diese Desoxycytidine liegen methyliert vor; vielmehr weist jeder DNA-Abschnitt ein spezifisches Muster von methylierten und nicht-methylierten Sequenzen auf. So sind im Säuger genom nur etwa 2 bis 7 %, in Pflanzen bis zu 30 % dieser Nukleotide methyliert. Das Dinukleotid 5'-CG-3' ist in der DNA von Vertebraten deutlich unterrepräsentiert (Subak-Sharpe et al., 1966; Russel et al., 1976); es ist lediglich mit 5 bis 10 % der erwarteten Häufigkeit zu finden. Die DNA der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* weist offenbar keine DNA-Methylierung auf (Urieli-Shoval et al., 1982; M. Zeschning, persönliche Mitteilung), im Gegensatz zu DNA der Kugelalge *Volvox*, die als einfachster vielzelliger Organismus angesehen wird. Von den darin enthaltenen Desoxycytidinen liegen etwa 1,15 % methyliert vor (Babinger, 1999). In pflanzlicher DNA ist zusätzlich eine 5'-CNG-3'-Methylierung bekannt, wobei das mittlere Nukleotid jede der vier Basen sein kann (Gruenbaum et al., 1981; Meyer et al., 1992). Es gibt auch Hinweise für das Vorhandensein dieser Art der Methylierung in Säugerzellen (Clark et al., 1995), wodurch frühere Beobachtungen bestätigt werden, denen zufolge 5-Methyl-Desoxycytidin auch benachbart zu anderen Basen vorliegen kann (Subak-Sharpe et al., 1966). Auch eine sogenannte Nicht-CpG-Methylierung wird diskutiert, da in seltenen Fällen 5-Methyl-Desoxycytidin im Kontext 5'-CT-3' oder 5'-CA-3' erscheint (Toth et al., 1990; Ramsahoye et al., 2000).

Zwei Arten der DNA-Methylierung sind zu unterscheiden. Nach der DNA-Replikation muß durch Methylierung des neu synthetisierten Stranges, der keine Methylierung aufweist, die Ausgangssituation wiederhergestellt werden. Durch diese sogenannte „Maintenance“-Methylierung hemimethylierter DNA ist die Weitergabe eines etablierten Methylierungsmusters an die Tochterzellen gewährleistet. Die Modifikation einer bisher in beiden Strängen unmethylierten DNA wird als *de novo*-Methylierung bezeichnet.

1.3 Bedeutung der DNA-Methylierung

Der Erhalt eines bestimmten Methylierungsmusters über viele Zellgenerationen muß für die Zelle von entscheidender Bedeutung sein, da dafür eine erhöhte Mutationsrate geduldet wird. Unter physiologischen Bedingungen desaminiert ein geringer Teil des in

der DNA enthaltenen Desoxycytidins zu Desoxyuridin. Deshalb existieren spezielle Reparatursysteme, die das in der DNA enthaltene Desoxyuridin erkennen, einen Teil des betroffenen DNA-Stranges herausschneiden und die entstandene Lücke durch neusynthetisierte DNA ersetzen. Bei der Desaminierung von 5-Methyl-Desoxycytidin entsteht jedoch das auch normalerweise in der DNA enthaltene Desoxythymidin, das nicht als fehlerhaft erkannt werden kann. Es wird in der nächsten Replikationsrunde mit Desoxyadenosin paaren, woraus sich dann eine Transition von Desoxycytidin nach Desoxythymidin und auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang von Desoxyguanosin nach Desoxyadenosin ergeben wird. Die so entstehenden Punktmutationen können nicht verhindert werden, wodurch es zu Verlusten an 5'-CG-3'-Dinukleotiden (Shen et al., 1992) kommt. Daß trotzdem 5'-CG-3'-Dinukleotide im Verlaufe der Evolution erhalten geblieben sind, zeigt ihre Bedeutung für die Zelle. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Methylierung während der Ontogenese liefern Untersuchungen an Knock out-Mäusen. In diesen Tieren führt das Fehlen der Methyltransferase dazu, daß sie bereits *in utero* sterben (Li et al., 1991).

Die *de novo*-Methylierung ist auch an der Inaktivierung weiter Bereiche auf einem der beiden X-Chromosomen in weiblichen Säugern beteiligt (Monk, 1990; Singer-Sam und Riggs, 1993). Bei Mäusen findet sich auf dem in somatischen Zellen inaktivierten X-Chromosom ein aktives Gen mit der Bezeichnung „Xist“, das an der Inaktivierung dieses Chromosoms beteiligt zu sein scheint. Dieses weist in den Gameten ein unterschiedliches Methylierungsmuster auf, je nachdem, ob es in Eizellen oder Spermien vorliegt (Norris et al., 1994; Ariel et al., 1995; Zucchotti und Monk, 1995). Dieser als „genomic imprinting“ bezeichnete Effekt ist auch in anderen DNA-Bereichen zu finden (Bartolomei, 1994). So wird das Gen für den „insulin-like growth factor 2“-Rezeptor geschlechtsspezifisch vererbt (Stöger et al., 1993; Feil et al., 1995). Bei Transgenen kann der Methylierungsstatus ebenfalls davon abhängen, von welchem Elternteil die Transgene stammen (Reik et al., 1987; Sapienza et al., 1987; Koetsier et al., 1996). Die homologen Chromosomen weisen in der Zygote aufgrund ihrer parentalen Herkunft in einigen Regionen ein unterschiedliches Methylierungsmuster auf (Surani et al., 1990).

Welche Bedeutung diese Unterschiede für den Organismus haben können, ist an zwei menschlichen Erbkrankheiten gezeigt worden. Eine Deletion auf dem paternalen Chromosom 15 im Bereich 15q11-13 führt zu dem Prader-Labhart-Willi-Syndrom. Ist der gleiche Bereich auf dem maternalen Chromosom deletiert, entsteht das davon vollkommen verschiedene Angelman-Syndrom (Reis et al., 1994). Im seltenen Fall

einer uniparentalen Disomie, in der beide homologe Chromosomen von einem Elternteil stammen, entsteht abhängig von ihrer Herkunft eines der beiden Syndrome. So löst beispielsweise das Vorhandensein von zwei maternalen Chromosomen 15 das Prader–Labhart–Willi–Syndrom aus, während durch das Vorliegen zweier paternalen Kopien das Angelman–Syndrom hervorgerufen wird. Also sind in Regionen, die einem „Imprinting“ unterliegen, die haploiden Genome der einzelnen Gameten nicht totipotent. Daß für die embryonale Entwicklung beide haploide Chromosomensätze nötig sind, ist bereits früh durch Rekonstitutionsexperimente an Eizellen von Mäusen gezeigt worden (Surani et al., 1984).

1.4 Methylierung und transkriptionelle Aktivität

Obwohl die Methylierungsmuster gleicher DNA–Bereiche in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sind, weisen sie doch zwischen verschiedenen Individuen oftmals eine sehr große Ähnlichkeit auf (Doerfler et al., 1990; Kochanek et al., 1990, 1991, 1993a; Behn–Krappa et al., 1991; Zeschnick et al., 1997; Remus et al., 2001). Demgegenüber weisen menschliche Tumore oftmals hypomethylierte Sequenzen auf (Chandler et al., 1986; Achten et al., 1991). Die Gesamtmenge an 5–Methyl–Desoxycytidin in Tumoren ist deutlich verringert (Feinberg und Vogelstein, 1983; Gama–Sosa et al., 1983), während im Bereich von Tumorsuppressorgenen in einzelnen Fällen auch eine Zunahme der Methylierung vorliegen kann (Greger et al., 1994).

Die statistisch unterrepräsentierten 5'–CG–3'–Dinukleotide (Subak–Sharpe et al., 1966; Russel et al., 1976) sind nicht gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt, sondern häufen sich in sogenannten CpG–Inseln. Diese Regionen sind definiert als Bereiche mit einem Gehalt von 55 bis 70 % an Desoxycytidin und Desoxyguanosin — verglichen mit einem Anteil von nur etwa 40 % im restlichen Genom. Sie befinden sich häufig in der Nähe von Promotorregionen und sind scheinbar wichtig für die Expression eines Gens (Bird, 1986; Craig und Bickmore, 1994). Die Promotoren gewebsspezifischer Gene liegen in den meisten Zelltypen methyliert vor, während die „house keeping“–Gene, die in allen Zellen exprimiert werden, vorwiegend unmethylierte CpG–Inseln aufweisen (Brandeis et al., 1994). Eine Zunahme der Methylierung in diesen Promotoren führt zur Verringerung der transkriptionellen Aktivität (Razin und Cedar, 1991). Die *de novo*–Methylierung von integrierter Virus–DNA oder auch von Transgenen geht in der Regel einher mit einer Verringerung oder kompletten Unterdrückung der Expression dieser Gene (Sutter und Doerfler, 1980; Jähner und Jaenisch, 1985; Gundersen et al., 1991).

Es existieren aber auch Promotoren wie die des Iridovirus Frosch Virus 3 (FV3), die selbst dann noch Transkriptionsaktivität aufweisen, wenn alle 5'-CG-3'-Dinukleotide methyliert vorliegen. In einem dieser Promotoren wird die Aktivität reduziert, wenn nur noch die *Hpa* II-Sequenzen (5'-CCGG-3') methyliert sind (Munnes et al., 1995).

Somit kann die *de novo*-Methylierung auch als Schutz vor der Transkription fremder DNA, die in ein etabliertes Genom integriert worden ist, dienen (Barlow, 1993; Bird, 1993; Doerfler, 1991, 1993, 1995). Sie ist ebenfalls bei höheren Pflanzen zu finden, wie das Beispiel einer Hypermethylierung der Promotorbereiche des A1-Gens aus Mais in Petunien zeigt (Meyer et al., 1992; Meyer und Heidmann, 1994). Das *ars*-Transgen in einer *Volvox*-Transformante liegt auch *de novo* methyliert vor (Babinger, 1999). Somit scheint die *de novo*-Methylierung sowohl in niederen als auch in höheren Eukaryonten vorzukommen, aber anscheinend nicht in Invertebraten.

1.5 Auswirkungen von Methylierungsänderungen

Methylierungsänderungen gehen mit Änderungen der Chromatinstruktur (Bestor, 1990; Selker, 1990; Feil et al., 1995) oder der Topologie eines Promotors einher (Muiznieks und Doerfler, 1994). Sie ermöglichen auch den Übergang von rechts- zu linksgängigen DNA-Strukturen (Zacharis et al., 1988). Dadurch kann die Zugänglichkeit bestimmter DNA-Bereiche für regulatorische Proteine verändert werden. Solche Proteine weisen unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Transkriptionsfaktoren wie AP-2, NF- κ B oder E2F erkennen Sequenzen, die 5'-CG-3'-Dinukleotide enthalten. Das Auftreten von 5-Methyl-Desoxycytidin in den Erkennungssequenzen verhindert die Bindung dieser Proteine an den Promotor und somit die Transkription des Gens (Tate und Bird, 1993). Demgegenüber existieren Proteine wie der MLT-Faktor aus HeLa-Zellen (Molloy und Watt, 1990) oder das „methylated DNA binding protein“ (MDBP) aus der menschlichen Plazenta (Ehrlich et al., 1990), die spezifisch nur an methylierte DNA-Sequenzen binden. Die Methyl-CpG bindenden Proteine MeCP1 und MeCP2, die ebenfalls methylierte 5'-CG-3'-Dinukleotide erkennen (Meehan et al., 1989), besitzen keine Sequenzspezifität und sind Repressoren der Transkription (Boyes und Bird, 1991, 1992). Allerdings existieren auch DNA-bindende Proteine wie beispielsweise Sp1, die sowohl an methylierte als auch an unmethylierte Sequenzen binden können (Höller et al., 1988). Weiterhin liegt eine unterschiedliche Zugänglichkeit für DNase I in methylierter und nicht-methylierter DNA vor (Kochanek et al., 1993b; Feil et al., 1995).

2. Auswirkungen der Integration von Fremd-DNA

Virale DNA — möglicherweise auch mit der Nahrung aufgenommene DNA (Schubbert et al., 1994, 1997) — kann in eukaryontische Zellen gelangen und in das zelluläre Genom integriert werden. Bei der Herstellung transgener Organismen oder im Verlauf der somatischen Gentherapie wird die Integration fremder DNA angestrebt. Da die verwendeten DNA-Sequenzen in der Regel unmethyliert sind, stellen sie für die Zelle Fremd-DNA dar und können *de novo* methyliert werden (Sutter et al., 1978; Doerfler 1993a; Meyer und Heitmann, 1994). Durch den Integrationsvorgang hervorgerufene Mutationen in der genomischen DNA werden zum Tod der Zelle führen, falls ein lebensnotwendiges Gen betroffen sein sollte. Die lokalen Veränderungen innerhalb der Chromatinstruktur können auch weiter entfernte DNA-Bereiche beeinflussen, eventuell auch auf anderen Chromosomen (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999). Art und Umfang solcher Auswirkungen hängen möglicherweise vom Ort der Integration ab.

2.1 Adenovirus Typ 12–transgene Hamsterzellen

Im Gegensatz zur Infektion menschlicher Zellen verläuft die Infektion von Zellen des Syrischen Hamsters (*Mesocricetus auratus*) mit Adenovirus Typ 12 (Ad12) abortiv (Doerfler, 1969). Die Virionen sind in der Lage, in die Zelle zu gelangen, die virale DNA erreicht den Zellkern und einige frühe Gene werden transkribiert. Die Replikation der Ad12-DNA jedoch ist blockiert, so daß die späten Strukturgene nicht exprimiert werden und somit auch keine Produktion neuer Virionen stattfindet (Übersicht bei Doerfler, 1991). Die subkutane Injektion von Ad12 in neugeborenen Hamstern induziert die Bildung von Tumoren in Nähe der Einstichstelle (Huebner et al., 1962; Trentin et al., 1962). Alle Tumorzellen enthalten mehrere Kopien der Ad12-DNA, die in der Regel an einer chromosomalen Stelle integriert sind (Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Die integrierte Ad12-DNA wird *de novo* methyliert (Sutter und Doerfler, 1980; Kuhlmann und Doerfler, 1982).

Mit Ad12 infizierte oder transformierte Hamsterzellen können somit als Modellsysteme für Untersuchungen zur Integration fremder DNA dienen. In Ad12-transformierten Zellen lassen sich in fünf von 40 untersuchten zellulären Genen Veränderungen im Expressionsmuster erkennen (Rosahl und Doerfler, 1992). In einem Ad12-induzierten Hamstertumor weisen die zellulären DNA-Sequenzen, die die virale DNA flankieren, eine deutliche Hypomethylierung auf (Lichtenberg et al., 1988). Ad12-transformierte

Hamsterzellen und Ad12-induzierte Hamstertumore zeigen auch Änderungen in den Methylierungsmustern zellulärer Gene. Derartige Veränderungen kennzeichnen auch solche Zellen, die das Ad12-Genom oder Teile davon aufgrund einer Transfektion enthalten, ohne dabei einen transformierten Phänotyp zu zeigen. Selbst in einer Zelllinie, die als einzige nachweisbare Fremd-DNA das pSV2neo-Plasmid mit dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen enthält, ist eine Zunahme der Methylierung zellulärer Sequenzen zu finden. Im Gegensatz dazu finden sich zwischen primären Hamsterzellen und der spontan transformierten Hamsterzelllinie BHK21 solche Unterschiede nicht. Die Zunahmen der Methylierung sind in mehreren zufällig ausgewählten DNA-Sequenzen zu finden, wobei sich die stärksten Veränderungen in den Genen des Intrazisternalen A-Partikels, Segment I (IAP I) und des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes Klasse I, Segment I (major histocompatibility complex (MHC) class I, segment I) nachweisen lassen. Andere DNA-Bereiche zeigen keine Unterschiede, beispielsweise die Region der Adenin-Phosphoribosyltransferase (ADPRT) (Heller et al., 1995).

Die festgestellten Methylierungsänderungen können einerseits durch die Integration der fremden DNA verursacht worden sein. Da viele der für Ad12-DNA transgenen Zellen einen transformierten Phänotyp zeigen, können diese Auswirkungen andererseits aber auch auf dem onkogenen Potential des Virus beruhen. Möglich ist auch, daß beide Effekte zusammen diese Veränderungen bewirken. Die Beobachtung, daß auch in einer Zelllinie, in der als einzige Fremd-DNA das Plasmid pSV2neo vorhanden ist, eine Zunahme der Methylierung auftritt, deutet darauf hin, daß auch die Integration anderer DNAs dazu führen kann, daß Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer Sequenzen ausgelöst werden.

2.2 Intrazisternale A-Partikel

Die Intrazisternalen A-Partikel (IAP) sind Retrovirus-ähnliche Strukturen in den Zellen vieler Nagetiere und anderer Säuger. Obwohl isolierte IAPs nicht infektiös zu sein scheinen, weisen sie doch Bestandteile auf, die normalerweise für Retroviren charakteristisch sind. So lassen sich in ihnen sowohl Reverse Transkriptase als auch polyadenylierte RNA-Moleküle nachweisen. Von den zu diesen RNAs homologen IAP-Genen, die beim Syrischen Hamster eine Größe von bis zu 7,6 Kilobasenpaare aufweisen (Ono und Ohishi, 1983), sind pro Zelle etwa 1.800 Kopien vorhanden (Kuff et al., 1986). Sie liegen auf nahezu allen Hamsterchromosomen, hauptsächlich auf

deren kurzen Armen, verteilt vor, wie durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung gezeigt wurde (Meyer zu Altenschildesche et al., 1996; Abb. 1).

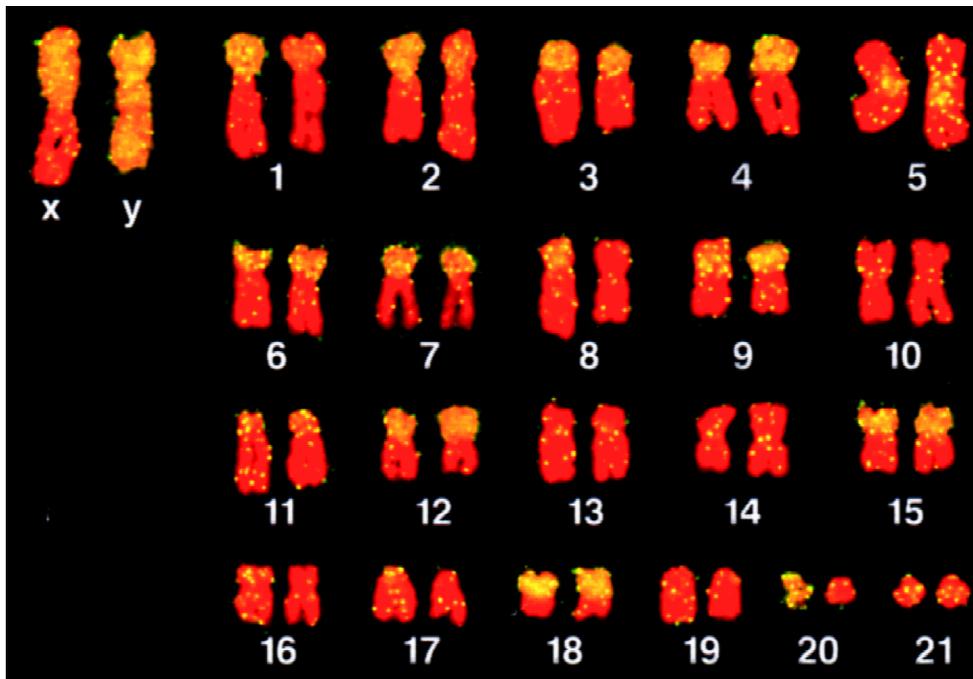


Abbildung 1:

Karyotyp einer BHK21-Zelle (entnommen aus: Meyer zu Altenschildesche et al., 1996; Abb. 3)

Die Chromosomen wurden ihrer Größe nach sortiert. Die gelben Signale entsprechen den IAP-Genen.

3. Erythrozyten

Alle Blutzellen stammen von einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle ab. Unter dem Einfluß von Erythropoetin (EPO) differenziert sie sich zu der sogenannten BFU-E (erythroide „blast-forming unit“). Nach einigen weiteren Zellteilungen erreicht diese das Stadium der CFU-E (erythroide „colony-forming unit“), die morphologisch nicht von den vorherigen Zellen zu unterscheiden ist, in der aber bereits die Expression der ersten erythroiden Proteine begonnen hat. Die daraus hervorgehenden Erythroblasten reifen im weiteren Verlauf und unter Verlust des Zellkerns zu den Roten Blutkörperchen (Erythrozyten) heran. Dieser Reifungsprozeß umfaßt auch die Umstrukturierung der Plasmamembran und die Entwicklung des erythroiden Membranskeletts, das den reifen Erythrozyten die spezielle Form und die damit verbundene Elastizität verleiht (eine Übersicht über die Entstehung der erythroiden Zellen gibt Lazarides, 1987). Ihre Lebensdauer beträgt durchschnittlich 113 Tage (108 bis 120 Tage); sie gehen nach Verbrauch ihrer Energiereserven durch Alterung zugrunde und werden durch die

mechanische Beanspruchung während des Zirkulierens in den Gefäßen zerstört (Pschyrembel, 1990).

3.1 Aufbau der Erythrozytenmembran

An der Innenseite der Erythrozytenmembran befindet sich das Membranskelett, das für die Stabilität und die besondere Form der Erythrozyten notwendig ist (Abb. 2). Die Strukturproteine, aus denen dieses Membranskelett aufgebaut ist (Tab. 1), können in drei Kategorien unterteilt werden: Die Proteine des Zytoskeletts (Spectrine, Actin, Protein 4.1, etc.), die Integralen Membranproteine (AE1, Glycophorine, etc.) und die Ankerproteine (Ankyrin, Pallidin, etc.), die die Verbindung zwischen den Zytoskelett- und Membranproteinen herstellen (Lux und Palek, 1995). Mutationen in diesen Proteinen können zu schweren Erkrankungen führen. Die mit Abstand häufigsten Erkrankungen, die auf einen Defekt des Erythrozytenmembranskeletts beruhen, sind die Hereditäre Sphärozytose (HS) und die Hereditäre Elliptozytose (HE). Die deutsche Bezeichnung „Kugelzellanämie“ leitet sich von dem Auftreten kugelförmiger Erythrozyten in Blutausstrichen dieser Patienten ab. Als Gründe für die Instabilität des Membranskeletts in diesen Erkrankungen wird ein Mangel an Ankyrin, AE1, β -Spectrin oder Pallidin oder ein Funktionsverlust eines dieser Proteine beschrieben. Allerdings

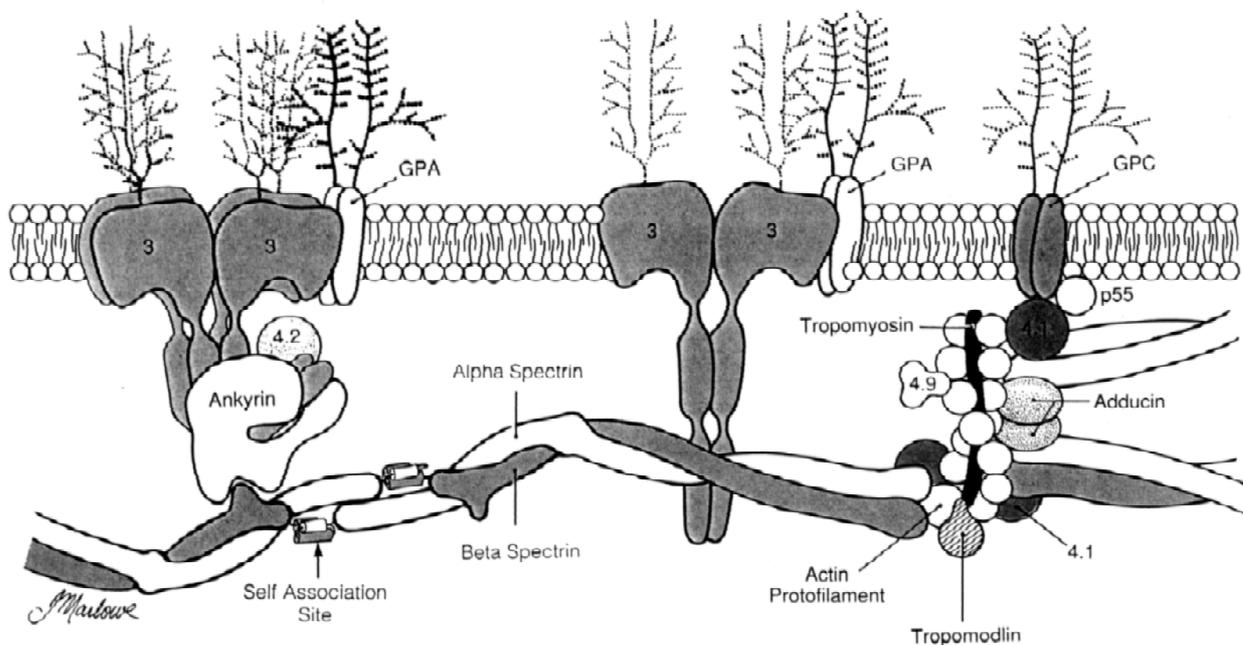


Abbildung 2:

Modell der Erythrozytenmembran (entnommen aus: Lux und Palek, 1995, Abb. 54–20)

Die Anordnung der Proteine ist korrekt, die Proteine und Lipide sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

gibt es auch Patienten, in denen keine Mutationen in den bekannten Genen aufgetreten sind; hier stellt sich die Frage, wodurch in diesen Fällen die Erkrankung hervorgerufen wird. Wie bereits beschrieben, kann ein verändertes Methylierungsmuster in einem der betroffenen Gene ebenfalls der Grund dafür sein, daß ein bestimmtes Genprodukt nicht oder nur in verringerter Menge gebildet wird.

