

**Untersuchungen zur Bedeutung der DNA-Methylierung und
methylierungsmodulierender Enzyme in verschiedenen
Zellsystemen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Christian Grosser
aus Duisburg

November 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers
3. Gutachter: -----

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2016

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Grosser C, Neumann L, Horsthemke B, Zeschnick M, van de Nes J.

Methylation analysis of *SST* and *SSTR4* promoters in the neocortex of Alzheimer's disease patients.

Neurosci Lett 2014; 566: 241-246.

Grosser C, Vassen L, Horsthemke B, Wagner N.

A transgenic mouse model ubiquitously overexpressing *Dnmt1s* mRNA lacks increased protein levels.

PeerJ PrePrints 2014; 2: e550v1 <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.550v1>

Grosser C, Wagner N, Grothaus K, Horsthemke B.

Altering TET dioxygenase levels within physiological range affects DNA methylation dynamics of HEK293 cells.

Epigenetics 2015; 10: 819-833.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 DNA-Methylierung.....	9
1.1.1 Die fünfte Base Methylcytosin	9
1.1.2 Funktionen der DNA-Methylierung	10
1.1.3 Mit DNA-Methylierung assoziierte Erkrankungen	14
1.1.4 Veränderungen der DNA-Methylierung während des Alterns.....	15
1.1.5 Etablierung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung.....	15
1.1.6 TET-Dioxygenasen und DNA-Demethylierung	17
1.1.6.1 Iterative Oxidation von Methylcytosin	18
1.1.6.2 Mechanismen der DNA-Demethylierung.....	20
1.1.6.3 Regulation der genomischen Zielfindung der TET-Enzyme	22
1.1.6.4 Verteilung oxidierter Methylcytosine im Genom	23
1.1.6.5 Interpretieren oxidierter Methylcytosine.....	26
1.1.6.6 Nicht-katalytische Funktionen der TET-Enzyme	27
1.1.6.7 Biologische Funktionen der TET-Enzyme	27
1.2 Somatostatin und die Alzheimer-Krankheit	31
2. Zielsetzung der Arbeit	37
3. Material und Methoden	38
3.1 Material	38
3.1.1 Chemikalien.....	38
3.1.2 Standardlösungen und Medien.....	38
3.1.3 Bakterienstämme und Zelllinien	39
3.1.4 Größenstandards.....	40
3.1.5 Oligonukleotide.....	40
3.1.6 Antikörper	40
3.1.7 Enzyme	41
3.1.8 Gewebe von Patienten	41
3.1.9 Mäuse.....	41
3.1.10 GEO-Datenbankeintrag	42
3.2 Methoden.....	42
3.2.1 Allgemeine Arbeiten mit DNA und RNA.....	42
3.2.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	42
3.2.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	43
3.2.1.3 Restriktionsendonukleaseverdau	43
3.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	43
3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	44
3.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
3.2.1.8 Sequenzierung nach Sanger.....	45
3.2.1.9 Reverse Transkription von RNA.....	45

3.2.1.10	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR (qRT-PCR).....	45
3.2.2	Allgemeine Arbeiten mit Proteinen	47
3.2.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
3.2.2.2	Proteintransfer und -nachweis (<i>western blot</i>)	48
3.2.3	Allgemeine Zellkulturarbeiten	49
3.2.3.1	Auftauen von Zellen	49
3.2.3.2	Kultivierung von Zellen	50
3.2.3.3	Kryokonservierung von Zellen.....	50
3.2.4	Arbeiten mit menschlichem Hirngewebe	50
3.2.4.1	DNA- und RNA-Isolation aus Hirngewebe.....	50
3.2.4.2	Bisulfit-Behandlung von DNA	51
3.2.4.3	Methylierungsanalyse des <i>SST</i> - und <i>SSTR4</i> -Promotors.....	52
3.2.4.4	Statistische Analysen	53
3.2.5	Arbeiten mit dem <i>Dnmt1s</i> -Mausmodell.....	54
3.2.5.1	Organentnahme bei Mäusen	54
3.2.5.2	Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	54
3.2.5.3	DNA-, RNA- und Protein-Isolation aus murinem Gewebe	54
3.2.5.4	Genotypisierung von Mäusen und Mausfibroblasten	56
3.2.5.5	Luciferase-Reportergen-Assays	56
3.2.6	Arbeiten mit HEK293-Zellen	57
3.2.6.1	Generierung induzierbarer <i>TET1</i> - und <i>GFP</i> -Expressionszelllinien.....	57
3.2.6.2	Simultaner Knockdown von <i>TET1</i> , <i>TET2</i> und <i>TET3</i> mittels siRNA	58
3.2.6.3	DNA-, RNA- und Protein-Isolation aus HEK293-Zellen	58
3.2.6.4	DNA <i>dot blot</i> -Assay	59
3.2.6.5	Methylierungsanalysen mit Infinium HumanMethylation450 BeadChips.....	59
3.2.6.6	Genexpressionsanalyse per Microarray	60
3.2.6.7	<i>Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling</i> (RRHP).....	61
3.2.6.8	Statistische Überrepräsentationstests	62
3.2.6.9	<i>De novo</i> -Motiv-Suchen	62
3.2.6.10	Weitere bioinformatische Analysen	63
4.	Ergebnisse	64
4.1	Methylierungsanalysen des <i>SST</i> - und <i>SSTR4</i> -Promotors im Neokortex von Alzheimer-Patienten.....	64
4.1.1	Direkte Bisulfit-Sequenzierung des <i>SST</i> - und <i>SSTR4</i> -Promotors	64
4.1.2	Hochauflösende Methylierungsanalyse der <i>SST</i> -Promotorregion	67
4.2	Weitere Charakterisierung des Mausmodells zur Studie der ubiquitären Überexpression von <i>Dnmt1s</i>	71
4.2.1	Untersuchung der <i>Dnmt1s</i> -mRNA-Expression	71
4.2.2	Untersuchung der <i>Dnmt1s</i> -Proteinexpression	74
4.2.3	Einfluss der Kozak-Sequenz und des RGS-His-tags auf die Proteintranslation.....	77

4.3 Einfluss veränderter TET-Dioxygenase-Level auf die DNA-Methylierung von HEK293-Zellen.....	80
4.3.1 <i>TET1</i> -Überexpression und <i>TET</i> -Knockdown in HEK293-Zellen	80
4.3.2 Methylierungsanalysen von Promotoren, Genen und CpG- <i>islands</i>	82
4.3.3 Analyse globaler Genexpressionsprofile	88
4.3.4 Charakterisierung differentiell methylierter Promotoren.....	89
4.3.5 Detaillierte Analyse der 5hmC-Level nach <i>TET1</i> -Überexpression.....	92
4.3.6 Charakterisierung der nach <i>TET1</i> -Überexpression hyperhydroxymethylierten Promotoren.....	98
4.3.7 Vergleich differentiell methylierter und hydroxymethylierter Promotoren nach <i>TET1</i> -Überexpression.....	100
4.3.8 Suche nach Sequenzmotiven	101
5. Diskussion	102
5.1 Die reduzierten SST- und SSTR4-Level im Neokortex von Alzheimer-Patienten waren nicht mit einer Hypermethylierung des entsprechenden Promotors assoziiert	102
5.2 Das transgene Mausmodell zeigte trotz ubiquitärer Überexpression von <i>Dnmt1s</i> -mRNA keine erhöhten Proteinlevel.....	106
5.3 Beeinflussung der DNA-Methylierung von HEK293-Zellen durch veränderte TET-Dioxygenase-Level.....	111
5.3.1 Methylierungsveränderungen in Abhängigkeit von endogenen Methylierungsleveln.....	111
5.3.2 Promotormethylierungsunabhängiger Einfluss auf die Genexpression	114
5.3.3 Methylierungsveränderungen an Promotoren in Abhängigkeit von der Expressionsstärke	116
5.3.4 Globale 5mC-Oxidation nach <i>TET1</i> -Überexpression	117
5.3.5 Charakterisierung der nach <i>TET1</i> -Überexpression hyperhydroxymethylierten Promotoren.....	118
5.3.6 Geringe Reziprozität differentiell methylierter und hydroxymethylierter Promotoren nach <i>TET1</i> -Überexpression	118
5.3.7 Allgemeine Diskussion	119
6. Zusammenfassung.....	122
7. Literaturverzeichnis	124
8. Anhang.....	141
9. Übersicht des erweiterten Anhangs	163

Abkürzungsverzeichnis

(E)GFP	grün fluoreszierendes Protein; ein Markerprotein; <i>E: enhanced</i>
°C	Grad Celsius
3'-UTR	3' <i>untranslated region</i> ; 3' untranslatierter Bereich
5'-UTR	5' <i>untranslated region</i> ; 5' untranslatierter Bereich
5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
A	Anhang
A β	Amyloid- β -Peptid
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGI	CpG- <i>island</i> ; CpG-reiche Region (> 200 bp; oft im Promotorbereich von Genen)
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge Cytosin, (Phosphatgruppe,) Guanin
CXXC	Cystein-X-X-Cystein-Zinkfingerdomäne, ein Proteinmotiv
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
E	erweiterter Anhang (digital)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	<i>embryonic stem cell</i> ; embryonale Stammzelle
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
GFS	<i>Gyrus frontalis superior</i>
GTM	<i>Gyrus temporalis medius</i>
HCP	<i>high CpG density promoter</i> ; Promotor mit hohem CpG-Gehalt
HEK293(T)	<i>human embryonic kidney 293 cells</i> ; menschliche embryonale Nierenzelllinie; Variante „T“ exprimiert das <i>SV40 large T-Antigen</i>
ICP	<i>intermediate CpG density promoter</i> ; Promotor mit mittlerem CpG-Gehalt
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i> ; Nährmedium zur Bakterienkultivierung
LCP	<i>low CpG density promoter</i> ; Promotor ohne erhöhten CpG-Gehalt
M	mol/l
MBD	<i>methyl-CpG binding domain containing</i> ; Proteine der MBD-Familie
MEF	murine embryonale Fibroblasten

mESC	<i>mouse embryonic stem cell</i> ; murine embryonale Stammzelle
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR
RGS-His-tag	Proteinmarkierung mit der Aminosäurenabfolge RGSHHHHHH
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay (buffer)</i> ; ein Lysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RRHP	<i>Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling</i> ; ermöglicht die basengenaue Kartierung der 5hmC-DNA-Modifikation im genomweiten Maßstab
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SST	Somatostatin; ein Peptidhormon
SSTR1-5	Somatostatin-Rezeptoren 1-5
T	Thymin
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
TET	<i>ten-eleven translocation</i> ; TET-Familie von Methylcytosin- Dioxygenasen
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	<i>unit</i> ; Enzimeinheit
WCE	<i>whole cell extract (buffer)</i> ; ein Lysepuffer

1. Einleitung

1.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist eine wichtige epigenetische Modifikation und an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt. Sie ist unverzichtbar für die Säugetierentwicklung (Smith & Meissner, 2013) und spielt unter anderem beim genomischen Imprinting, der X-Chromosominaktivierung und der Stilllegung von Transposons eine bedeutende Rolle (Bird, 2002; Goll & Bestor, 2005; Robertson, 2005). Die Methylierung von Genpromotoren ist im Allgemeinen mit reprimierter Genexpression assoziiert (Weber & Schubeler, 2007). Generell sind die Methylierungsmuster einer Zelle stabil und werden während der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben. Insbesondere während früher Entwicklungsphasen kann die DNA-Methylierung jedoch dynamisch reguliert werden. Die Regulation erfolgt hauptsächlich durch eine zyklische enzymatische Kaskade, bestehend aus der Etablierung der Methylierung an Cytosinen durch DNA-Methyltransferasen, iterativer Oxidation der Methylgruppe durch TET-Dioxygenasen und der Wiederherstellung unmodifizierter Cytosine durch replikationsabhängige Verdünnung oder DNA-Glykosylase-initiiertes DNA-Reparatur (Wu & Zhang, 2014).

1.1.1 Die fünfte Base Methylcytosin

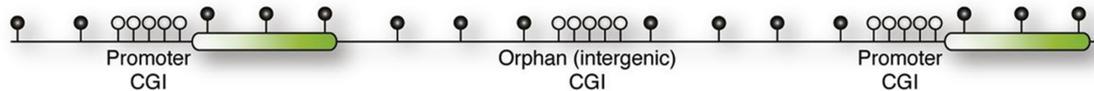
In Eukaryoten findet eine Methylierung der DNA ausschließlich an Cytosinen statt (Schubeler, 2015). Die Methylierung erfolgt an der C5-Position und führt zur Entstehung von 5-Methylcytosin (5mC), einer modifizierten Base, die oftmals als die fünfte Base des DNA-Codes bezeichnet wird (Breiling & Lyko, 2015; Lister & Ecker, 2009). Die DNA-Methylierung ist verbreitet in Eukaryoten, jedoch kann ihre Bedeutung und Funktion in den verschiedenen Organismen stark variieren (Messerschmidt *et al.*, 2014). Während bekannte Modellorganismen wie *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* keine konservierte DNA-Methylierung besitzen (Raddatz *et al.*, 2013), ist diese von entscheidender Bedeutung für die Klasse der Säugetiere (Messerschmidt *et al.*, 2014).

In Säugetieren findet die DNA-Methylierung hauptsächlich im Kontext von CpG-Dinukleotiden statt (Ramsahoye *et al.*, 2000; Ziller *et al.*, 2011), d.h. an Cytosinen, auf die ein Guanin folgt (CpGs). Methylierung außerhalb des Kontexts von CpG-Dinukleotiden geschieht in den meisten Zelltypen selten, scheint aber relativ oft in Oozyten, embryonalen Stammzellen und reifen Neuronen aufzutreten und eine bisher ungeklärte Funktion zu besitzen (Wu & Zhang, 2014). Das genomweite Methylierungsmuster einer typischen Säugetierzelle verläuft prinzipiell bimodal (Messerschmidt *et al.*, 2014): Während vereinzelt CpGs generell stark methyliert sind (Methylierungsgrad 60-90%; abhängig vom Zelltyp), verbleiben besonders CpG-reiche Regionen, die sogenannten CpG-islands (CGIs) (Gardiner-Garden & Frommer, 1987; Takai & Jones, 2002), überwiegend in unmethyliertem Zustand. Es entsteht das Bild einer global stark methylierten, aber CpG-armen genomischen Landschaft, die durch die meist unmethylierten CpG-reichen CGIs unterbrochen wird (Abbildung 1A) (Deaton & Bird, 2011). 5mC ist besonders anfällig für eine spontane Desaminierung, die aufgrund ineffizienter DNA-Reparatur häufig zu einer dauerhaften C→T Transition führt (Cooper *et al.*, 2010; Schubeler, 2015). Daher könnte das bimodale Methylierungsmuster für die evolutionäre Unterrepräsentation der CpGs außerhalb von CGIs bzw. für die Anreicherung von CpGs innerhalb unmethylierter CGIs verantwortlich sein (Bird, 1980; Cohen *et al.*, 2011; Messerschmidt *et al.*, 2014).

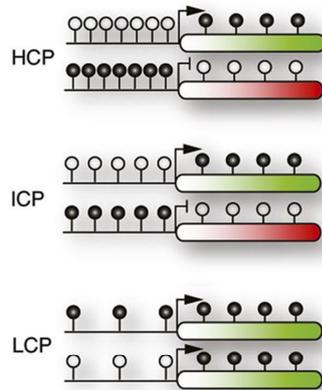
1.1.2 Funktionen der DNA-Methylierung

CGIs sind oft mit Genpromotoren assoziiert und verbleiben meistens in einem unmethylierten Zustand, auch wenn die entsprechenden Gene nicht aktiv sind (Meissner *et al.*, 2008; Messerschmidt *et al.*, 2014; Schubeler, 2015; Weber *et al.*, 2007). Doch auch in inter- und intragenischen Bereichen existieren CGIs (Abbildung 1A). Diese sind ebenfalls überwiegend unmethyliert, jedoch ist ihre Funktion bisher nicht vollständig verstanden (Jones, 2012; Messerschmidt *et al.*, 2014).

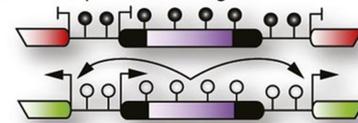
A Global bimodal CpG and 5mC distribution



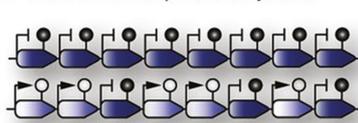
B Promoter methylation



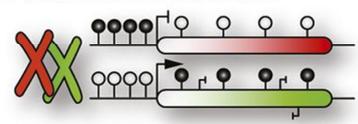
C Transposon silencing



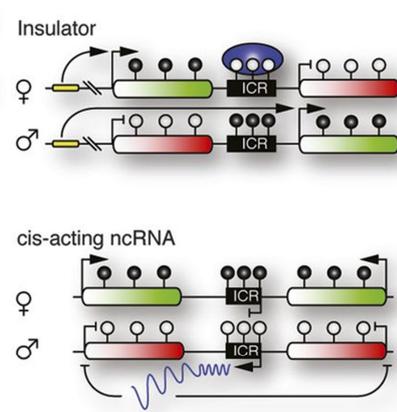
D Centromeric repeat methylation



E X-chromosome inactivation



F Genomic imprinting



● methylated CpG ○ unmethylated CpG

Abbildung 1: Übersicht über die DNA-Methylierung im Säugetiergenom. (A) Globale bimodale Verteilung der CpG-Dinukleotide (CpGs) und der DNA-Methylierung. CpGs innerhalb von CpG-islands (CGIs) sind im Allgemeinen unmethyliert. CGIs befinden sich in der Nähe von Promotoren, aber auch in inter- und intragenischen Regionen (*orphan* CGIs; ein intergenisches CGI ist abgebildet). CpGs außerhalb von CGIs sind hingegen generell methyliert. (B) Basierend auf ihrer CpG-Dichte können drei Promotor-Kategorien unterschieden werden, die unterschiedlich auf eine Methylierung reagieren. HCPs: Promotoren mit hohem CpG-Gehalt (*high CpG density promoters*); ICPs: Promotoren mit mittlerem CpG-Gehalt (*intermediate CpG density promoters*); LCPs: Promotoren ohne erhöhten CpG-Gehalt (*low CpG density promoters*). (C) Repression von Transposons durch DNA-Methylierung. Ein Verlust der Methylierung kann zu einer Ko-Aktivierung benachbarter Gene führen. (D) Die basale Transkription von zentromerischen Repeats interferiert mit der Anordnung und Segregation der Chromosomen während der Mitose und wird durch DNA-Methylierung reprimiert. (E) DNA-Methylierung verstärkt die Stilllegung des inaktivierten X-Chromosoms. Transkribierte Gene des aktiven X-Chromosoms (aber auch transkribierte Gene anderer Chromosomen) zeigen eine Methylierung entlang ihrer Introns und Exons. Dies unterbindet möglicherweise die störende Expression von kryptischen Transkriptionsstartstellen oder unterstützt die RNA-Prozessierung. (F) Genomisches Imprinting führt zu allelspezifischer Genexpression in Abhängigkeit vom Elternteil, von dem das Chromosom erbt wurde. Die DNA-Methylierung von Imprinting-Kontrollregionen (ICRs, *imprinting control regions*) reguliert die Bindung von Isolator-Proteinen oder die Expression von *cis*-agierenden, nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs). Abbildung verändert nach Messerschmidt *et al.*, 2014.

Aktive Gene, deren Promotoren mit einem CGI assoziiert sind weisen im Promotorbereich verschiedene charakteristische Merkmale auf (Jones, 2012). So ist der Bereich der Transkriptionsstartstelle (TSS) gewöhnlich frei von Nucleosomen. Erst eine solche *nucleosome-depleted region* (NDR) macht die DNA zugänglich für

die Transkriptionsmaschinerie und ist daher von entscheidender Bedeutung für eine aktive Transkription (Kelly *et al.*, 2010). Die NDR wird üblicherweise von Nukleosomen mit der speziellen Histonvariante H2A.Z und einer Trimethylierung des Lysins 4 an Histon H3 (H3K4me3) flankiert. Man nimmt an, dass H2A.Z und H3K4me3 hier einer *de novo*-DNA-Methylierung entgegenwirken und die Stärke der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Jones, 2012). Doch auch die Transkriptionsfaktoren selbst tragen zum hypomethylierten Zustand der Promotor-CGIs bei (Gebhard *et al.*, 2010; Lienert *et al.*, 2011; Meissner, 2011), da ihre Bindung die Anlagerung der DNA-Methylierungsmaschinerie verhindert (Messerschmidt *et al.*, 2014). Inaktive CGI-assoziierte Promotoren erwerben im Allgemeinen keine DNA-Methylierung (Schubeler, 2015), sondern können durch andere Mechanismen reprimiert werden (Jones, 2012). Dies beinhaltet beispielsweise eine Repression durch Polycomb-Proteine, deren Wirkungsweise nicht primär eine DNA-Methylierung miteinbezieht und zur Etablierung der repressiven Histonmodifikation H3K27me3 führt (Jones, 2012; Schubeler, 2015).

Dennoch zeigen einige reprimierte Gene durchaus die Methylierung ihres Promotor-CGIs. Dies beschränkt sich jedoch üblicherweise auf Gene, die eine Langzeitstabilisierung ihres reprimierten Zustands aufweisen, wie beispielsweise geimprintete Gene, Gene auf dem inaktivierten X-Chromosom oder auch keimbahnspezifische Gene, deren Expression in somatischen Zellen wahrscheinlich unvorteilhaft wäre (Jones, 2012).

Basierend auf ihrer CpG-Dichte können Promotoren in drei Kategorien unterteilt werden (Abbildung 1B) (Messerschmidt *et al.*, 2014): In die Kategorie der Promotoren mit einem hohen CpG-Gehalt (HCPs, *high CpG density promoters*) fallen Promotoren mit starken CGIs. Wie zuvor beschrieben, sind diese Promotoren zwar nur selten methyliert, zeigen in einem solchen Fall aber eine effiziente Stilllegung des betreffenden Gens. Promotoren mit mittlerem CpG-Gehalt (ICPs, *intermediate CpG density promoters*) besitzen meist schwache CGIs und sind ebenfalls inaktiv, wenn sie methyliert sind, zeigen jedoch häufiger eine differenzierungsabhängige Hypermethylierung. Dies umfasst Promotoren von keimbahnspezifischen und Pluripotenz vermittelnden Genen. Hier wird die DNA-Methylierung als zusätzlicher Notfallmechanismus angesehen, der die Stilllegung des Gens während der Differenzierung unterstützt. Die Klasse der LCPs (*low density CpG promoters*) besitzt keinen erhöhten CpG-Gehalt und ist generell stark methyliert. Diese Promotoren verbleiben ungeachtet ihres Methylierungsgrades meist transkriptionell aktiv.

Die Arbeit von Irizarry und Kollegen aus dem Jahr 2009 prägte erstmals den Begriff der *shore*-Regionen, die ein betreffendes CpG-*island* flankieren. Die Autoren konnten zeigen, dass die Mehrheit der gewebespezifischen, aber auch tumorspezifischen Methylierungsunterschiede in den per Definition bis zu 2 kb entfernten *shore*-Regionen und nicht in den CGIs selbst auftrat. Zudem konnten sie eine starke Verknüpfung von DNA-Methylierung in den *shore*-Regionen mit der Genexpression feststellen (Irizarry *et al.*, 2009).

Mit der DNA-Methylierung sind jedoch noch eine Reihe weiterer Funktionen verbunden (Abbildung 1C-F) (Goll & Bestor, 2005; Messerschmidt *et al.*, 2014). Dies umfasst neben der Repression von Transposons auch die Repression der latenten Transkriptionsaktivität an perizentromerischen Repeats, wodurch die korrekte Anordnung und Segregation der Chromosomen während der Mitose ermöglicht wird. Die DNA-Methylierung spielt zudem eine wichtige Rolle bei der X-Chromosominaktivierung und dem genomischen Imprinting.

Neben Promotoren spielen auch Enhancer, die sich in variablen Abständen zu Promotoren befinden können, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Genexpression (Jones, 2012). Transkriptionelle Enhancer interagieren physikalisch mit Promotoren, und ihre Hypomethylierung korreliert ebenfalls mit aktiver Genexpression (Carone *et al.*, 2010; Messerschmidt *et al.*, 2014; Schmidl *et al.*, 2009).

Zu den Mechanismen, wie die DNA-Methylierung ihre vornehmlich repressiven Effekte ausüben könnte, zählen die Blockierung aktivierender Faktoren und/oder die Rekrutierung spezifischer Repressoren (Baubec & Schubeler, 2014). Nachfolgend werden die von Baubec & Schubeler beschriebenen Mechanismen kurz vorgestellt.

Das Säugetiergenom kodiert für etwa 1400 Transkriptionsfaktoren, von denen die meisten Bindemotive jedoch ebenso unbekannt sind, wie die mögliche Sensitivität gegenüber einer DNA-Methylierung in diesen Sequenzbereichen. Nur wenige Transkriptionsfaktoren wurden hinsichtlich ihrer Methylierungssensitivität gründlich untersucht, und es zeigte sich, dass manche Faktoren durch DNA-Methylierung inhibiert wurden, wohingegen andere davon unbeeinflusst blieben. Zudem wiesen einige Transkriptionsfaktoren eine Affinität zu methylierten DNA-Sequenzen auf, die außerhalb ihres typischen Konsensus-Bindemotivs liegen, wodurch das Maß an Komplexität nochmals zuzunehmen scheint.

Viele Transkriptionsfaktoren besitzen keine CpG-Dinukleotide in ihren Konsensus-Bindemotiven und sollten daher unempfindlich gegenüber einer DNA-Methylierung

sein. Sie können jedoch sterisch durch die Bindung spezifischer Methyl-CpG-bindender Proteine beeinflusst werden. Solche Proteine binden methylierte, CpG-reiche Regionen überwiegend unabhängig von der restlichen zugrunde liegenden DNA-Sequenz und können Repressoren rekrutieren, sowie Veränderungen der Chromatinstruktur bewirken. Zu solchen Faktoren zählen die Proteine der MBD-Familie (*methyl-CpG binding domain containing*) MBD1, 2, 4 und MeCP2. Ausgehend von der DNA-Methylierung könnte daher die Etablierung eines dichten, repressiven Chromatinzustands die Bindung von Transkriptionsfaktoren und weiteren transkriptionellen Aktivatoren herabsetzen und schließlich zu verminderter Genaktivität führen.

1.1.3 Mit DNA-Methylierung assoziierte Erkrankungen

Da die DNA-Methylierung an der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt ist, überrascht nicht die Vielzahl von Krankheiten, die mit einer fehlerhaften Methylierung assoziiert sind (Robertson, 2005). Darunter befinden sich beispielsweise Imprinting- und verschiedene Repeat-Instabilitätserkrankungen, aber auch Krebserkrankungen.

Tumorzellen zeigen im Allgemeinen eine globale Hypomethylierung ihres Genoms, die von der lokalen Hypermethylierung bestimmter Regionen begleitet wird (You & Jones, 2012). Man nimmt an, dass die Hypomethylierung zur genomischen Instabilität dieser Zellen beiträgt und in seltenen Fällen auch zur Aktivierung stillgelegter Onkogene führen kann (Kulis & Esteller, 2010; Robertson, 2005). Trotz der globalen Hypomethylierung weisen verschiedene Gene eine Hypermethylierung ihrer Promotor-CGIs auf. Dies betrifft unter anderem die Gruppe der Tumorsuppressorgene, und viele Studien berichten von der Inaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene durch DNA-Hypermethylierung (Kulis & Esteller, 2010). Zellkulturstudien mit Tumorzelllinien unterstützen einen solchen Mechanismus der Inaktivierung (Bergman & Cedar, 2013). Jedoch zeigen genomweite Studien auch, dass in vielen Krebsarten etliche CGIs konsistent *de novo* methyliert werden und mit ihnen nicht nur Gene assoziiert sind, die eine Rolle bei einer Wachstumsselektion spielen könnten (Bergman & Cedar, 2013). Es ist fest etabliert, dass eine fehlerhafte DNA-Methylierung eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielt, auch wenn die

zugrunde liegenden Prozesse noch nicht verstanden sind (Bergman & Cedar, 2013; Kulis & Esteller, 2010).

1.1.4 Veränderungen der DNA-Methylierung während des Alterns

DNA-Methylierungsmuster können sich jedoch nicht nur während verschiedener Erkrankungen, sondern auch im Laufe des natürlichen Alterungsprozesses verändern. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine altersabhängige Drift der DNA-Methylierung, die im Allgemeinen durch globale Hypomethylierungs- und lokale Hypermethylierungsereignisse gekennzeichnet ist (Fraga & Esteller, 2007; Jung & Pfeifer, 2015). Diese altersabhängigen Veränderungen könnten möglicherweise die Vorstufen der charakteristischen Methylierungsveränderungen vieler Krebserkrankungen sein und zu frühen Ereignissen der Zelltransformation und einer erhöhten Krebs susceptibility beitragen (Jung & Pfeifer, 2015). Doch auch andere, altersabhängige Erkrankungen, wie beispielsweise die Alzheimer-Krankheit (Fuso *et al.*, 2005; Tohgi *et al.*, 1999) oder Typ-2-Diabetes (Dayeh *et al.*, 2014), sind mit Veränderungen der DNA-Methylierung assoziiert. Die Geschwindigkeit, mit der altersabhängige Methylierungsveränderungen auftreten, ist jedoch nicht konstant und wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Dazu zählen unter anderem der Lebensstil und verschiedene Umwelteinflüsse (Jung & Pfeifer, 2015).

