

**Epigenetische und funktionelle Charakterisierung
der 5'-*upstream* Region des menschlichen
FMR1 Gens**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anja Barbara Naumann

aus Freiberg

Erlangen im Dezember 2011

Vorsitzender der Promotionskommission:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. Walter Doerfler

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Januar 2012

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Veblen (1857-1929)
amerikanischer Soziologe und Ökonom

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Begriffserklärung	VIII
A. Einleitung	1
A.1. Epigenetik	1
A.2. Modifikation der DNA am Cytosin	1
A.3. Chromatin-Organisation und Modifikation der Histone	5
A.4. RNA-Interferenz und nicht-kodierende RNAs	5
A.5. Regulation der Genexpression und Gen-Stillegung	6
A.6. Krebsentstehung	7
A.7. Genomische Prägung	8
A.8. Entwicklung und epigenetische Reprogrammierung	9
A.9. X-Chromosom Inaktivierung	10
A.10. Erkrankungen mit instabilen Trinukleotid-Repetitionen	11
A.10.1. <i>Chorea Huntington</i>	11
A.10.2. <i>Fragiles X Syndrom</i>	13
B. Zielsetzung der Arbeit	19
C. Materialien	21
C.1. Chemikalien	21
C.2. Laborgeräte	22
C.3. Labormaterialien	24
C.4. Lösungen, Puffer, Medien	25
C.5. Zelllinien, Zellen und DNA-Proben	30
C.6. Bakterienstamm	31
C.7. Plasmide	31
C.8. Antikörper	31
C.9. Primer	32
C.9.1. Primer zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA	32
C.9.2. Primer zum Sequenzieren der PCR-Fragmente im Plasmid pJET1/ <i>blunt</i>	35
C.9.3. Primer zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA	35
C.9.4. Primer zum quantitativen Amplifizieren nach Histon-ChIP	35
C.9.5. Primer zum Amplifizieren der FMR1 Methylierungsgrenze und Promotorregion	36
C.10. Programme	36
C.11. DNA-Größenmarker	36

Inhaltsverzeichnis

C.12. Enzyme	37
C.12.1. Restriktionsendonukleasen	37
C.12.2. Sonstige Enzyme	37
C.13. Kits und Reagiersysteme	37
D. Methoden	39
D.1. Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern durch die Bisulfit-Sequenzierung	39
D.1.1. Zellkultur	39
D.1.2. Bestimmung der Zellzahl	39
D.1.3. Isolierung genomischer DNA mit Natriumperchlorat-Chloroform	39
D.1.4. Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen	40
D.1.5. Bisulfit-Konversion genomischer DNA	40
D.1.6. PCR (Polymerase-Kettenreaktion) Bisulfit-behandelter DNA	41
Gradienten-PCR	41
Analytische PCR	41
Präparative PCR	42
D.1.7. Agarose-Gelelektrophorese	42
D.1.8. Gelextraktion der PCR-Fragmente	42
D.1.9. Klonierung	43
Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli DH5α</i>	43
Ligation der PCR-Fragmente in den Vektor pJET1/ <i>blunt</i>	43
Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli DH5α</i>	44
D.1.10. Plasmid-DNA Minipräparation	44
D.1.11. Analytische Restriktionsspaltung	45
D.1.12. Sequenzierung	45
D.1.13. Auswertung der Sequenzierung	46
D.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	47
D.2.1. Präparation von Kernextrakten aus HCT-116 Zellen	47
D.2.2. Photometrische Bestimmung von Protein-Konzentrationen	47
D.2.3. Herstellen der DNA-Probe für EMSA	47
D.2.4. Plasmid-DNA Maxipräparation	48
D.2.5. Restriktionsspaltung des Plasmids pJET1-EMSA mit <i>XbaI</i> und <i>XhoI</i>	48
D.2.6. <i>in vitro</i> Methylierung der pJET1-EMSA <i>XbaI-XhoI</i> -Fragmente	49
D.2.7. Restriktionsspaltung der pJET1-EMSA <i>XbaI-XhoI</i> -Fragmente mit <i>HpaII</i> oder <i>MspI</i>	49
D.2.8. Restriktionsspaltung des Plasmids pcDNA3.1(+) mit <i>DraI</i> und <i>RsaI</i>	50
D.2.9. Markierung der DNA-Fragmente	50
D.2.10. Bestimmung der Markierungseffizienz der DNA-Fragmente	51
D.2.11. DNA-Protein-Bindungsreaktion	51
D.3. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	53
D.3.1. Vernetzung der DNA mit den Histonen	53
D.3.2. Permeabilisierung und Mikrokokken-Nuklease-Behandlung	53
D.3.3. Lysieren der Zellen	53
D.3.4. Antikörper-Bindung	54
D.3.5. Immunpräzipitation	54
D.3.6. Revertierung der DNA-Protein-Vernetzung und DNA-Reinigung	54
D.3.7. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	54
D.4. Sequenzierung der FMR1 Methylierungsgrenze und Promotorregion	56
E. Ergebnisse	57
E.1. Charakteristische Merkmale der <i>FMR1</i> Promotor und 5'- <i>upstream</i> Region des Menschen	57
E.2. DNA-Methylierungsmusteranalyse	59
E.3. Kontrollexperimente zur DNA-Methylierungsmusteranalyse	60

E.4. Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'-upstream Region in Zellen mit Wildtyp-Allel	62
E.5. Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'-upstream Region in verschiedenen Geweben	64
E.6. Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'-upstream Region in Tumorzelllinien	65
E.7. Spezifische Bindung von Kernproteinen an die Übergangsregion der <i>FMRI</i> Methylierungsgrenze	68
E.8. Histon-Modifikationen an der Übergangsregion der <i>FMRI</i> Methylierungsgrenze	70
E.9. Methylierungsgrenze in der <i>Fmr1</i> 5'-upstream Region der Maus in verschiedenen Geweben	73
E.10. Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'-upstream Region in Prämutations-Überträgern	74
E.11. Zunehmender Verlust der Methylierungsgrenze in weiblichen Vollmutations-Trägern	75
E.12. Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'-upstream Region in männlichen Vollmutations-Trägern ohne <i>FXS</i>	76
E.13. Vollständiger Verlust der Methylierungsgrenze in Zellen von männlichen <i>FXS</i> Individuen	77
E.14. Nukleotid-Sequenz der <i>FXS</i> Genome im Bereich der <i>FMRI</i> Methylierungsgrenze und Promotorregion	79
E.15. Methylierungsgrenze in der <i>HTT</i> 5'-upstream Region des Menschen in der männlichen Zelllinie HCT-116	80
F. Diskussion	81
F.1. Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des <i>FMRI</i> Gens des Menschen	81
F.2. Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des <i>Fmr1</i> Gens der Maus	82
F.3. Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des <i>HTT</i> Gens des Menschen	82
F.4. Proteine binden im Bereich der Methylierungsgrenze des menschlichen <i>FMRI</i> Gens	82
F.5. Verlust der Methylierungsgrenze in Zellen von männlichen <i>FXS</i> Individuen	83
F.6. Isoliert nicht-methylierte CpG-Folgen in <i>de novo</i> methylierter DNA	84
F.7. Die Genome von Prämutations-Überträgern und weiblichen Vollmutations-Trägern	84
F.8. Destabilisierung der Methylierungsgrenze in transformierten Zelllinien	85
F.9. Die Genome von männlichen Vollmutations-Trägern ohne <i>FXS</i>	85
F.10. Vergleich mit Expansionen anderer Trinukleotid-Repetitionen	86
F.11. Überlegungen zum Mechanismus der Methylierungsgrenze	86
G. Zusammenfassung	89
H. Abstract	91
I. Literaturverzeichnis	93
J. Anhang	105
J.1. Plasmidkarten	105
J.2. Sequenzierung	107
J.3. Erklärung	110
J.4. Veröffentlichungen	110
Teilpublikationen von Originalarbeiten	110
Reviews	110
Wissenschaftliche Beiträge	111
J.5. Lebenslauf	112
J.6. Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin durch DNA-Methyltransferasen.	1
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion.	3
Abbildung 3:	Die vier möglichen Mechanismen für eine aktive Demethylierung der DNA in Vertebraten.	4
Abbildung 4:	Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histon-Modifikation bei der Gen-Stillegung.	6
Abbildung 5:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines normalen und fragilen X-Chromosoms.	13
Abbildung 6:	Die vier verschiedenen Allele des <i>FMRI</i> Gens.	14
Abbildung 7:	Entwicklung der menschlichen Keimzellen.	16
Abbildung 8:	Berechnung der Transformationseffizienz.	43
Abbildung 9:	Umrechnung von pmol in ng.	51
Abbildung 10:	Berechnung des % Input für jede Immunpräzipitation.	55
Abbildung 11:	Karte mit einem Teil des <i>FMRI</i> Gens und der 5'- <i>upstream</i> Region des Menschen.	57
Abbildung 12:	Darstellungsweise der DNA-Methylierungsmusteranalyse.	59
Abbildung 13:	Kontrollen der DNA-Methylierungsmusteranalyse.	61
Abbildung 14:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in männlichen Zellen mit Wildtyp-Allel.	62
Abbildung 15:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in weiblichen Zellen mit Wildtyp-Allel.	63
Abbildung 16:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in männlichen fötalen Geweben.	64
Abbildung 17:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in männlichen adulten Geweben.	65
Abbildung 18:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in der weiblichen Zelllinie HeLa.	66
Abbildung 19:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in der männlichen Zelllinie HCT-116.	67
Abbildung 20:	Spezifische Bindung von Kernproteinen an die Übergangsregion der <i>FMRI</i> Methylierungsgrenze.	68
Abbildung 21:	Lokalisation der Produkte und Primer für die quantitative PCR.	70
Abbildung 22:	Histon-Modifikationen an der Übergangsregion der <i>FMRI</i> Methylierungsgrenze.	71
Abbildung 23:	Methylierungsgrenze in der <i>Fmr1</i> 5'- <i>upstream</i> Region der Maus in männlichen adulten Geweben.	73
Abbildung 24:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in weiblichen Prämutations-Überträgern.	74
Abbildung 25:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in männlichen Prämutations-Überträgern.	75
Abbildung 26:	Zunehmender Verlust der Methylierungsgrenze in weiblichen Vollmutations-Trägern.	75
Abbildung 27:	Methylierungsgrenze in der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region in männlichen Vollmutations-Trägern ohne <i>FXS</i>	76
Abbildung 28:	Vollständiger Verlust der Methylierungsgrenze in männlichen <i>FXS</i> peripheren weißen Blutzellen.	77
Abbildung 29:	Vollständiger Verlust der Methylierungsgrenze in männlichen <i>FXS</i> Fibroblastenzellen.	78
Abbildung 30:	Ausschnitt der <i>FMRI</i> Karte mit Lage der sequenzierten Region.	79
Abbildung 31:	Methylierungsgrenze in der <i>HTT</i> 5'- <i>upstream</i> Region des Menschen in der männlichen Zelllinie HCT-116.	80
Abbildung 32:	Plasmidkarte pcDNA3.1(+).	105
Abbildung 33:	Plasmidkarte pJET1/ <i>blunt</i>	105
Abbildung 34:	Plasmidkarte pUC19- <i>FMRI</i>	106
Abbildung 35:	Plasmidkarte pJET1-EMSA.	106
Abbildung 36:	<i>FMRI</i> Abschnitt 1 von 14451.	107
Abbildung 37:	<i>FMRI</i> Abschnitt 2 von 14451.	108
Abbildung 38:	<i>FMRI</i> Abschnitt 3 von 14451.	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zelllinien, Zellen und DNA-Proben.	31
Tabelle 2:	Primer zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA.	35
Tabelle 3:	Primer zum Sequenzieren der pJET1/ <i>blunt</i> klonierten PCR-Fragmente.	35
Tabelle 4:	Primer zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA.	35
Tabelle 5:	Primer zum quantitativen Amplifizieren nach Histon-ChIP.	35
Tabelle 6:	Primer zum Amplifizieren der <i>FMRI</i> Methylierungsgrenze und Promotorregion.	36
Tabelle 7:	Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm der Bisulfit-Konversion.	40
Tabelle 8:	Temperaturverteilung im Thermozykler der Gradienten 50±10°C und 60±10°C.	41
Tabelle 9:	Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA.	42
Tabelle 10:	<i>Sticky-End</i> Protokoll.	44
Tabelle 11:	Analytische Restriktionsspaltung mit <i>XbaI</i> und <i>NheI</i> oder <i>AluI</i>	45
Tabelle 12:	Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Sequenzieren der pJET1/ <i>blunt</i> klonierten PCR-Fragmente.	45
Tabelle 13:	Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA.	48
Tabelle 14:	Restriktionsspaltung des Plasmids pJET1-EMSA mit <i>XbaI</i> und <i>XhoI</i>	49
Tabelle 15:	<i>in vitro</i> Methylierung der pJET1-EMSA <i>XbaI-XhoI</i> -Fragmente.	49
Tabelle 16:	Restriktionsspaltung der pJET1-EMSA <i>XbaI-XhoI</i> -Fragmente mit <i>HpaII</i> oder <i>MspI</i>	50
Tabelle 17:	Restriktionsspaltung des Plasmid pcDNA3.1(+) mit <i>DraI</i> und <i>RsaI</i>	50
Tabelle 18:	Markierung der DNA-Fragmente mit Digoxigenin.	51
Tabelle 19:	Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm für qPCR der ChIP-Analysen.	55
Tabelle 20:	Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Amplifizieren der <i>FMRI</i> 5'- <i>upstream</i> Region.	56
Tabelle 21:	<i>Blunt-End</i> Protokoll.	56

Abkürzungsverzeichnis

5-caC	5-Carboxylcytosin
5-fC	5-Formylcytosin
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-hmU	5-Hydroxymethyluracil
5-mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
<i>Ad12</i>	<i>Adenovirus Typ 12</i>
<i>ADH5</i>	<i>Alkohol-Dehydrogenase 5 Gen</i>
AID	(engl.: activation induced deaminase)
AP	abasische Stelle
APOBEC	(engl.: apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2)
ATCC	(engl.: American Type Culture Collection)
BER	Basen-Exzisionsreparatur
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (engl.: charge-coupled device)
CGGBP1	CGG-Bindeprotein 1
ChIP	(engl.: chromatin immunoprecipitation)
<i>Chr4Sata</i>	<i>Chromosom 4 Satellit alpha</i>
CpG	Dinukleosidphosphat mit einem Cytosin- und Guanin-Rest
CTCF	(engl.: CCCTC-binding factor)
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphate
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphate
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphate
DIG	Digoxigenin
<i>DM1</i>	<i>myotone Dystrophie Typ 1</i>
<i>DMPK</i>	<i>Myotonin-Proteinkinase Gen</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleid acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
ds	doppelsträngig (engl.: double-stranded)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphate
<i>EBV</i>	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
<i>E. coli</i>	(lat.: <i>Escherichia coli</i>)
EMSA	(engl.: electrophoretic mobility shift assay)
engl.	Englisch
<i>FMR1</i>	(engl.: <i>fragile X mental retardation 1 gene</i>)
FMRP	FMR1 Protein
FW	fötale Woche
<i>FXPOI</i>	<i>fragile X assoziierte vorzeitige Ovarialinsuffizienz</i>
FXR1	(engl.: fragile X related 1 protein)
<i>FXS</i>	<i>fragiles X Syndrom oder Martin-Bell-Syndrom</i>
<i>FXTAS</i>	<i>fragile X assoziierte Tremor/Ataxie Syndrom</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (engl.: gravity)
g	Gramm
<i>GAPDH</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Gen</i>
griech.	Griechisch
h	Stunde(n)
HAT	Histon-Acetyl-Transferase

HCT	menschlicher Dickdarmtumor (engl.: human colon tumor)
HD	<i>Chorea Huntington</i> oder <i>Veitstanz</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HeLa	Henrietta Lacks
HFF	menschliche Vorhautfibroblasten (engl.: human foreskin fibroblasts)
HFM	(engl.: high-functioning male)
HMT	Histon-Methyl-Transferase
H ₂ O	Wasser
HP1	Heterochromatin Protein 1
<i>H. sapiens</i>	Mensch (lat.: <i>Homo sapiens</i>)
<i>HTT</i>	(engl.: <i>huntingtin</i> gene)
k	Kilo-
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	Lateinisch
M	Mega-
M	Molar
m	Milli-
μ	Mikro-
MBD	Methyl-CpG-Bindungsdomäne
mGluR-LTD	metabotrope Glutamat-Rezeptor-abhängige Langzeit-Depression
miRNA	(engl.: micro RNA)
min	Minute(n)
<i>M. musculus</i>	Maus (lat.: <i>Mus musculus</i>)
mol	Molekül
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
n	Nano-
NCBI	(engl.: National Center for Biotechnology Information)
ncRNA	nicht-kodierende RNA (engl.: non-coding RNA)
NTR	nicht-translatierte Region
OD	optische Dichte
p	Piko-
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (engl.: peripheral blood mononuclear cell)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
RISC	RNA-induzierter Stilllegungs-Komplex (engl.: RNA-induced silencing complex)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz (engl.: RNA interference)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
rRNA	Ribosomal-RNA (engl.: ribosomal RNA)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	S-adenosyl-methionin
siRNA	(engl.: short interfering RNA)
ss	einzelsträngig (engl.: single-stranded)
T	Thymin
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
TET	(engl.: ten-eleven translocation protein)
TNR	Trinukleotid-Repetition
tRNA	Transfer-RNA (engl.: transfer RNA)
U	Einheit(en) (engl.: unit(s))
U	Uracil
u. a.	und andere
x	fach, mal
XIC	X-Inaktivierungszentrum (engl.: X-inactivation center)
z. B.	zum Beispiel

Begriffserklärung

englische Begriffserklärung:

antisense

gegen die Laufrichtung

blunt-end

stumpfes bzw. glattes Ende

downstream

stromabwärts

gain of function

Funktionsgewinn

loss of function

Funktionsverlust

sense

mit der Laufrichtung

sticky-end

klebriges bzw. überhängendes Ende

upstream

stromaufwärts

lateinische Begriffserklärung:

cis

diesseits

de novo

neu

in vitro

im Glas

in vivo

im Lebenden

trans

jenseits

A. Einleitung

A.1. Epigenetik

Der Begriff Epigenetik fand im Jahre 1942 durch Conrad Hal Waddington zum ersten Mal Erwähnung und wurde definiert als die Wechselwirkung zwischen den Genen und ihren Genprodukten (Waddington, 1942). Abgeleitet wird er von dem griechischen Wort *epi* für „über“ oder „auf“ und bedeutet soviel wie „überlagerte Genetik“. Heute definiert man Epigenetik als die Weitergabe von Veränderungen des Phänotyps, die nicht auf Mutationen der DNA-Sequenz (Genotyp) zurückzuführen sind. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind die Modifikation der DNA und Histone und nicht-kodierende RNAs.

A.2. Modifikation der DNA am Cytosin

Jede Zelle eines Organismus trägt die selbe genomische Information in einer konstanten DNA-Sequenz aus Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C), jedoch benötigen Zellen nicht den gesamten genetischen Inhalt zur gleichen Zeit. Eine Differenzierung zu den verschiedenen Zelltypen mit spezifischen Funktionen erfordert eine dynamische Anpassung, bei der Gene aktiviert oder stillgelegt werden müssen. In Säugetieren wird die Modifikation der DNA ausschließlich am Cytosin bewerkstelligt (Nabel *u. a.*, 2011). Cytosin kann dabei durch Methylierung, Deaminierung und Oxidation verändert werden.

Das als „fünfte Base“ bezeichnete 5-Methylcytosin (5-mC) wurde entdeckt im Jahre 1925 von Johnson und Coghill in der DNA des Tuberkulose Bakteriums (Johnson & Coghill, 1925) und konnte 1948 auch in Kalbsthymus DNA nachgewiesen werden (Hotchkiss, 1948). Bei Wirbeltieren erfolgt die Methylierung der DNA ausschließlich an Cytosin-Resten in der Dinukleotid-Sequenz 5'-CpG-3' (Abbildung 1).

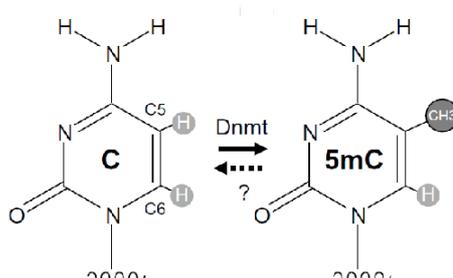


Abbildung 1: Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin durch DNA-Methyltransferasen.¹ Erklärung siehe Text.

¹Aus: (Cheng *u. a.*, 2010), modifiziert

Die Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert, dabei wird das Cytosin aus der DNA-Doppelhelix zunächst herausgeklappt (engl.: base flipping). Durch den nukleophilen Angriff eines konservierten Cysteins der DNMT und die vorübergehende kovalente Bindung an das sechste Kohlenstoff C6 des Cytosin-Ringes, kann dann die Methyl-Gruppe von S-adenosyl-

methionin (SAM) auf das nun aktivierte fünfte Kohlenstoff C5 übertragen werden. Man unterscheidet dabei drei Arten von DNA-Methyltransferasen, die DNMT1, 3A und 3B. Die DNMT1, auch bekannt als Instandhaltungs-Methylase (engl.: maintenance methylase), ist hauptsächlich verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters während der semikonservativen DNA-Replikation. Im Gegensatz dazu spielen die DNMT3A und 3B vorwiegend eine Rolle als Initiations-Methylasen (engl.: *de novo* methylase) bei der Gametogenese und Embryogenese, wo neue Methylierungsmuster etabliert werden müssen. DNMT3L besitzt keine eigene DNA-Methyltransferase-Aktivität, fungiert jedoch als essentieller Cofaktor für eine *de novo* DNA-Methylierung durch DNMT3A (Bourc'his *u. a.*, 2001; Bourc'his & Bestor, 2004). Das DNA-Methyltransferase Homolog DNMT2 methyliert anstelle von DNA die Asparaginsäure-beladene Transfer-RNA (tRNA-Asp) an Cytosin 38 (Goll *u. a.*, 2006).

Als Schutzmechanismus der Bakterien haben sich mit den DNA-Methyltransferasen parallel dazu auch die entsprechenden Restriktionsendonukleasen mit der gleichen Erkennungssequenz entwickelt. Kommt es aufgrund einer Bakteriophagen-Infektion zum Eindringen von fremder DNA in die Bakterienzelle, wird diese durch die Restriktionsendonukleasen zerstört, wohingegen die eigene DNA durch Methylierung vor dem Abbau geschützt ist.

Die wichtigste biologische Funktion von 5-mC ist jedoch die langfristige Regulation der Genexpression (Doerfler, 1983), wobei viele Gene eine umgekehrte Korrelation zwischen Expression und Methylierung aufweisen (Sutter & Doerfler, 1980; Bird, 1984; Attwood *u. a.*, 2002). Eine Ausnahme von dieser Regel stellt dabei, das zu den Iridoviren gehörende *Frosch Virus 3 (FV3)* mit einem stark methylierten Genom, dar. Es konnte gezeigt werden, dass trotz Methylierung aller CpG-Folgen in einigen Promotoren, deren Transkriptionsaktivität erhalten blieb (Thompson *u. a.*, 1988; Spangler & Essani, 1994; Munnes *u. a.*, 1995). Die DNA-Methylierung ist ein dynamischer Vorgang, mit dem es dem Organismus ermöglicht wird, sich flexibel an veränderte äußere Umwelteinflüsse anzupassen. Das DNA-Methylierungsmuster kann dabei sowohl während eines Zellteilungs-Zyklus variieren (Brown *u. a.*, 2007), als auch sich in nicht mehr teilungsfähigen, bereits ausdifferenzierten Zellen verändern (Martinowich *u. a.*, 2003).

Zum Nachweis von 5-mC in der DNA können Methylierungs-sensitive Restriktionsenzyme verwendet werden, deren Aktivität durch 5-mC gehemmt wird. Die beiden isochizomeren Restriktionsendonukleasen *HpaII* und *MspI* haben die gleiche Erkennungssequenz 5'-CCGG-3'. Das Methylierungs-sensitive *HpaII* wird durch eine CpG-Methylierung geblockt, wohingegen *MspI* die Sequenz unabhängig von der CpG-Methylierung schneidet (Waalwijk & Flavell, 1978). Nachteil dieser Methode ist, dass nur CpG-Folgen in Erkennungssequenzen von Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen untersucht werden können. Das sind nur etwa 10-15% aller CpG-Folgen in einer DNA-Sequenz. Zur Gen-spezifischen Analyse von DNA-Methylierungsmustern wird standardmäßig die Bisulfit-Konversion genomischer DNA verwendet, da ansonsten DNA-Methylierungsmuster ohne Instandhaltungs-Methylasen und SAM gelöscht werden können. Die Bisulfit-Konversion ist heute Ausgangspunkt für eine Reihe von Methoden zur Detektion von 5-mC in der DNA. Das zu Grunde liegende Prinzip ist die Umwandlung von Cytosin in Uracil (Abbildung 2), wohingegen alle methylierten Cytosine in der DNA nicht-reaktiv sind. Bei der Bisulfit-Sequenzierung (Frommer *u. a.*, 1992; Clark *u. a.*, 1994), wird die durch Bisulfit-behandelte

einzelsträngige DNA in der PCR (Polymerase-Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction) amplifiziert. Die verwendeten Primer binden ausschließlich an DNA, deren nicht-methylierte Cytosine außerhalb der CpG-Folgen zu Thyminen umgewandelt sind. Die PCR-Produkte können dann kloniert und 5 bis 10 einzelne Klone sequenziert werden. Wenn bei der Auswertung der Sequenzierung alle nicht-methylierten Cytosine in und außerhalb von CpG-Folgen zu Thyminen umgewandelt und nicht mehr zu erkennen sind, dann weisen alle übriggebliebenen Cytosine in der konvertierten DNA-Sequenz auf 5-Methylcytosin hin. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit zur Analyse von einzelnen DNA-Molekülen bis hin zu einzelnen CpG-Folgen, wobei ein sequenziertes DNA-Molekül für alle X-chromosomalen Gene bei Männern (XY) aus einer Zelle, bei Frauen (XX) hingegen von einem der beiden X-Chromosomen aus einer Zelle stammt.

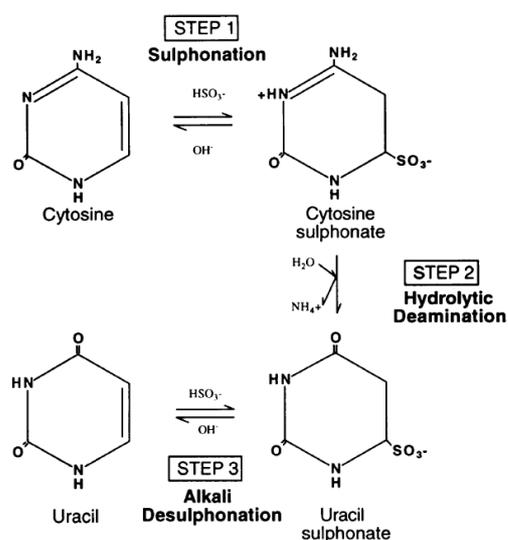


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion.² Die Umwandlungsreaktion von Cytosin zu Uracil durch Natriumbisulfit verläuft in drei Schritten über eine A) Sulfonierung, B) hydrolytische Deaminierung und C) alkalische Desulfonierung.

²Aus: (Clark u. a., 1994)

In Säugern konnte bisher kein eindeutiges Enzym für eine aktive Demethylierung, bei der die Methyl-Gruppe durch direkte Spaltung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung entfernt wird, nachgewiesen werden (Abbildung 1), weshalb verschiedene Mechanismen der Demethylierung derzeit diskutiert werden (Abbildung 3).

Die hydrolytische Deaminierung von 5-mC zu T durch die AID (engl.: activation induced deaminase) und APOBEC (engl.: apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2) Enzyme führt zur Entstehung einer falschen Basenpaarung von G mit T (Morgan u. a., 2004; Bhutani u. a., 2010). Das Enzym TDG (Thymin-DNA-Glykosylase) entfernt die falsche Nukleotidbase T durch Spaltung der N-glycosidischen Bindung zum Zucker Desoxyribose, wodurch eine abasische Stelle entsteht, welche dann im weiteren Reparaturverlauf der BER (Basen-Exzisionsreparatur) durch C ersetzt wird (Abbildung 3). Da 70% aller CpG-Folgen methyliert vorliegen, könnte die Deaminierung erklären, warum CpG-Folgen, mit nur 20% der zu erwartenden Häufigkeit, im menschlichen Genom deutlich unterrepräsentiert sind. In den sogenannten CpG-Inseln, die meist stromaufwärts eines Gens zu finden sind, hat man hingegen eine verstärkte

Anreicherung der CpG-Folgen (Antequera & Bird, 1993). Wird so eine falsche Basenpaarung nicht erkannt und repariert, ist die Folge eine Mutation der DNA.

In Abwesenheit des Kofaktors SAM können DNMT auch nicht-klassische Reaktionen katalysieren, wie die Deaminierung von Cytosin am Kohlenstoff C4 zu Uracil (Shen *u. a.*, 1992), oder die Addition eines Aldehyds am Kohlenstoff C5, wodurch 5-Hydroxyalkylcytosin gebildet wird (Liutkeviciute *u. a.*, 2009). Liegt der Aldehyd als Formaldehyd vor, kann daraus dann 5-Hydroxymethylcytosine entstehen.

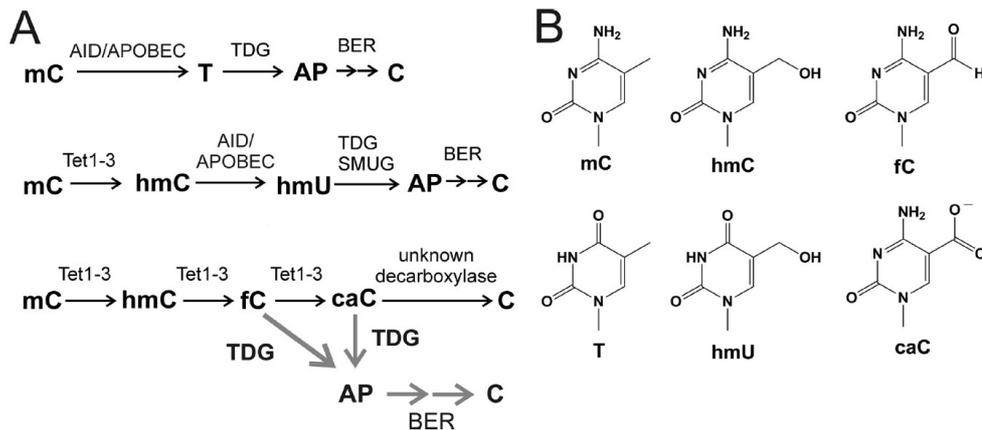


Abbildung 3: Die vier möglichen Mechanismen für eine aktive Demethylierung der DNA in Vertebraten.³ (A, B) T = Thymin; C = Cytosin; mC = 5-Methylcytosin; hmC = 5-Hydroxymethylcytosin; hmU = 5-Hydroxymethyluracil; fc = 5-Formylcytosin; caC = 5-Carboxylcytosin; AP = abasische Stelle; TDG = Thymin-DNA-Glykosylase; BER = Basen-Exzisionsreparatur; TET = ten-eleven translocation Protein. Erklärung siehe Text.

³Aus: (Maiti & Drohat, 2011)

Das häufig auch als „sechste Base“ bezeichnete 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) wurde erstmals 1952 in der DNA von Bakteriophagen entdeckt (Wyatt & Cohen, 1952), wo 5-hmC häufig durch Glykosylierung modifiziert vorliegt, um die eigene DNA resistent gegenüber dem Abbau durch die Restriktionsendonukleasen der infizierten Bakterienzelle zu machen. Jedoch erst 2009 konnte 5-hmC auch eindeutig in der DNA von Säugern nachgewiesen werden, (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *u. a.*, 2009), wobei die größten Mengen in den neuronalen Purkinjezellen der Kleinhirnrinde zu finden sind und nicht mehr als 1% aller Cytosine ausmachen (Kriaucionis & Heintz, 2009; Globisch *u. a.*, 2010). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass 5-hmC durch Oxidation von 5-mC entsteht, wobei diese Umwandlung von den Eisen(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen TET (engl.: ten-eleven translocation) Proteinen (TET1-3) katalysiert wird (Tahiliani *u. a.*, 2009). Man vermutet deshalb, dass 5-Hydroxymethylcytosin das Zwischenprodukt bei der Umwandlung von 5-Methylcytosin in Cytosin ist. Die Deaminierung von 5-Hydroxymethylcytosin zu 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU) erfolgt ebenfalls mit Hilfe von AID/APOBEC. Die TDG kann dann ebenso wie T auch 5-hmU entfernen und dadurch die BER einleiten (Abbildung 2) (Cortázar *u. a.*, 2011; Cortellino *u. a.*, 2011). Unklar ist jedoch, ob 5-hmC zudem auch eine Funktion bei der epigenetischen Regulation hat. Eine falsche Umwandlung von 5-mC zu 5-hmC kann von einer 5-Hydroxymethylcytosin-DNA-Glykosylase in einem Reparaturmechanismus korrigiert werden (Cannon *u. a.*, 1988).

Aktuelle Studien scheinen zu belegen, dass die TET Enzyme auch die weitere Oxidation von 5-hmC

zu 5-Formylcytosin (5-fC) und dann zu 5-Carboxylcytosin (5-caC) vermitteln (Abbildung 3), ebenso wie die Anwesenheit sowohl von 5-fC als „siebte Base“ als auch von 5-caC als „achte Base“ in der genomischen DNA von Säugetieren (He *u. a.*, 2011; Ito *u. a.*, 2011; Pfaffeneder *u. a.*, 2011). Bisher ist allerdings keine Decarboxylase bekannt, die die Regenerierung von C aus 5-caC katalysiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das TDG Enzym 5-fC und 5-caC erkennt und ausschneidet, wohingegen 5-hmC unangetastet bleibt (Maiti & Drohat, 2011). Die abschließende Reaktion der aktiven Demethylierung kann dann vermutlich wieder über die BER erfolgen (Abbildung 3).

A.3. Chromatin-Organisation und Modifikation der Histone

Als Chromatin bezeichnet man im Wesentlichen einen Komplex aus genomischer DNA, den basischen Histon-Proteinen und weiteren Nicht-Histon-Proteinen. Die Nukleosomen sind die Grundeinheiten der Chromatinstruktur, und bestehen aus 147 bp DNA, die linksgängig in 1,67 Windungen um ein Histonoktamer mit je zwei Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 gewunden sind. Zwei benachbarte Nukleosomen sind durch eine etwa 40 bis 60 bp lange Verbindungs-DNA (engl.: linker DNA) miteinander verbunden. Das Histon H1 liegt auf der Kerneinheit des Nukleosoms (engl.: core particle) und überdeckt die Eintritts- und Austrittsstelle der DNA. Dieses Histon ist notwendig für die Verpackung der Nukleosomen von der 11nm zur 30nm Faser, wobei dieser Übergang reversibel ist. Das Chromatin im Interphase-Kern liegt hauptsächlich als 30nm Faser (Heterochromatin) vor, allerdings kann nur die 11nm Faser (Euchromatin) transkribiert werden. Während der Zellteilung wird das replizierte Chromatin dann weiter zu den Chromosomen verpackt. Die Veränderung der Chromatinstruktur ist, ebenso wie die DNA-Methylierung, an der Regulation der Genexpression beteiligt und wird durch Histon-Modifikationen bewerkstelligt (Strahl & Allis, 2000; Eberharter & Becker, 2002). Histone sind aufgebaut aus einer globulären Domäne und flexiblen, hoch konservierten amino- und carboxyterminalen Armen, die reich an basischen Aminosäuren Arginin (R), Serin (S) und Lysin (K) sind. Die Genexpression wird beeinflusst durch die spezifische posttranslationale Modifikation dieser Aminosäuren. Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) übertragen die Acetyl-Gruppen von Acetyl-CoA auf die Lysine der aminoterminalen Enden, wohingegen Histon-Deacetylasen (HDACs) diese entfernen. Eine Acetylierung von Histonen ist meistens mit einer Aktivierung der Genexpression verbunden. Im Gegensatz dazu kann eine Methylierung von Histonen durch Histon-Methyl-Transferasen (HMTs) sowohl reprimierend (Lysin 9 von Histon H3) als auch aktivierend (Lysin 4 von Histon H3) wirken. Eine weitere Modifikation ist die Übertragung von Phosphat-Gruppen durch Protein-Kinasen. Die Dephosphorylierung wird hingegen durch Protein-Phosphatasen katalysiert. Durch die große Anzahl an Variationen, mit der Histone durch mehrere Modifikationen gleichzeitig verändert werden können, entsteht ein komplexer Histon-Code (Strahl & Allis, 2000).

A.4. RNA-Interferenz und nicht-kodierende RNAs

Nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) sind RNAs, die nach der Transkription nicht in ein Protein

translatiert werden. Der größte Teil von ncRNAs fungiert als Transfer-RNA (tRNA) oder Ribosomal-RNA (rRNA). Zudem gibt es ncRNAs, deren Funktion darin besteht, ebenso wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen, die Genexpression durch Interaktion mit der DNA oder Boten-RNA (mRNA) epigenetisch zu regulieren. Zu diesen epigenetisch regulierenden ncRNAs gehören die kleinen ncRNAs mit einer Länge von ungefähr 25 Nukleotiden, wie miRNAs und siRNAs (Carthew & Sontheimer, 2009), und die langen ncRNAs mit über 200 Nukleotiden. Einzelsträngige RNAs (ssRNA) bilden durch Schleifen kurze nicht vollständige doppelsträngige RNAs (dsRNAs). Diese werden durch die RNase III Endoribonuklease, auch Dicer genannt, zurechtgeschnitten. Nach Abbau eines Stranges werden diese miRNAs (engl.: micro RNAs) dann vom RNA-induzierten Stilllegungs-Komplex RISC (engl.: RNA-induced silencing complex) an die mRNA mit der komplementären Zielsequenz befördert. Dieser Mechanismus wird RNA-Interferenz (RNAi) genannt. Die Anlagerung der miRNAs an die 3'-NTR (nicht-translatierten Region) der mRNA führt dann zur Inhibition der Translation oder zum Abbau der gebundenen mRNAs. In einigen Fällen kann die Bindung der miRNA an die mRNA auch zu einer Aktivierung der Translation führen (Vasudevan & Steitz, 2007; Vasudevan *u. a.*, 2007). Die sogenannten siRNAs (engl.: short interfering RNAs) entstehen durch bidirektionale Transkription und können durch direkte Bindung an die DNA die Transkription der Zielgene verhindern. Die langen ncRNAs sind vorwiegend bei der X-Chromosom Inaktivierung in Säugetieren beteiligt.

A.5. Regulation der Genexpression und Gen-Stillegung

Die epigenetische Regulation der Genexpression wird hauptsächlich beeinflusst durch DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und nicht-kodierende RNA. Das Abschalten von Genen (engl.: gene silencing) spielt eine Rolle in zahlreichen Prozessen, wie z. B. bei der genomischen Prägung, Entwicklung, Krebsentstehung, X-Chromosom Inaktivierung und bei der Entstehung genetischer Erkrankungen.

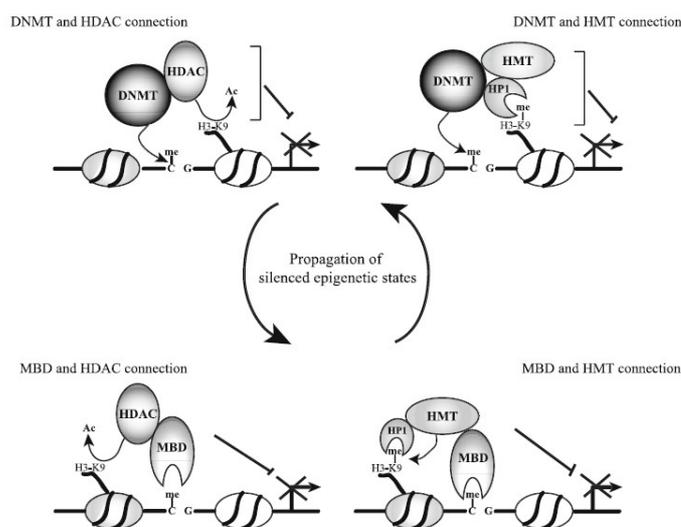


Abbildung 4: Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histon-Modifikation bei der Gen-Stillegung.⁴ Erklärung siehe Text.

⁴Aus: (Brenner & Fuks, 2006)

Aufgrund der Assoziation zwischen DNMT1 und HDAC kommt es zur gleichzeitigen DNA-Methylierung und Deacetylierung der Histone, was für die Ausbildung von Heterochromatin verantwortlich ist (Fuks *u. a.*, 2000). DNA-Methylierung kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren direkt inhibieren oder aber indirekt durch Bindung von Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) Proteinen an die methylierten CpG-Folgen. Dadurch werden weitere Faktoren wie HDAC (Jones *u. a.*, 1998; Nan *u. a.*, 1998) und HMT (Fuks *u. a.*, 2003b) an die DNA rekrutiert. Die HMT kann mit Hilfe des Adaptorproteins, dem Heterochromatin Protein 1 (HP1), die deacetylierten Histone methylieren und gleichzeitig über das HP1 mit der DNMT interagieren (Jackson *u. a.*, 2002; Fuks *u. a.*, 2003a; Lehnertz *u. a.*, 2003; Selker *u. a.*, 2003). Eine Methylierung des Histons H3 am Lysin 9 (H3K9) (Rea *u. a.*, 2000) ist verbunden mit der Repression der Transkription, wohingegen die Methylierung von Histon H3 am Lysin 4 (H3K4) mit einer Genaktivierung verknüpft ist. Durch Bindung von DNMT3L an nicht-methyliertes H3K4 wird die DNMT3A an die DNA gelenkt und es kann die *de novo* CpG-Methylierung der DNA erfolgen (Ooi *u. a.*, 2007).

An der Gen-Stillegung können aber auch nicht-kodierende RNAs beteiligt sein, die bei Bindung an die DNA zur Rekrutierung von DNMT, HP1 und HMT, und damit zur Ausbildung und Ausbreitung von Heterochromatin führen (Wassenaar *u. a.*, 1994; Verdell *u. a.*, 2009).

Um die Ausbreitung von Heterochromatin über die gesamte DNA und die euchromatischen Gene von heterochromatischen Bereichen der DNA abzugrenzen, werden die als Barrieren fungierenden Insulator-Elemente benötigt (Bell *u. a.*, 2001). Diese werden spezifisch von Proteinen gebunden. Bei Wirbeltieren handelt es sich dabei um das Zinkfinger Protein CTCF (engl.: CCCTC-binding factor) (Bell *u. a.*, 1999). Durch kombinatorische Verwendung der 11 Zinkfinger können ungefähr 50 bp lange DNA-Abschnitte, die Sequenzhomologie aufweisen, gebunden werden, was zur Ausbildung einer Schleife (engl.: loop) aus Chromatin führt (Filippova, 2008; Phillips & Corces, 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von CTCF an die Erkennungssequenz durch eine Methylierung der DNA geblockt wird (Bell & Felsenfeld, 2000; Hark *u. a.*, 2000). Außerdem spielt die Kolo-kalisation von CTCF mit Cohesin eine Rolle (Parelho *u. a.*, 2008; Stedman *u. a.*, 2008; Wendt *u. a.*, 2008).