Tabelle 1:
Humane Erythrozytenmembranproteine

SDS-Gelbande	Name des Proteins	Molekulargewicht (Gel) ($\times 10^3$)	Aminosäuren	Kopien pro Zelle ($\times 10^3$)	Gen-Symbol
1	α -Spectrin	240	2429	242 \pm 20	SPTA1
2	β -Spectrin	220	2137	242 \pm 20	SPTB
2.1	Ankyrin	210	1880	124 \pm 11	ANK1
2.9	α -Adducin	103	737	\sim 30	ADDA
	β -Adducin	97	726	\sim 30	ADDB
3	AE1	90-100	911	\sim 1200	EPB3
4.1	Protein 4.1	80+78	588	\sim 200	EL1
4.2	Pallidin	72	691	\sim 250	ELB42
4.9	Dematin	48+52	383+?	\sim 140	-
	p55	55	466	\sim 80	MPP1
5	β -Actin	43	375	\sim 500	ACTB
	Tropomodulin	43	359	\sim 30	TMOD
6	G3PD	35	335	\sim 500	GAPD
7	Stomatin	31	288	-	-
	Tropomyosin	27+29	239	70	TPM3
8	Protein 8	23	-	\sim 200	-
PAS-1	Glycophorin A	36	131	\sim 1000	GYPA
PAS-2	Glycophorin C	32	128	\sim 200	GYPC ^a
PAS-3	Glycophorin B	20	72	\sim 200	GYPB
	Glycophorin D	23	107	\sim 200	GYPC ^a
	Glycophorin E	-	59	-	GYPE

^a Die Glycophorine C und D werden vermutlich von derselben mRNA unter Verwendung verschiedener Transkriptionsstartstellen synthetisiert.

modifiziert nach: Lux und Palek, 1995 (Auszug aus der Tabelle 54-2)

4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Verteilung der modifizierten DNA-Base 5-Methyl-Desoxycytidin in ausgewählten Bereichen des Säuger genom zu bestimmen. Mit dieser Untersuchung sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Methylierungsmuster in Säugerzellen und deren mögliche funktionale Bedeutung geleistet werden. Dazu sollte zum einen der Methylierungsstatus eines Bereichs aus den IAP-Genen des Syrischen Hamsters (*Mesocricetus auratus*) vor und nach der Integration von fremder DNA ermittelt werden. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, daß die Integration fremder DNA zu Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer DNA-Sequenzen führen konnte. Im Bereich des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes Klasse 1 (major histocompatibility complex (MHC) class I) und der Retrovirus-ähnlichen IAP-Gene wiesen Southern Blot-Analysen deutliche Zunahmen der DNA-Methylierung auf (Heller et al., 1995). Diese Veränderungen galt es nun mit Hilfe des Genomischen Sequenzierens nach der Bisulfit-Methode genauer zu untersuchen. Der Einsatz dieser Technik ermöglichte es, jedes einzelne 5-Methyl-Desoxycytidin in einem gegebenen DNA-Abschnitt zu ermitteln, unabhängig davon, ob es in der Erkennungssequenz einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease lokalisiert war. Außerdem konnte so der Methylierungsgrad an einer bestimmten Position exakt quantifiziert werden, ganz im Gegensatz zu den früher verwendeten Techniken.

Ein weiterer Aspekt, der mit dieser Methode untersucht werden sollte, waren die Methylierungsmuster in drei menschlichen Promotoren. Dabei handelte es sich um die Promotoren der Gene für die Erythrozytenmembranskelettproteine β -Spectrin, AE1 und Pallidin; der Promotor des Ankyringens konnte nicht analysiert werden, da dessen Sequenz nicht bekannt war. Bei verschiedenen Patienten waren Punktmutationen in einem dieser Gene festgestellt worden, die zu einem Genprodukt mit eingeschränkter Funktionalität führten; darüber hinaus waren Patienten bekannt, die weder im Promotor noch im kodierenden Bereich eines der Gene Mutationen aufwiesen. Das Fehlen eines funktionierenden Membranskeletts in diesen Patienten hätte durch eine aberrante Methylierung eines der Promotoren hervorgerufen worden sein können. Deshalb sollten die Methylierungsmuster von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit bekannter Mutation bestimmt und mit denen jener Patienten verglichen werden.

II. Material

1. Chemikalien

Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose (Seakem® LE)	FMC, Rockland, ME, USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Binotal®)	Grünenthal, Aachen
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, MI, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β-D-galaktosid (X-Gal)	Diagnostic Chemicals, Charlottetown, Kanada
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chromatographiewasser	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTPs)	Promega, Madison, WI, USA
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Dodecylsulfat, Na-Salz (SDS, ultrarein)	Merck, Darmstadt
EDTA (Titrplex III)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Glucose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycerin, 87%	Merck, Darmstadt

Hexamincobaltchlorid (HACoCl_3)	Sigma, Taufkirchen
Hydrochinon	Sigma, Taufkirchen
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Diagnostic Chemicals, Charlottetown, Kanada
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
2[N-Morpholino]ethansulphonsäure (MES)	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogensulfit (NaHSO_3)	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
Phenol	J.T.Baker, Deventer, Holland
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (rauchend)	Merck, Darmstadt
Select Yeast Extract	LifeTechnologies, Paisley, Schottland, UK
Stickstoff, verflüssigt	Linde, Höllriegelskreuth
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
Trichlormethan	Riedel-de Haën, Seelze
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen

2. Sonstiges Verbrauchsmaterial

Einmal–Latexhandschuhe (gepudert)	Centramed, Koblenz
Einmal–Vakuum–Filtrationsgerät	Schleicher und Schuell, Dassel
Einweg–Halbmikroküvetten Nr. 1201	Ratiolab, Dreieich
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Filterspitzen 1000 µl	Greiner, Frickenhausen
Filterspitzen 200, 20 und 10 µl	SLG, Gauting
Gel Blotting–Papier GB003	Schleicher und Schuell, Dassel
HLA–Platten (60 Vertiefungen)	Greiner, Frickenhausen
Papierhandtücher ProNatur	Amandi Hygienepapier, Mainz–Kostheim
Parafilm "M"	American Can Company, Greenwich, CT, USA
PCR–Reaktionsgefäße	
0,2 ml (8er–Streifen, „tubes&lids“)	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
0,5 ml	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
pH–Indikatorstäbchen, nicht blutend	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	
10 µl	Eppendorf–Netheler–Hinz, Hamburg
1000 und 200 µl	La Fontaine, Forst/Bruchsal
PPN–Röhrchen 13 ml	geliefert durch Dr. Kleef, Bonn
PPN–Röhrchen 50 ml	Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße 1,7 ml	Brand, Wertheim
Skalpellschlingen 24 (steril)	Bayha, Tuttlingen
Spritzen–Vorsatzfilter (22 und 45 µm)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Thermodruckerpapier K65HM	Mitsubishi, Japan

3. Laborgeräte

Bakterieninkubator	Memmert, Schwabach
Eisflockenbereiter F90	CKT, Euskirchen
Glasgeräte	Schott, Mainz
Glaspipetten 10, 5 und 1 ml	Brand, Wertheim
Glasröhrchen 13 ml, Pyrex	Bibby Sterilin, Stone, England
Laborzentrifugen:	
Megafuge	Heraeus Sepatech, Hanau
MC12V	Sorvall, DuPont, Newtown, CO, USA
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Magnetrührstäbe	geliefert durch Faust, Köln
Membranpumpe	Brand, Wertheim
Mikrowellengerät Micromat	AEG Hausgeräte, Nürnberg
Minigelkammer	Biozym, Hess. Oldendorf
Netzgerät GPS 200/400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Pipetten:	
Research 10 µl	Eppendorf–Netheler–Hinz, Hamburg
Pipetman 1000, 200 und 20 µl	Gilson, Villier-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe pipump	Glasfirn, Giessen
Pipettierpumpe Fortuna Labopet 240	Greiner, Frickenhausen
Präzisionsküvette QS (50 µl)	Hellma, Müllheim/Baden
Schüttelinkubator G 25	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Sequenziergerät (ABI Prism® 377 DNA)	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spektrophotometer DU–640	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Sterilbank Antair BSK	Anthos Mikrosysteme, Köln
Thermocycler 480, 2400 und 9600	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA

Tiefkühltruhe ULT 1490 ST	Revco, Asheville, NC, USA
Video–Dokumentationssystem CS 1	Cybertech, San Gabriel, USA
Vortex–Mixer	Heidolph, Kehlheim
Wasser–Filtrieranlage SuperQ	Millipore, Bedford, MA, USA
Wasserbad 1012	GFL, Burgwedel

4. Oligodesoxyribonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide („Primer“) wurden bei Life Technologies, Paisley, Schottland, UK, bezogen. Sie wurden in Chromatographiewasser als Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 µg/µl rekonstituiert.

Tabelle 2:

Die verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P1	GTT TTT TAG TTT GGG GTT TTT TTT TAA GAA GTT G
P2	AAA CAT ACC ATA ATA CCA CTC TAT CTA CCT CC
P3	ATG TTT TAA GAT GTA TTA AAG TTT TAT TGT AGA AGG
P4	TTA TTT TAA CAC AAT CTA TAA AAC TAT AAC CAC
β–Sp SE 5'L	TAT ATA TTT TAA AAT TGA ATT GTG TGT AGT GGG
β–Sp SE 3'L	ACC CTC CTA AAA CTC ACC TAC CCT AAA AC
β–Sp SE 5'K	TGG GGA TGT AGG GYG GGA AAG GTT GGA GGG
β–Sp SE 3'K	TAA AAC RAA AAA CCA CCC CRA ACC CRA AAA TAA
AE1 AS 5'L	AAA TAC TAA ACA ATT CCC TAT AAA AAA AAC TAC
AE1 AS 3'L	TGG GTA TTT GTA GAA GTT TTT AGG GTA GGT ATT G
AE1 AS 5'K	CCT ATA AAA AAA ACT ACA AAA AAA AAA TAA ATC C
AE1 AS 3'K	GAG TTT TAG GGT TTT TTG GTG AAG TTT TGT AG
B4.2 SE 5'L	TTT AGG GTT TGA GAT TTG GAG TTG GAT ATG GG
B4.2 SE 3'L	CCC TCC CCC ACC ATA ATT ATA CCA CCA TCT CCC
B4.2 SE 5'K	TAA GGT TTG TTT TAG GTT TTT TTA GTT GGT AGG
B4.2 SE 3'K	CCA TCC CAC TTC CTT TAA TAA AAA CAA ATA ATA C
P4.2 SE 5'L	TAG ATT TTT TTT TAT AGG TAA TTA ATA TTT TGG
P4.2 SE 3'L	CTT CTC TCC TAC TCC CTC TCT ACT AAT ATC TCC
P4.2 SE 5'K	ATT TTG GGT AGT GTG TTT TAT ATT ATT TTA TAG
P4.2 SE 3'K	AAA AAT AAC CCT ATT CAT TTT ATC TCT TAT ACC
AE1 5'RT	TAG AGC TGC GTA GAG TCT TCA CC
AE1 3'RT	CTG AGC CAT GTA GGC ATC TAT GC
P4.2 5'RT	TGC ATT TTC TCA AGG AGC AGA GG
P4.2 3'RT	CAC CTC TTT TTC CTG AAG AGA CC
SP6	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Ein Y in der Primer–Sequenz soll andeuten, daß bei der Synthese an dieser Position zu gleichen Teilen Desoxycytidin und Desoxythymidin eingesetzt wurden, ein R kennzeichnet das Vorhandensein von Desoxyadenin und Desoxyguanosin.

5. Verwendete Zelllinien

BHK21 [C-13] (Nierenzelllinie eines neugeborenen Syrischen Hamsters)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, Nr. CCL 10 (Stoker und Macpherson, 1964)
T637 (Ad12-transformierte BHK21-Zelllinie)	Strohl et al., 1970
BHK21- λ 7 und BHK21- λ 10 (mit Bakteriophage λ -DNA transfizierte BHK21-Zelllinien)	Heller, 1997
BHK21-1 und BHK21-2 (einfach-einzelzellklonierte BHK21-Zelllinien)	Remus, 1996
BHK21-3 (dreifach-einzelzellklonierte BHK21-Zelllinie)	Remus, 1996
BHK21-4 („Mock“-transfizierte BHK21-Zelllinie)	Remus, 1996
HeLa (Zelllinie eines humanen Adenokarzinoms aus der Cervix)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, Nr. CCL 2 (Gey et al., 1952)
KB (Zelllinie eines humanen Epidermiskarzinoms aus dem Mund)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, Nr. CCL 17 (Eagle, 1955)
UT-7 (humane megakaryoblastische Leukämie-Zelllinie)	Komatsu et al., 1991
UT-7/GM	Komatsu et al., 1997
K562 (humane Chronisch-myeloische Leukämiezelllinie)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, Nr. CCL 243 (Lozzio und Lozzio, 1975)
AS-E2 (Akute myeloische Leukämiezelllinie)	Miyazaki et al., 1997
2 Phasen-Flüssigkultur (Erythroblastenkultur aus Blut)	Wada et al., 1990, 1999

6. Bakterienstamm

XL1-Blue MRF'	Stratagene, La Jolla, CA, USA
---------------	-------------------------------

7. Enzyme

Lysozym	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
<i>Pvu</i> II	MBI–Fermentas, Wilna, Litauen
RNase A	Sigma, Taufkirchen
<i>Taq</i> DNA–Polymerase (Lagerpuffer A)	Promega, Madison, WI, USA

8. DNAs

Molekulargewichtsmarker:

pUC–Mix	MBI–Fermentas, Wilna, Litauen
Lambda–Marker: (λ DNA/ <i>Sty</i> I/ <i>Mlu</i> I)	MBI–Fermentas, Wilna, Litauen

9. Kits

ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sequencing Ready Reaction Kit

GeneClean®II Glasmilch	Bio101, Vista, CA, USA
pGEM®–T Vektor System	Promega, Madison, WI, USA
Access RT–PCR System	Promega, Madison, WI, USA
Qiaquick® Gel–Extraktionskit	Qiagen, Hilden

10. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen (außer der Bisulfit–Lösung) wurden mit doppelt–destilliertem Wasser aus einer Millipore SuperQ–Filtrationsanlage angesetzt. Die fertigen Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

Ampicillin–Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O
Bisulfit–Lösung	8,5 g NaHSO ₃ in 16 ml entgastem Chromatographiewasser gelöst, 1 ml 40 mM Hydrochinon zugesetzt, mit 0,6 ml 10 M NaOH auf pH 5,0 eingestellt (alle Lösungen frisch angesetzt, mit N ₂ begast)
Desoxyribonukleosid–5'–triphosphate (dNTPs)	10 mM in H ₂ O

DnD-Lösung	1 M DTT 90 % DMSO 10 mM KOAc, pH 7,5
Ethidiumbromid-Lösung	2 µg/ml in H ₂ O
IPTG-Stammlösung	1 g IPTG in 42 ml H ₂ O
K-MES	500 mM MES mit 5 M KOH auf pH 6,3 eingestellt
Lysozym-Lösung	10 mg/ml in STET-Puffer (frisch angesetzt)
RNase A	10 mg/ml 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 DNasen 15 Minuten bei 100°C inaktiviert
SOB-Medium	10 mM NaCl 2 % Bacto-Tryptone 0,5 % Select Yeast Extract zuerst autoklaviert, dann Zugabe von: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose
STET-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA 8 % Saccharose 0,5 % Triton X-100
Stop-Mix (für Restriktionsendonukleasen)	50 % Glycerin 1 % SDS 100 mM EDTA, pH 7,8 0,1 % Bromphenolblau
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 7,8
1xTEB	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 77 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
Tetracyclin-Stammlösung	10 mg/ml in Ethanol

TFB-Puffer	100 mM KCl 45 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 3 mM HAcCoCl ₃ 10 mM K-MES, pH 6,3 pH 6,2
X-Gal	5 mg/ml in DMF
2xYT-Agar	2xYT-Medium 1,6 % Agar
2xYT-Medium	0,5 % NaCl 1 % Select Yeast Extract 1,6 % Bacto-Tryptone
2xYT-Agar mit Ampicillin/IPTG/X-Gal	2xYT-Agar 100 µg/ml Ampicillin 0,5 mM IPTG 80 µg/ml X-Gal
2xYT-Agar mit Tetracyclin	2xYT-Agar 12,5 µg/ml Tetracyclin

III. Methoden

1. **Genomisches Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994)**

Die Technik des Genomischen Sequenzierens nach der Bisulfit-Methode ermöglicht es, alle 5-Methyl-Desoxycytidine in einer DNA-Sequenz zu bestimmen, unabhängig davon, ob sie sich — wie es bislang für Southern Blot-Analysen erforderlich war — in den Erkennungssequenzen von methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen befinden. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode findet sich im Kapitel IV.2.1 des Ergebnisteils.

1.1 Bisulfit-Behandlung von genomischer DNA

5 µg genomische DNA wurden mit Chromatographiewasser auf ein Gesamtvolumen von 64 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 µl 10 M NaOH (Endkonzentration 0,3 M) wurde die DNA zuerst 15 Minuten bei 37°C inkubiert und dann zwei Minuten im kochenden Wasserbad vollständig denaturiert. Nach sofortigem Abkühlen in Eiswasser wurden 1,2 ml Bisulfit-Lösung zugesetzt, das Reaktionsgemisch mit Mineralöl überschichtet und das Reaktionsgefäß mit Parafilm versiegelt. Es folgte eine 16-stündige Inkubation bei 55°C in einem Wasserbad mit geschlossenem Deckel. Nach Entfernen des Mineralöls wurde die DNA mittels 5 µl Glasmilch (GeneClean II, Bio 101) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das getrocknete Glasmilch-Sediment wurde in 100 µl Chromatographiewasser resuspendiert und zur Freisetzung der DNA 5 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation (12.000 xg) wurde der Überstand ohne Reste von Glasmilch in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Beenden der Bisulfit-Behandlung wurden 3 µl 10 M NaOH zugegeben (Endkonzentration 0,3 M) und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die umgesetzte DNA mit 100 µl 6 M NH₄OAc und 400 µl eiskaltem Ethanol (absolut) präzipitiert und einige Stunden bei -70°C inkubiert. Nach einer halbstündigen Zentrifugation (13.000 xg, 4°C) wurde das Sediment mit 0,5 ml 70 % Ethanol versetzt, zentrifugiert (15 Minuten, 13.000 xg, 4°C) und bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurde es in 20 µl Chromatographiewasser gelöst und bei -20°C gelagert. Für eine anschließende PCR-Reaktion wurde 1 µl dieser DNA-Lösung (entsprechend 250 ng der eingesetzten DNA) verwendet.

Diese teilweise recht drastischen Reaktionsbedingungen führten zu einer Degradation von schätzungsweise 99 % der eingesetzten DNA (Abb. 3).

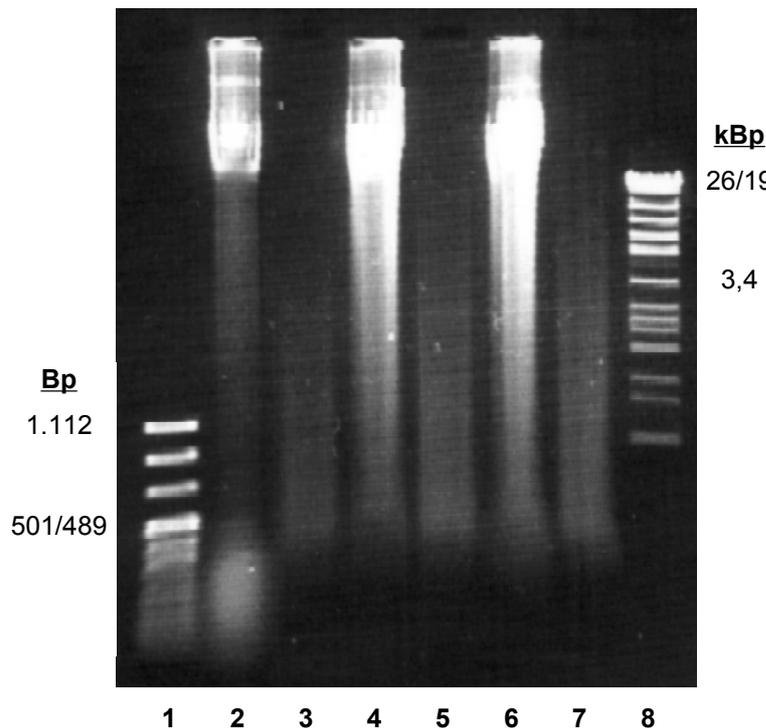


Abbildung 3:

Analyse Bisulfit-behandelter DNA
Dieses Agarosegel (1 %) verdeutlicht die Degradation der genomischen DNA durch die Bisulfit-Behandlung. In den Spuren 2, 4 und 6 sind jeweils 5 µg unterschiedlicher genomischer DNAs aufgetrennt worden (die DNA der Spur 2 enthielt Reste von RNA). Dieselbe Menge dieser DNAs wurde Bisulfit-behandelt und in den Spuren 3, 5 und 7 aufgetragen. Die anfangs hochmolekulare DNA (fast ausschließlich deutlich größer als 26.000 Bp) wurde zu Fragmenten mit einer Größe von bis zu 5.000 Bp degradiert. Kürzere Fragmente als 500 Bp wurden unter den gegebenen Bedingungen nicht aufgereinigt. Die Spur 1 enthielt 500 ng pUC-Mix, die Spur 8 500 ng Lambda-Marker. Die Größen von einigen Fragmenten sind exemplarisch in Basenpaaren (Bp) oder in Kilobasenpaaren (kBp) angegeben.

1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR; Saiki et al., 1988)

Die PCR-Amplifikation wurde in einem Volumen von 25 µl unter Verwendung eines Thermocyclers 9600 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Bedingungen, unter denen die PCR-Reaktionen abliefen, waren für alle untersuchten Regionen mit Ausnahme der Temperaturen identisch: Es wurden 250 ng der Bisulfit-behandelten DNA eingesetzt, je 250 ng der beiden Primer und 1 Einheit Taq DNA-Polymerase (Promega). Der Puffer enthielt 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 25°C), 50 mM KCl und 0,1 % Triton X-100; dazu wurden 1,7 mM MgCl₂ und jeweils 0,1 mM der vier dNTPs zugesetzt. Nach Beendigung der ersten Reaktion wurde 1 µl davon in einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit weiter innenliegenden („nested“) Primern und ansonsten gleichen Bedingungen eingesetzt.

Das PCR-Programm für alle Regionen verlief folgendermaßen:

Denaturierung	94°C	5 Minuten
35 Zyklen	94°C	15 Sekunden
	51 bis 57°C	15 Sekunden
	72°C	30 Sekunden
Elongation	72°C	5 Minuten
Abkühlen auf	4°C	

1.3 Aufreinigung der PCR–Produkte

Es wurde der gesamte PCR–Ansatz auf einem präparativen Agarosegel (2 % in 1xTBE) mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer aufgetrennt, um die Primer und freie Nukleotide zu entfernen. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurden die Banden, die den erwarteten PCR–Produkten entsprachen, mit jeweils neuen Skalpellklingen ausgeschnitten und mittels des Qiaquick® Gel–Extraktionskits (Qiagen) den Herstellerangaben folgend aufgereinigt. Die PCR–Produkte wurden mit 30 µl Elutionspuffer eluiert.