1.1.5 Etablierung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung

In Säugetieren vermitteln verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMTs) den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf Cytosin-Basen der DNA (Goll & Bestor, 2005). Die Beobachtung der generell symmetrischen Methylierung von CpG-Dinukleotiden auf beiden DNA-Strängen führte bereits 1975 in zwei unabhängigen Publikationen zur Formulierung einer Hypothese, nach der die Weitergabe von Methylierungsmustern durch semikonservative DNA-Replikation erfolgt (Goll & Bestor, 2005; Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975). Diese Hypothese setzte sowohl eine Form der Erhaltungs- als auch der *de novo*-Methylierungsaktivität voraus. Sie stellte sich als richtig heraus, auch wenn die entsprechenden Enzyme erst Jahre später entdeckt werden sollten (Goll & Bestor, 2005; Messerschmidt *et al.*, 2014).

DNMT3A und DNMT3B sind für die Etablierung von Methylierungsmustern verantwortlich und werden daher als *de novo*-Methyltransferasen bezeichnet (Denis *et al.*, 2011; Goll & Bestor, 2005). Sie spielen eine wichtige Rolle während der Entwicklung und besitzen teils unterschiedliche Funktionen (Messerschmidt *et al.*, 2014; Okano *et al.*, 1999). Beide Enzyme kooperieren mit der katalytisch inaktiven Form DNMT3L, einem wichtigen aktivierenden Kofaktor (Chen *et al.*, 2005; Ooi *et al.*, 2007; Suetake *et al.*, 2004). Trotz der Klassifizierung als *de novo*-Methyltransferasen spielen DNMT3A und DNMT3B auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomweiten Methylierungsmuster. So scheint es, als könnten sie Lücken ausbessern, die durch DNMT1 ausgelassen wurden (Arand *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2004). Deletionen von *Dnmt3a*, *Dnmt3b* oder *Dnmt3l* rufen schwerwiegende Defekte hervor und führen meist zu embryonaler Letalität (Messerschmidt *et al.*, 2014).

Die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) wird hauptsächlich als Erhaltungsmethyltransferase angesehen. Sie bindet während der S-Phase durch Interaktion mit UHRF1 (*ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*) an hemimethylierte CpG-Dinukleotide nahe der Replikationsgabel und methyliert diese vollständig (Avvakumov *et al.*, 2008; Bostick *et al.*, 2007; Sharif *et al.*, 2007). Auf diese Weise werden die Methylierungsmuster während der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben. In der Literatur finden sich jedoch auch Hinweise auf eine mögliche *de novo*-Methylierungsaktivität von DNMT1 (Arand *et al.*, 2012; Feltus *et al.*, 2003; Jair *et al.*, 2006; Vertino *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1993). Das murine *Dnmt1*-Gen besitzt drei verschiedene Isoformen, die sich in ihren alternativen ersten Exons unterscheiden. *Dnmt1o* und *Dnmt1p* sind geschlechtsspezifische Isoformen und werden nur in der Oozyte (*Dnmt1o*) bzw. nur in pachytänen Spermatozyten exprimiert (*Dnmt1p*). *Dnmt1s* ist die somatische, ubiquitär exprimierte Isoform und führt zur Entstehung des Volllänge-Proteins Dnmt1s (Bestor, 2000; Mertineit *et al.*, 1998). Das Dnmt1o-Protein ist 118 Aminosäuren kürzer, weist jedoch eine deutlich erhöhte Stabilität auf (Ding & Chaillet, 2002). Noch während der Entwicklung des Präimplantationsembryos wird Dnmt1o-Protein von aus Oozyten stammender mRNA translatiert (Kurihara *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu führt das spermatozytenspezifische *Dnmt1p*-Transkript zu keinen nachweisbaren Proteinleveln (Bestor, 2000; Mertineit *et al.*, 1998). Für die Entwicklung eines Organismus ist die korrekte Expression von *Dnmt1* unabdingbar. So verursacht die Deletion des

murinen *Dnmt1*-Gens einen erheblichen, globalen Verlust der DNA-Methylierung und führt zu Letalität während der Gastrulation (Messerschmidt *et al.*, 2014). Eine Überexpression von *Dnmt1* führt zu einer Hypermethylierung repetitiver Sequenzen, dem Verlust des Imprinting von *Igf2/H19* und zu embryonaler Letalität (Binizskiewicz *et al.*, 2002).

1.1.6 TET-Dioxygenasen und DNA-Demethylierung

Während das DNA-Methylierungsmuster in somatischen Zellen durch das Zusammenwirken von DNMT1 und UHRF1 aufrechterhalten wird und größtenteils stabil ist, findet in frühen Entwicklungsstadien, wie im Präimplantationsembryo oder in sich entwickelnden primordialen Keimzellen, eine genomweite DNA-Demethylierung statt (Hajkova *et al.*, 2002; Oswald *et al.*, 2000; Reik *et al.*, 2001). Die Demethylierung erfolgt sehr schnell und kann nicht allein durch einen replikationsabhängigen, passiven Verlust von 5mC - beispielweise durch Replikation in Abwesenheit von DNMT1/UHRF1 - erklärt werden. Vielmehr scheinen enzymatische Prozesse beteiligt zu sein, die Methylgruppen aktiv entfernen bzw. modifizieren können (Wu & Zhang, 2010). Auch in somatischen Zellen finden sich verschiedene Hinweise auf aktive Demethylierungsprozesse. Dazu zählen beispielsweise die äußerst schnelle Demethylierung der *Interleukin-2*-Promotor/Enhancer-Region in aktivierten T-Zellen in Abwesenheit von DNA-Replikation (Bruniquel & Schwartz, 2003) oder die Demethylierung des *BDNF*-Promotors in stimulierten, post-mitotischen Neuronen (Martinowich *et al.*, 2003). Lange Zeit wurde nach einer „DNA-Demethylase“ oder anderen Mechanismen der aktiven DNA-Demethylierung in Säugetieren gesucht (Delatte & Fuks, 2013; Guo *et al.*, 2011a), doch es konnte kein stimmiges Gesamtkonzept etabliert werden (Wu & Zhang, 2014).

Dies änderte sich mit dem eindeutigen Nachweis der Base 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) im Säugetiergenom (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009) und der Entdeckung der Oxidation von 5mC zu 5hmC durch TET1 (Tahiliani *et al.*, 2009). TET1 wurde ursprünglich als Fusionspartner eines weiteren Enzyms in einer Translokations-assoziierten Form der Leukämie beschrieben (Lorsbach *et al.*, 2003), woraus sich der aktuelle Gennamen ableitet (*ten-eleven translocation-1*). Die TET-Familie der Methylcytosin-Dioxygenasen umfasst die Mitglieder TET1, TET2 und

TET3, die alle in der Lage sind, 5mC zu 5hmC, aber in sukzessiven Schritten noch weiter zu 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC) zu oxidieren (He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011). Ausgehend von den oxidierten 5mC-Basen eröffnen sich aktive und passive Demethylierungsprozesse, die schließlich zu unmodifiziertem Cytosin führen (Pastor *et al.*, 2013).

Diese Entdeckungen schufen die Grundlage für das Verständnis der Initiierung von aktiver und passiver DNA-Demethylierung durch Enzyme der TET-Familie. Weitere Studien belegen allerdings auch nicht-katalytische Funktionen der TET-Familie und weisen auf Funktionen der oxidierten 5mC-Derivate hin, die über eine Rolle als reine Zwischenprodukte der DNA-Demethylierung hinauszugehen scheinen (Delatte *et al.*, 2014; Delatte & Fuks, 2013; Pastor *et al.*, 2013).

1.1.6.1 Iterative Oxidation von Methylcytosin

TET-Enzyme sind in allen Metazoen mit konservierter Cytosin-Methylierung vorhanden. Sie fehlen jedoch in Organismen wie *C. elegans*, in denen die Methylierung im Laufe der Evolution verloren ging. In Kiefermäulern, einer Überklasse innerhalb der Wirbeltiere, entstanden *TET1*, *TET2* und *TET3* durch Triplikation eines gemeinsamen Vorläufer-Gens (Pastor *et al.*, 2013). Die TET-Enzyme sind 2-Oxoglutarat- und Fe²⁺-abhängige Dioxygenasen, die 5mC sequentiell zu 5hmC, 5fC und 5caC oxidieren können (He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011; Minor *et al.*, 2013; Tahiliani *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2013). Durch die sukzessiven Reaktionen der DNMTs und TET-Enzyme erhöht sich die Zahl der bekannten Cytosin-Arten im Säugetiergenom auf insgesamt fünf Basen (Abbildung 2A).

Der 5hmC-Gehalt unterscheidet sich in verschiedenen Säugetierzellen mitunter recht deutlich (Pastor *et al.*, 2013): Im Vergleich zu 5mC stellt 5hmC 1% des totalen 5mC-Gehalts in einigen Immunzellpopulationen, etwa 5-10% in embryonalen Stammzellen und 40% in Purkinje-Neuronen. Doch auch in vielen anderen Zelltypen kann 5hmC mit einem Anteil von 1-5% des 5mC-Gehalts ohne weiteres detektiert werden (Globisch *et al.*, 2010; Wu & Zhang, 2014). Übereinstimmend wurden in mehreren Publikationen die bisher höchsten 5hmC-Level im Gehirn beschrieben (Globisch *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2011; Pastor *et al.*, 2013; Szwagierczak *et al.*, 2010). 5fC und 5caC sind dagegen deutlich seltener vorhanden und stellen nur 0,03% (5fC) bzw. 0,01% (5caC) des gesamten 5mC-Gehaltes in murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) (Pastor *et al.*, 2013).

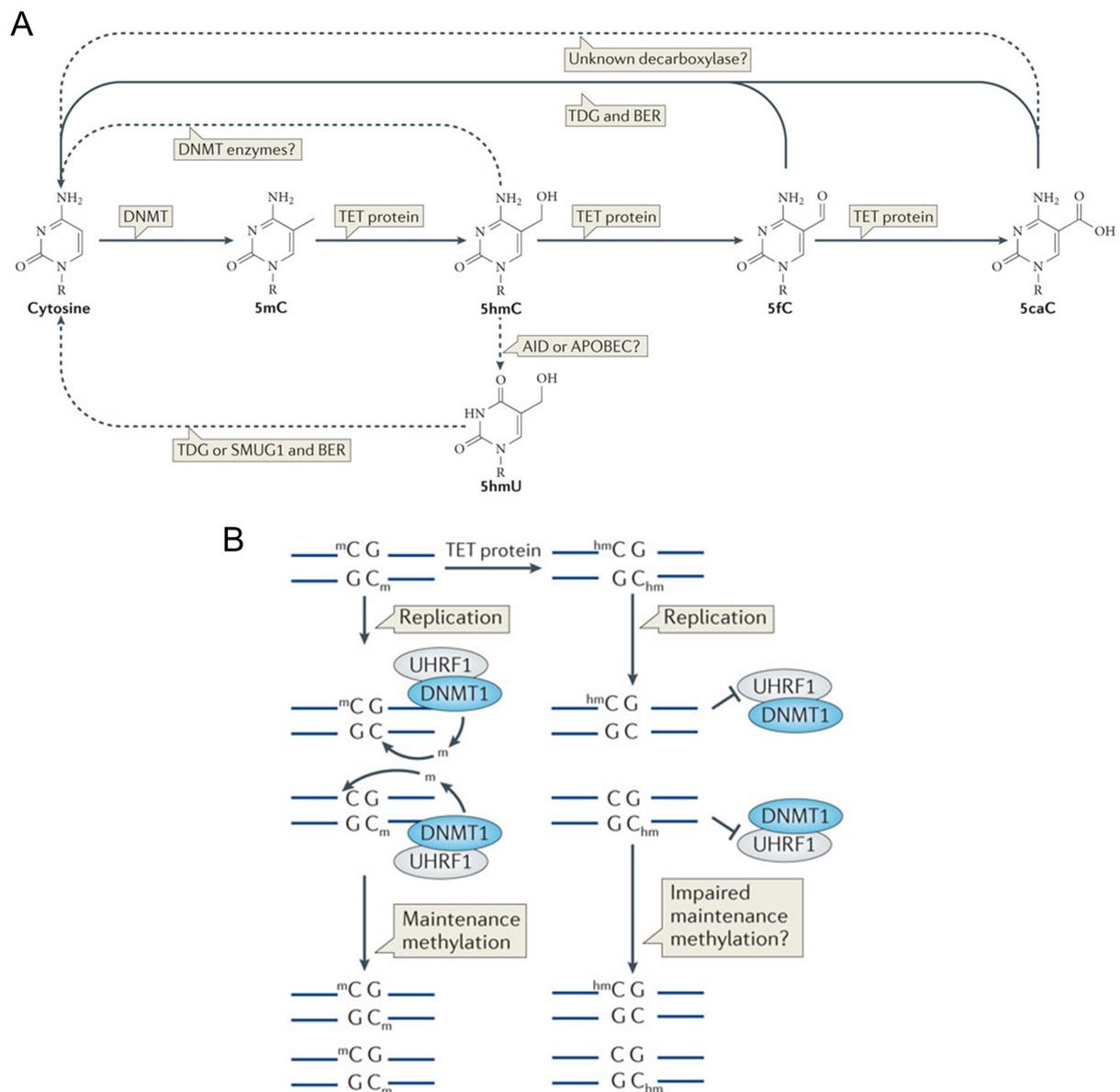


Abbildung 2: Mechanismen der TET-vermittelten DNA-Demethylierung. (A) Mögliche aktive Demethylierungsmechanismen, die auf der initialen Oxidation von 5-Methylcytosin (5mC) beruhen. Proteine der TET-Familie (*ten-eleven translocation*) oxidieren iterativ 5mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC). 5fC und 5caC können durch die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) entfernt und schließlich über die Basenexzisionsreparatur (BER) durch unmodifizierte Cytosine ersetzt werden. Dieser Mechanismus wurde von mehreren Forschungsgruppen bestätigt. Es ist jedoch unklar, in welchem Umfang er in verschiedenen Zelltypen zur Anwendung kommt. Andere Demethylierungsmechanismen sind weniger gut etabliert. Diese umfassen die Decarboxylierung von 5caC, die DNA-Methyltransferase(DNMT)-vermittelte Entfernung der Hydroxymethyl-Gruppe von 5hmC, sowie die Desaminierung von 5hmC durch die Cytidin-Desaminasen AID (*activation-induced cytidine deaminase*) und APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*). Durch die Desaminierung entsteht 5-Hydroxymethyluracil (5hmU), das durch Reparaturenzyme wie TDG oder SMUG1 (*single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1*) entfernt und über die BER durch Cytosin ersetzt werden könnte. (B) Passive Wiederherstellung unmodifizierter Cytosine durch replikationsabhängige Verdünnung von 5hmC. Eine symmetrisch methylierte CpG-

Sequenz wird während der DNA-Replikation in zwei asymmetrisch methylierte DNA-Stränge überführt (linke Bildhälfte). Die hemimethylierten CpG-Dinukleotide werden durch UHRF1, einen Bindepartner der Erhaltungsmethyltransferase DNMT1, erkannt und schließlich durch DNMT1 vollständig methyliert. Auf diese Weise wird das symmetrische Methylierungsmuster wiederhergestellt. TET-Proteine oxidieren methylierte CpGs und führen zur Entstehung symmetrisch hydroxymethylierter CpG-Sequenzen (rechte Bildhälfte, oben). 5hmC-Basen (und möglicherweise 5fC/5caC) beeinträchtigen durch Inhibition der UHRF1-Bindung und der DNMT1-Aktivität den Prozess der Erhaltungsmethylierung. Als Folge entstehen an ehemals methylierten CpG-Positionen unmodifizierte Cytosine (rechte Bildhälfte, unten). Durch sukzessive Replikationszyklen erfolgt die weitere Verdünnung von 5hmC und es entstehen vollständig (d.h. auf beiden Strängen) unmodifizierte CpG-Positionen. UHRF1: *ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*. Abbildung verändert nach Pastor *et al.*, 2013.

1.1.6.2 Mechanismen der DNA-Demethylierung

Es wurden mehrere mögliche Wege der TET-vermittelten DNA-Demethylierung beschrieben, die in passive und aktive Demethylierungsmechanismen unterteilt werden können.

Passive Demethylierung

Eine Möglichkeit der Demethylierung ist die passive Wiederherstellung unmodifizierter Cytosine durch die replikationsabhängige Verdünnung oxidierter 5mC-Basen (Abbildung 2B). So besitzt die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 eine deutlich niedrigere Methylierungsaktivität an hemihydroxymethylierten CpGs (Hashimoto *et al.*, 2012; Valinluck & Sowers, 2007), und auch der Interaktionspartner UHRF1, der DNMT1 während der DNA-Replikation zu hemimethylierten CpGs führt, zeigt eine herabgesetzte Affinität zu hemihydroxymethylierten CpGs (Hashimoto *et al.*, 2012). Ob hemimodifizierte CpGs bestehend aus den Basen 5fC und 5caC ebenfalls die Maschinerie zur Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung beeinträchtigen können, ist derzeit noch nicht geklärt (Wu & Zhang, 2014). In proliferierenden Zellen können die TET-Enzyme folglich einen Demethylierungsprozess initiieren, der mit der aktiven Oxidation methylierter CpGs beginnt, woraufhin sich die replikationsabhängige, passive Verdünnung von 5hmC (und möglicherweise 5fC/5caC) anschließt (Wu & Zhang, 2014). Über den Prozess der DNA-Replikation entstehen an ehemals methylierten CpG-Positionen unmodifizierte Cytosine.

Aktive Demethylierung

Neben der passiven Verdünnung oxidierter 5mC-Basen wurden verschiedene aktive Demethylierungsmechanismen beschrieben. Auch diese Prozesse beginnen mit der Oxidation von 5mC durch die TET-Enzyme, jedoch wird die Demethylierung replikationsunabhängig durch die aktive Wiederherstellung unmodifizierter Cytosine erreicht (Abbildung 2A).

In vitro-Experimente zeigen, dass die *de novo*-Methyltransferasen DNMT3A/B unter oxidierenden Bedingungen direkt die Hydroxymethyl-Gruppe von 5hmC entfernen können (Chen *et al.*, 2012). Das Resultat dieser Reaktion ist unmodifiziertes Cytosin; jedoch ist nicht bekannt, ob diese Reaktion auch in Zellen stattfindet (Pastor *et al.*, 2013).

Ein weiterer Mechanismus der direkten Entfernung eines Substituenten an der C5-Position des Cytosins ist die enzymatische Decarboxylierung von 5caC. Es gibt Hinweise auf eine solche direkte Konvertierung von 5caC zu Cytosin in Lysaten von mESCs (Schiesser *et al.*, 2012), jedoch konnten die verantwortlichen Enzyme bisher nicht identifiziert werden (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014).

Zwei weitere aktive Demethylierungsmechanismen wurden beschrieben, die auf dem Zusammenwirken der TET-vermittelten Oxidation von Methylcytosinen und der Basenexzisionsreparatur (BER) beruhen. Die größte experimentelle Unterstützung hat das Konzept der Demethylierung unter Beteiligung der Oxidationsprodukte 5fC und 5caC sowie der Thymin-DNA-Glykosylase (*thymine-DNA glycosylase*; TDG) erfahren (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014). Durch dieses Reparaturenzym können 5fC und 5caC erkannt und entfernt werden, woraufhin das Ausbessern der abasischen Stelle mit unmodifiziertem Cytosin erfolgt. Es finden sich überzeugende Hinweise auf diesen aktiven Demethylierungsmechanismus in mESCs, jedoch ist unklar, in welchem Umfang dieser Mechanismus *in vivo* und in anderen Zelltypen zur Anwendung kommt (Wu & Zhang, 2014). Der zweite reparaturbasierte Mechanismus wurde bisher von einer Arbeitsgruppe in kultivierten Zellen und im Mausgehirn beschrieben (Guo *et al.*, 2011b). Demnach erfolgt eine Desaminierung von 5hmC durch AID- (*activation-induced cytidine deaminase*) und APOBEC-Proteine (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*), wodurch 5-Hydroxymethyluracil (5hmU) entsteht. Dieses wird wiederum durch Reparaturenzyme wie TDG oder SMUG1 (*single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1*) entfernt und letztendlich über die BER durch Cytosin ersetzt. Dieser Mechanismus hat sich bisher nicht etabliert und wird aufgrund

verschiedener Bedenken kontrovers diskutiert (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014).

1.1.6.3 Regulation der genomischen Zielfindung der TET-Enzyme

Nahe ihrer N-Termini besitzen TET1 und TET3 eine Cystein-X-X-Cystein-Zinkfingerdomäne (CXXC) (Wu & Zhang, 2014). Diese Domäne ist Bestandteil vieler Chromatin-assoziiierter Proteine und zeichnet sich oft durch eine hohe Affinität zu unmethylierten CpG-Dinukleotiden aus (Long *et al.*, 2013). Dem TET2-Protein fehlt eine solche CXXC-Domäne, jedoch kodiert ein benachbartes Gen namens *IDAX* (*inhibition of the Dvl and axin complex*; auch *CXXC4* genannt) für eine CXXC-Domäne, die derjenigen von TET1 und TET3 sehr ähnlich ist (Wu & Zhang, 2014). Man nimmt an, dass das ursprüngliche *TET2*-Gen einer chromosomalen Inversion unterlag, wodurch sich das CXXC-kodierende Exon loslöste und zum separaten Gen *IDAX* wurde (Iyer *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2013). Genomweite Analysen zeigen, dass *IDAX* vorzugsweise an unmethylierte, CpG-reiche Regionen bindet, zu denen es das TET2-Protein zu rekrutieren scheint (Ko *et al.*, 2013). Studien mit verschiedenen Zelltypen legen nahe, dass alle drei TET-Enzyme eine ähnliche Präferenz aufweisen und überwiegend an unmethylierte, CpG-reiche Promotoren binden (Wu & Zhang, 2014).

Andere Studien weisen aber auch darauf hin, dass die CXXC-Domäne des TET1-Proteins neben unmethylierten CpGs auch methylierte CpGs binden kann (Xu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). Eine andere Studie wiederum berichtet, diese Domäne würde überhaupt keine DNA binden (Frauer *et al.*, 2011). Von der CXXC-Domäne des TET3-Proteins wurde berichtet, unmethylierte Cytosine innerhalb, aber auch außerhalb des CpG-Kontexts zu binden (Xu *et al.*, 2012). Während einige CXXC-Domänen spezifisch unmethylierte CpGs erkennen, könnten die CXXC-Domänen von TET1, TET3 und *IDAX* womöglich eine höhere Flexibilität besitzen und eine Rolle bei der Rekrutierung der TET-Enzyme zu ihren spezifischen genomischen Zielen spielen (Wu & Zhang, 2014).

1.1.6.4 Verteilung oxidierter Methylcytosine im Genom

Die genomische Verteilung modifizierter Cytosine kann mithilfe verschiedener affinitätsbasierter Anreicherungs- und basengenaue Kartierungsmethoden bestimmt werden (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014). Beide Methodengruppen besitzen unterschiedliche Vor- und Nachteile, können aber übereinstimmend Regionen identifizieren, die reich an Cytosinen sind, die einen mittleren bis hohen Modifizierungsgrad aufweisen. An Regionen mit spärlich verteilten oder selten modifizierten Cytosinen können sich die Ergebnisse jedoch unterscheiden (Wu & Zhang, 2014). Generell können Diskrepanzen zwischen genomweiten Kartierungsstudien aufgrund unterschiedlicher Methoden, Datenanalysestrategien oder auch abweichender Begriffsdefinitionen auftreten (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014).

Oxidierter Methylcytosine in Promotoren

Promotoren mit einem hohen CpG-Gehalt (HCPs, siehe Kapitel 1.1.2) besitzen meist starke CGIs, sind generell unmethyliert und transkriptionell aktiv. Wie aufgrund der niedrigen 5mC-Verfügbarkeit an HCPs erwartet, zeigen sowohl affinitätsbasierte als auch basengenaue Kartierungsstudien in flankierenden Regionen der TSS aktiver Promotoren (überwiegend HCPs) in mESCs als aktuellen Grundkonsens generell das Fehlen von 5hmC/5fC/5caC an (Wu & Zhang, 2014). TET-Proteine, die an CpG-reichen aktiven Promotoren angereichert sind, können hier die Transkription durch nicht-katalytische Effekte unterstützen (Wu & Zhang, 2014) (siehe Kapitel 1.1.6.6). Andere affinitätsbasierte Studien beschreiben in Stammzellen jedoch auch die Gegenwart von 5hmC in der Nähe von Promotoren mit mittlerem und hohem CpG-Gehalt (Williams *et al.*, 2012). Dies schuf die Grundlage für eine Hypothese, nach der TET1 und möglicherweise auch andere TET-Enzyme für die Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustands von CGIs verantwortlich sein könnten, indem sie der Akkumulation von fehlerhafter, sporadischer Methylierung entgegenwirken (Williams *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2011). Eine Studie in HEK293T-Zellen zeigt auch, dass TET1 die Anreicherung von 5hmC in den Randbereichen hypomethylierter CGIs bewirkt und die anomale Ausbreitung von DNA-Methylierung hinein in hypomethylierte CGIs verhindert (Jin *et al.*, 2014). Die Diskrepanz hinsichtlich der 5hmC-Präsenz an HCPs könnte auf die eingangs erwähnten Unterschiede zwischen

verschiedenen Studien zurückzuführen sein – insbesondere auf eine abweichende Definition des Begriffs einer Anreicherung (Pastor *et al.*, 2013).

Promotoren mit mittlerem oder niedrigem CpG-Gehalt (ICPs/LCPs) zeigen sowohl nach affinitätsbasierten als auch nach basengenauen Kartierungsstudien im Allgemeinen einen höheren 5hmC-Gehalt als HCPs. Sie sind zudem überwiegend mit einer mittelstarken bis schwachen Genexpression assoziiert (Wu & Zhang, 2014). Dies weist jedoch nicht auf eine reprimierende Rolle von 5hmC hin. Vielmehr kann 5hmC nur an Promotoren mit zugrunde liegender DNA-Methylierung entstehen und eine Methylierung des Promotors korreliert mit transkriptioneller Repression (Pastor *et al.*, 2013).

Nach dem Knockdown von *Tdg* in mESCs können die mitunter höchsten Level an 5hmC/5fC/5caC in den Promotoren und Promotor-flankierenden Regionen von entwicklungsregulatorischen Genen und keimblattspezifischen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die hauptsächlich zu den ICPs zählen (Shen *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014). Dies deutet auf eine TET/TDG-vermittelte aktive Demethylierung an diesen Loci hin, bei denen es sich oft um partiell methylierte Regionen und bivalente Promotoren handelt, die zwar transkriptionell inaktiv sind, aber schnell aktiviert werden können (Beisel & Paro, 2011; Wu & Zhang, 2014). Die TET-Proteine und oxidierten 5mC-Basen könnten auf verschiedene Weise zur Etablierung und/oder Aufrechterhaltung des transkriptionell inaktiven, aber schnell aktivierbaren Stadiums dieser Promotoren beitragen (Wu & Zhang, 2014). Dazu zählen die Aufrechterhaltung des partiell methylierten Zustands durch DNA-Demethylierung, die Rekrutierung/Abweisung spezifischer Interpreten modifizierter Cytosine (siehe Kapitel 1.1.6.5) sowie die Rekrutierung TET-interagierender Co-Repressor-Komplexe (siehe Kapitel 1.1.6.6).

Oxidierter Methylcytosine in Genen

Nahezu alle untersuchten Typen an Säugetierzellen zeigen eine intragenische Anreicherung von 5hmC, die positiv mit der Genexpression korreliert (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014). Während die Methylierung von Promotoren stark mit transkriptioneller Repression korreliert, hängt die Korrelation von intragenischer Methylierung und Genexpression vom Zelltyp ab und davon, ob sich die methylierten Cytosine im CpG-Kontext befinden. Es ist unklar, wie die intragenische Oxidation von 5mC oder eine DNA-Demethylierung durch die TET-Enzyme in diesen Bereichen die Genexpression beeinflussen könnten (Pastor *et al.*, 2013). Da 5hmC/5fC/5caC in

mESCs stärker in Exons als in Introns angereichert sind, könnte möglicherweise ein Einfluss auf die mRNA-Prozessierung bestehen (Wu & Zhang, 2014).