A.6. Krebsentstehung

Die Entstehung maligner (bösartiger) Tumore ist sehr komplex. In diesem Kapitel werden deshalb nur einige epigenetische Aspekte der Krebsentstehung betrachtet. In Tumorzellen sind zwei große Gen-Gruppen entweder genetisch durch Mutationen oder epigenetisch durch DNA-Methylierung (Feinberg & Vogelstein, 1983; Gama-Sosa *u. a.*, 1983; Goetz *u. a.*, 1985), Histon-Modifikationen (Orr & Hamilton, 2007; Kampranis & Tschlis, 2009) und nicht-kodierende RNAs (Garzon *u. a.*, 2009) verändert. Die betroffenen Gen-Gruppen sind an der Steuerung der Proliferation (Zellteilung), Apoptose (programmierter Zelltod) und Differenzierung beteiligt. Zelluläre Protoonkogene kodieren meist für Komponenten von Signalketten. Eine Veränderung führt zur Aktivierung oder Steigerung der Genexpression (engl.: gain of function). Im Gegensatz dazu kodieren Tumorsuppressorgene für Proteine, die als negative Regulatoren des Zellzyklus fungieren

und deren Genexpression durch Veränderungen herabgesetzt oder abgeschaltet wird (engl.: loss of function). In Tumorzellen findet man häufig abnormale DNA-Methylierungsmuster. Die überwiegende Abnahme von genomischem 5-mC (globale DNA-Hypomethylierung) führt zu einer Aktivierung von Protoonkogenen (Feinberg & Vogelstein, 1983; Gama-Sosa *u. a.*, 1983; Goelz *u. a.*, 1985). Im Gegensatz dazu ist die Expression vieler Tumorsuppressorgene durch verstärkte Methylierung (DNA-Hypermethylierung) abgeschaltet (Jones & Baylin, 2002). Eine Demethylierung des Histons H4 am Lysin 20 ist zudem mit einem stark dekondensierten Chromatin verbunden (Van Den Broeck *u. a.*, 2008). Während der Zellteilung kann das stark dekondensierte Chromatin zu genomischer Instabilität und zu abnormalen Chromosomenveränderungen führen (Tuck-Muller *u. a.*, 2000). In normalen Zellen ist das Gen für die Telomerase (*hTERT*) durch deacetylierte Histone stillgelegt, dadurch kommt es zu einer Verkürzung der Telomere bei fortlaufender Zellteilung und dem damit verbundenen Zelltod führt. In Tumorzellen kommt es deshalb zu einer Reaktivierung des *hTERT* Promotors, was eine Immortalisierung der Zellen nach sich zieht (Kelland, 2007). Während der malignen Transformation wird die Transkription ncRNAs meist herabgesetzt (Lu *u. a.*, 2005). Zudem vermutet man auch, dass einige ncRNAs selbst als Tumorsuppressorgene oder Protoonkogene fungieren oder an deren Genregulation beteiligt sind (Finoux & Chartrand, 2008).

A.7. Genomische Prägung

In Säugetieren ist sowohl das maternale als auch das paternale Genom für eine normale Entwicklung notwendig (McGrath & Solter, 1984). Die meisten Gene in den diploiden somatischen Zellen werden biallelisch exprimiert, das heißt die Transkription erfolgt am maternal und paternal ererbten Allel (Genvariante). Zudem gibt es einige Gene oder Gen-Cluster, die einer epigenetischen Regulation durch genomische Prägung (engl.: genomic imprinting) unterliegen (Barlow *u. a.*, 1991; Bartolomei *u. a.*, 1991; DeChiara *u. a.*, 1991). Bei diesem Vorgang ist die elterliche Herkunft eines Chromosoms entscheidend. Obwohl beide Allele die gleiche DNA-Sequenz besitzen, wird durch Gen-Stilllegung nur eines der beiden Allele exprimiert (uniparentale Genexpression), je nachdem ob zuletzt eine maternale oder paternale Meiose durchlaufen wurde. Im Embryo wird in den primordialen Geschlechtszellen das Methylierungsmuster nahezu vollständig gelöscht (Hajkova *u. a.*, 2002; Li, 2002; Yamazaki *u. a.*, 2003). Nach der genomweiten Reprogrammierung werden dann die Geschlechts-spezifischen Methylierungsmuster der Gameten (Keimzellen) während der weiblichen Oogenese oder der männlichen Spermiogenese wieder angelegt (Barlow, 1995). Zudem sind auch Histon-Modifikationen und nicht-kodierende RNAs bei der genomischen Prägung involviert (Sha, 2008; Koerner *u. a.*, 2009). Dieser Vorgang unterliegt einer strikten Kontrolle, und Störungen der normalen genomischen Prägung führen zu zahlreichen Krankheiten, die auf Veränderungen in der Entwicklung und dem Verhalten zurückzuführen sind. Eine gestörte genomische Prägung kann aber auch Ursache für eine veränderte Zellteilung sein und spielt deshalb oft auch eine Rolle bei der Krebsentstehung.

A.8. Entwicklung und epigenetische Reprogrammierung

Die normale Entwicklung bei Säugern ist essentiell von der epigenetischen Regulation durch DNA-Methylierung abhängig (Li, 2002). Die haploiden Gametengenome in den Spermatozyten und Oocyten sind stark methyliert, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der geschlechtsspezifischen Expression genomisch geprägter Gene (Reik *u. a.*, 2001). Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium. Die daraus entstehende Zygote ist in der Lage, sich in alle Zelltypen eines vollständigen Organismus zu differenzieren. Um diese Totipotenz zu ermöglichen, ist jedoch zunächst eine genomweite epigenetische Reprogrammierung beider parentaler Genome in der frühen Embryonalentwicklung notwendig. Maternale und paternale Chromosomen werden während der Präimplantationsphase im Mausembryo unterschiedlich demethyliert (Santos *u. a.*, 2002). Die aktive Demethylierung des paternalen Genoms erfolgt sehr schnell noch vor der ersten Teilung der Zygote durch eine maternale Demethylase-Aktivität (Oswald *u. a.*, 2000). Die Expression von TET3 ist in den Oocyten und Zygoten sehr stark, dadurch kommt es beim paternalen Genom vermutlich zur enzymatischen Umwandlung von 5-mC in 5-hmC, welches nur im männlichen Vorkern nachgewiesen werden konnte (Gu *u. a.*, 2011; Wossidlo *u. a.*, 2011). Das maternale Genom und paternal geprägte Regionen sind vor der Umwandlung geschützt und werden nicht demethyliert. Ab dem Zwei-Zell-Stadium des Embryos wird das maternale Genom in Abwesenheit von Instandhaltungs-Methyltransferasen passiv über mehrere Replikationsrunden hinweg demethyliert. Es scheint so, dass die eigentliche Demethylierung des 5-hmC modifizierten paternalen Genoms dann allerdings ebenfalls passiv durch DNA-Replikation erfolgt (Inoue & Zhang, 2011; Iqbal *u. a.*, 2011). Im Morula Stadium sind beide parental Methylierungsniveaus gleich niedrig (Mayer *u. a.*, 2000). Neue somatische Methylierungsmuster werden im Mausembryo während der Differenzierung Zelltyp-spezifisch wieder angelegt (Li *u. a.*, 1992; Okano *u. a.*, 1999). Beide parental Allele erhalten das gleiche DNA-Methylierungsmuster, das bei der Zellteilung stabil weitergegeben wird. Im Blastozysten Stadium unterscheidet man zwei unterschiedlich differenzierte Zelltypen. Die innere Zellmasse, bestehend aus pluripotenten embryonalen Stammzellen, entwickelt sich weiter zum adulten Tier. Die von der inneren Zellmasse abstammenden embryonalen Zellen weisen einen stärkeren Methylierungsgrad auf als die extraembryonalen Trophoblasten Zellen, die für die Bildung der Plazenta zuständig sind. Geprägte Gene sind von dieser ersten genomweiten Reprogrammierung nicht betroffen und behalten ihre ursprünglichen Methylierungsmuster. Die methyliert geprägten Gene werden nicht demethyliert und die nicht-methyliert geprägten Gene werden nicht methyliert. Die innere Zellmasse entwickelt sich im Gastrula Stadium weiter zu den multipotenten somatischen Stammzellen, die die drei Keimblätter, das Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, bilden. Während der weiteren Entwicklung differenzieren sich diese dann zu allen spezialisierten Zellen des Organismus. In den primordialen Keimzellen, den Vorläufern der eigentlichen Keimzellen im Embryo, beginnt durch Demethylierung eine zweite genomweite Reprogrammierung. Bei der Reifung der Keimzellen im adulten Tier (Gametogenese) werden dann neue Methylierungsmuster geschlechtsspezifisch wieder angelegt.

A.9. X-Chromosom Inaktivierung

Die Anzahl von X-Chromosomen unterscheidet sich in weiblichen und männlichen Zellen, wobei Weibchen zwei und Männchen ein X-Chromosom besitzen. Um die Gendosis zwischen beiden Geschlechtern für alle X-chromosomalen Gene in Balance zu halten, gibt es verschiedene Mechanismen zur Dosis-Kompensation. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wird die Genexpression beim einzigen X-Chromosom der Männchen um das doppelte verstärkt (Lucchesi & Manning, 1987). Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* erfolgt die Dosis-Kompensation in den weiblichen Zellen durch Reduktion der Genexpression bei beiden X-Chromosomen um die Hälfte im Vergleich zum männlichen X-Chromosom (Meyer & Casson, 1986). In den Zellen weiblicher Säugetiere wird während der Embryonalentwicklung ein X-Chromosom weitestgehend genetisch stillgelegt. Dieser Vorgang wird als X-Chromosom Inaktivierung bezeichnet (Lyon, 1961). Die Wahl, ob das maternale oder paternale X-Chromosom inaktiviert werden soll, erfolgt in der inneren Zellmasse rein zufällig. Die Information, welches X-Chromosom inaktiviert wurde, wird anschließend während der Zellteilung stabil weitergegeben, sodass Zellklone mit maternal oder paternal inaktiviertem X-Chromosom entstehen. Weibliche Säugetiere sind hinsichtlich der Expression X-chromosomaler Gene Mosaik. Ein heterozygoter Zustand der Allele hat deshalb bei Frauen meist keine schwerwiegenden Konsequenzen bei bestimmten X-chromosomalen Erbkrankheiten. Die X-Chromosom Inaktivierung in den embryonalen Stammzellen der inneren Zellmasse beginnt als ein aktiver Vorgang in einer als XIC (X-Inaktivierungszentrum, engl.: X-inactivation center) bezeichneten Region in der Mitte des X-Chromosoms (Russell, 1963). Bei der X-Chromosom Inaktivierung spielen zwei lange ncRNAs eine Rolle, die 15 kbp lange *Xist*-RNA (Brockdorff *u. a.*, 1992) und die 40 kbp lange *Tsix*-RNA. Beide Gene befinden sich in der XIC Region des X-Chromosoms, wobei *Tsix* das Antisense-Transkript von *Xist* ist und dessen Genexpression reguliert. Die Transkription von *Tsix* ist vor der X-Chromosom Inaktivierung verstärkt. Mit Beginn der X-Chromosom Inaktivierung wird dann *Xist* stärker exprimiert und die Anlagerung an das entsprechende X-Chromosom stabilisiert, dies hat die *cis* Inaktivierung in beide Richtungen zur Folge. Die damit verbundene Abschaltung der Genexpression ist nicht vollständig. Einige Gene bleiben aktiv, darunter das *Xist*-Gen zur Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes (Brown *u. a.*, 1991). Gene, die ein Gegenstück auf dem Y-Chromosom haben, bleiben ebenfalls aktiv. In diesen Fällen wird vermutlich für die Entwicklung eine doppelte Gendosis benötigt. Zudem vermutet man, dass es während der X-Chromosom Inaktivierung zu einer Bindung von *Xist* an *Tsix*, und der damit verbundenen Entstehung einer dsRNA, kommt. Diese wird dann bei dem Prozess der RNAi von dem Enzym Dicer prozessiert. Die entstehenden Fragmente sind, ebenso wie *Xist* selbst, an der Verdichtung und Ausbreitung des Chromatins als Heterochromatin über das gesamte X-Chromosom, durch Methylierung der Histone auf dem zukünftigen inaktiven X-Chromosom, beteiligt (Clemson *u. a.*, 1996; Ogawa *u. a.*, 2008). Nach X-Chromosom Inaktivierung erfolgt die Expression von *Tsix* dann nur noch auf dem aktiven X-Chromosom (Lee & Lu, 1999), wo *Tsix* die Transkription von *Xist* auf dem aktiven X-Chromosoms durch Bindung an die DNA reguliert. Die Rekrutierung von DNMT3A hat dann die Inaktivierung des *Xist*-Promotors auf dem aktiven X-Chromosom durch DNA-Methylierung zur Folge (Sun *u. a.*, 2006). Das Niveau der

jeweiligen Transkription entscheidet also, ob das entsprechende X-Chromosom aktiv oder inaktiv ist. Während *Tsix* ausschließlich auf dem aktiven X-Chromosom exprimiert wird und *Xist* stillgelegt ist, ist es auf dem inaktiven X-Chromosom genau umgekehrt. Das heterochromatische X-Chromosom, auch als Barr-Körperchen (engl.: Barr bodies) bezeichnet (Barr & Bertram, 1949), ist meist in den peripheren Regionen des Zellkerns lokalisiert. Die Replikation erfolgt erst spät in der S-Phase des Zellzyklus im Vergleich zum genetisch aktiven, euchromatischen X-Chromosom. Die X-Chromosom Inaktivierung ist ein reversibler Mechanismus und wird in den primordialen Keimzellen wieder rückgängig gemacht.

A.10. Erkrankungen mit instabilen Trinukleotid-Repetitionen

Im menschlichen Genom treten eine Reihe von Tandem-Wiederholungen aus Trinukleotiden auf. Diese Repetitionen sind kurz und bleiben während der Weitergabe an die nächste Generation in ihrer Länge meist stabil. Erreicht die Anzahl von Trinukleotid-Repetitionen (TNR) jedoch einen gewissen Schwellenwert, werden diese instabil und expandieren bei der nächsten Generation (engl.: repeat instability). Erkrankungen mit instabilen TNR treten dann ab einer bestimmten Anhäufung von Wiederholungen auf. Fast 30 schwere Erkrankungen, meist Nerven und Muskeln betreffend, sind beim Menschen bekannt, die durch Instabilität von TNR, einer dynamischen Mutation, verursacht werden (Mirkin, 2007; McMurray, 2010). Man unterscheidet TNR aufgrund ihrer Lage in dem entsprechenden Gen. TNR können in der kodierenden Region eines Gens (Exons) auftreten (z. B. *Chorea Huntington HD*, 5'-(CAG)_n-3'), was zu einer veränderten Proteinstruktur während der Translation führt. Befinden sich TNR im nicht-kodierenden Bereich, werden diese zwar transkribiert, aber nicht translatiert. Sie können dabei im 5'-Ende (z. B. *fragiles X Syndrom FXS*, 5'-(CGG)_n-3'), 3'-Ende oder in Introns zu finden sein. Instabilität von TNR führt innerhalb einer Generation meist zu einer Verlängerung von $n < 10$ Einheiten bei kodierenden TNR, bei nicht-kodierenden TNR hingegen von $100 < n < 1000$ Einheiten.

Ausgangspunkt für eine Expansion von TNR könnte die Ausbildung einer Schleife (engl.: loop formation) aus einzelsträngiger DNA (ssDNA) sein, die dann in die doppelsträngige DNA (dsDNA) eingebaut wird. Man vermutet, dass in ruhenden Zellen solche Schleifen durch Einzelstrang-Brüche während der DNA-Reparatur von mutierten Basen oder Nukleotiden entstehen (Kovtun *u. a.*, 2007). Der genaue Mechanismus ist jedoch unverstanden. In sich teilenden Zellen könnten solche Schleifen durch Verrutschen (engl.: slippage) eines DNA-Stranges während der DNA-Replikation entstehen (Petruska *u. a.*, 1998; Hartenstine *u. a.*, 2000). Ein Verrutschen beim Matrizen-Stranges führt zur Deletion, beim Tochter-Strang hingegen zu einer Insertion von DNA. Die Entstehung kleiner Schleifen wird normalerweise vom Reparatur-Mechanismus erkannt und korrigiert, bleibt dies jedoch aus, kann es dann zur Integration und damit zur Expansion der DNA kommen. In sich teilenden Zellen erfolgt der Einbau vermutlich während der DNA-Replikation, wohingegen in ruhenden Zellen der Mechanismus bisher nicht aufgedeckt werden konnte.

A.10.1. Chorea Huntington

Chorea Huntington oder *Veitstanz* (engl.: *Huntington's disease*, *HD*; [MIM 143100]) wurde im

Jahre 1872 zum ersten Mal von dem New Yorker Arzt George Huntington beschrieben, als eine erbliche Krankheit, die mit psychischen Störungen, sowie einer Neigung zum Selbstmord einhergeht, und bei der schwere Symptome aber erst im Erwachsenenalter auftreten (Huntington, 1872). Der Ausbruch der Erkrankung erfolgt meist zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (Chandler u. a., 1960), nimmt dann aber einen progressiven Krankheitsverlauf an, der bereits nach ungefähr 17 Jahren mit dem Tod endet. Typische Krankheitssymptome sind psychische Beschwerden, hervorgerufen durch eine Degenerierung von Neuronen, eine veränderte Wahrnehmung und eine gestörte Motorik. Zu Beginn der Erkrankung sind es meist unwillkürliche Muskelbewegungen, bis hin zu herumschleudernden Bewegungen von Armen und Beinen (Chorea, griech.: Tanz). Im späteren Krankheitsverlauf handelt es sich dann aber eher um eine Verkrampfung oder Versteifung der Muskulatur. Die Häufigkeit liegt bei ungefähr 5/100000, wobei es sich bei weniger als 10% aller *HD* Fälle um die *juvenile (kindliche)* Form handelt, bei der es bereits vor dem 20. Lebensjahr zum Ausbruch der Erkrankung mit einem schwerem Krankheitsverlauf kommt (Nance & Myers, 2001). Das *HD* verursachende Gen wurde 1992 auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3) lokalisiert (MacDonald u. a., 1992). Das *HTT* Gen [MIM 613004] kodiert für das ubiquitär exprimierte Huntingtin Protein (Hoogeveen u. a., 1993). Der Genombereich umfasst 180 kbp mit 67 Exons (Ambrose u. a., 1994). *Chorea Huntington* wird verursacht durch instabile Expansion einer 5'-(CAG)_n-3' Trinukleotid-Repetition im Exon 1 (MacDonald u. a., 1993), dabei beträgt die normale Anzahl $n = 6-29$, bei der Prämutation $n = 29-35$ und bei *HD* Patienten $n > 35$. Das Trinukleotid 5'-CAG-3' kodiert dabei für die Aminosäure Glutamin (Q). Das mutierte Huntingtin Protein besitzt am aminoterminalen Ende ein expandiertes Polyglutamin poly(Q). Die Vererbung von *Chorea Huntington* erfolgt autosomal dominant. Homozygote Träger zeigen phänotypisch allerdings keine Unterschiede zu den normalerweise heterozygoten *HD* Patienten (Wexler u. a., 1987). Da die Expansion der Repetition nicht zur Gen-Stillegung des Vollmutation-Alleles führt (Ambrose u. a., 1994), wird der dominante Phänotyp vermutlich durch eine veränderte und möglicherweise toxische Funktion des Proteins hervorgerufen (engl.: gain of function mutation). Das normale Huntingtin kommt sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vor (De Rooij u. a., 1996), wo es durch Bindung an Transkriptionsfaktoren die Transkription reguliert (Zuccato u. a., 2001). Zudem ist es vermutlich auch am intrazellulären Transport beteiligt (Gauthier u. a., 2004). Das aminoterminal Ende ist dabei für den Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma verantwortlich und durch Expansion der 5'-(CAG)_n-3' Repetition kann dieser Transport nicht mehr stattfinden, weshalb es zur Akkumulierung von mutiertem Huntingtin im Zellkern kommt (Cornett u. a., 2005). Daraus können Huntingtin-Aggregate entstehen und sich in Form von neuronalen Zellkern-Einschlüssen (engl.: neuronal intranuclear inclusions) ablagern (DiFiglia u. a., 1997), vermutlich spielt dabei auch die Inhibierung der Proteolyse eine Rolle (Dyer & McMurray, 2001). Bei *Chorea Huntington* kann es nur bei der Weitergabe über den Vater (paternale Transmission) zur Verlängerung einer Prämutation zur Vollmutation und zu großen Expansionen von $n > 7$ kommen (Kremer u. a., 1995; Nørremølle u. a., 1995). Instabilität der 5'-(CAG)_n-3' Repetition kann sowohl in den somatischen Zellen als auch in den Zellen der Keimbahn auftreten (Telenius u. a., 1994). In den post-mitotischen Zellen des Gehirns konnte Gewebe-spezifisch eine starke somatische Instabilität expandierter 5'-(CAG)_n-3' Repetitionen nachgewiesen werden (Telenius u. a., 1994). Zudem können große Verlängerungen von 5'-(CAG)_n-3' Repetitionen auch in den verschiedenen Stadien der männlichen Keimzell-

Reifung zustande kommen (Yoon *u. a.*, 2003). Die Spermatogonien im Mann regenerieren sich durch mitotische Zellteilung ein Leben, trotzdem korreliert die Instabilität der TNR nicht mit dem Alter des Vaters.

A.10.2. Fragiles X Syndrom

Im Metaphase-Chromosom erscheinen fragile Stellen (engl.: fragile sites) als Lücken, Einschnürungen oder Brüche, hervorgerufen durch eine spezifische Behandlung während der Zellkultur (Sutherland, 1977). Die „allgemeinen“ (engl.: common) fragilen Stellen lassen sich bei den Metaphase-Chromosomen aller Individuen finden, wohingegen die „seltenen“ (engl.: rare) fragilen Stellen bei weniger als 5% der Metaphase-Chromosomen zu finden sind und meist durch Expansion von Tandem-Nukleotid-Repetitionen in der Sequenz auftreten. Bis heute konnten 89 „allgemeine“ und 30 „seltene“ fragile Stellen identifiziert werden (Debacker & Kooy, 2007). Im Jahre 1969 konnten cytogenetische Untersuchungen bei zwei Brüdern mit geistiger Behinderung eine „seltene“ fragile Stelle FRAXA am langen Arm des X-Chromosoms aufzeigen (Lubs, 1969). Jedoch konnte dieser Befund erst durch Versuche mit Zellkulturmedium ohne Folsäure bestätigt werden (Sutherland, 1977). Bei der Kultivierung von Zellen aus Patienten ist es dabei zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur am distalen Ende des langen Armes auf dem X-Chromosom gekommen, die durch einen Mangel an Thymidinmonophosphat hervorgerufen wurde (Abbildung 5).

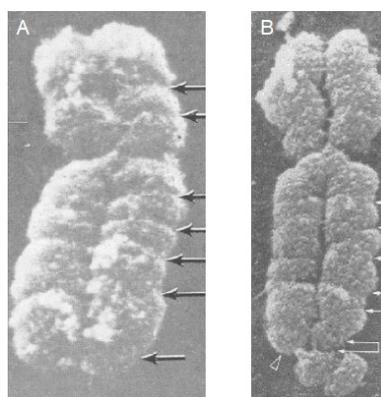


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines normalen und fragilen X-Chromosoms.⁵ (A) normales X-Chromosom, (B) fragiles X-Chromosom.

⁵Aus: (Harrison *u. a.*, 1983), modifiziert

Das mit der Folat-sensitiven fragilen Stelle FRAXA assoziierte *FMRI* (engl.: fragile X mental retardation 1) Gen [MIM 309550] wurde im Jahr 1991 von mehreren Gruppen gleichzeitig entdeckt (Kremer *u. a.*, 1991; Oberle *u. a.*, 1991; Verkerk *u. a.*, 1991). Das *FMRI* Gen bei der Bande Xq27.3 auf dem X-Chromosom beinhaltet 17 Exons in einem Genombereich von 38 kbp (Eichler *u. a.*, 1993). Alternatives Spleißen führt zur Bildung von 4 verschiedenen *FMR1* Proteinen (*FMRP*) (Verheij *u. a.*, 1993). In der 5'-NTR (nicht-translatierten Region) des ersten Exons befindet sich eine 5'-(CGG)_n-3' Repetition (Ashley *u. a.*, 1993b), wobei je nach Länge und Methylierung der 5'-(CGG)_n-3' Repetition vier verschiedene Allele des *FMRI* Gens vorkommen können (Abbildung 6). Der normale Wildtyp (WT) weist eine Anzahl von n = 5-50 Wiederholungen auf und wird von AGG

A. Einleitung

Trinukleotiden unterbrochen, die vermutlich eine Stabilisierung bewirken (Kunst *u. a.*, 1997). Eine Expansion der 5'-(CGG)_n-3' Repetitionen resultiert zunächst in einer instabilen Prämutation (PM), wenn n = 50-200 Wiederholungen umfasst. Von einer Vollmutation (FM) spricht man, wenn die kritische Anzahl von n > 200 Wiederholungen überschritten wird, und es zu einer massiven Verlängerung der 5'-(CGG)_n-3' Repetition kommt (Yu *u. a.*, 1991). Meistens erfolgt dann um die 10.-12. Woche der Embryonalentwicklung eine Methylierung der 5'-(CGG)_n-3' Repetition und des *FMRI* Promotors (Willemsen *u. a.*, 2002), was zur Gen-Stillegung und damit zum Verlust des FMRP führt (Devys *u. a.*, 1992). In seltenen Fällen kann die Methylierung der Vollmutation jedoch ausbleiben (UFM), so dass die Transkriptionsaktivität des *FMRI* Gens weiter aktiv bleibt (Smeets *u. a.*, 1995; Pietrobono *u. a.*, 2005; Tabolacci *u. a.*, 2008).

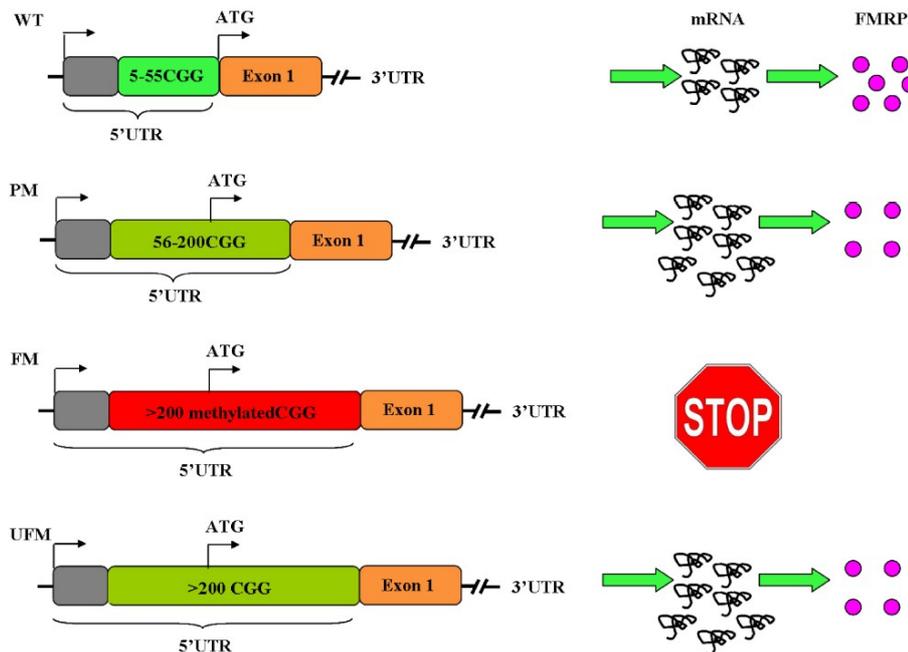


Abbildung 6: Die vier verschiedenen Allele des *FMRI* Gens.⁶ WT = Wildtyp; PM = Prämutation; FM = Vollmutation; UFM = nicht-methylierte Vollmutation. Erklärung siehe Text.

⁶Aus: (Pirozzi *u. a.*, 2011)

Die instabile Amplifikation der 5'-(CGG)_n-3' Repetition im *FMRI* Gen kann zu drei phänotypisch verschiedenen Krankheiten („FRAXopathien“) führen, das sind die *fragile X assoziierte vorzeitige Ovarialinsuffizienz*, das *fragile X assoziierte Tremor/Ataxie Syndrom* und das *fragile X Syndrom* (Pirozzi *u. a.*, 2011). Die *fragile X assoziierte vorzeitige Ovarialinsuffizienz* (engl.: *fragile X associated premature ovarian insufficiency, FXPOI*; [MIM 300624]), das heißt das Erreichen der Menopause bereits vor dem 40. Lebensjahr, kann bei ungefähr 20% der Frauen mit einer Prämutation auf einem X-Chromosom auftreten (Murray *u. a.*, 1998). Vor allem die männlichen Träger einer Prämutation können ab dem 50. Lebensjahr hingegen an dem *fragilen X assoziierten Tremor/Ataxie Syndrom* (engl.: *fragile X associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS*; [MIM 300623]) erkranken. Die Hauptsymptome beim *FXTAS* sind ein Zittern bei zielgerichteten Bewegungen (Intentionstremor) und Unregelmäßigkeiten beim Gehen (Gangataxien), hervorgerufen durch einen Verlust von Neuronen (Neurodegeneration). Man vermutet, dass die Symptome durch einem toxischen *gain of function* Effekt der *FMRI* mRNA hervorgerufen werden,

der entweder auf den 2-4fach erhöhten mRNA Spiegel (Hagerman *u. a.*, 2001; Leehey *u. a.*, 2003) oder auf die zur Prämutation expandierte 5'-(CGG)_n-3' Repetition (Handa *u. a.*, 2005) zurückzuführen ist. Zudem konnte man *FMR1* mRNA in Zellkerneinschlüssen in den Neuronen nachweisen (Tassone *u. a.*, 2004; Iwahashi *u. a.*, 2006). Das *fragile X Syndrom* oder *Martin-Bell Syndrom* (engl.: *fragile X syndrome, FXS*; [MIM 300624]) (Santoro *u. a.*, 2011) wurde erstmalig im Jahre 1943, als eine geistige Behinderung, die geschlechtsspezifisch mit dem X-Chromosom vererbt wird, beschrieben (Martin & Bell, 1943). Mit einer Frequenz von etwa 1/4000 Männern (Turner *u. a.*, 1996) und 1/8000 Frauen ist das *FXS* somit die häufigste Ursache für eine erblich bedingte geistige Entwicklungsstörung. Das phänotypische Hauptsymptom vom *FXS* ist die gestörte Entwicklung der Nervenzellen, was zu einer schweren geistigen Behinderung mit IQ-Werten von ungefähr 40 führt, hervorgerufen durch den Verlust (*loss of function* Mutation) vom FMRP. Zudem treten häufig auch Dismorphien des Gesichtes und mit Eintritt in die Pubertät auch eine Vergrößerung der Hoden (Makroorchidismus) auf. Spezifische Verhaltensmerkmale wie Wutausbrüche, psychische Labilität, Stimmungsschwankungen, geringer Augenkontrakt, Armwedeln und Handbeißen sind ebenso kennzeichnend für das Krankheitsbild.

Das FMRP mit nukleärem und cytoplasmatischen Lokalisationssignal fungiert als Transportprotein (engl.: shuttle protein) (Eberhart *u. a.*, 1996). Die Expression von FMRP in Säugetieren erfolgt vorwiegend in den Neuronen des Gehirns und den Spermatogonien der Hoden (Devys *u. a.*, 1993). Die drei RNA-Bindedomänen des FMRP dienen der selektiven Bindung von mRNA, auch der eigenen (Ashley *u. a.*, 1993a; Siomi *u. a.*, 1993). Der entstehende Komplex aus Protein und mRNA interagiert dann mit den Polyribosomen und verhindert so die Translation der gebundenen mRNA in Protein (Laggerbauer *u. a.*, 2001; Li *u. a.*, 2001). Das FMRP kann als phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form vorliegen. Jedoch fungiert nur das phosphorylierte FMRP als negativer Regulator der Translation, wohingegen bei nicht-phosphoryliertem FMRP die Translation fortgesetzt wird (Ceman *u. a.*, 2003). Weitere Studien konnten zeigen, dass FMRP sowohl mit dem Dicer (Caudy *u. a.*, 2002; Ishizuka *u. a.*, 2002) als auch mit spezifischen miRNAs interagiert (Jin *u. a.*, 2004b), dies lässt auf eine Regulation der gebundenen mRNAs durch RNAi schließen. Eine Bindung von FMRP an den Dicer kann allerdings nur in der nicht-phosphorylierten Form stattfinden. Die Dephosphorylierung des FMRP führt zu einer Aktivierung der Translation durch gebundene miRNA, wohingegen die Phosphorylierung von FMRP auch hier eine Inhibierung der Translation bewirkt (Cheever & Ceman, 2009). Man vermutet, dass FMRP vor allem bei der metabotropen Glutamat-Rezeptor-abhängigen Langzeit-Depression (mGluR-LTD) eine Rolle spielt (Bear *u. a.*, 2004). Die Entwicklung und Funktion der Dendriten (synaptische Plastizität) hängt von der lokalen Proteinsynthese ab. Im Zellkern bindet phosphoryliertes FMRP an die mRNA. Anschließend erfolgt der aktive neuronale Transport zu den Dendriten über die Granula (Kanai *u. a.*, 2004), wo FMRP als Adapter zwischen der gebundenen mRNA und dem Kinesin fungiert (Davidovic *u. a.*, 2007). Aufgrund eines synaptischen Signales wird der mGluR aktiviert, dies führt über einen Signalweg zur Dephosphorylierung von FMRP, was dann die Translation der gebundenen mRNA ermöglicht. Die Anreicherung der Proteine bewirkt die Aktivierung der LTD. Bei *FXS* Patienten kommt es aufgrund des Fehlens vom FMRP zu einer verstärkten Proteinsynthese auch ohne eine Aktivierung des mGluR. Das Resultat ist eine übertriebene LTD und eine damit

A. Einleitung

verbundene dauerhafte Abschwächung der Signalübertragung, was zur einer reduzierten synaptischen Plastizität führt, dem Hauptsymptom von *FXS* Patienten.

Die Vererbung von *FXS* folgt nicht dem klassischen X-chromosomalen Erbgang (Sherman *u. a.*, 1985). Das Risiko an *FXS* zu erkranken steigt mit jeder Generation, da längere Repetitionen leichter zur Vollmutation expandierten können als kürzere (Heitz *u. a.*, 1992), gleichzeitig nimmt auch der Schweregrad zu, jedoch das Alter des Ausbruchs der Erkrankung ab (genetische Antizipation). Männliche Überträger geben eine fast unveränderte Prämutation an die gesunden Töchter weiter. In der weiblichen Keimbahn der Töchter (maternale Transmission) kommt es allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit dann zur Expansion der Prämutation zur Vollmutation (Sherman Paradoxon), was dann zum Ausbruch von *FXS* bei der nächsten Generation führen kann (Fu *u. a.*, 1991).

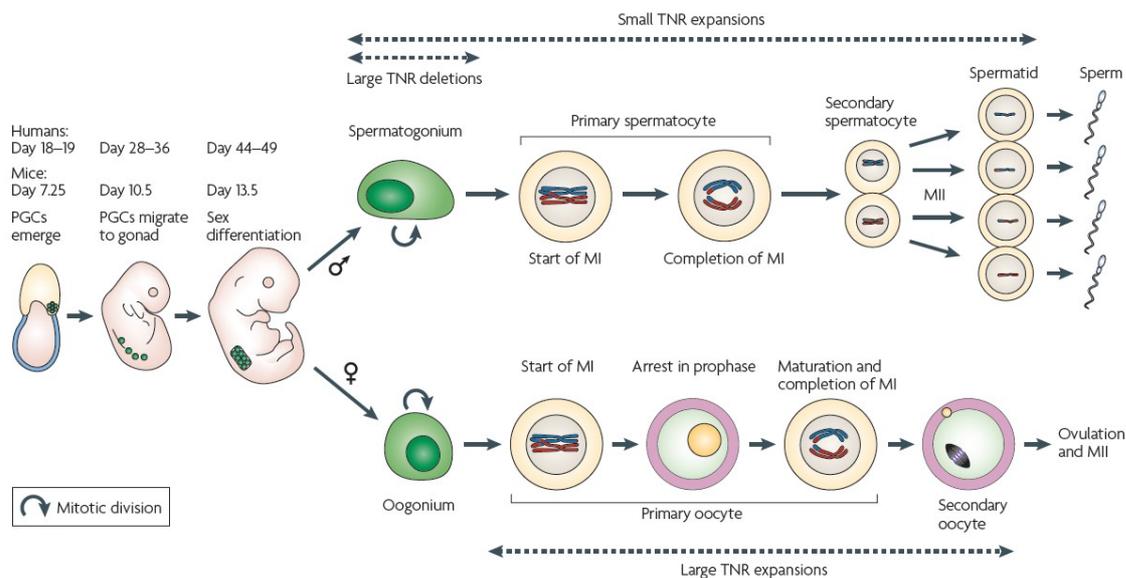


Abbildung 7: Entwicklung der menschlichen Keimzellen.⁷ PGC = primordiale Keimzelle; TNR = Trinukleotid-Repetition; MI = Meiose I; MII = Meiose II. Erklärung siehe Text.

⁷Aus: (McMurray, 2010)

Die Reifung der weiblichen Eizelle (engl.: oocyte) beginnt bereits während der Embryonalentwicklung im Mutterleib. Die großen Expansionsen von TNR finden vermutlich in den, in Prophase I arretierten, primären Oozyten statt (Abbildung 7). Da sich diese Zellen nicht teilen, vermutet man deshalb, dass dabei der Reparatur-Mechanismus eine Rolle spielt. Bei den männlichen Trägern einer Vollmutation kann es hingegen zwischen der 13. und 17. Woche der fötalen Entwicklung im Mutterleib zu einer Kontraktion von langen Repetitionen in den sich durch Mitose teilenden Spermatogonien (Ursamenzellen) kommen (Abbildung 7) (Malter *u. a.*, 1997). Das führt dazu, dass Männer mit Vollmutation in den somatischen Zellen ausschließlich Spermien mit Prämutation haben (Reyniers *u. a.*, 1993, 1999). Man vermutet, dass dabei der Replikations-Mechanismus benötigt wird (Nichol Edamura *u. a.*, 2005). Zudem können geringe Veränderungen, sowohl die Zunahme und als auch die Abnahme von TNR, in den Spermatogonien des Mannes ebenso wie in den sich nicht mehr teilenden und ausdifferenzierten somatischen Zellen beiden Geschlechts beobachtet werden. Diese Veränderungen der TNR könnten die Gewebe-spezifischen Unterschiede (somatische Mosaik) in den Längen von 5'-(CGG)_n-3' Repetitionen erklären

(MacKenzie *u. a.*, 2006).

Frauen mit einer Vollmutation auf einem X-Chromosom weisen oftmals auch die für *FXS* charakteristische geistige Behinderung auf, die jedoch meist viel schwächer ausgeprägt ist. Der Grund dafür ist vermutlich, dass es während der weiblichen X-Chromosom Inaktivierung nicht zu einer bevorzugten Stilllegung des fragilen X-Chromosom kommt. In einigen männlichen *FXS* Patienten können, neben den Zellen mit methylierten Vollmutation-Allelen, auch Zellen mit Prämutations-Allelen oder nicht-methylierten Vollmutations-Allelen vorkommen (Mosaik) (Oberle *u. a.*, 1991; Genç *u. a.*, 2000). Zellen mit langen Prämutations-Allelen weisen erhöhte *FMRI* mRNA, jedoch verminderte FMRP Mengen im Vergleich zu den normalen Wildtyp-Allelen auf (Abbildung 6) (Tassone *u. a.*, 2000c; Kenneson *u. a.*, 2001), ebenso ist die Transkriptionsrate der nicht-methylierten Vollmutations-Allele in den *FXS* Patienten erhöht (Abbildung 6) (Tassone *u. a.*, 2000a, 2000b, 2001). Die verstärkte Transkriptionsrate und die damit verbundene größere Menge an *FMRI* mRNA kann zu phänotypischen Symptomen führen. Der genaue Mechanismus für die verstärkte Transkription ist allerdings bisher nicht bekannt. Man vermutet, dass durch Expansion der 5'-(CGG)_n-3' Repetition das Chromatin in diesem Bereich stärker dekondensiert vorliegt, und so der Promoter für Transkriptionsfaktoren zugänglicher wird (Tan *u. a.*, 2009). Trotz verstärkter Transkription kann es aufgrund eines Mangels an FMRP zur Ausprägung des *FXS* Phänotyps kommen. Erklärt werden könnte dieses Phänomen durch eine Inhibierung der Translation der *FMRI* mRNA (Primerano *u. a.*, 2002), obwohl eine Translations-Inhibition scheinbar nicht immer auftritt. Bei den seltenen Fällen der phänotypisch normalen HFM (engl.: high-functioning males) lassen sich in den Zellen mit nicht-methylierter Vollmutation auch nachweisbare Mengen von FMRP finden (Smeets *u. a.*, 1995; Pietrobono *u. a.*, 2005; Tabolacci *u. a.*, 2008). Man vermutet, dass die *FMRI* mRNA mit der expandierten 5'-(CGG)_n-3' Repetition selbst an der Inhibierung der Translation beteiligt sein könnte. In der frühen Embryonalentwicklung, während der die Vollmutations-Allele noch nicht methyliert vorliegen und deshalb transkribiert werden, könnte es aufgrund der expandierten 5'-(CGG)_n-3' Repetition der *FMRI* mRNA zur Ausbildung einer stabilen Haarnadel-Struktur aus dsRNA kommen (Sobczak *u. a.*, 2003). Diese dsRNA könnte dann vom Dicer zu miRNA prozessiert werden. Im Mechanismus der RNA-Interferenz könnten diese nicht-kodierenden RNAs dann entweder an die mRNA binden, was die Translation inhibiert würde oder zum Abbau der mRNA führen könnte (Handa *u. a.*, 2003; Malinina, 2005; Krol *u. a.*, 2007). Außerdem könnte bei direkter Bindung an die DNA, *de novo* DNA-Methyltransferasen und Histon-Methyltransferasen rekrutiert werden, die dann eine Methylierung der DNA und Ausbildung von Heterochromatin bewirken, und damit die Abschaltung des *FMRI* Gens (Jin *u. a.*, 2004a). In Zellen aus *FXS* Patienten konnte in Zellkultur die *FMRI* Promotor Aktivität *in vitro* durch Demethylierung der DNA mit 5-Azadeoxycytidin (5-azadC) wiederhergestellt werden, so dass nachweisbare Mengen der spezifischen *FMRI* mRNA und des FMRP gemessen werden konnten (Chiurazzi *u. a.*, 1998). Seltene Fälle von *FXS* werden durch Punktmutationen im *FMRI* Gen hervorgerufen (De Boule *u. a.*, 1993).

Das 20 kD große CGG-Bindeprotein 1 (engl.: CGG-binding protein 1, CGGBP1) (Deissler *u. a.*, 1996; Müller-Hartmann *u. a.*, 2000; Naumann *u. a.*, 2004) könnte die Expression des *FMRI* Gens, durch spezifische Bindung an die nicht-methylierte doppelsträngige 5'-(CGG)_n-3' Repetition mit n >

5, beeinflussen, jedoch ist darüber wenig bekannt. Das *CGGBP1* Gen mit seinen 4 Exons befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 in der Nähe des Centromers (Deissler *u. a.*, 1997; Naumann *u. a.*, 2004). Kürzlich wurde eine mögliche Funktionen von *CGGBP1* als letztes Verbindungsstück (engl.: midbody) bevor sich die zwei Tochterzellen trennen und als Regulator der Zellteilung beschrieben (Singh & Westermarck, 2011; Singh *u. a.*, 2011). Zudem konnte man für einige Erkrankungen mit instabilen TNR die bidirektionale Transkription einer *Sense* und *Antisense* mRNA über die TNR nachweisen, was auf eine Beteiligung bei der Gen-Stillegung vermuten lässt (Cho *u. a.*, 2005; Moseley *u. a.*, 2006; Ladd *u. a.*, 2007). Das *ASFMR1* Gen liegt in der *Antisense* Richtung zum *FMRI* Gen und wird ebenso wie das *FMRI* Gen bei den Prämutations-Allelen verstärkt transkribiert und bei den methylierten Vollmutations-Allelen im Vergleich zu den normalen Allelen nicht transkribiert (Ladd *u. a.*, 2007; Khalil *u. a.*, 2008). Welche Funktion das *ASFMR1* Transkript allerdings hat, ist noch nicht bekannt. Zusätzlich können TNR flankiert werden von Bindestellen für CTCF (Filippova *u. a.*, 2001; Cho *u. a.*, 2005; Ladd *u. a.*, 2007), dadurch könnte zum einen die Transkription der *Sense* und *Antisense* Gene und zum anderen die Ausbildung von Chromatin-Schleifen reguliert werden (Bell *u. a.*, 2001; Filippova, 2008). Zudem ist CTCF vielleicht auch an der *cis* Regulation von Repetitions-Instabilität beteiligt (Libby *u. a.*, 2008). Die Stabilität von TNR kann auch von der Entfernung zu einem DNA-Replikationsursprung abhängen (Cleary *u. a.*, 2002; M Rindler *u. a.*, 2006). Zudem kann der normale Ablauf am Replikationsursprung durch epigenetische Veränderungen in der Umgebung der von TNR beeinflusst werden, was zu möglicher Instabilität führt (Cleary & Pearson, 2005). Ein in der Nähe der 5'-(CGG)-3' Repetition vom *FMRI* Gen gefundener Replikationsursprung könnte beim FXS zu Instabilität führen (Brylawski *u. a.*, 2007; Gray *u. a.*, 2007; Lucas *u. a.*, 2007). Das *Fmr1* Gen der Maus *Mus musculus* besitzt ebenfalls in der 5'-NTR eine 5'-(CGG)_n-3' Repetition mit einer Anzahl von n=8-12 Triplet-Wiederholungen. Die Aminosäuresequenz zeigt 97% Homologie zum menschlichen FMRP (Ashley *u. a.*, 1993b). Man konnte bei der Maus jedoch keine Instabilität der Repetition und eine damit verbundene Expansion zur Vollmutation nachweisen (Bontekoe *u. a.*, 2001).