2. Klonierung von PCR–Produkten

Die mit der Taq DNA–Polymerase synthetisierten PCR–Produkte wurden mit Hilfe des pGEM®–T Vektor–Kits (Promega) kloniert. Dabei wurde die spezielle Eigenschaft der Taq DNA–Polymerase genutzt, an die 3'–Enden fertig synthetisierter PCR–Produkte ein zusätzliches Desoxyadenosin anzufügen. Dies vereinfachte die Ligation in den T–Überhangsvektor pGEM®–T(Promega), der weiterhin die Möglichkeit bot, durch Blau–Weiß–Selektion diejenigen Bakterien zu identifizieren, die ein rekombinantes Plasmid enthielten.

2.1 Ligation (Dugaiczky et al., 1975)

Je 1 µl 10–fach Puffer, T4 DNA–Ligase und pGEM®–T Vektor (Promega) sowie 7 µl der eluierten PCR–Produkte wurden mindestens 16 Stunden bei 4°C inkubiert.

2.2 Transformation (Hanahan, 1983; Hanahan et al., 1995)

2.2.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

25 ml SOB–Medium wurden mit 1 ml einer XL–1blue MRF'–Übernachtkultur (eine Kolonie in 10 ml 2xYT–Medium) inokuliert und die Bakterien innerhalb von 90 Minuten bei 37°C im Schüttelinkubator zu einer O.D.₅₅₀ von 0,5 herangezogen. Nach zehnmütiger Abkühlung auf Eis wurden sie 10 Minuten bei 1.000 xg abzentrifugiert (4°C), der Überstand verworfen und das Sediment in 8,3 ml TFB–Puffer resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation (10 Minuten, 1.000 xg, 4°C). Der Überstand wurde komplett entfernt, die Bakterien in 2 ml TFB–Puffer resuspendiert und 70 µl DnD–Lösung (Endkonzentration 3,5 %) zugesetzt. Nach 15 Minuten auf Eis wurden erneut 70 µl DnD–Lösung (Endkonzentration 7 %) zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert.

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Es wurden 5 µl des Ligationsansatzes mit 0,2 ml transformationskompetenten Bakterien vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 90 Sekunden im 42°C–Wasserbad wurden die Bakterien erneut auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0,8 ml SOC–Medium wurden (ohne die im Originalprotokoll vorgesehene Inkubation bei 37°C) sofort 0,2 ml dieser Bakteriensuspension auf 2xYT–Agarplatten (Ampicillin/IPTG/X–Gal) ausplattiert. Dadurch wurde verhindert, daß aus einem transformierten Bakterium mehrere Kolonien entstanden, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse hätten führen können; deswegen sind in der Auswertung keine identischen Sequenzen vorhanden gewesen. Nachdem die Platten getrocknet waren, erfolgte eine mindestens 16–stündige Inkubation bei 37°C. Danach wurden die Platten einige Stunden bei 4°C gelagert, um eine Intensivierung des Indigofarbstoffes zu erreichen, wodurch die blauen und damit negativen Kolonien leichter zu erkennen waren. Übernachtskulturen wurden mit den Insert–tragenden weißen Kulturen angeimpft.

3. Plasmid–Präparation (modifiziert nach Holmes und Quigley, 1981)

Die Bakterien aus 1,5 ml Übernachtskultur wurden durch einminütige Zentrifugation (12.000 xg) sedimentiert, mit 0,5 ml STET–Puffer und 40 µl Lysozym–Lösung versetzt und mit einem Vortex–Mischer vollständig resuspendiert. Sie wurden 90 Sekunden in einem kochenden Wasserbad inkubiert und danach zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (12.000 xg). Der Überstand wurde mit 40 µl 3 M NaOAc, pH 4,8, und 0,5 ml Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß präzipitiert und zwölf Minuten zentrifugiert (12.000 xg). Das DNA–Sediment wurde mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen, 5 Minuten zentrifugiert (12.000 xg) und bei Raumtemperatur getrocknet.

4. Restriktionsanalyse der präparierten Plasmide

Die isolierten Plasmide wurden durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Pvu* II darauf überprüft, ob sie Inserts der richtigen Größe enthielten. Auf dem pGEM[®]–5Zf(+)-Vektor, von dem der pGEM[®]–T–Vektor abgeleitet worden war, befanden sich zwei Erkennungssequenzen, die bezogen auf die Klonierungsstelle 436 Basenpaare entfernt waren. Die zu klonierenden PCR–Produkte wiesen eine Größe zwischen 400 und 700 Basenpaaren auf, wodurch die positiven Klone aufgrund ihrer Größe leicht zu identifizieren waren.

4.1 Restriktionsspaltung (Nathans und Smith, 1975)

Die Restriktionsansätze wurden in die Vertiefungen einer HLA-Platte pipettiert, die sich in einer mit feuchtem Gel Blotting-Papier ausgelegten Petrischale befand. Dazu wurde die präparierte Plasmid-DNA in 30 µl RNase A-Lösung (333 ng/µl) aufgenommen, 1 µl davon zu einem Gemisch aus 0,1 µl *Pvu* II (50 Einheiten/µl), 1 µl 10xPuffer und 10 µl H₂O gegeben und mindestens 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zufügen von 2 µl Stop-Mix beendet.

4.2 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten (McDonnell et al., 1977)

Zur Auftrennung der bei der Restriktionsspaltung entstandenen DNA-Fragmente dienten 1,5 %ige Agarosegele. Als Laufpuffer wurde 1xTEB verwendet, in dem auch die Agarose durch fünfminütiges Aufkochen in einem Mikrowellengerät gelöst wurde. Aufgrund der verwendeten Apparatur (Biozym) konnte die heiße Agarose-Lösung direkt in die horizontale Gelkammer (8 x 7 cm) gegossen werden. Die aufgetragenen Proben wurden einer 15-minütigen Elektrophorese bei 100 mA unterzogen. Danach wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) inkubiert und mit Wasser abgespült. Die entstandenen Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und mittels einer Videokamera (Cybertech-Videosystem) photographiert.

4.3 Ammoniumacetat-Präzipitation (Okayama und Berg, 1982)

Die positiven Plasmide wurden durch Ammoniumacetat-Präzipitation aufgereinigt, um die nach der RNase A-Behandlung vorhandenen Ribonukleotide abzutrennen. Dazu wurden die Proben mit 30 µl 6 M NH₄OAc und 120 µl absolutem Ethanol (-20°C) vermischt und einige Stunden bei -20°C gelagert. Nach halbstündiger Zentrifugation (13.000 xg, 4°C) wurde das Sediment mit 0,5 ml 70 % Ethanol versetzt, zentrifugiert (15 Minuten, 13.000 xg, 4°C) und bei Raumtemperatur getrocknet.

5. Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die DNA-Sequenzen wurden auf einem ABI Prism® 377 DNA-Sequenziergerät unter Verwendung des ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kits (Perkin Elmer) bestimmt. Dazu wurde in der Regel ein Zwanzigstel der aus einer Plasmid-Präparation gewonnenen DNA (etwa 500 ng) mit 40 ng des SP6- oder des T7-Primers in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von

12 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 4 µl des Terminator Ready Reaction–Mixes wurde das fertige Sequenziergemisch mit Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierreaktion wurde in einem DNA Thermocycler 480 mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	96°C	5 Minuten
25 Zyklen	96°C	30 Sekunden
	50°C	15 Sekunden
	60°C	4 Minuten
Abkühlen auf	4°C	

Danach wurden die Produkte gemäß der Empfehlung des Herstellers aufgereinigt und auf dem Sequenziergerät analysiert; diese Arbeiten wurden von Birgit Schmitz oder Gudrun Schell durchgeführt.

6. Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Freeware–Programms GeneDoc in der Version 2.5.000 (Nicholas und Nicholas, 1997) analysiert. Diese Anwendung ermöglichte den Vergleich mehrerer Sequenzen, indem es in den horizontal dargestellten Sequenzen vertikale Bereiche entsprechend ihrer Homologie markierte. Dies erleichterte vor allem das manuelle Anordnen der IAP–Sequenzen, bei denen viele Abweichungen zwischen den einzelnen Sequenzen auftraten (siehe Abschnitt IV.3.1).

7. Reverse Transkription (RT)–PCR

Die RT–PCR–Analyse von 100 bis 300 ng DNaseI–behandelter Gesamt–RNA wurde in einer Ein–Gefäß–Reaktion mit Hilfe des RT Access–Kits (Promega) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Programm des Thermocyclers 2400 (Perkin Elmer) lautete:

Reverse Transkription	48°C	45 Minuten
Denaturierung	94°C	2 Minuten
40 Zyklen	94°C	30 Sekunden
	58°C	1 Minute
	68°C	2 Minuten
Elongation	68°C	7 Minuten
Abkühlen auf	4°C	

Die RT–PCR–Produkte wurden wie zuvor (Abschnitt III.1.3 ff) beschrieben analysiert, kloniert und sequenziert.

IV. Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation sollte die Verteilung der fünften DNA-Base 5-Methyl-Desoxycytidin im Säuger genom bestimmt werden. Der Methylierungsstatus von endogenen retroviralen Sequenzen des Syrischen Hamster wurde vor und nach der Integration fremder DNA ermittelt. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, daß die Integration fremder DNA zu Veränderungen im Methylierungsgrad zellulärer DNA-Sequenzen führen kann. In für Adenovirus Typ 12 (Ad12)-DNA transgenen Hamsterzellen waren deutliche Zunahmen der DNA-Methylierung insbesondere im Bereich des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes Klasse 1 (major histocompatibility complex (MHC) class I) und der Retrovirus-ähnlichen IAP-Gene beobachtet worden (Heller et al., 1995). Da nicht auszuschließen war, daß neben dem Integrationsvorgang auch die Transformation der Zellen durch adenovirale Transkripte diesen Effekt verursacht haben könnte, habe ich in meiner Diplomarbeit BHK21-Hamsterzellen mit der DNA des Bakteriophagen λ transfiziert und die transgenen Klone durch Southern Blot-Analysen auf *de novo*-Methylierung der Fremd-DNA und auf Veränderungen im Methylierungsmuster der IAP I-Gene untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Veränderungen mit Hilfe des Bisulfit-Protokolls des Genomischen Sequenzierens (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994) genauer untersucht. Diese Technik ermöglichte es, auch den Methylierungsstatus solcher 5'-CG-3'-Dinukleotide zu ermitteln, die sich nicht in der Erkennungssequenz einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease befanden.

Desweiteren wurde der Methylierungsstatus von drei menschlichen Promotoren mit dieser Methode analysiert. Dabei handelte es sich um die Promotoren der Gene für die Erythrozytenmembranskelettproteine β -Spectrin, AE1 und Pallidin. Zusätzlich wurde die Verteilung von 5-Methyl-Desoxycytidin in der DNA von Patienten mit Defekten des Erythrozytenmembranskeletts mit der von gesunden Kontrollpersonen verglichen.

1. Ergebnisse der Diplomarbeit (Remus, 1996)

In der Diplomarbeit habe ich untersucht, inwieweit die Integration fremder DNA allein ausreichend war, Veränderungen im Methylierungsstatus zellulärer DNA hervorzurufen. Für die Transfektion von BHK21–Hamsterzellen wurde die DNA des Bakteriophagen λ ausgewählt, da aufgrund ihres prokaryontischen Ursprungs anzunehmen war, daß sie in eukaryontischen Zellen keine funktionsfähige Transkripte hervorbringen und auch nicht repliziert werden konnte. Da diese DNA kein transformierendes Potential aufwies, waren andere Faktoren als die Integration der fremden DNA — soweit bekannt — nahezu vollständig auszuschließen. Mit einer Länge von 48.502 Basenpaaren war die Bakteriophagen λ –DNA der ursprünglich verwendeten Ad12–DNA (34.125 Basenpaare; Sprengel et al., 1994) zumindest in der Größe ähnlich. Um die Zellen ausfindig machen zu können, die die Bakteriophagen λ –DNA integriert hatten, wurde wie in vorherigen Untersuchungen das Plasmid pSV2neo mit dem Neomycin–Phosphotransferase–Gen kotransfiziert, wodurch die Selektion auf Geneticin (G418–Sulfat)–Resistenz ermöglicht wurde (Southern und Berg, 1982). Aus früheren Arbeiten war allerdings eine Zelllinie bekannt, die als einzige nachweisbare Fremd–DNA das pSV2neo–Plasmid enthielt, aber trotzdem Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer Gene aufwies. Deshalb wurde zusätzlich versucht, transgene Klone ohne Selektion zu finden, um mögliche Effekte der Plasmid–DNA vermeiden zu können. Doch nur einer von 110 Klonen zeigte in einer Dot Blot–Analyse spezifische Signale für die Bakteriophagen λ –DNA. Die aus diesem Klon hervorgegangenen Zelllinien wiesen kein verändertes Methylierungsprofil in den IAP I–Genen auf (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber hatten von den 59 transgenen Klonen, die nach der Selektion mit Geneticin erhalten wurden, vier Klone Veränderungen im Methylierungsstatus dieser DNA-Sequenzen aufzuweisen, am deutlichsten in den *Hha* I–Sequenzen. Diese Veränderungen waren aber nicht so stark wie in den für Ad12–DNA transgenen Zellen (Remus et al., 1999). Um ausschließen zu können, daß es sich bei den gefundenen Unterschieden um eine natürliche Varianz zwischen einzelnen BHK21–Hamsterzellen handelte, wurde der Methylierungsstatus der IAP I–Gene innerhalb der Zellpopulation überprüft. In 66 durch Einzelzellklonierung generierten BHK21–Klonen konnten weder im *Hpa* II– noch im *Hha* I–Profil Abweichungen von dem Referenzmuster der BHK21–Zelllinie festgestellt werden (Abb. 4). Auch 6 Klone aus einem Transfektionsexperiment, bei dem keine DNA eingesetzt worden war, zeigten keine Veränderungen der Methylierungsprofile

(Daten nicht gezeigt). Diese Kontrollen belegten, daß die Transfektionsmethode an sich keine Methylierungsänderungen bewirkte.

Die integrierte Fremd-DNA wurde ebenfalls methyliert. Bereits in Zellen der frühen Passage 10 konnte eine *de novo*-Methylierung sowohl der Bakteriophagen λ - als auch der pSV2neo-DNA festgestellt werden. Von vier Zelllinien wurde DNA aus Zellen der Passage 50 und zum Teil auch der Passage 100 untersucht. In diesen Klonen fand sich eine sukzessive Zunahme der Methylierung (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse ließen darauf schließen, daß die Integration fremder DNA weitreichende Veränderungen in der Zelle verursacht hatte. Wie durch Southern Blot-Analysen der IAP I-Gene gezeigt worden war, betrafen diese Veränderungen nicht nur die Integrationsstelle, sondern auch Regionen auf anderen Chromosomen. Mit Hilfe der Technik des Genomischen Sequenzierens nach der Bisulfit-Methode bot sich nun die Möglichkeit, diese Veränderungen genauer zu untersuchen und quantitativ zu erfassen.

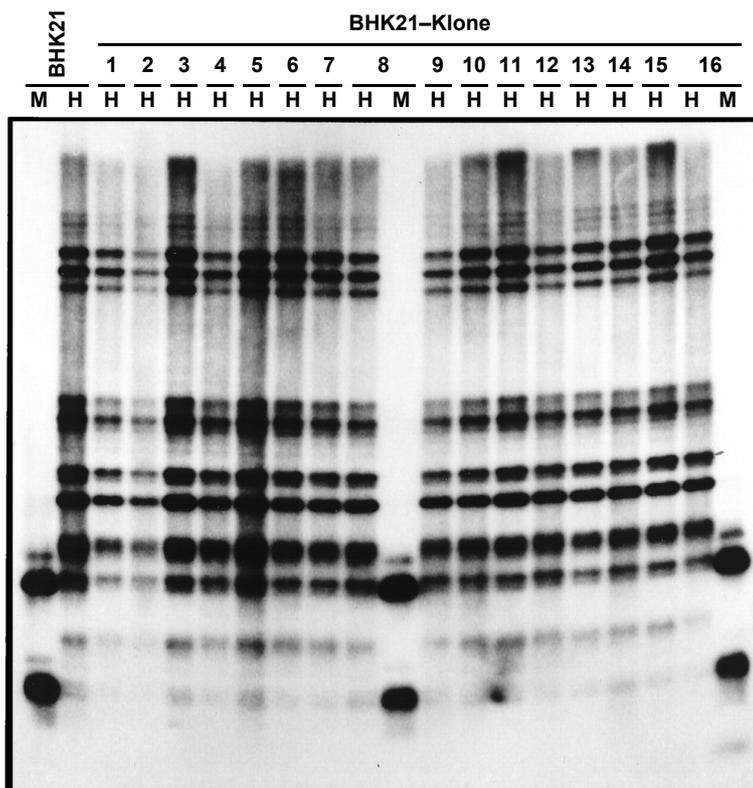


Abbildung 4:

Die Methylierungsmuster der IAP I-Gene sind in den BHK21-Klonen und der BHK21-Zelllinie identisch

In 66 einzelzellklonierten und 6 „Mock“-transfizierten BHK21-Klonen sind weder im *Hpa* II- noch im *Hha* I-Profil Unterschiede im Methylierungsmuster der IAP I-Gene gefunden worden. Diese Methylierungsmuster wichen nicht von dem in der BHK21-Zelllinie gefundenem ab.

Dieses Autoradiogramm zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Southern Blot-Analyse. Es wurden jeweils 3 μ g genomische DNA mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *Hpa* II gespalten („H“). Die mit „M“ bezeichneten Spuren zeigen das *Msp* I-Muster; die membrangebundenen DNAs wurden mit 32 P-markierter IAP I-DNA hybridisiert (entnommen aus: Remus et al., 1999; Abb. 8).

2. Genomisches Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode

2.1 Chemischer Hintergrund der Bisulfit-Behandlung

Das im Englischen „sodium bisulfite“ genannte Natriumhydrogensulfit („Bisulfit“) liegt im festen Zustand als Natriummetahydrogensulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) vor; in Wasser hydratisiert es zu NaHSO_3 . Bereits 1970 ist die Bisulfit-katalysierte Desaminierung von Cytosin beschrieben worden (Shapiro et al., 1970; Hayatsu et al., 1970a, b) wie auch die daraus resultierende mutagene Eigenschaft dieser Substanz (Hayatsu und Miura, 1970; Mukai et al., 1970). Die Umwandlung der Pyrimidinbase Desoxycytidin zu Desoxyuridin in einzelsträngiger DNA erfolgt in einer dreistufigen Reaktion (Abb. 5a). Das in leicht saurer Lösung (pH 5) größtenteils als HSO_3^- -Ion vorliegende Bisulfit addiert an die Position 6 des Pyrimidinringes, wodurch 5,6-Dihydrodesoxycytidin-6-sulphonat

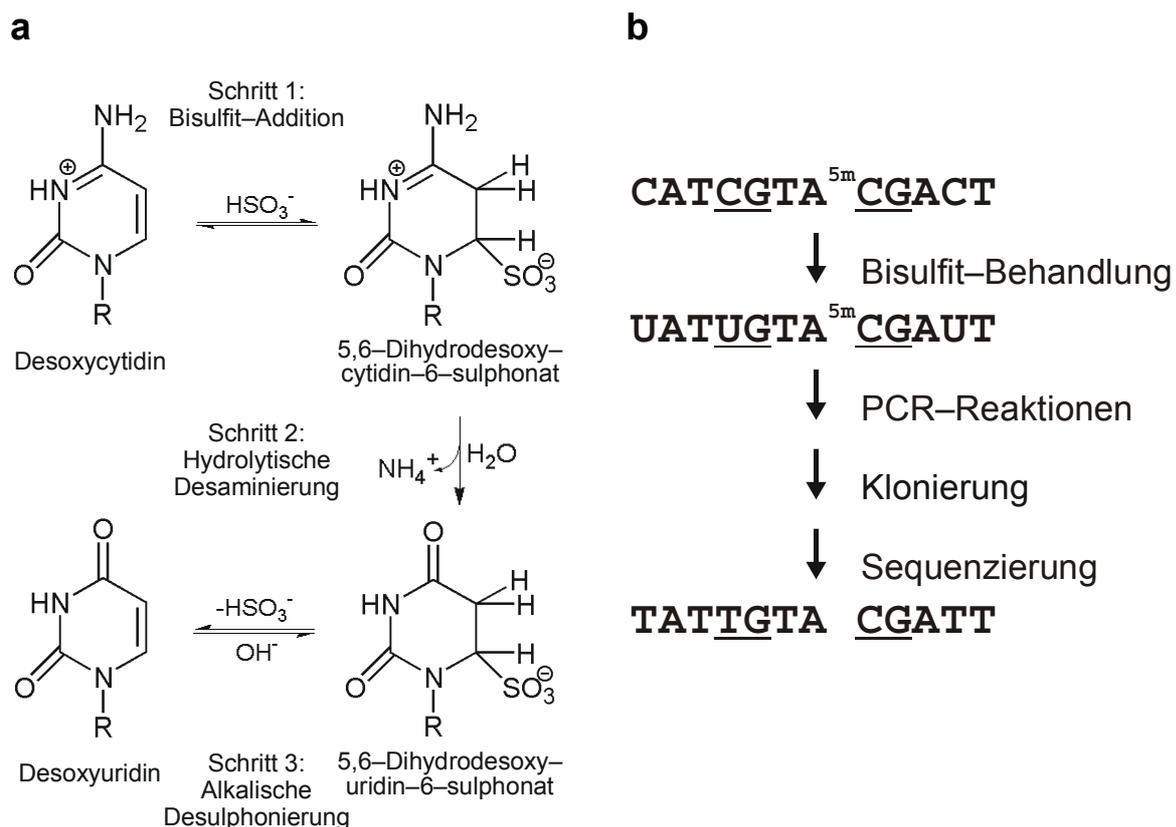


Abbildung 5:

Genomisches Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode

(a) Chemie der Bisulfit-Behandlung (modifiziert nach Hayatsu, 1976; Abb. 12)

(b) Schematische Darstellung der Arbeitsschritte und Angabe der Basenabfolge einer Beispielsequenz mit zwei 5'-CG-3'-Dinukleotiden (unterstrichen), von denen das zweite methyliert vorliegt. Alle unmethylierten Desoxycytidine werden in Desoxythymidine umgewandelt, 5-Methyl-Desoxycytidine erscheinen als Desoxycytidine. Das Vorhandensein von Desoxycytidinen nach der Sequenzierung zeigt an, in welchen Bereichen 5-Methyl-Desoxycytidine vorgelegen haben.

entsteht. In einem zweiten Schritt desaminiert dieses unter Beteiligung von SO_3^{2-} zu 5,6-Dihydrodesoxyuridin-6-sulphonat (Shapiro et al., 1974). Eine daran anschließende Alkalibehandlung eliminiert das Bisulfit, wodurch Desoxyuridin entsteht (Hayatsu et al., 1970b). Durch die Bisulfit-Behandlung wird also Desoxycytidin in das normalerweise nicht in der DNA vorkommende Desoxyuridin umgewandelt. In einer nachfolgenden Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, „PCR“) komplementiert das umgesetzte Desoxyuridin dann mit Desoxyadenosin, wodurch sich *de facto* die Transition eines Desoxycytidins zu einem Desoxythymidin ergibt (Abb. 5b). Unter den gewählten Bedingungen reagiert 5-Methyl-Desoxycytidin jedoch nicht mit Bisulfit (Hayatsu et al., 1970b; Frommer et al., 1992), weshalb dieses Nukleotid nach der PCR als Desoxycytidin vorliegt. Durch Bestimmung der Nukleotid-Sequenz der erhaltenen PCR-Produkte wird schließlich zwischen den methylierten und nicht-methylierten Desoxycytidinen unterschieden. Das Auftreten von Desoxycytidin in der ermittelten DNA-Sequenz weist auf das Vorhandensein von 5-Methyl-Desoxycytidin in der Ursprungs-DNA hin, während alle unmethylierten Desoxycytidine als Desoxythymidine erscheinen (Abb. 5b).