Oxidierter Methylcytosine in distalen regulatorischen Elementen

Sowohl affinitätsbasierte als auch basengenaue Kartierungsstudien zeigen eine starke 5hmC-Anreicherung an aktiven distal-regulatorischen Elementen (Wu & Zhang, 2014). Neben einer niedrigen CpG-Dichte (Pastor *et al.*, 2013) besitzen diese Regionen meist auch einen niedrigen Methylierungsgrad (Wu & Zhang, 2014). Die basengenaue Analyse zeigt, dass sich 5hmC direkt angrenzend an Transkriptionsfaktorbindestellen anreichert, an der eigentlichen Bindestelle aber nicht vorhanden ist (Yu *et al.*, 2012). Es ist unbekannt, ob die Oxidation von 5mC das Chromatin leichter zugänglich für die Bindung von Transkriptionsfaktoren macht, ob Transkriptionsfaktoren TET-Proteine rekrutieren können oder ob beide Mechanismen stattfinden und sich gegenseitig verstärken (Pastor *et al.*, 2013). Auch könnte die Transkriptionsfaktorbindung zunächst durch Ausbildung einer Schleife die Enhancer-Promotor-Interaktion ermöglichen, woraufhin Promotor-gebundene TET-Proteine Zugang zu distal-regulatorischen Elementen erhalten (Wu & Zhang, 2014). Die Reduktion der 5mC- und 5hmC-Level an den Transkriptionsfaktorbindestellen könnte das Ergebnis einer TET-vermittelten Demethylierung sein, aber ebenso durch Transkriptionsfaktoren verursacht werden, welche die Bindung von DNMTs und TET-Proteinen blockieren (Pastor *et al.*, 2013).

In sich differenzierenden Stammzellen nehmen die 5hmC-Level an aktivierten Enhancern stark zu. Bereits kurz nach Beginn der Differenzierung steigt der 5hmC-Gehalt und zeitnah findet die Acetylierung von Lysin 27 des Histons 3 statt, bei der es sich um eine epigenetische Markierung aktiver Enhancer handelt. Es findet eine TET-vermittelte Demethylierung statt und auch TDG-reduzierte Stammzellen zeigen eine Anreicherung von 5fC und 5caC als Hinweis auf aktive Demethylierungsprozesse (Pastor *et al.*, 2013).

1.1.6.5 Interpretieren oxidierter Methylcytosine

Zusätzlich zur Rolle eines reinen Zwischenprodukts der DNA-Demethylierung finden sich Hinweise auf weitere Funktionen von 5hmC. Die oxidierte 5mC-Base ist im Genom relativ stabil (Wu & Zhang, 2014) und insbesondere das hohe Vorkommen im Gehirn hat die Suche nach 5hmC-bindenden Proteinen vorangetrieben, die einen möglichen Informationsgehalt interpretieren bzw. translatieren können (Delatte *et al.*, 2014). Während 5hmC einerseits bestimmte Proteine anziehen könnte, ist es ebenso denkbar, dass andere Proteine abgestoßen werden (Wu & Zhang, 2014).

Es gibt Hinweise, nach denen verschiedene MBD-Proteine ein Bindungsvermögen sowohl für 5mC als auch für 5hmC aufweisen, wenn auch meist im hemihydroxymethylierten CpG-Kontext und mit niedrigerer Affinität im Vergleich zu vollständig methylierten CpGs (Delatte *et al.*, 2014). Weitere Analysen identifizierten eine große Anzahl an Kandidatenproteinen, die selektiv an 5hmC-haltige Oligonukleotide binden bzw. von ihnen abgestoßen werden (Wu & Zhang, 2014). Einige dieser Kandidaten werden ubiquitär exprimiert, wohingegen andere eine zelltypspezifische Expression aufweisen. Dies zeigt, dass 5hmC in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Funktionen ausüben könnte (Delatte *et al.*, 2014; Wu & Zhang, 2014). Neben 5hmC-bindenden Proteinen wurden zudem mögliche Interpretieren der 5fC- und 5caC-Modifikation identifiziert. Einige der mutmaßlichen Interpretieren oxidierter 5mC-Basen binden überdies in Abhängigkeit von der spezifischen CpG-Zusammensetzung (Delatte *et al.*, 2014).

Zu den identifizierten Kandidatenproteinen gehören einige uncharakterisierte Proteine, aber auch Transkriptionsfaktoren, Chromatinregulatoren und DNA-Reparaturproteine (Pastor *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2014). Als 5fC- und 5caC-bindendes Protein konnte insbesondere die TDG bestimmt werden, wodurch die Bedeutung dieses Enzyms für die aktive DNA-Demethylierung nochmals unterstrichen wird (Delatte *et al.*, 2014; Iurlaro *et al.*, 2013; Spruijt *et al.*, 2013).

1.1.6.6 Nicht-katalytische Funktionen der TET-Enzyme

Unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität können die TET-Enzyme auf verschiedene Weise die Genexpression beeinflussen. So kann TET1 an seinen genomischen Bindestellen eine transkriptionelle Repression durch die Rekrutierung der repressiven Komplexe Mbd3/NURD (Yildirim *et al.*, 2011), SIN3A (Williams *et al.*, 2011) oder PRC2 (Wu *et al.*, 2011) bewirken. Während auch TET3 den SIN3A-Co-Repressor-Komplex rekrutieren kann, zeigt TET2 keine solche Interaktion (Deplus *et al.*, 2013).

Alle TET-Enzyme können jedoch direkt mit dem Enzym OGT (*O-linked N-acetylglucosamine transferase*) interagieren und es zu CpG-reichen Promotoren in mESCs und differenzierten Zellen führen (Wu & Zhang, 2014). Es wurde das Modell der „hydroxymethylierungsunabhängigen“ Genaktivierung beschrieben (Delatte *et al.*, 2014), nach dem diese Interaktion die Glycosyltransferaseaktivität des OGT-Enzyms auf das Histon H2B und den SET1/COMPASS-Komplex verstärkt. Dies führt schließlich zu H3K4-Trimethylierung und transkriptioneller Aktivierung (Chen *et al.*, 2013; Deplus *et al.*, 2013; Vella *et al.*, 2013).

1.1.6.7 Biologische Funktionen der TET-Enzyme

Verschiedene Zelltypen und Gewebe besitzen mitunter recht deutlich abweichende *TET*-Expressionsmuster (Ito *et al.*, 2010; Lorsbach *et al.*, 2003; Szwagierczak *et al.*, 2010). So zeigen beispielsweise embryonale Stammzellen vornehmlich die Expression von *TET1* und *TET2*, wohingegen *TET3* besonders stark im Gehirn und in der Zygote exprimiert wird.

Studien mit verschiedenen Zelltypen zeigen jedoch übereinstimmend, dass alle drei TET-Enzyme vorzugsweise an unmethylierte, CpG-reiche Promotoren binden (Wu & Zhang, 2014). Entsprechend der vorgeschlagenen Hypothese von Williams und Kollegen könnten die TET-Enzyme hier katalytisch aktiv sein, um den unmethylierten Zustand von CGIs aufrechtzuerhalten und der Anreicherung fehlerhafter, sporadischer Methylierung entgegenzuwirken (Williams *et al.*, 2012). In dieses Bild fügt sich auch die beschriebene Rolle von TET1 ein, die anomale Ausbreitung von DNA-Methylierung hinein in hypomethylierte CGIs zu verhindern (Jin *et al.*, 2014).

Verschiedene Transkriptionsfaktoren können die TET-Enzyme aber auch zu ihren genomischen Zielpositionen führen, um dort katalytisch aktiv zu werden bzw. DNA-

Demethylierung zu initiieren. Dies geschieht beispielsweise während der Reprogrammierung somatischer Zellen zu pluripotenten Stammzellen (Costa *et al.*, 2013) oder der Differenzierung von Präadipozyten (Fujiki *et al.*, 2013) und Monozyten (de la Rica *et al.*, 2013).

Eine wichtige Rolle spielen die TET-Enzyme während der zwei Phasen globaler DNA-Demethylierung, die während der Säugetierentwicklung durchlaufen werden und Teil der epigenetischen Reprogrammierung sind (Delatte *et al.*, 2014; Messerschmidt *et al.*, 2014; Pastor *et al.*, 2013). In primordialen Keimzellen ermöglichen hohe Level an TET1 und TET2 die massive Konvertierung von 5mC zu 5hmC, woraufhin die passive, replikationsgekoppelte Verdünnung von 5hmC erfolgt. Die zweite Phase globaler Demethylierung ereignet sich direkt nach der Befruchtung in der Zygote. TET3 oxidiert massenhaft 5mC des paternalen Genoms, während das maternale Genom und geimprintete Loci durch PGC7 (auch DPPA3/STELLA genannt) geschützt werden. Auch hier findet anschließend die replikationsabhängige Verdünnung von 5hmC statt. In beiden Fällen globaler Demethylierung läuft im Wesentlichen das gleiche Muster ab (Pastor *et al.*, 2013): Durch die massenhafte Oxidation von 5mC durch die TET-Enzyme entsteht vornehmlich 5hmC, das während nachfolgender Zellteilungen die Aufrechterhaltung der Methylierung beeinträchtigt und die DNA-Demethylierung vorantreibt. Sowohl in der Zygote als auch in primordialen Keimzellen ist die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung ohnehin schon stark herabgesetzt. Durch die Konvertierung von 5mC zu 5hmC beschleunigen die TET-Enzyme jedoch den Prozess der passiven DNA-Demethylierung zusätzlich (Pastor *et al.*, 2013).

Die TET-Enzyme spielen auch bei zahlreichen anderen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Obwohl sie größtenteils entbehrlich für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen sind (Wu & Zhang, 2014), unterstreichen mehrere Studien die Bedeutung der TET-Enzyme während der Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (Delatte *et al.*, 2014; Pastor *et al.*, 2013). So spielen TET1 und TET2 eine wichtige Rolle bei der Demethylierung und Aktivierung maßgeblicher Pluripotenz-vermittelnder Gene (Delatte *et al.*, 2014).

Tet1-Knockout-Mäuse sind lebensfähig, fertil und nach größerer Charakterisierung offenkundig normal, auch wenn einige Tiere bei der Geburt eine geringere Körpergröße aufweisen (Dawlaty *et al.*, 2011). Ein Verlust von *Tet1* scheint demnach eher geringfügige Auswirkungen auf die Entwicklung zu haben. Subtilere Defekte, die sich möglicherweise erst in höherem Alter auswirken, können jedoch nicht

ausgeschlossen werden (Dawlaty *et al.*, 2011). Auch *Tet2*-Knockout-Mäuse sind lebensfähig und fertil, entwickeln aber nach einigen Monaten eine gestörte Hämatopoese und einen Zustand ähnlich der chronischen myelomonozytären Leukämie mit oftmals letalem Ausgang innerhalb eines Jahres (Li *et al.*, 2011). Da *Tet1* und *Tet2* während früher Entwicklungsphasen teilweise überlappende Expressionsmuster zeigen, wurde ein gewisses Maß an funktionaler Redundanz unter den Enzymen vermutet (Dawlaty *et al.*, 2011). Tatsächlich zeigen *Tet1/Tet2*-Doppelknockout-Embryonen in etwa der Hälfte aller Fälle ausgeprägte Entwicklungsdefekte gefolgt von perinataler Letalität, während die andere Hälfte zu offenkundig normalen und fertilen Tieren heranwächst. Adulte *Tet1/Tet2*-Doppelknockout-Mäuse besitzen eine erhöhte *Tet3*-Expression, die womöglich teilweise den Verlust der anderen Tet-Enzyme kompensieren und ein Überleben der Tiere gewährleisten konnte. Auch in dieser Studie können in den überlebenden Tieren subtilere Defekte mit möglicherweise später auftretenden Auswirkungen nicht ausgeschlossen werden (Dawlaty *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu der beschriebenen homozygoten Deletion von *Tet1*, *Tet2* oder der kombinierten Deletion dieser Gene, ist die homozygote Deletion des *Tet3*-Gens vollständig perinatal letal. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die Deletion des *Tet3*-Gens in der Oozyte nach anschließender Befruchtung mit wildtypischen Spermien zu einer stark beeinträchtigten Demethylierung des paternalen Genoms, sowie zu einer deutlichen Zunahme embryonaler Entwicklungsdefekte und erhöhter Letalität führt (Gu *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Tet3-Enzyms bei der epigenetischen Reprogrammierung des paternalen Genoms nach der Befruchtung. Grundsätzlich spielen die Tet-Enzyme also eine wichtige Rolle während der Entwicklung, auch wenn sie möglicherweise teils redundante Funktionen besitzen. Die TET-Enzyme sind an verschiedenen terminalen Differenzierungsprozessen beteiligt (Delatte *et al.*, 2014). Wie zuvor beschrieben, beinhaltet dies beispielsweise die Differenzierung von Präadipozyten und Monozyten, aber auch die korrekte Ausbildung verschiedener Neuronen und Gehirnregionen (Colquitt *et al.*, 2013; Hahn *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2012). Zudem scheinen die TET-Enzyme auch an der Regulation verschiedener Gehirnfunktionen, wie dem räumlichen Lernen, dem Kurzzeitgedächtnis und dem Löschen von Erinnerungen, beteiligt zu sein (Kaas *et al.*, 2013; Rudenko *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Auch bei der Tumorgenese können die TET-Enzyme eine Rolle spielen (Delatte *et al.*, 2014; Wu & Zhang, 2014). In Abhängigkeit der spezifischen Krebserkrankung

können die TET-Enzyme einerseits als Tumorsuppressoren wahrgenommen werden (Hsu *et al.*, 2012; Lian *et al.*, 2012), scheinen andererseits aber auch onkogenisches Potential zu besitzen (Huang *et al.*, 2013).

Das Gehirn von Säugetieren ist besonders reich an 5hmC, und die TET-Enzyme spielen womöglich eine wichtige Rolle bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen (Delatte *et al.*, 2014). Eine veränderte *TET*-Expression und gestörte 5hmC-Level wurden beispielsweise in den Gehirnen von Patienten beschrieben, die an einer Psychose (Dong *et al.*, 2012) oder an der Huntington-Krankheit leiden (Villar-Menendez *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

1.2 Somatostatin und die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit wurde erstmals 1906 von dem deutschen Arzt Alois Alzheimer beschrieben (Goedert & Spillantini, 2006) und ist mit weltweit mehr als 35 Millionen betroffenen Personen die häufigste Form der Demenz (Querfurth & LaFerla, 2010). Der größte Risikofaktor ist das Alter. Man nimmt an, dass sich das Risiko zu erkranken nach dem 65. Lebensjahr alle fünf Jahre verdoppelt (Querfurth & LaFerla, 2010). Aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Weltbevölkerung geht man von stark zunehmenden Fallzahlen aus (Brookmeyer *et al.*, 2007). Schätzungen zufolge werden im Jahr 2050 etwa 135 Millionen Menschen an dieser Krankheit leiden (Wisniewski & Goni, 2015).

Bei der Alzheimer-Krankheit handelt es sich um eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die durch die Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit, psychiatrische Symptome und Verhaltensstörungen sowie durch die nachlassende Fähigkeit zur Bewältigung von Alltagsaufgaben gekennzeichnet ist. Letztendlich führt sie zu stark ausgeprägter Demenz mit Bettlägerigkeit und dem Verlust von Sprache und psychomotorischen Fähigkeiten (Burns & Iliffe, 2009). Aus neuropathologischer Sicht sind Ablagerungen von Amyloid- β -Peptiden (A β) in Form extrazellulärer, seniler Plaques sowie von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen in der Form intrazellulärer Neurofibrillenbündel charakteristisch für diese Erkrankung (Bertram *et al.*, 2010). Weitere Kennzeichen sind ein Verlust von Neuronen und weißer Substanz, vaskuläre A β -Ablagerungen, Entzündungsreaktionen und oxidative Schädigungen (Querfurth & LaFerla, 2010). Die Alzheimer-Krankheit kann in eine spät und in eine früh ausbrechende Form unterteilt werden (Bettens *et al.*, 2013). Die spät ausbrechende Form manifestiert sich nach dem 65. Lebensjahr und betrifft mehr als 95% der Patienten, wohingegen weniger als 5% aller Patienten an der frühen Krankheitsform mit einem Ausbruch vor dem 65. Lebensjahr leiden (Wisniewski & Goni, 2015). Kausale Mutationen konnten bisher nur in einer kleinen Untergruppe der frühen Krankheitsfälle identifiziert werden. Diese familiäre Form der Alzheimer-Krankheit besitzt einen autosomal-dominanten Erbgang und ist für weniger als 1% aller Krankheitsfälle verantwortlich (Bertram *et al.*, 2010; Wisniewski & Goni, 2015). Mit dieser Ausnahme ist das Vererbungsmuster in den meisten Fällen jedoch deutlich komplexer und das Risiko einer Erkrankung wird vermutlich durch die Kombination zahlreicher genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse beeinflusst (Bettens *et al.*, 2013; Wisniewski & Goni, 2015). Der wichtigste genetische Risikofaktor für die spät

ausbrechende, sporadische Form der Alzheimer-Krankheit ist das $\epsilon 4$ -Allel des *APOE*-Gens (Bertram *et al.*, 2010), das für das Transportprotein Apolipoprotein E (ApoE) kodiert. Die Rolle von ApoE im Rahmen der Alzheimer-Krankheit ist komplex und beinhaltet neben isotypenspezifischen Auswirkungen auf die Aggregation und den Abbau von A β im Gehirn auch A β -unabhängige Effekte (Kanekiyo *et al.*, 2014). Genomweite Assoziationsstudien identifizierten zwar einige weitere Suszeptibilitätsloci, von denen jedoch einzeln nur sehr geringe Risikoeffekte ausgehen (Bertram *et al.*, 2010).

Die autosomal-dominante familiäre Form wird durch Mutationen in drei Genen verursacht, die alle mit der A β -Produktion zusammenhängen (Bettens *et al.*, 2013) und für die bereits 1992 aufgestellte Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese sprechen (Hardy & Higgins, 1992). Dieser Hypothese nach gilt das A β -Protein als Verursacher der Alzheimer-Krankheit und alle weiteren Krankheitsmerkmale seien eine direkte Folge seiner Ablagerungen. A β -Peptide sind natürlich vorkommende Proteine, die durch proteolytische Spaltung aus dem Amyloid-Vorläuferprotein APP entstehen (Querfurth & LaFerla, 2010). APP kann auf zwei sich gegenseitig ausschließenden Wegen prozessiert werden (Guerreiro *et al.*, 2012). Nur der amyloidogene Pfad führt über die Spaltung von APP durch β - und γ -Sekretasen zur Entstehung von A β -Peptiden, wohingegen APP auf dem nicht-amyloidogenen Pfad durch α - und γ -Sekretasen prozessiert wird und kein A β entsteht (Vardy *et al.*, 2005). A β -Peptide bestehen aus 36 bis 43 Aminosäuren (Querfurth & LaFerla, 2010), wobei das 40 Aminosäuren lange A β_{40} die häufigste Form darstellt (Vardy *et al.*, 2005). Vor allem das viel seltenere, 42 Aminosäuren lange A β_{42} neigt zur Aggregatbildung und begünstigt die Ausbildung von Oligomeren und den charakteristischen senilen Plaques der Alzheimer-Krankheit (Querfurth & LaFerla, 2010; Vardy *et al.*, 2005). Zahlreiche Theorien wurden aufgestellt, wie von A β schädigende Wirkungen ausgehen könnten (Burgos-Ramos *et al.*, 2008) und es scheint als spielten auch die besonders toxischen A β -Oligomere eine wichtige Rolle (Querfurth & LaFerla, 2010).

Die Amyloid-Hypothese ist das momentan meist favorisierte Modell, auf dem viele therapeutische Strategien aufbauen (Wisniewski & Goni, 2015). Mit voranschreitender Forschung wurden Stärken und Schwächen dieser Hypothese bekannt (Hardy & Selkoe, 2002) und sie wurde mitunter nuancierter formuliert oder auch ganz abgelehnt (Herrup, 2015). Andere Autoren sind der Auffassung, dass die einfache, lineare Form des Modells vermutlich nicht korrekt sei (Musiek & Holtzman,

2015). Musiek & Holtzman schlagen weiterhin eine zentrale Rolle des A β -Proteins vor, das womöglich nicht das primäre, direkte Neurotoxin und alleinig verantwortlich für den Ausbruch der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit ist, aber als Hauptinitiator eines komplexen Netzwerks pathologischer Veränderungen wirkt, das Jahre später zur Neurodegeneration führt (Abbildung 3).

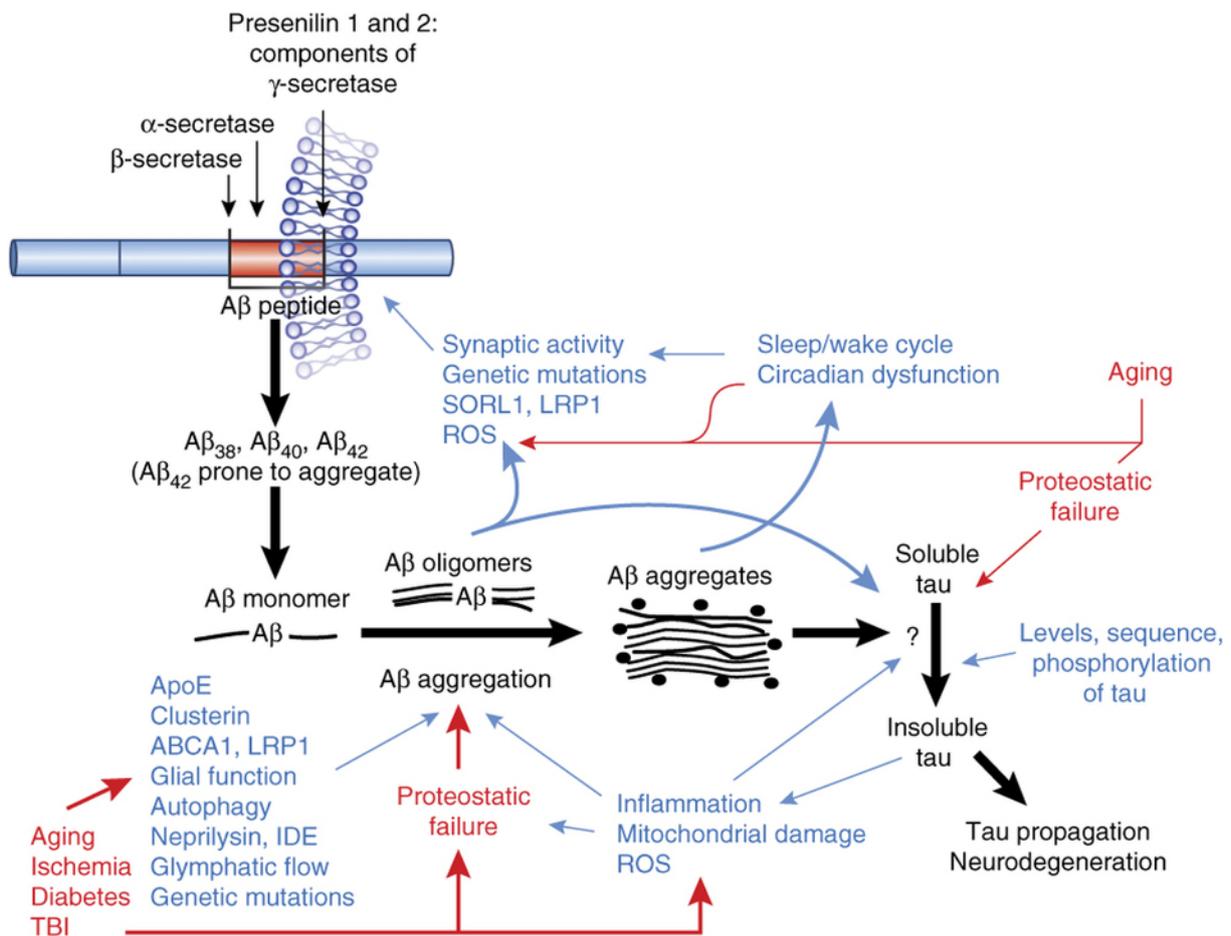


Abbildung 3: Ein aktualisiertes theoretisches Gerüst zur Amyloid-Hypothese. Die schwarzen Pfeile veranschaulichen die Prozessierung des Vorläuferproteins APP durch β - und γ -Sekretasen. Dies führt zur Entstehung verschiedener A β -Peptide, die nachfolgend aggregieren und schließlich die Aggregation von Tau-Proteinen und die nachgeschaltete Neurodegeneration auslösen. In blauer Farbe sind mögliche Modifikatoren dieser Kaskade dargestellt, wohingegen in roter Farbe der Einfluss des Alterns und verschiedener Begleiterkrankungen verdeutlicht wird. Mehrere, sich selbst verstärkende Kreisläufe sind dargestellt. Dies umfasst beispielsweise A β -Oligomere, die die Prozessierung von APP beeinflussen und zur verstärkten Produktion von A β -Monomeren führen, welche sich wiederum zu neuen A β -Oligomeren verbinden. Verschiedene Faktoren, wie das Altern oder oxidativer Stress, stören die Protein-Homöostase (*Proteostatic failure*) und führen zu vermehrter Aggregation von A β - und Tau-Proteinen. Obwohl nicht abgebildet, interagieren zudem viele A β -beeinflussende Faktoren miteinander. A β : amyloid β ; IDE: insulin-degrading enzyme; ROS: reactive oxygen species; TBI: traumatic brain injury. Abbildung aus Musiek & Holtzman, 2015.

Die A β -Level im Gehirn repräsentieren ein dynamisches Gleichgewicht als Resultat der Synthese aus dem Vorläuferprotein APP und der Degradation durch A β -abbauende Enzyme (Burgos-Ramos *et al.*, 2008; Hama & Saido, 2005). Es wurde beobachtet, dass die Aktivität einiger A β -abbauender Enzyme mit dem Alter nachlässt (Roberson & Mucke, 2006). Dazu zählt Neprilysin, dessen Expression mit dem Alter (Iwata *et al.*, 2002) und in frühen Stadien der Alzheimer-Krankheit abnimmt (Yasojima *et al.*, 2001). In transgenen Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit hingegen konnte eine Erhöhung der Neprilysin-Aktivität die Anreicherung von A β reduzieren (Iwata *et al.*, 2004; Leissring *et al.*, 2003). Somatostatin (SST) ist ein Aktivator von Neprilysin (Saito *et al.*, 2005) und das am konsistentesten reduzierte Neuropeptid im Gehirn von Alzheimer-Patienten (Burgos-Ramos *et al.*, 2008). Im Gehirn ist es an der Regulation kognitiver Prozesse beteiligt, wie dem Lernen und der Gedächtnisbildung (Burgos-Ramos *et al.*, 2008). Sowohl während des normalen Alterungsprozesses (Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004) als auch im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung (Bossers *et al.*, 2010) konnte im Gehirn eine Abnahme der SST-mRNA-Expression beobachtet werden. Saito und Kollegen konnten in primären Neuronen zeigen, dass SST die Neprilysin-Aktivität in konzentrationsabhängiger Weise erhöht und eine Reduktion des A β_{42} -Levels im Zellkulturmedium bewirkt (Saito *et al.*, 2005). Dieser Effekt wurde nachweislich über SST-Rezeptoren vermittelt und ein SST-Knockout im Mausmodell führte zu verringerter Neprilysin-Aktivität und erhöhten A β_{42} -Leveln (Saito *et al.*, 2005). Im Menschen sind fünf Subtypen an SST-Rezeptoren bekannt (SSTR1-5), die alle der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören (Kumar, 2005). Interessanterweise zeigen Gehirne von Alzheimer-Patienten neben reduzierten SST-Leveln auch signifikant reduzierte Level der Rezeptor-Subtypen SSTR4 und SSTR5 (Kumar, 2005). Es wurde ein mögliches Szenario zur Entstehung der spät ausbrechenden, sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit vorgestellt, in dem SST eine entscheidende Rolle spielt (Hama & Saido, 2005; Saito *et al.*, 2005) (Abbildung 4).

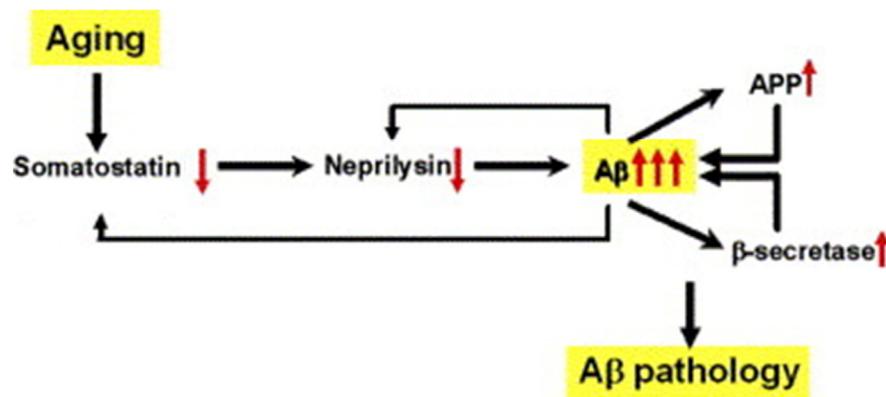


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer möglichen Verbindung von Altern, Somatostatin (SST) und der Alzheimer-Krankheit. Die altersbedingte Reduktion der SST-Level verursacht eine Abnahme der Neprilysin-Aktivität und führt zur Erhöhung der Amyloid- β -Level ($A\beta$) im Gehirn. Chronisch erhöhte $A\beta$ -Level könnten die weitere Reduktion der Somatostatin-Level nach sich ziehen und auch zu oxidativer Inaktivierung von Neprilysin führen. Eine weitere Konsequenz könnte die verstärkte Expression des $A\beta$ -Vorläuferproteins APP und der β -Sekretase sein, da APP ein auf Stress reagierendes Protein ist und die Expression der beiden Proteine in nachgeschalteten Teilen der Kaskade der Alzheimer-Entstehung nachweislich erhöht ist. Diese Ereignisse bilden einen sich selbst verstärkenden Kreislauf, der nach wenigen Jahrzehnten zum Ausbruch der Alzheimer-Krankheit führt. Abbildung verändert nach Hama & Saido, 2005.