B. Zielsetzung der Arbeit

Bei der instabilen Amplifikation einer Prämutation zur Vollmutation kommt es häufig auch zu einer DNA-Methylierung der CpG-Folgen in der 5'-(CGG)_n-3' Repetition des *FMRI* Promotors und der 5'-*upstream* Region. Es konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, in welchem genauen Zusammenhang die Expansion der TNR und die DNA-Methylierung stehen, ebenso wenig welche Vorgänge dabei eine Rolle spielen. Es wird vermehrt der Einfluss epigenetischer Mechanismen, wie DNA-Methylierung, Chromatinstruktur auch im Zusammenhang mit CTCF und nicht-kodierenden RNAs auf die Instabilität von TNR untersucht, jedoch steht man da erst am Anfang der Forschung (Engel *u. a.*, 2006; Dion & Wilson, 2009; Kumari & Usdin, 2009).

Viele Viren integrieren, um sich zu vermehren, ihr Genom in das Wirtsgenom der infizierten Zelle. Um die Integrität des eigenen Genoms zu sichern, nutzen viele Bakterien DNA-Methylierung als Schutzmechanismus gegen das Eindringen fremder DNA. DNA-Methylierung könnte bei der Inaktivierung von fremder oder invasiver DNA in Eukaryoten ebenso beteiligt sein (Sutter *u. a.*, 1978; Doerfler, 1991). Das menschliche Genom besteht zu 45% aus repetitiven Elementen und integrierter fremder DNA, dabei handelt es sich meist um Relikte mobiler Elemente wie virale Retrotransposons oder endogene Retroviren (Lander *u. a.*, 2001; Venter *u. a.*, 2001), deren Ausbreitung und/oder Expression in Vertebraten und Pflanzen vermutlich durch eine *de novo* DNA-Methylierung verhindert wird. Häufig sind repetitive DNA-Sequenzen ebenso durch DNA-Methylierung und Ausbildung von Heterochromatin gekennzeichnet (Wolffe & Matzke, 1999). Die expandierte 5'-(CGG)_n-3' Repetition könnte von der Zelle als fremde oder invasive DNA angesehen werden und deshalb eine *de novo* DNA-Methylierung als Schutzmechanismus auslösen.

In *Adenovirus Typ 12 (Ad12)* transformierten Hamsterzellen liegt das adenovirale Genom chromosomal integriert und hypermethyliert vor (Sutter & Doerfler, 1980; Hochstein *u. a.*, 2007), wohingegen Ad12-DNA aus Viruspartikeln und freie zelluläre *Ad12*-DNA nicht-methyliert sind (Kämmer & Doerfler, 1995). Die stark *de novo* methylierten *Ad12*-Segmente scheinen, im Gegensatz zu den eher schwach oder nicht-methylierten *Ad12*-Segmenten, stabiler integriert zu sein (Orend *u. a.*, 1995). Eine DNA-Methylierung der CpG-Folgen könnte somit auch expandierte 5'-(CGG)_n-3' Repetition beim *FXS* stabilisieren.

Expandierte repetitive Sequenzen, wie die 5'-(CGG)_n-3' Repetition im *FMRI* Gen, könnten ebenso wie integrierte Fremd-DNA zu epigenetischen Veränderungen in der Nähe (*cis*) und in entfernten Regionen (*trans*) führen, was dann wiederum auch Einfluss auf die Genexpression hat (Heller *u. a.*, 1995; Remus *u. a.*, 1999; Müller *u. a.*, 2001). Um den zu Grunde liegenden Mechanismus der Expansion der 5'-(CGG)_n-3' Repetition und die durch DNA-Methylierung hervorgerufene Stilllegung des *FMRI* Gens beim *fragilen X Syndrom* besser verstehen zu können, soll deshalb in der vorliegenden Arbeit die 5'-*upstream* Region sowie der Promotor des menschlichen *FMRI* Gens sowohl epigenetisch als auch funktionell charakterisiert werden.

Der Methylierungsstatus in der *FMRI* Promotor und 5'-*upstream* Region bei den vier verschiedenen Allelen (Wildtyp, Prämutation, Vollmutation, nicht-methylierte Vollmutation) soll mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung ermittelt werden. Die dazu verwendeten Zelllinien, Zellen und DNA-Proben

sind unterschiedlicher Herkunft mit dem Phänotyp *FXS* oder nicht-*FXS*. Zum Vergleich sollen auch Methylierungsmuster des *Fmr1* Gen Homologs der Maus und des *HTT* Gens bestimmt werden. Begonnene Analysen für den *FMRI* Promotor der genomischen DNA aus den peripheren weißen Blutzellen (Genç *u. a.*, 2000) ebenso aus den Fibroblastenzellen (Diplomarbeit Anja Barbara Naumann, 2007) von *FXS* Patienten ergaben dabei Methylierungsmosaiken.

Die Bindung von Proteinen an die 5'-*upstream* Region des menschlichen *FMRI* Gens kann ebenso Einfluss auf die Chromatinstruktur und daraus resultierende Genexpression nehmen. Mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) soll die 5'-*upstream* Region auf eine spezifische Proteinbindung hin überprüft werden.

Die Chromatin-Organisation und damit auch die Genexpression kann durch die Modifikation der Histone in der *FMRI* Promotor und 5'-*upstream* Region beeinflusst werden, deshalb soll über die *Chromatin-Immunoprecipitation* (ChIP) eine Methylierung oder Acetylierung der Histone H3 und H4 untersucht werden.

Der Phänotyp des *FXS* ausgelöst durch den Verlust des FMRP kann, neben der instabilen Expansion der 5'-(CGG)_n-3' Repetition und DNA-Methylierung des *FMRI* Promotors, in seltenen Fällen auch durch Punktmutationen im *FMRI* Gen hervorgerufen werden (De Boulle *u. a.*, 1993). Der Einfluss von möglichen Mutationen in der 5'-*upstream* Region auf die Expression des *FMRI* Gens soll durch die Mutationsanalyse über Sequenzierung der genomischen DNA aus *FXS* Patienten ermittelt werden.

C. Materialien

C.1. Chemikalien

Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Gerbu, Gaiberg
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Bovines Serumalbumin, Albumin Fraktion V)	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ciprofloxacin-Hydrochlorid-Monohydrat	Gerbu, Gaiberg
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	Bio&Sell, Feucht bei Nürnberg
DMEM (Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium)	Invitrogen, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Na ₂ -2H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	Apotheke, Erlangen
Ethidiumbromid, 1%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll 400	Carl Roth, Karlsruhe
FKS (fötale Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt
Gentamycin-Sulfatsalz	Serva, Heidelberg
D-(+)-Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Glycerol, 99,5%	Baker, Deventer, Niederlande
Glycerol, 100%	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
HEPES (4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H ₂ O _{Ampuwa}	Fresenius Kabi, Bad Homburg v. d. H.
Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kalium-di-hydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH), Plätzchen	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ -2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Lysolecithin (1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ -6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Manganchlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ -4H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
β-ME (2-Mercaptoethanol), 99%	Carl Roth, Karlsruhe
MEM (Minimum Essential Medium)	Invitrogen, Darmstadt
MOPS (3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt

C. Materialien

Natriumbisulfit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH), Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumperchlorat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin G-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton aus Casein	Serva, Heidelberg
Phenol	Biomol, Hamburg
Phenolrot	Merck, Darmstadt
PIPES (Piperazin-1,2-bis[2-ethansulfonsäure])	Carl Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Roti-Nanoquant	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl), 25%	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat, ultrarein)	MP Biomedicals, Aurora, OH, USA
Streptomycin-Sulfatsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau, 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

C.2. Laborgeräte

Bakterienbrutschrank	Memmert, Schwabach
Bakterien-Inkubationsschüttler:	
Multitron 2	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Stuart SI500	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Blotting Kammer:	
Semi-Phor Blotter	Hoefer Scientific, Holliston, MA, USA
Branson Sonifier 450	G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd
CCD-Kamera:	
Luminescent Image Analyser LAS-1000 CH	Fuji Photo Film, Tokio, Japan
Chromato-Vue Transilluminator C-62 (360nm)	Ultra-Violet Products, San Gabriel, CA, USA
DNA-Sequenziermaschine:	
AbiPrism 3730 DNA Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Gel-Dokumentationssystem:	
Herolab E.A.S.Y. RH	Heraeus, Düsseldorf
Gelkammern (horizontal):	
HU6	Carl Roth, Karlsruhe
HU10	Carl Roth, Karlsruhe
HU25	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Pocketblock	Biozym Scientific, Oldendorf
Gelkammer (vertikal):	
TV100	Carl Roth, Karlsruhe
Handdispenser:	
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank (+4°C):	
Privileg Super Energiesparer	Quelle, Fürth

Labor-pH-Meter:	
inoLab pH 720	WTW, Weilheim
Magnetrührer:	
RCT basic safety control IKAMAG	IKA-Werke, Staufen
Mehrkanalpipetten:	
8-Kanalpipette Research 300	Eppendorf, Hamburg
12-Kanalpipette Research 100	Eppendorf, Hamburg
12-Kanalpipette Research 300	Eppendorf, Hamburg
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroskop:	
Axovert 25	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Lesegerät:	
Emax	MWG-Biotech, Ebersberg
Mikrowelle:	
M 720	Miele, Gütersloh
Netzgerät:	
EPS 300	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GPS 200/400	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
PCR-Maschinen/Thermozykler:	
Mastercycler egradient S	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler pro S	Eppendorf, Hamburg
AbiPrism 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Photometer:	
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA
Pipetten:	
1-10µl	Eppendorf, Hamburg
1-20, 10-200, 100-1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhelfer:	
accu-jet pro	Brand, Wertheim
Sterilbank Antair BSK 4	Anthos Mikrosysteme, Köln
Taumel-Schüttler 3011	GFL, Burgwedel
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-20°C):	
Öko super	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühltruhe (-80°C):	
Hera Freeze	Heraeus, Düsseldorf
Tischautoklav:	
HRM-242II	Becthai, Bangkok, Thailand
Tischzentrifugen:	
Uni-Fuge	Carl Roth, Karlsruhe
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
Biofuge Pico	Heraeus, Düsseldorf
5415 R	Eppendorf, Hamburg
Rotina 38 R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen
Überkopffrotator 3025	GFL, Burgwedel
Vakuumpkonzentrator-Zentrifuge:	
BA-VC-300 H	Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe mit Kühlfalle:	

C. Materialien

E1M5	Edwards High Vacuum Int., Crawley, England
RVT 100	Savant, Holbrook, NY, USA
Vortexer:	
VF2, Vortex Genie 2	Janke & Kunkel, Staufen
Waagen:	
Feinwaage 1801 004	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage 1507 004	Sartorius, Göttingen
Wasserbad:	
1012	GFL, Burgwedel
W22	Störk-Tronic, Stuttgart
Wasserfilteranlage	
Milli-Q ^{UF} Plus	Millipore, Schwalbach
Zellinkubator:	
Steri-Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Zellzählgerät:	
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyser	Beckman/Coulter, Fullerton, CA, USA

C.3. Labormaterialien

Combitip Plus:	
0,1, 0,2, 10ml	Eppendorf, Hamburg
Cryogefäße:	
1,8ml	VWR, Darmstadt
Dialysierschlauch:	
Größe 3	Carl Roth, Karlsruhe
Dounce-Homogenisator:	
5ml, Glas	B. Braun Melsungen, Melsungen
Filterpapier MN 827 B	Macherey-Nagel, Düren
Gewebekulturplatte:	
96-Loch, F-Form	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaswaren	Schott, Mainz und Brand, Wertheim
Küvetten:	
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt, Nümbrecht
UVette	Eppendorf, Hamburg
Microcon YM-100	Millipore, Schwalbach
Millidisk 10 Filtereinsatz:	
0,1, 0,22µm	Millipore, Schwalbach
Nylon Membran, positiv geladen	Roche Diagnostics, Mannheim
Parafilm M	Brand, Wertheim
Petrischalen:	
quadratisch 120mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
rund 100mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen:	
kristall 0,5-10µl	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck
gelb 1-200µl	Sarstedt, Nümbrecht
blau 200-1000µl	Ratiolab, Dreieich
10µl (0,5-10µl), mit Filter	Peqlab, Erlangen
20µl (0,1-30µl), mit Filter	Peqlab, Erlangen
200µl (5-250µl), mit Filter	Nerbe Plus, Winsen/Luhe

1250µl (50-1250µl), mit Filter	Peqlab, Erlangen
Polypropylen-Röhrchen:	
14ml, runder Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße:	
0,2ml	Biozym Scientific, Oldenburg
0,5ml	Carl Roth, Karlsruhe
1,5ml	Brand, Wertheim
1,5ml, Schraub	Sarstedt, Nümbrecht
1,5ml, Schraub, „Amber“, freistehend	Kisker Biotech, Steinfurt
2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Real Time Klebefolie	Applied Biosystems, Darmstadt
Real Time Platten, 96-Loch	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Rotkappröhrchen:	
15, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter:	
blau, 0,2µm	Millipore, Schwalbach
Steri-Cup:	
150, 250, 500ml, 0,22µm	Millipore, Schwalbach
Toppits:	
Alufolie, Frischhaltefolie	Melitta, Minden
Zahnstocher	Neoten, Salzgitter
Zellkulturflaschen:	
Cellstar 25, 75cm ² , mit Filter	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

C.4. Lösungen, Puffer, Medien

Ampicillin, 50mg/ml

5g Ampicillin-Natriumsalz wurden in 100ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und durch einen 0,2µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Die Lösung wurde zu je 1ml Portionen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch

Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 gemischt.

Ciprofloxacin, 2,35mg/ml

0,4g Ciprofloxacin-Hydrochlorid-Monohydrat wurden in 170ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und durch einen 0,2µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Die Lösung wurde zu je 2,5ml Portionen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate, dNTP, 10mM

Für 100µl wurden je 10µl von 100mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit 60µl H₂O_{Ampuwa} gemischt und bei -20°C gelagert.

DMEM-Medium

13,38g DMEM und 3,7g NaHCO₃ wurden in 950ml H₂O_{Milli-Q} gelöst. Der pH7,05 in einem Endvolumen von 1l wurde mit 25% HCl eingestellt und die Lösung durch einen 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert.

DNA-Ladepuffer, 6x

30ml 100% Glycerol, 6ml 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0, 1,5ml 1% Bromphenolblau, 1,5ml 1% Xylencyanol und 0,5ml 1M TRIS-HCl, pH7,6 wurden gemischt und bis 50ml mit H₂O_{Ampuwa} aufgefüllt. Endkonzentration: 60% Glycerol (v/v), 60mM EDTA-Na₂, pH8,0, 0,03% Bromphenolblau (w/v), 0,03% Xylencyanol (w/v), 10mM TRIS-HCl, pH7,6.

DTT, 1M

1,54g DTT wurden in 10ml H₂O_{Milli-Q} gelöst und zu je 200µl Portionen bei -20°C gelagert.

DTT, 2,25M

1,84g DTT und 250µl 1M Kaliumacetat wurden in 5ml H₂O_{Milli-Q} gelöst und zu je 50µl Portionen bei -20°C gelagert. Endkonzentration: 2,25M DTT, 50mM Kaliumacetat.

EMSA Hypotonischer Puffer

2ml 1M HEPES, pH7,9, 300µl 1M MgCl₂ und 800µl 2,5M KCl wurden gemischt, bis 200ml mit H₂O_{Ampuwa} aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 25ml EMSA Hypotonischer Puffer wurden 25µl 0,2M PMSF und 12,5µl 1M DTT gegeben. Endkonzentration: 10mM HEPES, pH7,9, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT.

EMSA Puffer, wenig Salz

4ml 1M HEPES, pH7,9, 50ml 100% Glycerol, 300µl 1M MgCl₂, 1,6ml 2,5M KCl und 80µl 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 wurden gemischt, bis 200ml mit H₂O_{Ampuwa} aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 25ml EMSA Puffer, wenig Salz wurden 25µl 0,2M PMSF und 12,5µl 1M DTT gegeben. Endkonzentration: 20mM HEPES, pH7,9, 25% Glycerol (v/v), 1,5mM MgCl₂, 20mM KCl, 0,2mM EDTA-Na₂, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT.

EMSA Puffer, viel Salz

4ml 1M HEPES, pH7,9, 50ml 100% Glycerol, 300µl 1M MgCl₂, 80ml 2,5M KCl und 80µl 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 wurden gemischt, bis 200ml mit H₂O_{Ampuwa} aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 25ml EMSA Puffer, viel Salz wurden 25µl 0,2M PMSF und 12,5µl 1M DTT gegeben. Endkonzentration: 20mM HEPES, pH7,9, 25% Glycerol (v/v), 1,5mM MgCl₂, 1M KCl, 0,2mM EDTA-Na₂, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT.

EMSA Dialysierpuffer

40ml 1M HEPES, pH7,9, 200ml 100% Glycerol, 80ml 2,5M KCl und 800µl 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 wurden gemischt, bis 2l mit H₂O_{Ampuwa} aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 1l EMSA Dialysierpuffer wurden 250µl 0,2M PMSF und 125µl 1M DTT gegeben. Endkonzentration: 20mM HEPES, pH7,9, 10% Glycerol (v/v), 100mM KCl, 0,2mM EDTA-Na₂, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT.

Gentamycin, 50mg/ml

5g Gentamycin-Sulfatsalz wurden in 100ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und durch einen 0,2µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Die Lösung wurde zu je 1ml Portionen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

L-Glutamin, 50mg/ml

50g L-Glutamin wurden in 1l H₂O_{Ampuwa} im Wasserbad bei 37°C gelöst und mit einem 0,22µm

Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert. Es wurden jeweils 3,5ml Portionen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

HEPES, 1M, pH7,4 oder pH7,9

119,15g HEPES wurden in 400ml H₂O_{Milli-Q} gelöst, der pH7,4 oder pH7,9 mit 5M KOH eingestellt und bis 500ml Endvolumen mit H₂O_{Milli-Q} aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend mit einem 0,22µm Steri-Cup filtriert und zu je 50ml Portionen bei -20°C oder 4°C gelagert.

Inoue-Transformationspuffer

10,88g MnCl₂·4H₂O, 2,2g CaCl₂·2H₂O, 18,65g KCl und 20ml 0,5M PIPES, pH6,7 wurden in 1l H₂O_{Milli-Q} gelöst, mit einem 0,22µm Steri-Cup filtriert und zu je 50ml Portionen bei -20°C gelagert.

Endkonzentration: 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, 10mM PIPES.

LB-Medium (Luria-Bertani)

10g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt und 5g NaCl wurden in 950ml H₂O_{Milli-Q} gelöst, der pH7,2 mit 5M NaOH eingestellt und auf 1l Endvolumen mit H₂O_{Milli-Q} aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend durch Autoklavieren sterilisiert und bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert. Zur Selektion: 50µg/ml Ampicillin (1ml von 50mg/ml Ampicillin auf 1l LB-Medium).

LB-Agarplatten

10g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl und 16g Agar wurden in 1l H₂O_{Milli-Q} gelöst, autoklaviert und auf 50°C abgekühlt, bevor zur Selektion das benötigte Antibiotikum zugegeben wurde. 10cm Petrischalen wurden mit 20ml LB-Agar befüllt. Zur Selektion: 100µg/ml Ampicillin (2ml von 50mg/ml Ampicillin auf 1l LB-Agar).

LM-Agarplatten

10g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 0,6g NaCl und 16g Agar wurden in 1l H₂O_{Milli-Q} gelöst, autoklaviert und auf 55°C abgekühlt, bevor 10ml 1M MgSO₄, 10ml 1M MgCl₂ und zur Selektion das benötigte Antibiotikum zugegeben wurde. 10cm Petrischalen wurden mit 20ml LM-Agar befüllt. Zur Selektion: 100µg/ml Ampicillin (2ml von 50mg/ml Ampicillin auf 1l LM-Agar).

Lysis-Lösung

20ml 1M TRIS-HCl, pH8,0, 6ml 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0, 1,5ml 5M NaCl, 5ml 10% SDS und 17,5ml H₂O_{Ampuwa} wurden gemischt und ergaben ein Endvolumen von 50ml. Endkonzentration: 400mM TRIS-HCl, pH8,0, 60mM EDTA-Na₂, 150mM NaCl, 1% SDS (w/v).

Lysolecithin, 5mg/ml

50mg Lysolecithin wurden in 10ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und zu je 1ml Portionen bei -20°C gelagert.

β-ME, 1,22M

853µl 14,3M β-ME, 100µl 1M MOPS und 9047µl H₂O_{Milli-Q} wurden gemischt und zu je 50µl Portionen bei -20°C gelagert. Endkonzentration: 1,22M β-ME, 10mM MOPS.

MEM-Medium

9,6g MEM und 2,2g NaHCO₃ wurden in 950ml H₂O_{Milli-Q} gelöst. Der pH7,0 in einem Endvolumen von 1l wurde mit 25% HCl eingestellt und die Lösung durch einen 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert.

MNase-Puffer

4,5ml 1M Saccharose, 2,4ml 1M KCl, 900µl 1 M HEPES, pH7,4, 150µl 1M MgCl₂ und 75µl 1M CaCl₂ wurden gemischt und bis 30ml mit H₂O_{Ampuwa} aufgefüllt. Endkonzentration: 150mM Saccharose, 80mM KCl, 30mM HEPES, pH7,4, 5mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂.

NZY⁺-Medium

10g Pepton aus Casein, 50g Hefeextrakt, 6g NaCl wurden in 1l H₂O_{Milli-Q} gelöst, autoklaviert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 10ml NZY⁺-Medium wurden 125µl 1M MgSO₄, 125µl 1M MgCl₂ und 200µl 1M D-(+)-Glukose zugegeben.

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)

80g NaCl, 11,5g Na₂HPO₄·2H₂O, 2g KCl, 2g KH₂PO₄, 4,9ml 2M MgCl₂ und 4,6ml 2M CaCl₂ wurden in 9l H₂O_{Milli-Q} gelöst. Der pH7,3 im Endvolumen von 10l wurde mit 1M HCl eingestellt und die Lösung mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C oder Raumtemperatur. Endkonzentration: 136,89mM NaCl, 6,46mM Na₂HPO₄, 2,68mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄, 0,98mM MgCl₂, 0,92mM CaCl₂.

PBS₀ (Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Mg²⁺ und Ca²⁺)

80g NaCl, 11,5g Na₂HPO₄·2H₂O, 2g KCl und 2g KH₂PO₄ wurden in 9l H₂O_{Milli-Q} gelöst. Der pH7,3 im Endvolumen von 10l wurde mit 1M HCl eingestellt und die Lösung mit einem 0,22µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C oder Raumtemperatur. Endkonzentration: 136,89mM NaCl, 6,46mM Na₂HPO₄, 2,68mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄.

PIPES, 0,5M, pH6,7

15,1g PIPES wurden in 80ml H₂O_{Milli-Q} gelöst, der pH6,7 mit 5M KOH eingestellt und bis 100ml Endvolumen mit H₂O_{Milli-Q} aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend mit einem 0,22µm Steri-Cup filtriert und zu je 20ml Portionen bei -20°C gelagert.

PMSF, 0,2M

348,4mg PMSF wurden in 10ml Ethanol absolut 30 min lang im 30°C Wasserbad gelöst und zu je 200µl Portionen bei -20°C gelagert.

RNase A, 10mg/ml (DNase-frei)

100mg RNase A wurden in 10ml TE-Puffer, pH8,0 gelöst und 15 min lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem langsamen Abkühlen der Lösung wurden je 1ml Portionen bei -20°C gelagert.

SOB-Medium

20g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 0,6g NaCl und 0,2g KCl wurden in 1l H₂O_{Milli-Q} gelöst. Die Lösung wurde durch Autoklavieren sterilisiert und danach bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 100ml Medium wurden 1ml 1M MgSO₄ (steril) und 1ml 1M MgCl₂ (steril) zugegeben.

SOC-Medium

20g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 0,6g NaCl und 0,2g KCl wurden in 1l H₂O_{Milli-Q} gelöst. Die Lösung wurde durch Autoklavieren sterilisiert und danach bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch: Zu 100ml Medium wurden 1ml 1M MgSO₄ (steril), 1ml 1M MgCl₂ (steril) und 2ml 1M D-(+)-Glukose (steril) zugegeben.

Streptomycin, 60mg/ml und Penicillin, 99500U/ml

5g Streptomycin-Sulfatsalz und 5g Penicillin G-Natriumsalz (1652U/mg) wurden in 83ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und durch einem 0,2µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Die Lösung wurde zu je 1ml Portionen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

TBE-Probenpuffer, 5x (EMSA)

2ml TBE-Puffer, 5x (EMSA), 1,5g Ficoll 400, 1ml 1% Bromphenolblau und 1ml 1% Xylencyanol wurden in 10ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und bei 4°C gelagert. Endkonzentration: 89mM TRIS, 89mM Borsäure, 2mM EDTA, 15% Ficoll 400 (w/v), 0,1% Bromphenolblau (w/v), 0,1% Xylencyanol (w/v).

TBE-Puffer, 5x (EMSA)

54g TRIS, 27,5g Borsäure und 2,9g EDTA wurden in 1l H₂O_{Ampuwa} gelöst. Endkonzentration: 445mM TRIS, 445mM Borsäure, 10mM EDTA.

TBE-Puffer, 5x (TRIS/Borsäure/EDTA)

270g TRIS, 137,5g Borsäure und 100ml 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 wurden in 5l H₂O_{Milli-Q} gelöst. Endkonzentration: 445mM TRIS, 445mM Borsäure, 10mM EDTA-Na₂, pH8,0.

TE-Puffer, pH8,0 (TRIS/EDTA)

10ml 1M TRIS-HCl, pH8,0 und 2ml 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 wurden bis 950ml mit H₂O_{Milli-Q} aufgefüllt und der pH8,0 im Endvolumen von 1l mit 1M HCl eingestellt. Die Lösung wurde anschließend durch Autoklavieren sterilisiert. Endkonzentration: 10mM TRIS-HCl, pH8,0, 1mM EDTA-Na₂, pH8,0.

TEN-Puffer, pH8,0 (TRIS/EDTA/NaCl)

10ml 1M TRIS-HCl, pH8,0, 2ml 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 und 20ml 5M NaCl wurden bis 950ml mit H₂O_{Milli-Q} aufgefüllt und der pH8,0 im Endvolumen von 1l mit 1M HCl eingestellt. Die Lösung wurde anschließend durch Autoklavieren sterilisiert. Endkonzentration: 10mM TRIS-HCl, pH8,0, 1mM EDTA-Na₂, pH8,0, 100mM NaCl.

Trypsin-EDTA

8g NaCl, 0,4g KCl, 0,1g Na₂HPO₄·2H₂O, 1g D-(+)-Glukose und 3g TRIS wurden in 950ml H₂O_{Ampuwa} gelöst und der pH7,5 mit 25% HCl eingestellt. Anschließend wurden 0,1g EDTA-Na₂·2H₂O, 1,2g Trypsin, 1:250 und 5ml 0,1% Phenolrot zugegeben. Der pH7,5 im Endvolumen von 1l wurde nochmals mit 1M HCl eingestellt. Die fertige Lösung wurde mit einem 0,1µm Millidisk 10 Filtereinsatz filtriert und bei 4°C gelagert. Endkonzentration: 136,89mM NaCl, 5,37mM KCl, 0,56mM Na₂HPO₄, 5,55mM D-(+)-Glukose, 24,77mM TRIS, 0,27mM EDTA-Na₂, 0,12% Trypsin (w/v), 0,0005% Phenolrot (w/v).

Zellkulturmedium

Endkonzentration: 90% DMEM (v/v), 10% FKS (v/v), 350µg/ml L-Glutamin, 120µg/ml Streptomycin, 199U/ml Penicillin.

Zellkulturmedium

Endkonzentration: 92,5% MEM (v/v), 7,5% FKS (v/v), 350µg/ml L-Glutamin, 11,75µg/ml Ciprofloxacin, 100µg/ml Gentamycin.

C.5. Zelllinien, Zellen und DNA-Proben

Alle für diese Arbeit verwendeten Zelllinien, Zellen und DNA-Proben, bei einigen mit der Anzahl n für die 5'-(CGG) _{n} -3' Repetition, sind in Tabelle 1 aufgeführt. ♂ = männlich; ♀ = weiblich; FW = fötale Woche; HFM = high-functioning male; *FXS* = *fragiles X Syndrom*; *EBV* = *Epstein-Barr-Virus*

H. sapiens Zelllinien

HCT-116	♂	Epithelzellen eines Kolorektalkarzinoms		~30	ATCC: CCL-247	LGC Standards, Wesel
HeLa	♀	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms		20	ATCC: CCL-2	LGC Standards, Wesel

H. sapiens primäre Zellen

HFF	♂	Fibroblastenzellen der Vorhaut		normal		Kinderklinik, Erlangen
77MN161	♂	periphere weiße Blutzellen	28 Jahre	normal		Virologie, Erlangen
33MN182	♂	periphere weiße Blutzellen	73 Jahre	normal		Virologie, Erlangen
80WN203	♀	periphere weiße Blutzellen	26 Jahre	normal		Virologie, Erlangen
83WN224	♀	periphere weiße Blutzellen	23 Jahre	normal		Virologie, Erlangen
GM07072	♂	Fibroblastenzellen der Lunge	22 FW	<i>FXS</i>	~450	Coriell Cell Repositories, Camden, NJ, USA
GM05848	♂	Fibroblastenzellen	4 Jahre	<i>FXS</i>	~670	

H. sapiens genomische DNA-Proben

Gehirn	♂		22 FW			BioCat, Heidelberg
Leber	♂		22 FW			BioCat, Heidelberg
Skelettmuskel	♂		22 FW			BioCat, Heidelberg
Gehirn	♂		33 Jahre	normal		BioCat, Heidelberg
Leber	♂		27 Jahre	normal		BioCat, Heidelberg
Skelettmuskel	♂		33 Jahre	normal		BioCat, Heidelberg
28765	♀	periphere weiße Blutzellen		Prämutation	109±1	Humangenetik, Erlangen
25948	♀	periphere weiße Blutzellen		Prämutation	119±1	Humangenetik, Erlangen
32301	♀	periphere weiße Blutzellen		Prämutation	78±1	Humangenetik, Erlangen
33056	♀	periphere weiße Blutzellen		Prämutation	79±1	Humangenetik, Erlangen
32157	♂	periphere weiße Blutzellen		Prämutation	113±1	Humangenetik, Erlangen
31475	♀	periphere weiße Blutzellen		Vollmutation		Humangenetik, Erlangen
14451	♂	periphere weiße Blutzellen	9 Jahre	<i>FXS</i>		Humangenetik, Erlangen
21181	♂	periphere weiße Blutzellen		<i>FXS</i>		Humangenetik, Erlangen
54923	♂	periphere weiße Blutzellen		<i>FXS</i>		Humangenetik, Erlangen
86RD540	♂	Fibroblastenzellen		normal		Telomerase Erasmus University, DR Rotterdam, Die Niederlande
86RD613	♂	Fibroblastenzellen		<i>FXS</i>	~500	Telomerase
94CE422	♂	Fibroblastenzellen		HFM	~330	Telomerase
ROS31	♂	periphere weiße Blutzellen		normal		<i>EBV</i> Erasmus University, DR Rotterdam, Die Niederlande
RJK1412	♂	periphere weiße Blutzellen		<i>FXS</i>	~500	<i>EBV</i>
5106	♂	periphere weiße Blutzellen		HFM	~400	<i>EBV</i>

<i>M. musculus</i> genomische DNA-Proben					
Gehirn	♂	7 Wochen	normal	9	BioCat, Heidelberg
Leber	♂	6-8 Wochen	normal	9	BioCat, Heidelberg
Skelettmuskel	♂	8 Wochen	normal	9	BioCat, Heidelberg
genomische DNA Kontrolle					
nicht-methylierte und Bisulfit-konvertierte menschliche DNA					Qiagen, Hilden
methylierte und Bisulfit-konvertierte menschliche DNA					Qiagen, Hilden
Plasmid-DNA Kontrolle					
pUC19- <i>FMR1</i>				11	Vanderbilt University, Nashville, TE, USA

Tabelle 1: Zelllinien, Zellen und DNA-Proben.

C.6. Bakterienstamm

E. coli DH5 α

Invitrogen, Darmstadt

Genotyp:

F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*

C.7. Plasmide

pcDNA3.1(+)

Invitrogen, Darmstadt

pJET1/*blunt*

(50ng/ μ l)

Fermentas, St. Leon-Rot

C.8. Antikörper

Anti-acetyl-Histon H3

Millipore, Schwalbach

Anti-acetyl-Histon H4

Millipore, Schwalbach

Anti-Digoxigenin-AP

Roche Diagnostics, Mannheim

Anti-RNA-Polymerase II

Epigentek, Farmingdale, NY, USA

Anti-trimethyl-Histon H3 Lysin 9

Millipore, Schwalbach

Anti-trimethyl-Histon H4 Lysin 20

Millipore, Schwalbach

Normal Hase IgG

Millipore, Schwalbach

Normal Maus IgG

Epigentek, Farmingdale, NY, USA

C.9. Primer

Alle verwendeten Oligodesoxyribonukleotid-Primer wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen hergestellt. Aus: ¹ (Genç *u. a.*, 2000); ² (Alberter & Ensser, 2007).

C.9.1. Primer zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA

Zur Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern wurden verschachtelte PCRs (engl.: nested PCRs) durchgeführt, so dass vier Primer für jedes PCR-Fragment verwendet wurden. v = Primer vorwärts; r = Primer rückwärts; n = Primer für nested PCR; Y = C oder T; R = A oder G. Die verwendeten Primer für die Bisulfit-Sequenzierung wurden so entworfen, dass ausschließlich Bisulfit-behandelte DNA gebunden werden konnte. Die Amplifikation während der PCR erfolgte dann entweder für den oberen oder unteren Strang der DNA, da die Bisulfit-Konversion Einzelstrang-spezifisch verläuft und im Anschluss beide Stränge der DNA nicht mehr komplementär zueinander sind. Die zur Anlagerung der Primer verwendete Temperatur (TA) und die Größen der PCR-Fragmente für das innere Primerpaar wurden ebenfalls angegeben.

Primer	Position		Sequenz 5' → 3'	Strang	TA	Größe
NC_000023:146.786.201-146.840.303 <i>H. sapiens</i> FMRI Genregion						
P33	13659	v	TTA ATT TAG TGT TAT TAG TTA ATT TTT ATT	oben		
P34	13699	v n	TAG TTG GAA TTA TTT TTT TTT TTT TAT TTT	oben	53,8°C	590 bp
P35	14288	r n	AAA CCT TTC CTC AAA CCC AAC TTT AAC CCA	oben		
P36	14348	r	CCC TAT AAA AAC ACC CTA TAC CCT TTA AAA	oben		
P29	14169	v	GTA GAA ATG AAT TTT AAG TGT TTA ATA TAA	oben		
P30	14259	v n	TGG GTT AAA GTT GGG TTT GAG GAA AGG TTT	oben	53,8°C	530 bp
P31	14788	r n	AAA AAC CRA CCR AAA TAC CRA ATC RAA AAA	oben		
P32	14838	r	CCC CRC CCT CTC TCT TCA AAT AAC CTA AAA	oben		
P25	14664	v	GGG YGT TTT GGT TTT YGY GAG GTA GTG YGA TT	oben		
P26	14699	v n	TAT YGT TTT TTA GTT TTT TYG TTT TTT ATT AAG	oben	53,8°C	293 bp
P27	14991	r n	RCC CRC TCA AAA ACR ACC CTC CAC CRA AAA TAAA	oben		
P28	15056	r	ACC RCA CRC CCC CTA ACA ACR ACR CCT CCR T	oben		
P21	14589	v	AAT CCC AAA AAA ACC RAA CTA AAA TAA CCR	unten		
P22	14629	v n	ATT TCC CAC RCC ACT AAA TAC ACC TCT ACA	unten	50,0°C	210 bp
P23	14838	r n	TTT YGT TTT TTT TTT TTA AGT GGT TTG GGA	unten		
P24	14878	r	ATT AAY GTT GTT TTT TTT TTT YGY GGG TTT	unten		
P92	9560	v	ACA AAA CCC ATA AAT ACA AAA	unten		
P93	9670	v n	AAT TCA ATA AAA AAA CAA TAA TC	unten	49,0°C	556 bp
P94	10225	r n	TAA TAG GTG TAT AGT AGA AT	unten		
P95	10345	r	AGA TGA TTT TTT AAA GTG GTT G	unten		

P96	10530	v	AAT AAA CAA ACC ATA ATA TA	unten		
P97	10669	v n	ACA TAC TAT ATA ATT CCA ACT	unten	49,0°C	374 bp
P98	11042	r n	AAA ATT AAG TAG ATA GTG GAG AG	unten		
P99	11121	r	TGA TTT TTT ATT TAA ATG AG	unten		
P100	11109	v	AAA TAA AAA ATC ATA ATT AAA AAA AAT TAT	unten		
P101	11159	v n	AAA TAT AAC TTT AAC TAA ATC CTA AAA AAT	unten	49,0°C	350 bp
P102	11508	r n	TTT GTT TTT AGT GTT TAT TAT AGT GTT TGG	unten		
P103	11540	r	AGA ATA AAG ATT TTT ATT TGT TTT ATT TAT	unten		
P40	11531	v	TCT TTA TTC TCA CTA AAC TTA C	unten		
P41	11808	v n	AAA CTA AAT AAA TTT CAT ACA C	unten	49,0°C	497 bp
P42	12304	r n	TTA AAG TTT TTT TTT TTT TT	unten		
P43	12417	r	TTT GAT TTT GAG TTT TAG TTT	unten		
P108	12594	v	TAT TCT AAT ACA CTA ACC ATC ATA ATA AAA	unten		
P109	12659	v n	AAC AAT ATA ATA AAA AAA CAA AAA ATA TAC	unten	49,0°C	305 bp
P110	12963	r n	TGT TTA TGT TTT TTG TAT TTA TAG AGA TGG	unten		
P111	13038	r	TTA TTT TTA TTT TTT TAG ATA TAA GTT GTA	unten		
P112	12869	v	ATA AAT ATA ACT CAA AAA CAA ACT ATT AAA	unten		
P113	12904	v n	CAA TAA AAA ATA AAA ATT TAC AAT CCA ATA	unten	49,0°C	405 bp
P114	13308	r n	TAT TAT AAG TTA TAT TTA ATT TGT GTT GTT	unten		
P115	13348	r	TTT AGG GTT TAA AAA TAT GTT AAT TTT TTA	unten		
P116	13359	v	AAC AAC TTA CAC TTA AAA AAA TAT AAT CAT	unten		
P117	13419	v n	ACA TTA AAA TTA CAA CTA ATA CTC TAC TCC	unten	49,0°C	197 bp
P118	13615	r n	AGG ATG TTG TTG TTG GTG GAA TTT TAG TTT	unten		
P119	13648	r	ATG ATT TGT TTT AGG TAG GTG TTT TAG AAT	unten		
P13	13659	v	CCA ACT CAA TAC TAT TAA TTA ACT CTC ACC	unten		
P14	13699	v n	CAA CTA AAA TCA TCT CCC CTT CTC CAC CCC	unten	53,8°C	590 bp
P15	14288	r n	GAG TTT TTT TTT AGA TTT AGT TTT GAT TTA	unten		
P16	14348	r	TTT TGT GGA GAT ATT TTG TGT TTT TTA AGG	unten		
P9	14169	v	ACA AAA ATA AAC CTC AAA TAC TTA ACA CAA	unten		
P10	14259	v n	TAA ATC AAA ACT AAA TCT AAA AAA AAA CTC	unten	53,8°C	530 bp
P11	14788	r n	GGG AAT YGG TYG GGG TGT YGG GTY GAA AGA	unten		
P12	14838	r	TTT YGT TTT TTT TTT TTA AGT GGT TTG GGA	unten		
P1 ¹	14664	v	AAA CRT TCT AAC CCT CRC RAA ACA AAT ACR ACC	unten		
P2 ¹	14699	v n	CAC CRC CCT TCA ACC TTC CCR CCC TCC ACC AAG	unten	53,8°C	293 bp
P3 ¹	14991	r n	GTT YGT TTA GAG GGY GGT TTT TAT YGG AAG TGA A	unten		
P4 ¹	15056	r	GTY GTA YGT TTT TTG GTA GYG GYG TTT TYG T	unten		
P5 ¹	14956	v	ATT TCA CTT CCR ATA AAA AAC CRC CTC TAA ACR AAC	unten		
P6 ¹	15029	v n	AAA ACR CCR CTA CCA AAA AAC RTA CRA CAA C	unten		127 bp
P7 ¹	15155	r n	TTT YGA GAG GTG GGT TGY GGG YGT TYG AGG TTT AG	unten		
P8 ¹	15195	r	TTT TAT TTT TTT TTT AGT TTT GTT AGY GTY GGG AG	unten		20xCGG

C. Materialien

NC_000086:65.916.730-65.971.138 *M. musculus Fmr1* Genregion

M13	13447	v	TAA AAC AAC TCA CCC TTA CTC TTT CAA ATA	unten		
M14	13497	v n	TCT TAT CAC ATT CCA ATT AAA ATC ATC TTA	unten	53,8°C	488 bp
M15	13984	r n	TAG GAG TAG ATG TGT AAA ATT TAA TTT TTT	unten		
M16	14030	r	GGT GAG GTA GTA ATA AAA AGA TTG TTA TTA	unten		
M9	14061	v	AAC ACA TAA TAA ACA TTC AAT AAA CTT CTC	unten		
M10	14096	v n	AAT ACA AAC CTT CTA AAT TAA AAA AAC ATA	unten	53,8°C	325 bp
M11	14420	r n	TTT TTT TTT TAG ATA GTT TTT TTT ATA TTT	unten		
M12	14460	r	TAA GGG TTA ATA GGG TGT GTT AGA ATT TTA	unten		
M5	14391	v	AAA TAT AAA AAA AAC TAT CTA AAA AAA AAA	unten		
M6	14431	v n	TAA AAT TCT AAC ACA CCC TAT TAA CCC TTA	unten	53,8°C	463 bp
M7	14893	r n	TTT TTT GGG TAT TTG TTT TAG GGT ATT AGG	unten		
M8	14936	r	TTY GTT TTT GTT TTT TTT YGG GTA GTG GAG	unten		
M1	14831	v	CCT TTC ACC AAA TAC RCR CRC CAA AAA ATA	unten		
M2	14864	v n	CCT AAT ACC CTA AAA CAA ATA CCC AAA AAA	unten	53,8°C	363 bp
M3	15226	r n	GGA GGT GGG TTG TAG GYG TTT GAG GTT TAG	unten		
M4	15295	r	GGA GTT TYG TAT TTT TAT TAT TAG TTT TTT	unten		9xCGG

NC_000004:3.031.206-3.215.485 *H. sapiens HTT* Genregion

HTT25	11961	v	TCA AAT TAA TAT CCT AAA CCC C	unten		
HTT26	12018	v n	TCT TTA AAA AAA TAA AAA AAC T	unten	51,7°C	306 bp
HTT27	12323	r n	GTT TTA GTA GTA GAT GAT TGT	unten		
HTT28	12362	r	AGA TAT GTG TGT TGT TAA GT	unten		
HTT21	12304	v	CAA TCA TCT ACT ACT AAA AC	unten		
HTT22	12343	v n	ACT TAA CAA CAC ACA TAT CT	unten	51,7°C	515 bp
HTT23	12857	r n	TGG TTT TAG TAT TTT TTA TTT TT	unten		
HTT24	12887	r	TTA GTT ATT TTA GTG GGT AG	unten		
HTT17	13001	v	AAT ACA ATA ACA TAA TCT TA	unten		
HTT18	13033	v n	CTC CAC CTC CCA AAT TCA AA	unten	51,7°C	317 bp
HTT19	13349	r n	TAT TTG AAT TTA GGA ATT TG	unten		
HTT20	13398	r	GAG AAA TAG TTG TTA GTT TTT AG	unten		
HTT13	13388	v	AAC TAT TTC TCT ACT ATC CTT C	unten		
HTT14	13432	v n	TAC CCC ACT AAA AAC AAT ACT AA	unten	51,7°C	614 bp
HTT15	14045	r n	ATT TTT AGT GAG TTG GAG AG	unten		
HTT16	14072	r	GAG GAT TTT AAG TGT GAT TT	unten		
HTT9a	14025	v	CCT CTC CAA CTC ACT AAA AAT AA	unten		
HTT10a	14050	v n	TAA AAA TCA CAC TTA AAA TCC TC	unten	61,5°C	313 bp
HTT11a	14362	r n	TAT GAA GGA YGG GGT TAT	unten		
HTT12a	14385	r	GTA GGG TTA TGG AGG GGT T	unten		
HTT1a	14798	v	CRC CCR AAT AAA ACR CTA CRC TA	unten		
HTT2a	14824	v n	ACR ACC TTA CTA TAT AAA ACA AAA CC	unten	61,5°C	253 bp
HTT3a	15076	r n	GGT AAT GAA TGG GGT TTT	unten		
HTT4a	15128	r	TAY GGT AGT TTT YGG AGG TT	unten		

HTT1b	15019	v	AAA TAA ACR ACC RCT CAA ATT C	unten		
HTT2b	15049	v n	CCT ACR ACC CAA AAC CCC ATT C	unten	61,5°C	252 bp
HTT3b	15300	r n	GGA AGT TGA GGA GGY GGY GG	unten		
HTT4b	15330	r	AGT AGY GGT TGT GTT TGY G	unten		21xCAG

Tabelle 2: Primer zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA.