2.2 Vorteile dieser Technik gegenüber herkömmlichen Methylierungsanalysen

Durch Southern Blot-Analysen mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen (Waalwijk und Flavell, 1978) können nur diejenigen 5'-CG-3'-Dinukleotide untersucht werden, die sich in den palindromischen Erkennungssequenzen solcher Enzyme befinden. Mit dieser Technik kann also nur ein geringer Teil der in einer DNA-Sequenz vorhandenen 5-Methyl-Desoxycytidine identifiziert werden. Das bisherige Protokoll des Genomischen Sequenzieren, das auf der basenspezifischen chemischen Spaltung von DNA beruht (Church und Gilbert, 1984), ermöglicht bereits die Analyse aller 5-Methyl-Desoxycytidine, erfordert aber eine große Menge an genomischer DNA. Außerdem ist es mit dieser Technik schwierig, geringe Methylierungsgrade zuverlässig zu detektieren (C. Kämmer, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu erlaubt das Genomische Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode, alle 5-Methyl-Desoxycytidine bereits in geringen DNA-Mengen zu ermitteln. Ein weiterer Vorteil gegenüber den herkömmlichen Nachweisen von 5-Methyl-Desoxycytidin ist die Möglichkeit, den Methylierungsgrad einzelner 5'-CG-3'-Dinukleotide quantifizieren zu können. Aus den Sequenzdaten der klonierten PCR-Produkte läßt sich der prozentuale Methylierungsgrad errechnen. Die Klonierung der PCR-Produkte ist auch aus einem anderen Grunde sinnvoll. Aufgrund

der großen Zahl an IAP-Genen (schätzungsweise 1.800 Kopien pro Zellkern; Kuff et al., 1986) kann gerade in diesen PCR-Reaktionen nicht mit PCR-Produkten einheitlicher Länge gerechnet werden. Es ist zu erwarten, daß im Laufe der Evolution neben Punktmutationen auch Deletionen und Insertionen aufgetreten sind, weshalb eine direkte Sequenzierung des PCR-Gemischs nicht durchführbar ist.

2.3 Bestimmung der Methylierungsgrade

Die Vorgehensweise der Auswertung möchte ich hier aus Platzgründen am Beispiel des EBP3-Gens (siehe Kapitel IV.4.8) verdeutlichen (Abb. 6): Im oberen Teil (Abb. 6a) sind zehn Einzelsequenzen schematisch dargestellt, jedes Kästchen symbolisiert eine der 15 5'-CG-3'-Positionen im untersuchten Bereich des EBP3-Gens. Das Vorhandensein von 5-Methyl-Desoxycytidin ist durch ein grau-gefülltes Kästchen gekennzeichnet, die weißen Symbole stehen für unmethylierte 5'-CG-3'-Dinukleotide. Zur Quantifizierung wird nun der Anteil der methylierten Klone in jeder einzelnen Spalte bestimmt und wie im unteren Teil dargestellt als Prozentwert angegeben (Abb. 6b). In dieser Arbeit erfolgen alle Auswertungen der durch die Bisulfit-Sequenzierung gewonnenen Daten auf diese Weise. So ist es möglich, nicht nur den Gesamt-Methylierungsgrad zu bestimmen, sondern auch die Unterschiede an einzelnen 5'-CG-3'-Dinukleotiden aufzuzeigen.

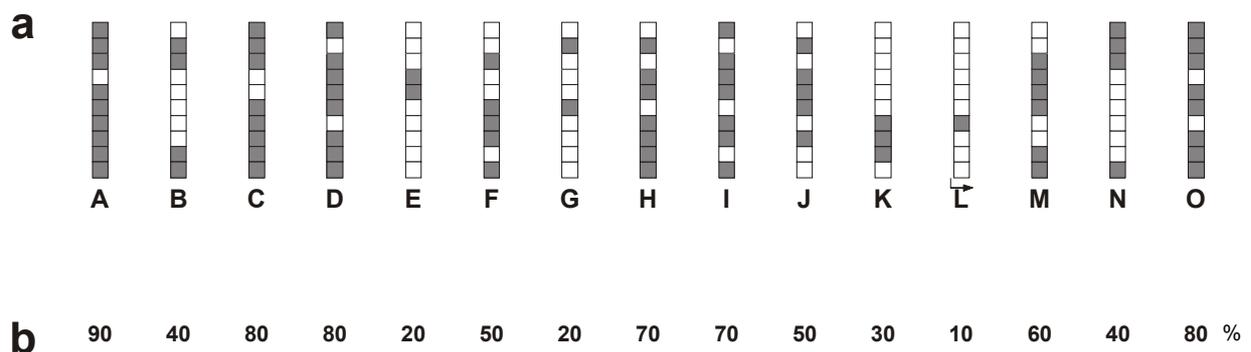


Abbildung 6:

Auswertung der Sequenzdaten

(a) schematische Darstellung der Methylierungsdaten der Einzelsequenzen

(b) prozentualer Anteil der methylierten Klone

Die im Promotor und ersten Exon des EBP3-Gens vorhandenen 5'-CG-3'-Dinukleotide sind mit den Buchstaben A bis O gekennzeichnet (vergleiche Tab. 9 im Kapitel IV.4.8), der Pfeil symbolisiert den Transkriptionsstart (Schofield et al., 1994).

3. Methylierungsmuster der IAP I-Gene

Die Ad12-transformierte BHK21-Zelllinie T637 (Strohl et al., 1970), die multiple Kopien der Ad12-DNA (Fanning und Doerfler, 1976) an einer chromosomalen Stelle integriert enthielt, zeigte in Southern Blot-Analysen einen deutlich höheren Methylierungsgrad in den IAP I-Genen als die Zelllinie BHK21 (Heller et al., 1995). In unserer Arbeitsgruppe waren mit Bakteriophagen λ - und pSV2neo-DNA kotransfizierte BHK21-Zelllinien isoliert worden, die zum Teil Änderungen im Methylierungsmuster der IAP I-Gene zeigten, wenn auch nicht so ausgeprägt wie die Zelllinie T637 (Kämmer, 1995; Remus, 1996; Heller, 1997). Von zweien dieser Klone, BHK21- λ 7 und BHK21- λ 10 (Remus et al., 1999), der Ursprungszelllinie BHK21 und der Zelllinie T637 wurde mit Hilfe der Bisulfit-Methode das Methylierungsmuster eines Teils des IAP I-Gens bestimmt.

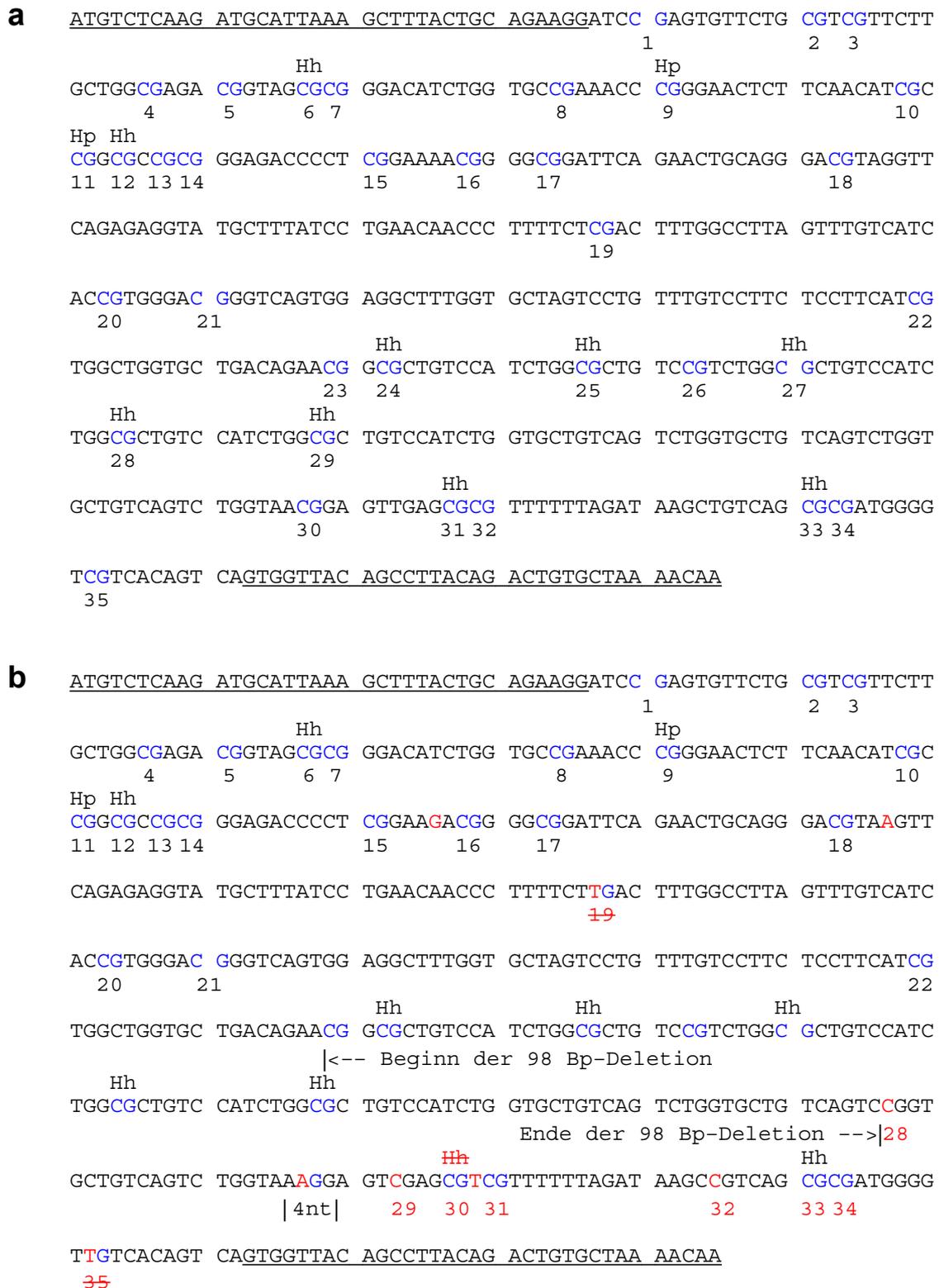
In der Diplomarbeit hatte ich zwischen einzelzellklonierten BHK21-Subklonen und der BHK21-Zelllinie in Southern Blot-Analysen keine Unterschiede im Methylierungsmuster feststellen können (Abb. 4). Da mit dieser Technik nur einige 5'-CG-3'-Dinukleotide hatten analysiert werden können, sind ebenfalls vier einzelzellklonierte BHK21-Zelllinien mit der Bisulfit-Methode untersucht worden, um eventuell vorhandene Variationen der Methylierungsgrade einzelner 5'-CG-3'-Dinukleotide in der Ursprungszelllinie finden zu können. Die Tab. 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Tabelle 3:
Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenzen
BHK21	spontan transformierte Nierenzelllinie des Syrischen Hamsters (ATCC CCL 10)	Stoker und Macpherson, 1964
T637	Ad12-transformierte BHK21-Zelllinie	Strohl et al., 1970
BHK21-λ7	mit Bakteriophage λ - und pSV2neo-DNA kotransfizierte BHK21-Zelllinien	Heller, 1997
BHK21-λ10		Heller, 1997
BHK21-1	einmal-einzelzellklonierte BHK21-Zelllinie	Remus, 1996
BHK21-2	einmal-einzelzellklonierte BHK21-Zelllinie	Remus, 1996
BHK21-3	dreimal-einzelzellklonierte BHK21-Zelllinie	Remus, 1996
BHK21-4	ohne DNA (mock) transfizierte BHK21-Zelllinie	Remus, 1996

3.1 Abweichungen zu der publizierten IAP-Sequenz (Ono et al., 1985)

In dem 456 Basenpaare großen Bereich des IAP I-Fragments zwischen den Primern p3 und p4 befanden sich in der publizierten Sequenz 35 5'-CG-3'-Dinukleotide, zwei davon in *Hpa* II- (5'-CCGG-3') und neun in *Hha* I- (5'-GCGC-3') Erkennungsstellen (Abb. 7a). Die meisten der klonierten PCR-Produkte wiesen zur publizierten Sequenz

**Abbildung 7:**

Verteilung der 5'-CG-3'-Dinukleotide im untersuchten IAP I-Fragment

(a) Ausschnitt aus der publizierten Sequenz (Nukleotide 292–816; Ono et al., 1985)

(b) Abweichungen der aus mehr als 660 Klonen abgeleiteten Consensus-Sequenz

Die 5'-CG-3'-Dinukleotide sind in blau dargestellt und durchnummeriert.

Hh und Hp kennzeichnen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Hha* I und *Hpa* II, die Abweichungen in der Consensus-Sequenz sind in rot dargestellt, die Bereiche der Deletionen sind angegeben (siehe Text).

Die unterstrichenen Sequenzabschnitte zeigen die Lokalisation der Primer P3 und P4 an.

eine Deletion von 98 Basenpaaren auf, die 18 Basenpaare stromab des 5'-CG-3'-Dinukleotids Nummer 22 lokalisiert war (Abb. 8). In diesem Bereich waren sieben 5'-CG-3'-Dinukleotide, davon fünf in *Hha* I-Sequenzen, publiziert. Im Abstand von weiteren 19 Basenpaaren war ein Tetranukleotid in etwa der Hälfte der Klone deletiert. Das 5'-CG-3'-Dinukleotid, das sich darin befinden sollte, lag in fast allen Klonen, die diese zusätzliche Sequenz enthielten, als 5'-AG-3'-Dinukleotid vor. Die Auswertung von mehr als 600 Klonen ergab weitere Sequenzabweichungen, von denen einige erneut 5'-CG-3'-Dinukleotide betrafen. Drei in vielen Klonen methyliert vorliegende 5'-CG-3'-Dinukleotide waren als 5'-TG-3'-Dinukleotide publiziert (die Positionen 28, 29 und 32). Aufgrund der Vielzahl an Abweichungen wurden die stromab der großen Deletion gelegenen 5'-CG-3'-Dinukleotide mit 28 beginnend neu nummeriert (Abb. 7b). Durch ein zusätzlich vorhandenes Nukleotid benachbart zur Position 30 stellte sich heraus, daß hier keine *Hha* I-Erkennungssequenz vorlag. Die Positionen 19 und 35 waren nur in wenigen Klonen methyliert; statt der publizierten 5'-CG-3'-Dinukleotide waren hauptsächlich 5'-TG-3'-Dinukleotide vorhanden gewesen. Letztendlich enthielt der untersuchte Bereich 28 5'-CG-3'-Dinukleotide, von denen sich zwei in einer *Hpa* II- und drei in einer *Hha* I-Erkennungssequenz befanden. Die nur in einem Teil der Klone enthaltenen 5'-CG-3'-Dinukleotide zwischen den Positionen 22 und 28 wurden nicht in die spätere Auswertung einbezogen. Einen Überblick über die analysierte Region gibt die Abb. 8.

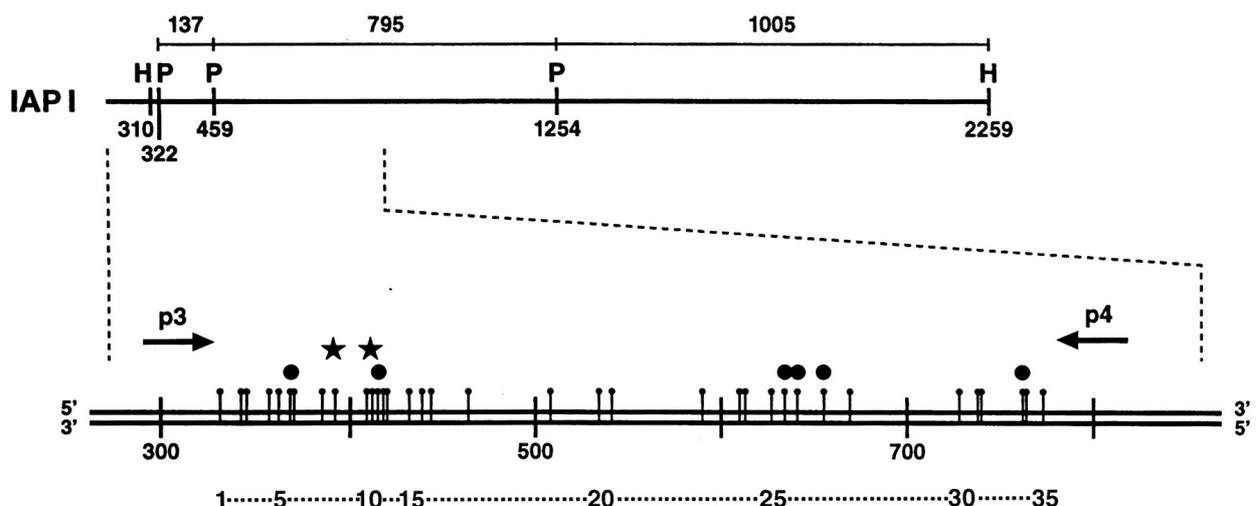


Abbildung 8:

Karte der IAP I-Region (Ono et al., 1985)

Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen in der veröffentlichten Sequenz wieder. H und P markieren Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Pst* I, die Größe der resultierenden Fragmente ist ebenfalls angegeben. Senkrechte Linien stellen die untersuchten 5'-CG-3'-Dinukleotide dar, Sterne kennzeichnen die *Hpa* II-, Kreise die *Hha* I-Erkennungssequenzen; Pfeile symbolisieren die verwendeten Primer p3 und p4.

3.2 Auswertung der IAP I-Sequenzen

Zur Ermittlung der Methylierungsgrade in dem untersuchten IAP I-Fragment wurde die im Kapitel IV.2.3 beschriebene Art der Auswertung modifiziert. In allen sequenzierten Klonen befanden sich mehrere Sequenzabweichungen in Form von Punktmutationen, die in einigen Fällen auch die 5'-CG-3'-Dinukleotide betrafen. Für die Auswertung der jeweiligen 5'-CG-3'-Positionen wurden deshalb immer nur die Anzahl an Sequenzen herangezogen, die ein 5'-CG-3'-Dinukleotid hätten enthalten können. Alle Klone, die an diesen Positionen weder ein 5'-CG-3'- noch ein 5'-TG-3'-Dinukleotid aufwiesen, wurden nicht mitgezählt. Anhand der mit der Bisulfit-Methode ermittelten Sequenzen konnte nicht erkannt werden, welche der gefundenen Desoxythymidine ursprünglich Desoxycytidine gewesen waren und welche bereits als Desoxythymidine vorgelegen hatten (siehe Abb. 5b). Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, daß einige der 5'-TG-3'-Dinukleotide ebenfalls auf Punktmutationen beruhten und somit keine unmethylierten Positionen darstellten. Diese mögliche Fehlerquelle konnte jedoch aufgrund der großen Zahl an untersuchten Sequenzen vernachlässigt werden, und auch deshalb, weil alle Hamster-DNAs davon in gleichem Maße betroffen waren.

3.3 Vergleich der transgenen Zelllinien

Um den Methylierungsstatus in der BHK21-Zelllinie zu bestimmen, wurden 123 Klone sequenziert. Es zeigte sich, daß der Methylierungsgrad des IAP-Fragments je nach 5'-CG-3'-Position 27,8 bis 87,5 % betrug; über den gesamten Bereich gemittelt ergab sich ein Wert von 57,8 % (Tab. 4). Die Auswertung von 79 Klonen der als Vergleich analysierten Ad12-transformierten Zelllinie T637 ergab mit durchschnittlich 79,4 % einen deutlich höheren Methylierungsgrad als in der Ursprungszelllinie BHK21; die Einzelwerte variierten zwischen 54,5 und 94,7 %. Mit der Bisulfit-Methode konnten also die älteren Southern Blot-Daten bestätigt werden (Heller et al., 1995). Die Zelllinien BHK21- λ 7 und BHK21- λ 10 wiesen mit 35,2 bis 84,9 % und 34,3 bis 87,9 % teilweise ebenfalls erhöhte Werte gegenüber der Zelllinie BHK21 auf. Der durchschnittliche Methylierungsgrad von 58 und 73 Klonen lag mit 62,5 und 65,1 % signifikant über dem der Ursprungszelllinie, aber deutlich unter dem der Zelllinie T637 (79,4 %). Auch diese Beobachtung stand in Einklang mit vorangegangenen Southern Blot-Analysen (Heller, 1997).

Für einen vereinfachten Vergleich wurden der Methylierungsgrad eines jeden einzelnen 5'-CG-3'-Dinukleotids der transgenen Zelllinien in Relation zu dem entsprechenden

Tabelle 4:

DNA-Methylierung der einzelnen 5'-CG-3'-Dinukleotide in den transgenen Zelllinien und der Ursprungszelllinie BHK21

5'-CG-3'- Positionen	Methylierungsstatus der einzelnen Zelllinien in Prozent (%)			
	BHK21	T637	BHK21-λ7	BHK21-λ10
1	39,8	77,3	42,6	47,2
2	51,8	82,4	72,0	70,1
3	54,8	81,6	65,3	65,7
4	46,6	70,3	51,0	66,7
5	79,6	88,9	86,5	83,3
6 ^a	65,2	90,4	76,9	76,9
7	73,0	90,0	79,6	83,8
8	65,4	86,1	78,8	77,5
9 ^b	67,9	85,1	67,3	85,5
10	67,9	86,8	64,3	64,3
11 ^b	87,5	93,3	84,9	87,9
12 ^a	48,6	67,1	39,2	56,5
13	66,0	83,1	62,5	78,1
14	72,1	94,7	64,3	82,4
15	67,6	83,3	57,7	77,9
16	68,4	76,7	57,7	77,5
17	51,0	75,0	52,0	52,3
18	48,6	58,0	35,8	47,1
20	42,0	79,5	66,0	62,0
21	27,8	61,5	41,1	53,4
22	37,8	70,1	43,6	37,3
28	44,1	69,2	43,9	35,8
29	35,0	54,5	35,2	34,3
30	60,0	92,9	60,7	52,5
31	50,9	77,8	77,4	45,5
32	73,5	83,6	80,8	73,5
33 ^a	58,9	77,6	82,1	72,6
34	65,2	86,3	82,1	76,5
Anzahl der Klone	123	79	58	73

^a Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease *Hha* I (5'-GCGC-3')

^b Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease *Hpa* II (5'-CCGG-3')

Wert der Ursprungszelllinie BHK21 standardisiert; die BHK21-Werte wurden dabei als 1,000 gesetzt (Tab. 5). Für die Zelllinie T637 ergab sich an den meisten Positionen eine Zunahme der Methylierung um 20 bis 57 %; in vier Fällen betrug die Werte etwa das Doppelte der BHK21-Zelllinie. Nur die Positionen 5, 16 und 32 wiesen vergleichbare Werte wie die Ursprungszelllinie auf; diese hatten aber bereits dort mit 70 bis 80 % einen hohen Methylierungsgrad. In der Zelllinie BHK21-λ7 ergab sich für viele der

Tabelle 5:

Zur Ursprungszelllinie relativierte Methylierung der 5'-CG-3'-Dinukleotide in den transgenen Zelllinien

5'-CG-3'- Positionen	relativer Methylierungsgrad der einzelnen Zelllinien			
	BHK21	T637	BHK21- λ 7	BHK21- λ 10
1	1,000	1,942	1,070	1,186
2	1,000	1,591	1,390	1,353
3	1,000	1,489	1,192	1,199
4	1,000	1,509	1,094	1,431
5	1,000	1,117	1,087	1,046
6	1,000	1,387	1,179	1,179
7	1,000	1,233	1,090	1,148
8	1,000	1,317	1,205	1,185
9	1,000	1,253	0,991	1,259
10	1,000	1,278	0,947	0,947
11	1,000	1,066	0,970	1,005
12	1,000	1,381	0,807	1,163
13	1,000	1,259	0,947	1,183
14	1,000	1,313	0,892	1,143
15	1,000	1,232	0,854	1,152
16	1,000	1,121	0,844	1,133
17	1,000	1,471	1,020	1,025
18	1,000	1,193	0,737	0,969
20	1,000	1,893	1,571	1,476
21	1,000	2,212	1,478	1,921
22	1,000	1,855	1,153	0,987
28	1,000	1,569	0,989	0,812
29	1,000	1,557	1,006	0,980
30	1,000	1,548	1,012	0,875
31	1,000	1,528	1,521	0,894
32	1,000	1,137	1,099	1,000
33	1,000	1,317	1,394	1,233
34	1,000	1,324	1,259	1,173

Die Methylierungsdaten aus der Tab. 4 sind in Relation zu den entsprechenden Werten der Ursprungszelllinie BHK21 aufgelistet, deren Werte hier als 1,000 gesetzt worden sind. Die deutlichsten Veränderungen in den beiden für Bakteriophagen λ -DNA transgenen Zelllinien sind durch Fettdruck hervorgehoben.

5'-CG-3'-Dinukleotide kein Unterschied im Methylierungsgrad. Einige zeigten jedoch mit bis zu 57 % Steigerung signifikante Veränderungen, unter anderem auch zwei der *Hha* I-Erkennungssequenzen (Positionen 6 und 33) mit um etwa 18 und 40 % höheren Werten. Die Zelllinie BHK21- λ 10 wies in etwa der Hälfte der 5'-CG-3'-Dinukleotide Werte auf, die zwischen 13 und 26 % höher waren als in der Zelllinie BHK21; in vier weiteren Positionen fanden sich Zunahmen von 35 bis 92 %. In dieser Zelllinie lagen alle *Hha* I-Erkennungssequenzen um 16 bis 23 % häufiger methyliert vor als in der

Ursprungszelllinie. Dieses Resultat bestätigte erneut die früheren Restriktionsanalysen (Heller, 1997).