Dieser Hypothese nach verursacht die Reduktion der SST-Level bereits in einer frühen Phase des Alterungsprozesses eine Abnahme der Neprilysin-Aktivität, was zur allmählichen Erhöhung der $A\beta$ -Level im Gehirn führt. Ein sich selbst verstärkender Kreislauf gerät in Gang, der nach wenigen Jahrzehnten zum Ausbruch der Alzheimer-Krankheit führt.

Da SST die Regulation der Neprilysin-Aktivität über die Bindung an SST-Rezeptoren vermittelt, könnte eine verringerte Rezeptor-Expression ebenfalls zur reduzierten Neprilysin-Aktivität beitragen. Eine maßgebliche Rolle könnte SSTR4 spielen, da dieser Rezeptor-Subtyp recht stark im Neocortex und Hippocampus exprimiert wird (Saito *et al.*, 2005) und die stärkste Reduktion bei einer Alzheimer-Erkrankung zeigt (Kumar, 2005).

Als mögliche Ursache der reduzierten SST- und SST-Rezeptor-Level kommen Veränderungen der DNA-Methylierung im Bereich der Genpromotoren in Betracht (siehe Kapitel 1.1.2). Neben seiner Funktion als Neuropeptid im Gehirn ist SST an der Kontrolle einer Vielzahl physiologischer Funktionen in etlichen Geweben beteiligt, einschließlich der negativen Regulation der Zellproliferation (Guillemet-Guibert *et al.*, 2005; Susini & Buscail, 2006). In verschiedenen Tumoren wurde die Rolle von SST als Tumorsuppressorgen untersucht und die Korrelation von verstärkter

Promotormethylierung und reduzierter mRNA-Expression festgestellt (Jackson *et al.*, 2011; Ricketts *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011). Malik und Kollegen analysierten die Leber von Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien und identifizierten ebenfalls eine negative Korrelation der Promotormethylierung und mRNA-Expression von *SST* sowie seiner Rezeptoren *SSTR1-5* (Malik *et al.*, 2013). Diese Studien weisen deutlich auf eine Beteiligung der DNA-Methylierung bei Kontrolle der *SST*- und *SST-Rezeptor*-Expression hin. Ein Einfluss der DNA-Methylierung auf die Genexpression könnte auch die altersbedingte Reduktion der *SST*-Level erklären, da sich DNA-Methylierungsmuster im Laufe des Alterungsprozesses verändern können (siehe Kapitel 1.1.4).

2. Zielsetzung der Arbeit

In drei verschiedenen Zellsystemen (Zellen von Patienten, Zellen eines Mausmodells sowie kultivierten Zellen) soll die Bedeutung der DNA-Methylierung bzw. methylierungsmodulierender Enzyme untersucht werden.

Reduzierte Somatostatin- und Somatostatin-Rezeptor-Level im Gehirn sind ein charakteristisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit und werden mit der verstärkten Ablagerung von Amyloid- β -Peptiden und dem Ausbruch der sporadischen Form der Krankheit in Verbindung gebracht. Ein Teil der vorliegenden Arbeit soll klären, ob die Reduktion des Peptidhormons Somatostatin und des im Kortex von Alzheimer-Patienten am stärksten reduzierten Rezeptor-Subtyps 4 auf eine Hypermethylierung der entsprechenden Promotorregion zurückzuführen sein könnte. Zu diesem Zweck sollen diese Regionen mittels Bisulfit-Sequenzierung in Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen analysiert werden.

Eine Studie von Biniszkiwicz und Kollegen konnte anhand eines transgenen Mausmodells zeigen, dass die Überexpression von *Dnmt1* zu DNA-Hypermethylierung sowie einem Verlust von Imprinting und embryonaler Letalität führt (Biniszkiwicz *et al.*, 2002). Da ein BAC-Transgen verwendet worden war, das alle drei Isoformen von *Dnmt1* enthielt, bleibt unklar, welche (der) Isoform(en) die Effekte verursachte. Während seiner Promotion ist von Dr. Nicholas Wagner (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) ein Mausmodell erschaffen worden, um gezielt die Auswirkungen der ubiquitären Überexpression der somatischen Isoform von *Dnmt1*, *Dnmt1s*, untersuchen zu können (Wagner, 2010). Die Tiere dieses Modells waren lebensfähig und sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

Seit der Entdeckung der Initiierung von aktiver und passiver DNA-Demethylierung durch die Familie der TET-Dioxygenasen untersuchten wenige Studien die Funktion dieser Enzyme in bereits differenzierten Zellen. In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss einer *TET1*-Überexpression sowie eines simultanen Knockdowns von *TET1*, *TET2* und *TET3* auf die DNA-Methylierung und Genexpression von HEK293-Zellen untersucht werden. Zusätzlich soll in *TET1*-überexprimierenden Zellen und entsprechenden Kontrollzellen die Verteilung der 5hmC-DNA-Modifikation im genomweiten Maßstab mithilfe des *Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling* (RRHP) analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Clontech (Heidelberg), Life Technologies (Darmstadt), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Heidelberg), Thermo Fisher Scientific (Schwerte), Peqlab (Erlangen), BD (Heidelberg) und Roche (Mannheim) in *pro analysis* Qualität bezogen.

3.1.2 Standardlösungen und Medien

DPBS	Gibco DPBS, no Calcium, no Magnesium (Life Technologies)
20x SSC-Puffer	Invitrogen UltraPure 20X SSC (Life Technologies)
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
TE-Puffer	TE-Puffer (1x) pH 8,0 für die Molekularbiologie (AppliChem)

Puffer für die Immunodetektion

TBST-Puffer	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween-20
Blockpuffer	5% (w/v) Magermilchpulver in TBST

Medien für die Kultur von Bakterien

LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt
-----------	--

Flp-In T-REx-293 Zelllinie zur Generierung stabiler Expressionszelllinien (Life Technologies #R780-07), freundlicherweise von Prof. G. Ryffel zur Verfügung gestellt

3.1.4 Größenstandards

DNA-Größenmarker FastRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Protein-Größenmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

MagicMark XP Western Protein Standard (Thermo Fisher Scientific)

3.1.5 Oligonukleotide

Verwendete Primer und Sonden sind in den betreffenden Kapiteln bzw. im Anhang in Tabelle A1 und Tabelle A2 aufgeführt. Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers oder Eurogentec bezogen.

3.1.6 Antikörper

Primärantikörper

anti-FLAG (Stratagene, #200472)

anti-TET1 (GeneTex, #GTX124207)

anti-GAPDH (Cell Signaling, #2118)

anti-5hmC (Active Motif, #39769)

anti-Dnmt1 (Abcam, #ab13537)

anti-RGS-His, BSA-free (Qiagen, #34650)

anti-Penta-His, BSA-free (Qiagen, #34660)

anti-Tetra-His, BSA-free (Qiagen, #34670)

anti-His (GE Healthcare, #27-4710-01)

anti-(HIS)₆-Tag Epitope Antibody Clone 13/45/31-2 (Dianova, #DIA-900)

Sekundärantikörper

anti-rabbit-HRP (Thermo Fisher Scientific, #32460)

anti-mouse-HRP (Thermo Fisher Scientific, #32430)

3.1.7 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Roche oder New England Biolabs bezogen. Enzyme, die während der Klonierungsarbeiten verwendet wurden (Alkaline Phosphatase, T4 DNA Ligase) stammten von Roche, Fermentas und New England Biolabs. Andere verwendete Enzyme sind im Text explizit aufgeführt.

3.1.8 Gewebe von Patienten

Post mortem Nervengewebsproben aus dem *Gyrus temporalis medius* (Brodmann-Areal 22) und *Gyrus frontalis superior* (Brodmann-Areal 9) von fünf stark betroffenen Alzheimer-Patienten sowie fünf nicht-dementen Normalpersonen stammten aus der *Netherlands Brain Bank* (NBB; Koordinator: Dr. I. Huitinga). Die NBB hatte die Erlaubnis, die Gehirnautopsie durchzuführen und stellt Proben von klinisch gut dokumentierten und neuropathologisch bestätigten Fällen für Forschungszwecke zur Verfügung. Detaillierte, klinisch-pathologische Information sind in Tabelle A4 gegeben. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren; die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.1.9 Mäuse

Das transgene Mausmodell zur Studie der ubiquitären *Dnmt1s*-Überexpression wurde von Dr. Nicholas Wagner (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) während seiner Promotion erschaffen (Grosser *et al.*, 2014b; Wagner, 2010). Die Tiere wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen in einem zwölfstündigem Lichtprogramm (Hell-Dunkelrhythmus) gehalten. Den Tieren stand Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz bewilligt (LANUV G034/06).

3.1.10 GEO-Datenbankeintrag

Expressions- sowie (Hydroxy)Methylierungsdaten des Projekts zur Untersuchung des Einflusses veränderter TET-Dioxygenase-Level auf die DNA-Methylierung von HEK293-Zellen wurden in der GEO-Datenbank (*Gene Expression Omnibus*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) hinterlegt.

Der Zugriff auf Daten des Projekts erfolgt über die GEO *accession number* GSE67351.

Die induzierbaren T-REx-293-TET1-Zelllinien (TET1 #1-3) der vorliegenden Arbeit entsprechen den klonalen Zelllinien TET1-A, -F und -G. Die T-REx-293-GFP-Zelllinien (GFP #1-3) entsprechen den Einträgen 1_GFPsiRNA, 2_GFPsiRNA und 3_GFPsiRNA nach Knockdown der *TET*-Transkripte bzw. den Einträgen 4_GFPscr, 5_GFPscr und 6_GFPscr im Kontrollzustand.

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Arbeiten mit DNA und RNA

Hier werden diejenigen Methoden aufgeführt, die häufiger für die Arbeit mit DNA und RNA verwendet wurden.

3.2.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab erfolgten aus Übernachtskulturen einzelner klonaler Bakterienkolonien. Die dabei verwendeten Puffer P1, P2 und P3 wurden von der Firma Qiagen bezogen. Zunächst wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch kurze Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl P1-Puffer resuspendiert, woraufhin die Lyse durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer und fünfminütiger Inkubation erfolgte. Anschließend wurden 300 µl P3-Puffer hinzugegeben, der Ansatz vorsichtig invertiert und Proteine und Zelltrümmer durch 10 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C sedimentiert. Der

Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Ethanol (100%) versetzt und 10 min bei 16.000 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 150 µl Ethanol (70%) gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

3.2.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Plasmidpräparationen in größerem Maßstab erfolgten mithilfe des Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers.

3.2.1.3 Restriktionsendonukleaseverdau

Für analytische und präparative Zwecke wurden meist 1 - 10 µg Plasmid-DNA mit 10 - 60 U Restriktionsenzymen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 – 3 h bei 37°C verdaut. Dabei wurde die Menge an Restriktionsenzymen dem Maßstab der Reaktion angepasst und war davon abhängig, ob es sich um einen Einzel- oder Doppelverdau handelte. Das Volumen an Restriktionsenzymen überstieg jedoch nicht 10% des Ansatzes, um eine Inhibition der Restriktion durch eine zu hohe Glycerinkonzentration zu vermeiden. Nach dem Verdau wurden die Produkte per Agarose-Gelelektrophorese analysiert und ggf. aufgereinigt.

3.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Spezifische Sequenzabschnitte aus genomischer DNA, Plasmid-DNA, cDNA und Bisulfit-behandelter DNA wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986). Die Reaktionen erfolgten meist in einem Endvolumen von 25 µl unter Verwendung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) oder der GoTaq DNA Polymerase (Promega). Generell enthielt jede Reaktion den mitgelieferten PCR-Puffer, 3 mM MgCl₂, 0,4 µM jedes Primers, 150 µM dNTPs, *template*-DNA (bei Amplifikation von genomischer DNA meist 50 - 100 ng) und 1 - 2,5 U Polymerase. Meist wurden 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 96 °C für 30 s, Primer-*annealing* (mit Primer-spezifischer Temperatur) für 30 s und Elongation bei 72 °C für 1 min (pro amplifizierter kb DNA) durchgeführt. Die AmpliTaq-Polymerase benötigte eine längere Aktivierungsphase. Daher wurde bei Verwendung dieser Polymerase vor dem ersten Zyklus eine Aktivierungs- bzw.

Denaturierungsphase von 10 min durchgeführt, die bei Verwendung der GoTaq-Polymerase auf 2 min herabgesetzt werden konnte. Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine finale Elongationsphase von 7 min bei 72 °C.

3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit 1 - 2%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, 5-10 min bei RT abgekühlt, mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in Form gegossen. Nach dem Erhärten der Gele wurden DNA-Proben mit 1x Ladepuffer (Thermo Scientific) versehen aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 - 100 V in 1x TAE-Laufpuffer mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid ermöglichte die Visualisierung der DNA auf einem Transilluminator unter UV-Licht (312 nm). Mitgeführte Größenstandards (siehe Kapitel 3.1.4) ermöglichten die Abschätzung der absoluten Größe der DNA-Fragmente.

3.2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Wenn bei einer PCR-Reaktion Nebenprodukte auftraten, die beim weiteren Arbeiten mit dem Hauptprodukt stören könnten, wurde das Hauptprodukt mithilfe des MinElute Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt. Plasmide wurden im Rahmen der Klonierungsarbeiten aus Gelen mithilfe des Wizard DNA Clean-Up Systems (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch mit einem NanoDrop ND-1000 bzw. ND-2000 UV/Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Geräte maßen die optische Dichte (OD) einer Lösung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD von 1 bei 260 nm (OD_{260}) einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA von 40 µg/ml. Bei reiner DNA sollte der Quotient OD_{260}/OD_{280} etwa 1,8 betragen, bei reiner RNA sollte er zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.2.1.8 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus bis zu 500 ng DNA, 0,5 µM Primer und 2 - 4 µl BigDye in einem Endvolumen von 10 µl. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 1 min bei 96 °C durchgeführt. Es folgten 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung (10 s bei 96 °C), *annealing* (5 s mit Primer-spezifischer Temperatur) und Elongation (4 min bei 60 °C). Anschließend wurden die Produkte mittels Sephadex Gelfiltration (GE Healthcare) aufgereinigt, um freie Didesoxynukleotide zu entfernen. Vor der Analyse auf einem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurde die DNA mit Formamid versetzt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Sequencing Analysis Version 5.3.1 (Applied Biosystems) und Geneious (Biomatters).

3.2.1.9 Reverse Transkription von RNA

Nach einer DNase-Behandlung (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) erfolgte die reverse Transkription von RNA in cDNA mithilfe des GeneAmp RNA PCR Kits und Random-Hexamer-Primern nach Anweisungen des Herstellers (Life Technologies). Kontrollreaktionen ohne das Enzym Reverse Transkriptase wurden stets durchgeführt.

3.2.1.10 Quantitative *real-time* RT-PCR (qRT-PCR)

In den verschiedenen Forschungsprojekten wurden mitunter abweichende Geräte und Methoden zur Bestimmung der Genexpression per qRT-PCR verwendet. Die Kontrollreaktionen der Reversen Transkription von RNA in cDNA wurden bei allen Versuchen stets mit analysiert.

Bestimmung der SST-Expression

TaqMan Gene Expression Assays (SST, Hs00356144_m1; GAPDH, Hs02758991_g1; Life Technologies) wurden mit dem LightCycler 480 Probes Master

(Roche) zur Expressionsbestimmung im LightCycler 480 System (Roche) unter Standardbedingungen verwendet. Die Datenanalyse basierte auf der Delta-Delta-Ct-Methode („Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR“ (ABI, 2008)) und erfolgte in Excel (Microsoft). Die Normalisierung der *SST*-Expression erfolgte über die Expressionsstärke des Haushaltsgens *GAPDH*.

Bestimmung der *Dnmt1*-Expression

TaqMan Gene Expression Assays wurden zur Bestimmung der totalen *Dnmt1*-Expression verwendet, wobei die Normalisierung über die *Gapdh*-Expression erfolgte (*Dnmt1*, Mm01151063_m1; *Gapdh*, Mm99999915_g1; Life Technologies). Der *Dnmt1*-Assay unterschied nicht zwischen endogenen *Dnmt1*- und transgenen RGS-His-*Dnmt1s*-Transkripten. Die TaqMan Gene Expression Assays wurden mit dem ABI TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Mithilfe eines EPmotion Pipettierroboters (Qiagen) wurden 384-Well-Platten befüllt und anschließend in einem ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) analysiert. Das folgende Programm wurde verwendet: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 45 Zyklen (95 °C 15 s, 60 °C 1 min). Die Datenanalyse basierte auf der Delta-Delta-Ct-Methode und erfolgte in Excel (Microsoft).

Expressionsbestimmungen nach *TET1*-Überexpression oder *TET*-Knockdown

Für Expressionsuntersuchungen in HEK293-Zellen wurde das Universal ProbeLibrary System der Firma Roche verwendet. Intron-überspannende Assays bestehend aus Primern und Hydrolyse-Sonden wurden mithilfe der ProbeFinder Assay Design Software (Roche) zusammengestellt und sind in Tabelle A2 aufgeführt. Die Experimente erfolgten unter Standardbedingungen im LightCycler 480 System mit dem LightCycler 480 Probes Master (beides von Roche). Zur Auswertung wurde die LightCycler 480 Software (Release 1.5.0, Version 1.5.0.39; Roche) verwendet, wobei die Expression eines Zielgens über die Expressionsstärke des Haushaltsgens *GAPDH* normalisiert wurde. Die Berechnung der Expressionsstärke der *TET*-Transkripte relativ zur *GAPDH*-Expression (Abbildung A5) wurde anhand exportierter Werte in Excel (Microsoft) durchgeführt und basierte auf der (Delta-)Delta-Ct-Methode.

3.2.2 Allgemeine Arbeiten mit Proteinen

Hier werden diejenigen Methoden aufgeführt, die häufiger für die Arbeit mit Proteinen verwendet wurden.

3.2.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden nach ihrer molekularen Masse über die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli aufgetrennt (Laemmli, 1970). Denaturierende 7,5%ige Polyacrylamidgele wurden in Minigelapparaturen (Mini-PROTEAN III, BIO-RAD) gegossen oder es wurden kommerzielle Gradientengele verwendet (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels 4-15%, BIO-RAD). Für die Analyse wurden pro Spur 5 - 100 µg Gesamtprotein mit 1x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 96 °C denaturiert, auf ein Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 60 - 80 Volt in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt (Dauer ca. 1,5 - 2 h).

Tabelle 1: 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel (ausreichend für 2 Minigele).

	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese Gel 30 (Roth)	0,65 ml	2 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	-
H ₂ O	3,1 ml	4 ml
SDS (20%)	25 µl	40 µl
Ammoniumpersulfat (10%)	25 µl	40 µl
TEMED	10 µl	20 µl

10x SDS-Laufpuffer 0,25 M Tris
 1,92 M Glycin
 1% (w/v) SDS

4x SDS-Probenpuffer 0,25 M Tris-HCl pH 6,8
 8% (w/v) SDS
 40% (v/v) Glycerin
 0,4 M DTT
 Bromphenolblau

3.2.2.2 Proteintransfer und -nachweis (*western blot*)

Der *western blot* ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen aus einem nach SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemisch mithilfe von Antikörpern. Dazu werden die Proteine aus dem Gel zunächst durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Der Transfer erfolgte hauptsächlich nach dem *semi-dry*-Verfahren (Trans-Blot SD, BIO-RAD) auf Nitrocellulosemembranen (Amersham Hybond-C Extra, GE Healthcare). Alternativ wurden auch das *wet blot*-Verfahren zum Proteintransfer angewandt oder Trägermembranen aus PVDF verwendet.

Der *semi-dry*-Transfer geschah wie folgt. Auf der Graphit-Anode der Transferapparatur wurden der Reihe nach ein Stück Whatman-Papier (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD), die Trägermembran, das Proteingel sowie ein weiteres Stück Whatman-Papier luftblasenfrei geschichtet. Alle Komponenten sind zuvor in Transfer-Puffer für eine Dauer von etwa 10 min equilibriert worden. Es erfolgte nun der Transfer für 60 - 70 min bei 23 Volt.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBS-Puffer gewaschen und zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt. Da Teile der Membran mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden sollten, wurde die Membran entsprechend geteilt. Anschließend wurden alle Teile durch mehrmaliges Waschen in TBS entfärbt. Unter leichtem Schwenken erfolgte die Inkubation der Membranen in Blockpuffer für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Membranen auf eine Teflonplatte überführt und über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden wie folgt in Blockpuffer verdünnt: anti-Dnmt1 1:250, anti-TET1 1:5.000, anti-FLAG 1:1.000, anti-GAPDH: 1:5.000-10.000. Am nächsten Tag wurden die Membranen unter leichtem Schwenken viermal für 5 min mit TBST gewaschen und für 1 h bei RT auf einer Teflonplatte mit Meerrettich-Peroxidase- (HRP-) konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Verdünnung Sekundärantikörper erfolgte dabei 1:1.000 in Blockpuffer. Nach viermaligem Waschen für 5 min in TBST wurden die Membranen für 5 min mit Substratlösung der Meerrettich-Peroxidasen inkubiert (SuperSignal West Dura Extended Duration, Thermo Fisher Scientific), zusammengehörige Membranteile zusammengesetzt, zwischen Plastikfolien fixiert und Lichtsignale detektiert. Die Detektion erfolgte meist mit einem Chemilumineszenz-Imager und dem Programm Chemostar Professional (beides von Intas) und nur in seltenen Fällen mit Super RX Röntgenfilmen (Fujifilm) unter Verwendung von Entwicklerlösungen (AGFA Healthcare). Bandenintensitäten wurden

in Digitalaufnahmen mit den Programmen Quantity One (Version 4.6.9, BIO-RAD) und Multi Gauge (Version 3.0, Fujifilm) bestimmt.

Transfer-Puffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
TBS-Puffer	10 mM Tris 150 mM NaCl
Ponceau-Rot-Lösung	0,1% (w/v) Ponceau S 5% (v/v) Essigsäure

3.2.3 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Alle Zelllinien wurden in DMEM, 10% FKS und Penicillin-Streptomycin in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor Gebrauch sterilisiert. Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen oder -schalen (Nunc) kultiviert.

Blasticidin, Zeocin und Hygromycin B wurden als Selektionsantibiotika während verschiedener Phasen der Kultivierung von Flp-In T-REx-293 Zellen verwendet. Alle T-REx-293-TET1- und T-REx-293-GFP-Zelllinien wurden negativ auf eine Mycoplasmenkontamination getestet (PCR Mycoplasma Test Kit II, AppliChem).

3.2.3.1 Auftauen von Zellen

Alle Zellen wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Gefäße auf Trockeneis transportiert und in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen in ein 15ml-Röhrchen mit 9 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 150 x g sedimentiert, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen anschließend in eine Kulturflasche überführt.

3.2.3.2 Kultivierung von Zellen

Alle zwei bis drei Tage wurde das Zellkulturmedium erneuert. Dazu wurde das alte Medium von den adhären wachsenden Zellen abgesaugt und durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

Alle Zelllinien wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert, wobei sich das Verhältnis der Passage nach Erfahrungswerten richtete. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und 5 min bei 37 °C mit 1,5 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Zum Inaktivieren des Trypsins wurden die losgelösten Zellen im vierfachen Volumen FKS-haltigen Mediums resuspendiert. Nach kurzer Sedimentation der Zellen wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt.

3.2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Passagieren zunächst trypsinisiert und sedimentiert. Das Zellpellet wurde in frisch angesetzttem Einfriermedium (Kulturmedium, jedoch mit 20% FKS und 10% DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension auf Kryoröhrchen verteilt (Cryotubes, Nunc). Diese wurden dann über Nacht mithilfe einer Isopropanol-gefüllten Einfrierhilfe langsam auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4 Arbeiten mit menschlichem Hirngewebe

3.2.4.1 DNA- und RNA-Isolation aus Hirngewebe

Unter Anleitung von Dr. Johannes van de Nes vom Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen erfolgte die Trennung von kortikaler grauer und infrakortikaler weißer Substanz aus den Gewebeproben der verschiedenen Gehirnareale.

DNA-Isolation

Die Homogenisierung von Teilstücken der getrennten Gewebeproben erfolgte mit Mörser und Pistille. Anschließend wurde die DNA nach einer konventionellen Phenol-

Chloroform-Methode extrahiert und mit einer Ethanol/Natriumacetat-Lösung gefällt (Sambrook *et al.*, 1989).

RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion aus Teilstücken der getrennten Gewebeproben erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Empfehlungen des Herstellers, wobei der Aufschluss des Gewebes mithilfe der Lysing Matrix D (MP Biomedicals) unter Verwendung des Thermo Savant FastPrep FP 120 Cell Disruptors (Thermo Fisher Scientific) erfolgte. Für eine zusätzliche Homogenisierung des Gewebes wurden zum RNeasy Mini Kit passende QIAshredder-Säulen (Qiagen) verwendet. Es erfolgte die optionale DNase-Behandlung auf den Isolations-Säulen des Kits mithilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen).

3.2.4.2 Bisulfit-Behandlung von DNA

Durch eine Bisulfit-Behandlung der DNA werden unmethylierte Cytosine durch Desaminierung in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosine durch die Methylgruppe vor dieser Reaktion geschützt sind. Bei einer anschließenden PCR wird die RNA-Base Uracil durch Thymin ersetzt. Es entstehen C/T-Ambivalenzen zwischen methylierten und unmethylierten DNA-Sequenzen, die zur Analyse des Methylierungsstatus genutzt werden können.

Die Bisulfit-Behandlung der DNA aus Hirngewebe von Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen erfolgte nach einem etablierten Protokoll mit geringfügigen Abweichungen (Zeschnigk *et al.*, 1997). Für die Bisulfit-Behandlung wurden 2 µg DNA in 50 µl H₂O gelöst. Zur Denaturierung der DNA wurden 5,5 µl 3 M NaOH hinzugegeben und der Ansatz für 15 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 95 °C in einem weiteren, bereits vorgeheizten, Heizblock wurde der Ansatz sofort auf Eis gekühlt. Die Bisulfit-Lösung wurde währenddessen frisch angesetzt. Dazu wurden 8,5 g Natriumbisulfit in 15 ml H₂O gelöst. Anschließend wurden 0,9 ml 50 mM Hydrochinon sowie 1 ml 10 M NaOH (pH 5,0 – 5,3) hinzugegeben und das Volumen mit H₂O auf 20 ml erhöht. Zur denaturierten DNA wurden 500 µl der Bisulfit-Lösung gegeben und der Ansatz über Nacht bei 50°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA mithilfe des Wizard DNA Clean-Up Systems (Promega) nach Herstellervorgaben. Die Bisulfit-behandelte, aufgereinigte DNA wurde mit 5,5 µl

3 M NaOH versehen und 15 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 55 µl 6 M NH₄OAc (pH 7,0), 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 350 µl Ethanol (100%) hinzugegeben und die DNA anschließend für 20 min bei 16.000 x g präzipitiert. Das Pellet wurde in 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl H₂O resuspendiert.

3.2.4.3 Methylierungsanalyse des SST- und SSTR4-Promotors

Mittels PCR wurden anschließend die zu untersuchenden Regionen amplifiziert. Die verwendeten genspezifischen Primer wurden von Lisa Neumann (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) mithilfe der Software MethPrimer (Li & Dahiya, 2002) erstellt und besaßen eine Schmelztemperatur von 56-60 °C (Tabelle 2, oben).

Tabelle 2: Primer zur Methylierungsanalyse des SST- und SSTR4-Promotors.

Gen	Position des PCR-Produkts	Primer	Sequenz (5' - 3')
SST	chr3:187387960-187388423	SSTFw1	<u>cttgcttcctggcacga</u> TAGTATTGAGTGAAAAATAAAAGATTGTATA
		SSTRRev1	<u>tgtaaaacgacggccagt</u> AACCAAAAACCTTCTACAAAACTAAC
SSTR4	chr20:23015854-23016195	SSTR4Fw4	<u>cttgcttcctggcacga</u> GATTTTAGGGTTGGGTGAGG
		SSTR4Rev4	<u>tgtaaaacgacggccagt</u> AACATTAACCTACAAAAACCAACC
-	-	Roche MID A	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG</u> <u>ACGCTCGACA</u> <u>cttgcttcctggcacga</u>
-	-	Roche MID B	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG</u> <u>ACGCTCGACA</u> <u>tgtaaaacgacggccagt</u>

Die chromosomalen Positionen beziehen sich auf GRCh37/hg19. Eine unspezifische *tag*-Sequenz am 5'-Ende der SST- und SSTR4-Primer (in blau) unterstützte zunächst die direkte Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte. Die hochauflösende Methylierungsanalyse erforderte die Re-Amplifikation der Produkte mit Primern wie Roche MID A/B. Diese waren spezifisch für die *tag*-Sequenzen der primären Primer (in blau, siehe 3'-Ende) und besaßen probenspezifische Barcode-Sequenzen (*multiplex identifiers*, MIDs, unterstrichen; hier ein Beispiel) sowie Adapter-Sequenzen des 454-Systems (kursiv).