C.9.2. Primer zum Sequenzieren der PCR-Fragmente im Plasmid pJET1/blunt

Primer	Sequenz 5' → 3'
pJET1 vorwärts	GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC
pJET1 rückwärts	GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C

Tabelle 3: Primer zum Sequenzieren der pJET1/blunt klonierten PCR-Fragmente.

C.9.3. Primer zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA

Primer	Position	Sequenz 5' → 3'	T _A	Größe
EMSA vorwärts	13999	AAG GCA GCT ATA AGC ACG GTG	61,5°C	630 bp
EMSA rückwärts	14628	CAA ATG CAT CCG GTT ATC CC		

Tabelle 4: Primer zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA.

C.9.4. Primer zum quantitativen Amplifizieren nach Histon-ChIP

Primer	Position	Sequenz 5' → 3'	Größe
<i>FMRI</i> methyliert entfernt vorwärts	13446	TCC CAT TCA GCC TAT GAT GAG A	78 bp
<i>FMRI</i> methyliert entfernt rückwärts	13523	CTA GGG TCT TTG GAG TAG TCA CAT GA	
<i>FMRI</i> methyliert vorwärts	13936	CAC ACG ATA GAT GCT CCG TCA A	146 bp
<i>FMRI</i> methyliert rückwärts	14081	CCT TGC AAC CCT TTA CAT TCC A	
<i>FMRI</i> Methylierungsgrenze vorwärts	14267	AGC TGG GTC TGA GGA AAG GC	146 bp
<i>FMRI</i> Methylierungsgrenze rückwärts	14412	CTT TTG TGA CCC GTA GAG GCA	
<i>FMRI</i> nicht-methyliert vorwärts	14583	CCG CGG AAT CCC AGA GA	65 bp
<i>FMRI</i> nicht-methyliert rückwärts	14647	ACT CAG TGG CGT GGG AAA TC	
<i>FMRI</i> nicht-methyliert entfernt vorwärts	14860	GGG AGG GAA CAG CGT TGA	111 bp
<i>FMRI</i> nicht-methyliert entfernt rückwärts	14970	CAC CGG AAG TGA AAC CGA AA	
<i>GAPDH</i> Promotor vorwärts ²		CCC AAC TTT CCC GCC TCT C	293 bp
<i>GAPDH</i> Promotor rückwärts ²		CAG CCG CCT GGT TCA ACT G	
<i>ADH5</i> Promotor vorwärts ²		GCA TAA TTG AGC CTA CGC C	146 bp
<i>ADH5</i> Promotor rückwärts ²		GCA GAG GTG TTT GTT ACG TG	
<i>Chr4Sata</i> vorwärts ²		CTG CAC TAC CTG AAG AGG AC	139 bp
<i>Chr4Sata</i> rückwärts ²		GAT GGT TCA ACA CTC TTA CA	

Tabelle 5: Primer zum quantitativen Amplifizieren nach Histon-ChIP.

C.9.5. Primer zum Amplifizieren der *FMRI* Methylierungsgrenze und Promotorregion

Die *FMRI* Methylierungsgrenze und Promotorregion in dem 1050 bp Bereich zwischen den Nukleotiden 13886 und 14935 wurde in Form von drei Abschnitten mittels PCR amplifiziert.

Primer	Position	Sequenz 5' → 3'	T _A	Größe
<i>FMRI</i> Abschnitt 1 vorwärts	13867	CGT TTC TTC TTT TTT TTT C	51,8°C	374 bp
<i>FMRI</i> Abschnitt 1 rückwärts	14240	ACT CAT TTT CAT ACT TTC AC		
<i>FMRI</i> Abschnitt 2 vorwärts	14161	CAG TAG GGG CAG AAA TGA AC	64,1°C	413 bp
<i>FMRI</i> Abschnitt 2 rückwärts	14573	TCT GGT CTG GTT TGG TTT G		
<i>FMRI</i> Abschnitt 3 vorwärts	14509	TCA GAC TGC GCT ACT TTG AAC C	69,5°C	445 bp
<i>FMRI</i> Abschnitt 3 rückwärts	14953	AAA CGG AGC TGA GCG CCT		

Tabelle 6: Primer zum Amplifizieren der *FMRI* Methylierungsgrenze und Promotorregion.

C.10. Programme

AIDA 3.1	raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
CorelDRAW 12	Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada
Microsoft Office 2002:	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Excel	
PowerPoint	
Word	
OpenOffice 3.0:	Sun Microsystems, Santa Clara, CA, USA
Draw	
Impress	
Writer	
Primer Express 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequence Detection Software 1.2	Applied Biosystems, Darmstadt
Vector NTI Advance 9	Invitrogen, Darmstadt

C.11. DNA-Größenmarker

DNA MW Marker VI, Digoxigenin-labeled	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot

C.12. Enzyme

C.12.1. Restriktionsendonukleasen

<i>AluI</i>	5'-AGCT-3'	10U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>DraI</i>	5'-TTTAAA-3'	50U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HpaII</i>	5'-CCGG-3'	10U/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>MspI</i>	5'-CCGG-3'	10U/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>NheI</i>	5'-GCTAGC-3'	10U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>RsaI</i>	5'-GTAC-3'	10U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XbaI</i>	5'-TCTAGA-3'	10U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i>	5'-CTCGAG-3'	10U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot

C.12.2. Sonstige Enzyme

BSA	10mg/ml	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA <i>Blunting</i> Enzym		Fermentas, St. Leon-Rot
MNase (Mikrokokken-Nuklease)	300U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Phusion</i> Polymerase	2U/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase A (Ribonuklease A)		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SAM (S-adenosyl-methionin)	32mM	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>SssI</i> -Methylase (CpG-Methylase)	4U/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>T4</i> DNA-Ligase	5U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> Polymerase	5U/μl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Terminale Transferase	400U/μl	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin, 1:250		Gerbu, Wieblingen

C.13. Kits und Reagiersysteme

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	Applied Biosystems, Darmstadt
DIG Gel Shift Kit, 2 nd Generation	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics, Mannheim
Novex DNA Retardation Gel, 6%	Invitrogen, Darmstadt
EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation Kit	Epigentek, Farmingdale, NY, USA
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Darmstadt
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen, Darmstadt
QuickLyse Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

D. Methoden

D.1. Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern durch die Bisulfit-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, Zellen und DNA-Proben zur Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern wurden alle in Tabelle 1 auf den Seiten 30-31 aufgeführt.

D.1.1. Zellkultur

Die von menschlichen Tumoren abstammenden Zelllinien HCT-116 (Kolorektalkarzinom) und HeLa (Zervixkarzinom) wurden ebenso wie die primären Fibroblastenzellen GM07072 und GM05848 bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 80% Luftfeuchtigkeit in DMEM-Medium mit 10% FKS (v/v), 350µg/ml L-Glutamin, 120µg/ml Streptomycin und 199U/ml Penicillin nach Standardmethoden kultiviert. Die primären Vorhautfibroblasten HFF wurden unter denselben Bedingungen kultiviert, jedoch in MEM-Medium mit 7,5% FKS (v/v), 350µg/ml L-Glutamin, 11,75µg/ml Ciprofloxacin, 100µg/ml Gentamycin. Die adhärent an der Oberfläche wachsenden Zellen wurden passagiert, wenn die Zellen in einer Schicht den Boden vollständig bedeckten (Vollkonfluenz). Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellsuspensionen 1:6 (HeLa), 1:4 (HCT-116) und 1:2 (primäre Fibroblastenzellen) geteilt, damit die Zellen innerhalb von ungefähr vier Tagen (HeLa und HCT-116) oder sieben Tagen (primäre Fibroblastenzellen) erneut die Vollkonfluenz erreichten.

D.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Beckman/Coulter „Z2 Coulter Particle Count and Size Analyser“ verwendet. Dazu wurden 50µl Zellsuspension in einer 1:200 Verdünnung mit 0,9% NaCl (w/v) eingesetzt.

D.1.3. Isolierung genomischer DNA mit Natriumperchlorat-Chloroform

(Johns & Paulus-Thomas, 1989)

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde die Natriumperchlorat-Chloroform Methode verwendet. Dazu wurden die Zellen von 4 vollkonfluenten 75cm² Zellkulturflaschen mit PBS_o gewaschen und anschließend in PBS_o vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. In einem 50ml Rotkappröhrchen wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 550x g und RT, 5 min lang gesammelt. Das Zellsediment wurde in 6ml Lysis-Lösung vorsichtig resuspendiert und anschließend in ein 15ml Rotkappröhrchen überführt. Die RNase Behandlung erfolgte durch Zugabe von 45µl einer 50µg/ml RNase A Lösung und Inkubation 30 min lang bei 37°C. Von einer 5M Natriumperchlorat-Lösung wurden 1,5ml zugegeben, 15 min lang bei RT in einem

Überkopffrotator gemischt, 25 min lang bei 65°C inkubiert und dabei mehrmals invertiert. Nach Zugabe von 5,5ml Chloroform (-20°C) wurde der Ansatz 10 min lang bei RT erneut rotiert und 5 min lang bei 1400x g und RT abzentrifugiert. Die wässrige Phase (Überstand) wurde vorsichtig, um die DNA dabei möglichst wenig zu scheren, in ein neues 50ml Rotkappröhrchen überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe des zweifachen Volumens an Ethanol absolut (4°C) über Nacht bei -20°C. Die DNA wurde bei 4388x g und 4°C, 15 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig ausgekippt und das DNA-Pellet getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 3ml TE-Puffer, pH8,0 über Nacht bei 4°C gelöst.

D.1.4. Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

(Kaiser & Hogness, 1960)

Zur Bestimmung von DNA-Konzentration wurden das „BioPhotometer“ von Eppendorf und das „NanoDrop 1000 Spectrophotometer“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Eine Extinktion von 1 bei 260nm und 1cm Küvettentiefe entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde aus dem Absorptionsmaximum bei 260nm für DNA und 280nm für Proteine ermittelt. Die für die Experimente verwendete DNA hatte einen Quotienten OD_{260/280} von über 1,8.

D.1.5. Bisulfit-Konversion genomischer DNA

(Frommer *u. a.*, 1992; Clark *u. a.*, 1994)

Die Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des „EpiTect Bisulfite Kit“ der Firma Qiagen. Dazu wurden 500ng oder 2µg DNA in einem Volumen von 20µl mit H₂ORNase-frei gemischt und wie in Tabelle 7 beschrieben eingesetzt. Nach der 5 h langen Konversionsreaktion in der PCR-Maschine wurde die einzelsträngige DNA ohne die Verwendung von Carrier-RNA auf eine Säule gebunden, gewaschen, desulfoniert, nochmals gewaschen, in 40µl Elutionspuffer eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

Reaktionsansatz		Programm	
Volumen	Komponente		
		99°C	5 min Denaturierung
		60°C	25 min Inkubation
		99°C	5 min Denaturierung
20µl	DNA-Lösung (500ng oder 2µg)	60°C	85 min Inkubation
85µl	Bisulfit Mix	99°C	5 min Denaturierung
35µl	Konversions-Puffer	60°C	175 min Inkubation
140µl	Gesamtvolumen	20°C	∞ Halten

Tabelle 7: Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm der Bisulfit-Konversion.

Für einige Kontrollreaktionen wurde die Bisulfit-Konversion genomischer DNA wie bereits beschrieben durchgeführt (Hochstein *u. a.*, 2007). Dazu wurden 2µg genomische DNA durch NaOH-Zugabe und Hitze vollständig denaturiert. Die denaturierte DNA wurde in einer Sauerstoff- und Licht-empfindlichen Reaktion mit einer Natriumbisulfit-Hydrochinon-Lösung gemischt und 17

h lang im Dunkeln bei 50°C inkubiert. Die Bisulfit-behandelte einzelsträngige DNA wurde in Microcon YM-100 Säulen alkalisch desulfoniert, gereinigt und konzentriert (Boyd & Zon, 2004).

D.1.6. PCR (Polymerase-Kettenreaktion) Bisulfit-behandelter DNA

(Saiki *u. a.*, 1985)

Gradienten-PCR

Um eine erhöhte Spezifität und Ausbeute für die zu untersuchenden PCR-Fragmente zu erreichen, wurden die für die DNA-Methylierungsmusteranalyse vorhergesehenen DNA-Regionen durch verschachtelte PCRs (engl. nested PCRs) amplifiziert. Für jedes PCR-Fragment wurden zwei Primerpaare verwendet, wobei das zweite Primerpaar im Amplikon des ersten Primerpaares lag. Die Sequenzen der verwendeten Primer zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA befinden sich in der Tabelle 2 auf den Seiten 32-35. Die für die Bisulfit-Sequenzierung verwendeten Primer wurden so entworfen, dass ausschließlich Bisulfit-behandelte DNA gebunden werden konnte. Während der PCR erfolgte die Amplifikation dann entweder für den oberen oder unteren Strang der DNA, da die Bisulfit-Konversion der genomischen DNA nach Denaturierung Einzelstrang-spezifisch verläuft und im Anschluss beide Stränge der DNA nicht mehr komplementär zueinander sind. Die optimale Temperatur zur Anlagerung an die DNA wurde für jedes Set aus äußerem und innerem Primerpaar mittels Gradienten-PCR ermittelt. Dazu wurden die beiden Gradienten 50±10°C und 60±10°C verwendet, wobei jeder senkrechten Reihe in der PCR-Maschine eine spezifische Temperatur vom Thermozykler zugeordnet wurde (Tabelle 8). Die verschachtelte PCR (mit dem inneren Primerpaar) wurde unter denselben Bedingungen mit 1/10 (2,5µl) des Reaktionsvolumens der ersten PCR (mit dem äußeren Primerpaar) durchgeführt.

50±10°C Gradient				60±10°C Gradient			
Position	Temperatur	Position	Temperatur	Position	Temperatur	Position	Temperatur
1	40,3°C	7	51,7°C	1	50,0°C	7	61,5°C
2	40,8°C	8	54,3°C	2	50,5°C	8	64,1°C
3	42,1°C	9	56,7°C	3	51,8°C	9	66,5°C
4	44,0°C	10	58,5°C	4	53,8°C	10	68,3°C
5	46,4°C	11	59,7°C	5	56,1°C	11	69,5°C
6	49,0°C	12	60,1°C	6	58,8°C	12	69,8°C

Tabelle 8: Temperaturverteilung im Thermozykler der Gradienten 50±10°C und 60±10°C.

Analytische PCR

Die *Taq* (*Thermus aquaticus*) Polymerase wurde zum Amplifizieren der DNA verwendet. In einem Gesamtvolumen von 25µl wurden 2µl Bisulfit-behandelte einzelsträngige DNA eingesetzt (Tabelle 9). Die Umwandlung einzelsträngiger genomischer DNA mittels Bisulfit führt zu einer Reduktion des Cytosin-Gehaltes, da nicht-methylierte Cytosine in und außerhalb von CpG-Folgen als Uracile vorliegen. Diese Uracile werden dann während der PCR-Amplifikation durch Thymin ersetzt.

D. Methoden

Reaktionsansatz			Programm		
Volumen	Ausgangskonz.	Endkonz.			
2,5µl	10x PCR-Puffer	1x			
2µl	25mM MgCl ₂	2mM			
0,5µl	10mM dNTP	200µM	95°C	5 min	Initiale Denaturierung
0,4µl	5U/µl <i>Taq</i> Polymerase	0,08U/µl	95°C	1 min	Denaturierung
2µl	Bisulfit-behandelte DNA		°C	2 min	Anlagerung
12,6µl	H ₂ O _{Ampuwa}		72°C	2 min	Elongation
2,5µl	2µM Primer vorwärts	0,2µM		40x	Zyklen
2,5µl	2µM Primer rückwärts	0,2µM	72°C	7 min	Finale Elongation
25µl	Gesamtvolumen		4°C	∞	Halten

Tabelle 9: Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Amplifizieren Bisulfit-behandelter DNA.

Präparative PCR

Zur Vergrößerung der Ausbeute wurde für jedes PCR-Fragment die verschachtelte PCR nochmals in Form einer präparativen PCR mit 150µl Gesamtvolumen durchgeführt. Unter denselben Bedingungen wie bei der analytischen PCR, wurde 1/10 (15µl) des Reaktionsvolumens der ersten PCR verwendet.

D.1.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Fragmente wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1,3% Agarosegel (w/v) durch Anlegen eines elektrischen Feldes bei 400mA und 90V, 30 min lang aufgetrennt. Zur Elektrophorese wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Um die Fragmentgrößen bestimmen zu können, wurden parallel dazu 3µl des DNA-Größenmarkers „GeneRuler DNA Ladder Mix“ von Fermentas aufgetragen. Zur Visualisierung wurde das Gel nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt und unter kurzzeitigem UV-Licht analysiert.

D.1.8. Gelextraktion der PCR-Fragmente

Die Extraktion und Reinigung der PCR-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit dem „MinElute Gel Extraction Kit“ von Qiagen durchgeführt. Die Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten, und die Agarose in einer Lösung chaotropischer Salze mit Hilfe von Hitze aufgelöst. Die Reinigung erfolgte anschließend über eine Säule. Die DNA wurde dabei an eine Glasfaser-Membran gebunden. Kontaminationen wie Salze, Agarose und Proteine wurden weg gewaschen. Die gereinigten PCR-Fragmente wurden in Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

D.1.9. Klonierung

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α

(Inoue *u. a.*, 1990), modifiziert

Es wurden 100 μ l kompetente *E. coli* DH5 α mit 400ml SOB-Medium in einen 1000ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Bakteriensuspension wurde in einem Bakterien-Inkubationsschüttler bei 200x rpm und 18°C, ca. 48 h lang geschüttelt und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 geerntet. Die Kultur wurde auf 50ml Rotkappröhrchen aufgeteilt und in einem Eis-Ethanolbad 10 min lang gekühlt. Anschließend wurden die Bakterien bei 2500x g und 0°C, 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in insgesamt 50ml Inoue-Transformationspuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2500x g und 0°C, 5 min lang, wurde der Überstand vollständig entfernt und das Bakteriensediment in 5ml Inoue-Transformationspuffer mit 375 μ l DMSO resuspendiert. Die kompetenten *E. coli* DH5 α wurden zu je 100 μ l Portionen in einem Eis-Ethanolbad vorgekühlt und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz der chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α wurde ermittelt durch Transformation von 10pg pcDNA3.1(+) Plasmid-DNA. Der berechnete Wert sollte $\sim 1 \times 10^7$ pro μ g DNA ergeben (Abbildung 8).

$$\frac{\text{Transformationseffizienz}}{\mu\text{g}} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times 10^6 \text{pg}}{\text{Menge der transformierten DNA [pg]}} \times \frac{\text{Volumen}^{\text{transformiert}}}{\text{Volumen}^{\text{ausplattiert}}}$$

Abbildung 8: Berechnung der Transformationseffizienz.

Ligation der PCR-Fragmente in den Vektor pJET1/blunt

Die gereinigten PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des „GeneJET PCR Cloning Kit“ von Fermentas in den Vektor pJET1/blunt (Plasmidkarte als Anhang auf der Seite 105) ligiert. Das *Sticky-End* Protokoll (Tabelle 10) wurde verwendet, da die *Taq* Polymerase 3'-Adenin-Überhänge generiert. Während der ersten Inkubation bei 70°C, 5 min lang werden diese 3'-Adenin-Überhänge vom DNA *Blunting* Enzym entfernt. Die anschließende Ligation der *blunt-end* PCR-Fragmente in den bereits linearisierten und *blunt-end* vorliegenden Vektor pJET1/blunt erfolgte bei RT, 30 min lang. In dieser Inkubationszeit wurde bereits mit der, im folgenden Abschnitt beschriebenen, Vorbereitung der chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α für die Transformation begonnen.

<i>Blunting</i> Reaktion	
Volumen	Komponente
10 μ l	2x Ligations-Puffer
2 μ l	PCR-Fragment
5 μ l	H ₂ O _{Nuklease-frei}
1 μ l	DNA <i>Blunting</i> Enzym
18 μ l	Gesamtvolumen

Ligationsreaktion	
Volumen	Komponente
1µl	Vektor pJET1/ <i>blunt</i>
1µl	<i>T4</i> DNA-Ligase
20µl	Gesamtvolumen

Tabelle 10: *Sticky-End* Protokoll.

Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α

(Inoue *u. a.*, 1990), modifiziert

Zu 100µl frisch aufgetauten chemisch kompetenten *E. coli* DH5α wurden 2µl 100mM EDTA-Na₂ zugegeben und 5 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 2µl 1,22M β-ME (25mM Endkonzentration) und 2,25M DTT (44mM Endkonzentration) zugegeben und 10 min lang auf Eis inkubiert. In der Zeit wurde die DNA vorbereitet. Dazu wurden 1,5µl Ligationsansatz und je 2µl 0,5M CaCl₂ und 0,5M MgCl₂ gemischt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien in vorgekühlte Polypropylen-Röhrchen (-20°C) überführt, die DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation 30 min lang auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C, 1 min lang. Nach erneuter Inkubation 5 min lang auf Eis, wurden 950µl vorgewärmtes NZY⁺-Medium (42°C) zu den Bakterien gegeben. Die Regenerationsphase erfolgte 1 h lang bei 37°C im Wasserbad. Die Bakterien wurden anschließend bei 4000x rpm (Rotina 38 R) und 37°C, 5 min lang sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Bakteriensediment in 200µl NZY⁺-Medium (42°C) resuspendiert. Der komplette Ansatz wurde auf vorgewärmte LM-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin (37°C) ausplattiert und über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert. Während der Wachstumsphase der Bakterien wurde negativ gegen Bakterienzellen ohne das aufgenommene Plasmid pJET1/*blunt* mit dem β-Lactamase Gen selektioniert, welches für die Resistenz gegen Ampicillin kodiert. Eine positive Selektion für Bakterienzellen mit rekombinantem Plasmid wurde erreicht durch Ligation der PCR-Fragmente in den Vektor pJET1/*blunt* und die damit verbundene Zerstörung des Gens für die Restriktionsendonuklease *Eco47I*, die für alle *E. coli* Stämme letal ist.

D.1.10. Plasmid-DNA Minipräparation

Bakterienklone wurden mit autoklavierten Zahnstochern von LM-Agarplatten abgehoben und in 15ml Rotkappröhrchen mit 3ml LB-Medium (50µg/ml Ampicillin) überführt. Die angeimpften Kulturen wurden im Bakterien-Inkubationsschüttler bei 300x rpm und 37°C, über Nacht geschüttelt. Die Zellen in der Übernachtskultur wurden bei 13000x rpm (5415 R) und RT, 1 min lang sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus dem Bakteriensediment nach Angaben des Herstellers mit dem „QuickLyse Miniprep Kit“ von Qiagen isoliert. Die Bakterienzellen wurden lysiert und auf eine Säule gegeben. Die Plasmid-DNA wurde dabei an eine Membran gebunden. Nach einem Waschschrift mit einer Isopropanol-haltigen Lösung wurde die Plasmid-DNA in H₂O_{Ampuwa} eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

D.1.11. Analytische Restriktionsspaltung

Die isolierte und gereinigte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse auf positive Klone untersucht. Die Plasmid-DNA wurde entweder mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* (5'-TCTAGA-3') und *NheI* (5'-GCTAGC-3') oder mit der Restriktionsendonuklease *AluI* (5'-AGCT-3') geschnitten (Tabelle 11). Die Positionen der Schnittstellen im Vektor pJET1/*blunt* sind in der Abbildung 33 auf Seite 103 im Anhang dargestellt. Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C, 1,5 h lang im Wasserbad inkubiert, anschließend mit 2µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1,3% Agarosegel (w/v) aufgetragen. Die Restriktionsfragmente wurden bei 400mA und 90V, 30 min lang aufgetrennt.

Restriktionsansatz		Restriktionsansatz	
Volumen	Komponente	Volumen	Komponente
2µl	Plasmid-DNA	2µl	Plasmid-DNA
1µl	10x Puffer Tango Gelb	1µl	10x Puffer Tango Gelb
0,2µl	<i>NheI</i>	0,2µl	<i>AluI</i>
0,2µl	<i>XbaI</i>		
6,6µl	H ₂ O _{Ampuwa}	6,8µl	H ₂ O _{Ampuwa}
10µl	Gesamtvolumen	10µl	Gesamtvolumen

Tabelle 11: Analytische Restriktionsspaltung mit *XbaI* und *NheI* oder *AluI*.

D.1.12. Sequenzierung

Alle positiven Plasmide mit einem integrierten PCR-Fragment wurden nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *u. a.*, 1977) mit Fluorochrom-markierten ddNTPs mit dem „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing“ Kit von Applied Biosystems sequenziert. Die Reaktion verlief in der PCR-Maschine mit BigDye v3.1 Mix (Tabelle 12). Die pJET1/*blunt* klonierten PCR-Fragmente wurden entweder mit dem Primer pJET1 vorwärts oder pJET1 rückwärts (Tabelle 3 auf Seite 35) sequenziert. Die Proben wurden zentral durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Erlangen gereinigt und die Sequenzen im „AbiPrism 3730 DNA Analyser“ von Applied Biosystems generiert.

Sequenzierreaktion			Programm	
Volumen	Ausgangskonz.	Endkonz.	Temperatur	Zeit
2µl	Plasmid-DNA		96°C	3 min
1µl	5x Sequenzier-Puffer	0,5x	96°C	10 s
0,5µl	10µM Primer	0,5µM	50°C	15 s
2µl	2,5x BigDye v3.1 Mix	0,5x	60°C	4 min
4,5µl	H ₂ O _{Ampuwa}			25x Zyklen
10µl	Gesamtvolumen		60°C	5 min
			4°C	∞ Halten

Tabelle 12: Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Sequenzieren der pJET1/*blunt* klonierten PCR-Fragmente.

D.1.13. Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm „Vector NTI Advance 9“ von Invitrogen ausgewertet. Die Bisulfit-Konversion wandelte alle Cytosin-Reste in Uracil-Reste um, die während der PCR durch Thymin-Reste ersetzt wurden. Hingegen blieben alle 5-Methylcytosine für diese Konvertierungsreaktion unempfindlich. Alle übriggebliebenen Cytosine in der Sequenz wiesen auf 5-Methylcytosin hin, denn alle nicht-methylierten Cytosine in und außerhalb von CpG-Folgen wurden zu Thymin umgewandelt und sind bei der Auswertung nicht mehr zu erkennen. Zum Erstellen von DNA-Methylierungsmustern wurden nur die klonierten und sequenzierten DNA-Moleküle verwendet, bei denen über 95% aller Cytosine außerhalb der CpG-Folgen zu Thymin umgewandelt wurden, verglichen mit den DNA-Fragmenten vor der Bisulfit-Konversion.

D.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

D.2.1. Präparation von Kernextrakten aus HCT-116 Zellen

HCT-116 Zellen wurden in 75cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Die Herstellung der Kernextrakte erfolgte bei 4°C. Zur Isolierung der Kerne wurden die mit kaltem PBS gewaschenen Zellen in EMSA Hypotonischem Puffer resuspendiert. Das Anschwellen der Zellen erfolgte während der 10 min langen Inkubation auf Eis. Das Aufbrechen der Zellmembran erfolgte mechanisch über Scherkräfte in einem 5ml Dounce-Homogenisator durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen eines Typ B Stößels aus Glas. Die Lyse der Zellen sollte bei 80-90% liegen, und wurde mittels einer Trypanblau-Färbung unter dem Mikroskop überprüft, wobei Zellen mit einer intakten Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Die Zellkerne wurden bei 2820x g und 4°C, 15 min lang gesammelt und in EMSA Puffer mit wenig Salz resuspendiert. Anschließend erfolgte bei gleichzeitigem und vorsichtigem Schütteln eine tropfenweise Zugabe von EMSA Puffer mit viel Salz bis zu einer Endkonzentration von 260mM Kaliumchlorid. Die Extraktion der Kerne erfolgte 1 h lang auf Eis. Die Kernextrakte wurden nach dem Sedimentieren der Kerne, durch eine Zentrifugation bei 2820x g und 4°C, 30 min lang, abgenommen. Zum Entfernen der Salze wurden die Kernextrakte in einem, vorher in TE-Puffer aufgekochtem und bei 4°C gelagerten, Dialysierschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 12000 bis 14000 Dalton überführt und gegen EMSA Dialysierpuffer über Tag und nach Pufferwechsel über Nacht bei 4°C ausgetauscht. Die extrahierten Kerne wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2820x g und 4°C, 30 min lang sedimentiert, der Überstand (Kernextrakt) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

D.2.2. Photometrische Bestimmung von Protein-Konzentrationen

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen ab 200ng erfolgte mit Roti-Nanoquant und beruht auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Die Proben wurden mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 gemischt, dessen Adsorptionsmaximum bei 595nm liegt und sich bei Komplexbildung mit Proteinen auf 450nm verschiebt. Die optische Dichte OD wurde bei 595nm und 450nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät photometrisch bestimmt. Aus dem Quotienten $OD_{595/450}$ konnte dann die Protein-Konzentration anhand einer BSA-Kalibriergeraden ermittelt werden.

D.2.3. Herstellen der DNA-Probe für EMSA

Die optimale Anlagerungs-Temperatur des verwendeten Primerpaares zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA (Tabelle 4 auf der Seite 35) wurde durch Gradienten-PCR ermittelt. Zum Herstellen des 630 bp DNA-Fragmentes wurde eine PCR unter den in Tabelle 13 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

D. Methoden

Reaktionsansatz			Programm		
Volumen	Ausgangskonz.	Endkonz.			
5µl	10x PCR-Puffer	1x			
3µl	25mM MgCl ₂	1,5mM			
1µl	10mM dNTP	200µM	95°C	5 min	Initiale Denaturierung
0,5µl	5U/µl <i>Taq</i> Polymerase	0,05U/µl	95°C	1 min	Denaturierung
1,66µl	604ng/µl HCT-116 DNA	1µg	61,5°C	30 s	Anlagerung
28,84µl	H ₂ O _{Ampuwa}		72°C	1 min	Elongation
5µl	2µM EMSA vorwärts	0,2µM		35x	Zyklen
5µl	2µM EMSA rückwärts	0,2µM	72°C	7 min	Finale Elongation
50µl	Gesamtvolumen		4°C	∞	Halten

Tabelle 13: Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Amplifizieren der DNA-Probe für EMSA.

Eine präparative PCR mit einem Gesamtvolumen von 150µl wurde durchgeführt, um eine größere Menge des PCR-Fragmentes herzustellen.

Nach der PCR-Amplifikation wurden 2µl des nicht-aufgereinigten PCR-Ansatzes direkt in den Vektor pJET1/*blunt* ligiert und anschließend in *E. coli* DH5α transformiert. Die mit Bakterienklonen angeimpften Übernachtskulturen wurden durch Plasmid-DNA Präparation und Restriktionsanalyse auf positive Klone untersucht. Auf diese Weise wurde die EMSA DNA-Probe für die *in vitro* *SssI*-Methylierung vermehrt.

Der restliche PCR-Ansatz wurde auf ein 1,3% Agaroesgel (w/v) aufgetragen und das PCR-Fragment für die EMSA DNA-Probe über Gelextraktion gereinigt.

D.2.4. Plasmid-DNA Maxipräparation

Um eine größere Menge Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine Plasmid-DNA Maxipräparation durchgeführt. Von einer positiven Übernachtskultur mit Bakterien, die das rekombinante Plasmid pJET1-EMSA trugen, wurden 200µl in 200ml LB-Medium (50µg/ml Ampicillin) überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 220x rpm im Bakterien-Inkubationsschüttler wurde die Plasmid-DNA mit dem „PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit“ nach Angaben des Herstellers Invitrogen isoliert.

D.2.5. Restriktionsspaltung des Plasmids pJET1-EMSA mit *XbaI* und *XhoI*

Die beiden Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *XhoI* schneiden das rekombinante Plasmid pJET1-EMSA jeweils nur einmal (Plasmidkarte als Anhang auf Seite 106) und wurden dazu verwendet, die EMSA DNA-Probe wieder aus dem Plasmid herauszuschneiden (Tabelle 14). Eine CpG-Methylierung der Erkennungssequenz für das Enzym *XhoI* würde die Restriktionsspaltung beeinträchtigen, deshalb wurde das Plasmid pJET1-EMSA zuerst über Nacht bei 37°C geschnitten und dann *in vitro* methyliert.

Restriktionsansatz	
Volumen	Komponente
30µg	Plasmid pJET1-EMSA
20µl	10x Puffer NEB2
8µl	<i>XbaI</i>
8µl	<i>XhoI</i>
2µl	100x BSA (10mg/ml)
Rest	H ₂ O _{Ampuwa}
200µl	Gesamtvolumen

Tabelle 14: Restriktionsspaltung des Plasmids pJET1-EMSA mit *XbaI* und *XhoI*.

D.2.6. *in vitro* Methylierung der pJET1-EMSA *XbaI-XhoI*-Fragmente

Das mit *XbaI-XhoI* geschnittene Plasmid pJET1-EMSA wurde anschließend durch die *SssI*-Methylase an den CpG-Dinukleotiden methyliert. Als Methyl-Gruppen Donor diente S-Adenosyl-Methionin (SAM). Der Methylierungsansatz wurde 7,5 h lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 4 h wurden nochmals 4µl SAM (32mM) zugegeben. Nach Inkubationsende wurde die *SssI*-Methylase bei 65°C, 20 min lang inaktiviert.

Methylierungsansatz	
Volumen	Komponente
200µl	Restriktionsansatz
4µl	SAM (32mM)
10µl	<i>SssI</i> -Methylase
2µl	10x Puffer NEB2
4µl	H ₂ O _{Ampuwa}
220µl	Gesamtvolumen

Tabelle 15: *in vitro* Methylierung der pJET1-EMSA *XbaI-XhoI*-Fragmente.

Für die analytische Restriktionsspaltung mit *HpaII* und *MspI* wurden 20µl des Methylierungsansatzes abgenommen. Die DNA-Fragmente in dem restlichen Volumen wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1,3% Agarosegel (w/v) aufgetrennt. Die Bande mit der Länge 655 bp wurde aus der Agarose herausgeschnitten und gereinigt.

D.2.7. Restriktionsspaltung der pJET1-EMSA *XbaI-XhoI*-Fragmente mit *HpaII* oder *MspI*

Zur Überprüfung der Methylierung des Plasmids pJET1-EMSA (Plasmidkarte als Anhang auf Seite 106) ist eine analytische Restriktionsspaltung bei 37°C, 2,5 h lang mit den isochizomeren Restriktionsenzymen *HpaII* und *MspI* durchgeführt wurden. Trotz gleicher Erkennungssequenz 5'-CCGG-3' wird das Methylierungs-sensitive *HpaII* durch eine CpG-Methylierung geblockt, wohingegen *MspI* die Sequenz unabhängig von der CpG-Methylierung schneidet.

Restriktionsansatz	
Volumen	Komponente
1µl	Methylierungsansatz
1µl	10x Puffer Tango Gelb
0,5µl	<i>HpaII</i> oder <i>MspI</i>
7,5µl	H ₂ O _{Ampuwa}
10µl	Gesamtvolumen

Tabelle 16: Restriktionsspaltung der pJET1-EMSA *XbaI-XhoI*-Fragmente mit *HpaII* oder *MspI*.

D.2.8. Restriktionsspaltung des Plasmids pcDNA3.1(+) mit *DraI* und *RsaI*

Zum Herstellen eines Kompetitors, der die Ausbildung nicht-spezifischer DNA-Protein-Komplexe hemmt, wurden das Plasmid pcDNA3.1(+) (Plasmidkarte als Anhang auf Seite 105) mit den Restriktionsendonukleasen *DraI* und *RsaI* über Nacht bei 37°C geschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden in einem 1,3% Agarosegel (w/v) nach Zugabe von 6x DNA-Ladepuffer aufgetrennt. Die 595 bp Fragment-Bande, mit einem Teil des β -Laktamase (*bla*) Gens, wurde aus der Agarose herausgeschnitten und über Gelextraktion gereinigt.

Restriktionsansatz	
Volumen	Komponente
15µg	Plasmid pcDNA3.1(+)
20µl	10x Puffer Tango Gelb
1,5µl	<i>DraI</i>
4µl	<i>RsaI</i>
Rest	H ₂ O _{Ampuwa}
200µl	Gesamtvolumen

Tabelle 17: Restriktionsspaltung des Plasmid pcDNA3.1(+) mit *DraI* und *RsaI*.

D.2.9. Markierung der DNA-Fragmente

Für die DNA-Protein-Bindungsreaktionen wurden 3,85pmol (Abbildung 9) der nicht-methylierten oder der *in vitro* prämethylierten DNA-Fragmente pro 20µl Gesamtvolumen mit Hilfe des „DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation“ nach Anleitung des Herstellers Roche Diagnostics mit Digoxigenin (DIG) markiert. Zur Verbesserung der Markierungsreaktion wurde der zweifache Reaktionsansatz angesetzt und bei 37°C, 1 h lang inkubiert. Die Terminale Transferase katalysierte mit Hilfe von Kobalt-Ionen (Co²⁺) die Anheftung von DIG-ddUMP an die 3'-Hydroxy-Gruppe der DNA-Fragmente unter der Abspaltung von Pyrophosphat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4µl 0,2M EDTA, pH8,0 gestoppt, anschließend wurden 6µl H₂O_{Ampuwa} hinzugefügt. Das entstandene Gesamtvolumen von 50µl enthielt eine Endkonzentration von 0,155pmol/µl der DNA-Fragmente. Die markierten DNA-Fragmente wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

$$\text{ng doppelsträngige DNA} = \text{pmol} \times 0,66 \times N \quad (N = \text{Länge des doppelsträngigen Fragmentes})$$

Abbildung 9: Umrechnung von pmol in ng.

Markierungsreaktion		
Volumen	Ausgangskonz.	Endkonz.
X μ l	DNA-Fragmente	7,7pmol
Rest	H ₂ O _{Ampuwa}	
8 μ l	5x Markierungs-Puffer	1x
8 μ l	25mM CoCl ₂ -Lösung	5mM
2 μ l	1mM DIG-ddUTP-Lösung	0,05mM
2 μ l	400U/ μ l Terminale Transferase	20U/ μ l
40 μ l	Gesamtvolumen	

Tabelle 18: Markierung der DNA-Fragmente mit Digoxigenin.

D.2.10. Bestimmung der Markierungseffizienz der DNA-Fragmente

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurden Verdünnungsreihen der DIG-markierten DNA-Fragmente in TEN-Puffer, pH8,0 hergestellt und diese für einen Dot-Blot tropfenweise auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des „DIG Wash and Block Buffer Set“ von Roche Diagnostics. Die Methode beruht auf einer Bindung des mit der Alkalischen Phosphatase konjugierten Antikörpers Anti-Digoxigenin (Anti-Digoxigenin-AP) und der anschließenden Umsetzung des Substrates CSPD durch die Alkalische Phosphatase. Die Auswertung in der CCD-Kamera sollte eine Nachweisgrenze von 4pg ergeben.

D.2.11. DNA-Protein-Bindungsreaktion

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) oder *Band Shift Assay* wird zur Charakterisierung von DNA-Protein-Bindungsreaktionen eingesetzt und beruht auf dem Prinzip, dass die Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld in nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen durch die Bindung von Proteinen verlangsamt wird (Revzin, 1989). Die Durchführung des EMSA erfolgte mit Hilfe des „DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation“ des Herstellers Roche Diagnostics. In einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurden 1x Bindungspuffer, 1 μ g poly [d(I-C)], 0,1 μ g poly L-Lysin, 0,2ng DIG-markierte DNA-Fragment mit 2,64 μ g Protein aus Kernextrakt gemischt und 15 min lang bei 37°C inkubiert. Die Spezifität der entstandenen DNA-Protein-Komplexe wurde in verschiedenen Experimenten der kompetitiven Hemmung überprüft, indem nicht-markierte DNA-Fragmente in mehr als 2000fachem Überschuss zugegeben wurden. Die Reaktionsprodukte wurden mit 5 μ l 5x TBE-Probenpuffer versetzt und in nicht-denaturierenden „Novex DNA Retardation Gels“ mit 6% Polyacrylamid der Firma Invitrogen analysiert. Die Fragmente wurden durch Elektrophorese 3 h lang bei 80 V und 10 mA in 0,5x TBE-Puffer getrennt. Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte durch Elektrotransfer in einer halbtrockenen Blotting Kammer mit je zwei Lagen in 0,5x TBE-Puffer präinkubierten Filterpapiers unten und oben 1 h lang bei 30 V und 150 mA auf eine positiv

geladene Nylonmembran mit 0,5x TBE-Puffer übertragen. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente durch 30 min langes Erhitzen der Membran bei 120°C fixiert, und die Membran zwischen Filterpapier über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Waschen wurde die Membran 30 min lang in Blockierungspuffer und dann 30 min lang in verdünnter Anti-Digoxigenin-AP-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran 5 min lang in Detektionspuffer equilibriert. Die Membran wurde nach Zugabe einer 0,1mg/ml CSPD-Lösung, in Frischhaltefolie verpackt und 5 min lang bei RT inkubiert. Zur Verstärkung der Chemilumineszenz-Reaktion wurde die Membran bei 37°C, 10 min lang inkubiert und anschließend in der CCD-Kamera 3 min lang belichtet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm AIDA 3.1.

D.3. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Proteine können kovalent an die DNA gebunden werden. Nach Fragmentierung des Chromatins über Scherkräfte oder Nukleasen, können dann DNA-Protein-Interaktionen durch die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) ermittelt werden. Die von den Proteinen gebundenen DNA-Abschnitte können mit Hilfe spezifischer Antikörper, gegen die gesuchten Proteine, durch Präzipitation angereichert und anschließend in der PCR bestimmt werden. Häufig wird ChIP zur Charakterisierung posttranslationaler Histon-Modifikationen oder Transkriptionsfaktor-Bindung genomweit oder für eine bestimmte Region verwendet. Zur bisherigen Analyse von Histon-Modifikationen wurde mit einigen Änderungen das „EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation Kit“ von Epigentek verwendet.

D.3.1. Vernetzung der DNA mit den Histonen

Bei einer Konfluenz der HCT-116 Zellen von 90-95% wurden die Proteine durch Zugabe von 278µl 37% Formaldehyd zu 10ml Zellkulturmedium (1% Endkonzentration) und einer Inkubation bei 37°C, 10 min lang mit der DNA vernetzt (engl.: cross-linking). Nach gründlichem Waschen mit eiskaltem PBS_o, wurden die Zellen in eiskaltem MNase-Puffer bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. In zwei 50ml Rotkappröhrchen wurden dann je 6ml Zellsuspension (6×10^6 Zellen) gegeben.

D.3.2. Permeabilisierung und Mikrokokken-Nuklease-Behandlung

Die Zellen wurden durch Zugabe von 316µl 5mg/ml Lysolecithin zu je 6ml Zellsuspension (250µg/ml Endkonzentration) permeabilisiert. Das Chromatin ist dann durch Zugabe von 100U/ml MNase (Mikrokokken-Nuklease) und Inkubation bei 37°C, 10 min lang zu Mononukleosomen gespalten wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl 0,5M EDTA-Na₂, pH8,0 zu je 1ml Ansatz gestoppt.

D.3.3. Lysieren der Zellen

Die Zellen wurden anschließend bei 700x g und 4°C, 10 min lang sedimentiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellsediment in 1,2ml Prälysispuffer (200µl für 1×10^6 adhärenente Zellen) aufgenommen, in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min lang auf Eis inkubiert. Vor der Zentrifugation der Zellen bei 5000x rpm (5415 R) und 4°C, 5 min lang, wurde das Sediment 10 s lang resuspendiert (Vortex). Das Zellsediment wurde danach in 600µl Lysispuffer mit Protease Inhibitor Cocktail (100µl für 1×10^6 adhärenente Zellen) resuspendiert und die Zellen auf Eis, 10 min lang lysiert. Die weitere Lyse der Zellen und Zellkerne erfolgte durch Ultraschall-Behandlung im Branson Sonifier 450. Die Proben wurden bei 80% Leistung und 5 Micro Tip Limit, 6x 20 s lang und zwischenzeitlich mit einer je 30 s langen Pause auf Eis, aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (5415 R) und 4°C, 15 min lang wurden die sonifizierten

Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand in ein 2ml Reaktionsgefäß vereinigt. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde der Überstand bei -80°C gelagert.