Eine graphische Darstellung der Daten aus der Tab. 4 zeigt die Abb. 9. Es ist zu erkennen, daß die Methylierungsgrade beider BHK21- λ -Zelllinien größtenteils deutlich über denen der BHK21-Zelllinie liegen, aber nur selten an die der Zelllinie T637 heranreichen. Im Bereich zwischen den Positionen 9 und 18 ist die DNA der Zelllinie BHK21- λ 7 weniger stark methyliert als die DNA der Ursprungszelllinie. Dasselbe gilt für die Zelllinie BHK21- λ 10 im Bereich zwischen den sechs 5'-CG-3'-Dinukleotiden 22 und 32.

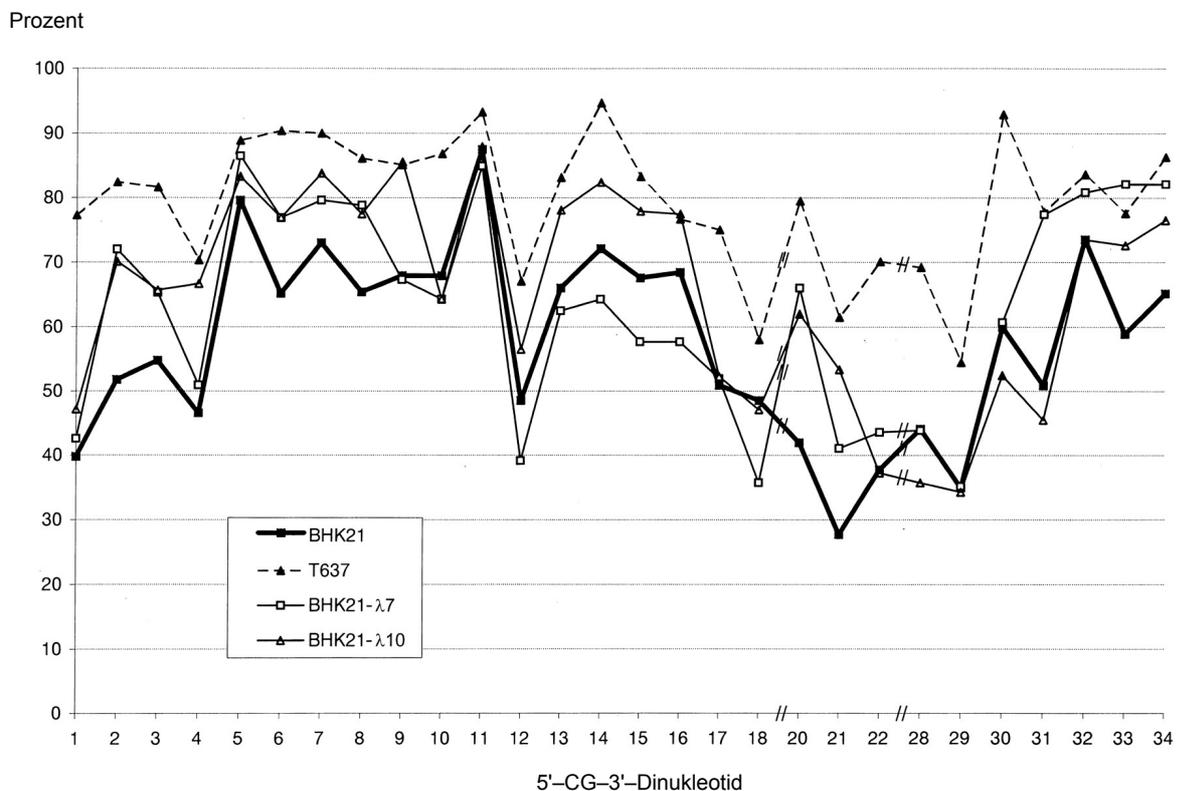


Abbildung 9:

Vergleich der DNA-Methylierungsgrade der transgenen Zelllinien und der Ursprungszelllinie BHK21. Um einen einfacheren Vergleich zu ermöglichen, wurden die Methylierungsdaten aus der Tab. 4 graphisch dargestellt. Die fettgedruckte Linie entspricht den Werten der Ursprungszelllinie BHK21, die gestrichelte denen der Ad12-transformierten Zelllinie T637, die in früheren Restriktionsanalysen bereits eine deutlich stärkere Methylierung aufgewiesen hatte (Heller et al., 1995). Auch in dieser Darstellung zeigen die DNAs beider für Bakteriophagen λ -DNA transgener Zelllinien deutliche Veränderungen im Methylierungsgrad vieler 5'-CG-3'-Dinukleotide.

3.4 Variabilität des Methylierungsgrads in subklonierten BHK21–Zelllinien

Um eventuell zwischen Subpopulationen der Zelllinie BHK21 bestehende Unterschiede im Methylierungsstatus bestimmen zu können, wurden vier Kontroll–Zelllinien mit der Bisulfit–Methode untersucht (Tab. 3). Zwei dieser Zelllinien, BHK21–1 und BHK21–2, waren durch einmalige Einzelzellklonierung aus der Ursprungszelllinie hervorgegangen; die Zelllinie BHK21–3 war dreimal einzelzellkloniert worden. Die Zelllinie BHK21–4 entstammte einem Transfektionsexperiment, bei dem keinerlei DNA eingesetzt worden war (sogenannte „Mock“–Transfektion), und diente zur Überprüfung eines etwaigen Einflusses der Transfektionsbedingungen auf das zelluläre Methylierungsmuster. Durch Southern Blot–Analysen hatten in diesen Zelllinien keine Methylierungsänderungen in den IAP I–Sequenzen gefunden werden können (Remus, 1996). Um Vergleichswerte zu erhalten, wurde in diesem Experiment erneut der Methylierungsstatus in den Zelllinien BHK21 und T637 ermittelt.

Zwischen den subklonierten BHK21–Zelllinien fanden sich in der untersuchten Region Variationen im Methylierungsgrad, die Werte waren aber vergleichbar mit denen der Ursprungszelllinie. Die relativierten Methylierungsdaten zeigten, daß es sich dabei nur um geringfügige Veränderungen handelte (Tab. 6). Die Zelllinie T637 hingegen wies erneut deutlich erhöhte Werte auf. Somit konnten die in den für Bakteriophagen λ –DNA transgenen Zelllinien beobachteten Methylierungsänderungen nicht auf bestehende Unterschiede in der BHK21–Zelllinie zurückgeführt werden. Natürlich war trotzdem nicht ganz auszuschließen, daß in der Ursprungszelllinie einzelne Zellen existierten, deren Methylierungsstatus stärker variierte.

Tabelle 6:

Zur Ursprungszelllinie BHK21 relativierte Methylierung der 5'-CG-3'-Dinukleotide in den subklonierten BHK21-Zelllinien und der Zelllinie T637

5'-CG-3'- Positionen	relativer Methylierungsgrad der einzelnen Zelllinien					
	BHK21 (68)	T637 (43)	BHK21-1 (50)	BHK21-2 (60)	BHK21-3 (54)	BHK21-4 (60)
1	1,000	1,445	0,850	0,602	1,062	0,837
2	1,000	1,255	0,931	0,840	1,148	1,091
3	1,000	1,154	0,874	0,831	0,822	0,822
4	1,000	1,276	1,050	0,841	0,855	0,855
5	1,000	1,050	1,014	1,002	1,027	1,027
6	1,000	1,149	0,996	1,010	1,010	1,010
7	1,000	1,094	0,899	0,987	0,946	0,938
8	1,000	0,999	0,900	0,823	0,910	0,901
9	1,000	1,062	0,894	0,847	0,892	1,013
10	1,000	1,086	0,894	0,996	1,107	0,880
11	1,000	1,058	1,076	1,014	1,120	1,125
12	1,000	0,977	0,843	0,628	0,870	0,915
13	1,000	1,146	1,106	1,018	1,123	1,039
14	1,000	1,231	1,061	0,963	0,994	0,930
15	1,000	1,048	0,917	0,998	0,940	0,962
16	1,000	1,083	0,785	0,787	0,920	0,983
17	1,000	1,279	0,777	0,569	0,678	0,976
18	1,000	1,728	1,395	0,966	1,111	1,277
20	1,000	1,123	0,788	0,915	0,946	0,899
21	1,000	1,534	0,810	0,704	1,230	1,112
22	1,000	1,182	0,912	0,523	1,043	0,818
28	1,000	1,085	0,986	0,775	0,890	0,901
29	1,000	0,842	0,738	0,611	0,861	0,927
30	1,000	1,247	1,107	1,089	1,063	1,116
31	1,000	1,337	0,906	0,825	1,047	0,986
32	1,000	1,050	0,909	1,006	0,948	0,945
33	1,000	1,194	0,891	0,992	0,982	1,049
34	1,000	1,213	0,933	0,999	1,090	1,035

Die hier angegebenen Daten sind wie die den Tab. 4 und 5 aus einem davon unabhängigen Experiment ermittelt worden; die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der jeweils sequenzierten Klone wieder.

4. Der Methylierungsstatus in den Promotoren von drei menschlichen Genen

Im zweiten Teil der Dissertation sollte der Methylierungsstatus in den Promotoren dreier menschlicher Gene bestimmt werden. Dabei handelte es sich um die Gene für die Erythrozytenmembranskelettproteine β -Spectrin, AE1 und Pallidin. Neben der Analyse von DNA aus Zellkulturen, die verschiedenen Entwicklungsstadien der erythroiden Linie entsprachen, sollte auch die Methylierung in verschiedenen Patienten-DNAs bestimmt werden.

4.1 Die Zelllinie UT-7

Die megakaryoblastische Leukämiezelllinie UT-7 ist in der Lage, durch Behandlung mit Erythropoetin (EPO) in erythroide Zellen zu differenzieren (Komatsu et al., 1991). Nach Langzeitkultivierung mit dem Kolonie-stimulierenden Faktor für Granulozyten und Makrophagen (GM-CSF) ist eine Subzelllinie (UT-7/GM) mit der Fähigkeit isoliert worden, sowohl in die erythroide als auch in die megakaryozytische Linie differenzieren zu können (Komatsu et al., 1997). Wird GM-CSF durch EPO ersetzt, entwickeln sich diese Zellen ebenfalls zu erythroiden Vorläuferzellen. Diese Zelllinien befinden sich also zu Beginn der erythroiden Linie und können somit für Methylierungsstudien in frühen erythropoetischen Zellen dienen.

Deshalb wurde DNA aus den erythroiden Zellen analysiert, die entweder nach EPO-Behandlung direkt aus der Zelllinie UT-7 hervorgegangen waren (UT-7/EPO) oder aus der Subzelllinie UT-7/GM, die anstelle von GM-CSF mit EPO kultiviert worden war (UT-7/GM/EPO). Als Kontrolle für nicht-erythroide Zellen diente die nur mit GM-CSF behandelte Zelllinie UT-7/GM. Zusätzlich wurden auch mit GM-CSF, aber nicht mehr mit EPO behandelte UT-7/EPO-Zellen untersucht (UT-7/EPO/GM). Einen Überblick über die verwendeten UT-7-Zelllinien gibt die Abb. 10.

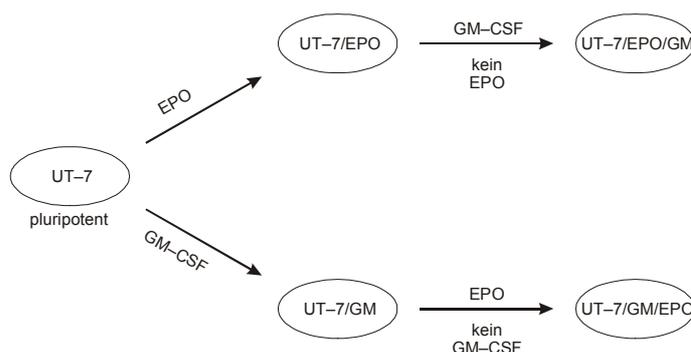


Abb. 10:

Die verwendeten UT-7-Zelllinien
(modifiziert nach Komatsu et al., 1997;
Abb. 14)

4.2 Kultivierte Erythroblasten

Die 2 Phasen-Flüssigkultur gestattet es, selektiv Vorläuferzellen der erythroiden Linie (BFU-E und CFU-E) aus peripheren Blut zum Wachstum anzuregen (Wada et al., 1990). Dazu werden die mononukleären Blutzellen in Gegenwart von Interleukin-3 und Stammzellfaktor sieben Tage unter hypoxischen Bedingungen kultiviert (1. Phase). Die nicht-phagozytischen Zellen werden dann in Gegenwart von Stammzellfaktor, EPO und Transferrin rekultiviert (2. Phase). Zu Beginn der 2. Phase befinden sich in dieser Kultur fast ausschließlich nicht-erythroide Zellen (zu etwa 99 %), während bereits am Tag 5 etwa 45 % der Zellen der erythroiden Linie angehören. Bis zu den Tagen 10 und 15 erhöht sich deren Anteil auf 90 und 92 % (Wada et al., 1999). Die meisten dieser Zellen sind Erythroblasten; zu den späteren Zeitpunkten liegen etwa 20 bis 25 % Erythrozyten ohne Zellkern vor.

Für die Analyse des Methylierungsmusters der Erythroblasten wurden DNAs aus Zellen der Zeitpunkte 0, 5, 10 und 15 Tage nach Beginn der zweiten Phase verwendet.

4.3 Nicht-erythroide Zelllinien

Als weitere nicht-erythroide Kontrollen wurden kultivierte Zellen der Mundschleimhaut (KB) und eines Cervix-Karzinoms (HeLa) in die Untersuchung eingeschlossen.

4.4 Patienten

Es wurden DNAs von 15 Patienten mit Störungen im Erythrozytenmembranskelett untersucht (P1 bis 15). In den Erythrozyten des Patienten mit der *de novo*-Mutation im β -Spectrin-Gen SPTB, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führte (P1), lag zu 16,3 % ein verkürztes Protein vor. Sechs Patienten trugen Mutationen im Pallidin-Gen ELB42 (P2 bis 7); in ihren Erythrozyten war kein Pallidin (auch Protein 4.2 oder P4.2 genannt) vorhanden. Bei drei weiteren Patienten waren Mutationen im Bereich des AE1-Gens EPB3 gefunden worden (P8 bis 10); ihre Erythrozyten enthielten verringerte Mengen sowohl von AE1 als auch von Pallidin. Zusätzlich wurden DNAs von fünf Patienten analysiert, bei denen in keinem dieser Gene Mutationen nachgewiesen werden konnten (P11 bis 15). In der Tab. 7 sind die beobachteten Mutationen, die Genotypen aller untersuchten Patienten und die in ihren Erythrozyten gefundenen Veränderungen im Proteingehalt aufgelistet.

Tabelle 7:

Liste der Patienten mit Störungen im Erythrozytenmembranskelett

Patient	betroffenes Gen	Name der Mutation	Art der Mutation	Genotyp	betroffene Proteine	Referenzen
P1	SPTB	β-Spectrin Nagoya (<i>de novo</i> -Mut.)	Nonsense 6205G→T (E2069X)	heterozygot	verkürztes β-Spectrin: 16,3 %	Maillet et al., 1996
P2	ELB42	P4.2 Nippon	Missense 424G→A	homozygot	kein Pallidin	Bouhassira et al., 1992 und Inoue et al., 1994
P3			(A142T)	homozygot	kein Pallidin	
P4				homozygot	kein Pallidin	
P5		P4.2 Komatsu	Missense 523G→T (D175Y)	homozygot	kein Pallidin	Kanzaki et al., 1995a
P6		P4.2 Shiga	Missense 949C→T (R317C)	„zusammen- gesetzt“	kein Pallidin	Kanzaki et al., 1995b
P7	und Missense 424G→A (A142T)		heterozygot	kein Pallidin		
P8	EPB3	B3 Fukuyama I	Frameshift 112–113 1 Bp Del.	heterozygot	-17 % AE1	Yawata et al., 2000
P9				heterozygot	-11 % Pallidin	
P10		B3 Fukuoka	Missense 388G→A (G130R)	homozygot	-30 % AE1 -60 % Pallidin	Inoue et al., 1998
P11			unbekannt			
P12			unbekannt			
P13			unbekannt			
P14			unbekannt			
P15			unbekannt			

4.5 Familienangehörige

Es waren teilweise auch DNAs von Familienmitgliedern der Patienten verfügbar. Die Familienangehörigen, die keinerlei Mutationen in den untersuchten Genen aufwiesen, wurden in die Gruppe der gesunden Kontrollpersonen integriert (K1 bis 4). Diejenigen Verwandten, die zwar heterozygot bezogen auf eine der Mutationen waren, aber keinen krankhaften Phänotyp aufwiesen, wurden mit H1 bis 9 bezeichnet. Der für die Mutation P4.2 Nippon heterozygote Proband H3, der ebenfalls einen normalen Phänotyp zeigte, war mit keinem der Patienten verwandt (Tab. 8).

Tabelle 8:

Liste der Familienangehörigen und anderen Kontrollpersonen

Proband	Familienangehörigkeit	Genotyp
K1	Vater von P1	normal
K2	Mutter von P1	normal
H1	Vater von P2	heterozygot (P4.2 Nippon)
H2	Mutter von P2	heterozygot (P4.2 Nippon)
K3	Ehefrau von P3	normal
H3	- - -	heterozygot (P4.2 Nippon)
H4	Tochter von P5	heterozygot (P4.2 Komatsu)
H5	Tochter von P5	heterozygot (P4.2 Komatsu)
H6	Tochter von P6	heterozygot (P4.2 Shiga, 949C→T)
H7	Tochter von P6	heterozygot (P4.2 Shiga, 949C→T)
K4	Ehemann von P8, Vater von P9	normal
H8	Vater von P10	heterozygot (B3 Fukuoka)
H9	Mutter von P10	heterozygot (B3 Fukuoka)
K5	- - -	normal
K6	- - -	normal
K7		
bis	- - -	nicht bestimmt
K16		
S	- - -	nicht bestimmt

Alle hier aufgeführten Probanden (auch die heterozygoten Mutationsträger) weisen keinen anämischen Phänotyp auf. Der Proband H3, ein gesunder heterozygoter Träger des P4.2 Nippon-Allels, ist mit keinem der Patienten verwandt. Bei den Probanden K5 und K6 handelt es sich um japanische, bei den Probanden K7 bis K16 um europäische Kontrollpersonen; mit S ist die aus Spermien gewonnene DNA bezeichnet. Die Genotypen der Europäer sind nicht bestimmt worden.

4.6 Kontrollpersonen

Neben den DNAs der vier Familienangehörigen ohne Mutationen in den betreffenden Genen standen zwölf weitere DNAs gesunder Kontrollpersonen zur Verfügung. Von diesen waren zwei von japanischer (K5 und 6), die restlichen zehn von europäischer Abstammung (K7 bis 16). Als letzte Probe wurde aus Spermien gewonnene DNA untersucht (S).

4.7 DNA-Methylierung im Promotor des β -Spectrin-Gens (SPTB)

Aus dem für erythroide Zellen spezifischen SPTB-Promotor wurde ein 470 Basenpaare großes Fragment amplifiziert, in dem sich (gemäß der veröffentlichten Sequenz) 49 5'-CG-3'-Dinukleotide befinden sollten (Gallagher et al., 1999). Die Auswertung der sequenzierten PCR-Produkte ergab jedoch, daß zwei davon auf Abweichungen in der publizierten Sequenz beruhten. Die verbliebenen 47 Positionen waren sowohl in DNAs der verschiedenen UT-7 Zelllinien als auch zu allen untersuchten Zeitpunkten der 2 Phasen-Flüssigkultur komplett unmethyliert. Auch in Leukozyten-DNAs gesunder Kontrollpersonen konnte keinerlei Methylierung festgestellt werden, ebensowenig in DNAs des β -Spectrin Patienten und einiger Patienten mit Pallidin-Defizienz. In einem Teil der Sequenzen traten vereinzelte Desoxycytidine auf, von denen sich jedoch nur wenige im Kontext mit Desoxyguanosin befanden. Die ermittelte Gesamt-Methylierung betrug etwa 0,7 % (Daten nicht gezeigt); dieser Wert liegt jedoch im Bereich der Fehlerrate, mit der die *Taq* DNA-Polymerase falsche Nukleotide inkorporiert. Also konnte davon ausgegangen werden, daß der SPTB-Promotor komplett unmethyliert vorlag. Da sich selbst im Patienten mit der β -Spectrin-Mutation keine Zunahme des Methylierungsgrades zeigte, wurde auf eine systematische Analyse der restlichen Patienten verzichtet.

4.8 Methylierungsstatus des AE1-Gens EPB3 (Promotor und Exon 1)

Für die Analyse des EPB3-Promotors wurde ein 471 Basenpaare großes Fragment amplifiziert, das — wie in der veröffentlichten Sequenz — 15 5'-CG-3'-Dinukleotide enthielt (Schofield et al., 1994). Davon befanden sich elf, mit A bis K bezeichnet, im Bereich des Promotors, die restlichen vier (L bis O) im Exon 1 (siehe Abb. 6 im Kapitel IV.2.3 und Tab. 9 bis 12). In einem Teil der Sequenzen (2 Phasen-Flüssigkultur der Tage 0 und 5 und Zelllinie UT-7/EPO) wurde ein Primer verwendet, mit dem die Position O nicht analysiert werden konnte; dies ist in der Tab. 9 durch ein „n.a.“ (nicht auswertbar) gekennzeichnet.

In den DNAs, die zu den verschiedenen Zeitpunkten aus der 2 Phasen-Flüssigkultur gewonnen worden waren, ergab sich für die meisten der 5'-CG-3'-Dinukleotide ein recht hoher Methylierungsgrad von 67 bis 100 %. Die Position G war mit nur 14 bis 75 % deutlich weniger stark methyliert, die Position E zeigte einen etwas geringeren Methylierungsgrad als die Nachbarpositionen.

Die Methylierungsgrade in allen UT-7 abgeleiteten Zelllinien lagen deutlich unter den für die 2 Phasen-Flüssigkultur bestimmten. Einige der 5'-CG-3'-Dinukleotide waren kaum methyliert, in drei Fällen lag überhaupt keine Methylierung vor. Die Zelllinie UT-7/GM wies weder nach EPO- noch nach GM-CSF-Behandlung Methylierung in der Position E auf. Hier schien eine Punktmutation des 5'-CG-3'-Dinukleotids vorzuliegen. In den DNAs von KB- und HeLa-Zellen wurde ebenfalls eine deutlich geringere Methylierung beobachtet, jedoch mit einem gänzlich anderem Methylierungsmuster.

Tabelle 9:

Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der Erythroblastenkultur und der verschiedenen Zelllinien

5'-CG-3' Position	Methylierungsstatus in Prozent (%)									
	Tag 0	Tag 5	Tag 10	Tag 15	UT-7	UT-7/ EPO	UT-7/ GM	UT-7/ GM/ EPO	KB	HeLa
A	89	86	100	100	94	90	88	50	56	75
B	78	86	100	75	50	40	63	100	78	0
C	78	100	80	100	63	80	75	100	78	0
D	89	71	87	92	69	80	88	50	100	75
E	78	57	87	58	13	20	0	0	67	75
F	89	86	93	100	44	50	38	75	56	50
G	67	14	33	75	0	20	25	25	33	0
H	67	86	93	92	50	70	50	75	33	25
I	67	86	93	100	81	70	63	100	78	100
J	78	71	100	83	50	50	75	75	56	100
K	100	100	67	100	50	30	38	75	67	50
L	100	71	73	67	19	10	63	50	0	0
M	78	71	100	92	50	60	63	75	11	50
N	100	71	93	92	50	40	100	100	33	75
O	n.a.	n.a.	93	92	n.a.	80	88	100	22	0
Klone	9	7	15	12	16	10	8	4	9	4

In einem Teil der Sequenzen ist ein Primer verwendet worden, mit dem die Position O nicht ausgewertet werden konnte; diese sind durch ein „n.a.“ gekennzeichnet.