Zur Amplifikation der Promotorregionen von Bisulfit-behandelter DNA wurde das folgende *Touchdown* PCR-Protokoll verwendet: 5 min 95°C, 14 Zyklen (20 s 95 °C; 1 min 63 °C – 0,5 °C pro Zyklus; 1 min 72 °C), 35 Zyklen (20 s 95 °C, 1 min 56 °C, 1 min 72 °C), 5 min 72 °C. Nach Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte die direkte Sanger-Sequenzierung auf einem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) und einem zur *tag*-Sequenz komplementären Primer.

Die hochauflösende Methylierungsanalyse basierte auf *Next-Generation-Sequencing*-Technologie. Sie wurde prinzipiell wie zuvor beschrieben auf dem Roche/454 GS Junior System durchgeführt (Beygo *et al.*, 2013). Hierzu wurden die von Bisulfit-behandelter DNA generierten PCR-Produkte mit Primern re-amplifiziert, die spezifisch für die *tag*-Sequenzen der primären Primer waren und zudem probenspezifische Barcode-Sequenzen (*multiplex identifiers*, MIDs) sowie notwendige Adapter-Sequenzen des 454-Systems besaßen (Tabelle 2, unten). Für die Erstellung dieser Bisulfit-Amplicon-*libraries* wurde das folgende Protokoll verwendet: 10 min Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen bei 95 °C für 20 s und 72 °C für 45 s und einer finalen Elongation für 7 min bei 72 °C. Die Spezifität der Re-PCR wurde anschließend per Gelelektrophorese kontrolliert.

Es folgten die Probenvorbereitung und anschließend die Durchführung der Sequenzierung durch Technische Assistenten des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen. Dies beinhaltete das Verdünnen und Vereinigen der Bisulfit-Amplicon-*libraries* sowie deren klonale Amplifikation in einer Emulsions-PCR nach den Vorgaben des Herstellers (Roche emPCR Amplification Method Manual – Lib-A). Anschließend erfolgte die Sequenzierung nach Herstellervorgaben (Roche Sequencing Method Manual).

Die Datenanalyse wurde mit dem Python-basierten Programm Amplikyzer durchgeführt (Rahmann *et al.*, 2013). Dieses Programm sortiert die generierten Sequenzen nach ihren MIDs, erstellt Sequenz-Alignments und erlaubt die Filterung nach Qualitätsmaßstäben. *Reads* mit einer Bisulfit-Konvertierungsrate unter 99% wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Mit diesem Programm wurden auch die Darstellungen der Methylierungsmuster generiert.

3.2.4.4 Statistische Analysen

Statistische Analysen erfolgten mithilfe von JMP7 (SAS Institute) und Excel (Microsoft).

3.2.5 Arbeiten mit dem *Dnmt1s*-Mausmodell

3.2.5.1 Organentnahme bei Mäusen

Die Mäuse wurden mit CO₂ getötet und ihre Organe entnommen. Während der Organentnahme wurden Teilstücke der Gewebe (meist 50 – 100 mg) in RNAlater RNA-Stabilisierungslösung (Qiagen) überführt. Das restliche Gewebe wurde unmittelbar in flüssigem Stickstoff für die spätere Präparation von DNA und Protein schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung des Materials bei -80 °C.

3.2.5.2 Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden durch Verpaarungen heterozygoter transgener Männchen der Linie 4 mit Wildtyp-Weibchen (C57BL/6) gewonnen. Kopf und Leber der Embryonen (13,5 Tage *post coitum*) wurden entfernt und verworfen. Die Schwänze wurden ebenfalls entfernt, jedoch zur DNA-Isolation in Puffer G2 überführt (EZ1 DNA Tissue Kit, Qiagen). Das übrige Gewebe jedes Embryos wurde mit 5 ml Zellkulturmedium wenige Male mit einer Spritze aufgezogen und anschließend vorsichtig mit aufgesetzter Kanüle wieder abgegeben (zunächst 18G-, dann 20G-Kanülen). Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit weiterem Medium versetzt, kultiviert und Aliquots eingefroren.

3.2.5.3 DNA-, RNA- und Protein-Isolation aus murinem Gewebe

DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus den Schwanzspitzen getöteter Tiere sowie aus den Schwänzen von Embryonen erfolgte nach einer Proteinase-K-Inkubation (56 °C, über Nacht) mithilfe des BioRobot EZ1 Systems bei Verwendung des EZ1 DNA Tissue Kits (beides von Qiagen).

RNA-Isolation

Zur RNA-Extraktion wurde mit RNAlater stabilisiertes Gewebe mithilfe der Lysing Matrix D (MP Biomedicals) und dem Thermo Savant FastPrep FP 120 Cell Disruptor (Thermo Fisher Scientific) homogenisiert. Abhängig vom Gewebetyp wurden

entweder QIAzol Lysis Reagent gefolgt vom RNA Cleanup Protokoll des RNeasy Mini Kits oder das Protokoll zur Aufreinigung von RNA aus tierischem Gewebe dieses Kits befolgt (alles von Qiagen). Im letzteren Fall wurden für eine zusätzliche Homogenisierung des Materials QIAshredder-Säulen (Qiagen) verwendet. Unabhängig vom Gewebetyp erfolgte die optionale DNase-Behandlung auf den Isolations-Säulen mithilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen).

Die RNA-Extraktion aus MEFs erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits nach dem Protokoll zur Aufreinigung von RNA aus tierischen Zellen. Zur Homogenisierung wurden QIAshredder-Säulen verwendet; die optionale DNase-Behandlung mithilfe des RNase-Free DNase Sets wurde durchgeführt.

Protein-Isolation

Schockgefrorenes Gewebe wurde auf Trockeneis gekühlt in kleine Stücke geschnitten und in WCE-Puffer (*whole cell extract buffer*) oder in RIPA-Puffer (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) sonifiziert. Die Lysate wurden stets auf Eis gekühlt. Abhängig vom jeweiligen Gewebe erfolgten mehrere Wiederholungen der Ultraschallbehandlung. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile bei 4 °C und 16.000 x g für 30 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Konzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte bei Verwendung des WCE-Puffers mit Coomassie Plus Protein Assay Reagent nach Anweisung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific). In RIPA-Puffer sonifizierte Lysate wurden mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung von Iodoacetamid als Kompatibilitätsreagenz quantifiziert, das den störenden Einfluss des Reduktionsmittels DTT im Lysepuffer minimierte.

WCE-Puffer	30 mM Tris-HCl, pH 8 0,42 M NaCl 0,5 mM EDTA 20% (v/v) Glycerin 1x Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific)
RIPA-Puffer	50 mM HEPES, pH 7,4 50 mM NaCl 1% (v/v) NP40 0,5% (w/v) Na-DOC

0,1% (w/v) SDS
1% (w/v) DTT
1x Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo
Fisher Scientific)

3.2.5.4 Genotypisierung von Mäusen und Mausfibroblasten

Der Genotyp der Mäuse wurde von Mitarbeitern des Zentralen Tierlaboratoriums des Universitätsklinikums Essen per PCR bestimmt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle A1 aufgeführt (Primer #3-6).

Zusätzlich wurden alle in dieser Arbeit analysierten Tiere nochmals auf ihren Genotyp hin überprüft, wobei die eingesetzte DNA aus den Schwanzspitzen der getöteten Tiere stammte. Der Genotyp der MEFs wurde über die DNA der während der Fibroblastengewinnung entfernten Schwänze bestimmt. Die verwendeten Primer dieser PCR sind ebenfalls in Tabelle A1 aufgeführt (Primer #7-8).

3.2.5.5 Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Der HSV-TK-Promotor wurde von Stephanie Gkalympoudis (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) während ihrer Promotion aus dem Plasmid pGL4.74[hRluc/TK] (Promega) in einen promotorlosen Basisvektor (pGL4.10[luc2], Promega) kloniert, um ein HSV-TK-angetriebenes Reporter-Gen-Konstrukt auf Basis der Firefly-Luciferase zu erschaffen. Dieses Plasmid besitzt die optimale Kozak-Konsensussequenz GCCACC direkt *upstream* des Firefly-Luciferase-Startcodons und wurde im Rahmen dieser Arbeit als das Plasmid pGL4.10[HSV-TK/GCCACC/luc2] geführt (Abbildung 12B, oben). Das GeneArt Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) wurde nach Herstellervorgaben verwendet, um auf dieser Basis ein zweites Konstrukt zu erschaffen, in dem die Kozak-Konsensussequenz zu TTCCCC verändert worden war (pGL4.10[HSV-TK/TTCCCC/luc2]) (Abbildung 12B, zweites von oben). Diese Kozak-Sequenz (TTCCCC) entsprach der Kozak-Sequenz direkt am Anfang des RGS-His-*Dnmt1s*-Transgens im Mausmodell.

Zusätzlich wurden Varianten der beiden Reporter-Gen-Konstrukte erschaffen, die um die RGS-His-*tag*-Sequenz des Transgens erweitert worden waren und für eine N-terminal markierte Luciferase kodierten (Abbildung 12B, untere zwei Konstrukte). Diese Konstrukte wurden als pGL4.10[HSV-TK/GCCACC+tag/luc2] bzw.

pGL4.10[HSV-TK/TTCCCC+tag/luc2] geführt. Das *Renilla* Co-Reporter-Plasmid pGL4.74[*hRluc*/TK] (Promega) wurde zur Normalisierung verwendet.

Am Tag vor der Transfektion wurden 1×10^4 NIH-3T3-Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit 50 ng des promotorlosen Kontrollplasmids (pGL4.10[luc2]) oder 50 ng eines der vier zu untersuchenden pGL4.10[HSV-TK/luc2]-Testplasmide (GCCACC, TTCCCC, GCCACC+tag, TTCCCC+tag) sowie 2,5 ng des Co-Reporter-Plasmids pGL4.74[*hRluc*/TK] mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Anweisungen des Herstellers für 24h co-transfiziert. Die Zellkulturarbeiten wurden von Michaela Hiber (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

Die Luciferase-Genreporter-Assays erfolgten mithilfe des Dual-Luciferase Reporter Assays Systems (Promega) und einem Centro LB 960 Luminometer (Berthold Technologies) nach Anweisungen der Hersteller. Die Firefly-Luciferase-Messungen wurden mit den *Renilla*-Luciferase-Messungen des Co-Reporter-Plasmids normalisiert.

3.2.6 Arbeiten mit HEK293-Zellen

3.2.6.1 Generierung induzierbarer *TET1*- und *GFP*-Expressionszelllinien

Stabile Zelllinien zur Doxycyclin-induzierbaren Expression des *TET1*- bzw. *GFP*-Gens wurden mithilfe des Flp-In T-REx Core Kits und der Flp-In T-REx-293-Zelllinie gemäß den Empfehlungen des Herstellers Invitrogen generiert. Die Flp-In T-REx-293-Zelllinie leitet sich von der HEK293-Zelllinie ab (Ward *et al.*, 2011).

FLAG-HA-*TET1*-cDNA wurde freundlicherweise von A. Rao und Kollegen zur Verfügung gestellt (Tahiliani *et al.*, 2009) und aus dem Vektor pOZ-FH-N in die *KpnI*- und *NotI*-Schnittstellen des pcDNA5/FRT/TO-Vektors kloniert, um den Vektor pcDNA5/FRT/TO_TET1 zu generieren. Der GFP-Kontroll-Vektor pcDNA5/FRT/TO_GFP und der Flp-Rekombinase-Expressionsvektor pCSFLPe wurden freundlicherweise von G. Ryffel und Kollegen zur Verfügung gestellt (Erdmann *et al.*, 2007). Die Plasmide pCSFLPe und pcDNA5/FRT/TO_TET1 (oder pcDNA5/FRT/TO_GFP) wurden unter Verwendung von Fugene HD (Roche) nach Empfehlungen des Herstellers in einem Verhältnis von 9:1 co-transfiziert. Die

Selektion positiver Klone erfolgte mit 100 µg/ml Hygromycin B. Als alle Zellen einer Negativkontrolle gestorben waren, wurden unabhängige, Einzelzell-abgeleitete Klone (T-REx-293-TET1 #1-3; T-REx-293-GFP #1-3) unter konstanter Selektion kultiviert und, wie vom Hersteller empfohlen, auf die Abwesenheit der β -Galactosidaseaktivität getestet. Die *TET1*-Überexpression wurde mit 1 µg/ml Doxycyclin im Zellkulturmedium in den T-REx-293-TET1-Zelllinien für 48 h induziert. Induzierte T-REx-293-GFP-Zelllinien zeigten im Invers-Fluoreszenzmikroskop eine starke GFP-Expression (Daten nicht gezeigt).

3.2.6.2 Simultaner Knockdown von *TET1*, *TET2* und *TET3* mittels siRNA

Die T-REx-293-GFP-Zelllinien #1-3 wurden ohne Zugabe des Induktionsmittels Doxycyclin kultiviert und mit kombinierten ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs gegen *TET1*, *TET2* und *TET3* in einer Gesamtkonzentration von 50 nM transfiziert (L-014635-02, L-013776-03, L-022722-02; Thermo Scientific). Jeder der drei siRNA-Pools war gegen eines der drei *TET*-Transkripte gerichtet und bestand aus vier individuellen siRNAs. Somit war jede einzelne siRNA-Art in einer Konzentration von 4,17 nM vorhanden. Parallel dazu wurden die gleichen Zelllinien mit einem ON-TARGETplus Non-Targeting Pool an Kontroll-siRNAs transfiziert (D-001810-10, Thermo Scientific). Die Transfektionen erfolgten mittels Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) nach Empfehlungen des Herstellers. Die Zellen wurden nach 48 h re-transfiziert und nach 96 h geerntet.

3.2.6.3 DNA-, RNA- und Protein-Isolation aus HEK293-Zellen

Die Extraktion von DNA, RNA und Proteinen aus HEK293-Zellen erfolgte parallel mithilfe des DNA/RNA/Protein Mini Kits (Qiagen) nach Empfehlungen des Herstellers. Wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in PBS resuspendiert/gewaschen, die Zellen abermals pelletiert und in mit β -Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer des Kits lysiert. Die Homogenisierung erfolgte über QIAshredder-Säulen; die optionale DNase-Behandlung während der RNA-Extraktion wurde mithilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen) durchgeführt. Das Proteinpellet wurde in 5%iger SDS-Lösung resuspendiert. Die Bestimmung der

Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

3.2.6.4 DNA dot blot-Assay

Serielle Verdünnungen genomischer DNA in TE-Puffer wurden in 0,4 M NaOH/10 mM EDTA bei 99 °C für 5 min denaturiert. Das gleiche Volumen eisgekühlter 2 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) wurde hinzugegeben und die Proben mithilfe eines Minifold *dot blot* Systems (SRC-96, Schleicher & Schuell) unter Anlegen eines Vakuums auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare) transferiert. Nach kurzem Waschen der Membran in 2x SSC-Puffer wurde die DNA durch UV-*crosslinking* mit 70.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (UVC 500, Hoefer) kovalent fixiert. Ähnlich der Immunodetektion von Proteinen (siehe Kapitel 3.2.2.2) wurde die Membran unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT mit Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf eine Teflonplatte überführt und über Nacht bei 4 °C mit einem anti-5hmC-Primärantikörper (1:3.000 in Blockpuffer verdünnt) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran unter leichtem Schwenken dreimal für 5 min mit TBST gewaschen und für 1 h bei RT auf einer Teflonplatte mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert (anti-rabbit-HRP, 1:2.000 in Blockpuffer verdünnt). Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBST wurde die Membran für 5 min mit HRP-Substratlösung inkubiert (SuperSignal West Dura Extended Duration, Thermo Fisher Scientific) und anschließend zwischen Plastikfolien fixiert. Die Detektion der Lichtsignale erfolgte mit einem Chemilumineszenz-Imager und dem Programm Chemostar Professional (beides von Intas).

3.2.6.5 Methylierungsanalysen mit Infinium HumanMethylation450 BeadChips

DNA aus den HEK293-Zellen der *TET1*-Überexpressions- bzw. *TET*-Knockdown-Experimente (insgesamt zwölf Proben) wurde der Desaminierung und anschließenden Analyse mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChips nach Anweisungen des Herstellers unterzogen (11322371 Rev. A, Illumina). Die Desaminierung der DNA-Proben und technische Durchführung der BeadChip-Experimente erfolgte durch Mitarbeiter der Abteilung Molecular Diagnostics des Austrian Institute of Technology.

Die Datenanalyse erfolgte mithilfe des Webservices der Software RnBeads (Assenov *et al.*, 2014) in der Version 0.99.15 unter Anwendung der Standardeinstellungen (siehe Tabelle A3). Das Programm bewertete die differentielle Methylierung von Promotoren, Genen und CpG-*islands* (CGIs) anhand mehrerer Kriterien. Auf Basis dieser Kriterien wurden jeder Region Ränge zugewiesen, von denen wiederum ein kombinierter Rang abgeleitet wurde. Je niedriger der kombinierte Rang einer Region, desto größer waren die Anzeichen differentieller Methylierung. Anhand der kombinierten Ränge erstellte das Programm Streudiagramme der durchschnittlichen Methylierungswerte der 1.000 bestbewerteten, differentiell methylierten Regionen (Abbildung 16). Für weitere Analysen wurden aus den Ranglisten der Überexpressions- bzw. Knockdown-Studie Kandidatenlisten der jeweils 500 bestbewerteten CGIs und 500 bestbewerteten, mit einem Gensymbol annotierten Promotoren und Gene erstellt. Ein Promotor wurde als die Region 1,5 kb *upstream* bis 0,5 kb *downstream* der Transkriptionsstartstelle des betreffenden Gens definiert. CGIs wurden als mit einem Promotor assoziiert beschrieben, wenn sie mit der 2 kb großen Promotorregion überlappten. Diese Annotation wurde von Katrin Grothaus (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) den Datensätzen hinzugefügt.

3.2.6.6 Genexpressionsanalyse per Microarray

Globale Genexpressionsprofile der HEK293-Zellen der Überexpressions- bzw. Knockdown-Studie wurden mithilfe von GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix) erstellt. Dazu wurden je 200 ng RNA mit dem GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix) nach Anweisung des Herstellers aufbereitet. Die Arrays wurden nach den Empfehlungen des Herstellers hybridisiert, gewaschen sowie angefärbt und schließlich mit einem GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) mit G7 Upgrade analysiert.

Zunächst wurden die Rohdaten mit der Partek GenomicsSuite (Partek) unter Anwendung des RMA-Standardalgorithmus prozessiert. Die statistische Auswertung mittels ANOVA und Korrektur für multiples Testen (*false discovery rate step-up correction*) wies auf keine deregulierten Gene nach *TET1*-Überexpression und auf ein dereguliertes Gen nach dem Knockdown der *TET*-Transkripte hin.

Um subtilere Expressionsunterschiede detektieren und interklonale Unterschiede zwischen den Replikatzelllinien berücksichtigen zu können, wurden paarweise

Vergleiche durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der GCOS Software 1.4 und dem MAS 5.0 Algorithmus (Affymetrix) mit Standardeinstellungen, um die Signale und *detection calls* (*present*, *absent*, *marginal*) jedes Sonden-Sets zu bestimmen. Zur Normalisierung wurde global auf eine durchschnittliche Signalstärke von 1.000 skaliert. In paarweisen Vergleichen wurde jede behandelte Replik-Zelllinie mit ihrem entsprechenden Kontrollzustand verglichen. Basierend auf dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (*Wilcoxon's signed rank test*) wurde die Signifikanz jeder Expressionsveränderung (change *p*-value) berechnet. Signifikant in ihrer Intensität erhöhte (*p*-value <0,002) bzw. reduzierte Sonden-Sets (*p*-value >0,998) wurden beibehalten. Um die Anzahl falsch positiver Veränderungen zu begrenzen, wurden des Weiteren nur diejenigen Sonden-Sets beibehalten, die zumindest einen *present detection call* im behandelten/unbehandelten Paar aufwiesen. In die endgültige Auswertung wurden schließlich nur Sonden-Sets aufgenommen, die eine konsistente Hoch- bzw. Herunterregulation unter den drei Replikatsvergleichen der entsprechenden Überexpressions- bzw. Knockdown-Studie anzeigten. Sonden-Sets, die mit einem eindeutigen Gensymbol annotiert waren, wurden den entsprechenden Genen zugeordnet. Die technische Durchführung der Array-Experimente erfolgte durch Mitarbeiter des BioChip-Labors des Universitätsklinikums Essen. Die statistische Auswertung der Experimente wurde von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass, dem Leiter des BioChip-Labors, durchgeführt.

3.2.6.7 *Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling (RRHP)*

Die DNA von zwei der drei Paaren von *TET1*-Überexpressions- und Kontrollzellen (T-REx-293-TET1 #1 und 3) wurde von der Firma Zymo Research mithilfe des *Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling (RRHP)* (Peterson *et al.*, 2014) untersucht und einer ersten bioinformatischen Analyse unterzogen. Die Methode basiert auf der *Next-Generation-Sequenzier*technologie und ermöglicht die Kartierung der 5hmC-DNA-Modifikation im genomweiten Maßstab. Durch Vergleiche von *read*-Zahlen können 5hmC-Level quantifiziert und verschiedene Proben miteinander verglichen werden.

Zunächst basierten die Gen- und CGI-Annotationen der RRHP-Datensätze auf RefSeq- und CGI-Listen der UCSC-Website (genome.ucsc.edu); und Promotoren waren als die Regionen 1 kb *upstream* bis 1 kb *downstream* von Transkriptionsstartstellen definiert. Von Katrin Grothaus (Institut für Humangenetik,

Universitätsklinikum Essen) wurden die Regionsdefinitionen angepasst, sodass schließlich dieselben Promotor-, Gen- und CGI-Definitionen für die RRHP- und HumanMethylation450 BeadChip-Datensätze verwendet wurden (Ensembl gene definitions version 73, <http://www.ensembl.org/>; CGI-Definitionen von UCSC; Promotoren: die Region 1,5 kb *upstream* bis 0,5 kb *downstream* der Transkriptionsstartstelle eines Gens).

3.2.6.8 Statistische Überrepräsentationstests

Um die verschiedenen Kandidatenlisten auf über- bzw. unterrepräsentierte Genontologie-Kategorien hin zu überprüfen, wurden mithilfe der PANTHER-Software (Mi *et al.*, 2013) statistische Überrepräsentationstests mit Standardeinstellungen durchgeführt. Listen mit Gensymbolen dienten als Input und wurden mit der Referenzliste des menschlichen Genoms bei Anwendung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen verglichen. Die Details jeder Analyse sind im Anhang aufgeführt.

3.2.6.9 *De novo*-Motiv-Suchen

Die 5.000 CpG-Dinukleotide, die die stärkste Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression oder die stärkste Methylierungszunahme nach Knockdown der *TET*-Transkripte aufwiesen ($p < 0,05$), wurden mitsamt ihren flankierenden Regionen (± 200 bp) in FASTA-Dateien gespeichert. In gleicher Weise wurden FASTA-Dateien mit den am stärksten an 5hmC gewinnenden CpG-Dinukleotiden (*de novo* sowie nach *fold change*) und ihren Sequenzumgebungen angelegt. Passende Hintergrund-Dateien mit dem Sequenzkontext aller in den BeadChip- bzw. RRHP-Experimenten untersuchten CpG-Positionen wurden erstellt. Anschließend wurden mithilfe des Programms „findMotifs.pl“ der HOMER-Software Version 4.7 (Heinz *et al.*, 2010) die Ziel-Dateien mit den entsprechenden Hintergrund-Dateien verglichen, um angereicherte *de novo*-Sequenzmotive zu identifizieren. Motive, die von dem Programm als mögliche falsch positive Treffer markiert worden waren, wurden nicht in die Ergebnislisten aufgenommen. Die Motiv-Suchen wurden von Dr. Nicholas Wagner (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

3.2.6.10 Weitere bioinformatische Analysen

Vergleiche der per Microarray identifizierten deregulierten Transkripte mit den bestbewerteten, differentiell methylierten Genpromotoren wurden auf Basis annotierter Gensymbole durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob die Promotorregionen dieser Gene in den BeadChip-Methylierungsanalysen erfasst worden waren. Von den 21 nach *TET1*-Überexpression deregulierten Genen, wurden 16 zugehörige Promotorregionen auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht. Im Falle des *TET*-Knockdown-Experiments lagen für 179 der 191 deregulierten Gene Methylierungsdaten der Promotoren vor. Die Tatsache, dass nicht von allen deregulierten Genen Promotormethylierungswerte vorhanden waren, könnte auf abweichende Gensymbolannotationen sowie fehlende Methylierungs-Sonden-Sets zurückzuführen sein. Die Sonden-Sets fehlten möglicherweise von vornherein aufgrund des Array-Designs oder wurden während der Datenvorverarbeitungs- und Filterschritte der Methylierungsanalyse-Pipeline des Programms RnBeads aussortiert.

Die Genexpressionsdaten der unbehandelten Kontrollzelllinien der Überexpressions- und Knockdown-Studie wurden basierend auf ihrer Signalstärke in Expressionsquartile stratifiziert. Die Signalwerte sind mit statistischen Algorithmen der Affymetrix Microarray Suite Version 5.0 während der *single array*-Analysen berechnet worden und können zur Feststellung größerer Expressionscharakteristika und für die Erstellung von Expressionsprofilen verwendet werden (Affymetrix Statistical Algorithms Reference Guide, 701110 Rev 1). In beiden Studien wurden die Signalwerte der drei Replikat-Zelllinien für jedes Sonden-Set gemittelt. Da Vergleiche mit den (Hydroxy)Methylierungsdaten auf annotierten Gensymbolen beruhten, wurden nur Expressionsdaten von Genen berücksichtigt, die mit einem eindeutigen Gensymbol annotiert waren. Wenn mehrere Sonden-Sets mit einem Gensymbol assoziiert waren, wurde das stärkste Expressionssignal verrechnet. Auf diese Weise wurden die Expressionsdaten von mehr als 20.000 Genen in Quartile stratifiziert.

Berechnungen und die Erstellung von Abbildungen erfolgten mithilfe der Programmiersprache R (www.r-project.org) oder mit Excel (Microsoft).

4. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht. Eine Publikation zu den Methylierungsanalysen der *SST*- und *SSTR4*-Promotoren im Neokortex von Alzheimer-Patienten erschien in der Fachzeitschrift *Neuroscience Letters* (Grosser *et al.*, 2014a). Die nähere Charakterisierung des Mausmodells zur Studie der ubiquitären Überexpression von *Dnmt1s* ist Teil einer Online-Publikation auf dem *PrePrint*-Server der Fachzeitschrift *PeerJ* (Grosser *et al.*, 2014b). Eine Publikation, die den Einfluss veränderter TET-Dioxygenase-Level auf HEK293-Zellen beschreibt, wurde in der Fachzeitschrift *Epigenetics* veröffentlicht (Grosser *et al.*, 2015).

4.1 Methylierungsanalysen des *SST*- und *SSTR4*-Promotors im Neokortex von Alzheimer-Patienten

Im Gehirn von Alzheimer-Patienten finden sich oft reduzierte Somatostatin- und Somatostatin-Rezeptor-Level (Burgos-Ramos *et al.*, 2008), die mit einer pathogenen Rolle hinsichtlich der Ablagerung von Amyloid- β -Peptiden in Verbindung gebracht werden können (Saito *et al.*, 2005). Um zu klären, ob die Verringerungen des Peptidhormons Somatostatin und des Rezeptor-Subtyps 4 auf eine Hypermethylierung der entsprechenden Promotorregionen zurückzuführen sein könnten, wurden diese Regionen mittels Bisulfit-Sequenzierung in Patienten mit der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit und in nicht-dementen Normalpersonen analysiert.

4.1.1 Direkte Bisulfit-Sequenzierung des *SST*- und *SSTR4*-Promotors

Untersucht wurde der Methylierungsgrad der Promotorregionen des *Somatostatin*- (*SST*) und *Somatostatin-Rezeptor 4*-Gens (*SSTR4*) im *Gyrus temporalis medius* (GTM, Brodmann-Areal 22) und *Gyrus frontalis superior* (GFS, Brodmann-Areal 9) von fünf stark betroffenen Alzheimer-Patienten sowie fünf nicht-dementen Normalpersonen (für klinisch-pathologische Information siehe Tabelle A4). Die kortikale graue und infrakortikale weiße Substanz dieser Areale wurden dabei

separat analysiert, so dass sich aus der Gesamtzahl von 40 Gewebeproben die Analyse von insgesamt 80 Promotorregionen ergab.