D.3.4. Antikörper-Bindung

Für die Analyse von Histon-Modifikationen wurden die Antikörper Anti-acetyl-Histon H3, Anti-acetyl-Histon H4, Anti-trimethyl-Histon H3 Lysin 9 und Anti-trimethyl-Histon H4 Lysin 20 von Millipore verwendet. Wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, wurden die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens gewaschen, und danach die Antikörper mit Bindungspuffer bei RT, 90 min lang inkubiert. Die Antikörper wurden dadurch an den Boden der Vertiefungen des Mikrotiterstreifens gebunden.

D.3.5. Immunpräzipitation

Nach dem Entfernen der Antikörper-Lösung und intensivem Waschen wurde der Überstand 1:1 verdünnt. Als Ausgangsproben (Input), mit der Gesamtmenge an isoliertem Chromatin, wurden 2x 5 μl Aliquote entnommen. Anschließend wurde die Chromatinmenge aus 0,5x10⁶ Zellen pro Vertiefung des Mikrotiterstreifens pipettiert und zur Immunpräzipitation bei RT, 90 min lang bei 500x rpm auf dem Thermomixer 5436 geschüttelt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens intensiv gewaschen.

D.3.6. Revertierung der DNA-Protein-Vernetzung und DNA-Reinigung

Durch Zugabe von 0,4 μl 10mg/ml Proteinase K zu 40 μl Revertierungspuffer pro Ansatz und Inkubation bei 65°C , 15 und 90 min lang wurde die Bindung der Proteine an die DNA aufgehoben. Die Reinigung der DNA erfolgte nach Anleitung des „EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation Kit“ von Epigentek über die Bindung der DNA an eine Säule. Nach Waschschritten mit 70% bzw. 90% Ethanol und Zentrifugation 1 min lang bei 12000x rpm (5415 R) und RT wurde die gereinigte DNA von der Säule eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

D.3.7. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mit der qPCR-Methode wurde die Menge an Antikörper-präzipitiertem Chromatin bestimmt. Zur Detektion der amplifizierten DNA wurde der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in doppelsträngige DNA genutzt. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem PCR-Zyklus bestimmt. Verschiedene PCRs können nur in ihrer exponentiellen Phase verglichen werden. Bei einer idealen PCR wird nur in der exponentiellen Phase in jedem Zyklus die Anzahl der amplifizierten DNA-Moleküle mit einer Effizienz von 100% verdoppelt. In den frühen Phasen einer PCR liegen alle PCR-Komponenten im Überschuss vor, so dass die PCR-Produkte nicht um Primer oder dNTP kompetieren müssen, wohingegen in den späten Phasen die Effizienz der DNA-Polymerase abnimmt.

Die qPCR-Analysen wurden mit dem „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG“ Mastermix

von Invitrogen in einem „AbiPrism 7500 Real Time PCR System“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dazu wurden 2µl präzipitierte oder Input DNA für eine qPCR eingesetzt (Tabelle 19). Die Spezifität des SYBR-Green-Einbaus in das gesuchte qPCR-Amplikon wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse nach jedem Zyklus, die Analyse der Amplikongröße im Agarosegel und Negativkontrollen mit Wasser überprüft.

Reaktionsansatz			Programm	
Volumen	Ausgangskonz.	Endkonz.		
12,5µl	2x Mastermix	1x	50°C	2 min UDG Inkubation
	MgCl ₂ (im Mastermix)	3mM	95°C	2 min Initiale Denaturierung
0,05µl	25µM ROX Referenzfarbstoff	50nM	95°C	15 s Denaturierung
0,5µl	10µM Primer vorwärts	0,2µM	60°C	30 s Anlagerung/Elongation
0,5µl	10µM Primer rückwärts	0,2µM		40x Zyklen
2µl	DNA		95°C	15 s
9,45µl	H ₂ O _{Ampuwa}		60°C	1 min Schmelzkurvenanalyse
25µl	Gesamtvolumen		95°C	15 s

Tabelle 19: Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm für qPCR der ChIP-Analysen.

Ausgehend von einer exponentiellen Amplifikation mit Verdopplung der PCR-Produkte innerhalb eines Zyklus der quantitativen PCR, konnte der Grad der Immunpräzipitation (IP) im Vergleich zur Gesamtmenge an eingesetztem Chromatin (Input) durch die ΔC_t -Methode berechnet und in Prozent (% Input) angegeben werden (Abbildung 10).

$$\Delta C_t [\text{normalisierte IP}] = C_t [IP] - (C_t [\text{Input}] - \text{Log}_2 \text{Verdünnungsfaktor vom Input})$$

$$\% \text{ Input} = 2^{-\Delta C_t [\text{normalisierte IP}]}$$

Abbildung 10: Berechnung des % Input für jede Immunpräzipitation. IP = Immunpräzipitation.

Die Funktionalität der ChIP-Methode wurde durch die Kontrollen des „EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation Kit“ überprüft. Als negativ Kontroll-Antikörper wurde der Isotyp Normal Maus IgG und als positiv Kontroll-Antikörper Anti-RNA-Polymerase II verwendet. Präzipitationen ohne die Zugabe eines Antikörpers wurden ebenfalls durchgeführt. Um die Effizienz und Spezifität der qPCR zu ermitteln, wurde mit Hilfe der Primer für die *GAPDH* Promotorregion die Menge an Chromatin ermittelt, welches durch Anti-RNA-Polymerase II präzipitiert wurde. Zur Kontrolle der Histon-Modifikationen wurden die Promotorregionen der Haushaltsgene *GAPDH* und *ADH5* als ein transkriptionell aktives Chromatin (Euchromatin) und die *Chr4Sata* Satellitenregion als eher kondensiertes Chromatin (Heterochromatin) amplifiziert (Alberter & Ensser, 2007). Die zur Präzipitation verwendeten Antikörper wurden auf Seite 31 angegeben. Die Tabelle 5 mit den verwendeten Primerpaaren befindet sich auf Seite 35.

D.4. Sequenzierung der *FMRI* Methylierungsgrenze und Promotorregion

Die Amplifikation der *FMRI* Methylierungsgrenze und Promotorregion, der genomischen DNA 14451 aus *FXS* peripheren weißen Blutzellen, erfolgte durch die *Phusion* Polymerase mit Korrekturlese-Einheit und einer Fehlerrate von $4,4 \times 10^{-7}$ bei Verwendung des *High-Fidelity*-Puffers (Tabelle 20). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 auf der Seite 36 aufgeführt. Die optimale Anlagerungs-Temperatur der Primerpaare wurde durch Gradienten-PCR ermittelt.

Reaktionsansatz			Programm	
Volumen	Ausgangskonz.	Endkonz.		
10µl	5x <i>High-Fidelity</i> -Puffer	1x		
	MgCl ₂ (im Puffer)	1,5mM		
1µl	10mM dNTP	200µM	98°C	30 s Initiale Denaturierung
2,5µl	10µM Primer vorwärts	0,5µM	98°C	10 s Denaturierung
2,5µl	10µM Primer rückwärts	0,5µM	°C	10 s Anlagerung
Xµl	genomische DNA	300ng	72°C	10 s Elongation
0,5µl	2U/µl <i>Phusion</i> Polymerase	0,02U/µl		35x Zyklen
Rest	H ₂ O _{Ampuwa}		72°C	7 min Finale Elongation
50µl	Gesamtvolumen		4°C	∞ Halten

Tabelle 20: Reaktionsansatz und Thermozykler-Programm zum Amplifizieren der *FMRI* 5'-upstream Region.

Im Thermozykler wurden *blunt-end* PCR-Produkte durch die *Phusion* Polymerase generiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und die PCR-Fragmente in einem 1,3% Agarosegel (w/v) aufgetrennt. Die Bande mit der zu erwartenden Länge des PCR-Fragmentes wurden wie bereits beschrieben aus der Agarose herausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Die gereinigten PCR-Fragmente wurden in den Vektor pJET1/*blunt* nach dem *Blunt-End* Protokoll ligiert (Tabelle 21).

Ligationsreaktion	
Volumen	Komponente
10µl	2x Ligations-Puffer
2µl	PCR-Fragment
1µl	pJET1/ <i>blunt</i> (50ng/µl)
1µl	<i>T4</i> DNA-Ligase
6µl	H ₂ O _{Nuklease-frei}
20µl	Gesamtvolumen

Tabelle 21: *Blunt-End* Protokoll.

Die Transformation des rekombinanten Plasmids erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* DH5a Bakterienzellen. Nach Isolierung der Plasmid-DNA durch Mini-Präparation und der analytischen Restriktionsspaltung durch die Enzyme *NheI* und *XbaI* wurden beide Stränge des rekombinanten Plasmids von fünf positiven Klonen sequenziert und auf Mutationen untersucht.

E. Ergebnisse

E.1. Charakteristische Merkmale der *FMR1* Promotor und 5'-upstream Region des Menschen

Das mit der Folat-sensitiven fragilen Stelle *FRAXA* assoziierte *FMR1* Gen liegt auf dem X-Chromosom des Menschen bei der Bande Xq27.3 (Abbildung 11 A). Das *FMR1* Gen umfasst einen Genombereich von 38 kbp mit 17 Exons (Eichler u. a., 1993). In *Antisense* Richtung zum *FMR1* Gen liegend, befindet sich zudem das *ASFMR1* Gen (Ladd u. a., 2007). Die 5'-upstream Region des *FMR1* Gens enthält zahlreiche für die Funktion relevante genetische Signale (Abbildung 11 C).

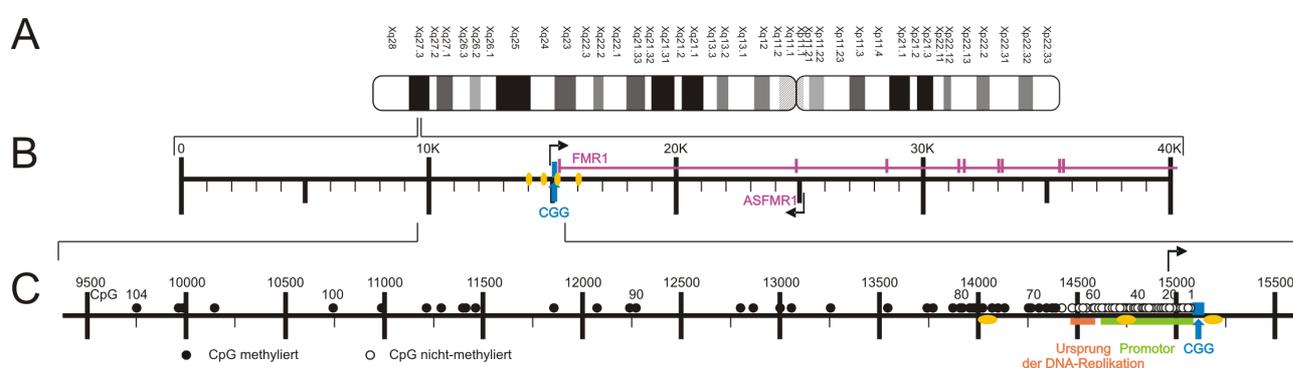


Abbildung 11: Karte mit einem Teil des *FMR1* Gens und der 5'-upstream Region des Menschen. (A) Ideogramm des X-Chromosoms und bei Xq27.3 das *FMR1* Gen des Menschen. (B) Karte mit den ersten 9 Exons (vertikale Balken) und Introns (horizontale Linie) des *FMR1* Gens und der 5'-upstream Region mit der 5'-(CGG)_n-3' Repetition. Die Startstellen der Transkription für das *FMR1* und *ASFMR1* Gen sind als Pfeile und die vier CTCF-Bindestellen als gelbe Ovale dargestellt. (C) Karte der 5'-upstream Region des *FMR1* Gens. ○ = CpG nicht-methyliert; ● = CpG methyliert. Die Grafik zeigt alle CpG-Folgen 1 bis 104 in der Region mit eingezeichneter Methylierungsgrenze. Der Promotor und Ursprung der DNA-Replikation werden ebenfalls gezeigt. Die Nummerierung der Nukleotide in der Karte erfolgte nach der von NCBI stammenden Sequenz: NC_000023:146.786.201-146.840.303 *H. sapiens FMR1* Genregion (mit den Nummern der Nukleotide für das X-Chromosom des Menschen).

1. In der 5'-NTR des ersten Exons des *FMR1* Gens befindet sich eine 5'-(CGG)_n-3' Repetition (Abbildung 11 B). Die instabile Amplifikation der 5'-(CGG)_n-3' Repetition im *FMR1* Gen kann zu drei phänotypisch verschiedenen Krankheiten („FRAXopathien“) führen (Pirozzi u. a., 2011). Die *fragile X* assoziierte vorzeitige Ovarialinsuffizienz (*FXPOI*) und das *fragile X* assoziierte Tremor/Ataxie Syndrom (*FXTAS*) sind auf eine Prämutation zurückzuführen, wohingegen beim *fragilen X* Syndrom (*FXS*) die 5'-(CGG)_n-3' Repetition meistens zur Vollmutation expandiert ist und auch nicht mehr von stabilisierenden AGG Trinukleotide unterbrochen wird (Eichler u. a., 1994).
2. Die 5'-(CGG)_n-3' Repetition wird von Bindestellen für CTCF flankiert (Ladd u. a., 2007).
3. Der *FMR1* Promotor und die Startstelle für die RNA-Transkription befinden sich kurz vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition. Bis auf die TATA-ähnliche Sequenz 5'-TTTACA-3' (Hwu u. a., 1993) enthält der Promotor keine typische TATA Box (5'-TATAAA-3'), jedoch Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP2, α -PAL/NRF1, c-myc und SP1 (Drouin u. a., 1997). Eine verstärkte *FMR1* Genexpression ist kennzeichnend für die Syndrome *FXPOI* und *FXTAS*, wohingegen beim

FXS die Ausprägung des Phänotyps, der bedingt ist auf den Verlust des FMR1 Proteins (FMRP), meistens durch die Stilllegung des *FMRI* Gens, in seltenen Fällen durch Inhibierung der Translation erklärt wird.

4. Ein Ursprung der DNA-Replikation liegt ungefähr 300 bis 450 Nukleotide vor der Startstelle der RNA-Transkription (Brylawski *u. a.*, 2007; Gray *u. a.*, 2007; Lucas *u. a.*, 2007).
5. In dem ungefähr 5500 bp langen Sequenzbereich vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition zwischen der Kartenposition 9500 und 15060 befinden sich 104 CpG-Folgen, wobei die Nummer 1 die nächste und Nummer 104 die entfernteste CpG-Folge zur 5'-(CGG)_n-3' Repetition darstellt (Abbildung 11 C). Nur wenige dieser CpG-Folgen sind Bestandteil der Erkennungssequenz für Methylierungssensitive Restriktionsenzyme.
6. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Grenze zwischen vollständig methylierten und im wesentlichen nicht-methylierten CpG-Folgen in Zellen mit Wildtyp-Allel identifiziert werden (Naumann *u. a.*, 2009). Eine Methylierungsgrenze ließ sich auch in den Prämutations-Überträgern und in den Trägern einer nicht-methylierten Vollmutation nachweisen (Smeets *u. a.*, 1995; Pietrobono *u. a.*, 2005; Tabolacci *u. a.*, 2008). In *FXS* Individuen war diese Methylierungsgrenze hingegen aufgehoben.

E.2. DNA-Methylierungsmusteranalyse

DNA-Methylierungsmuster der *FMRI* Promotor und 5'-*upstream* Region wurden mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung bestimmt. Die Analyse mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen wie zum Beispiel *HpaII* liefert zum einen als Ergebnis nur sehr ungenaue Durchschnittswerte und zum anderen liegen nur wenige CpG-Folgen in Erkennungssequenzen von Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen. Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung erlaubt die Bestimmung des Methylierungszustandes jeder CpG-Folge von einzelnen klonierten und sequenzierten DNA-Molekülen. In Abbildung 12 ist ein Beispiel für die verwendete Darstellungsweise der DNA-Methylierungsmusteranalyse erklärt. Methylierte CpG-Folgen werden als schwarze und nicht-methylierte CpG-Folgen als weiße Quadrate symbolisiert. Jede Zeile repräsentiert ein einzelnes, kloniertes und sequenziertes DNA-Molekül. Die CpG-Nummer in jeder Spalte stimmt mit der in Abbildung 11 C verwendeten Nummerierung der untersuchten CpG-Folgen 1-104 überein. Die Abbildung 11 C zeigt die Positionen der CpG-Folgen im korrekten Maßstab, wohingegen die CpG-Folgen in Abbildung 12 komprimiert sind, so dass alle CpG-Folgen, ohne die tatsächlichen Abstände berücksichtigend, nebeneinander liegen. Einige CpG-Folgen können durch zwei überlappende PCR-Fragmente abgedeckt werden.

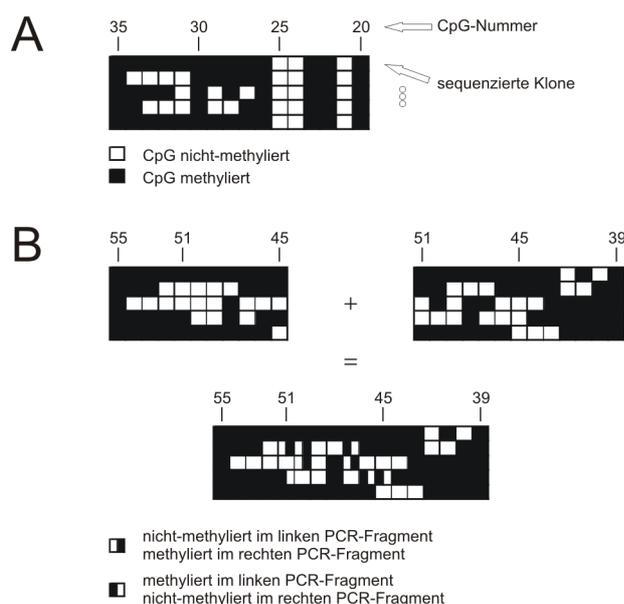


Abbildung 12: Darstellungsweise der DNA-Methylierungsmusteranalyse. (A) Die CpG-Nummer in einer Spalte entsprechen den untersuchten CpG-Folgen, wie sie in Abbildung 11 dargestellt sind. Jede Zeile zeigt das DNA-Methylierungsmuster eines klonierten und sequenzierten DNA-Moleküls. □ = CpG nicht-methyliert; ■ = CpG methyliert. (B) Einige CpG-Folgen, die durch zwei benachbarte PCR-Fragmente abgedeckt werden, unterscheiden sich im Methylierungszustand. Diese CpG-Folgen werden als Quadrate dargestellt, die zur Hälfte weiß (nicht-methyliert) und schwarz (methyliert) sind.

E.3. Kontrollexperimente zur DNA-Methylierungsmusteranalyse

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Bisulfit-Sequenzierung wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt.

1. DNA-Methylierungsmuster der CpG-Folgen 20 bis 83 des *FMRI* Promotors und der 5'-*upstream* Region wurden für die kommerziell erworbene nicht-methylierte oder durch die *SssI*-Methylase *in vitro* prämethylierte und Bisulfit-konvertierte menschliche genomische DNA ermittelt. Die nicht-methylierte DNA (Abbildung 13 A) und die methylierte DNA (Abbildung 13 B) konnten auch als fast vollständig nicht-methyliert (weiße Quadrate) oder methyliert (schwarze Quadrate) identifiziert werden.
2. Das Plasmid pUC19-*FMRI* (Plasmidkarte als Anhang auf Seite 106), welches die 5'-*upstream* Region, den *FMRI* Promotor und eine 5'-(CGG)₁₁-3' Repetition enthält, wurde ebenso durch Bisulfit-Sequenzierung der CpG-Folgen 20 bis 49 im *FMRI* Promotor analysiert. Die Ergebnisse für die nicht-methylierte (Abbildung 13 C) und die *in vitro SssI* prämethylierte Form (Abbildung 13 D) ergaben die korrekten DNA-Methylierungsmuster.
3. Außerdem wurde die Bisulfit-Sequenzierung der CpG-Folgen 20 bis 49 einer 1:1 Mischung aus der nicht-methylierten und der methylierten Plasmid-DNA pUC19-*FMRI* als Kontrolle durchgeführt. Einzelne nicht-methylierte oder methylierte DNA-Moleküle sollten erkannt und während der PCR-Amplifikation oder Klonierung auch nicht bevorzugt werden. Die Abbildung 13 E zeigt, dass von fünf sequenzierten Klonen zwei nicht-methyliert und drei methyliert waren, und deshalb im zu erwartenden Bereich repräsentiert waren.
4. Die Bisulfit-Konversion genomischer DNA erfolgte hauptsächlich nach Anleitung des „EpiTect Bisulfite Kit“. Als Kontrolle wurden deshalb auch unabhängige Bisulfit-Konversionen, mit DNA-Denaturierung durch NaOH und Hitze und anschließender Zugabe einer Natriumbisulfit-Hydrochinon-Lösung (Hochstein *u. a.*, 2007), durchgeführt. Die Abbildung 19 A und B zeigt, dass beide Methoden fast identische Ergebnisse liefern.
5. Nach der Bisulfit-Konversion sind beide DNA-Stränge nicht mehr komplementär zueinander. Um eine mögliche Hemimethylierung zu erkennen, wurde deshalb für einige Proben das DNA-Methylierungsmuster der beiden DNA-Stränge analysiert (oberes und unteres Diagramm in Abbildung 19 A). Der DNA-Methylierungsstatus des „oberen“ DNA-Stranges stimmte mit dem des „unteren“ DNA-Stranges weitestgehend überein. Deshalb wurden für die meisten Proben die DNA-Methylierungsmuster nur über den ursprünglich „unteren“ DNA-Strang ermittelt.
6. Nur die klonierten und sequenzierten DNA-Moleküle wurden zum Erstellen der DNA-Methylierungsmuster verwendet, bei denen über 95% aller Cytosine außerhalb der CpG-Folgen zu Thymin umgewandelt wurden, verglichen mit den DNA-Fragmenten vor der Bisulfit-Konversion.
7. Zur Validierung der Ergebnisse wurden für jedes PCR-Fragment mindestens fünf Klone sequenziert und ausgewertet.

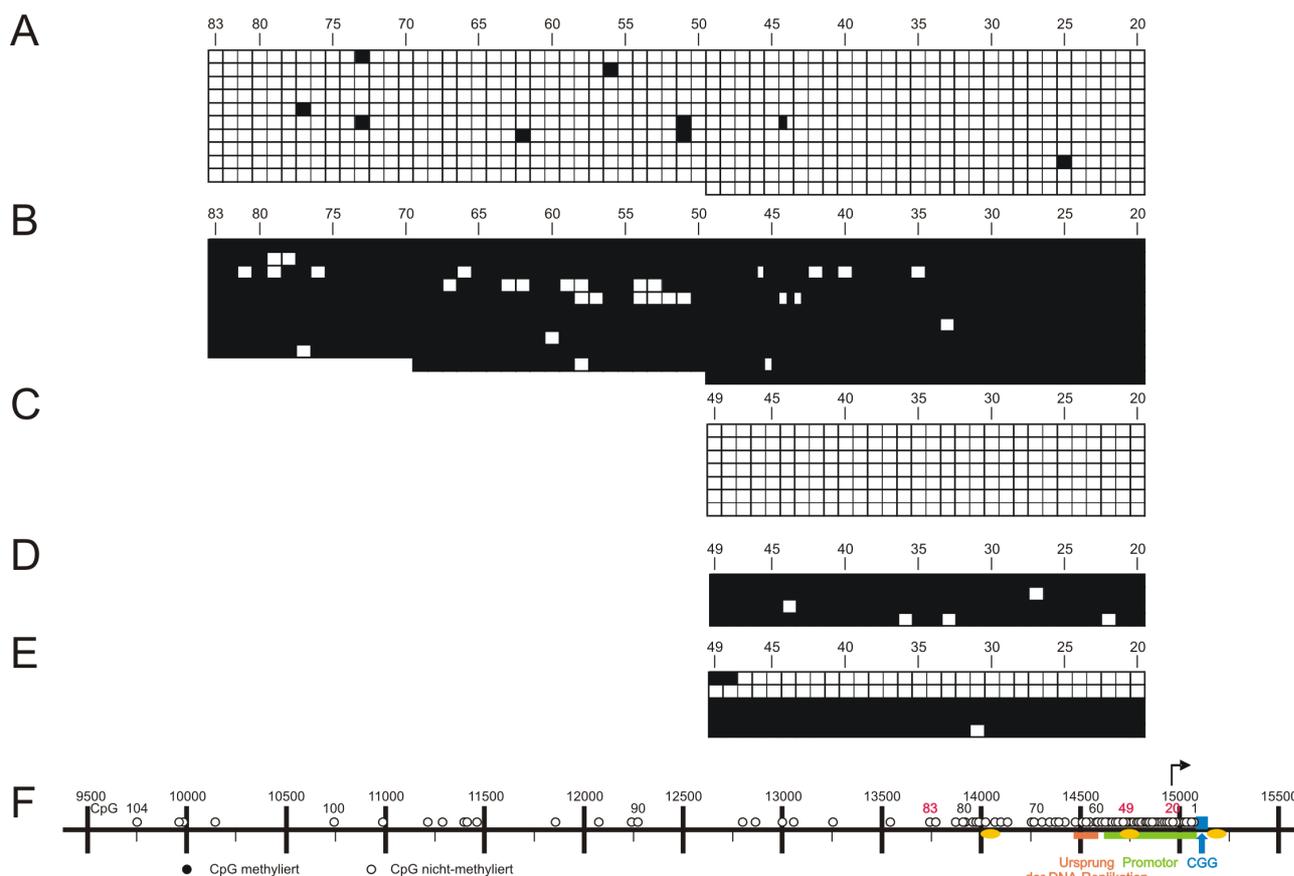


Abbildung 13: Kontrollen der DNA-Methylierungsmusteranalyse. (A, B) Menschliche genomische DNA, die kommerziell erworben wurde, in der nicht-methylierten (A) oder durch die *SssI*-Methylase *in vitro* prämethylierten Form (B), nach Denaturierung, Bisulfit-Konversion, PCR-Amplifikation des *FMRI* Promotors und der 5'-*upstream* Region, Klonierung und Sequenzierung (CpG-Folgen 20 bis 83). (C, D) Ein Teil des *FMRI* Promotors (CpG-Folgen 20 bis 49) der pUC19-*FMRI* Plasmid-DNA wurde ebenfalls durch Bisulfit-Sequenzierung der nicht-methylierten (C) und der methylierten Form (D) analysiert. (E) DNA-Methylierungsmuster einer 1:1 Mischung der DNA von (C) und (D). (F) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C, in der alle CpG-Folgen als nicht-methyliert dargestellt sind.

Nach Bestätigung der Zuverlässigkeit der Bisulfit-Sequenzierung, wurde der DNA-Methylierungsstatus in der *FMRI* Promotor und 5'-*upstream* Region bei den vier verschiedenen Allelen (Wildtyp, Prämutation, Vollmutation, nicht-methylierte Vollmutation) ermittelt. Zum Vergleich erfolgte auch die Analyse der DNA-Methylierungsmuster des *Fmr1* Gens der Maus und *HTT* Gens des Menschen. Da DNA-Methylierungsmuster zwischen verschiedenen menschlichen Geweben oder Zelllinien (Kochanek *u. a.*, 1990) aber auch von Zelle zu Zelle variieren können (Genç *u. a.*, 2000), wurden deshalb Zelllinien, Zellen und DNA-Proben unterschiedlicher Herkunft verwendet, die entweder den Phänotyp *FXS* oder nicht-*FXS* repräsentierten.

E.4. Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in Zellen mit Wildtyp-Allel

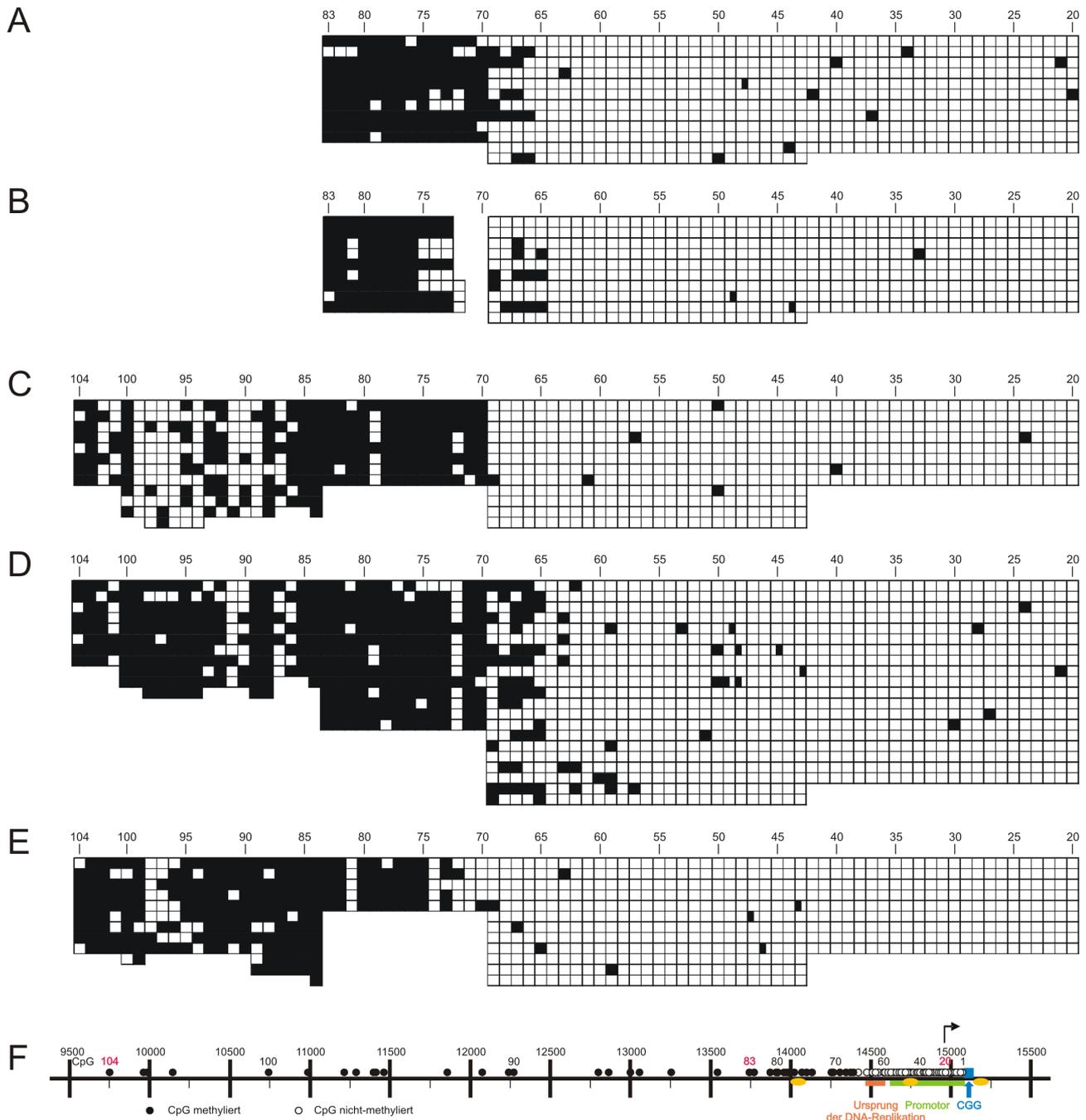


Abbildung 14: Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in männlichen Zellen mit Wildtyp-Allel. Die Bisulfit-Sequenzierung wurde für die genomische DNA aus männlichen peripheren weißen Blutzellen (A, B, C) und Fibroblastenzellen (D, E) durchgeführt. Die CpG-Folgen 20 bis 83 (A, B) und 20 bis 104 (C, D, E) sind dargestellt. (A) 77MN161 28 Jahre, (B) 33MN182 73 Jahre, (C) ROS31 *EBV*-transformiert, (D) primäre Vorhautfibroblasten HFF, (E) 86RD540 Telomerase-transformiert. (F) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

Die Analyse der DNA-Methylierungsmuster in einem ungefähr 5500 bp langen Bereich der menschlichen *FMRI* 5'-*upstream* Region in männlichen Zellen mit Wildtyp-Allel ergab eine Methylierungsgrenze für die genomische DNA sowohl aus peripheren weißen Blutzellen (PBMCs) (Abbildung 14 A, B, C) als auch aus Fibroblastenzellen (Abbildung 14 D, E). Diese Methylierungsgrenze befindet sich ungefähr 650 bis 800 bp vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition, gekennzeichnet durch einen ungefähr 4900 bp stark methylierten *upstream* und einen ungefähr 670 bp kurzen fast vollständig nicht-methylierten *downstream* Bereich, der den *FMRI* Promotor und einen Ursprung der DNA-Replikation enthält. Die Bisulfit-Sequenzierung der genomischen DNA aus den PBMCs zweier männlicher Probanden (Abbildung 14 A, B) erfolgte für die CpG-Folgen 20 bis 83 und ergab eine Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 69 und 70, ebenso auch bei den (*Epstein-Barr-Virus*) *EBV*-transformierten PBMCs ROS31 (Abbildung 14 C), bei denen die CpG-Folgen 20 bis 104 analysiert wurden. Zusätzlich konnte bei den *EBV*-transformierten PBMCs ROS31 weiter *upstream* vor der Grenze eine Abnahme der DNA-Methylierung verzeichnet werden. Die primären Vorhautfibroblasten HFF (Abbildung 14 D) und die Telomerase-transformierten Fibroblastenzellen 86RD540 (Abbildung 14 E) wurden im Bereich der CpG-Folgen 20 bis 104 untersucht und wiesen ebenfalls eine Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 65 bis 70 (Abbildung 14 D) oder 73 bis 75 (Abbildung 14 E) auf.

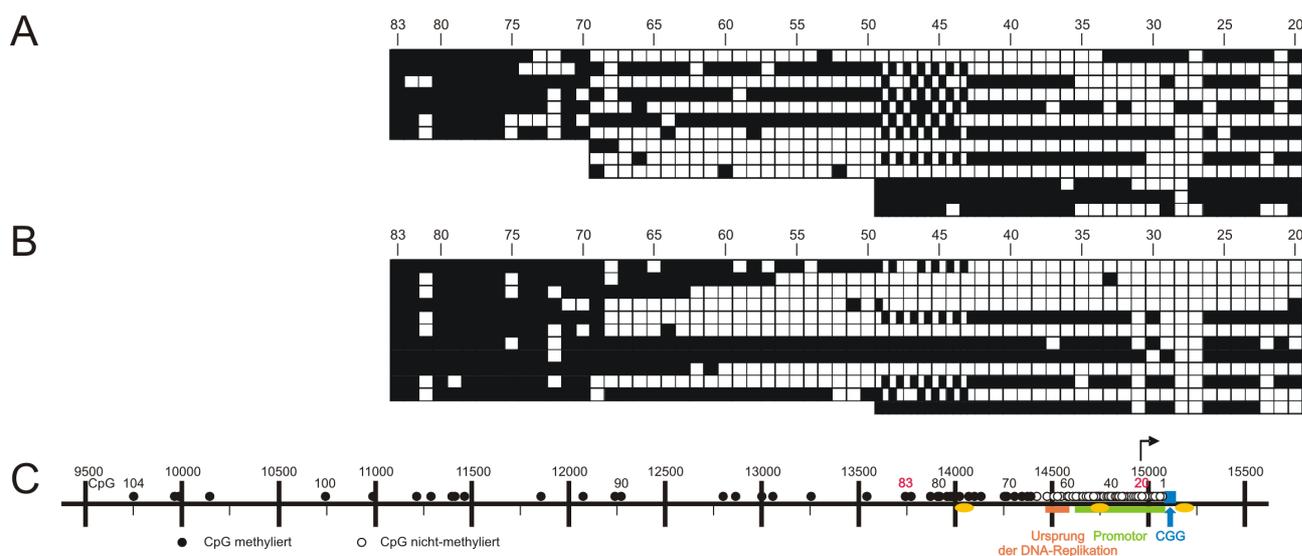


Abbildung 15: Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-*upstream* Region in weiblichen Zellen mit Wildtyp-Allel. (A, B) Die Bisulfit-Sequenzierung der CpG-Folgen 20 bis 83 wurde für die genomische DNA aus weiblichen peripheren weißen Blutzellen durchgeführt. (A) 80WN203 26 Jahre, (B) 83WN224 23 Jahre. (C) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

Die Analysen der DNA-Methylierungsmuster für die CpG-Folgen 20 bis 83 der genomischen DNA aus den PBMCs zweier weiblicher Probanden ergab bei ungefähr der Hälfte der sequenzierten DNA-Moleküle eine Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 69 und 70 (Abbildung 15 A, B). In der Region zwischen den CpG-Folgen 20 und 68 konnte ein Methylierungsmosaik, aus nicht-methylierten und methylierten DNA-Molekülen im Verhältnis von ungefähr 1:1, nachgewiesen werden. Dieses Mosaik ist sehr wahrscheinlich auf das unterschiedliche Ausmaß der DNA-Methylierung in den beiden weiblichen X-Chromosomen zurückzuführen, wobei eines stark und das andere nicht- oder nur schwach methyliert ist (Kelkar & Deobagkar, 2010; Sharp *u. a.*, 2011).

E.5. Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in verschiedenen Geweben

Das DNA-Methylierungsmuster der *FMR1* Promotor und 5'-upstream Region wurde auch für die genomische DNA aus verschiedenen männlichen Geweben erstellt (Abbildungen 16, 17). Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung wurden die CpG-Folgen 1 bis 83 untersucht. Die Analysen menschlicher fötaler DNA (Abbildung 16) und adulter DNA (Abbildung 17) von Gehirn (A), Leber (B) und Skelettmuskel (C) ergaben ebenso die bereits beschriebene Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 65 und 70. Zudem konnten im Bereich der CpG-Folgen 1 bis 64 beim fötalen Skelettmuskel (Abbildung 16 C) im Vergleich zum adulten Skelettmuskel (Abbildung 17 C) allerdings auch stärker methylierte DNA-Moleküle nachgewiesen werden.

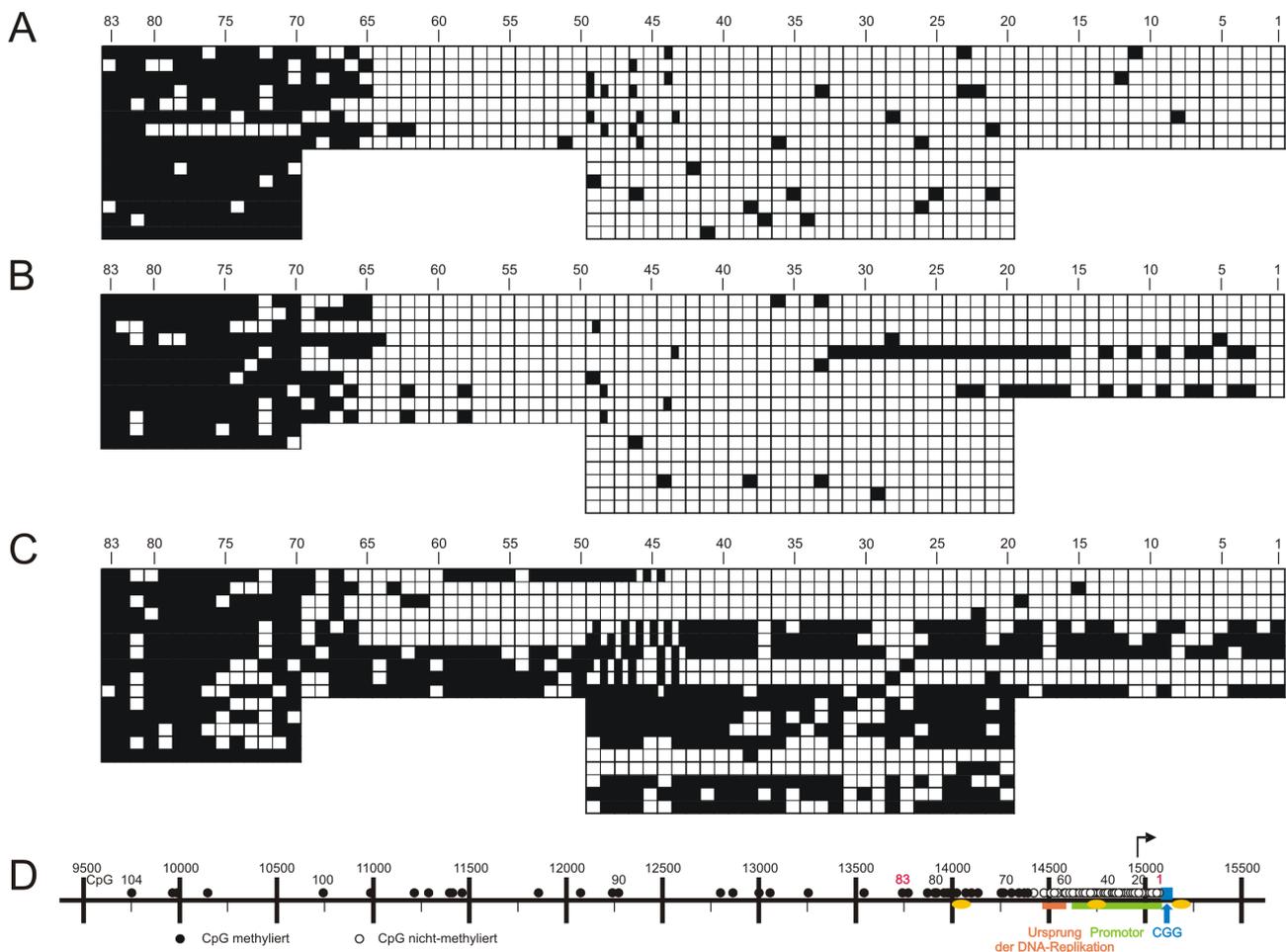


Abbildung 16: Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in männlichen fötalen Geweben. (A, B, C) Die Bisulfit-Sequenzierung wurde für die CpG-Folgen 1 bis 83 durchgeführt. (A) Mensch Gehirn 22 fötale Wochen, (B) Mensch Leber 22 fötale Wochen, (C) Mensch Skelettmuskel 22 fötale Wochen. (D) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

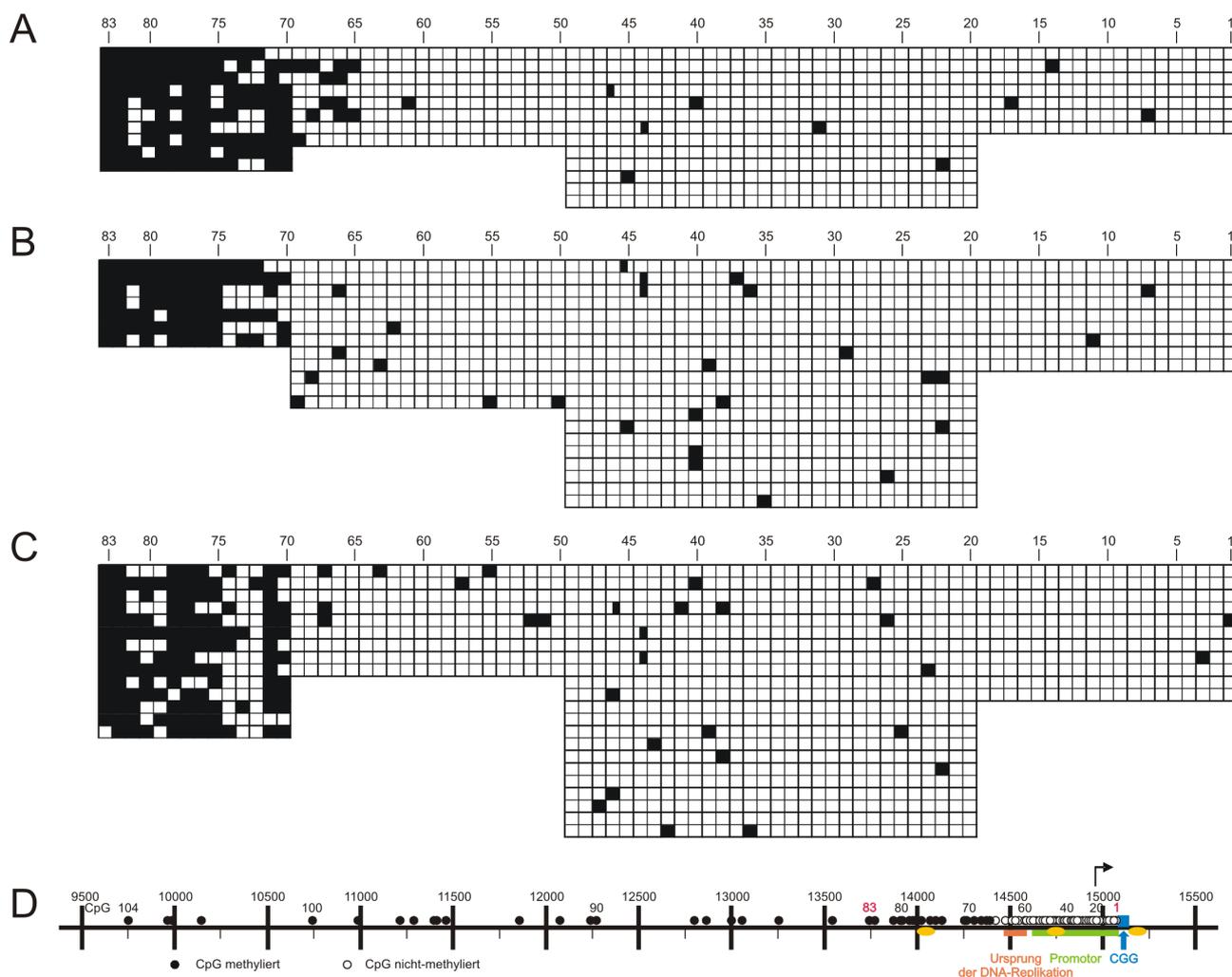


Abbildung 17: Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in männlichen adulten Geweben. (A, B, C) Die Bisulfid-Sequenzierung wurde für die CpG-Folgen 1 bis 83 durchgeführt. (A) Mensch Gehirn normal 33 Jahre, (B) Mensch Leber normal 27 Jahre, (C) Mensch Skelettmuskel normal 33 Jahre. (D) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

E.6. Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in Tumorzelllinien

Komplexe genetische und epigenetische Veränderungen der genomischen DNA in malignen transformierten Tumorzellen, bewirken die stetige Teilung der Zellen und verhindern den programmierten Zelltod. Aufgrund der Fähigkeit sich sehr schnell und unendlich teilen zu können, werden in der Forschung deshalb häufig kultivierte Zelllinien aus Tumorzellen verwendet. In Tumorzelllinien findet man jedoch häufig abnormale DNA-Methylierungsmuster, die dann zu einer veränderten Genexpression führen können. Um mögliche Veränderungen der Methylierungsgrenze in Tumorzellen zu ermitteln, wurde das DNA-Methylierungsmuster der *FMR1* Promotor und 5'-upstream Region der genomischen DNA aus der weiblichen Tumorzelllinie HeLa (Abbildung 18) und der männlichen Tumorzelllinie HCT-116 (Abbildung 19) analysiert. Die Bisulfid-Sequenzierung der genomischen DNA aus der weiblichen Tumorzelllinie HeLa, menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Scherer *u. a.*, 1953), für den Bereich der CpG-Folgen 1 bis 49 verlief über die 5'-(CGG)_n-3' Repetition hinweg und ergab eine normale Anzahl von $n = 20$ Trinukleotid-Repetitionen.