In den DNAs gesunder Probanden wurde ein ähnlicher hoher Grad an Methylierung und ein ähnliches Methylierungsmuster gefunden wie in den DNAs aus der 2 Phasen-Flüssigkultur. Auch hier war die Position G mit 13 bis 67 % nur gering, die Position E mit maximal 78 % weniger stark methyliert als die restlichen 5'-CG-3'-Dinukleotide. In den DNAs der japanischen (K1 bis 6) und denen der europäischen Kontrollpersonen (K7 bis 16) wurden vergleichbare Methylierungsmuster beobachtet. Die aus Spermien

gewonnene DNA jedoch wies eine deutlich stärkere Methylierung auf. Die meisten der 5'–CG–3'–Dinukleotide waren in fast allen Klonen methyliert, lediglich die Position E lag mit 56 % deutlich geringer methyliert vor (Tab. 10). Diese Daten zeigten, daß das Methylierungsmuster in Leukozyten–DNAs dem der Erythroblasten–DNAs ähnlich war. Somit war es auch möglich, Patienten mit Defekten im Erythrozyten–Membranskelett zu untersuchen. Gerade von solchen Patienten wäre es aufgrund der dazu nötigen Blutmenge nicht vertretbar gewesen, mit der 2 Phasen–Flüssigkulturmethode ausreichende Mengen an DNA zu gewinnen. Eine Entnahme von Knochenmark verbot sich bei diesen Patienten von selbst.

Tabelle 10:

Methylierungsstatus des EBP3–Promotors in DNAs der Kontrollpersonen und der Spermien–DNA

5'–CG–3' Position	Methylierungsstatus in Prozent (%)																S
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16	
A	97	95	91	100	100	92	89	88	90	80	100	92	89	100	88	100	89
B	78	85	91	80	83	92	81	75	90	85	67	100	56	86	75	75	100
C	78	100	77	80	83	92	95	75	80	88	100	92	89	86	75	100	100
D	88	90	86	100	67	92	81	88	70	90	67	92	67	71	75	75	89
E	41	25	14	60	50	58	32	25	20	54	67	33	33	71	38	50	56
F	72	80	64	90	67	75	65	75	50	71	100	58	44	57	38	75	78
G	56	35	18	50	33	67	37	13	40	46	0	25	33	14	13	0	78
H	59	75	50	80	50	50	72	75	60	73	100	92	33	57	88	75	89
I	84	80	77	100	50	67	77	63	60	90	0	83	67	71	63	75	67
J	91	100	82	90	67	92	77	100	40	93	0	83	56	86	75	100	100
K	63	55	73	80	17	83	74	88	60	78	0	58	44	57	50	75	89
L	44	45	59	80	33	33	54	50	30	59	67	50	67	71	38	25	78
M	66	80	77	70	83	58	75	63	50	76	67	92	56	100	50	75	89
N	88	80	77	100	83	92	93	88	80	80	100	92	89	100	75	75	100
O	72	50	86	90	83	92	82	75	90	61	100	58	56	57	88	25	78
Klone	32	20	22	10	6	12	57	8	10	41	3	12	9	7	8	4	9

Sowohl die DNAs der Patienten als auch die der heterozygoten Mutationsträger wiesen Methylierungsmuster ähnlich denen der Kontrollpersonen und der Erythroblastenkultur (2 Phasen–Flüssigkultur) auf. Die 5'–CG–3'–Dinukleotide G und E zeigten eine deutlich geringere Methylierung; die dazu benachbarten Positionen waren zum Teil etwas geringer methyliert als die restlichen Positionen. Ein ähnliches Muster ergab sich auch bei den fünf Patienten, bei denen keinerlei Sequenzabweichung gefunden worden war (Tab. 11 und 12).

Tabelle 11:

Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der Patienten

5'-CG-3' Position	Methylierungsstatus in Prozent (%)														
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
A	89	92	95	95	100	85	100	100	89	100	87	82	80	89	94
B	89	92	67	62	90	92	80	64	89	100	93	94	73	100	94
C	100	92	81	100	100	85	80	100	100	100	93	82	80	89	88
D	89	83	100	90	90	92	90	73	67	100	87	82	93	78	81
E	30	17	33	43	20	31	20	55	44	44	33	29	40	22	38
F	74	92	76	100	90	85	90	64	50	67	80	59	60	89	94
G	44	33	52	48	50	38	20	18	44	33	47	41	33	56	63
H	56	83	67	67	50	62	60	36	67	67	53	71	53	67	75
I	85	92	100	86	90	85	90	91	67	78	53	82	60	78	94
J	85	92	81	95	90	85	80	91	89	89	93	76	93	100	88
K	67	58	76	76	60	54	50	64	67	56	53	82	60	78	69
L	48	75	81	71	30	69	40	36	67	44	27	71	53	89	56
M	78	92	90	81	60	62	60	73	67	100	100	71	80	67	75
N	78	100	71	86	90	69	70	82	100	89	100	100	80	67	100
O	81	75	81	76	100	85	60	82	67	89	67	82	80	78	81
Klone	27	12	21	21	10	13	10	11	9	9	15	17	15	9	16

Die genauen Genotypen der einzelnen Patienten können der Tab. 7 entnommen werden; die Patienten P8, P9 und P10 weisen Mutationen im EBP3-Gen auf.

Tabelle 12:

Methylierungsstatus des EBP3-Promotors in DNAs der heterozygoten Mutationsträger

5'-CG-3' Position	Methylierungsstatus in Prozent (%)									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	
A	100	80	86	92	80	100	100	87	80	
B	83	100	86	77	100	67	90	78	100	
C	83	100	86	92	90	33	90	100	100	
D	83	70	76	92	90	56	90	87	70	
E	33	50	14	8	30	56	30	30	40	
F	67	60	81	69	80	89	90	61	70	
G	33	70	14	31	60	44	30	61	30	
H	50	60	57	62	70	44	70	70	50	
I	83	90	71	85	80	89	50	87	80	
J	50	90	90	92	90	89	90	83	70	
K	50	50	52	92	50	78	70	65	60	
L	50	40	38	62	70	89	70	61	50	
M	67	80	71	85	60	67	90	87	70	
N	83	80	86	92	90	89	100	74	70	
O	67	100	86	92	80	78	90	78	90	
Klone	6	10	21	13	10	9	10	23	10	

Die genauen Genotypen dieser Personen sind der Tab. 8 aufgelistet; H8 und H9 sind heterozygot für die Mutation B3 Fukuoka.

4.9 Methylierungsstatus im Promotor und Exon 1 des Pallidin-Gens ELB42

Zu Beginn des Projektes stand lediglich ein Teil der Promotorsequenz zur Verfügung (Sung et al., 1992). In dem daraus amplifzierten 384 Basenpaare großen Fragment lagen sieben 5'-CG-3'-Dinukleotide, aber nur eins davon befand sich in der Promotorregion, die anderen bereits im Exon 1. Sowohl in den Leukozyten- als auch in den Erythroblasten-DNAs fanden sich mit wenigen Ausnahmen hohe Methylierungsgrade von über 70 bis zu 100 % (Tab. 13 und 14). Die DNAs aller UT-7-Zelllinien jedoch waren frei von Methylierung; die gefundenen 17 % Methylierung in der Zelllinie UT-7/GM/EPO ergaben sich aus einer an einer Position methylierten Sequenz. Es war nicht auszuschließen, daß es sich hierbei wie bereits im Kapitel IV.4.6 beschrieben um einen Amplifizierfehler handelte.

Tabelle 13:

Methylierungsstatus der 5'-Region des ELB42-Gens in DNAs der Erythroblastenkultur und der UT-7-Zelllinien

5'-CG-3' Position	Methylierungsstatus in Prozent (%)							
	Tag 0	Tag 5	Tag 10	Tag 15	UT-7	UT-7/ EPO	UT-7/ GM	UT-7/ GM/ EPO
D	88	78	73	83	0	0	0	0
E	100	67	45	100	0	0	0	0
F	100	100	64	100	0	0	17	0
G	100	100	91	100	0	0	0	0
H	75	100	100	100	0	0	0	0
I	75	100	100	100	0	0	0	0
J	75	78	82	67	0	0	0	0
Klone	8	9	11	6	6	6	6	6

Ein Fragment der publizierten 5'-Region des ELB42-Gens ist untersucht worden (Sung et al., 1992); lediglich die Position D befindet sich im Promotorbereich, die restlichen bereits im Exon 1. Keine der UT-7-Zelllinien weist Methylierung auf. Der Wert von 17 % in der Zelllinie UT-7/GM (Position F) ist auf eine methylierte Position in einem einzelnen Klon zurückzuführen; es ist nicht auszuschließen, daß es sich dabei um einen Amplifizierfehler handelt.

Tabelle 14:

Methylierungsstatus der 5'-Region des ELB42-Gens in DNAs von Patienten, heterozygoten Mutationsträgern und Kontrollpersonen

5'-CG-3' Position	Methylierungsstatus in Prozent (%)											
	P1	P2	P3	P4	H1	H2	H3	K1	K2	K3	K7	K8
D	80	91	100	100	67	100	75	75	100	78	60	75
E	100	100	100	100	100	100	100	88	100	100	100	88
F	90	91	100	100	100	89	100	100	89	100	100	100
G	100	91	100	100	100	100	75	88	89	89	90	100
H	100	82	100	89	100	89	100	88	78	89	100	88
I	90	82	33	78	89	78	88	88	78	78	90	100
J	90	91	100	89	56	78	88	63	67	56	80	75
Klone	10	11	6	9	9	9	8	8	9	9	10	8

Die Patienten P2, P3 und P4 sind homozygot, die Personen H1, H2 und H3 sind heterozygot für die Mutation P4.2 Nippon (siehe Tab. 7 und 8).

Erst nachdem eine (wenn auch ungetestete) Promotorsequenz zur Verfügung stand (C. Korsgren, persönliche Mitteilung), konnte der gesamte Promotorbereich untersucht werden. In dieser Sequenz waren acht 5'-CG-3'-Dinukleotide aufgeführt, von denen vier jedoch auf Sequenzierfehlern beruhten. In den DNAs der 2 Phasen-Flüssigkultur lagen zwischen 36 und 100 % Methylierung vor, die davon abweichenden Werte (Tag 5) konnten auf der geringen Anzahl an Sequenzen beruhen. Alle UT-7-Zellen wiesen auch in diesem Bereich keinerlei Methylierung auf, die 17 % in der Zelllinie UT-7/GM/EPO ergaben sich aufgrund eines Desoxycytidins in einem Klon und wurden als PCR-Artefakt gewertet (Tab. 15).

Tabelle 15:

Methylierungsstatus der vier 5'-CG-3'-Dinukleotide des ELB42-Promotors in DNAs der Erythroblastenkultur und der UT-7-Zelllinien

5'-CG-3'	Methylierungsstatus in Prozent (%)							
	Tag 0	Tag 5	Tag 10	Tag 15	UT-7	UT-7/ EPO	UT-7/ GM	UT-7/ GM/ EPO
A	45	100	50	55	0	0	0	17
B	55	0	100	55	0	0	0	0
C	36	25	75	91	0	0	0	0
D	82	100	75	100	0	0	0	0
Klone	11	4	4	11	7	10	9	6

Auch in diesem Fragment findet sich in den UT-7-Zelllinien keine Methylierung; der Wert von 17 % in der Zelllinie UT-7/GM/EPO (Position A) beruht vermutlich ebenfalls auf einem Amplifizierartefakt (siehe Tab. 13).

In allen untersuchten Leukozyten–DNAs ergaben sich für die einzelnen Positionen Methylierungsgrade von 14 bis 100 %, die aber nicht signifikant von den Werten der Erythroblastenkultur abwichen. Auch hier spiegelte sich der erythroide Methylierungsstatus in den Leukozyten wider. In den untersuchten Patienten–DNAs konnten keine Unterschiede zu den gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden; die niedrigen Werte des Patienten P7 waren vermutlich ebenfalls durch die geringe Anzahl von drei Sequenzen verursacht (Tab. 16). In diesem Promotor konnte kein einheitliches Methylierungsmuster festgestellt werden; die Werte der Positionen A bis C variierten von 14 bis 100 %. Nur die Position D wies eine hohe Methylierung von 73 bis 100 % auf, wie bereits in den vorangegangenen Experimenten, denen die publizierte Sequenz zugrunde lag, festgestellt worden war.

Tabelle 16:

Methylierungsstatus der vier 5'–CG–3'–Dinukleotide des ELB42–Promotors in DNAs von Patienten, heterozygoten Mutationsträgern und Kontrollpersonen

5'–CG–3'	Methylierungsstatus in Prozent (%)										
	P1	P3	P4	P5	P6	P7	P13	P14	P15	K1	K12
A	73	88	100	89	86	33	100	100	73	75	75
B	64	25	67	33	14	0	25	67	36	50	38
C	73	63	67	67	71	0	25	83	82	50	63
D	73	88	100	89	86	100	100	100	100	100	75
Klone	11	8	3	9	7	3	4	6	11	4	8

Die Patienten P3, P4, P5, P6 und P7 tragen Mutationen im ELB42–Gen (siehe Tab. 7).

5. Expression der erythroiden Gene

Abschließend wurde die Expression sowohl des EPB3- als auch des ELB42-Gens in verschiedenen Zelllinien durch RT-PCR analysiert. Neben drei der UT-7-Zelllinien wurden zwei weitere erythroide Zelllinien untersucht. Die Zelllinie K562 war aus dem Knochenmark eines Patienten mit Chronisch-Myeloischer Leukämie gewonnen worden (Lozzio und Lozzio, 1975), die Zelllinie AS-E2 entstammte einem Patienten mit Akuter myeloischer Leukämie (Miyazaki et al., 1997). Zusätzlich wurde RNA aus HeLa-Zellen und aus peripheren Leukozyten analysiert. Als Primer wurden Sequenzen aus den Exons 5 und 10 (EPB3; Schofield et al., 1994) und aus den Exons 6 und 10 (ELB42; Korsgren und Cohen, 1991) gewählt. Damit hätten DNA-Kontaminationen entdeckt werden können, da in diesem Fall die zusätzlichen PCR-Produkte aufgrund der Intronsequenzen deutlich größer gewesen wären. Das EPB3-Gen wurde in allen Leukämiezelllinien außer in der unter diesen Bedingungen nicht-erythroiden Zelllinie UT-7/GM exprimiert. War diese Zelllinie jedoch in Gegenwart von EPO anstelle von GM-CSF kultiviert worden, fand eine Expression dieses Gens statt (Abb. 11, obere Reihe). ELB42-Genprodukte konnten nur in den UT-7-Zelllinien gefunden werden, die beiden anderen Leukämiezelllinien exprimierten dieses Gen nicht (Abb. 11, untere Reihe). In der Zelllinie UT-7/GM war nur eine geringe Menge an PCR-Produkt zu beobachten. In allen Fällen ergab die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte eine Übereinstimmung mit den publizierten Sequenzen.

In den RNAs aus Leukozyten und HeLa-Zellen wurden nur Transkripte mit einer geringeren als der erwarteten Größe amplifiziert (nicht gezeigt). Ob es sich hierbei um Spleißvarianten handelte, konnte nicht ermittelt werden, da die Klonierung dieser PCR-Produkte nicht glückte; dies war möglicherweise ein Hinweis darauf, daß es sich dabei doch um PCR-Artefakte handelte.

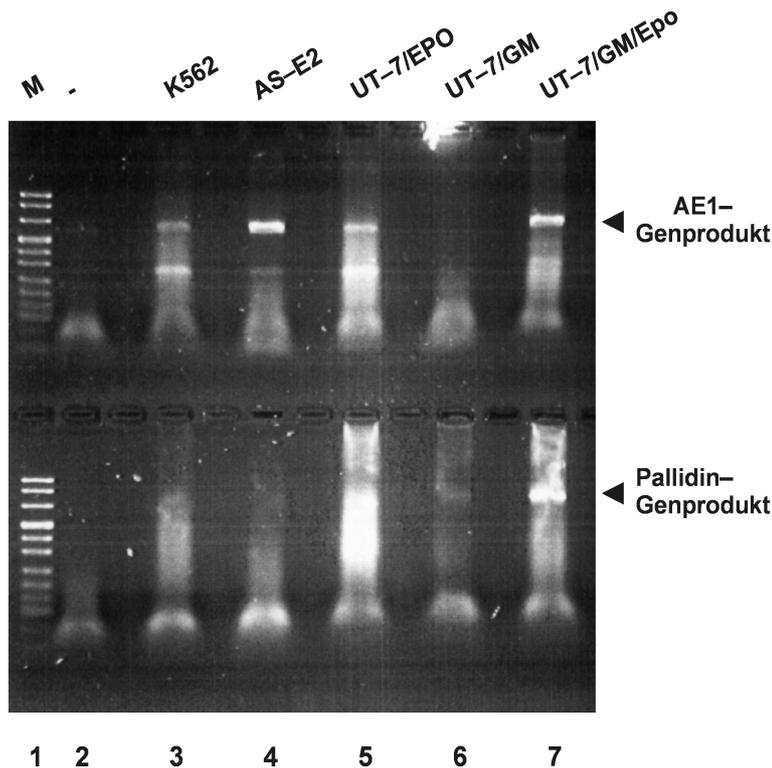


Abbildung 11:

Expression der Gene EPB3 und ELB42

Dieses Agarosegel (2 %) zeigt exemplarisch eins von mehreren unabhängig durchgeführten RT-PCR-Experimenten. Es sind 300 ng Gesamt-RNA mit AMV-Reverser Transkriptase in DNA überschrieben und anschließend in einer PCR (40 Zyklen) mit der *Tth* DNA-Polymerase amplifiziert worden. In den erythroiden Zelllinien UT-7/EPO und UT-7/GM/EPO werden beide Gene transkribiert, wie die starken PCR-Signale zeigen (Spuren 5 und 7). Nach Behandlung mit GM-CSF sind keine EPB3-Transkripte vorhanden, es liegen aber schwache Signale des ELB42-Gens vor (Spur 6). In den beiden anderen Leukämiezelllinien K562 und AS-E2 finden sich EPB3-, aber keine ELB42-Produkte (Spuren 3 und 4). In der Spur 1 wurden jeweils 500 ng pUC-Mix aufgetragen, die Spur 2 zeigt die Negativkontrollen ohne RNA.

V. Diskussion

1. Auswirkungen der Integration fremder DNA

In Zelllinien, die mit der DNA des Bakteriophagen λ transfiziert worden waren, waren Veränderungen des zellulären Methylierungsmusters durch Southern Blot-Analysen mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen beobachtet worden (Heller et al., 1995). In der jetzigen Arbeit wurden diese Veränderungen in den IAP-Genen mit Hilfe des Genomischen Sequenzierens nach der Bisulfit-Methode detailliert untersucht. Diese Technik ermöglichte es erstmals, alle in einem DNA-Bereich vorhandenen 5-Methyl-Desoxycytidine zu bestimmen (siehe Kapitel IV.2). Durch die Analyse von klonierten PCR-Produkten, die jeweils einem Allel entsprachen, konnten die Methylierungsgrade aller 5'-CG-3'-Dinukleotide quantifiziert werden. So waren zehn der 28 untersuchten 5'-CG-3'-Positionen in der Zelllinie BHK21- λ 7 um bis zu 57 % stärker methyliert als in der Ursprungszelllinie BHK21. Die Zelllinie BHK21- λ 10 wies sogar in der Hälfte dieser 5'-CG-3'-Dinukleotide einen um bis zu 92 % erhöhten Methylierungsgrad auf (Tab. 4). Jedoch waren die beobachteten Veränderungen in diesen beiden Zelllinien nie so ausgeprägt gewesen wie in der Ad12-transformierten Zelllinie T637. Hier lag in nahezu allen Positionen die Methylierung deutlich höher als bei der BHK21-Zelllinie, wie bereits in Southern Blot-Analysen zu beobachten gewesen war (Heller et al., 1995).

Die Integration von fremder DNA führt also zu teilweise erheblichen Veränderungen im Genom. Dies betrifft offenbar nicht nur die Stelle, an der die Integration fremder DNA stattgefunden hat, sondern auch weiter entfernte Regionen sowie Bereiche auf anderen Chromosomen. Die beobachteten Veränderungen des Methylierungsmusters in den IAP-Genen lassen sich nur dadurch erklären, daß sich die Integration der Fremd-DNA auf viele der etwa 1.800 Kopien im Hamstergenom (Kuff et al., 1986) ausgewirkt hat. Da sich die IAP-Gene auf nahezu allen Chromosomen befinden (siehe Abb. 1; Meyer zu Altenschildesche et al., 1996), muß sich die Integration der Fremd-DNA also auf den Methylierungsstatus weiter Bereiche des Genoms ausgewirkt haben. Dies läßt darauf schließen, daß auch in anderen Genomabschnitten ähnliche Veränderungen aufgetreten sind.

Die Integration von DNA ist ein weit verbreiteter Vorgang. Jeder Organismus nimmt mit der Nahrung große Mengen an DNA auf, von denen ein Teil über den gastrointestinalen Trakt ins Blut gelangt; von dort kann sie Leukozyten, Milz- und Leberzellen erreichen (Schubbert et al., 1994, 1997). Es ist nicht auszuschließen, daß diese DNA dann auch integrieren kann, vielleicht durch denselben oder einen ähnlichen Mechanismus wie in Transfektionsexperimenten. Ein weiterer Weg, auf dem wahrscheinlich auch die hier untersuchten IAP-Gene Einzug ins Hamstergenom gefunden haben, besteht über die Zwischenstufe bei der retroviralen Infektion, während der das virale Genom in die zelluläre DNA integriert vorliegt. Der Herstellung transgener Tiere oder auch der somatischen Gentherapie liegt ebenfalls die Integration von für die Zelle fremder DNA zugrunde, auch wenn in letzterem Fall die Fremdartigkeit nur darauf zu beziehen ist, daß sich die eingesetzte DNA aufgrund fehlender Methylierung von der zellulären unterscheidet.

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, daß die Integration der prokaryontischen DNA des Bakteriophagen λ zu Veränderungen im Methylierungsstatus zellulärer Gene führen kann. In eukaryontischen Zellen kann diese DNA weder transkribiert noch repliziert werden und weist auch — soweit bekannt — kein transformierendes Potential auf. Daher sind diese Veränderungen — im Gegensatz zu den viralen Systemen — nicht durch virale Funktionen zu erklären. Möglicherweise können die Auswirkungen der Integration durch virale Faktoren ergänzt oder verstärkt werden, wodurch sich die erheblichen Veränderungen in der Zelllinie T637 erklären ließen. Die verschieden stark ausgeprägten Veränderungen in den transgenen Zelllinien könnten auf die Art der integrierten DNA, auf die Größe oder Struktur des Integrates oder — vielleicht ist das der wichtigste Faktor — auf die unterschiedlichen Integrationsstellen zurückzuführen sein. Jedenfalls lassen die gefundenen Daten den Schluß zu, daß die Integration jeder DNA in der Lage ist, weitreichende Veränderungen innerhalb der Zelle auszulösen. Es ist jedoch anzumerken, daß die meisten Veränderungen dieser Art bei einer Zelle im Gewebeverband dazu führen würden, daß sie aufgrund von Fehlern im Metabolismus zugrunde ginge. Viele der für Bakteriophagen λ -DNA transgenen Zelllinien zeigten ein geringeres Wachstum als die Ursprungszelllinie; sie wären ohne Einzelzellklonierung wahrscheinlich von den nicht-transfizierten Nachbarzellen überwachsen worden. Unter bestimmten Umständen würde eine derart veränderte Körperzelle auch vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und eliminiert werden. Im schlimmsten Fall könnte die

Zelle aufgrund eines Integrationsereignisses zu einer Tumorzelle transformiert werden. Die einzige Möglichkeit, daß die Integration fremder DNA zu evolutionär weitreichenden Konsequenzen führen könnte, wäre die Integration in die DNA einer Keimbahnzelle. Nur so wäre die Weitergabe an die Nachkommen möglich. Ob dann allerdings auch ein modifiziertes Methylierungsmuster auftreten würde, kann nicht beantwortet werden.

2. Methylierungsstatus der erythroiden Promotoren

Die Erythrozytenmembran ist aus drei Gruppen von Proteinen aufgebaut: Proteine des Zytoskeletts, Integrale Membranproteine und Ankerproteine (siehe Kapitel I.3.1). Von jeweils einem Vertreter jeder Gruppe wurde der Promotor–Methylierungsgrad bestimmt. Das β –Spectrin–Gen SPTB wurde als Beispiel eines Zytoskelettproteins analysiert, das AE1–Gen EPB3 repräsentierte die Integralen Membranproteine, und als letztes wurde das Gen des Ankerproteins Pallidin (ELB42) ausgewählt. Mutationen in diesen Genen wurden als Ursache für Erythrozytenmembranskelett–Erkrankungen festgestellt.