Die Methylierungsanalyse erfolgte über die direkte Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten, generiert von Bisulfit-behandelter DNA. Das untersuchte *SST*-Amplicon erstreckte sich über die Transkriptionsstartstelle des *SST*-Gens und den Großteil des Promotor-assoziierten CpG-*islands* (CGI; Abbildung 5A). Es umfasste insgesamt 27 CpG-Dinukleotide, von denen 20 innerhalb des CGIs und sieben in 5'-Richtung außerhalb in der angrenzenden *shore*-Region lagen. Da die randständigen CpGs #1, #2 und #27 aufgrund systematischer Sequenzierfehler wiederholt nicht informativ waren, wurden sie aus den Analysen ausgeschlossen. Auch das Amplicon des *SSTR4*-Promotors überlappte mit der entsprechenden Transkriptionsstartstelle (Abbildung 5B). Es beinhaltete 44 CpGs, die alle innerhalb des Promotor-assoziierten CGIs lagen. Aus demselben zuvor beschriebenen Grund musste hier das randständige CpG-Dinukleotid #44 aus den Analysen ausgeschlossen werden.

Die Elektropherogramme zeigten ein sehr geringes Maß an Methylierung aller CpGs innerhalb des *SST*-CGIs und die Abwesenheit von Methylierungssignalen im *SSTR4*-CGI. Auszüge repräsentativer Elektropherogramme sind in Abbildung 5A+B gezeigt. Ein stärkerer Grad an DNA-Methylierung lag nur in der 5'-*shore*-Region des *SST*-CGIs vor (Daten nicht gezeigt). Es konnten keine offensichtlichen Methylierungsveränderungen der *SST*- und *SSTR4*-Promotorregionen in den Gewebeproben der grauen und weißen Substanz des GTM und GFS von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollgeweben nicht-dementer Personen festgestellt werden.

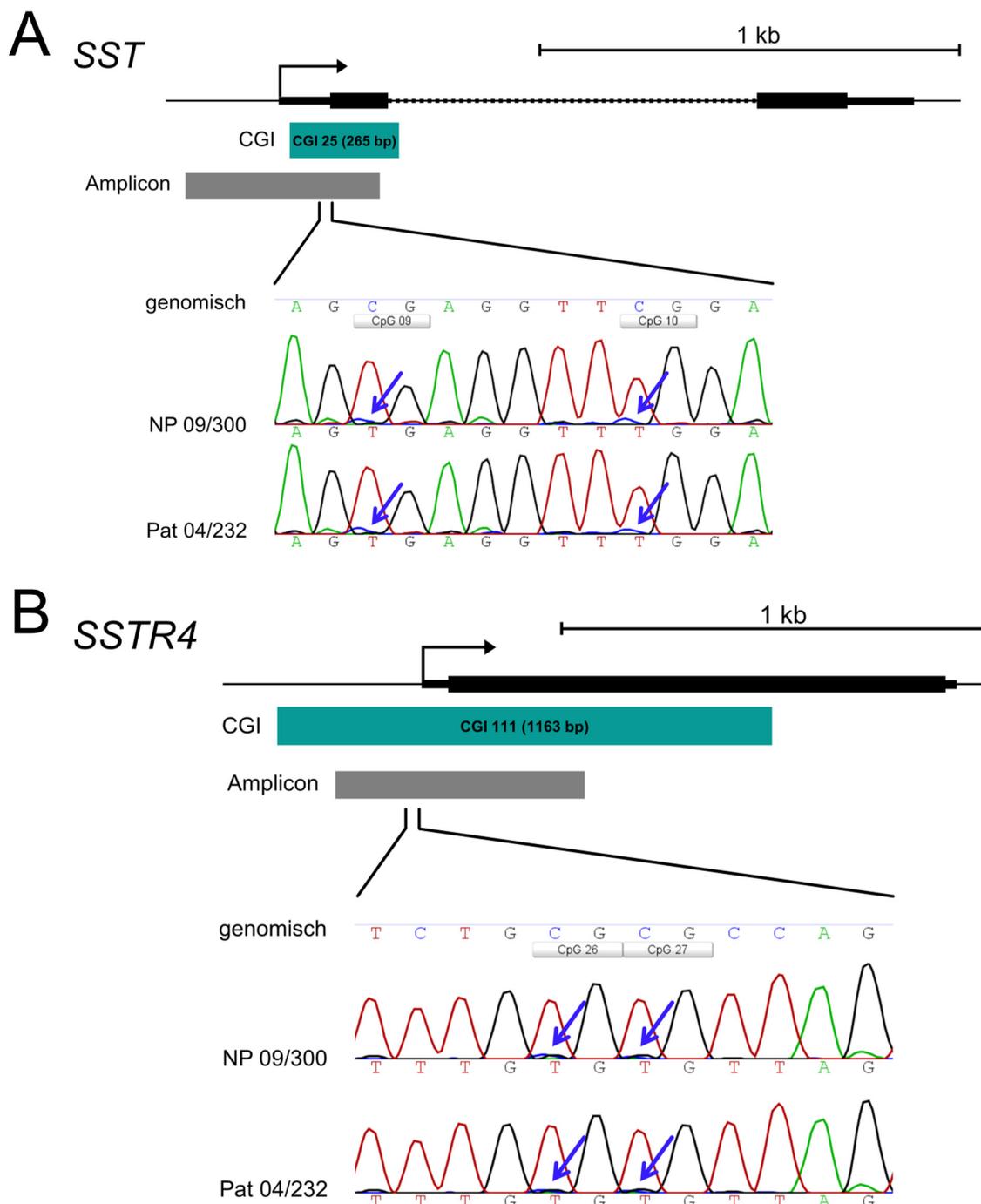


Abbildung 5: Übersicht der analysierten *SST*- (A) und *SSTR4*-Promotorregionen (B) samt repräsentativer Elektropherogramme. Transkriptionsstartstellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Kleine schwarze Boxen kennzeichnen untranslatierte Regionen, große schwarze Boxen kennzeichnen Exons. CGIs sind mit grünen Boxen dargestellt, mit Bisulfit-Sequenzierung untersuchte Amplicons mit grauen Boxen. Für jede Region sind repräsentative Elektropherogramme einer nicht-dementen Normalperson (NP 09/300) und eines Alzheimer-Patienten gezeigt (Pat 04/232). Sie stammen aus der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten Bisulfit-behandelter DNA aus der grauen Substanz des GFS. Der Methylierungsgrad im *SST*-CGI kann grob anhand der Peaks der blauen Cytosin-Spur abgeschätzt werden (A, blaue Pfeile). Das *SSTR4*-CGI zeigte Methylierungssignale im Bereich des Hintergrundrauschens (B, blaue Pfeile). Abgebildet sind die reversen komplementären Sequenzen. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014a.

4.1.2 Hochauflösende Methylierungsanalyse der SST-Promotorregion

Da die SST-Promotorregion in der vorangegangenen Analyse ein geringes Maß an DNA-Methylierung aufwies und sich die analysierten Gewebeproben aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzten, war es denkbar, dass Methylierungsveränderungen nur in einer Untergruppe kortikaler Zellen stattgefunden hatten. Daher wurde exemplarisch die SST-Promotorregion eines Gewebetyps (GFS, graue Substanz) derselben fünf Alzheimer-Patienten und fünf nicht-dementen Normalpersonen hochauflösend mithilfe von *Next-Generation-Sequencing*-Technologie untersucht. Als zusätzliche Kontrollen wurden Sperma- und Blutproben gesunder Spender analysiert. Diese hochauflösende Analyse ermöglicht selbst die Detektion eines niedriggradigen Methylierungsmosaiks, das zu erwarten ist, wenn nur eine Subpopulation an Zellen Methylierungsveränderungen trägt. Für jede Gehirnprobe wurde eine Sequenziertiefe von mehr als 300 *reads* erreicht, von denen jeder *read* ein individuelles Allel repräsentiert.

Die graphische Darstellung der Sequenziererergebnisse erbrachte jedoch keinen Hinweis auf die Hypermethylierung einzelner SST-Promotor-Allele in Alzheimer-Patienten (Abbildung 6). In einem weiteren Schritt wurden die durchschnittlichen Methylierungswerte jedes CpG-Dinukleotids bestimmt, indem die Anzahl der methylierten CpGs durch die Anzahl der gesamten CpGs geteilt wurde. Die Ergebnisse wurden separat für die 5'-*shore*-Region (CpG #1-7) und das CGI (CpG #8-27) jeder Probe zusammengefasst (Tabelle A5). Wie bereits aufgrund der Ergebnisse der direkten Bisulfit-Sequenzierung erwartet, lagen die durchschnittlichen Methylierungslevel der *shore*-Region zwar höher als die der CGI-Region, es zeigte sich jedoch kein größerer Unterschied zwischen Patienten (14-20%) und Normalpersonen (13-18%). Der Methylierungsgrad der CGI-Region war mit 3,5 bis 5,2% in den nicht-dementen Normalpersonen und 3,9 bis 5,9% in den Alzheimer-Patienten auf einem sehr ähnlichen, niedrigen Niveau. Diese Daten bestätigten die in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Ergebnisse der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte. Die zur Kontrolle eingesetzte DNA aus Sperma zeigte sowohl in der *shore*-Region (3%) als auch im CGI (0,3%) niedrigere durchschnittliche Methylierungslevel. Die untersuchte DNA aus Blut wies dagegen in beiden Regionen höhere Methylierungslevel auf (*shore*-Region: 24%; CGI: 7,5%).

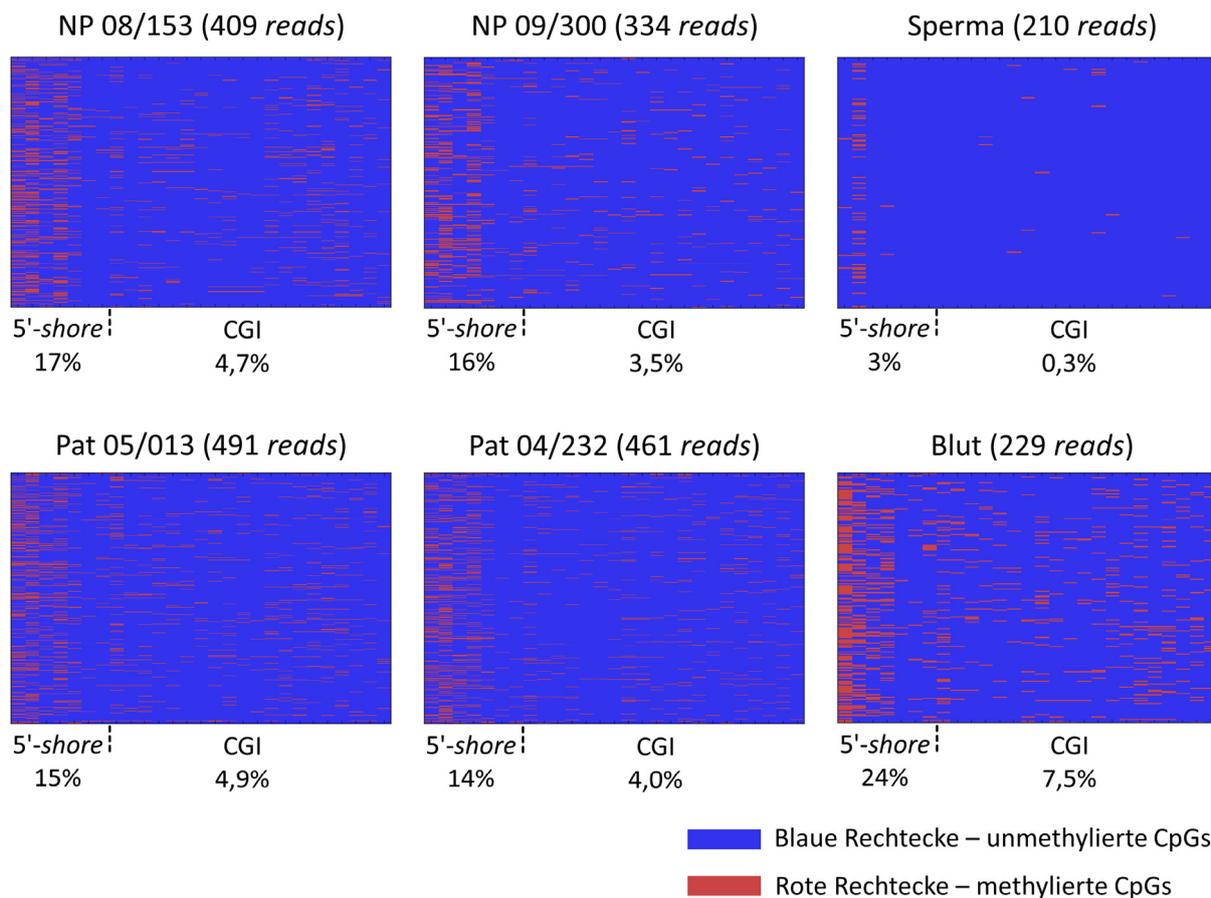


Abbildung 6: Hochauflösende Methylierungsanalyse der SST-Promotorregion. Graphische Darstellung repräsentativer Sequenzierungsergebnisse am Beispiel zweier Alzheimer-Patienten (Pat 05/013, Pat 04/232) und nicht-dementer Normalpersonen vergleichbaren Alters (NP 08/153, NP 09/300). Untersucht wurde die graue Substanz des GFS mithilfe von *Next-Generation-Sequencing*-Technologie. Zusätzlich sind die Analysen von Sperma- und Blutproben gesunder Spender gezeigt. Jede Zeile repräsentiert einen einzelnen *read* und somit ein in der PCR erzeugtes DNA-Molekül, jede Spalte repräsentiert den Methylierungsstatus eines CpG-Dinukleotids. Die CpGs #1-7 befinden sich in der 5'-*shore*-Region außerhalb des CGIs. Die durchschnittlichen Methylierungswerte aller CpGs innerhalb der CGI- bzw. 5'-*shore*-Regionen sind angegeben. In keiner Probe fanden sich Hinweise auf die Hypermethylierung einzelner Allele, was an einem hohen Blauanteil und niedrigen Rotanteil der einzelnen Zeilen zu erkennen ist. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014a.

Da Studien einen Zusammenhang von Alter und Methylierungsgrad verschiedener Loci im Gehirn nahelegten (Christensen *et al.*, 2009; Siegmund *et al.*, 2007), wurde die Korrelation von Methylierungsgrad und dem Alter der untersuchten (Normal- oder an Alzheimer erkrankten) Personen analysiert. Es zeigte sich, dass der durchschnittliche Methylierungsgrad der 5'-*shore*-Region nicht mit dem Alter assoziiert war, wohingegen der durchschnittliche Methylierungsgrad des CGIs die Tendenz aufwies, mit steigendem Alter ebenfalls zuzunehmen (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,08$; Abbildung 7). Der Methylierungsgrad des CGIs korrelierte jedoch nicht mit

dem Geschlecht, der Zeitspanne vom Tod bis zur Probenkonservierung oder dem pH der Zerebrospinalflüssigkeit (Daten nicht gezeigt).

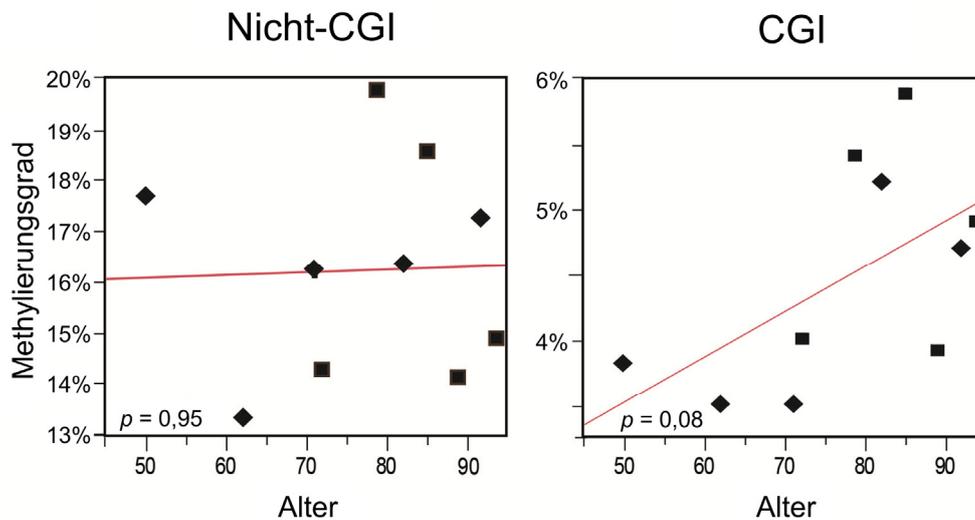


Abbildung 7: Untersuchung der Korrelation von Methylierungsgrad und Alter der untersuchten Personen. Der durchschnittliche Methylierungsgrad der 5'-shore-Region (Nicht-CGI) war nicht mit dem Alter assoziiert, wohingegen der durchschnittliche Methylierungsgrad des SST-CGIs (CGI) dazu tendierte, mit steigendem Alter der untersuchten Personen zuzunehmen (Bewertung mittels Chi-Quadrat-Test). Die Werte basieren auf der hochauflösenden Methylierungsanalyse mithilfe von *Next-Generation-Sequencing*-Technologie. Alzheimer-Patienten sind durch Rauten, nicht-demente Normalpersonen durch Quadrate dargestellt. Rote Linie: Regressionsgerade. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014a.

In einem weiteren Schritt wurde der Methylierungsdurchschnitt der fünf Alzheimer-Patienten mit dem der nicht-dementen Normalpersonen ähnlichen Alters verglichen. Aufgrund der zuvor beschriebenen Tendenz eines Alterseffekts mussten die 50- und 62-jährigen Normalpersonen von der Berechnung der Durchschnittswerte ausgeschlossen werden. Die Auswertung zeigte jedoch keine signifikanten Methylierungsunterschiede, weder in der 5'-shore-Region noch im CGI des SST-Promoters (Abbildung 8A). Mithilfe einer quantitativen *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) wurde überprüft, ob die Expression von SST-mRNA im Gehirn der Alzheimer-Patienten wie in der Literatur beschrieben herunterreguliert war (Bossers *et al.*, 2010). Unter Verwendung derselben Gehirnproben wie in den Methylierungsanalysen bestätigte die qRT-PCR die signifikant verringerte SST-Expression in der grauen Substanz des GFS der Alzheimer-Patienten ($p = 0,004$; Abbildung 8B).

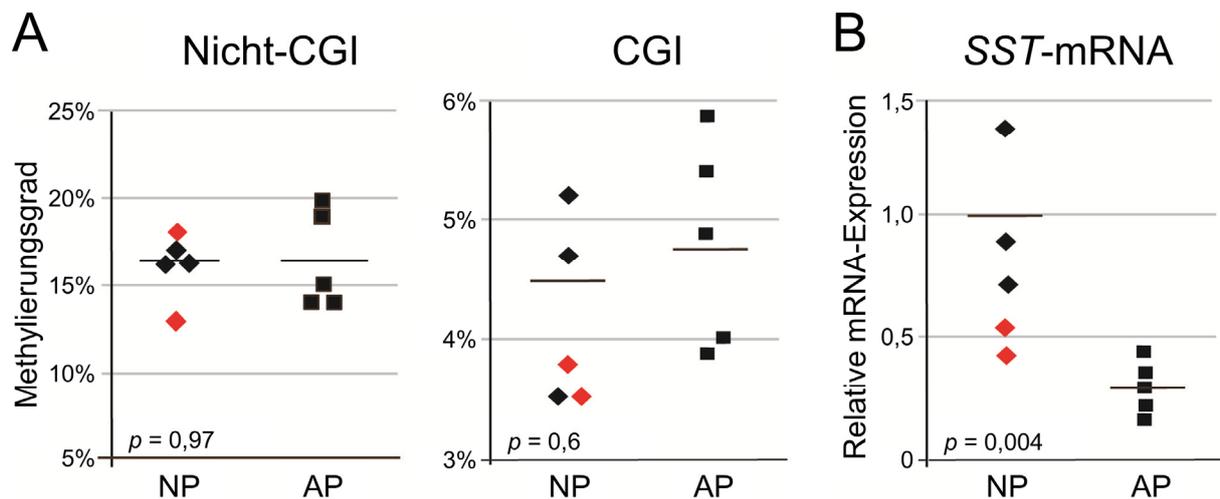


Abbildung 8: Analyse der Promotormethylierung und mRNA-Expression des SST-Gens in der grauen Substanz des GFS von Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen. (A) Die durchschnittlichen Methylierungslevel (schwarze Striche) der 5'-shore-Region (Nicht-CGI) und CGI-Region des SST-Promoters waren vergleichbar in nicht-dementen Normalpersonen (NP) und Alzheimer-Patienten (AP) mit $16,6 \pm 0,6\%$ verglichen mit $16,3 \pm 2,6\%$ (NP vs. AP, Nicht-CGI) und $4,5 \pm 0,9\%$ verglichen mit $4,8 \pm 0,9\%$ (NP vs. AP, CGI) [Mittelwert \pm Standardabweichung]. Die Werte basieren auf der hochauflösenden Methylierungsanalyse mithilfe von *Next-Generation-Sequencing*-Technologie. (B) Die Expression von SST-mRNA wurde im gleichen Set an Geweben mittels qRT-PCR bestimmt und ist relativ zur Durchschnittsexpression der Normalpersonen angegeben, die auf 1 gesetzt wurde. Die schwarzen Striche repräsentieren die durchschnittliche SST-Expression und zeigen verglichen mit Normalpersonen (NP; $1 \pm 0,35$) eine signifikant verringerte Expression in Alzheimer-Patienten (AP; $0,29 \pm 0,11$). Rote Symbole: Normalpersonen abweichenden Alters (50 bzw. 62 Jahre alt), die nicht für die Berechnung der Durchschnittswerte berücksichtigt wurden. Alzheimer-Patienten sind durch Rauten, Normalpersonen durch Quadrate dargestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe des Student-*t*-Tests bewertet. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014a.

4.2 Weitere Charakterisierung des Mausmodells zur Studie der ubiquitären Überexpression von *Dnmt1s*

Der folgende Teil beschäftigt sich mit der detaillierteren Untersuchung des Mausmodells zur ubiquitären Überexpression der somatischen Form der *DNA-Methyltransferase 1*, *Dnmt1s*. Dies umfasst neben der Analyse der *Dnmt1s*-mRNA- und Proteinexpression in verschiedenen Geweben auch einen experimentellen Ansatz zur Abschätzung des Einflusses der Kozak-Sequenz und der Sequenz des N-terminalen RGS-His-tags auf die Translationseffizienz des *Dnmt1s*-Transgens.

4.2.1 Untersuchung der *Dnmt1s*-mRNA-Expression

Mithilfe einer RT-PCR wurde untersucht, in welchen Geweben die transgenen Mäuse mRNA exprimieren, die für das RGS-His-markierte *Dnmt1s*-Transgen kodiert. Um die Detektion endogener, wildtypischer *Dnmt1s*-mRNA zu verhindern, wurde ein Primer der Reaktion in der transgenen RGS-His-tag-Sequenz platziert. Dieser Ansatz ermöglicht die transgenspezifische Amplifikation eines 209-bp-großen Fragments. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der analysierten Gewebe ausgeweitet. Untersucht wurde ein Tier der Linie 4, bei der es sich nach bisherigem Erkenntnisstand um die expressionsstärkste der drei weitergeführten transgenen Linien handelte. Die Analyse demonstrierte die Expression von RGS-His-*Dnmt1s*-mRNA in allen untersuchten Geweben (Abbildung 9A), wobei der Skelettmuskel und das Herz die stärkste Expression aufwiesen. Ein Wildtypgeschwistertier zeigte in der RT-PCR hingegen keine Produkte (Abbildung 9B).

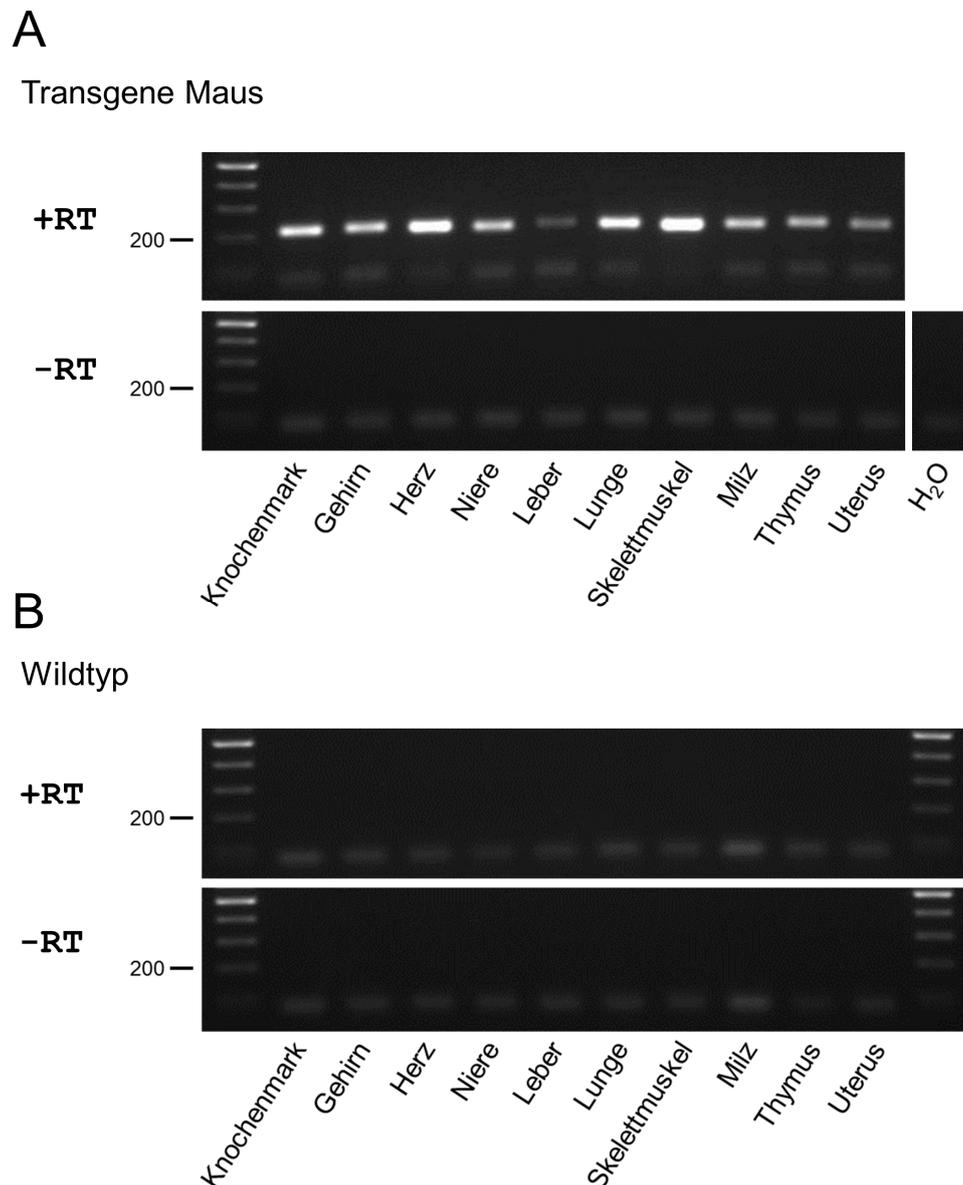


Abbildung 9: Ubiquitäre Expression transgenspezifischer *Dnmt1s*-mRNA. (A) Ein 209-bp-großes PCR-Produkt zeigt die ubiquitäre Expression von mRNA, die für das RGS-His-markierte *Dnmt1s*-Transgen kodiert. Untersucht wurden verschiedene Gewebe einer transgenen Maus der Linie 4. Da für alle Gewebe die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde, spiegeln die Bandenintensitäten grob die gewebespezifischen Expressionsstärken wider. (B) Ein Wildtyp-Geschwistertier zeigte kein Produkt in der transgenspezifischen RT-PCR.

Alle Ansätze wurden unter Verwendung desselben Master-Mixes durchgeführt. +RT: vollständiger Reaktionsansatz; -RT: Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase. Als Größenstandard wurde die FastRuler Low Range Ladder verwendet. Abbildung verändert nach Grosser et al., 2014b.