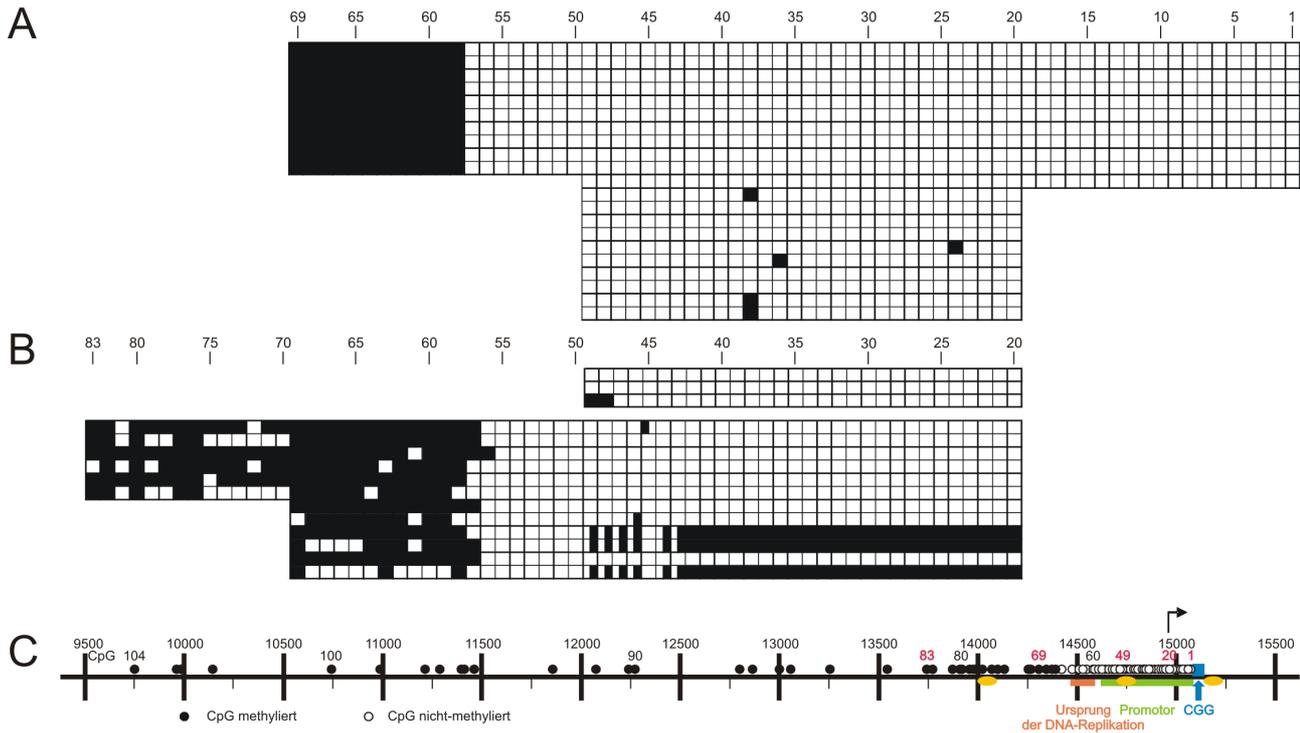


Abbildung 18: Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-upstream Region in der weiblichen Zelllinie HeLa. Die Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA erfolgte nach Anleitung des „EpiTect Bisulfite Kit“ (A) oder nach Denaturierung der DNA durch NaOH und Hitze mit einer Natriumbisulfit-Hydrochinon-Lösung (B). DNA-Methylierungsmuster wurden für den „unteren“ (A) und für beide Stränge (oberes und unteres Diagramm in B) analysiert. Die CpG-Folgen 1 bis 69 (A) und 20 bis 83 (B) des „unteren“ Stranges und die CpG-Folgen 20 bis 49 (B) des „oberen“ Stranges wurden dargestellt. (C) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

Bei der menschlichen Tumorzelllinie HCT-116 handelt es sich um männliche Epithelzellen eines Kolorektalkarzinoms (Brattain *u. a.*, 1981), die ebenso keine Expansion der 5'-(CGG)_n-3' Repetition aufweisen (n = ~30) (Fernández-López *u. a.*, 2004; Gray *u. a.*, 2007). Die Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA aus den beiden Tumorzelllinien HeLa und HCT-116 erfolgte zum einen nach Anleitung des „EpiTect Bisulfite Kit“ (Abbildungen 18 A, 19 A) und zum anderen nach Denaturierung der DNA durch NaOH und Hitze mit einer Natriumbisulfit-Hydrochinon-Lösung (Hochstein *u. a.*, 2007) (Abbildungen 18 B, 19 A, 19 B). Die beiden Stränge der denaturierten genomischen DNA sind nach der Bisulfit-Konversion nicht mehr komplementär zueinander, da die Reaktion Einzelstrang-spezifisch verläuft, das ermöglicht DNA-Methylierungsmusteranalysen für beide DNA-Stränge. Für die meisten Proben wurde das DNA-Methylierungsmuster des ursprünglich „unteren“ DNA-Stranges ermittelt, wohingegen die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der genomischen DNA aus den Tumorzelllinien HeLa und HCT-116 für beide DNA-Stränge erfolgte (oberes und unteres Diagramm in den Abbildungen 18 B, 19 A, 19 B). Die Bisulfit-Sequenzierung des „unteren“ Stranges der genomischen DNA aus HeLa wurde für die CpG-Folgen 1 bis 69 (Abbildung 18 A) und 20 bis 83 (Abbildung 18 B) durchgeführt, und ergab eine Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 57 und 58, daneben wurden auch die CpG-Folgen 20 bis 49 von drei klonierten DNA-Molekülen des „oberen“ Stranges untersucht (Abbildung 18 B). Die Methylierungsgrenze ist in Abbildung 18 A sehr deutlich ausgeprägt, der methylierte Bereich ist vollständig methyliert und im nicht-methylierten Bereich sind nur sehr wenige nicht-methylierte CpG-Folgen zu finden. In Abbildung 18 B konnten in dem stark methylierten Bereich auch nicht-

methylierte CpG-Folgen nachgewiesen werden, zudem waren bei der Sequenzierung des *FMRI* Promotorbereichs drei methylierte DNA-Moleküle dabei. Diese methylierten DNA-Moleküle sind sehr wahrscheinlich auf das weitestgehend still gelegte weibliche X-Chromosom zurückzuführen. Für HCT-116 wurde das DNA-Methylierungsmuster der CpG-Folgen 20 bis 104 (Abbildung 19 A) und 20 bis 83 (Abbildung 19 B) des „unteren“ DNA-Stranges und der CpG-Folgen 20 bis 83 (Abbildung 19 A) und 20 bis 49 (Abbildung 19 B) des „oberen“ DNA-Stranges ermittelt.

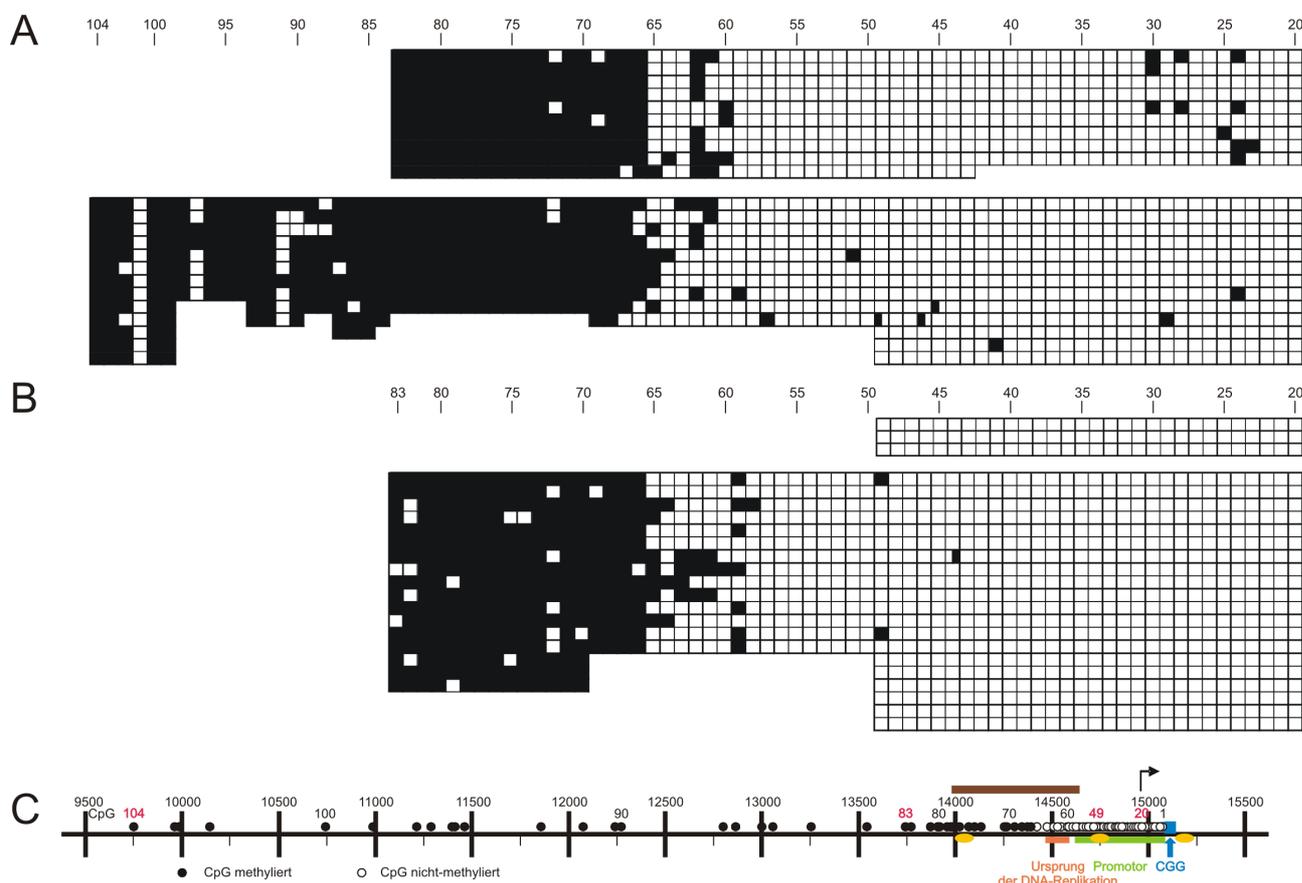
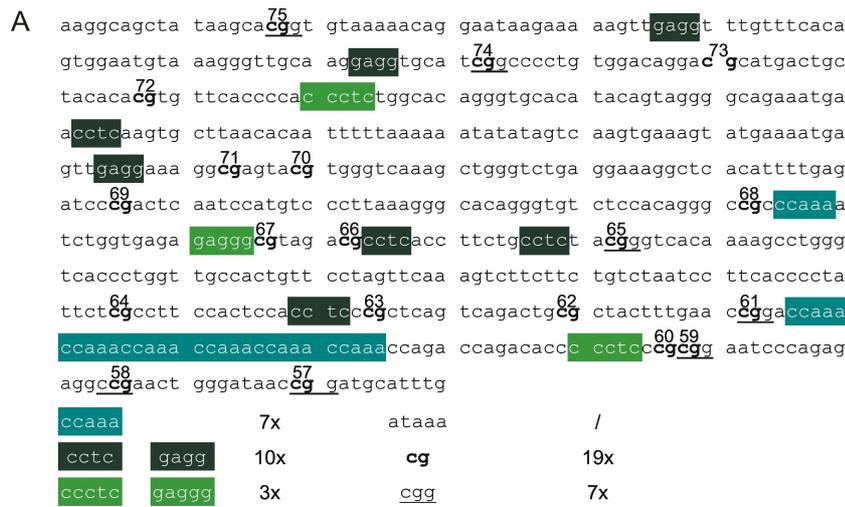


Abbildung 19: Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-upstream Region in der männlichen Zelllinie HCT-116. Die Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA erfolgte nach Anleitung des „EpiTect Bisulfit Kit“ (A) oder nach Denaturierung der DNA durch NaOH und Hitze mit einer Natriumbisulfit-Hydrochinon-Lösung (B). DNA-Methylierungsmuster wurden für beide Stränge (oberes und unteres Diagramm in A, B) analysiert. Die CpG-Folgen 20 bis 104 (A) und 20 bis 83 (B) des „unteren“ Stranges und die CpG-Folgen 20 bis 83 (A) und 20 bis 49 (B) des „oberen“ Stranges wurden dargestellt. (C) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C mit markierter Übergangsregion vom nicht-methylierten zum methylierten Bereich (brauner Balken).

Die Analysen der beiden Stränge der genomischen DNA, ebenso die beiden unterschiedlichen Vorgehensweisen der Bisulfit-Behandlung, ergaben fast identische DNA-Methylierungsmuster mit einer Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 57 und 58 (HeLa, Abbildung 18) oder 65 und 66 (HCT-116, Abbildung 19). Verglichen mit den DNA-Methylierungsmustern der *FMRI* Promotor und 5'-upstream Region der DNA-Proben mit einer normalen Länge der 5'-(CGG)_n-3' Repetition, konnten in den beiden untersuchten Tumorzelllinien HeLa und HCT-116 keine gravierenden Unterschiede festgestellt werden. Die Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des *FMRI* Gens scheint stabil zu sein, trotz möglicherweise zahlreichen abnormalen DNA-Methylierungsmustern in anderen Bereichen der genomischen DNA aus den Tumorzellen HeLa und HCT-116.

E.7. Spezifische Bindung von Kernproteinen an die Übergangsregion der *FMR1* Methylierungsgrenze

In allen untersuchten menschlichen Zelllinien und Zelltypen mit Wildtyp-Allel der 5'-(CGG)_n-3' Repetition konnte, unabhängig von Geschlecht und Alter, eine Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region nachgewiesen werden. Die Übergangsregion vom nicht-methylierten zum methylierten Bereich (brauner Balken in Abbildung 19 C) sollte deshalb auf eine mögliche spezifische Bindung von Kernproteinen untersucht werden.



B

DIG-markierte nicht-methylierte DNA	+	+	+	+	+					
DIG-markierte methylierte DNA						+	+	+	+	
nicht-markierte nicht-methylierte DNA			+							+
nicht-markierte methylierte DNA				+					+	
Kernextrakt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Plasmid-DNA Fragment (<i>b/a</i>)					+					+

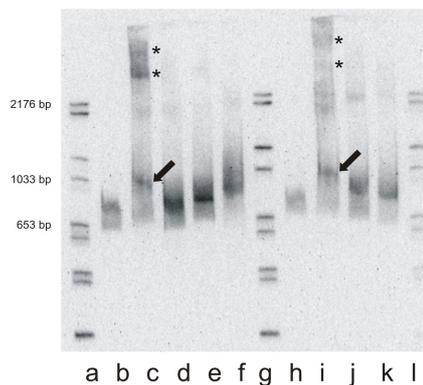


Abbildung 20: Spezifische Bindung von Kernproteinen an die Übergangsregion der *FMR1* Methylierungsgrenze. (A) Nukleotid-Sequenz der Übergangszone zwischen vollständig methylierter und nicht-methylierter DNA in der *FMR1* 5'-upstream Region mit verschiedenen Motiven des DNA-Abschnittes einer 5'-(CCAAA)₆-3' Repetition. (B) Der Kernextrakt aus menschlichen HCT-116 Zellen (2,64µg Protein) wurde mit dem DIG-markierten DNA-Fragment der Übergangsregion der DNA-Methylierungsgrenze inkubiert. Die entstehenden Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) in nativen 6% Polyacrylamid-Gelen analysiert. Die Laufrichtung und Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte von oben nach unten. Nach Detektion der DIG-markierten DNA-Banden ergab die Auswertung spezifische Komplexe (markiert mit einem Pfeil) und möglicherweise nicht-spezifische Komplexe (markiert mit einem Stern). Weitere Erklärungen siehe Text.

Die Nukleotid-Sequenz der Übergangszone zwischen dem vollständig methylierten Bereich *upstream* und dem nicht-methylierten Bereich *downstream* in der *FMRI 5'-upstream* Region enthält die CpG-Folgen 57 bis 75 mit der Methylierungsgrenze zwischen den CpG-Folgen 65 und 66 (Abbildung 20 A). Von den 19 CpG-Dinukleotiden sind 7 auch Teil eines 5'-CGG-3' Trinukleotids. Außerdem sind die folgenden Motive in diesem DNA-Abschnitt zu erkennen: drei 5'-CCCTC-3' bzw. 5'-GAGGG-3' Sequenzen, zehn 5'-CCTC-3' bzw. 5'-GAGG-3' Sequenzen und eine 5'-(CCAAA)₆-3' Repetition (Abbildung 20 A). Die Fähigkeit der Übergangsregion Kernproteine aus menschlichen Zellen zu binden, wurde mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) überprüft. Der Kernextrakt aus HCT-116 Zellen wurde mit dem 630 bp Digoxigenin-markierten (DIG-markierten) DNA-Fragment der Übergangsregion der DNA-Methylierungsgrenze inkubiert. In einigen Experimenten wurde das mit der *SssI*-Methylase *in vitro* prämethylierte DNA-Fragment der Übergangsregion verwendet. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte in nativen 6% Polyacrylamid-Gelen. Ein DIG-markierter DNA-Größenmarker wurde ebenfalls separiert (Abbildung 20 B; Spalten a, g, l). Der Vergleich der Ansätze ohne Proteinzugabe (Abbildung 20 B; Spalten b, h) mit den DNA-Protein-Ansätzen ergab einige Banden mit verschobener Laufweite bei dem nicht-methylierten und methylierten DIG-markierten DNA-Fragment der Übergangsregion (Abbildung 20 B; Spalten c, i; Pfeile und Sterne). Diese verlangsamte Wanderung ist vermutlich auf entstandene DNA-Protein-Komplexe zurückzuführen. Die Spezifität dieser entstandenen Komplexe wurde in verschiedenen Experimenten der kompetitiven Hemmung überprüft.

1. Das nicht-markierte 630 bp Fragment der Übergangsregion wurde als spezifischer Kompetitor in einem > 2000-fachen Überschuss eingesetzt und hemmte in allen sieben durchgeführten Versuchen die verschobenen DNA-Protein-Komplexe (Abbildung 20 B; Spalten d, k).
2. Das eingesetzte nicht-markierte 595 bp *DraI-RsaI*-Fragment von einem Teil des β -Laktamase (*bla*) Gens aus dem Plasmid pcDNA3.1(+) (Plasmidkarte als Anhang auf Seite 105), als nicht-spezifischer Kompetitor, hemmte die langsam wandernden Komplexe (markiert mit einem Stern) aber nicht den Komplex (markiert mit einem Pfeil) nahe der 1033 bp Bande des DIG-markierten DNA-Größenmarkers (Abbildung 20 B; Spalte f).
3. Das nicht-markierte 655 bp *XbaI-XhoI*-Fragment aus dem Plasmid pJET1-EMSA (Plasmidkarte als Anhang auf Seite 106) mit der *in vitro SssI*-prämethylierten Übergangsregion (Abbildung 20 B; Spalten e, j) führte ebenso wie das nicht-methylierte Fragment zur Hemmung aller DNA-Protein-Komplexe. Es entstand eine DNA-Bande mit einer etwas kürzeren Laufweite als bei der nicht-methylierten DNA-Probe. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, da die Übergangsregion im Bereich der CpG-Folgen 66 bis 75 methyliert ist.

Die Analyse der verschiedenen Experimente der kompetitiven Hemmung ergab, dass Kernproteine spezifisch an die nicht-methylierte und *in vitro SssI*-prämethylierte Übergangsregion der DNA-Methylierungsgrenze binden (mit einem Pfeil markierte Komplexe in Abbildung 20). Ein Vergleich der Bindung von Kernproteinen an die nicht-methylierte oder methylierte Übergangsregion kann möglicherweise zu leichten Unterschieden führen. Bei den langsamer wandernden DNA-Protein-Komplexen (mit einem Stern markierte Komplexe in Abbildung 20) scheint es sich um nicht-spezifische oder weniger spezifische DNA-Protein-Komplexe zu handeln.

E.8. Histon-Modifikationen an der Übergangsregion der FMR1 Methylierungsgrenze

Die Untersuchung der Histon-Modifikationen an der *FMR1* DNA-Methylierungsgrenze sowie im methylierten oder nicht-methylierten Bereich erfolgte über *Chromatin-Immunoprecipitation* (ChIP). Die Bindung der Proteine an die DNA in HCT-116 Zellen wurde durch 1% Formaldehyd fixiert. Nach der Permeabilisierung der Membran durch Lysolecithin und Mikrokokken-Nuklease-Behandlung wurden die HCT-116 Zellen mit Ultraschall aufgebrochen. Die DNA-Protein-Komplexe wurden mit vier spezifischen Antikörpern präzipitiert, welche gegen folgende Histon-Modifikationen gerichtet waren. Hypoacetylierte Histone H3 und H4 werden in transkriptionell aktivem und zugänglichen Chromatin gefunden (Hebbes *u. a.*, 1988). Im Gegensatz dazu ist trimethyliertes Lysin (K) 9 beim Histon H3 und trimethyliertes Lysin (K) 20 beim Histon H4 charakteristisch für transkriptionell reprimiertes und kondensiertes Chromatin (Fang *u. a.*, 2002; Nishioka *u. a.*, 2002; Rice *u. a.*, 2002). Die Menge an Antikörper-präzipitiertem Chromatin wurde durch quantitative PCR bestimmt. Die Abbildung 21 zeigt die genaue Lokalisation der qPCR Produkte (A) und Primer (B) für die fünf untersuchten *FMR1* Regionen.

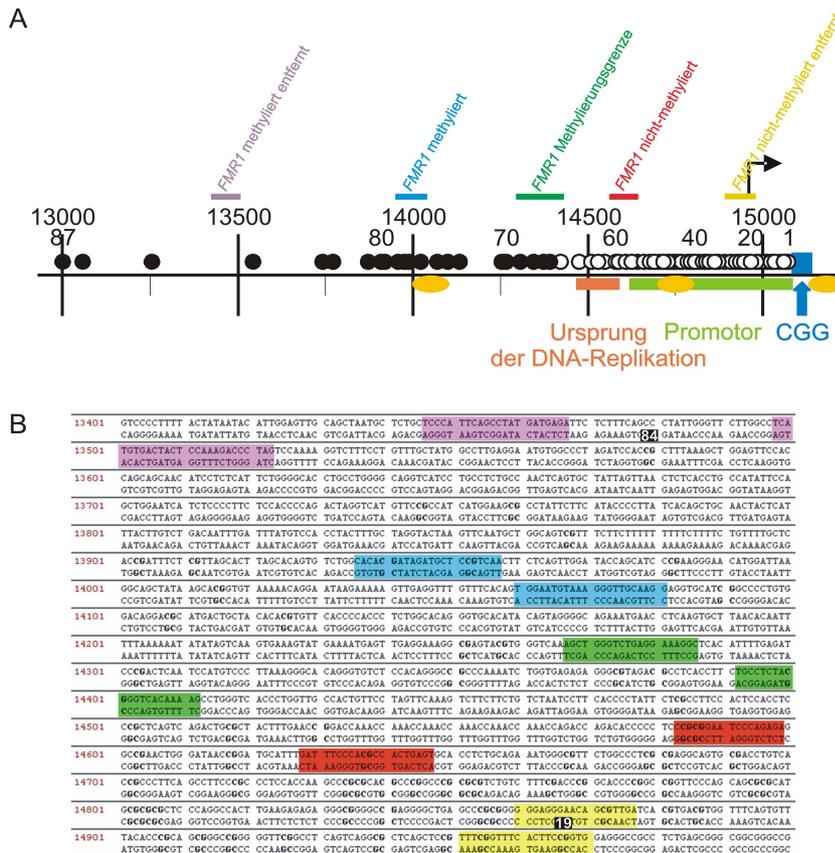


Abbildung 21: Lokalisation der Produkte und Primer für die quantitative PCR. (A) Ausschnitt der *FMR1* Karte mit Lage der fünf amplifizierten PCR-Produkte. (B) Nukleotid-Sequenz von 13401 bis 15000 mit angegebenen Positionen der PCR-Primer und der CpG-Folgen 19 bis 84.

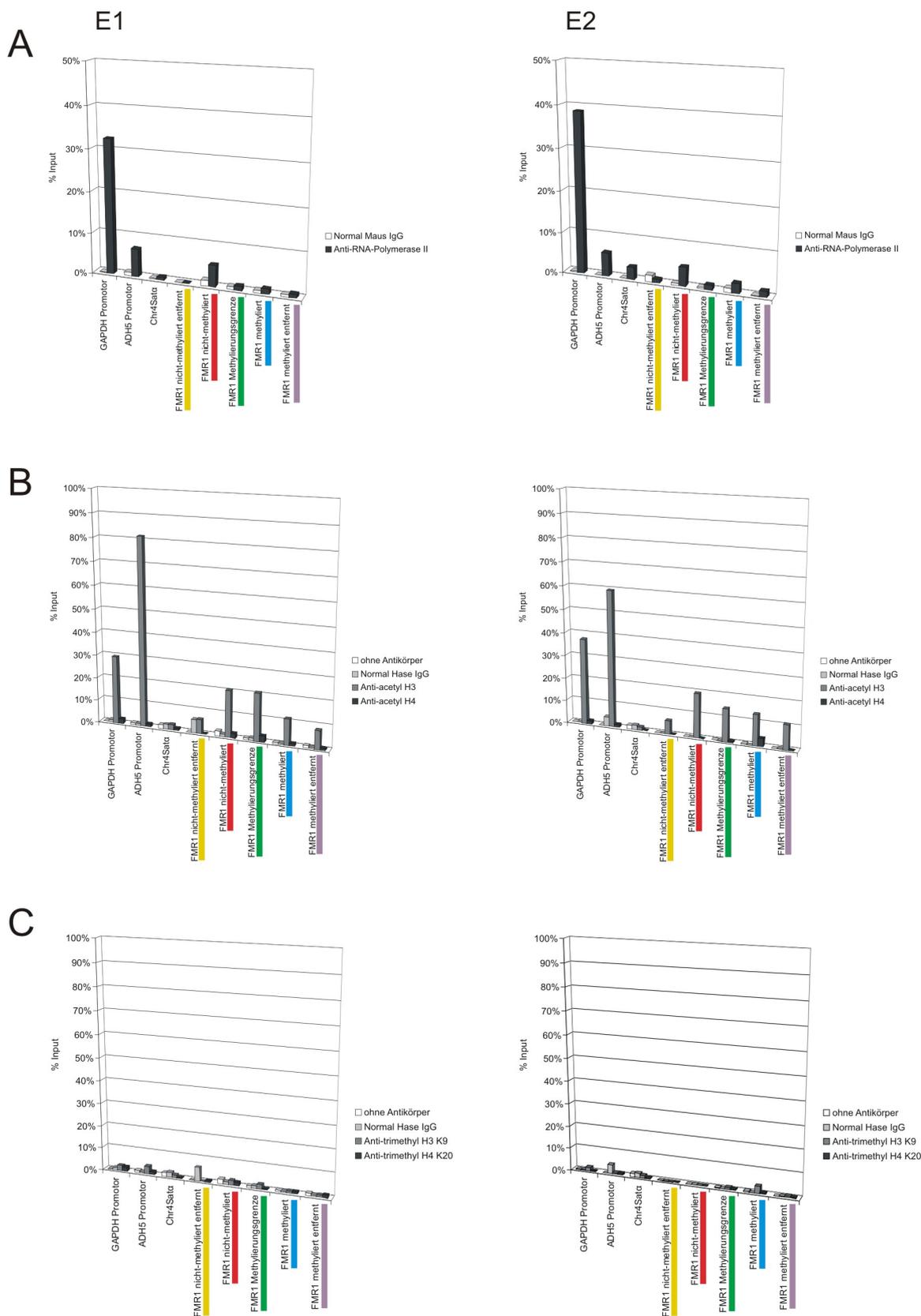


Abbildung 22: Histon-Modifikationen an der Übergangsregion der *FMR1* Methylierungsgrenze. In zwei unabhängigen ChIP Experimenten (E1, E2) wurde die Menge an Chromatin bestimmt, die durch Kontroll-Antikörper (A), Antikörper gegen aktive (B) und inaktive (C) Histon-Modifikationen präzipitiert wurden. Weitere Erklärungen siehe Text.

Ausgehend von einer exponentiellen Amplifikation mit Verdopplung der PCR-Produkte innerhalb eines Zyklus der quantitativen PCR, konnte der Grad der Immunpräzipitation (IP) im Vergleich zur Gesamtmenge an eingesetztem Chromatin (Input) durch die ΔC_t -Methode berechnet und in Prozent (% Input) angegeben werden (Abbildung 10). In zwei unabhängigen Experimenten (Abbildung 22 E1, E2) konnten, im Gegensatz zum negativ Kontroll-Antikörper Normal Maus IgG, mit Hilfe des positiv Kontroll-Antikörpers Anti-RNA-Polymerase II deutliche Mengen an Chromatin für die *GAPDH* Promotorregion präzipitiert werden, was die Effizienz und Spezifität der ChIP Methode bestätigt (Abbildung 22 A). Zur Kontrolle der Histon-Modifikationen wurden die *GAPDH* und *ADH5* Promotorregion für ein transkriptionell aktives Chromatin (Euchromatin) und die *Chr4Sata* Satellitenregion als eher kondensiertes Chromatin (Heterochromatin) verwendet (Alberter & Ensser, 2007). Die Promotorregionen der konstitutiv exprimierten Haushaltsgene *GAPDH* und *ADH5* wiesen eine starke Acetylierung der Histone H3 auf (Abbildung 22 B). Die auf eine Präzipitation hin untersuchten Regionen zeigten keine Anreicherung durch Antikörper gegen transkriptionell reprimierende Histon-Modifikationen (Abbildung 22 C). Die *Chr4Sata* Satellitenregion wies ebenso keine trimethylierten Histone H3 K9 und H4 K20 auf, was entweder auf ein nicht Vorhandensein dieser Histon-Modifikationen in der *Chr4Sata* Satellitenregion oder nicht-präzipitierende Antikörper gegen trimethyliertes H3 K9 und H4 K20 zurückzuführen sein könnte (rechte Felder). Die bisherigen ChIP Resultate für die transkriptionell aktiven Histon-Modifikationen deuten auf eine Anreicherung von acetyliertem H3 in der Übergangsregion der *FMRI* Methylierungsgrenze hin, verbunden mit einer leichten Abnahme in Richtung des methylierten Bereiches (Abbildung 22 B). Die spezifische Antikörper-Präzipitation des Chromatins wurde in Kontrollen ohne Antikörperzugabe oder mit dem Isotyp-Antikörper Normal Hase IgG überprüft. In der geplanten Weiterführung dieser Arbeit sollen zur Verifizierung der bisherigen Ergebnisse noch weitere ChIP Versuche durchgeführt werden.

E.9. Methylierungsgrenze in der *Fmr1* 5'-upstream Region der Maus in verschiedenen Geweben

Die DNA-Methylierungsmusteranalyse der *FMRI* Promotor und 5'-upstream Region des Menschen ergab eine Methylierungsgrenze in Zellen mit Wildtyp-Allel der 5'-(CGG)_n-3' Repetition. Um zu klären, ob eine Methylierungsgrenze des entsprechenden Genombereiches in den homologen Genen anderer Säugetiere zu finden ist, wurde die Bisulfit-Sequenzierung der *Fmr1* Promotor und 5'-upstream Region der Maus durchgeführt (Abbildung 23 A). Die Sequenz vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition ist zwischen Mensch und Maus nur zu 46,7% identisch, trotzdem ergab die Analyse der CpG-Folgen 1 bis 61 der DNA aus Maus Gehirn (Abbildung 23 B) und Maus Leber (Abbildung 23 C) eine konservierte Methylierungsgrenze der CpG-Folgen 56 und 57. Die DNA aus Maus Skelettmuskel wurde bisher im Bereich der CpG-Folgen 1 bis 56 untersucht (Abbildung 23 D).

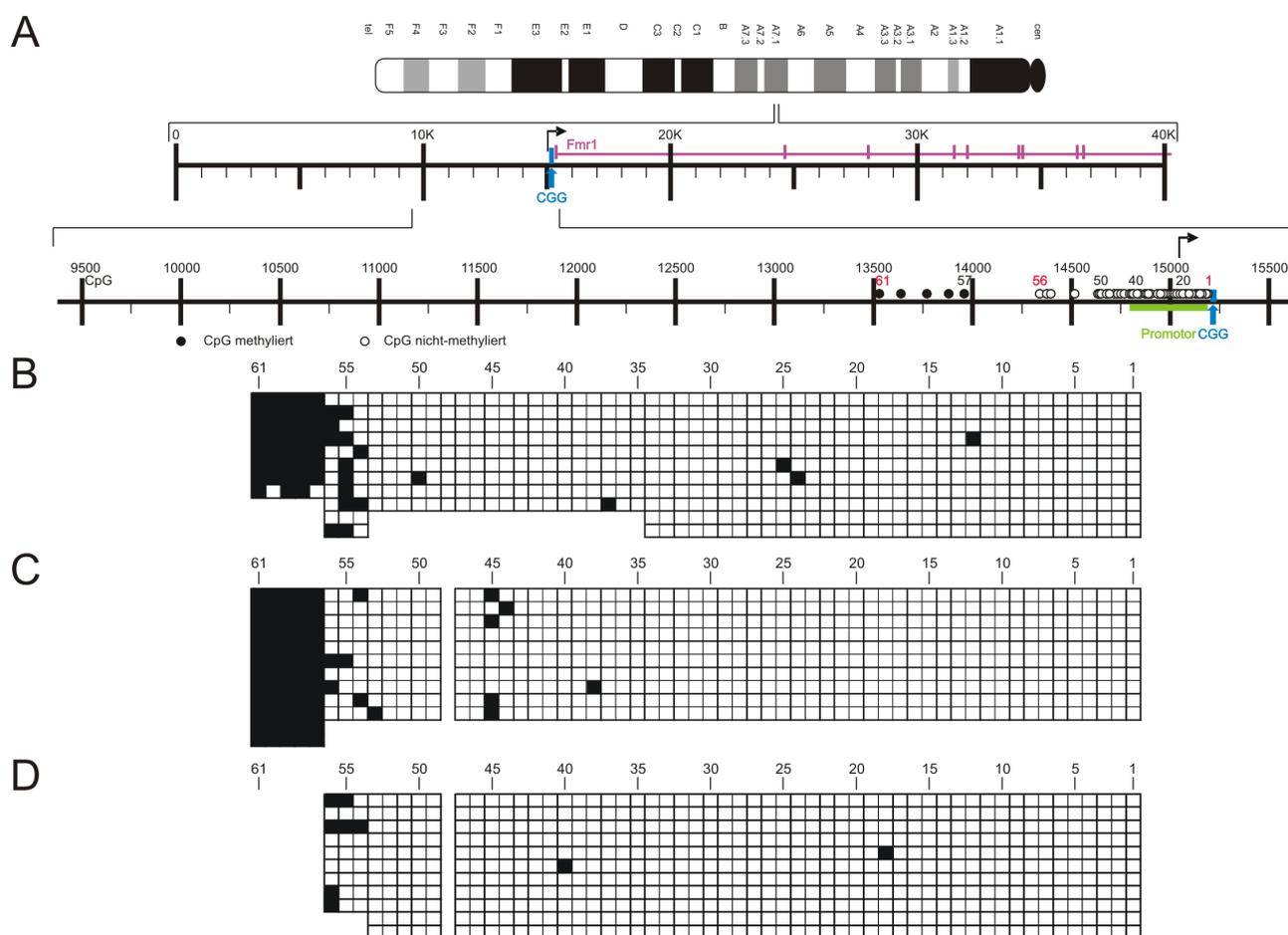


Abbildung 23: Methylierungsgrenze in der *Fmr1* 5'-upstream Region der Maus in männlichen adulten Geweben. (A) Ideogramm des X-Chromosoms und bei A7.1 das *Fmr1* Gen der Maus. Karte mit den ersten 9 Exons (vertikale Balken) und Introns (horizontale Linie) des *Fmr1* Gens und der 5'-upstream Region mit der 5'-(CGG)_n-3' Repetition. Der Nummerierung der Nukleotide in der Karte erfolgte nach der von NCBI stammenden Sequenz: NC_000086:65.916.730-65.971.138 *M. musculus Fmr1* Genregion (mit den Nummern der Nukleotide für das X-Chromosom der Maus). Die *Fmr1* Karte der Maus wurde analog zur Karte des menschlichen *FMRI* Gens in Abbildung 11 C dargestellt. Die Bisulfit-Sequenzierung erfolgte für CpG-Folgen 1 bis 61 (B, C) oder 1 bis 56 (D). (B) Maus Gehirn normal 7 Wochen, (C) Maus Leber normal 6 bis 8 Wochen, (D) Maus Skelettmuskel normal 8 Wochen, alle mit einer Anzahl von n = 9 Trinukleotid-Repetitionen.

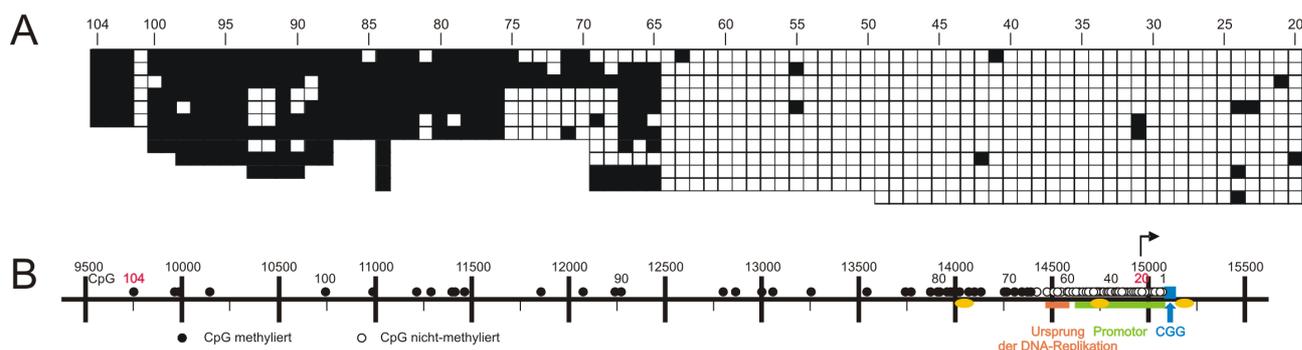


Abbildung 25: Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-upstream Region in männlichen Prämutations-Überträgern. Die Bisulfid-Sequenzierung der genomischen DNA aus männlichen peripheren weißen Blutzellen wurde für die CpG-Folgen 20 bis 104 (A) durchgeführt. (A) 32157 mit $n = 113 \pm 1$. (B) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

E.11. Zunehmender Verlust der Methylierungsgrenze in weiblichen Vollmutations-Trägern

Im Gegensatz zu den Frauen mit Wildtyp-Allel (Abbildung 15) und den Frauen mit Prämutations-Allel (Abbildung 24), ist das DNA-Methylierungsmuster einer Frau mit Vollmutations-Allel auf einem der beiden X-Chromosomen (Abbildung 26) gekennzeichnet durch einen fast vollständigen Verlust der Methylierungsgrenze und zunehmende Ausbreitung der DNA-Methylierung *downstream* in Richtung der *FMRI* Promotorregion. Die ursprüngliche Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 65 bis 70 lässt sich nur noch bei wenigen DNA-Molekülen ausmachen.

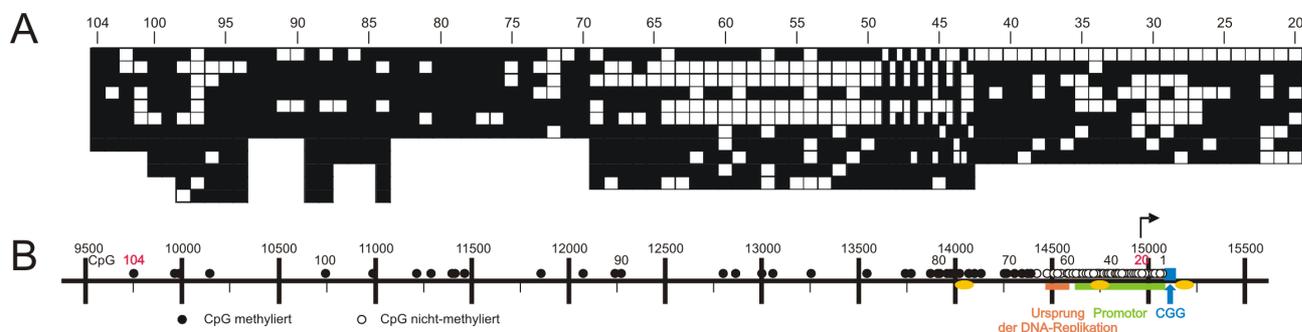


Abbildung 26: Zunehmender Verlust der Methylierungsgrenze in weiblichen Vollmutations-Trägern. (A) Die Bisulfid-Sequenzierung der genomischen DNA 31475 aus weiblichen peripheren weißen Blutzellen wurde für die CpG-Folgen 20 bis 104 durchgeführt. (B) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

E.12. Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in männlichen Vollmutations-Trägern ohne FXS

Bei den sogenannten HFM (engl.: high-functioning males) (Smeets *u. a.*, 1995; Pietrobono *u. a.*, 2005; Tabolacci *u. a.*, 2008) handelt es sich um die seltenen Fälle von männlichen Trägern einer Vollmutation, bei denen es aber nicht zur Ausprägung von FXS gekommen ist. Die Bisulfit-Sequenzierung der CpG-Folgen 20 bis 83 der HFM Genome aus den *EBV*-transformierten peripheren weißen Blutzellen 5106 mit $n = \sim 400$ (Abbildung 27 A) und den Telomerase-transformierten Fibroblastenzellen 94CE422 mit $n = \sim 330$ (Abbildung 27 B) ergab, trotz Vollmutation der 5'-(CGG)_n-3' Repetition, eine Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region. Die Methylierungsgrenze in den männlichen Vollmutations-Trägern ohne FXS scheint stabil zu sein und eine Ausbreitung der DNA-Methylierung zu verhindern. Die Expression des *FMR1* Gens mit expandierter 5'-(CGG)_n-3' Repetition erfolgt weiterhin, durch den nicht-methylierten *FMR1* Promotor, und verhindert die Ausprägung des FXS Phänotyps.