Im SPTB–Promotor, der reich an 5'–CG–3'–Dinukleotiden war, konnte in keiner der untersuchten DNAs Methylierung festgestellt werden. Die wenigen Desoxycytidine, die in vereinzelt Klonen gefunden worden waren, befanden sich häufig nicht in einem 5'–CG–3'–Dinukleotid. Die in der PCR eingesetzte *Taq* DNA–Polymerase verfügt nicht über einen Fehlerkorrekturmechanismus und inkorporiert daher statistisch etwa alle 10.000 Basenpaare ein falsches Nukleotid. Also beruhte das Vorkommen der wenigen beobachteten Desoxycytidine eher auf dieser Fehlerquelle. Diese Erklärung wurde auch dadurch bestätigt, daß diese Desoxycytidine gleichmäßig über die untersuchte Region verteilt vorlagen. Andererseits zeigte der Gesamtmethylierungsgrad von 0,7 % in dieser wahrscheinlich vollkommen unmethylierten Region die recht hohe Genauigkeit der verwendeten Technik; somit konnte eine Fehlerrate von wenigen Prozentpunkten angenommen werden. Bereits in einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß mehr als 95 % aller methylierten 5'–CG–3'–Dinukleotide als solche wiedergefunden wurden (Zeschnigk et al., 1997).

Die 47 5'–CG–3'–Dinukleotide im SPTB–Promotor waren also sowohl in den kultivierten erythroiden Zellen als auch in den Leukozyten gesunder Kontrollpersonen komplett unmethyliert gewesen. Da selbst in der DNA des Patienten mit der Mutation im SPTB–Gen keine Methylierung zu finden war, wurde auf eine detaillierte Untersuchung anderer Patienten verzichtet. Die 15 untersuchten 5'–CG–3'–Dinukleotide des EPB3–

Promotors wiesen sowohl in den Erythroblasten- als auch in den Leukozyten-DNAs einen hohen Methylierungsgrad auf. Die Methylierung war jedoch nicht gleichmäßig verteilt, vielmehr war die Position G deutlich geringer methyliert. Auch in der Position E und den zur Position G benachbarten 5'-CG-3'-Dinukleotiden trat eine etwas geringere Methylierung auf als in dem restlichen Bereich. Im Unterschied dazu wiesen die DNAs aller UT-7-Zelllinien geringere Werte auf, das Methylierungsmuster ähnelte jedoch dem der Blut-DNAs. Auch in den DNAs der nicht-erythroiden Tumorzelllinien KB und HeLa war in diesem Bereich weniger Methylierung vorhanden, es zeigte sich aber ein anderes Methylierungsmuster als in den UT-7-Zelllinien. Demgegenüber war die aus Spermien gewonnene DNA nahezu vollständig methyliert, mit Ausnahme der Position E, die nur in der Hälfte der Sequenzen methyliert vorlag. Der ELB42-Promotor, der lediglich vier 5'-CG-3'-Dinukleotide enthielt, war teilweise sehr stark methyliert; es war aber kein einheitliches Methylierungsmuster zu erkennen. In allen untersuchten UT-7-Zelllinien lag dieser Promotor und der analysierte Bereich des Exons 1 vollkommen unmethyliert vor.

Das vollständige Fehlen von 5-Methyl-Desoxycytidin im untersuchten Bereich des SPTB-Promotors in allen analysierten DNAs könnte die Wichtigkeit dieses Proteins für den Aufbau des Zytoskeletts in Erythrozyten widerspiegeln. Ganz im Gegensatz zu β -Spectrin ist das Fehlen von AE1 oder Pallidin zu einem gewissen Grad tolerierbar, auch wenn die Erythrozyten dieser Patienten weniger stabil sind und nur eine kurze Lebensdauer aufweisen. So existieren beispielsweise Rinder mit einer homozygoten Nonsense-Mutation im EPB3-Gen, die eine ausgeprägte Sphärozytose aufweisen (Inaba et al., 1996). In den Erythrozyten der untersuchten Patienten mit Mutationen im ELB42-Gen (P2 bis 7) ist kein Pallidin vorhanden (siehe Tab. 7). Transkriptionsstudien, bei denen *in vitro*-methylierte SPTB- und EPB3-Promotorkonstrukte in die BHK21-Hamsterzelllinie transfiziert worden sind, zeigen, daß beide Promotoren nicht exprimiert werden, wenn alle 5'-CG-3'-Dinukleotide vollständig methyliert vorliegen. Allein die Methylierung der *Hpa* II- (SPTB) oder *Hha* I-Methyltransferase (EPB3) führt bereits zu einem deutlichen Rückgang in der Transkriptionsrate (I. Zuther, persönliche Mitteilung). Darin könnte die fehlende Methylierung im SPTB-Promoter begründet liegen, da ohne β -Spectrin kein Erythrozytenmembranskelett aufgebaut werden kann. Eventuell wird durch die verringerten Methylierungsgrade oder das veränderte Methylierungsmuster im EPB3-Promotor in den UT-7-Zelllinien die Transkription dieses Gens ermöglicht. Die

Ergebnisse der RT-PCR lassen den Schluß zu, daß zusätzliche Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise durch EPO aktiviert werden, für die Expression von AE1 nötig sind. Der ELB42-Promotor liegt möglicherweise deshalb in den UT-7-Zelllinien vollkommen unmethyliert vor, damit er auch ohne zusätzliche Faktoren exprimiert werden kann. Die geringen Signale in der Zelllinie UT-7/GM scheinen dies zu bestätigen; allerdings finden sich in Gegenwart von EPO deutlich stärkere Signale.

3. Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit

Die vorliegenden Beobachtungen lassen darauf schließen, daß fremde DNA, auch wenn sie nicht exprimiert wird, allein durch die Integration in das zelluläre Genom weitreichende Veränderungen in der Zelle hervorrufen kann. Diese Resultate werfen Fragen auf, die die Beurteilung der Ergebnisse von Studien an transgenen Organismen betreffen könnten. Denn die dort festgestellten Funktionsänderungen müssen nicht ausschließlich auf der Expression der eingebrachten DNA beruhen, sondern könnten auch durch weiterreichende Effekte während der Integration hervorgerufen worden sein. Zusätzliche Probleme ergeben sich bei der somatischen Gentherapie, da dabei das Risiko besteht, ungewollt Funktionsverluste oder unkontrolliertes Wachstum von Zellen in dem betroffenen Gewebe auszulösen. Daher sind noch eine Reihe von weiteren Überprüfungen auch in Tiermodellen nötig, um herauszufinden, wie solche drastischen Veränderungen verhindert werden können. Desweiteren können die im Rahmen der somatischen Gentherapie zur Reparatur defekter Gene in die Zelle eingebrachten DNA-Sequenzen durch Methylierung inaktiviert werden. Der daraus resultierende Funktionsverlust dieser Sequenzen würde eine häufige Wiederholung der Gentherapie erforderlich machen. Erst wenn diese Probleme überwunden sein werden, wird die Reparatur defekter Gene durch Einbringen von funktionsfähigen Allelen realisiert werden können.

Die in den Promotoren der drei menschlichen Gene gefundenen Methylierungsmuster haben erneut gezeigt, daß gleiche DNA-Abschnitte in verschiedenen Individuen oftmals ähnlich methyliert sind. Demgegenüber können diese Bereiche je nach Zelltyp deutlich variierende Methylierungsgrade aufweisen, wie die Ergebnisse der DNAs aus Spermien oder aus den Tumorzelllinien andeuten. Daß der EPB3-Promotor in den UT-7-Zelllinien aktiv ist, obwohl er deutlich methyliert ist, zeigt, daß nicht allein die Gesamtmethylierung eines Promotors entscheidend ist. Denkbar ist vielmehr, daß der Methylierungsgrad

einzelner 5'-CG-3'-Dinukleotide für die Transkription entscheidend ist, daß also nicht jedes 5-Methyl-Desoxycytidin die gleichen Auswirkungen hat. Es stellt sich auch die Frage, ob die DNA-Methylierung die Transkription direkt beeinflußt. Es ist durchaus vorstellbar, daß andere epigenetische Faktoren wie beispielsweise eine durch Histon-Acetylierung hervorgerufene Veränderung der Nukleosomenstruktur (Boffa et al., 1990) die Genexpression reguliert. Möglich wäre auch, daß diese Veränderungen dann die DNA-Methylierung auslösen können. Somit wäre die DNA-Methylierung nicht die Ursache, sondern die Folge von Veränderungen in der Transkriptionsaktivität.

In den etwa 2.000 Sequenzen mit zusammen mehr als einer Million Basenpaare, die für diese Arbeit ausgewertet worden sind, ist kein Hinweis darauf zu finden, daß 5-Methyl-Desoxycytidin regelmäßig außerhalb von 5'-CG-3'-Dinukleotiden vorkommt. Vereinzelt aufgetretene Desoxycytidine beruhen eher auf Fehlern der *Taq* DNA-Polymerase, da sie über den gesamten Bereich verteilt vorliegen und niemals in zwei Sequenzen an der selben Position auftreten; außerdem sind sie etwa gleich häufig vorhanden wie andere Sequenzabweichungen. Demnach kann die seit langem postulierte Existenz einer Nicht-CpG-Methylierung in Wirbeltieren (Subak-Sharpe et al., 1966) nicht bestätigt werden. Aufgrund der Genomgröße von 3 bis 4 Milliarden Basenpaaren ist aber nicht ganz auszuschließen, daß sie in anderen als den analysierten DNA-Regionen vorkommt.

VI. Zusammenfassung

In Ad12-transformierten Hamsterzellen und Ad12-induzierten Hamstertumoren waren Veränderungen im Methylierungsstatus zellulärer DNA-Sequenzen beobachtet worden (Heller et al., 1995). Auch in mit Ad12-DNA transfizierten Hamsterzellen, die keinen transformierten Phänotyp zeigten, waren solche Veränderungen aufgetreten, ganz im Gegensatz zu abortiv mit Ad12 infizierten BHK21-Zellen, deren Methylierungsmuster nicht von dem der BHK21-Zelllinie zu unterscheiden waren. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, daß nicht allein die durch virale Faktoren hervorgerufene Transformation, sondern auch die Integration von DNA ausreichend war, diese Veränderungen auszulösen. Daher waren BHK21-Zellen mit der DNA des Bakteriophagen λ , die in eukaryontischen Zellen nicht exprimiert werden konnte und demzufolge kein transformierendes Potential hatte, transfiziert worden (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999). In einigen der so generierten BHK21- λ -Zelllinien wurden ebenfalls Veränderungen im Methylierungsmuster der IAP I-Gene gefunden. Diese Zellen wiesen dieselbe Morphologie auf wie die Ursprungszellen und zeigten in Northern Blot-Analysen keine Transkripte der Bakteriophage λ -DNA. Demgegenüber konnten in mehr als 70 einzelzellklonierten BHK21-Zelllinien keinerlei Unterschiede im Methylierungsmuster beobachtet werden. Daher war anzunehmen, daß die gefundenen Veränderungen in den transgenen Zelllinien nicht auf bestehende Unterschiede zwischen einzelnen BHK21-Zellen beruhen konnten.

Im Gegensatz zu den bis dato durchgeführten Southern Blot-Analysen ermöglichte das Genomische Sequenzieren nach der Bisulfit-Methode die Bestimmung aller 5-Methyl-Desoxycytidine in einer gegebenen Sequenz. Mit dieser Technik wurde ein Bereich der IAP-Gene, der in früheren Analysen die deutlichsten Veränderungen im Methylierungsstatus gezeigt hatte, genauer untersucht. Verglichen mit der Ursprungszelllinie BHK21 wies die Ad12-transformierte Zelllinie T637 in nahezu allen 5'-CG-3'-Dinukleotiden stark erhöhte Methylierungsgrade auf. Die wenigen Positionen, für die nur leicht gestiegene Werte ermittelt wurden, waren schon in der BHK21-Zelllinie stark methyliert. Auch in den DNAs der beiden Zelllinien BHK21- λ 7 und BHK21- λ 10, die keinen transformierten Phänotyp gezeigt hatten, war eine Zunahme der Methylierung aufgetreten (Heller et al., 1995). Wie schon zuvor in Southern Blot-Analysen beobachtet waren diese Veränderungen nicht so ausgeprägt wie in der

Ad12-transformierten Zelllinie T637. Dennoch waren 10 (BHK21- λ 7) und 17 (BHK21- λ 10) der 28 untersuchten 5'-CG-3'-Dinukleotide um 13 bis 92 % stärker methyliert als in der Ursprungszelllinie BHK21. Die Analyse von vier BHK21-Subklonen ergab keine signifikant unterschiedlichen Methylierungswerte; in der Diplomarbeit waren in Southern Blot-Experimenten mit den methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen *Hpa* II und *Hha* I zwischen 72 Subklonen und der Zelllinie BHK21 keine Unterschiede im Methylierungsmuster der IAP I-Gene gefunden worden. Somit war es unwahrscheinlich, daß die in den transgenen Zelllinien gefundenen Veränderungen auf Variationen innerhalb der BHK21-Population beruhten.

Die untersuchten IAP-Gene liegen in etwa 1.800 Kopien pro Hamsterzelle vor und sind auf nahezu allen Chromosomen verteilt, hauptsächlich auf deren kurzen Armen. Daß überhaupt Methylierungsänderungen hatten gefunden werden können, machte deutlich, daß eine große Zahl dieser Sequenzen in der gleichen Weise beeinflusst worden waren. Somit hatte also die Integration der Fremd-DNA weitreichende Veränderungen zufolge, die nicht nur die Integrationsstelle umfaßte, sondern auch weit entfernte Regionen auf anderen Chromosomen. Das Ausmaß solcher Veränderungen könnte durch den Integrationsort oder auch von der integrierten DNA-Menge beeinflusst werden. Daneben könnte durch die Expression einer transformierenden DNA diese Auswirkungen verstärkt werden, wie die Daten der Ad12-transformierten Zelllinie T637 vermuten lassen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Methylierungsstatus in den Promotoren von drei menschlichen Genen, die für Proteine des Erythrozytenmembranskeletts kodieren, bestimmt. Im Promotor des für β -Spectrin kodierenden SPTB-Gens konnte weder in den Erythroblasten- und Leukozyten-DNAs noch in den DNAs der UT-7-Zelllinien Methylierung gefunden werden. Auch in der DNA des Patienten mit der Punktmutation, die zu einem verkürzten Protein führte, war keine Methylierung vorhanden. Die 15 5'-CG-3'-Dinukleotide im Promotor und Exon 1 des AE1-Gens EPB3 wiesen in den Erythroblasten- und Leukozyten-DNAs einen hohen Methylierungsgrad auf; die Positionen G und E waren geringer methyliert. In den DNAs der UT-7-Zelllinien und der nicht-erythroiden Tumorzelllinien KB und HeLa trat ein geringerer Methylierungsgrad auf, die DNAs von KB- und HeLa-Zellen hatten ein gänzlich anderes Methylierungsmuster. Der Promotor des ELB42-Gens, das für Pallidin kodierte, enthielt lediglich vier

5'-CG-3'-Dinukleotide, die in den meisten DNAs sehr stark methyliert vorlagen. Im Gegensatz zu den beiden anderen Promotoren war im ELB42-Promotor jedoch kein einheitliches Methylierungsmuster festzustellen. In allen UT-7-Zelllinien lag dieser Bereich und ein zusätzlich analysierter Teil des Exons 1, in dem sich weitere sechs 5'-CG-3'-Dinukleotide befanden, vollkommen unmethyliert vor. RT-PCR-Analysen ergaben, daß in den erythroiden UT-7-Zelllinien sowohl AE1 als auch Pallidin exprimiert wurden. In der mit GM-CSF kultivierten Zelllinie UT-7/GM konnten nur schwache Pallidin-Signale gefunden werden. Die erythroiden Leukämiezelllinien K562 und AS-E2 exprimierten AE1, aber kein Pallidin.

In insgesamt mehr als einer Million Basenpaare, die für diese Arbeit ausgewertet worden sind, ist 5-Methyl-Desoxycytidin — von wenigen Ausnahmen abgesehen, die aber eher auf Amplifikationsfehlern der *Taq* DNA-Polymerase beruhten — nicht außerhalb von 5'-CG-3'-Dinukleotiden gefunden worden. Somit konnte die Existenz einer Nicht-CpG-Methylierung, die seit langem postuliert wird (Subak-Sharpe et al., 1966), nicht bestätigt werden. Andererseits konnte aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß sie eventuell in anderen DNA-Regionen vorkommt.

VII. Summary

In Ad12-transformed hamster cells and in Ad12-induced hamster tumors changes in the methylation status of cellular DNA sequences had been observed (Heller et al., 1995). Ad12-transfected hamster cells, which did not show a transformed phenotype, displayed similar changes whereas the methylation patterns observed in abortively with Ad12 infected BHK21 cells did not differ from the patterns of the BHK21 cell line. These observation suggested, that not only the transformation caused by viral factors but also the integration of foreign DNA itself could lead to changes in the methylation pattern. Therefore BHK21 cells were transfected with DNA of bacteriophage λ , which was not able to be expressed in eukaryotic cells and thus did not have a transforming potential (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999). In some of the generated BHK21- λ cell lines changes in the methylation pattern of the IAP I genes have been found. These cells had the same morphology as BHK21 cells and — according to Northern blot analyses — did not transcribe the bacteriophage λ DNA. In more than 70 single cell-cloned BHK21 sublines no differences in the DNA methylation patterns of the IAP I genes had been observed. Therefore, it seemed quite unlikely that the documented changes were due to preexisting differences in the BHK21 cell line.

In contrast to Southern blot analyses the genomic sequencing by the bisulfite protocol enables the determination of all 5-methyldeoxycytidines in a given sequence. This technique was used to analyze a region of the IAP genes which in Southern blot analyses had shown the most striking differences in the methylation patterns. Compared to the cell line BHK21 the Ad12-transformed cell line T637 exhibited markedly increased levels of methylation in nearly all of the 5'-CG-3' dinucleotides. The few positions showing only moderate increases exhibited already in the cell line BHK21 high levels of methylation. In the DNAs of the cell lines BHK21- λ 7 and BHK21- λ 10, which did not display a transformed phenotype, increases of methylation had been found (Heller et al., 1995). As had already be seen in Southern blot analyses, these changes were not as distinct as in the Ad12-transformed cell line T637. Nevertheless, 10 (BHK21- λ 7) and 17 (BHK21- λ 10) out of 28 analyzed 5'-CG-3' dinucleotides showed increases of 13 to 92 % compared to the cell line BHK21. The analysis of four BHK21 subclones did not reveal significantly different levels of methylation. In Southern blot analyses, no differences in the *Hpa* II and *Hha* I restriction patters of 72 subclonal

BHK21 cell lines had been found. Therefore it seemed quite unlikely, that the observed changes had been due to preexisting variations in the BHK21 population.

There are some 1,800 copies of the IAP genes located in each hamster cell, they are spread on nearly all chromosomes, frequently on the short arms. The methylation patterns of many of these sequences must have been changed in a similar way to be found. Therefore, the integration of foreign DNA can lead to far reaching effects not only on the site of integration but also on sequences located on other chromosomes. The extend of such changes could be depending on the site of integration or the amount of integrated DNA. Additionally, this effect could be amplified by the expression of a transforming DNA as the studies on the Ad12-transformed cell line T637 suggested.

In the second part of this study, the methylation status in the promoter regions of three human genes was analyzed. These genes encoded proteins of the red cell membranes skeleton. In the promoter of the β -spectrin encoding gene SPTB, neither in DNAs prepared from erythroblasts or leukocytes nor in DNAs from the UT-7 cell lines methylation has been detected. In the DNA of the patient with the *de novo* mutation in the SPTB gene leading to a truncated protein no methylation was present, neither. The 15 5'-CG-3' dinucleotides located in the promoter and exon 1 of the AE1 gene EPB3 showed high levels of methylation in DNAs both from erythroblasts and leukocytes: the positions G and E displayed lower levels of methylation. In the DNAs of the UT-7 cell lines and the non-erythroid tumor cell lines KB and HeLa a lower degree of methylation has been observed; the DNAs of KB and HeLa cells exhibited a different methylation pattern. The promoter of the ELB42 gene encoding Pallidin contained four 5'-CG-3' dinucleotides, most of them were found to be heavily methylated. There was no distinct methylation pattern observed in this promoter. In the UT-7 cell lines, this area and the analyzed part of the exon 1 containing six additional 5'-CG-3' dinucleotides were completely unmethylated. RT-PCR analyses revealed that in the erythroid UT-7 cell lines AE1 as well as Pallidin was expressed. In the cell line UT-7/GM which has been cultivated with GM-CSF only weak signals for Pallidin were observed. Both erythroid leukemia cell lines K562 and AS-E2 expressed AE1, but not Pallidin.

In more than one million base pairs analyzed in this study, 5-methyldeoxycytosine was always found in 5'-CG-3' dinucleotides — except for a few occasional cases most likely misincorporated by the Taq DNA polymerase. The postulated non-CpG methylation (Subak-Sharpe et al., 1966) has not been found; on the other hand it could not be ruled out that in other parts of the genome this kind of methylation could occur.

VIII. Literatur

- Achten S, Behn–Krappa A, Jücker M, Sprengel J, Hölker I, Schmitz B, Tesch H, Diehl H, Doerfler W (1991)
Patterns of DNA methylation in selected human genes in different Hodgkin's Lymphoma and Leukemia cell lines and in normal human lymphocytes
Cancer Res. 51, 3702–3709
- Ariel M, Robinson E, McCarrey JR, Cedar H (1995)
Gamete specific methylation correlates with imprinting of the murine Xist gene
Nature Genetics 9, 312–315
- Babinger P (1999)
Identifizierung und biologische Funktion von 5–Methylcytosin und N6–Methyladenin in Volvox–DNA
Diplomarbeit durchgeführt am Lehrstuhl für Genetik im Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III — Biologie und Vorklinische Medizin — der Universität Regensburg
- Bablanian R, Eggers HJ, Tamm I (1965)
Studies on the mechanism of polio–induced cell damage
I. The relation between poliovirus–induced metabolic and morphologic alterations in cultured cells
Virology 26, 100–113
- Barlow DP (1993)
Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation
Science 260, 309–310
- Bartolomei MS (1994)
The search for imprinted genes
Nature Genetics 6, 220–221
- Behn–Krappa A, Hölker I, Sandaradura de Silva U, Doerfler W (1991)
Patterns of DNA methylation are indistinguishable in different individuals over a wide range of human DNA sequences
Genomics 11, 1–7
- Bestor TH (1990)
DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 326, 179–187
- Bestor TH, Verdine GL (1994)
DNA methyltransferases
Curr. Opin. Cell. Biol. 6, 380–389

- Bird A (1986)
CpG rich islands and the function of DNA methylation
Nature 321, 209–213
- Bird A (1993)
Functions for DNA methylation in vertebrates
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 58, 281–285
- Boffa LC, Walker J, Chen TA, Sterner R, Mariani MR, Allfrey VG (1990)
Factors affecting nucleosome structure in transcriptionally active chromatin. Histone acetylation, nascent RNA and inhibitors of RNA synthesis
Eur. J. Biochem. 194, 811–823
- Bouhassira EE, Schwartz RS, Yawata Y, Ata K, Kanzaki A, Qiu JJ, Nagel RL, Rybicki AC (1992)
An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (protein 4.2^{Nippon})
Blood 79, 1846–1854
- Boyes J, Bird A (1991)
DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein
Cell 64, 1123–1134
- Boyes J, Bird A (1992)
Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein
EMBO J. 11, 327–333
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H (1994)
Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation
Nature 371, 435–438
- Chandler LA, De Clerk YA, Bogenmann E, Jones PA (1986)
Patterns of DNA methylation and gene expression in human tumor cell lines
Cancer Res. 46, 2944–2949
- Church GM, Gilbert W (1984)
Genomic sequencing
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991–1995
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994)
High sensitivity mapping of methylated cytosines
Nucleic Acids Res. 22, 2990–2997
- Clark SJ, Harrison J, Frommer M (1995)
CpNpG methylation in mammalian cells
Nature Genetics 10, 20–27

- Craig JM, Bickmore WA (1994)
The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes
Nature Genetics 7, 376–381
- Doerfler (1969)
Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12
Virology 38, 587–606
- Doerfler (1981)
DNA methylation — a regulatory signal in eukaryotic gene expression
J. Gen. Vir. 57, 1–20
- Doerfler (1983)
DNA methylation and gene activity
Ann. Rev. Biochem. 52, 93–124
- Doerfler W, Toth M, Kochanek S, Achten S, Freisem–Rabin U, Behn–Krappa A, Orend G (1990)
Eukaryotic DNA methylation: facts and problems
FEBS Letters 268, 329–333
- Doerfler W (1991)
Abortive infection and malignant transformation by adenoviruses: integration of viral DNA and control of viral gene expression by specific patterns of DNA methylation
Adv. Virus Res. 39, 89–128
- Doerfler W (1993a)
Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns; a different view of insertional mutagenesis
Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 46, 1–36
- Doerfler W (1993b)
Patterns of de novo DNA methylation and promotor inhibition: studies on the adenoviruses and the human genome
in: „DNA methylation, biology and biological significance”
Jost JP, Saluz HP (eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz
- Doerfler W (1995)
The insertion of foreign DNA into mammalian genomes and its consequences: a concept in oncogenesis
Adv. Cancer Res. 66, 313–344
- Dugaiczuk A, Boyer HW, Goodman HM (1975)
Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures
J. Mol. Biol. 96, 171–184
- Eagles H (1955)
Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 362–364