Um einen Vergleich der *Dnmt1*-Expression von transgenen und Wildtyp-Mäusen zu ermöglichen, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Es wurden kommerzielle TaqMan-Assays verwendet, die sowohl transgene als auch endogene *Dnmt1*-Transkripte detektieren. Verglichen mit Wildtypgeschwistertieren zeigten transgene Tiere der

Linie 4 eine signifikante *Dnmt1*-Überexpression in nahezu allen untersuchten Geweben (Abbildung 10). Eine Ausnahme stellte die Untersuchung der Lymphknoten dar. Dieses Gewebe zeigte zwar ebenfalls die Überexpression totaler *Dnmt1*-Level, jedoch musste das begrenzte Probenmaterial mehrerer Versuchstiere vereinigt werden, sodass keine Signifikanzberechnung erfolgen konnte. Im Einklang mit der zuvor durchgeführten RT-PCR-Analyse wiesen der Skelettmuskel (~229-fach) und das Herz (~55-fach) der transgenen Tiere die stärkste *Dnmt1*-Überexpression auf. Gehirn, Niere, Leber, Lunge, die vereinigten Lymphknoten-Proben, Milz, Testikel und Uterus zeigten eine etwa drei- bis neunfache Überexpression. Mit einer 1,6-fachen Zunahme an *Dnmt1*-Transkripten wiesen das Knochenmark und der Thymus die schwächste Überexpression auf. Die *Dnmt1*-Überexpression der transgenen Mauslinie 2 fiel generell niedriger aus, folgte jedoch einem vergleichbaren, gewebeabhängigen Muster (Abbildung A1). Tiere der Linie 3 zeigten insgesamt eine deutlich schwächere Überexpression und ließen, auch aufgrund der verringerten Anzahl untersuchter Gewebe, ein vergleichbares Muster gerade noch erahnen (Abbildung A2).

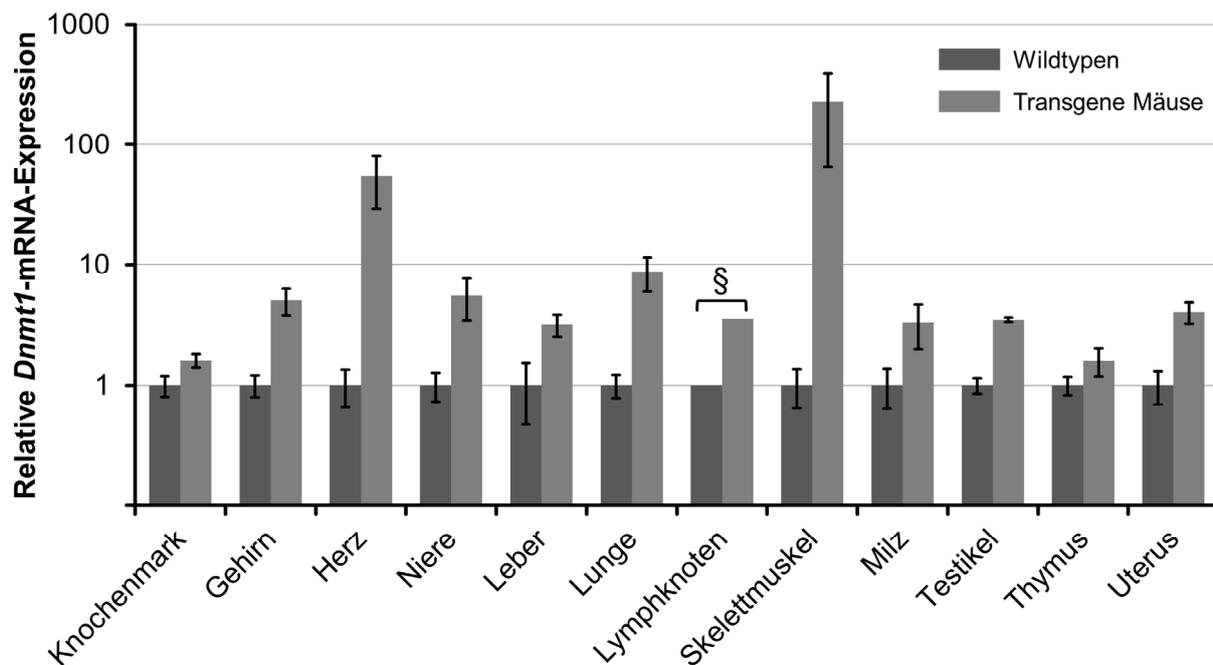


Abbildung 10: Ubiquitäre *Dnmt1*-Überexpression in transgenen Mäusen der Linie 4. Mittels qRT-PCR wurde die *Dnmt1*-Expression von transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistertieren verglichen. Für jedes Gewebe wurde die Expression der Wildtypen auf 1 gesetzt. Die relative *Dnmt1*-Expression war mit Ausnahme der Lymphknoten in Geweben transgener Tiere signifikant höher und zeigte gewebeabhängige Unterschiede [$n \geq 5$; $p < 0,05$, Student-*t*-Test; Lymphknoten: je 5 vereinigte Proben]. Gezeigt sind Mittelwerte mitsamt Standardabweichung. Die höchste *Dnmt1*-Überexpression wiesen der Skelettmuskel ($228,5 \pm 163,5$) und das Herz auf ($54,7 \pm 25,6$). Eine drei- bis neunfache Überexpression zeigten Gehirn ($5,0 \pm 1,3$), Niere ($5,5 \pm 2,1$), Leber ($3,2 \pm 0,7$), Lunge ($8,7 \pm 2,7$), Lymphknoten ($3,5$), Milz ($3,3 \pm 1,3$), Testikel ($3,5 \pm 0,2$) und Uterus ($4,0 \pm 0,8$). Die Überexpression war am schwächsten im Knochenmark ($1,6 \pm 0,2$) und Thymus ($1,6 \pm 0,4$). §: keine Signifikanzberechnung, da vereinigte Gewebeprobe. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014b.

4.2.2 Untersuchung der *Dnmt1*s-Proteinexpression

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche *western blot*-Untersuchungen durchgeführt, um spezifisch das transgene, RGS-His-markierte *Dnmt1*s-Protein zu detektieren oder die totalen (endogenen und transgenen) *Dnmt1*-Protein-Level zu quantifizieren. Dies umfasste verschiedene Lysepuffer (WCE-Puffer, RIPA-Puffer), verschiedene Techniken des Proteintransfers (*semi-dry blot*, *wet blot*), unterschiedliche Trägermembranen (Nitrocellulose, PVDF) und diverse Antikörper gerichtet gegen den His-*tag* oder das *Dnmt1*-Protein selbst (vgl. Kapitel 3.1.6 für eine Liste der verwendeten Antikörper). Obwohl die transgene mRNA in allen untersuchten Geweben exprimiert wurde und viele Gewebe stark erhöhte totale

Dnmt1-mRNA-Level aufwies, konnte das transgene, RGS-His-markierte Dnmt1s-Protein in keinem adulten Gewebe der Mauslinien 2, 3 oder 4 detektiert werden. Auch Fibroblasten, gewonnen aus transgenen Embryonen der Linie 4 (13,5 Tage *post coitum*), zeigten trotz 6,4-fach erhöhter *Dnmt1*-mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt) kein Signal des transgenen Proteins. Die semi-quantitative Bestimmung der totalen Dnmt1-Protein-Level in digitalen Aufnahmen der *western blots* erfolgte mithilfe verschiedener Analyse-Programme, erbrachte aber keinen Hinweis auf signifikant veränderte Protein-Mengen beim Vergleich von wildtypischen und transgenen Geweben der Linien 2, 3 und 4. Repräsentative *western blots* der Detektion der totalen Dnmt1-Protein-Level sind in Abbildung 11 gezeigt. In keiner *western blot*-Analyse gab es Hinweise auf degradiertes Dnmt1-Protein.

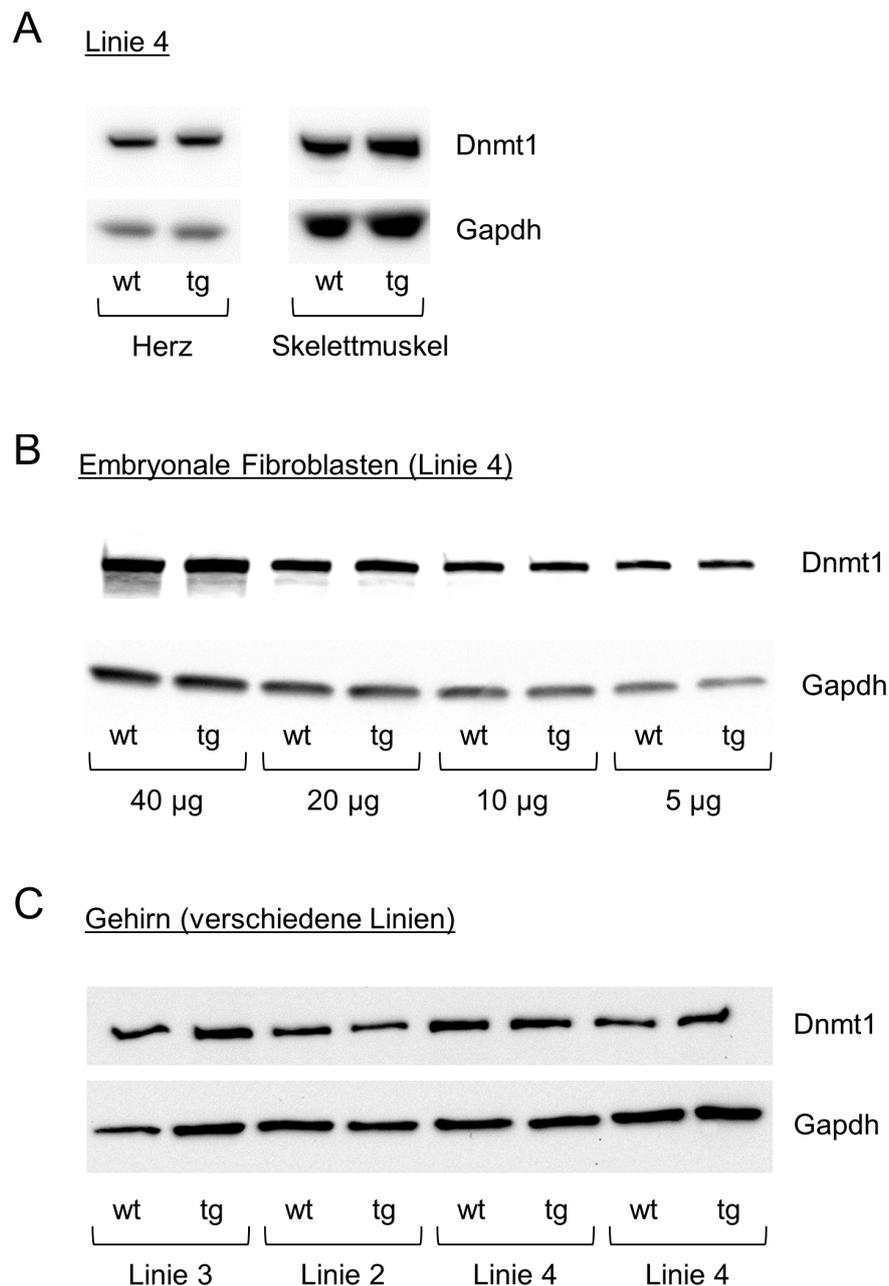


Abbildung 11: Erhöhte *Dnmt1*-mRNA-Level führten nicht zur Überexpression von *Dnmt1*-Protein. Repräsentative *western blots* zeigen die Detektion totaler (d.h. endogener und transgener) *Dnmt1*-Protein-Level mit einem *Dnmt1*-spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente die Detektion von *Gapdh*. **(A)** Untersucht wurden die Gewebe mit der stärksten Überexpression von *Dnmt1*-mRNA (Herz und Skelettmuskel der Linie 4). Transgene und wildtypische Geschwistertiere zeigten jedoch vergleichbare *Dnmt1*-Protein-Level. **(B)** Murine embryonale Fibroblasten der Linie 4 zeigten eine 6,4-fache Überexpression von *Dnmt1*-mRNA, wiesen aber keine erhöhten *Dnmt1*-Protein-Level auf. Verschiedene Mengen analysierten Gesamtproteins (40-5 µg) sollten die Überlagerung kleinerer Unterschiede durch zu starke *Dnmt1*-Signale verhindern. **(C)** Gehirn-Lysate transgener und wildtypischer Geschwistertiere der Linien 2-4 zeigten ebenfalls vergleichbare *Dnmt1*-Protein-Level. wt: wildtypische Probe; tg: transgene Probe. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014b.

4.2.3 Einfluss der Kozak-Sequenz und des RGS-His-tags auf die Proteintranslation

Die untersuchten Mauslinien gehen auf ein konditionelles Transgen-Konstrukt zurück, das erst durch die Einkreuzung von Cre-Rekombinase-Mauslinien die Überexpression von RGS-His-markiertem *Dnmt1s* zuließ (Grosser *et al.*, 2014b; Wagner, 2010). Im nicht-aktivierten, unrekombinierten Zustand trieb der CAG-Promotor des Konstrukts die Expression eines EGFP-Markerproteins an. Um herauszufinden, warum das Konstrukt im unrekombinierten Zustand zwar detektierbares Markerprotein produzierte, nach der Rekombination jedoch nur zur Überexpression transgener *Dnmt1s*-mRNA ohne entsprechende Proteinlevel führte (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2), wurden Luciferase-Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Diese sollten den Einfluss von zwei Unterschieden des *EGFP*- und des RGS-His-*Dnmt1s*-Transgens auf die Proteintranslation untersuchen: (I) den Einfluss der verschiedenen Kozak-Sequenzen und (II) den Einfluss der RGS-His-tag-Sequenz (Abbildung 12A). Zu diesem Zweck wurden die Kozak-Sequenzen alleine oder in Kombination mit der Sequenz des N-terminalen RGS-His-tags in ein Standard-Luciferase-Reporterplasmid kloniert (Abbildung 12B). Unterschiede in der Effizienz der Proteintranslation sollten zu veränderten Luciferase-Enzymleveln und somit zu veränderter Luciferase-Aktivität führen.

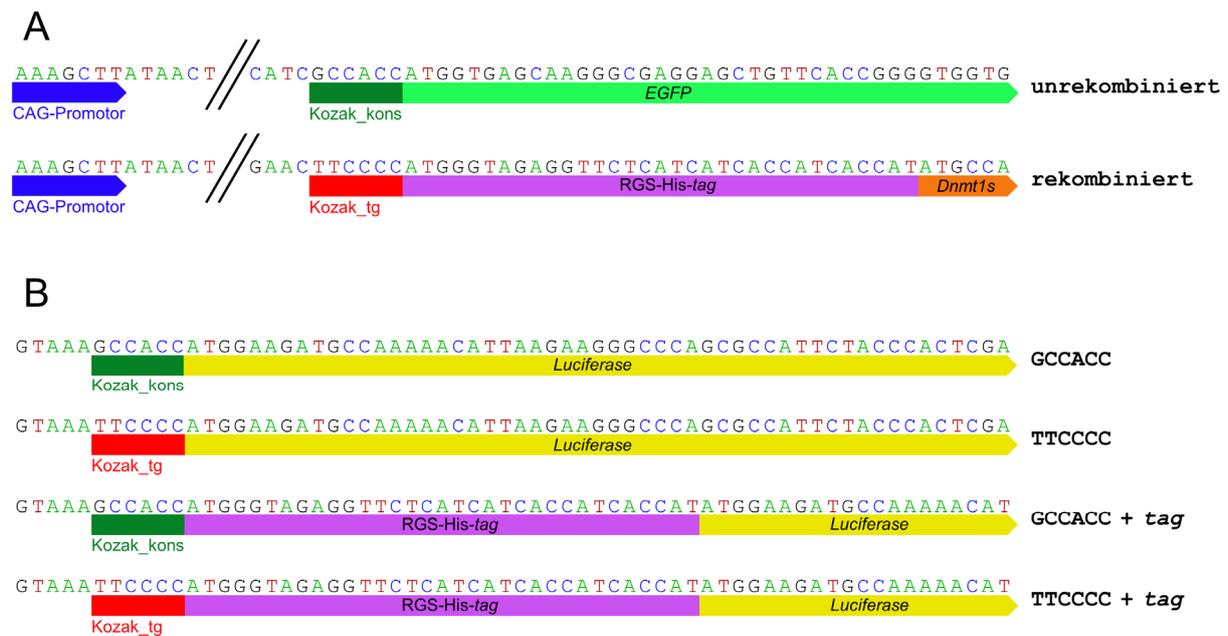


Abbildung 12: Übersicht über die Kozak-Sequenzen des Transgen-Konstrukts und die durchgeführten Luciferase-Reportergen-Studien. (A) Übersicht über die Kozak-Sequenzen des *EGFP*-Gens der unrekombinierten Version (oben) und des RGS-His-*Dnmt1s*-Gens der rekombinierten Version (unten) des Transgen-Konstrukts. **(B)** Aufbau der Luciferase-Konstrukte zum Test der Kozak-Sequenzen des *EGFP*-Gens (oben) und des RGS-His-*Dnmt1s*-Gens (zweites von oben) alleine, oder in Kombination mit dem RGS-His-tag (untere zwei Konstrukte). Kozak_kons: Optimale Kozak-Konsensussequenz; Kozak_tg: Kozak-Sequenz des RGS-His-*Dnmt1s*-Transgens. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014b.

Durchgeführt wurden die Luciferase-Reportergen-Assays in NIH-3T3-Mausfibroblasten. Hier reduzierte die Kozak-Sequenz (TTCCCC) des *Dnmt1s*-Transgens die Luciferase-Aktivität um etwa 30% verglichen mit der Kozak-Sequenz des *EGFP*-Transgens, die aus der optimalen Kozak-Konsensussequenz (GCCACC) bestand und deren Aktivität in den Versuchen auf 100% gesetzt worden war (Abbildung 13). Näher an der Situation des Mausmodells war der Test der Kozak-Sequenz des *Dnmt1s*-Transgens in Kombination mit der RGS-His-tag-Sequenz (TTCCCC + tag). Diese Kombination reduzierte die Luciferase-Aktivität um etwa 70%. Die gemeinsame Verwendung der optimalen Kozak-Konsensussequenz und der RGS-His-tag-Sequenz führte ebenfalls zu einem Aktivitätsverlust von etwa 70%. Die beschriebenen Ergebnisse basieren auf einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. Ergebnisse der Replikat-Experimente sind in Abbildung A3 und Abbildung A4 gezeigt. Obwohl die Translationseffizienz reduziert ist, kann das Fehlen des transgenen Proteins bzw. das Ausbleiben einer Erhöhung der totalen Dnmt1-Proteinlevel im Mausmodell nicht allein hierauf zurückgeführt werden.

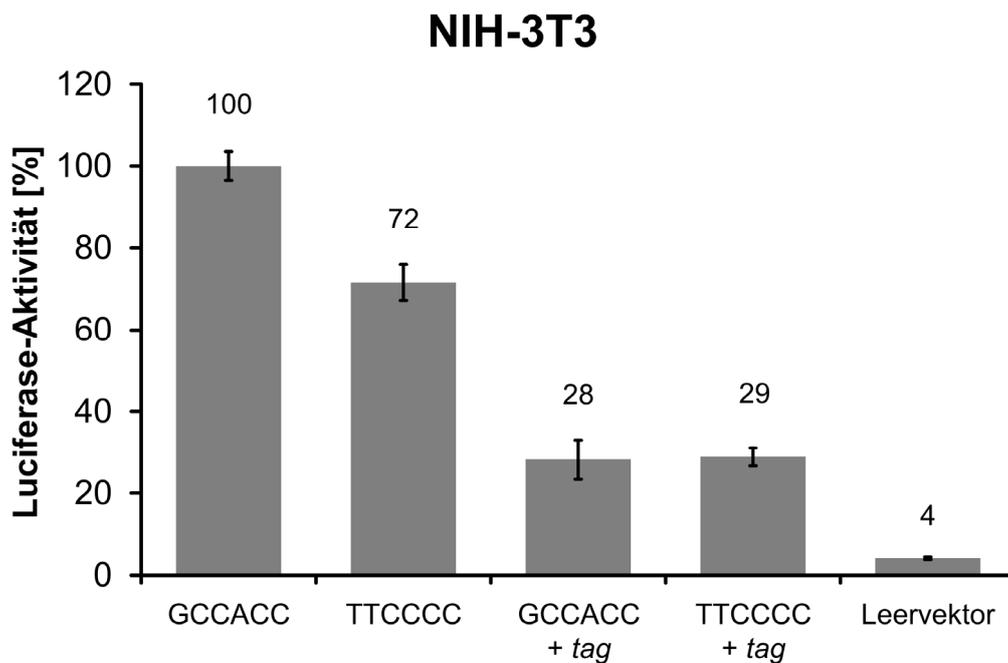


Abbildung 13: Die transgene *Dnmt1s*-Kozak-Sequenz und die Sequenz des RGS-His-tags verhinderten nicht die Proteintranslation in NIH-3T3-Mausfibroblasten. Die Kozak-Sequenz des RGS-His-*Dnmt1s*-Gens (TTCCCC) aus der rekombinierten Version des Transgen-Konstrukts reduzierte die Luciferase-Aktivität auf 72% verglichen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCCACC) des *EGFP*-Gens aus der unrekombinierten Version. Das Anfügen des RGS-His-tags vor das Luciferase-Startcodon beider Konstrukte führte zu einer stärkeren Reduktion der Luciferase-Aktivität auf etwa 30%, ungeachtet der verwendeten Kozak-Sequenz. Verglichen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCCACC, auf 100% gesetzt) zeigten die übrigen Konstrukte einen signifikanten Aktivitätsverlust ($p < 0,01$, Student-*t*-Test). Bei dem Leervektor handelte es sich um das promotorlose Kontroll-Plasmid. Es wurden jeweils fünf Transfektionsansätze gemessen, dargestellt als Mittelwert mitsamt Standardabweichung. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014b.

4.3 Einfluss veränderter TET-Dioxygenase-Level auf die DNA-Methylierung von HEK293-Zellen

Um den Einfluss veränderter TET-Dioxygenase-Level auf die DNA-Methylierung und Genexpression von HEK293-Zellen untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Das Flp-In T-REx-293 Zellsystem der Firma Invitrogen wurde verwendet, um stabile Zelllinien zu erschaffen, die FLAG-markiertes TET1 unter Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren Promotors exprimieren (T-REx-293-TET1 #1-3). Nach Induktion konnten auf diese Weise die Auswirkungen einer *TET1*-Überexpression untersucht werden. Dem gegenüber stand der siRNA-vermittelte simultane Knockdown von *TET1*, *TET2* und *TET3*. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden hierzu ebenfalls Zelllinien des Flp-In T-REx-293 Systems verwendet, die jedoch anstelle einer induzierbaren *TET1*-Genkopie ein *GFP*-Kontrollgen trugen (T-REx-293-GFP #1-3). Die Überexpression bzw. der Knockdown erfolgte in je drei klonalen, Einzelzell-abgeleiteten T-REx-293-Zelllinien.

4.3.1 *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown in HEK293-Zellen

Die drei T-REx-293-TET1-Zelllinien wurden für eine Dauer von 48h mit Doxycyclin induziert, woraufhin die Zellernte und parallele Extraktion von DNA, RNA und Protein erfolgten. Alle drei Linien wiesen eine etwa 2,5-fache Überexpression von *TET1*-mRNA im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollen auf (Abbildung 14A). *Western blots* bestätigten die spezifische Expression von FLAG-markiertem TET1-Protein (Abbildung 14B, oben) und zeigten eine deutliche Zunahme an TET1-Gesamtprotein (Abbildung 14B, unten). Die Zunahme an TET1-Gesamtprotein übertraf dabei die 2,5-fache Überexpression auf mRNA-Ebene. Ein DNA *dot blot*-Assay mit Anti-5hmC-Antikörpern zeigte in allen Linien die starke Erhöhung der globalen 5hmC-Level nach *TET1*-Überexpression (Abbildung 14C).

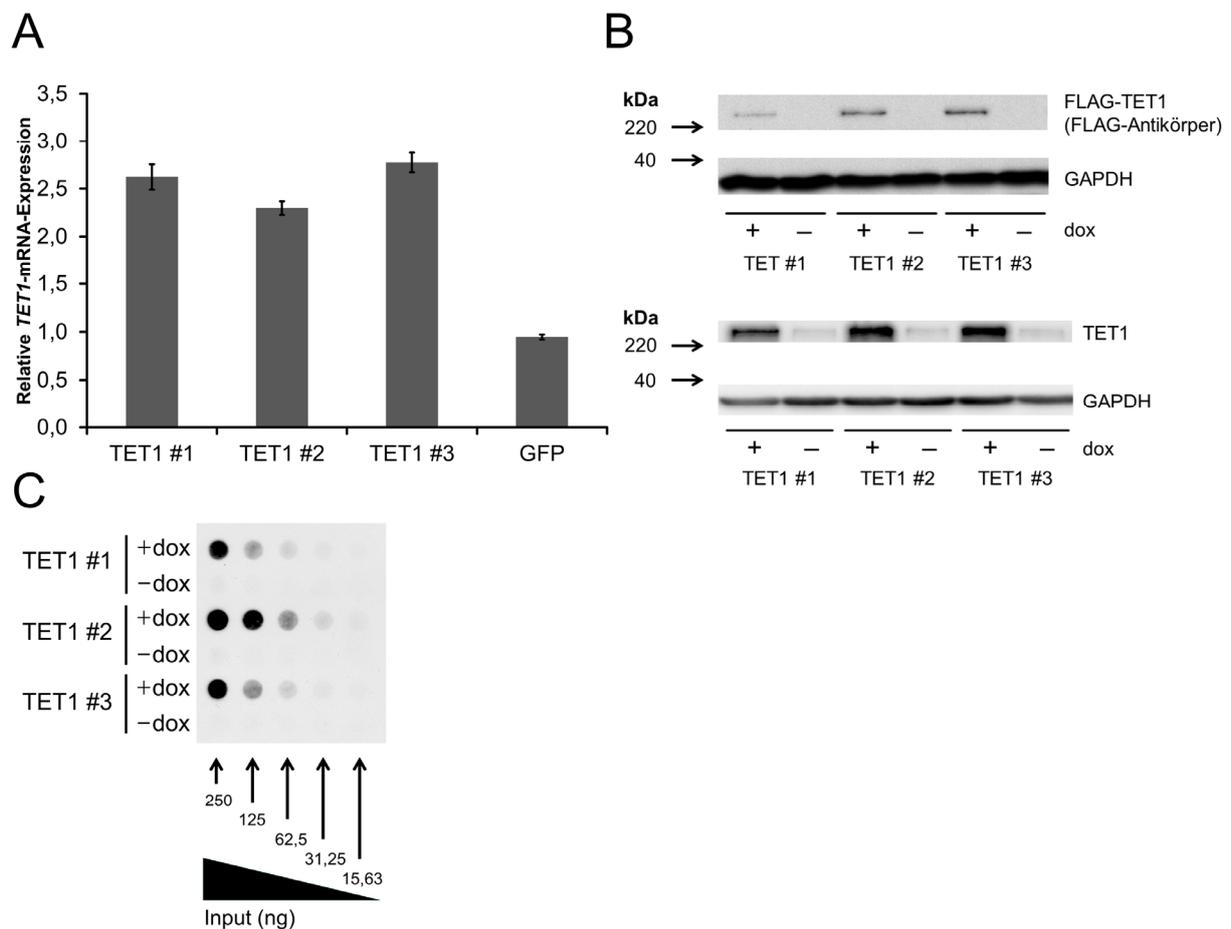


Abbildung 14: Erhöhte globale 5hmC-Level in HEK293-Zellen nach TET1-Überexpression. (A) Nach Doxycyclin-Induktion zeigt die qRT-PCR erhöhte *TET1*-Transkriptlevel in den T-REx-293-TET1-Zelllinien, wohingegen eine T-REx-293-GFP-Kontrollzelllinie (GFP) keine erhöhte *TET1*-Expression aufwies. Verglichen wurden induzierte Zelllinien relativ zu ihrem nicht-induzierten Zustand. Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und sind als Mittelwert mitsamt Standardabweichung aufgetragen. (B) *Western blot*-Analysen von induzierten und nicht-induzierten T-REx-293-TET1-Zelllinien mit Anti-FLAG- (oberer Abschnitt) und Anti-TET1-Antikörpern (unterer Abschnitt) belegen die Expression von FLAG-markiertem TET1-Protein bzw. die deutliche Zunahme an TET1-Gesamtprotein nach Induktion. (C) Die DNA *dot blot*-Analyse mit Anti-5hmC-Antikörpern zeigt stark erhöhte 5hmC-Level in induzierten T-REx-293-TET1-Zelllinien. TET1 #1-3: Einzelzell-abgeleitete T-REx-293-TET1-Zelllinien; +dox: Doxycyclin-induzierte Genexpression; -dox: nicht-induzierte Kontrolle. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Der simultane Knockdown von *TET1*, *TET2* und *TET3* wurde mithilfe von siRNAs für 96h in drei Einzelzell-abgeleiteten T-REx-293-GFP-Zelllinien durchgeführt, die ohne Zugabe des Induktionsmittels Doxycyclin kultiviert worden waren. Für die meisten Zelllinien und *TET*-Transkripte konnte eine Knockdown-Effizienz von mehr als 60% im Vergleich zu einer Behandlung mit Kontroll-siRNAs erreicht werden (Abbildung

15A). Ein DNA *dot blot*-Assay zeigte in allen Linien die starke Abnahme an globalem 5hmC nach *TET*-Knockdown (Abbildung 15B).