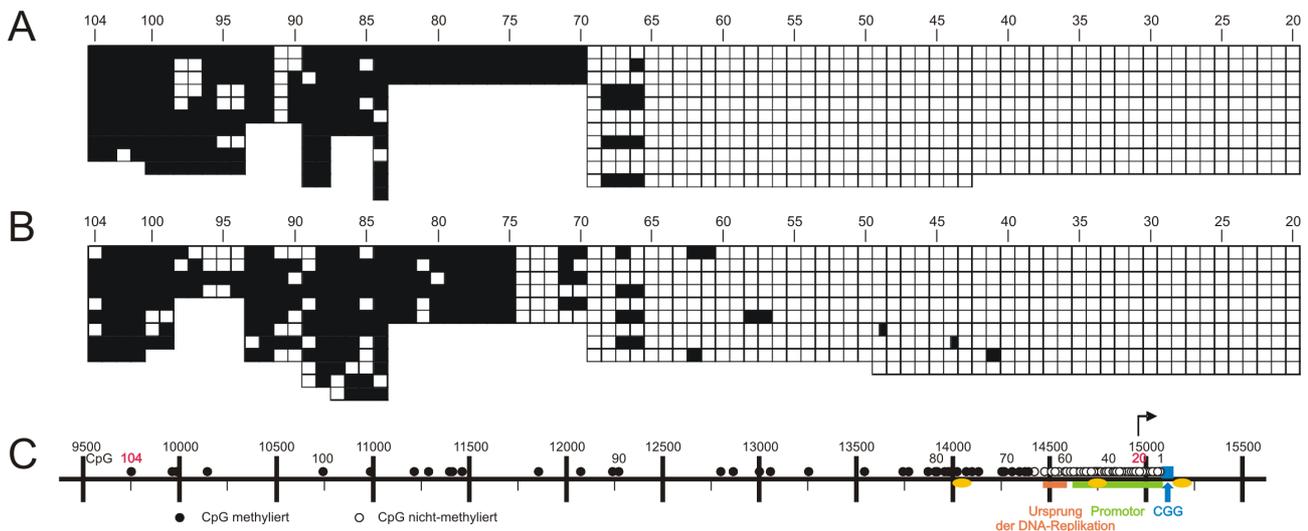


Abbildung 27: Methylierungsgrenze in der *FMR1* 5'-upstream Region in männlichen Vollmutations-Trägern ohne FXS. (A, B) Die Bisulfit-Sequenzierung der genomischen DNA von männlichen HFM wurde für die CpG-Folgen 20 bis 104 durchgeführt. (A) periphere weiße Blutzellen 5106 EBV-transformiert mit $n = \sim 400$, (B) Fibroblastenzellen 94CE422 Telomerase-transformiert mit $n = \sim 330$. (C) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C.

E.13. Vollständiger Verlust der Methylierungsgrenze in Zellen von männlichen FXS Individuen

Das Muster der DNA-Methylierung für die CpG-Folgen 20 bis 104 der *FMRI* Promotor und 5'-*upstream* Region wurde bei verschiedenen männlichen *FXS* Individuen, mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung genomischer DNA aus peripheren weißen Blutzellen (Abbildung 28) und Fibroblastenzellen (Abbildung 29) ermittelt.

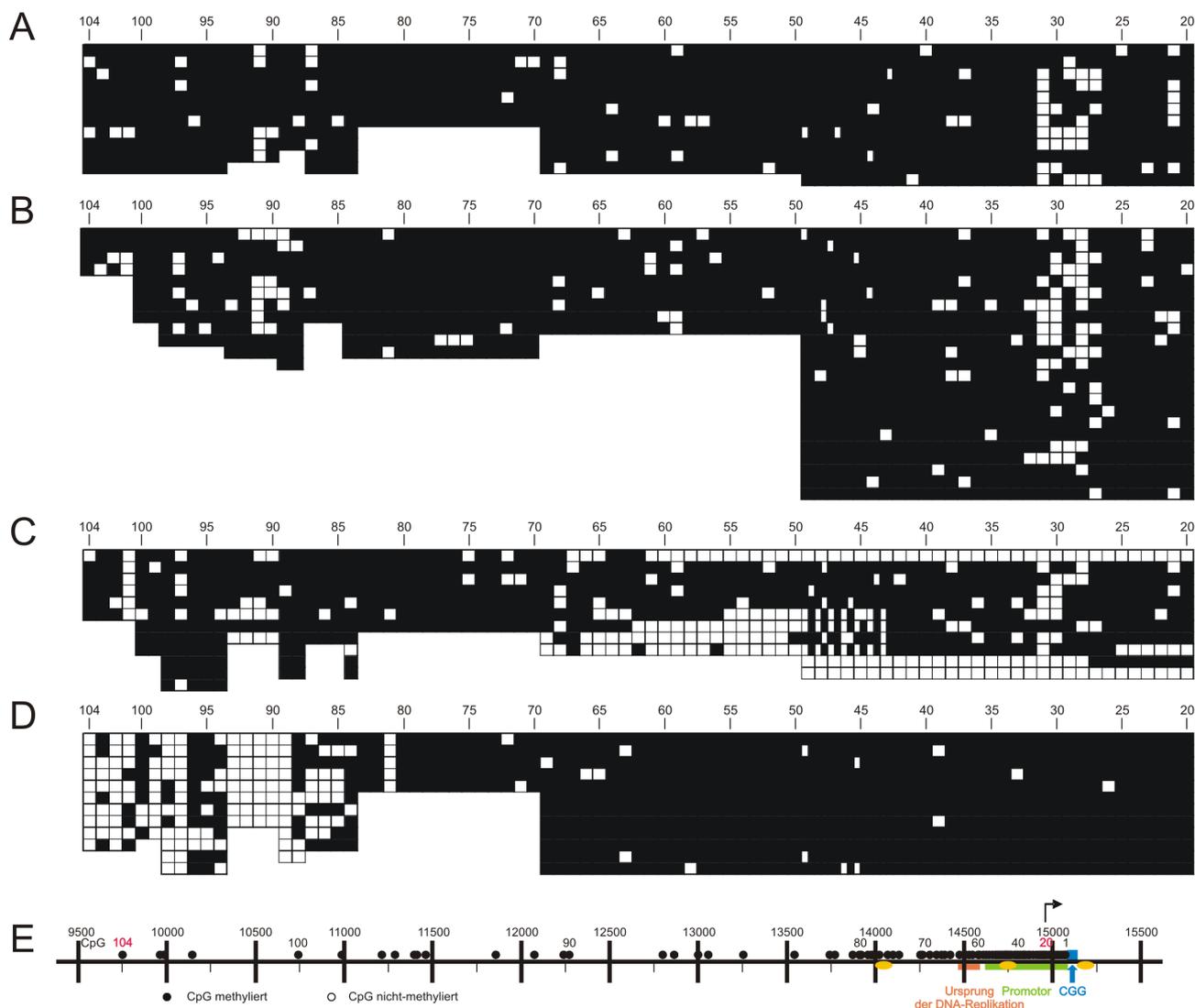


Abbildung 28: Vollständiger Verlust der Methylierungsgrenze in männlichen FXS peripheren weißen Blutzellen. Die Bisulfit-Sequenzierung erfolgte für die CpG-Folgen 20 bis 104. (A) 21181, (B) 14451, (C) 54923, (D) RJK1412 EBV-transformiert mit $n = \sim 500$. (E) Erklärung der Karte siehe Abbildung 11 C, in der alle CpG-Folgen als methyliert dargestellt sind.

Die *FXS* Genome aus den peripheren weißen Blutzellen 21181 (Abbildung 28 A), 14451 (Abbildung 28 B) und den *EBV*-transformierten RJK1412 (Abbildung 28 D) wiesen im Bereich der CpG-Folgen 20 bis 83 eine starke DNA-Methylierung auf. Isoliert nicht-methylierte CpG-Folgen waren vor allem in Umgebung der CpG-Folge 30 bei 21181 und 14451 vorhanden. Die Untersuchung des DNA-Methylierungsmusters zwischen den CpG-Folgen 20 bis 69 der *FXS*

E.14. Nukleotid-Sequenz der FXS Genome im Bereich der FMR1 Methylierungsgrenze und Promotorregion

In FXS Genomen könnte die Methylierungsgrenze oder Promotorregion des *FMR1* Gens möglicherweise durch Mutationen verändert sein. Diese Mutationen könnten die Aufhebung der Methylierungsgrenze in der 5'-*upstream* Region bewirken, so dass es zur Ausbreitung der DNA-Methylierung und der damit verbundenen Stilllegung des *FMR1* Promotors kommt, was dann wiederum den FMRP Verlust beim FXS erklärt. Um die genomische DNA aus den peripheren weißen Blutzellen des FXS Individuums 14451 auf Mutationen hin zu untersuchen, wurde die DNA-Region im Bereich der Nukleotide 13886 bis 14935 (roter Balken in Abbildung 30) in Form von drei Abschnitten mittels PCR amplifiziert, in den Vektor pJET1/blunt kloniert und beide DNA-Stränge von jeweils fünf Klonen sequenziert. Beim anschließenden Vergleich mit der normalen DNA-Sequenz des Menschen (Lander *u. a.*, 2001; Venter *u. a.*, 2001) konnten keine Mutationen im untersuchten Sequenzbereich festgestellt werden, die für den Verlust der Methylierungsgrenze bei FXS Genomen verantwortlich sein könnten (Sequenzierung als Anhang auf den Seiten 107-109). Zur Validierung des Ergebnisses werden zur Zeit noch zwei FXS Genome aus Fibroblastenzellen und ein weiteres FXS Genom aus peripheren Blutzellen sequenziert und auf Mutationen hin analysiert.

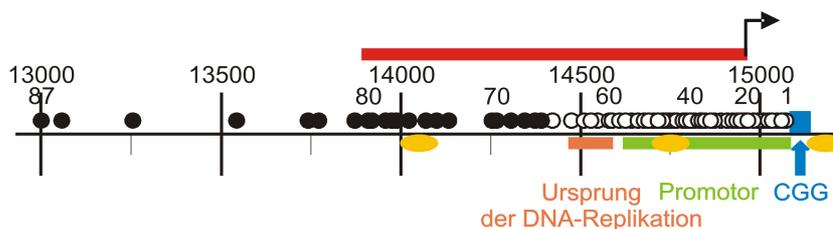


Abbildung 30: Ausschnitt der *FMR1* Karte mit Lage der sequenzierten Region. Die Sequenzierung der FXS Genome erfolgte im Bereich der *FMR1* Methylierungsgrenze und Promotorregion zwischen den Nukleotiden 13886 und 14935 (roter Balken).

E.15. Methylierungsgrenze in der *HTT* 5'-upstream Region des Menschen in der männlichen Zelllinie HCT-116

Eine Methylierungsgrenze konnte sowohl in der 5'-upstream Region des *FMRI* Gens des Menschen als auch in der 5'-upstream Region des *Fmr1* Gens der Maus nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob allgemein eine Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region von Genen mit Trinukleotid-Repetitionen zu finden ist, wurde deshalb die 5'-upstream Region des menschlichen *HTT* Gens untersucht. Das *HTT* (*Huntingtin*) Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3) und umfasst einen Genombereich von 180 kbp mit 67 Exons. *Chorea Huntington* wird verursacht durch instabile Expansion einer CpG-freien 5'-(CAG)_n-3' Repetition im kodierenden Bereich von Exon 1 (Abbildung 31 A), wobei das Trinukleotid 5'-CAG-3' für die Aminosäure Glutamin kodiert. Die normale Anzahl an Trinukleotid-Repetitionen beträgt n = 6-29, bei einer Prämutation n = 29-35 und bei *HD* Patienten n > 35. Der *HTT* Promotor ist GC-reich, enthält Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP2, AP4, NF-AT und SP1, jedoch keine typische TATA und CAAT (5'-CCAAT-3') Box (Holzmann u. a., 2001). Die bisherige Analyse des DNA-Methylierungsmusters der *HTT* Promotor und 5'-upstream Region in HCT-116 für die CpG-Folgen 1 bis 37 (oberes Feld in Abbildung 31 B) und 87 bis 160 (unteres Feld in Abbildung 31 B) ergab eine deutliche Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 116 und 117.

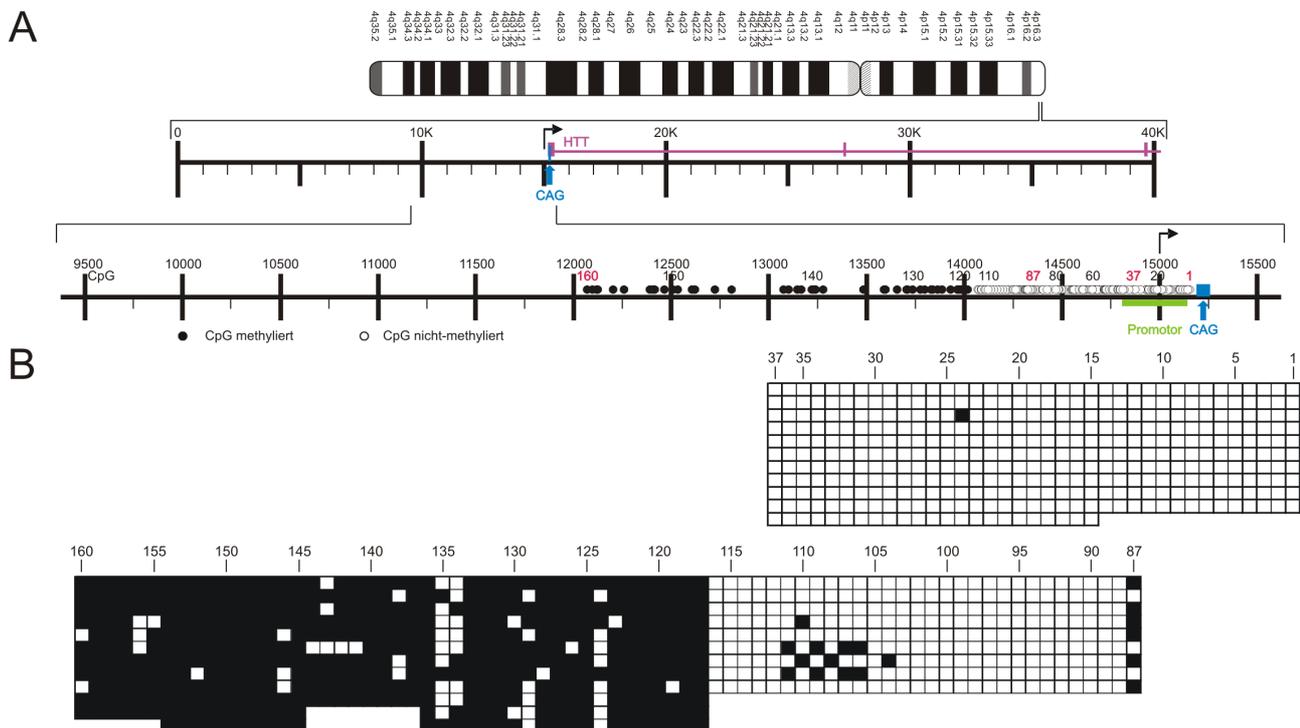


Abbildung 31: Methylierungsgrenze in der *HTT* 5'-upstream Region des Menschen in der männlichen Zelllinie HCT-116. (A) Ideogramm des Chromosoms 4 und bei 4p16.3 das *HTT* Gen des Menschen. Karte mit den ersten 3 Exons (vertikale Balken) und Introns (horizontale Linie) des *HTT* Gens und der 5'-upstream Region mit der 5'-(CAG)_n-3' Repetition. Der Nummerierung der Nukleotide in der Karte erfolgte nach der von NCBI stammenden Sequenz: NC_000004:3.031.206-3.215.485 *H. sapiens* *HTT* Genregion (mit den Nummern der Nukleotide für das Chromosom 4 des Menschen). Die *HTT* Karte des Menschen wurde analog zur Karte des menschlichen *FMRI* Gens in Abbildung 11 C dargestellt. (B) Die Bisulfid-Sequenzierung der genomischen DNA aus HCT-116 erfolgte für die CpG-Folgen 1 bis 37 (oberes Feld) und 87 bis 160 (unteres Feld).

F. Diskussion

F.1. Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des *FMR1* Gens des Menschen

In einem 5500 bp langen Genombereich des Menschen konnte in der 5'-upstream Region des *FMR1* Gens auf dem X-Chromosom (Xq27.3) eine Methylierungsgrenze aufgezeigt werden. Diese Methylierungsgrenze liegt 650 bis 800 Nukleotide vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition und umfasst die CpG-Folgen 65 bis 70. Upstream der Methylierungsgrenze befindet sich ein ungefähr 4900 bp Bereich mit starker DNA-Methylierung, wohingegen downstream der Methylierungsgrenze ein kurzer Bereich von ungefähr 670 bp eine nur sehr schwache DNA-Methylierung aufweist. Der Übergang vom schwach methylierten zum stark methylierten Bereich kann dabei entweder sehr deutlich ausgeprägt sein (Abbildung 18 A) oder eher fließend erfolgen (Abbildung 14 D), was auf eine gewisse Dynamik des Chromatins in diesem Bereich hindeuten könnte. Die Methylierungsgrenze ist konserviert und kommt unabhängig vom Alter in männlichen wie in weiblichen Zellen und Zelllinien vor. Bei den Sequenzen aus den weiblichen peripheren weißen Blutzellen handelt es sich um eine Mischung der *FMR1* Promotor und 5'-upstream Region von beiden X-Chromosomen, wobei vermutlich die stärker methylierten Genome ohne Methylierungsgrenze vom inaktiven X-Chromosom und die Genome mit Methylierungsgrenze vom aktiven X-Chromosom stammen. Für diese Deutung spricht auch das Verhältnis von ungefähr 1:1 der methylierten zu den nicht-methylierten Sequenzen zwischen den CpG-Folgen 20 bis 69 der weiblichen DNA aus den peripheren weißen Blutzellen (Abbildung 15). Eine Methylierungsgrenze in dem selben Bereich konnte ebenso bei verschiedenen adulten und fötalen Geweben nachgewiesen werden. Die DNA aus fötalen Skelettmuskelzellen (Abbildung 16 C) war im Bereich der CpG-Folgen 1 bis 69 stärker methyliert als die DNA aus adulten Skelettmuskelzellen (Abbildung 16 D). Die beobachtete Abnahme der DNA-Methylierung im *FMR1* Promotorbereich könnte auf die DNA-Demethylierung während der Reifung der Skelettmuskelzellen zurückzuführen sein (Hupkes *u. a.*, 2011). Eine Aktivierung der *FMR1* Genexpression in Skelettmuskelzellen könnte bedeuten, dass das FMRP als RNA-Binde- und Transportprotein, nicht nur an der Entwicklung der Neuronen beteiligt ist (Bear *u. a.*, 2004), sondern durch die Interaktion mit dem homologen FXR1 (engl.: fragile X related 1) Protein auch bei der Reifung der Skelettmuskelzellen eine Rolle spielen könnte (Zhang *u. a.*, 1995; Dubé *u. a.*, 2000). Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung durchgeführte DNA-Methylierungsmusteranalysen ermöglichen keine Unterscheidung von 5-mC zu den oxidierten Formen 5-hmC, 5-fC und 5-caC. Die Sequenz-spezifische Bestimmung der verschiedenen Modifikationen am Cytosin und die korrekte Unterscheidung zwischen 5-mC, 5-hmC, 5-fC und 5-caC von einzelnen CpG-Folgen ist technisch noch nicht realisierbar. Einen Hinweis auf den Modifikationsstatus erhält man bisher nur über eine Anreicherung der DNA mittels spezifischer Präzipitation durch Antikörper gegen 5-mC, 5-hmC, 5-fC und 5-caC. Zur Erkennung dieser Modifikationen durchgeführte Analysen, auch in der *FMR1* 5'-upstream Region, könnten in Zukunft Aufschluss darüber geben.

F.2. Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des *Fmr1* Gens der Maus

Obwohl die Nukleotid-Sequenz vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition des homologen *Fmr1* Gens des X-Chromosoms der Maus (A7.1) nur zu 46,7% identisch ist mit dem entsprechenden Bereich des *FMRI* Gens des Menschen, konnte in verschiedenen adulten Geweben der Maus auch dort eine deutliche Methylierungsgrenze durch Bisulfit-Sequenzierung nachgewiesen werden (Abbildung 23). Eine konservierte Methylierungsgrenze, trotz geringer Sequenz-Homologie zwischen zwei Säugetier-Arten, könnte auf eine mögliche funktionell verwandte Chromatinstruktur verweisen.

F.3. Methylierungsgrenze in der 5'-upstream Region des *HTT* Gens des Menschen

Im Gegensatz zur 5'-(CGG)_n-3' Repetition in der 5'-NTR des ersten Exons des *FMRI* Gens, liegt die 5'-(CAG)_n-3' Repetition des *HTT* Gens im kodierenden Bereich des ersten Exons auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3). Die instabile Expansion der 5'-(CAG)_n-3' Repetition führt nicht nur zu einer veränderten mRNA, sondern spiegelt sich auch in einer abgewandelten Proteinstruktur des Huntingtins wieder. Im *HTT* Gen konnte in dem 3250 bp Genombereich 5'-upstream der 5'-(CAG)_n-3' Repetition eine deutliche Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 116 und 117 nachgewiesen werden (Abbildung 31). Eine Methylierungsgrenze könnte auch in der 5'-upstream Region von anderen Genen mit Trinukleotid-Repetitionen (TNR) zu finden sein, was auf eine Beteiligung von Methylierungsgrenzen bei der Expression von Genen mit TNR hinzudeuten könnte.

F.4. Proteine binden im Bereich der Methylierungsgrenze des menschlichen *FMR1* Gens

Die Übergangsregion der Methylierungsgrenze in 5'-upstream Bereich des menschlichen *FMR1* Gens, mit den methylierten CpG-Folgen 66 bis 75 und den nicht-methylierten CpG-Folgen 57 bis 65, enthält eine *AluI* (5'-AGCT-3') Schnittstelle und noch einige weitere bereits beschriebene Sequenz-Motive (Abbildung 20 A). Bei Inkubation der gesamten 630 bp Nukleotid-Sequenz der Übergangsregion, sowohl in der nicht-methylierten als auch der CpG-methylierten Form, mit Kernproteinen konnten eindeutige DNA-Protein-Komplexe beobachtet werden (Abbildung 20 B; Spalten c, i). Die Spezifität dieser Komplex wurde dadurch dokumentiert, dass bei Zugabe von nicht-methylierten und methylierten DNA-Fragmenten im Überschuss die Bindung der Proteine abgefangen wurde, und damit die Entstehung von DNA-Protein-Komplexen mit den DIG-markierten nicht-methylierten beziehungsweise methylierten Proben verhindert werden konnte (Abbildung 20 B). Ein als unspezifischer Kompetitor verwendetes 595 bp Plasmid-Fragment des β -Laktamase Gens eliminierte die größeren Komplexe, aber nicht den Komplex nahe der 1033 bp Bande eines DNA-Größenmarkers (Abbildung 20 B; Spalte f). Der kleinere der beiden Komplexe weist vermutlich eine höhere Spezifität auf.

F.5. Verlust der Methylierungsgrenze in Zellen von männlichen FXS Individuen

Die DNA der männlichen *FXS* nicht-transformierten peripheren weißen Blutzellen 21181 (Abbildung 28 A) und 14451 (Abbildung 28 B) zeichnet sich durch den Verlust der Methylierungsgrenze bei den CpG-Folgen 65 bis 70 aus. Die DNA-Methylierung breitet sich *downstream* bis in den *FMRI* Promotor aus. Die Methylierungsgrenze in der *5'-upstream* Region des *FMRI* Gens könnte durch eine spezifische Chromatinstruktur ausgezeichnet sein, die eine Ausbreitung der DNA-Methylierung *downstream* und über den *FMRI* Promotor hinweg verhindern könnte. Die Destabilisierung der Methylierungsgrenze in *FXS* Genomen spiegelt sich nicht nur in der *downstream* Ausbreitung der DNA-Methylierung und Inaktivierung des *FMRI* Promotors wieder, zudem konnte im normalerweise stark methylierten *upstream* Bereich zwischen den CpG-Folgen 85 bis 104 eine Abnahme der DNA-Methylierung verzeichnet werden. Diese Hypomethylierung ist bei den primären *FXS* Fibroblasten GM07072 (Abbildung 29 A) und GM05848 (Abbildung 29 B), die nicht mit *EBV* oder Telomerase transformiert waren, besonders deutlich nachzuweisen. In *FXS* Genomen kann also eine hypermethylierte *downstream* Region einhergehen mit einer hypomethylierten *upstream* Region. Da in den nicht-transformierten Fibroblastenzellen, aber nicht in den nicht-transformierten peripheren weißen Blutzellen, ein Verlust der DNA-Methylierung *upstream* verzeichnet wurde, könnte möglicherweise auch die Art des Zelltyps und der Zellkultivierung eine Rolle spielen. Die Methylierungsgrenze könnte stabilisierend in beide Richtungen wirken, also nicht nur die Ausbreitung der DNA-Methylierung *downstream* verhindern, sondern zusätzlich auch die DNA-Methylierung *upstream* aufrechterhalten. Mutationen in der *5'-upstream* Region des *FMRI* Gens könnten die Aufhebung der Methylierungsgrenze bewirken. Die durchgeführte Sequenzierung der *5'-upstream* Region im Bereich der Nukleotide 13886 bis 14935 des bisher analysierten *FXS* Genoms ergab keine Mutationen oder Veränderungen verglichen mit der normalen DNA-Sequenz des Menschen (Lander *u. a.*, 2001; Venter *u. a.*, 2001), die den Verlust der Methylierungsgrenze erklären könnten. Die Bisulfit-Sequenzierung der männlichen *FXS* genomischen DNA 54923 aus peripheren weißen Blutzellen ergab im Bereich der CpG-Folgen 20 bis 69 ein Mosaik aus methylierten und nicht-methylierten DNA-Molekülen (Abbildung 28 C). Dieses Methylierungsmosaik bestätigt die Möglichkeit, dass in einigen *FXS* Individuen durchaus auch Zellen mit Prämutations-Allelen oder nicht-methylierten Vollmutations-Allelen vorkommen können (Oberle *u. a.*, 1991; Genç *u. a.*, 2000). In diesem seltenen Fall könnte der *FXS* verursachende Verlust des FMRP, durch Stilllegung des *FMRI* Promotors nach Destabilisierung der DNA-Methylierungsgrenze und die damit verbundene Ausbreitung der DNA-Methylierung, zum Teil auch durch Inhibierung der Translation hervorgerufen worden sein.

F.6. Isoliert nicht-methylierte CpG-Folgen in de novo methylierter DNA

In der DNA von *FXS* Individuen wurden, im fast vollständig *de novo* methylierten *FMRI* Promotorbereich, isoliert nicht-methylierte CpG-Folgen gefunden (Abbildungen 28, 29), von denen scheinen einige, vor allem im Bereich der CpG-Folge 30, mit Bindestellen für Transkriptionsfaktoren einherzugehen (Schwemmle *u. a.*, 1997; Pietrobono *u. a.*, 2002). Solche isoliert nicht-methylierten CpG-Folgen waren auch in dem fast vollständig *de novo* methylierten *Adenovirus Typ 12* Genom in transformierten Hamsterzelllinien zu finden (Hochstein *u. a.*, 2007). Obwohl die Genome von Säugetieren deutliche Unterschiede zu den integrierten viralen Genomen aufweisen, konnte man in den stark *de novo* methylierten Bereichen eine oder mehrere isoliert nicht-methylierte CpG-Folgen ausmachen, was charakteristisch für eine *de novo* methylierte DNA in Säugerzellen sein könnte. In den *in vitro* prämethylierten *FMRI 5'-upstream* Regionen genomischer und Plasmid-DNA, die mittels bakterieller *SssI*-Methylase ebenfalls *de novo* methyliert wurden, traten bei der Analyse der DNA-Methylierungsmuster jedoch keine dieser isoliert nicht-methylierten CpG-Folgen auf (Abbildung 13 B, D, E). Nur bei einer *de novo* Methylierung in lebenden Säugerzellen und Organismen, aber nicht während der *in vitro* Methylierung durch die bakterielle *SssI*-Methylase, konnten solche isoliert nicht-methylierten CpG-Folgen beobachtet werden. Möglicherweise verhindert bei den funktionsfähigen Chromosomen in Säugetieren eine spezifische Chromatinstruktur und/oder Proteinbindung die *de novo* Methylierung an der entsprechenden Stelle.

F.7. Die Genome von Prämutations-Überträgern und weiblichen Vollmutations-Trägern

Sowohl in weiblichen als auch in männlichen Prämutations-Überträgern konnte eine stabile Methylierungsgrenze nachgewiesen werden (Abbildungen 24, 25). Die DNA-Methylierungsmuster in peripheren weißen Blutzellen von männlichen Prämutations-Überträgern wiesen keine Unterschiede zu den männlichen Zellen mit Wildtyp-Allel auf (Vergleich der Abbildungen 25 und 14 A, B), ebenso waren auch die DNA-Methylierungsmuster in peripheren weißen Blutzellen von weiblichen Prämutations-Überträgern und weiblichen Zellen mit Wildtyp-Allel nahezu identisch (Vergleich der Abbildungen 24 und 15). Eine Prämutation führt offenbar nicht zu einer veränderten DNA-Methylierung in der *FMRI 5'-upstream* Region. Im Gegensatz dazu war in weiblichen Vollmutations-Trägern die ursprüngliche Methylierungsgrenze nur noch in wenigen DNA-Molekülen intakt (Abbildung 26). Vermutlich findet, während der X-Chromosom Inaktivierung in den heterozygoten weiblichen Vollmutations-Trägerinnen, keine bevorzugte Stilllegung des X-Chromosoms mit Vollmutations-Allel statt.

F.8. Destabilisierung der Methylierungsgrenze in transformierten Zelllinien

Trotz Transformation der peripheren weißen Blutzellen ROS31 und Fibroblastenzellen 86RD540 durch *Epstein-Barr-Virus* (*EBV*) oder Telomerase blieb die Methylierungsgrenze in den nicht-*FXS* Genomen erhalten und verhinderte eine *downstream* Ausbreitung der DNA-Methylierung (Abbildung 14 C, E). Im Gegensatz dazu führte die *EBV*-Transformation von peripheren weißen Blutzellen, sowohl im nicht-*FXS* Genom ROS31 als auch im *FXS* Genom RJK1412, zum Verlust der DNA-Methylierung in der *upstream* Region zwischen den CpG-Folgen 84 und 104 (Abbildungen 14 C, 28 D). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, konnte erst kürzlich Instabilität von DNA-Methylierungsmustern für einige Regionen des menschlichen Genoms in *EBV*-transformierten und in Zellkultur gehaltenen peripheren weißen Blutzellen nachgewiesen werden (Grafodatskaya u. a., 2010). Die DNA-Methylierung des zellulären Genoms könnte durch das fremde *Epstein-Barr-Virus* Genom verändert worden sein. Solche Veränderungen zellulärer DNA-Methylierungsmuster durch integrierte fremde DNA, auch in entfernten Regionen zur Integrationsstelle, konnten bereits auch in Säugerzellen gezeigt werden, die für *Adenovirus Typ 12*, *Bakteriophage Lambda* und Plasmid-DNA transgen waren (Heller u. a., 1995; Doerfler, 1996; Remus u. a., 1999; Müller u. a., 2001; Doerfler, 2011). Das nicht-*FXS* Genom 86RD540 aus Fibroblastenzellen zeigte trotz Telomerase-Transformation keine Abnahme der DNA-Methylierung in der *upstream* Region (Abbildung 14 E). Möglicherweise ist die Stabilität der Methylierungsgrenze auch abhängig vom Integrationsort der Fremd-DNA. Die *FXS* Genome aus den Fibroblastenzellen GM07072 und GM05848 wiesen hingegen auch ohne Transformation einen hypomethylierten Bereich zwischen den CpG-Folgen 85 bis 104 auf (Abbildung 29 A, B). Während der langfristigen Kultivierung der *FXS* Fibroblastenzellen könnte die expandierte 5'-(CGG)_n-3' Repetition vielleicht als fremde oder invasive DNA erkannt worden sein, und zu Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster der *upstream* Region zwischen den CpG-Folgen 85 bis 104 geführt haben.

F.9. Die Genome von männlichen Vollmutations-Trägern ohne FXS

Die beiden untersuchten männlichen Vollmutations-Träger (*high-functioning males*, HFM), ohne *FXS* aber mit expandierter 5'-(CGG)_n-3' Repetition über den kritischen Grenzwert, wiesen ebenfalls eine stabile Methylierungsgrenze in der 5'-*upstream* Region und einen nicht-methylierten aktiven *FMRI* Promotor auf (Abbildung 27). Zudem konnte in den HFM Genomen aus den *EBV*-transformierten peripheren weißen Blutzellen 5106 und Telomerase-transformierten Fibroblastenzellen 94CE422 keine hypomethylierte *upstream* Region nachgewiesen werden (Abbildung 27). Eine stabile Methylierungsgrenze in den *high-functioning males* scheint von wesentlicher Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des *FMRI* Promotors zu sein.

F.10. Vergleich mit Expansionen anderer Trinukleotid-Repetitionen

Die Aufrechterhaltung der Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-*upstream* Region könnte somit ein wichtiger Faktor für den Schutz gegen das *FXS* sein. Eine spezifische Chromatinstruktur im Bereich der Methylierungsgrenze könnte möglicherweise für die Stabilität verantwortlich sein und eine Ausbreitung der DNA-Methylierung über die Promotorregion des *FMRI*, *Fmr1* und *HTT* Gens verhindern. Die in der 3'-NTR des *Myotonin-Proteinkinase* (*DMPK*; [MIM 605377]) Gens auf Chromosom 19q13 lokalisierte 5'-(CTG)_n-3' Repetition scheint *upstream* ebenfalls methyliert zu sein (Shaw *u. a.*, 1993; Steinbach *u. a.*, 1998). Die allerdings in diesen Systemen nur mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen durchgeführten Untersuchungen könnten auf eine Methylierungsgrenze hindeuten. In den Genomen *myotoner Dystrophie Typ 1* (*DMD*; [MIM 160900]) Patienten könnte es dann aufgrund des Verlustes der Methylierungsgrenze dann ebenfalls zur Ausbreitung der DNA-Methylierung kommen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass in Geweben von *DMD* Patienten die expandierte ebenfalls CpG-freie 5'-(CTG)_n-3' Repetition als weitere Barriere fungiert um die Ausbreitung der abnormalen CpG-Methylierung in Richtung *downstream* zu verhindern (López Castel *u. a.*, 2011). Im Gegensatz dazu beinhaltet die DNA-Methylierung in *FXS* Genomen auch die CpG-Folgen der expandierten 5'-(CGG)_n-3' Repetition (Genç *u. a.*, 2000) und möglicherweise auch der *downstream* Regionen.

F.11. Überlegungen zum Mechanismus der Methylierungsgrenze

Welcher Mechanismus für die Stabilität oder Instabilität der Methylierungsgrenze und der 5'-(CGG)_n-3' Repetition verantwortlich ist, konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden. Der Nachweis von spezifischen DNA-Protein-Komplexen zwischen der Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-*upstream* Region und Kernproteinen aus menschlichen Zellen könnte zu der Schlussfolgerung führen, dass möglicherweise Proteinbindungen für die Aufrechterhaltung der Methylierungsgrenze zuständig sind. Bei den folgenden Ausführungen handelt es sich um mögliche Interpretationen der Daten verschiedener Laboratorien, die deshalb als zum Teil hypothetische Folgerungen betrachtet werden müssen. Die Ausbreitung der DNA-Methylierung wird durch spezifische Zinkfinger Proteine verhindert, da in den Grenzregionen von DNA-Methylierung die Bindestellen für Zinkfinger Proteine vermehrt vorkommen (Fan *u. a.*, 2007). Ebenso wie die Ausbreitung von Heterochromatin durch die als Barrieren fungierenden Insulator-Elemente verhindert wird (Wallace & Felsenfeld, 2007), können Insulator-Elemente auch die Ausbreitung der DNA-Methylierung über die Methylierungsgrenze hinweg verhindern. Das bei Wirbeltieren vorkommende Zinkfinger Protein CTCF ist nicht nur an der Stabilisierung von Trinukleotid-Repetitionen beteiligt (Libby *u. a.*, 2008), sondern sorgt zusätzlich auch für eine stabile Methylierungsgrenze in der *FMRI* 5'-*upstream* Region. Die Lage der CTCF-Bindestellen im *FMRI* Gen (Abbildung 11 C) (Ladd *u. a.*, 2007) kann ein Hinweis darauf sein, da nicht nur die 5'-(CGG)_n-3' Repetition, sondern auch die Methylierungsgrenze flankiert wird von CTCF-Bindestellen. Eine dieser CTCF-Bindestellen liegt auch tatsächlich in der Übergangsregion der Methylierungsgrenze, die in dieser Arbeit auf eine spezifische Bindung von Proteinen untersucht worden ist (Abbildungen

19 C, 20). Auch andere Trinukleotid-Repetitionen sind ebenfalls mit CTCF-Bindestellen assoziiert (Filippova *u. a.*, 2001; Cho *u. a.*, 2005), und weisen auch, wie die 5'-(CGG)_n-3' Repetition, die bidirektionale Transkription einer *Sense* und *Antisense* mRNA über die Trinukleotid-Repetition auf (Cho *u. a.*, 2005; Moseley *u. a.*, 2006; Ladd *u. a.*, 2007). Eine ganze Reihe von Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung von Methylierungsgrenzen, CTCF-Bindung und Antisense mRNA bei der Expression von Genen mit Trinukleotid-Repetition hin. Ein möglicher Mechanismus, der dabei eine Rolle spielen kann, soll folgend erklärt werden. Im normalen *FMRI* Wildtyp-Allel kommt es durch Bindung von CTCF zur Ausbildung von Chromatin-Schleifen, die zum einen die 5'-(CGG)_n-3' Repetition stabilisieren und zum anderen zur Entstehung der Methylierungsgrenze führen. Bei Expansion der Repetition vergrößert sich auch die Schleife. Die Vergrößerung der Schleifen ermöglicht den Transkriptionsfaktoren einen besseren Zugang zum Promotor und führt zu einer verstärkten Genexpression der Prämutations-Allele und nicht-methylierten Vollmutations-Allele (Tassone *u. a.*, 2000a, 2000b, 2000c, 2001; Kenneson *u. a.*, 2001). Die expandierte Repetition der *FMRI* und *ASFMRI* mRNA bildet eine stabile Haarnadel-Struktur aus dsRNA (Sobczak *u. a.*, 2003), die dann vom Dicer zu miRNA prozessiert wird. In den *high-functioning male* Genomen liegt das Chromatin möglicherweise in Form von Schleifen vor, dadurch bleibt die Methylierungsgrenze stabil und die miRNAs können nicht binden und zur Gen-Stillegung führen. In *FXS* Patienten kann in einen unbekanntem Vorgang die Bindung von CTCF und die damit verbundene Ausbildung der Schleifen verhindert worden sein. Die Aufhebung der Methylierungsgrenze und Rekrutierung von *de novo* DNA-Methyltransferasen, durch Bindung der miRNAs an die DNA, können mögliche Konsequenzen des Fehlens der Chromatin-Schleifen sein, und zur DNA-Methylierung des Promotors und Abschaltung des *FMRI* Gens im *FXS* führen.

G. Zusammenfassung

Das mit der Folat-sensitiven fragilen Stelle *FRAXA* assoziierte *fragile X mentale Retardierung Gen 1 (FMRI)* liegt auf dem menschlichen X-Chromosom (Xq27.3). Die instabile Amplifikation einer 5'-(CGG)_n-3' Repetition in der 5'-nicht-translatierten Region des ersten Exons des *FMRI* Gens kann zu drei phänotypisch verschiedenen Krankheiten führen, zur *fragilen X assoziierten vorzeitigen Ovarialinsuffizienz*, zum *fragilen X assoziierten Tremor/Ataxie Syndrom* und zum *fragilen X Syndrom (FXS)*.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte erstmals eine deutliche Methylierungsgrenze in einem Bereich von 650 bis 800 Nukleotiden stromaufwärts der 5'-(CGG)_n-3' Repetition des *FMRI* Gens aufgezeigt werden. Diese durch Bisulfit-Sequenzierung identifizierte Methylierungsgrenze ist konserviert und kommt unabhängig vom Alter, Geschlecht und Entwicklungsstadium in allen menschlichen Zelltypen und Zelllinien vor. Die Übergangsregion der Methylierungsgrenze im 5'-gelegenen Bereich stromaufwärts des menschlichen *FMRI* Gens bindet spezifisch Kernproteine.

Auch in verschiedenen Geweben der Maus konnte eine deutliche Methylierungsgrenze nachgewiesen werden, obwohl die Nukleotid-Sequenz vor der 5'-(CGG)_n-3' Repetition des homologen *Fmr1* Gens des X-Chromosoms der Maus (A7.1) mit dem menschlichen *FMRI* Gen nur zu 46,7% identisch ist.

Der Bereich stromaufwärts des menschlichen *Huntingtin* Gens (*HTT*) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 (4p16.3), mit einer 5'-(CAG)_n-3' Repetition im kodierenden Bereich des ersten Exons, weist ebenfalls eine deutliche Methylierungsgrenze auf.

Die Transformation von menschlichen Zellen ohne *FXS* durch *Epstein-Barr-Virus* oder Telomerase führt nicht zur Destabilisierung der Methylierungsgrenze und zur Ausbreitung der DNA-Methylierung in Richtung des *FMRI* Promotors. Die eingebrachte fremde DNA führte jedoch in einem unbekanntem Mechanismus zu einem Verlust der DNA-Methylierung in dem ursprünglich stark methylierten Bereich, der weiter stromaufwärts zur Methylierungsgrenze liegt. Eine ähnliche Abnahme der Methylierung wurde auch in Zellkultur wachsenden, nicht-transformierten *FXS* Fibroblastenzellen beobachtet.

Die DNA von *FXS* Individuen zeichnet sich durch den Verlust der Methylierungsgrenze und Ausbreitung der DNA-Methylierung stromabwärts bis in den *FMRI* Promotor aus. Die Analyse der *FXS* Genome ergab keine Mutationen oder Veränderungen, verglichen mit der normalen DNA-Sequenz des Menschen. Der *FXS*-assoziierte Verlust der Methylierungsgrenze kann folglich nicht einfach durch eine mutierte Nukleotid-Sequenz erklärt werden.

In dem fast vollständig *de novo* methylierten *FMRI* Promotorbereich in *FXS* Individuen wurden isoliert nicht-methylierte CpG-Folgen gefunden. Diese isoliert nicht-methylierten CpG-Folgen sind nur bei einer *de novo* Methylierung in lebenden Säugerzellen und Organismen nachweisbar, aber nicht während der *in vitro* Methylierung der gleichen *FMRI* Sequenz durch die bakterielle *SssI*-Methylase.

In weiblichen Vollmutations-Trägerinnen war die ursprüngliche Methylierungsgrenze nur noch in wenigen DNA-Molekülen intakt. Bei männlichen wie weiblichen Prämutations-Überträgern konnte eine stabile Methylierungsgrenze nachgewiesen werden, ebenso in den männlichen Vollmutations-Trägern ohne *FXS* aber mit expandierter 5'-(CGG)_n-3' Repetition, den sogenannten *high-functioning males* (HFM).

Eine stabile Methylierungsgrenze in den HFM scheint von wesentlicher Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des *FMRI* Promotors zu sein. Die Wichtigkeit der Methylierungsgrenze wird zudem unterstützt durch den Verlust der Methylierungsgrenze im regulatorischen Bereich des Entwicklungs-relevanten menschlichen *FMRI* Gens im *fragilen X Syndrom*. Eine spezifische Chromatinstruktur im Bereich der Methylierungsgrenze könnte für die Stabilität verantwortlich sein und eine Ausbreitung der DNA-Methylierung über die Promotorregion des *FMRI*, *Fmr1* und *HTT* Gens verhindern. Die Aufrechterhaltung der Methylierungsgrenze des *FMRI* Gens könnte somit ein wichtiger Faktor für den Schutz gegen das *fragile X Syndrom* sein.