- Ehrlich M, Zhang X–Y, Asiedu CK, Khan R, Supaker PC (1990)
Methylated DNA–binding protein from mammalian cells
Nuc. Acids Meth., 351–365
- Fanning E, Doerfler W (1976)
Intracellular forms of adenovirus DNA. V. Viral DNA sequences in hamster cells abortively infected and transformed with human adenovirus type 12
J. Virol. 20, 373–383
- Feil R, Handel MA, Allen ND, Reik W (1995)
Chromatin structure and imprinting: developmental control of DNase–I sensitivity in the mouse insulin–like growth factor 2 gene
Dev. Genet. 17, 240–252
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983)
Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts
Nature 301, 89–91
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992)
A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5–methylcytosine residues in individual DNA strands
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1827–1831
- Gallagher PG, Sabatino DE, Romana M, Cline AP, Garrett LJ, Bodine DM, Forget BG (1999)
A human beta–spectrin gene promoter directs high level expression in erythroid but not muscle or neural cells
J. Biol. Chem. 274, 6062–6073
- Gama–Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983)
The 5–methylcytosine content of DNA from human tumors
Nuc. Acids Res. 11, 6883–6894
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952)
Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium
Cancer Res. 12, 264–265
- Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B (1994)
Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastomas
Hum. Genet. 94, 491–496
- Gruenbaum Y, Naveh–Many T, Cedar H, Razin A (1981)
Sequence specificity of methylation in higher plant DNA
Nature 292, 860–862

- Gundersen G, Kolstø AB, Prydz H (1991)
Differential methylation of a CpG island concatemer in hemi- and homozygous transgenic mice
FEBS Letters 295, 214–221
- Hanahan D (1983)
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids
J. Mol. Biol. 166, 557–580
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1995)
Techniques for transformation of E. coli
in: „DNA Cloning 1 core techniques, a practical approach”
Glover DM, Hames BD (eds.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo
- Hayatsu H, Miura A (1970)
The mutagenic action of sodium bisulfite
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 156–160
- Hayatsu H, Wataya Y, Kazushige K (1970a)
The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine
J. Am. Chem. Soc. 92, 724–726
- Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S (1970b)
Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives
Biochemistry 9, 2858–2865
- Hayatsu H (1976)
Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 16, 75–124
- Heller H, Kämmer C, Wilgenbus P, Doerfler W (1995)
Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage λ) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5515–5519
- Heller H (1997)
Zur DNA Methylierung und Genomorganisation in Ad12-transformierten und λ -DNA-transgenen Hamsterzelllinien
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Hilger-Eversheim K, Doerfler W (1997)
Clonal origin of adenovirus type 12-induced hamster tumors:
non-specific chromosomal integration sites of viral DNA
Cancer Res. 57, 3001–3009
- Höllner M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W (1988)
Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated
Genes Dev. 2, 1127–1135

- Holmes DS, Quigley M (1981)
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Anal. Biochem. 114, 193–197
- Huebner RJ, Rowe WP, Lane WT (1962)
Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 2051–2058
- Inaba M, Yawata A, Hoshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzaki A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maede Y (1996)
Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation
J. Clin. Invest. 97, 1804–1817
- Inoue T, Kanzaki A, Yawata A, Tsuji A, Ata K, Okamoto N, Wada H, Higo I, Sugihara T, Yamada O, Yawata Y (1994)
Electron microscopic and physicochemical studies on disorganization of the cytoskeletal network and integral protein (band 3) in red cells of band 4.2 deficiency with a mutation (codon 142: GCT→ACT)
Int. J. Hematol. 59, 157–175
- Inoue T, Kanzaki A, Kaku M, Yawata A, Takezono M, Okamoto N, Wada H, Sugihara T, Yamada O, Katayama Y, Nagata N, Yawata Y (1998)
Homozygous missense mutation (band 3 Fukuoka: G130R):
a mild form of hereditary spherocytosis with near-normal band 3 content and minimal changes of membrane ultrastructure despite moderate protein 4.2 deficiency
Br. J. Haematol. 102, 932–939
- Jähner D, Jähnisch R (1985)
Retrovirus induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity
Nature 315, 594–597
- Kämmer C (1995)
Fremde DNA in Säugerzellen: Methylierungsprofile in transferierter und endogen-zellulärer DNA
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Kanzaki A, Yawata Y, Yawata A, Inoue T, Okamoto N, Wada H, Harano T, Harano K, Wilmotte R, Hayette S, Nakamura Y, Niki T, Kawamura Y, Nakamura S, Matsuda T (1995a)
- Band 4.2 Komatsu: 523 GAT→TAT (175 Asp→Tyr) in exon 4 of the band 4.2 gene associated with total deficiency of band 4.2, hemolytic anemia with ovalostomatocytosis and marked disruption of the cytoskeletal network
Int. J. Hematol. 61, 165–178

- Kanzaki A, Yasunaga M, Okamoto N, Inoue T, Yawata A, Wada H, Andoh A, Hodohara K, Fujiyama Y, Bamba T, Harano T, Harano K, Yawata Y (1995b)
Band 4.2 Shiga: 317 CGC→TGC in compound heterozygotes with 142 GCT→ACT results in band 4.2 deficiency and microspherocytosis
Br. J. Haematol. 91, 333–340
- Kochanek S, Toth M, Dehmel A, Renz D, Doerfler W (1990)
Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factors α and β
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8830–8834
- Kochanek S, Radbruch A, Tesch H, Renz D, Doerfler W (1991)
DNA methylation profiles in the human genes for tumor necrosis factor α and β in subpopulations of leukocytes and leukemias
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5759–5763
- Kochanek S, Renz D, Doerfler W (1993a)
DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells
EMBO J. 12, 1141–1151
- Kochanek S, Renz D, Doerfler W (1993b)
Differences in the accessibility of methylated and unmethylated DNA to DNase I
Nucleic Acids Res. 21, 5843–5845
- Koetsier PA, Mangel L, Schmitz B, Doerfler W (1996)
Stability of transgene methylation patterns in mice: position effects, strain specificity and cellular mosaicism
Transgenic Research 5, 235–244
- Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T, Eguchi M, Moroi M, Okada M, Sato Y, Wada H, Yawata Y, Suda T, Miura Y (1991)
Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte–macrophage colony–stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival
Cancer Res. 51, 341–348
- Komatsu N, Kirito K, Shimizu R, Kunitama M, Yamada M, Uchida M, Takatoku M, Eguchi M, Miura Y (1997)
In vitro development of erythroid and megakaryocytic cells from a UT–7 subline, UT–7/GM
Blood 89, 4021–4033
- Korsgren C, Cohen CM (1991)
Organization of the gene for human erythrocyte membrane protein 4.2: structural similarities with the gene for the α subunit of factor XIII
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4840–4844

- Kuff EL, Fewell JE, Lueders KK, DiPaolo JA, Amsbaugh SC, Popescu NC (1986)
Chromosome distribution of intracisternal A-particle sequences in the Syrian hamster and mouse
Chromosoma 93, 213–219
- Kuhlmann I, Doerfler W (1982)
Shifts in the extent and patterns of DNA methylation upon explantation and subcultivation of adenovirus type 12-induced hamster tumor cells
Virology 118, 169–180
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1991)
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality
Cell 69, 915–926
- Lichtenberg U, Zock C, Doerfler W (1988)
Integration of foreign DNA into mammalian genome can be associated with hypomethylation at site of insertion
Virus Res. 11, 335–342
- Lozzio BB, Lozzio CB (1975)
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome
Blood 45, 321–334
- Lux SE, Palek J (1995)
Disorders of the red cell membrane, aus: Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds.), Philadelphia; *Blood: Principles and Practice of Hematology*, 1701–1818
- Maillet P, Inoue T, Kanzaki A, Yawata A, Kato K, Baklouti F, Delaunay J, Yawata Y (1996)
Stop codon in exon 30 (E2069X) of β -spectrin gene associated with hereditary elliptocytosis in spectrin Nagoya
Hum. Mutat. 8, 366–368
- McClelland M, Nelson M, Raschke E (1994)
Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases
Nucleic Acids Res. 22, 3640–3659
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels
J. Mol. Biol. 110, 119–146
- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP (1989)
Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs
Cell 58, 499–507

- Meyer P, Linn F, Heidmann I, Meyer z.A. H, Niedenhof I, Saedler H (1992)
Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype
Mol. Gen. Genet. 231, 345–352
- Meyer P, Heidmann I (1994)
Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants
Mol. Gen. Genet. 243, 390–399
- Meyer zu Altenschildesche G, Heller H, Wilgenbus P, Tjia ST, Doerfler W (1996)
Chromosomal distribution of the hamster intracisternal A-particle (IAP) retrotransposons
Chromosoma 104, 341–344
- Miyazaki Y, Kuriyama K, Higuchi M, Tsushima H, Sohda H, Imai N, Saito M, Kondo T, Tomonaga M (1997)
Establishment and characterization of a new erythropoietin-dependent acute myeloid leukemia cell line, AS-E2
Leukemia 11, 1941–1949
- Molloy PL, Watt F (1990)
DNA methylation and specific protein–DNA interactions
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 326, 267–275
- Monk M (1990)
Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X chromosome activity and imprinting
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 326, 299–312
- Muiznieks I, Doerfler W (1994)
The impact of 5'–CG–3' methylation on the activity of different eukaryotic promoters: a comparative study
FEBS Letters 344, 251–254
- Mukai F, Hawryluk I, Shapiro R (1970)
The mutagenic specificity of sodium bisulfite
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 983–988
- Nathans D, Smith HO (1975)
Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules
Ann. Rev. Biochem. 44, 273–293
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr. (1997)
GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments
- Norris DP, Patel D, Kay GF, Penny GD, Brockdorff N, Sheardown SA, Rastan S (1994)
Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation
Cell 77, 41–51

- Okayama H, Berg P (1982)
High-efficiency cloning of full-length cDNA
Biotechnology 24, 210–219
- Ono M, Ohishi H (1983)
Long terminal repeat sequences of intracisternal A particle genes in the Syrian hamster genome: identification of tRNA^{Phe} as a putative primer tRNA
Nucleic Acids Res. 11, 7169–7179
- Ono M, Toh H, Miyata T, Awaya T (1985)
Nucleotide sequence of the syrian hamster intracisternal A particle gene:
Close evolutionary relationship of type A particle gene to types B and D oncovirus genes
J. Virol. 55, 387–394
- Pschyrembel (1990)
Klinisches Wörterbuch
256., neu bearbeitete Auflage; Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Ramsahoye BH, Biniszkievicz D, Lyko F, Clark V, Bird A, Jaenisch R (2000)
Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by
DNA methyltransferase 3a
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5237–5242
- Razin A, Cedar H (1991)
DNA methylation and gene expression
Microbiological Reviews 55, 451–458
- Reik W, Collick A, Norris ML, Barton SC, Surani MA (1987)
Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice
Nature 328, 248–251
- Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillissen–Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B (1994)
Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial
Angelman and Prader–Willi syndromes
Am. J. Hum. Genet. 54, 741–747
- Remus R (1996)
Untersuchungen des Methylierungsmusters der zellulären IAP I–Segmente in normalen
und λ DNA–transgenen BHK21–Hamsterzellen
Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln, Abteilung Medizinische
Genetik und Virologie
- Remus R, Kämmer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W (1999)
Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the
methylation of cellular DNA sequences
J. Virol. 73, 1010–1022

- Remus R, Zeschnigk M, Zuther I, Kanzaki A, Wada H, Yawata A, Muiznieks I, Schmitz B, Schell G, Yawata Y, Doerfler W (2001)
The state of DNA methylation in the promoter regions of the human red cell membrane protein (band 3, protein 4.2, and β -spectrin) genes
Gene Funct. Dis. 2 (im Druck)
- Riggs AD, Jones PA (1983)
5-methylcytosine, gene regulation and cancer
Adv. Cancer Res. 40, 1–30
- Rosahl T, Doerfler W (1992)
Alterations in the levels of expression of specific cellular genes in adenovirus-infected and -transformed cells
Virus Res. 26, 71–90
- Russel GJ, Walker PMB, Elton RA, Subak-Sharpe JH (1976)
Doublet frequency analysis of fractionated vertebrate nuclear DNA
J. Mol. Biol. 108, 1–23
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science 266, 1208–1212
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467
- Sapienza C, Peterson AC, Rossant J, Balling R (1987)
Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin
Nature 328, 251–254
- Schofield AE, Martin PG, Spillett D, Tanner MJ (1994)
The structure of the human red blood cell anion exchanger (EPB3, AE1, band 3) gene
Blood 84, 2000–2012
- Schubbert R, Lettmann C, Doerfler W (1994)
Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice
Mol. Gen. Genet. 242, 495–504
- Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W (1997)
Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 961–966
- Selker EU (1990)
DNA methylation and chromatin structure: a view from below
TIBS 15, 103–107

- Shapiro R, Servis RE, Welcher M (1970)
Reactions of uracil and cytosine derivatives with sodium bisulfite. A specific deamination method
J. Am. Chem. Soc. 92, 422–424
- Shapiro R, DiFate V, Welcher M (1974)
Deamination of cytosine derivatives by bisulfite. Mechanism of the reaction
J. Am. Chem. Soc. 96, 906–912
- Shen JC, Rideout III WM, Jones PA (1992)
High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase
Cell 71, 1073–1080
- Singal R, Ginder GD (1999)
DNA methylation
Blood 93, 4059–4070
- Singer–Sam J, Riggs AD (1993)
X chromosome inactivation and DNA methylation
in: „DNA methylation, biology and biological significance”
Jost JP, Saluz HP (eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz
- Southern EM, Berg P (1982)
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter
J. Mol. Appl. Genet. 1, 327–341
- Sprengel J, Schmitz B, Heuss–Neitzel D, Zock C, Doerfler W (1994)
Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis
J. Virol. 68, 379–389
- Stöger R, Kubicka P, Liu C–G, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow D (1993)
Maternal specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinted signal
Cell 73, 61–71
- Stoker M, Macpherson I (1964)
Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives
Nature 203, 1355–1357
- Strohl WA, Rouse H, Teets K, Schlesinger RW (1970)
The response of BHK21 cells to infection with type 12 adenovirus.
III. Transformation and restricted replication of superinfecting type 2 adenovirus
Arch. Ges. Virusforsch. 31, 93–112
- Subak–Sharpe H, Burk RR, Crawford LV, Morrison JM, Hay J, Keir HM (1966)
An approach to evolutionary relationships of mammalian DNA viruses through analysis of the pattern of nearest neighbour base sequences
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 31, 737–748

- Sung LA, Chien S, Fan Y-S, Lin CC, Lambert K, Zhu L, Lam J, Chang L-S (1992)
Human erythrocyte Protein 4.2: isoform expression, differential splicing, and
chromosomal assignment
Blood 79, 2763–2770
- Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984)
Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during
gametogenesis
Nature 308, 548–550
- Surani MA, Allen ND, Barton SC, Fundele R, Howlett SK, Norris ML, Reik W (1990)
Developmental consequences of imprinting of paternal chromosomes by DNA
methylation
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 326, 313–327
- Sutter D, Westphal M, Doerfler W (1978)
Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus
type 12-transformed hamster cells
Cell 14, 569–585
- Sutter D, Doerfler W (1980)
Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is
inversely correlated with viral gene expression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 253–256
- Suzuki A, Kitasato H, Kawakami M, Ono M (1982)
Molecular cloning of retrovirus-like genes present in multiple copies in the Syrian
hamster genome
Nucleic Acid Res. 10, 5733–5746
- Tate PH, Bird A (1993)
Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression
Curr. Opin. Genet. Dev. 3, 226–231
- Toth M, Müller U, Doerfler W (1990)
Establishment of de novo DNA methylation patterns. Transcription factor binding and
deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus
promoter
J. Mol. Biol. 214, 673–683
- Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G (1962)
The quest for human cancer viruses. A new approach to an old problem reveals cancer
induction in hamsters by human adenoviruses
Science 137, 835–841
- Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J, Razin A (1982)
The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA
FEBS Lett. 146, 148–152

- Waalwijk C, Flavell RA (1978)
Msp I, an isoschizomer of *Hpa* II which cleaves both unmethylated and methylated *Hpa* II sites
Nucleic Acids Res. 5, 3231–3236
- Wada H, Suda T, Miura Y, Kajii E, Ikemoto S, Yawata Y (1990)
Expression of major blood group antigens on human erythroid cells in a two phase liquid culture system
Blood 75, 505–511
- Wada H, Kanzaki A, Yawata A, Inoue T, Kaku M, Takezono M, Sugihara T, Yamada O, Yawata Y (1999)
Late expression of red cell membrane protein 4.2 in normal human erythroid maturation with seven isoforms of the protein 4.2 gene.
Exp. Hematol. 27, 54–62
- Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Kaku M, Uno M, Wada H, Sugihara T, Yamada O, Eber SW, Özcan R, Kugler W (2000)
Characteristic features of genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population
Int. J. Hematol. 71, 118–135
- Zacharis W, Caserta M, O'Conner TR, Larsom JE, Wells RD (1988)
Cytosine methylation as an effector of right handed to left handed DNA structure transitions
Gene 74, 221–224
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W (1997)
Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader–Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method
Hum. Mol. Genet. 6, 387–395
- Zucchotti M, Monk M (1995)
Methylation of the mouse Xist gene in sperm and eggs correlates with imprinted Xist expression and paternal X-inactivation
Nature Genetics 9, 316–320

Danksagung

Danken möchte ich in erster Linie Herrn Prof. Dr. Walter Doerfler für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Anleitung durchführen zu können, für seine wertvollen Ratschläge, seine Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima in seiner Abteilung.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Dr. Yoshihito Yawata (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan), auf dessen Initiative das Erythrozyten-Projekt zurückgeht. Er hat nicht nur die im zweiten Teil der Arbeit untersuchten Nukleinsäuren zur Verfügung gestellt, sondern ermöglichte mir im Rahmen unserer Kollaboration auch die beiden Aufenthalte in seiner Arbeitsgruppe. Neben dem Erlernen grundlegender Techniken der Hämatologie gewann ich dort auch einen Einblick in die japanische Lebensart. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Dr. Hideho Wada, der mich mit der 2 Phasen-Flüssigkultur vertraut machte, und dem Laborleiter Prof. Dr. Dr. Akio Kanzaki bedanken. Zu danken habe ich insbesondere Frau Dr. Dr. (Omedeto!) Mayumi Kaku und Frau Sakura Eda dafür, daß sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ihnen allen gilt: „Domo arigato gozaimasu!”

Für die Einführung in das praktische molekularbiologische Arbeiten und die Betreuung während der Diplomarbeit möchte ich Dr. Christina Kämmer danken. Mein Dank gebührt auch Dr. Hildegard Heller für das Bereitstellen von DNA der BHK21- λ -Zelllinien aus der frühestmöglichen Passage und für das ausgiebige Lesen dieses Manuskriptes.

Auch Dr. Michael Zeschmick gegenüber bin ich zu Dank verpflichtet, da er mich in das Bisulfit-Protokoll des Genomischen Sequenzierens und die zeitsparende Plasmid-Minipräparationsmethode eingewiesen hat. Er hat auch die anfangs verwendeten Primer ausgewählt und die PCR-Bedingungen erprobt.

Ein ganz herzliches „Danke“ geht nach Riga zu Prof. Dr. Indrikis Muiznieks für seine wirklich speziellen, teilweise ausgefallenen Ratschläge. Von ihm habe ich eine Menge lernen können; insbesondere hat er mir durch die Weitergabe seiner Erfahrung geholfen, ein „Gespür“ für die Vorteile angeblich antiquierter Techniken zu entwickeln.

Für wertvolle Diskussionen und technische Ratschläge danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung „Medizinische Genetik und Virologie“ aus den letzten Jahren, insbesondere: Dr. Annett Behn–Krappa, Dr. Marianna Hösel, Dr. Paul A. Koetsier, Dr. Andreas Kremer, Dr. Marc Munnes, ...

Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung von Birgit Schmitz und Gudrun Schell bei der Sequenzierung der klonierten PCR–Produkte. Ihre routinierte Präparation der Sequenzreaktionen und –gele ermöglichten erst die Bestimmung einer solch großen Zahl von Sequenzen.

Weiterhin geht mein Dank auch an Gerd („noch ein–zwei Stündchen“) Wronka für die Gesellschaft an manch langem Abend im Labor.

Zu Dank verpflichtet bin ich insbesondere den Damen in der Spülküche, Frau Jansen, Frau Bläser und Frau Schmidt, für die stets sorgfältige Reinigung der Laborgeräte und das Autoklavieren der Lösungen. Ohne diesen nicht selbstverständlichen „Service“ hätte das Anfertigen dieser Arbeit mit Sicherheit deutlich länger gedauert!

Last but not least (ganz im Gegenteil!) gilt mein Dank den Kollegen aus dem Labor 416, Dr. Laurence Mangel, Frauke Naumann (Vielen Dank für die originellen Kommentare zu dem Manuskript!) und Dr. Jörg Schröer. Sie hätten eigentlich viel früher erwähnt werden müssen, werden aber aus gutem Grunde erst hier genannt: Ihnen möchte ich nicht nur für die hervorragende Zusammenarbeit über so viele Jahre hinweg und die sehr gute Stimmung in unserem Labor während dieser Zeit danken, sondern auch dafür, daß aus Kollegen Freunde geworden sind.

Die allerwichtigste Person für das Gelingen dieser Arbeit ist aber ohne Zweifel Christine Wolf, bei der ich mich hier für alle Entbehrungen vor allem während des Schreiben des Manuskriptes (man nennt es wohl „Opfer für die Wissenschaft“) entschuldigen muß. Ich danke ihr für die Unterstützung und das Verständnis, das sie in den ganzen Jahren aufgebracht hat. Eine lediglich etwas detailliertere Ausführung würde sicherlich den Rahmen dieser Danksagung sprengen und sie zu einem ganzen Buch anschwellen lassen.

Abschließend gebührt mein ganz spezieller Dank aber allen E. coli-Bakterien vom Stamme der XL1-blueMRF', die mir mit ihrer Bereitschaft, von allen Plasmiden, mit denen ich sie transformiert hatte, so viele Replikate zu produzieren, daß ich deren Sequenzen bestimmen konnte, ungemein geholfen haben. Ohne sie — und den zu den heutigen Techniken führenden Arbeiten unzähliger Wissenschaftler — hätte diese Arbeit nicht durchgeführt werden können.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit — einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen —, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie — abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen — noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Walter Doerfler betreut worden.

Teilpublikationen:

R. Remus, C. Kämmer, H. Heller, B. Schmitz, G. Schell und W. Doerfler. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J. Virol.* 73, 1010–1022 (1999)

R. Remus, M. Zeschnigk, I. Zuther, A. Kanzaki, H. Wada, A. Yawata, I. Muiznieks, B. Schmitz, G. Schell, Y. Yawata und W. Doerfler. The state of DNA methylation in the promoter regions of the human red cell membrane protein (band 3, protein 4.2, and β -spectrin) genes. *Gene Funct. Dis.* 2, (im Druck)

Lebenslauf

Ralph Remus

geboren am 30. März 1970 in Köln, Bundesrepublik Deutschland

ledig

Schulbildung

1976–1980 Katholische Grundschule Köln–Poll

1980–1989 Johann–Gottfried–Herder–Gymnasium, Köln–Buchheim

Mai 1989 Allgemeine Hochschulreife

Studium

1989–1996 Diplom–Biologie an der Universität zu Köln

1995–1996 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter der Anleitung von Professor Dr. W. Doerfler. Thema: „Untersuchungen des Methylierungsmusters der zellulären IAP I–Segmente in normalen und λ DNA–transgenen BHK21–Hamsterzellen“

Dissertation

1996–2000 Institut für Genetik, Universität zu Köln

Auslandsaufenthalte

1998 2 Wochen

1999 4 Wochen

an der Kawasaki Medical School, Abteilung für Hämatologie, Kurashiki, Japan (Einladung von Prof. Dr. Dr. Yoshihito Yawata)