H. Abstract

The folate-sensitive fragile site *FRAXA* associated with the *fragile X mental retardation gene 1* (*FMRI*) is located on human X chromosome (Xq27.3). The unstable expansion of a 5'-(CGG)_n-3' repeat in the 5'-untranslated region of the first exon of the *FMRI* gene can lead to three phenotypically different diseases, the *fragile X associated premature ovarian insufficiency*, the *fragile X associated tremor/ataxia syndrome* and the *fragile X syndrome* (*FXS*).

This thesis work revealed for the first time a distinct methylation boundary at a genome location 650 to 800 nucleotides upstream of the 5'-(CGG)_n-3' repeat in the *FMRI* gene. This boundary, identified by bisulfite sequencing, is conserved and present in all human cell types and cell lines, irrespective of age, gender, and developmental stage. The transition sequence of the methylation boundary in the 5'-upstream region of the human *FMRI* gene binds specifically nuclear proteins.

The same distinct methylation boundary is also found in different mouse tissues, although the nucleotide sequence upstream of the 5'-(CGG)_n-3' repeat between the mouse *Fmr1* gene on chromosome X (A7.1) and the human *FMRI* gene shows only 46.7% homology.

The upstream region of the human *huntingtin* gene (*HTT*) located on the short arm of chromosome 4 (4p16.3) with a 5'-(CGG)_n-3' repeat in the coding region of the first exon, also carries a distinct methylation boundary.

Transformation of human cells without *FXS* by *Epstein-Barr-Virus* or the telomerase gene does not compromise the stability of the methylation boundary. Hence methylation does not spread into the *FMRI* promoter. By an unknown mechanism, the introduction of foreign DNA leads to the loss of methylation in the usually hypermethylated region far upstream of the methylation boundary. A similar decrease of the methylation was also observed in non-transformed *FXS* fibroblasts, growing in culture.

In genomes of *FXS* individuals the methylation boundary is lost, the methylation spreads downstream and extends across the *FMRI* promoter. The analysis of *FXS* genomes did not reveal mutations or deviations when compared to the standard human DNA sequence. Thus, the *FXS*-associated loss of the methylation boundary cannot be simply explained by a mutated nucleotide sequence.

In the almost completely *de novo* methylated *FMRI* promoter region in *FXS* individuals, isolated unmethylated CpG dinucleotides have been observed. These isolated unmethylated CpG dinucleotides arise only during *de novo* methylation in living cells and organisms but not during *in vitro* methylation of the same *FMRI* sequence by the bacterial *SssI* methylase.

In female full mutation individuals the methylation boundary was still intact in only a few genomes. In male and female premutation carriers a stable methylation boundary was also preserved, as well as in high-functioning males (HFM) with an expansion of the 5'-(CGG)_n-3' repeat to full mutation lengths but without the *FXS* phenotype.

A stable methylation boundary in HFM seems to be necessary for the functionality of the *FMRI*

promoter. The significance of the methylation boundary is also supported by its deletion in the regulatory region of the developmentally important human *FMRI* gene in the *fragile X syndrome*. The stability of the methylation boundary could be preserved by a specific chromatin structure in the boundary region that prevents methylation spreading into the promoter region of the *FMRI*, *Fmr1* and *HTT* gene. The maintenance of the methylation boundary in the *FMRI* 5'-upstream region is most likely an important factor in the protection against the *fragile X syndrome*.

I. Literaturverzeichnis

- Alberter B & Ensser A (2007) Histone Modification Pattern of the T-Cellular Herpesvirus Saimiri Genome in Latency. *J Virol* **81**: 2524-2530
- Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates GP, Lin CS, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H & Altherr M (1994) Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat. Cell Mol. Genet.* **20**: 27-38
- Antequera F & Bird A (1993) CpG islands. *EXS* **64**: 169-185
- Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D & Warren ST (1993a) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**: 563-566
- Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL & Warren ST (1993b) Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat. Genet* **4**: 244-251
- Attwood JT, Yung RL & Richardson BC (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 241-257
- Barlow DP (1995) Gametic imprinting in mammals. *Science* **270**: 1610-1613
- Barlow DP, Stöger R, Herrmann BG, Saito K & Schweifer N (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* **349**: 84-87
- Barr ML & Bertram EG (1949) A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* **163**: 676
- Bartolomei MS, Zemel S & Tilghman SM (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* **351**: 153-155
- Bear MF, Huber KM & Warren ST (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* **27**: 370-377
- Bell AC & Felsenfeld G (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**: 482-485
- Bell AC, West AG & Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**: 387-396
- Bell AC, West AG & Felsenfeld G (2001) Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* **291**: 447-450
- Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY & Blau HM (2010) Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* **463**: 1042-1047
- Bird AP (1984) DNA methylation--how important in gene control? *Nature* **307**: 503-504
- Bontekoe CJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, van der Linde H, Lans H, de Lange D, Hirst MC & Oostra BA (2001) Instability of a (CGG)₉₈ repeat in the Fmr1 promoter. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 1693-1699
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA & Willems PJ (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.* **3**: 31-35
- Bourc'his D & Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**: 96-99
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B & Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-2539
- Boyd VL & Zon G (2004) Bisulfite conversion of genomic DNA for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increased throughput. *Anal. Biochem.* **326**: 278-280
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J & Brattain DE (1981) Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* **41**: 1751-1756
- Brenner C & Fuks F (2006) DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**: 45-

- Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S & Rastan S (1992) The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* **71**: 515-526
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R & Willard HF (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**: 38-44
- Brown SE, Fraga MF, Weaver ICG, Berdasco M & Szyf M (2007) Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics* **2**: 54-65
- Brylawski BP, Chastain PD 2nd, Cohen SM, Cordeiro-Stone M & Kaufman DG (2007) Mapping of an origin of DNA replication in the promoter of fragile X gene FMR1. *Exp. Mol. Pathol.* **82**: 190-196
- Cannon SV, Cummings A & Teebor GW (1988) 5-Hydroxymethylcytosine DNA glycosylase activity in mammalian tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**: 1173-1179
- Carthew RW & Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642-655
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ & Hammond SM (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* **16**: 2491-2496
- Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J & Warren ST (2003) Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 3295-3305
- Chandler JH, Reed TE & Dejong RN (1960) Huntington's chorea in Michigan. III. Clinical observations. *Neurology* **10**: 148-153
- Cheever A & Ceman S (2009) Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *RNA* **15**: 362-366
- Cheng X, Hashimoto H, Horton JR & Zhang X (2010) Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals. In *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics* S 9-24. Academic Press
- Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA & Neri G (1998) In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 109-113
- Cho DH, Thienes CP, Mahoney SE, Analau E, Filippova GN & Tapscott SJ (2005) Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol. Cell* **20**: 483-489
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL & Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**: 2990-2997
- Cleary JD & Pearson CE (2005) Replication fork dynamics and dynamic mutations: the fork-shift model of repeat instability. *Trends Genet.* **21**: 272-280
- Cleary JD, Nichol K, Wang Y-H & Pearson CE (2002) Evidence of cis-acting factors in replication-mediated trinucleotide repeat instability in primate cells. *Nat. Genet.* **31**: 37-46
- Clemson CM, McNeil JA, Willard HF & Lawrence JB (1996) XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* **132**: 259-275
- Cornett J, Cao F, Wang C-E, Ross CA, Bates GP, Li S-H & Li X-J (2005) Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat. Genet.* **37**: 198-204
- Cortázar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E, Wirz A, Schuermann D, Jacobs AL, Siegrist F, Steinacher R, Jiricny J, Bird A & Schär P (2011) Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* **470**: 419-423
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, *u. a.* (2011) Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**: 67-79
- Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel A-M, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B & Khandjian EW (2007) The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum. Mol. Genet.* **16**: 3047-3058
- Debacker K & Kooy RF (2007) Fragile sites and human disease. *Hum. Mol. Genet.* **16 Spec No. 2**: R150-158

- DeChiara TM, Robertson EJ & Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**: 849-859
- Deissler H, Behn-Krappa A & Doerfler W (1996) Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that bind specifically to the unstable tandem repeat (CGG)_n in the human FMR1 gene. *J. Biol. Chem* **271**: 4327-4334
- Deissler H, Wilm M, Genç B, Schmitz B, Ternes T, Naumann F, Mann M & Doerfler W (1997) Rapid protein sequencing by tandem mass spectrometry and cDNA cloning of p20-CGGBP. A novel protein that binds to the unstable triplet repeat 5'-d(CGG)_n-3' in the human FMR1 gene. *J. Biol. Chem* **272**: 16761-16768
- Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Eymin B, Khochbin S & Gazzeri S (2008) Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**: 7237-7245
- Devys D, Biancalana V, Rousseau F, Boué J, Mandel JL & Oberlé I (1992) Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am. J. Med. Genet.* **43**: 208-216
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP & Mandel JL (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat. Genet.* **4**: 335-340
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP & Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**: 1990-1993
- Dion V & Wilson JH (2009) Instability and chromatin structure of expanded trinucleotide repeats. *Trends Genet.* **25**: 288-297
- Doerfler W (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 93-124
- Doerfler W (1991) Patterns of DNA methylation--evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **372**: 557-564
- Doerfler W (1996) A new concept in (adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**: F79-99
- Doerfler W (2011) Epigenetic consequences of foreign DNA insertions: de novo methylation and global alterations of methylation patterns in recipient genomes. *Rev. Med. Virol.* **21**: 336-346
- Drouin R, Angers M, Dallaire N, Rose TM, Khandjian EW & Rousseau F (1997) Structural and functional characterization of the human FMR1 promoter reveals similarities with the hnRNP-A2 promoter region. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 2051-2060
- Dubé M, Huot ME & Khandjian EW (2000) Muscle specific fragile X related protein 1 isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast. *BMC Genet.* **1**: 4
- Dyer RB & McMurray CT (2001) Mutant protein in Huntington disease is resistant to proteolysis in affected brain. *Nat. Genet.* **29**: 270-278
- Eberhart DE, Malter HE, Feng Y & Warren ST (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 1083-1091
- Eberhart A & Becker PB (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**: 224-229
- Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, Richards CS, Ward PA & Nelson DL (1994) Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat. Genet.* **8**: 88-94
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA & Nelson DL (1993) Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet* **2**: 1147-1153
- Engel N, Thorvaldsen JL & Bartolomei MS (2006) CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus. *Hum. Mol. Genet.* **15**: 2945-2954
- Fan S, Fang F, Zhang X & Zhang MQ (2007) Putative zinc finger protein binding sites are over-represented in the boundaries of methylation-resistant CpG islands in the human genome. *PLoS ONE* **2**: e1184
- Fang J, Feng Q, Ketel CS, Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Simon JA & Zhang Y (2002) Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.* **12**: 1086-1099
- Feinberg AP & Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal

I. Literaturverzeichnis

- counterparts. *Nature* **301**: 89-92
- Fernández-López L, Piñeiro E, Marcos R, Velázquez A & Surrallés J (2004) Induction of instability of normal length trinucleotide repeats within human disease genes. *J. Med. Genet.* **41**: e3
- Filippova GN (2008) Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**: 337-360
- Filippova GN, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ, Moore JM, Klesert TR, Lobanenko VV & Tapscott SJ (2001) CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat. Genet.* **28**: 335-343
- Finoux A-L & Chartrand P (2008) Oncogenic and tumour suppressor microRNAs. *Med Sci (Paris)* **24**: 1049-1054
- 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. U.S.A* **89**: 1827-1831
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr & Warren ST (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**: 1047-1058
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L & Kouzarides T (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat. Genet.* **24**: 88-91
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R & Kouzarides T (2003a) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **31**: 2305-2312
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP & Kouzarides T (2003b) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 4035-4040
- 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. *Nucleic Acids Res.* **11**: 6883-6894
- Garzon R, Calin GA & Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* **60**: 167-179
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S & Saudou F (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**: 127-138
- Genç B, Müller-Hartmann H, Zeschnik M, Deissler H, Schmitz B, Majewski F, von Gontard A & Doerfler W (2000) Methylation mosaicism of 5'-(CGG)(n)-3' repeats in fragile X, premutation and normal individuals. *Nucleic Acids Res* **28**: 2141-2152
- Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M & Carell T (2010) Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS ONE* **5**: e15367
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR & Feinberg AP (1985) Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* **228**: 187-190
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE & Bestor TH (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**: 395-398
- Grafodatskaya D, Choufani S, Ferreira JC, Butcher DT, Lou Y, Zhao C, Scherer SW & Weksberg R (2010) EBV transformation and cell culturing destabilizes DNA methylation in human lymphoblastoid cell lines. *Genomics* **95**: 73-83
- Gray SJ, Gerhardt J, Doerfler W, Small LE & Fanning E (2007) An origin of DNA replication in the promoter region of the human fragile X mental retardation (FMR1) gene. *Mol. Cell. Biol* **27**: 426-437
- Gu T-P, Guo F, Yang H, Wu H-P, Xu G-F, Liu W, Xie Z-G, Shi L, He X, Jin S-gi, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabó PE, Pfeifer GP, Li J & Xu G-L (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* **477**: 606-610
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B & Hagerman PJ (2001) Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* **57**: 127-130
- Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J & Surani MA (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* **117**: 15-23

- Handa V, Goldwater D, Stiles D, Cam M, Poy G, Kumari D & Usdin K (2005) Long CGG-repeat tracts are toxic to human cells: implications for carriers of Fragile X premutation alleles. *FEBS Lett.* **579**: 2702-2708
- Handa V, Saha T & Usdin K (2003) The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer. *Nucleic Acids Res.* **31**: 6243-6248
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM & Tilghman SM (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**: 486-489
- Harrison CJ, Jack EM, Allen TD & Harris R (1983) The fragile X: a scanning electron microscope study. *J. Med. Genet.* **20**: 280-285
- Hartenstine MJ, Goodman MF & Petruska J (2000) Base stacking and even/odd behavior of hairpin loops in DNA triplet repeat slippage and expansion with DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **275**: 18382-18390
- He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song C-X, Zhang K, He C & Xu G-L (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**: 1303-1307
- Hebbes TR, Thorne AW & Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**: 1395-1402
- Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C & Mandel JL (1992) Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J. Med. Genet.* **29**: 794-801
- Heller H, Kämmer C, Wilgenbus P & Doerfler W (1995) Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage lambda) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 5515-5519
- Hochstein N, Muiznieks I, Mangel L, Brondke H & Doerfler W (2007) Epigenetic status of an adenovirus type 12 transgenome upon long-term cultivation in hamster cells. *J. Virol* **81**: 5349-5361
- Holzmann C, Schmidt T, Thiel G, Epplen JT & Riess O (2001) Functional characterization of the human Huntington's disease gene promoter. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **92**: 85-97
- Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ & Galjaard H (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 2069-2073
- Hotchkiss RD (1948) The quantitative separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* **175**: 315-332
- Huntington G (1872) On chorea. *Med. Surg. Reporter* **26**: 317-321
- Hupkes M, Jonsson MKB, Scheenen WJ, van Rotterdam W, Sotoca AM, van Someren EP, van der Heyden MAG, van Veen TA, van Ravestein-van Os RI, Bauerschmidt S, Piek E, Ypey DL, van Zoelen EJ & Dechering KJ (2011) Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. *FASEB J.* **25**: 3861-3872
- Hwu WL, Lee YM, Lee SC & Wang TR (1993) In vitro DNA methylation inhibits FMR-1 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 324-329
- Inoue A & Zhang Y (2011) Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* **334**: 194
- Inoue H, Nojima H & Okayama H (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Iqbal K, Jin S-G, Pfeifer GP & Szabó PE (2011) Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 3642-3647
- Ishizuka A, Siomi MC & Siomi H (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* **16**: 2497-2508
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C & Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**: 1300-1303
- Iwahashi CK, Yasui DH, An H-J, Greco CM, Tassone F, Nannen K, Babineau B, Lebrilla CB, Hagerman RJ & Hagerman PJ (2006) Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain* **129**: 256-271
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X & Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560
- Jin P, Alisch RS & Warren ST (2004a) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat. Cell Biol.* **6**: 1048-

1053

- Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K & Warren ST (2004b) Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* **7**: 113-117
- Johns MB Jr & Paulus-Thomas JE (1989) Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Anal. Biochem.* **180**: 276-278
- Johnson TB & Coghill RD (1925) Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus. *J. Am. Chem. Soc.* **47**: 2838-2844
- Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 415-428
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J & Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**: 187-191
- Kaiser AD & Hogness DS (1960) The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J. Mol. Biol.* **2**: 392-415
- Kämmer C & Doerfler W (1995) Genomic sequencing reveals absence of DNA methylation in the major late promoter of adenovirus type 2 DNA in the virion and in productively infected cells. *FEBS Lett.* **362**: 301-305
- Kampranis SC & Tschlis PN (2009) Histone demethylases and cancer. *Adv. Cancer Res.* **102**: 103-169
- Kanai Y, Dohmae N & Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**: 513-525
- Kelkar A & Deobagkar D (2010) Methylation profile of genes on the human X chromosome. *Epigenetics* **5**: 612-618
- Kelland L (2007) Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clin. Cancer Res.* **13**: 4960-4963
- Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH & Warren ST (2001) Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 1449-1454
- Khalil AM, Faghihi MA, Modarresi F, Brothers SP & Wahlestedt C (2008) A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS ONE* **3**: e1486
- Kochanek S, Toth M, Dehmel A, Renz D & Doerfler W (1990) Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 8830-8834
- Koerner MV, Pauler FM, Huang R & Barlow DP (2009) The function of non-coding RNAs in genomic imprinting. *Development* **136**: 1771-1783
- Kovtun IV, Liu Y, Bjoras M, Klungland A, Wilson SH & McMurray CT (2007) OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* **447**: 447-452
- Kremer B, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg YP & Hayden MR (1995) Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 343-350
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR & Richards RI (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* **252**: 1711-1714
- Kriaucionis S & Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**: 929-930
- Krol J, Fiszer A, Mykowska A, Sobczak K, de Mezer M & Krzyzosiak WJ (2007) Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol. Cell* **25**: 575-586
- Kumari D & Usdin K (2009) Chromatin remodeling in the noncoding repeat expansion diseases. *J. Biol. Chem.* **284**: 7413-7417
- Kunst CB, Leeflang EP, Iber JC, Arnheim N & Warren ST (1997) The effect of FMR1 CGG repeat interruptions on mutation frequency as measured by sperm typing. *J. Med. Genet.* **34**: 627-631
- Ladd PD, Smith LE, Rabaia NA, Moore JM, Georges SA, Hansen RS, Hagerman RJ, Tassone F, Tapscott SJ & Filippova GN (2007) An antisense transcript spanning the CGG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Hum. Mol. Genet.* **16**: 3174-3187

- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A & Fischer U (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 329-338
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, *u. a.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921
- Lee JT & Lu N (1999) Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* **99**: 47-57
- Leehey MA, Munhoz RP, Lang AE, Brunberg JA, Grigsby J, Greco C, Jacquemont S, Tassone F, Lozano AM, Hagerman PJ & Hagerman RJ (2003) The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch. Neurol.* **60**: 117-121
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AAHA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T & Peters AHFM (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* **13**: 1192-1200
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 662-673
- Li E, Bestor TH & Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915-926
- Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST & Feng Y (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2276-2283
- Libby RT, Hagerman KA, Pineda VV, Lau R, Cho DH, Baccam SL, Axford MM, Cleary JD, Moore JM, Sopher BL, Tapscott SJ, Filippova GN, Pearson CE & La Spada AR (2008) CTCF cis-regulates trinucleotide repeat instability in an epigenetic manner: a novel basis for mutational hot spot determination. *PLoS Genet* **4**: e1000257
- Liutkeviciute Z, Lukinavicius G, Masevicius V, Daujotyte D & Klimasauskas S (2009) Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 400-402
- López Castel A, Nakamori M, Tomé S, Chitayat D, Gourdon G, Thornton CA & Pearson CE (2011) Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 1-15
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR & Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**: 834-838
- Lubs HA (1969) A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **21**: 231-244
- Lucas I, Palakodeti A, Jiang Y, Young DJ, Jiang N, Fernald AA & Le Beau MM (2007) High-throughput mapping of origins of replication in human cells. *EMBO Rep.* **8**: 770-777
- Lucchesi JC & Manning JE (1987) Gene dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* **24**: 371-429
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**: 372-373
- M Rindler P, Clark RM, Pollard LM, De Biase I & Bidichandani SI (2006) Replication in mammalian cells recapitulates the locus-specific differences in somatic instability of genomic GAA triplet-repeats. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6352-6361
- MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, Barnes G, Taylor SA, James M, Groot N, MacFarlane H, Jenkins B, Anderson MA, Wexler NS & Gusella JF (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**: 971-983
- MacDonald ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G, Taylor S, Allitto B, Altherr M & Myers R (1992) The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nat. Genet.* **1**: 99-103
- MacKenzie JJ, Sumargo I & Taylor SAM (2006) A cryptic full mutation in a male with a classical fragile X phenotype. *Clin. Genet.* **70**: 39-42
- Maiti A & Drohat AC (2011) Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J. Biol. Chem.* **286**: 35334-35338
- Malinina L (2005) Possible involvement of the RNAi pathway in trinucleotide repeat expansion diseases. *J. Biomol.*

I. Literaturverzeichnis

Struct. Dyn. **23**: 233-235

- Malter HE, Iber JC, Willemsen R, de Graaff E, Tarleton JC, Leisti J, Warren ST & Oostra BA (1997) Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nat. Genet.* **15**: 165-169
- Martin JP & Bell J (1943) A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry* **6**: 154-157
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G & Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* **302**: 890-893
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R & Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502
- McGrath J & Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**: 179-183
- McMurray CT (2010) Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 786-799
- Meyer BJ & Casson LP (1986) *Caenorhabditis elegans* compensates for the difference in X chromosome dosage between the sexes by regulating transcript levels. *Cell* **47**: 871-881
- Mirkin SM (2007) Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* **447**: 932-940
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W & Petersen-Mahrt SK (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J. Biol. Chem.* **279**: 52353-52360
- Moseley ML, Zu T, Ikeda Y, Gao W, Mosemiller AK, Daughters RS, Chen G, Weatherspoon MR, Clark HB, Ebner TJ, Day JW & Ranum LPW (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat. Genet.* **38**: 758-769
- Müller K, Heller H & Doerfler W (2001) Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J. Biol. Chem.* **276**: 14271-14278
- Müller-Hartmann H, Deissler H, Naumann F, Schmitz B, Schröer J & Doerfler W (2000) The human 20-kDa 5'-(CGG)(n)-3'-binding protein is targeted to the nucleus and affects the activity of the FMR1 promoter. *J. Biol. Chem.* **275**: 6447-6452
- Munnes M, Schetter C, Hölker I & Doerfler W (1995) A fully 5'-CG-3' but not a 5'-CCGG-3' methylated late frog virus 3 promoter retains activity. *J. Virol.* **69**: 2240-2247
- Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G & Jacobs P (1998) Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J. Med. Genet.* **35**: 637-640
- Nabel CS, Manning SA & Kohli RM (2011) The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation, and Oxidation as Modulators of Genomic Potential. *ACS Chemical Biology* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004246> [Zugegriffen November 3, 2011]
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN & Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389
- Nance MA & Myers RH (2001) Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **7**: 153-157
- Naumann A, Hochstein N, Weber S, Fanning E & Doerfler W (2009) A distinct DNA-methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **85**: 606-616
- Naumann F, Remus R, Schmitz B & Doerfler W (2004) Gene structure and expression of the 5'-(CGG)(n)-3'-binding protein (CGGBP1). *Genomics* **83**: 106-118
- Nichol Edamura K, Leonard MR & Pearson CE (2005) Role of replication and CpG methylation in fragile X syndrome CGG deletions in primate cells. *Am. J. Hum. Genet.* **76**: 302-311
- Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD & Reinberg D (2002) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* **9**: 1201-1213
- Nørremølle A, Sørensen SA, Fenger K & Hasholt L (1995) Correlation between magnitude of CAG repeat length alterations and length of the paternal repeat in paternally inherited Huntington's disease. *Clin. Genet.* **47**: 113-

- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M & Mandel J (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**: 1097-1102
- Ogawa Y, Sun BK & Lee JT (2008) Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* **320**: 1336-1341
- Okano M, Bell DW, Haber DA & Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257
- Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin S-P, Allis CD, Cheng X & Bestor TH (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**: 714-717
- Orend G, Knoblauch M & Doerfler W (1995) Selective loss of unmethylated segments of integrated Ad12 genomes in revertants of the adenovirus type 12-transformed cell line T637. *Virus Res.* **38**: 261-267
- Orr JA & Hamilton PW (2007) Histone acetylation and chromatin pattern in cancer. A review. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **29**: 17-31
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W & Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.* **10**: 475-478
- Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG & Merkschlager M (2008) Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* **132**: 422-433
- Petruska J, Hartenstine MJ & Goodman MF (1998) Analysis of strand slippage in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease. *J. Biol. Chem.* **273**: 5204-5210
- Pfaffeneder T, Hackner B, Truss M, Münzel M, Müller M, Deiml CA, Hagemeyer C & Carell T (2011) The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**: 7008-7012
- Phillips JE & Corces VG (2009) CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**: 1194-1211
- Pietrobono R, Pomponi MG, Tabolacci E, Oostra B, Chiurazzi P & Neri G (2002) Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3278-3285
- Pietrobono R, Tabolacci E, Zalfa F, Zito I, Terracciano A, Moscato U, Bagni C, Oostra B, Chiurazzi P & Neri G (2005) Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 267-277
- Pirozzi F, Tabolacci E & Neri G (2011) The FRAXopathies: definition, overview, and update. *Am. J. Med. Genet. A* **155A**: 1803-1816
- Primerano B, Tassone F, Hagerman RJ, Hagerman P, Amaldi F & Bagni C (2002) Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *RNA* **8**: 1482-1488
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD & Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599
- Reik W, Dean W & Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093
- 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
- Revzin A (1989) Gel electrophoresis assays for DNA-protein interactions. *BioTechniques* **7**: 346-355
- Reyniers E, Martin JJ, Cras P, Van Marck E, Handig I, Jorens HZ, Oostra BA, Kooy RF & Willems PJ (1999) Postmortem examination of two fragile X brothers with an FMR1 full mutation. *Am. J. Med. Genet.* **84**: 245-249
- Reyniers E, Vits L, De Boule K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK & Oostra B (1993) The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat. Genet.* **4**: 143-146
- Rice JC, Nishioka K, Sarma K, Steward R, Reinberg D & Allis CD (2002) Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* **16**: 2225-2230

I. Literaturverzeichnis

- De Rooij KE, Dorsman JC, Smoor MA, Den Dunnen JT & Van Ommen GJ (1996) Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 1093-1099
- Russell LB (1963) Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and region of origin. *Science* **140**: 976-978
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467
- Santoro MR, Bray SM & Warren ST (2011) Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. *Annual Review of Pathology* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017584> [Zugegriffen November 3, 2011]
- Santos F, Hendrich B, Reik W & Dean W (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **241**: 172-182
- Scherer WF, Syverton JT & Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**: 695-710
- Schwemmler S, de Graaff E, Deissler H, Gläser D, Wöhrle D, Kennerknecht I, Just W, Oostra BA, Dörfler W, Vogel W, Steinbach P & Dörfler W (1997) Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 1354-1362
- Selker EU, Tountas NA, Cross SH, Margolin BS, Murphy JG, Bird AP & Freitag M (2003) The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature* **422**: 893-897
- Sha K (2008) A mechanistic view of genomic imprinting. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**: 197-216
- Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y & Antonarakis SE (2011) DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res.* **21**: 1592-1600
- Shaw DJ, Chaudhary S, Rundle SA, Crow S, Brook JD, Harper PS & Harley HG (1993) A study of DNA methylation in myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* **30**: 189-192
- Shen JC, Rideout WM 3rd & Jones PA (1992) High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell* **71**: 1073-1080
- Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington MW, Sutherland GR, Turner G & Watson M (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* **69**: 289-299
- Singh U & Westermark B (2011) CGGBP1 is a nuclear and midbody protein regulating abscission. *Exp. Cell Res* **317**: 143-150
- Singh U, Roswall P, Uhrbom L & Westermark B (2011) CGGBP1 regulates cell cycle in cancer cells. *BMC Mol. Biol.* **12**: 28
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL & Dreyfuss G (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**: 291-298
- Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, Hoogeveen AT, Oosterwijk JC & Oostra BA (1995) Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 2103-2108
- Sobczak K, de Mezer M, Michlewski G, Krol J & Krzyzosiak WJ (2003) RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucleic Acids Res.* **31**: 5469-5482
- Spangler CM & Essani K (1994) Transactivation of methylated HIV-LTR by a frog virus 3 protein. *Virology* **204**: 651-655
- Stedman W, Kang H, Lin S, Kissil JL, Bartolomei MS & Lieberman PM (2008) Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *EMBO J.* **27**: 654-666
- Steinbach P, Gläser D, Vogel W, Wolf M & Schwemmler S (1998) The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **62**:

278-285

- Strahl BD & Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45
- Sun BK, Deaton AM & Lee JT (2006) A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol. Cell* **21**: 617-628
- Sutherland GR (1977) Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* **197**: 265-266
- Sutter D & Doerfler W (1980) Methylation of integrated viral DNA sequences in hamster cells transformed by adenovirus 12. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **44 Pt 1**: 565-568
- 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
- Tabolacci E, Moscato U, Zalfa F, Bagni C, Chiurazzi P & Neri G (2008) Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *Eur. J. Hum. Genet* **16**: 1487-1498
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L & Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**: 930-935
- Tan H, Li H & Jin P (2009) RNA-mediated pathogenesis in fragile X-associated disorders. *Neurosci. Lett.* **466**: 103-108
- Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD & Hagerman PJ (2000a) Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **97**: 195-203
- Tassone F, Hagerman RJ, Loesch DZ, Lachiewicz A, Taylor AK & Hagerman PJ (2000b) Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am. J. Med. Genet* **94**: 232-236
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK & Hagerman PJ (2001) A majority of fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of FMR1 messenger RNA. *J. Med. Genet.* **38**: 453-456
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE & Hagerman PJ (2000c) Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 6-15
- Tassone F, Iwahashi C & Hagerman PJ (2004) FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol* **1**: 103-105
- Telenius H, Kremer B, Goldberg YP, Theilmann J, Andrew SE, Zeisler J, Adam S, Greenberg C, Ives EJ & Clarke LA (1994) Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat. Genet.* **6**: 409-414
- Thompson JP, Granoff A & Willis DB (1988) Methylation of the promoter for an immediate-early frog virus 3 gene does not inhibit transcription. *J. Virol.* **62**: 4680-4685
- Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS & Ehrlich M (2000) DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet. Cell Genet.* **89**: 121-128
- Turner G, Webb T, Wake S & Robinson H (1996) Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **64**: 196-197
- Vasudevan S & Steitz JA (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**: 1105-1118
- Vasudevan S, Tong Y & Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**: 1931-1934
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, *u. a.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351
- Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M & Touat-Todeschini L (2009) Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int. J. Dev. Biol.* **53**: 245-257
- Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT & Oostra BA (1993) Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**: 722-724
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF & Zhang FP (1991)

I. Literaturverzeichnis

- Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**: 905-914
- Waalwijk C & Flavell RA (1978) MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nucleic Acids Res.* **5**: 3231-3236
- Waddington CH (1942) The epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20
- Wallace JA & Felsenfeld G (2007) We gather together: insulators and genome organization. *Curr. Opin. Genet. Dev* **17**: 400-407
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L & Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567-576
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K & Peters J-M (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* **451**: 796-801
- Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F & Ramos Arroyo MA (1987) Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* **326**: 194-197
- Willemsen R, Bontekoe CJM, Severijnen L-A & Oostra BA (2002) Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum. Genet.* **110**: 601-605
- Wolffe AP & Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**: 481-486
- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W & Walter J (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* **2**: 241
- Wyatt GR & Cohen SS (1952) A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids. *Nature* **170**: 1072-1073
- Yamazaki Y, Mann MRW, Lee SS, Marh J, McCarrey JR, Yanagimachi R & Bartolomei MS (2003) Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 12207-12212
- Yoon S-R, Dubeau L, de Young M, Wexler NS & Arnheim N (2003) Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 8834-8838
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley J, Warren S, Schlessinger D & Et A (1991) Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* **252**: 1179-1181
- Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL & Dreyfuss G (1995) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J.* **14**: 5358-5366
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S & Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**: 493-498

J. Anhang

J.1. Plasmidkarten

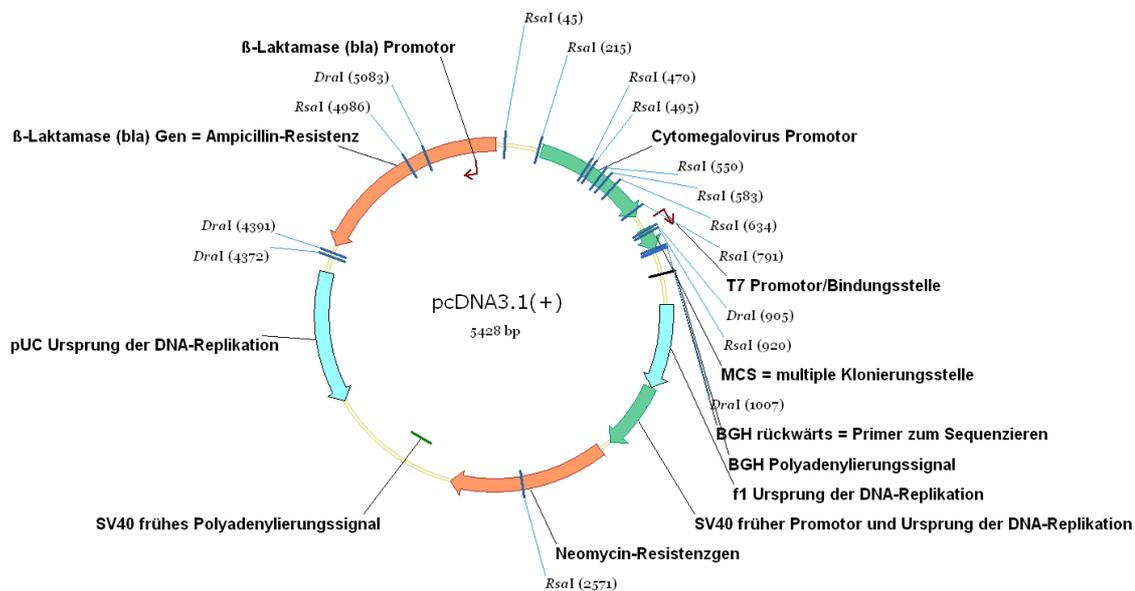


Abbildung 32: Plasmidkarte pcDNA3.1(+).

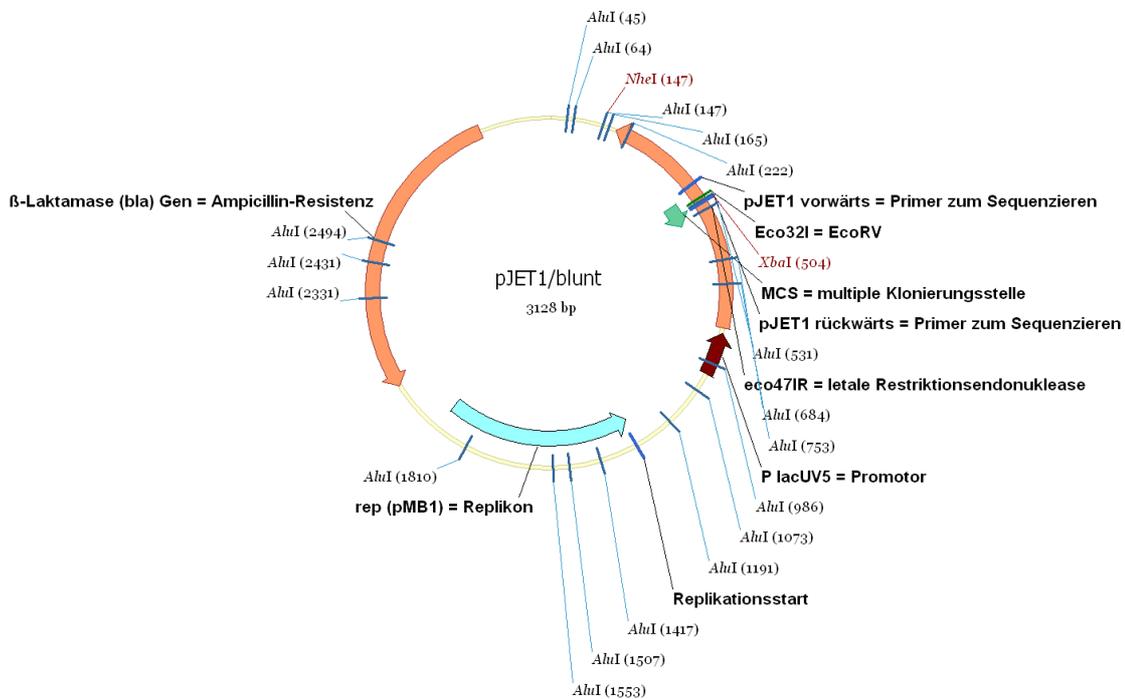


Abbildung 33: Plasmidkarte pJET1/blunt.

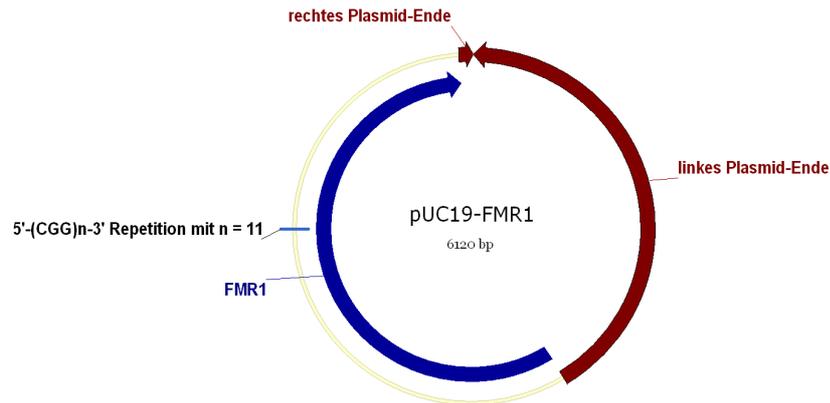


Abbildung 34: Plasmidkarte pUC19-FMR1.

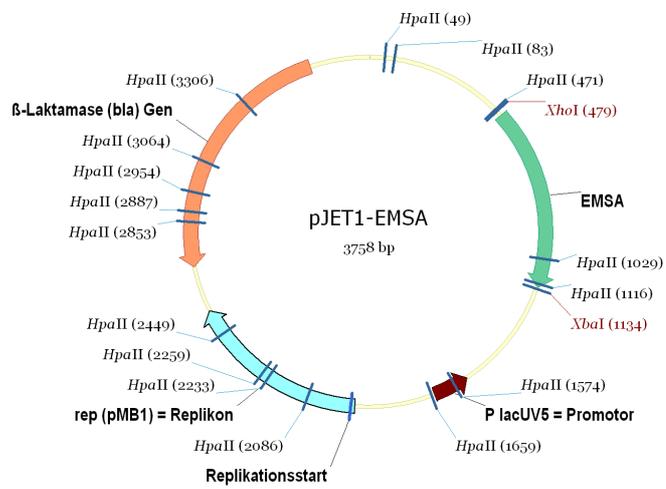


Abbildung 35: Plasmidkarte pJET1-EMSA.

J.3. 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.

J.4. Veröffentlichungen

Teilpublikationen von Originalarbeiten

Naumann A, Kraus C, Hoogeveen A, Fanning E & Doerfler W

The *FMRI* Methylation Boundary Safeguards against Methylation Spreading and is (Partly) Stable upon Foreign DNA Insertion Effects.

eingereicht im November 2011

Naumann A, Hochstein N, Weber S, Fanning E & Doerfler W

A Distinct DNA-Methylation Boundary in the 5'-Upstream Sequence of the *FMRI* Promoter Binds Nuclear Proteins and Is Lost in Fragile X Syndrome.

Am J Hum Genet. (2009) Nov;85(5): 606-16

Reviews

Doerfler W, Naumann A, Hochstein N & Weber S

DNA methylation profiles in the 5'-upstream region of the human *FMRI* promoter and in an adenovirus transgenome.

Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics (2010): 495-509

Naumann A, Hochstein N, Weber S & Doerfler W

5-Methylcytosin als wichtiger Regulator in der Genetik.

BIOspektrum (2010) Feb;01: 29-32

Wissenschaftliche Beiträge

Naumann A, Kraus C, Hoogeveen A & Doerfler W

Critical Chromatin Structure Safeguards against Methylation Spreading into the Human *FMRI* Promoter

4. Weissenburg Symposium: Epigenetics and the Regulation of Gene Expression, Weissenburg
20.-22.06.2011 (Vortrag)

Naumann A, Weber S, Hoogeveen A, Fanning E & Doerfler W

Safeguarding the human *FMRI* promoter: The methylation barrier in its 5'-upstream region.

60. Jahrestagung der American Society of Human Genetics (ASHG), Washington, D.C.
02.-06.11.2010 (Poster)

Naumann A, Hochstein N, Fanning E & Doerfler W

A distinct DNA methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the *FMRI* promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome.

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik (GfG), Köln
16.-19.09.2009 (Vortrag)

Naumann A, Hochstein N, Fanning E & Doerfler W

A distinct DNA methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the *FMRI* promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome.

20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Aachen
01.-03.04.2009 (Poster)

Erlangen im Dezember 2011

Anja Naumann

J.5. Lebenslauf

Nama: Naumann

Vorname: Anja Barbara

Geburtsdatum: 16.11.1983

Geburtsort: Freiberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

- seit 07/2007** Doktorandin von Prof. Dr. Walter Doerfler am Institut für Genetik an der Universität zu Köln mit dem Titel:
„Epigenetische und funktionelle Charakterisierung der 5'-*upstream* Region des menschlichen *FMRI* Gens“
Die Arbeit im Laboratorium wurde angefertigt am Institut für Klinische und Molekulare Virologie des Universitätsklinikum Erlangen
- 05/2007** Diplom-Biologin Univ.
- 08/2006-05/2007** Diplomarbeit bei Prof. Dr. Walter Doerfler am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Titel:
„Bestimmung des DNA-Methylierungsmusters in der Promotor Region des menschlichen *FMRI* Gens bei normalen und fragilen X Syndrom Probanden“
- 10/2002-05/2007** Biologiestudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit den Studienschwerpunkten:
Genetik, Biochemie, Mikrobiologie, Virologie
- 06/2002** Allgemeine Hochschulreife
- 09/1994-06/2002** Bernhard-von-Cotta-Gymnasium Brand-Erbisdorf
- 09/1990-07/1994** Grundschule Brand-Erbisdorf

Erlangen im Dezember 2011

Anja Naumann

J.6. Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Doerfler für die Möglichkeit, dass ich als 80. Doktorandin dieses interessante Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte. Sie haben in den vergangenen Jahren viel Geduld bewiesen, und standen jederzeit mit Ihrem immensen fachlichen Wissen bereit, außerdem haben Sie mir das große Feld der Epigenetik „schmackhaft gemacht“.

Bedanken möchte ich mich auch beim Virologischen Institut Erlangen für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten.

Ich bedanke mich außerdem bei der molekulargenetischen Diagnostik des Humangenetischen Instituts Erlangen für die Möglichkeit, meine „unendliche“ Anzahl von Klonen sequenzieren zu lassen.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Cornelia Kraus aus der Humangenetik und Herrn Dr. André Hoogeveen aus Rotterdam für die Aushändigung der zahlreichen DNA-Proben.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Susan Jung, für die Lösung diverser kleinerer „Problemchen“ bis hin zu größeren technischen Katastrophen des Laboralltags.

Danke an Frau Dr. Andrea Kreß für die Hilfe beim ChIP.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei Frau Dipl. Biol. Stefanie Weber bedanken. Danke für die Freundschaft, und dass auf dich Verlass ist, wenn mal wieder Not am Mann ist. Wir hatten trotz mancher Anstrengungen der letzten Jahre immer viel Spaß im Labor und natürlich auch außerhalb. Und denke immer daran, alles ist irgendwie „ep(p)igenetisch“!

Natürlich gilt mein Dank auch meiner Familie für die diversen kleineren Finanzspritzen. Ich danke Euch, dass ihr mir im Notfall immer den Rücken freigehalten habt.

Zu guter Letzt bedanke ich mich noch bei all denjenigen, die mir während der ganzen Zeit zur Seite gestanden haben.

„Jeder junge Wissenschaftler sollte stets die Möglichkeit im Auge behalten, dass ein vermeintlich irritierendes Versagen von Labortechnik, das zu inkonsistenten Ergebnissen führt, ein- oder zweimal im Leben auch ein Hinweis auf großartige Entdeckungen sein könnte.“

Patrick Blackett (1897-1974)
englischer Experimentalphysiker