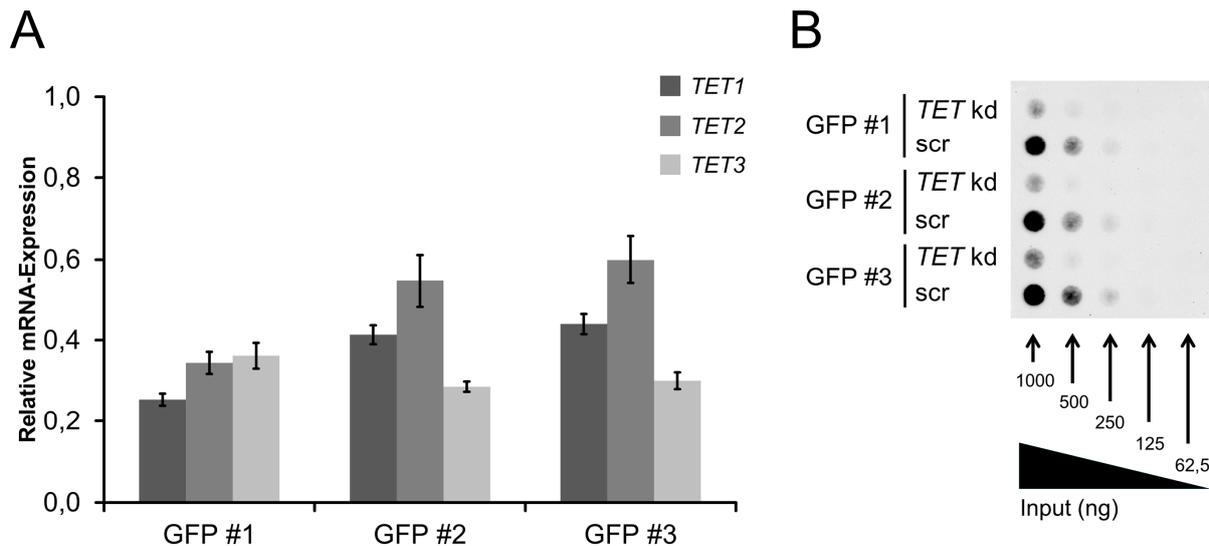


Abbildung 15: Reduzierte globale 5hmC-Level in HEK293-Zellen nach *TET*-Knockdown. (A) Die qRT-PCR zeigt reduzierte *TET*-Transkriptlevel nach Behandlung dreier T-REx-293-GFP-Zelllinien mit siRNAs gerichtet gegen *TET1*, *TET2* und *TET3* relativ zu einer Behandlung mit einem Kontroll-siRNA-Pool. Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und sind als Mittelwert mitsamt Standardabweichung aufgetragen. (B) Die DNA *dot blot*-Analyse mit Anti-5hmC-Antikörpern zeigt verringerte 5hmC-Level in T-REx-293-GFP-Zellen nach siRNA-vermitteltem *TET*-Knockdown (*TET kd*) verglichen mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen (*scr*). GFP #1-3: Einzelzell-abgeleitete T-REx-293-GFP-Zelllinien. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Weder während der *TET1*-Überexpression, noch während des *TET*-Knockdowns konnten offensichtliche Veränderungen der Zellmorphologie oder der Wachstumsrate beobachtet werden. Eine Analyse der endogenen *TET*-Level relativ zur Expression des Haushaltsgens *GAPDH* zeigte, dass das verwendete HEK293-Zellsystem niedrige basale *TET*-Expressionslevel besaß (Abbildung A5). Gemessen an der Expressionsstärke von *GAPDH* zeigten *TET1*-Transkripte ein Expressionsniveau von 0,42%. *TET3*-Transkripte wiesen ein Expressionsniveau von 0,36% und *TET2*-Transkripte von 0,09% auf.

4.3.2 Methylierungsanalysen von Promotoren, Genen und CpG-islands

Um zu untersuchen, ob einerseits die *TET1*-Überexpression zu DNA-Hypomethylierung und andererseits der *TET*-Knockdown aufgrund verringerter Demethylierungsaktivität zu DNA-Hypermethylierung führen könnte, wurden

Analysen mit Infinium HumanMethylation450 BeadChips durchgeführt (Technische Durchführung: Austrian Institute of Technology, Kapitel 3.2.6.5). Die untersuchte DNA stammte aus denselben Überexpressions-, Knockdown- bzw. Kontroll-Zellen die im vorigen Kapitel beschrieben und analysiert wurden.

Mithilfe spezifischer Sonden erfassten die HumanMethylation450 BeadChips den Methylierungsstatus von über 450.000 einzelnen CpG-Dinukleotiden, die über das gesamte Genom verteilt vorlagen. Die Auswertung der Methylierungsrohdaten und Suche nach differentiell methylierten Regionen erfolgte mithilfe der RnBeads-Software. Dabei wurden für jedes CpG zunächst die Methylierungswerte der Replikatzelllinien gemittelt und anschließend Methylierungsdurchschnittswerte von Promotoren, Genen und CGIs auf Basis der enthaltenen CpGs gebildet. Wiedergegeben wird der Methylierungsgrad einer Region als Beta-Wert, wobei die Skala von 0,0 für eine komplett unmethylierte bis 1,0 für eine vollständig methylierte Region reicht. Differentiell methylierte Regionen wurden von der RnBeads-Software nach einer Methode verschiedener kombinierter Ränge identifiziert (Assenov *et al.*, 2014).

Der Vergleich von *TET1*-überexprimierenden Zellen mit nicht-induzierten Kontrollzellen zeigt, dass die *TET1*-Überexpression hauptsächlich eine leichte Hypomethylierung von Promotoren, Genen und CGIs bewirkte. Dies zeigt sich in Methylierungs-Streudiagrammen anhand der überwiegenden Verschiebung der 1.000 bestbewerteten, differentiell methylierten Regionen (dargestellt als rote Punkte) in die rechte Diagrammhälfte, unterhalb der Diagonale (Abbildung 16A-C). Regionen mit identischen Methylierungsleveln in induzierten und nicht-induzierten Zellen lägen exakt auf der Diagonale, die eine perfekte positive Korrelation darstellt. Je größer der Grad der differentiellen Methylierung, desto weiter entfernt sich eine Region von dieser Diagonale. Die Verschiebung der 1.000 bestbewerteten, differentiell methylierten Regionen entlang weiter Teile der Diagonale zeigt die große Spannbreite der endogenen Methylierungslevel der nach *TET1*-Überexpression hypomethylierten Regionen. Die höhere rote Punktdichte im Mittelbereich des Diagramms verdeutlicht dabei die größere Präferenz für die Hypomethylierung der Promotoren und Gene, die mittelstarke Ausgangsmethylierungslevel besaßen (Abbildung 16A+B). Im Gegensatz dazu wurden vorzugsweise bereits schwach methylierte CGIs weiter demethyliert (Abbildung 16C, höhere Punktdichte im Bereich niedriger Ausgangsmethylierungslevel).

Der *TET*-Knockdown führte hauptsächlich zu einer leichten Hypermethylierung von Promotoren, Genen und CGIs. In den entsprechenden Streudiagrammen ist dies anhand der überwiegend linksseitigen Verschiebung der 1.000 bestbewerteten, differentiell methylierten Regionen ersichtlich (Abbildung 16D-F). Ähnlich der *TET1*-Überexpression zeigen die betroffenen Regionen ebenfalls eine große Spannweite endogener Methylierungslevel, doch gab es hier eine klare Präferenz für die Hypermethylierung derjenigen Promotoren, Gene und CGIs, die bereits einen hohen Methylierungsgrad besaßen. Dies ist an der höheren roten Punktdichte im Bereich der größeren Methylierungs-Beta-Werte erkennbar (Beta-Werte ca. 0,6-0,9).

Details zu den abgebildeten differentiell methylierten Regionen sind in den Tabellen E1-E6 des erweiterten, digitalen Anhangs dieser Arbeit aufgeführt.

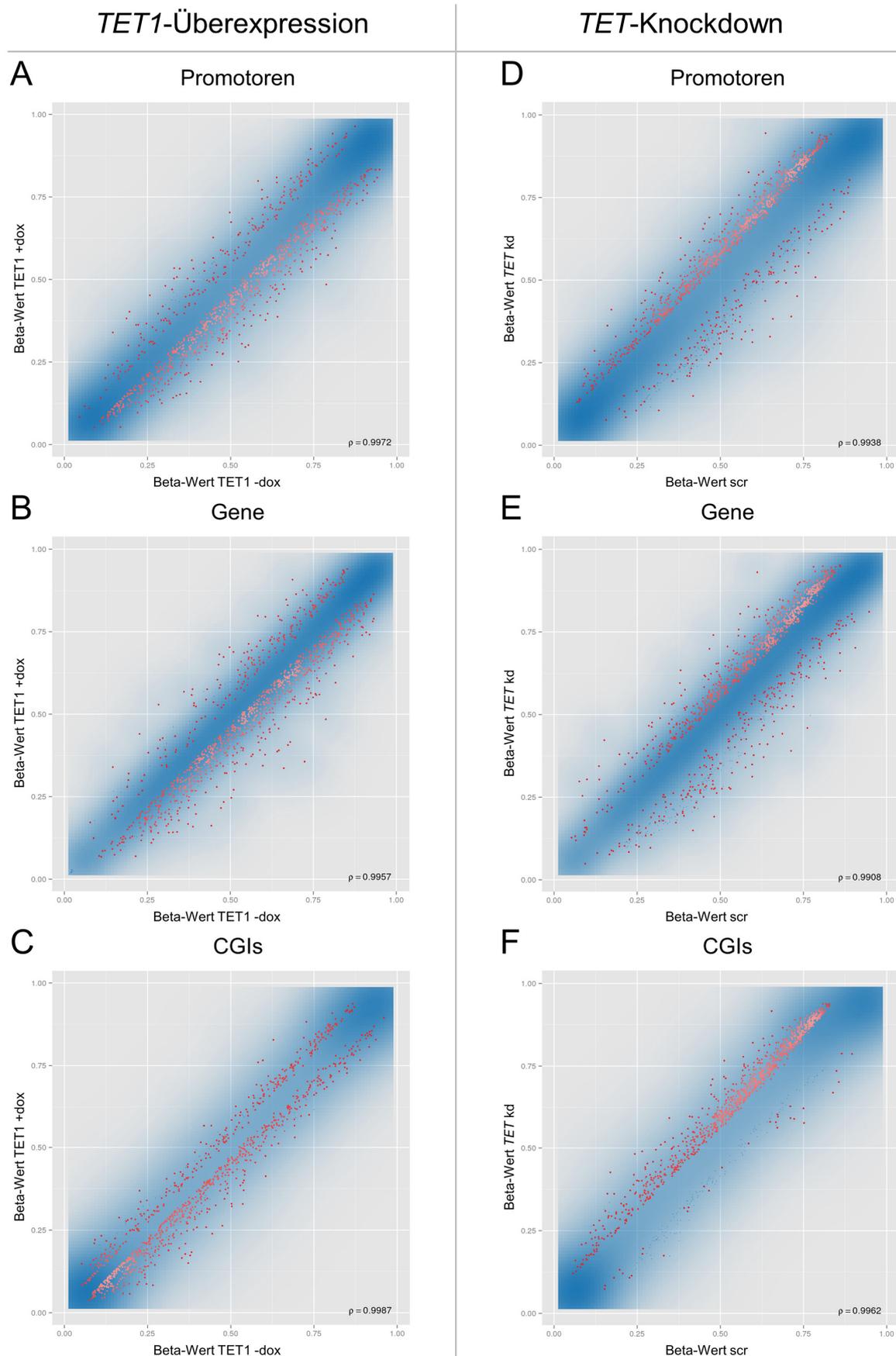


Abbildung 16: *TET1*-Überexpression und *TET1*-Knockdown beeinflussen die DNA-Methylierungslevel von HEK293-Zellen. Streudiagramme der durchschnittlichen Methylierungswerte (Beta-Werte) verschiedener genomischer Regionen nach induzierter Überexpression von *TET1* (*TET1* +dox; **A-C**) und nach simultanem Knockdown von *TET1*,

TET2 und *TET3* (*TET* kd; **D-F**) verglichen mit den entsprechenden nicht-induzierten (*TET1* -dox) bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (scr). Mithilfe von Illumina HumanMethylation450 BeadChips wurde der Methylierungszustand von mehr als 450.000 CpG-Dinukleotiden erfasst und quantitativ auf Regionsebene für die drei Replikat-Zelllinien beider Experimente ausgewertet. Die transparenten blauen Bereiche entsprechen der Punktdichte, wobei 1% der Punkte in den am dünnsten besetzten Bereichen explizit in blau dargestellt sind. Die 1.000 bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren (A, D), Gene (B, E) und CGIs (C, F) sind durch rote Punkte abgebildet. ρ = Pearson-Korrelationskoeffizient. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Für weitere Analysen wurden aus beiden Studien Kandidatenlisten der jeweils 500 bestbewerteten CGIs und 500 bestbewerteten, mit einem Gensymbol annotierten Promotoren und Gene erstellt (Tabellen E7-E12). In Übereinstimmung mit den obigen Analysen zeigte die Mehrheit dieser Regionen eine Hypomethylierung nach *TET1*-Überexpression bzw. eine Hypermethylierung nach simultanem Knockdown der drei *TET*-Transkripte (Tabelle 3, linke Seite).

Tabelle 3: Reziproke Methylierungsveränderungen nach *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown.

	<i>TET1</i> -Überexpression		<i>TET</i> -Knockdown		Überschneidung		
Promotoren	84	↑	424	↑	38	↓	↑
	416	↓	76	↓	9	↓	↓
Gene	84	↑	381	↑	3	↑	↑
	416	↓	119	↓	3	↑	↓
CGIs	125	↑	486	↑	26	↓	↑
	375	↓	14	↓	12	↓	↓
					5	↑	↑
					8	↑	↓
					42	↓	↑
					1	↓	↓
					5	↑	↑
					3	↑	↓

Verteilung der 500 bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren, Gene und CGIs in Richtung Hypo- (↓) bzw. Hypermethylierung (↑). Hauptsächlich verursachte die *TET1*-Überexpression DNA-Hypomethylierung, wohingegen der *TET*-Knockdown zu DNA-Hypermethylierung führte (beides schwarz hervorgehoben). Überschneidungen der beiden Experimente sind in der rechten Spalte dargestellt, wobei reziproke Veränderungen, die dem generellen Trend von Hypomethylierung nach *TET1*-Überexpression und Hypermethylierung nach *TET*-Knockdown folgten, schwarz hervorgehoben sind. Tabelle verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Mithilfe der PANTHER-Software wurden statistische Überrepräsentationstests durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.6.8), um in den Kandidatenlisten nach über- bzw. unterrepräsentierten Genontologie-Kategorien zu suchen (Tabelle A6). Die Analyse der nach *TET1*-Überexpression hypomethylierten Promotoren und Gene zeigte eine Anreicherung von Genen, die mit sensorischer Wahrnehmung assoziiert sind. Im Gegensatz dazu zeigten die nach *TET*-Knockdown hypermethylierten Promotoren eine Anreicherung von Genen mit Bezug zum Immunsystem. Nach Knockdown hypermethylierte Gene waren angereichert in der System-Entwicklung und in mit biologischer Regulation verwandten Kategorien, einschließlich der Transkriptionsregulation von RNA-Polymerase-II-Promotoren. Promotor-assoziierte CGIs, die eine Hypomethylierung in der Überexpressions- bzw. eine Hypermethylierung in der Knockdown-Studie aufwiesen, zeigten keine signifikant veränderten Kategorie-Verteilungen.

Die Kandidatenlisten beider Studien wurden zudem auf reziproke Methylierungsveränderungen hin überprüft (Tabelle 3, rechte Seite). Details zu den konsistent identifizierten Promotoren, Genen und CGIs sind in den Tabellen E13-E15 aufgeführt. Von den je 500 bestwerteten, differentiell methylierten Promotoren zeigten 38 eine verringerte Methylierung nach der Überexpression von *TET1* (Spanne -4 bis -23%) in Kombination mit einer Methylierungszunahme nach *TET*-Knockdown (Spanne +7 bis +24%). Fünfzehn weitere Promotoren wurden übereinstimmend in beiden Studien identifiziert, zeigten jedoch anders gerichtete Methylierungsveränderungen. Von den 500 bestbewerteten Genen beider Studien zeigten 26 reziproke Methylierungsveränderungen wie oben beschrieben, während 25 weitere Gene Methylierungsveränderungen anderer Richtung aufwiesen. Ähnlich der Klasse der Promotoren zeigten insgesamt 42 CGIs eine Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression sowie eine Methylierungszunahme nach *TET*-Knockdown. In den Kandidatenlisten beider Studien wurden neun weitere CGIs identifiziert, die jedoch anders gerichtete Methylierungsveränderungen aufwiesen. Interessanterweise überlappten nur acht der 42 CGIs mit denjenigen Promotoren, die ebenfalls solche reziproken Methylierungsveränderungen zeigten. Statistische Überrepräsentationstests mit den reziprok in ihrer Methylierung veränderten Promotoren, Genen und CGIs zeigten keine signifikant über- bzw. unterrepräsentierten biologischen Prozesse (Tabelle A7).

Der Anteil an überlappenden reziproken Veränderungen zwischen den Kandidatenlisten war mit drei Promotoren, zugehörigen CGIs und Genen (*DUSP26*,

ZNF597, *ZNF619*) eher gering. Auch wenn die *TET1*-Überexpression und der *TET*-Knockdown generell entgegengesetzte Methylierungsveränderungen an Promotoren, CGIs und Genen hervorgerufen haben, so zeigte sich nur eine begrenzte Anzahl an reziproken Methylierungsveränderungen unter den bestbewerteten Zielregionen.

4.3.3 Analyse globaler Genexpressionsprofile

Da die DNA-Methylierung von Promotoren oft mit reprimierter Genexpression assoziiert ist und es berichtet wurde, dass TET-Enzyme die Genaktivität beeinflussen können (Guo *et al.*, 2011b; Williams *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011), wurden genomweite Expressionsanalysen unter Verwendung von GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays durchgeführt (Technische Durchführung: BioChip-Labor des Universitätsklinikums Essen, Kapitel 3.2.6.6). Die eingesetzte RNA wurde aus denselben Überexpressions-, Knockdown- bzw. Kontroll-Zellen extrahiert, mit denen die zuvor beschriebenen Methylierungsanalysen durchgeführt wurden. Verglichen wurden die induzierten bzw. siRNA-behandelten Zellen mit ihren entsprechenden Kontrollen. Eine erste Analyse basierend auf Durchschnittswerten der jeweils drei Replikatzelllinien zeigte bei Anwendung einer *false discovery rate* (q-value <0,05) keine signifikant deregulierten Gene nach Überexpression von *TET1*, wohingegen nach Knockdown der *TET*-Transkripte ein herunterreguliertes Gen identifiziert werden konnte (*KIAA0494/EF CAB14*). Um auch subtilere Expressionsunterschiede detektieren zu können und interklonale Unterschiede zwischen den Replikatzelllinien zu berücksichtigen, wurden paarweise Vergleiche durchgeführt. Dazu wurde mithilfe des Affymetrix MAS 5.0 Vergleichs-Algorithmus jede behandelte Zelllinie mit ihrem entsprechenden Kontrollzustand verglichen. In die Endauswertung wurden nur diejenigen Sonden-Sets aufgenommen, die eine konsistente Hoch- bzw. Herunterregulation unter den drei Replikatsvergleichen der entsprechenden Studie anzeigten. Auf diese Weise wurden elf hoch- und zehn herunterregulierte Gene identifiziert, die konsistent in allen drei *TET1*-überexprimierenden Zelllinien dereguliert waren (Tabelle E16). Der *TET*-Knockdown hingegen führte mit 67 hoch- und 124 herunterregulierten Genen zu einer größeren Anzahl an Expressionsveränderungen (Tabelle E17). Statistische Überrepräsentationstests mit den deregulierten Genen erbrachten jedoch keinen Hinweis auf über- bzw. unterrepräsentierte biologische Prozesse (Tabelle A8).

Die *TET1*-Überexpression beeinflusste nicht die Transkriptmengen der anderen TET-Enzyme. Zudem wirkten sich weder die Überexpression von *TET1* noch der simultane Knockdown der *TET*-Transkripte auf die Expressionsstärke von DNA-Methyltransferasen aus. Auch konnte in früheren Experimenten gezeigt werden, dass das als Induktionsmittel verwendete Doxycyclin selbst keinen Einfluss auf das Transkriptom von HEK293-Zellen ausübt (Neumann *et al.*, 2012). Obwohl die meisten der mit den GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays gemessenen Expressionsveränderungen geringer als zweifach ausfielen, konnten die Veränderungen exemplarisch mittels qRT-PCR verifiziert werden (Abbildung A6). Mit nur zwei deregulierten Genen gab es kaum Überschneidungen zwischen der Überexpressions- und Knockdown-Studie, auch wenn diese Gene reziproke Expressionsänderungen zeigten (*ARRDC4*, *HOXA13*).

Vergleiche der Genexpressionsprofile mit den 500 bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren aus der Infinium HumanMethylation450 BeadChip-Methylierungsanalyse zeigten keine Überschneidungen im Falle der *TET1*-Überexpression, wohingegen im *TET*-Knockdown-Experiment drei schwach hochregulierte Gene eine verstärkte Promotormethylierung zeigten (*CREBZF*, *HIST1H3H*, *ROBO1*). Die Expressionsveränderungen lassen sich folglich nicht direkt mit den veränderten Methylierungsleveln der Promotoren in Verbindung bringen.

4.3.4 Charakterisierung differentiell methylierter Promotoren

Da anhand der BeadChip-Methylierungsanalysen gezeigt werden konnte, dass die *TET1*-Überexpression und der *TET*-Knockdown die Promotormethylierungslevel mit unterschiedlicher Präferenz in Abhängigkeit vom endogenen Methylierungsgrad beeinflussten (Kapitel 4.3.2), stellte sich die Frage nach einer möglichen Verbindung zum Expressionsniveau der betroffenen Gene. Zur Verifizierung der Grundannahme, dass Genexpression und Promotormethylierung prinzipiell negativ korrelieren, wurden zunächst die Expressionsprofile der Kontrollzelllinien basierend auf der Expressionsstärke in Quartile unterteilt und mit den entsprechenden Methylierungs-Beta-Werten der BeadChips verglichen (Abbildung 17). Entsprechend der Annahme zeigte die Mehrheit der Gene eine solche negative Korrelation.

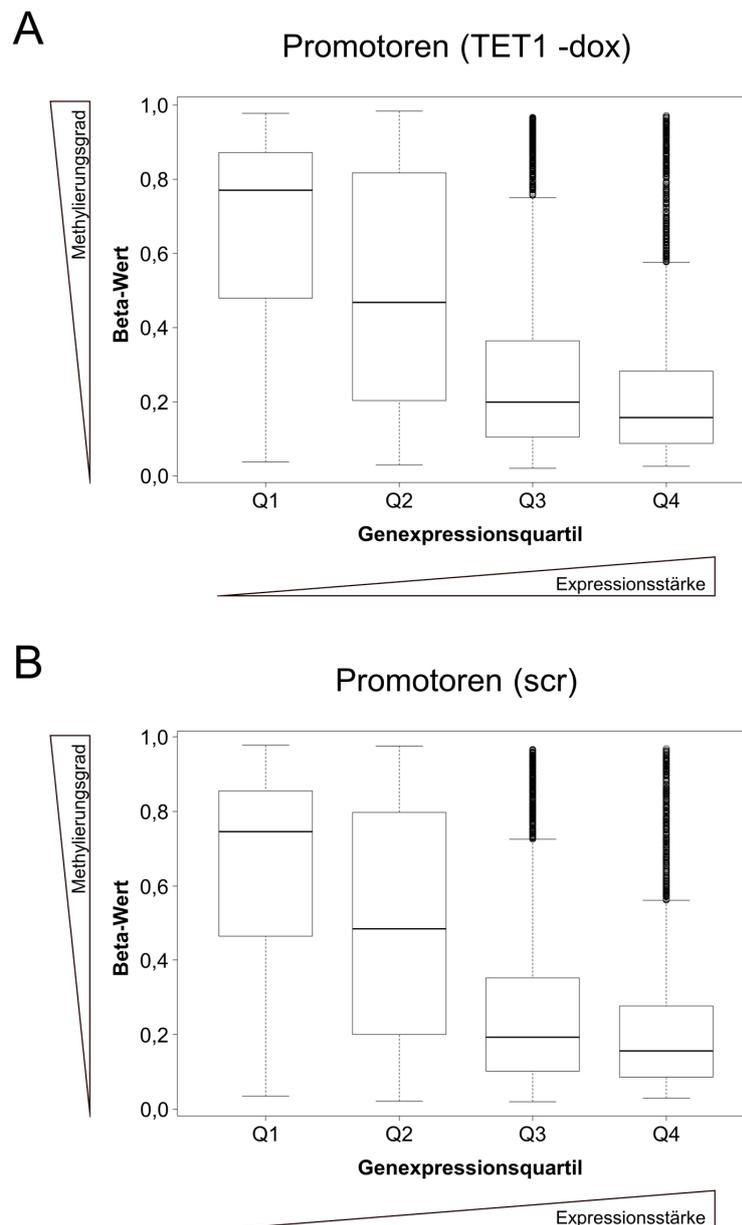


Abbildung 17: Negative Korrelation von Promotormethylierung und Expressionsstärke. Die Microarray-Genexpressionsdaten der Kontrollzelllinien aus den Studien zur Überexpression von *TET1* (TET1 -dox; **A**) und zum Knockdown der *TET*-Transkripte (scr; **B**) wurden in Expressionsquartile stratifiziert und mit den zugehörigen Methylierungs-Beta-Werten aus den BeadChip-Experimenten verglichen. Die Länge der Boxen entspricht dem Interquartilsabstand; die Antennen markieren maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand. Ausreißer sind eingezeichnet. Q1 – Q4: Genexpressionsquartile, aufsteigend nach Expressionsstärke. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Ein Abgleich der bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren, die eine Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression oder eine Methylierungszunahme nach dem *TET*-Knockdown zeigten, mit den zugehörigen Expressionsquartilen offenbarte jedoch eine Diskrepanz von Methylierungsgrad und Expressionsstärke: Während die *TET1*-Überexpression bevorzugt zu einer

Demethylierung von Promotoren mit mittleren endogenen Methylierungsleveln führte (Abbildung 16A), zeigte diese Analyse, dass Gene jeden Expressionsniveaus betroffen waren, und ließ die vermehrte Anreicherung schwach exprimierter Gene erkennen (Abbildung 18A). Der *TET*-Knockdown führte bevorzugt zu einer Methylierungszunahme bereits stark methylierter Promotoren (Abbildung 16D). Ähnlich der *TET1*-Überexpression waren Gene aller Expressionsstärken betroffen, doch es zeigte sich hier die verstärkte Anreicherung moderat exprimierter Gene (Abbildung 18B). Nach dem Filtern auf identische Gensymbole zwischen den Methylierungs- und Expressionsdatensätzen haben die gemeinsamen und letztlich analysierten Promotoren ihr charakteristisches, vom endogenen Methylierungsgrad abhängiges Verteilungsmuster beibehalten (Abbildung A7).

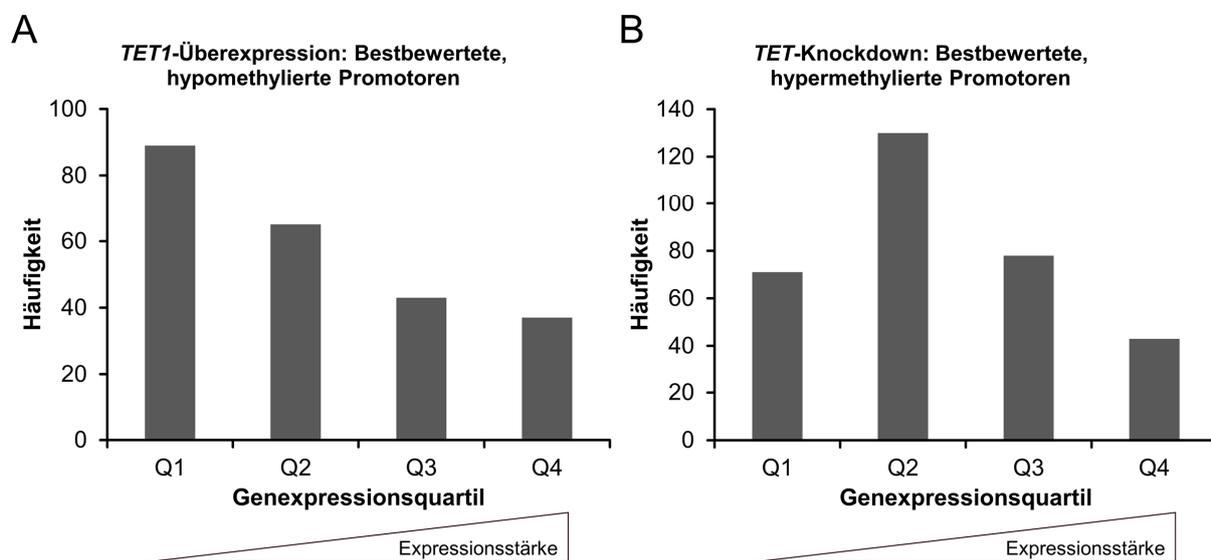


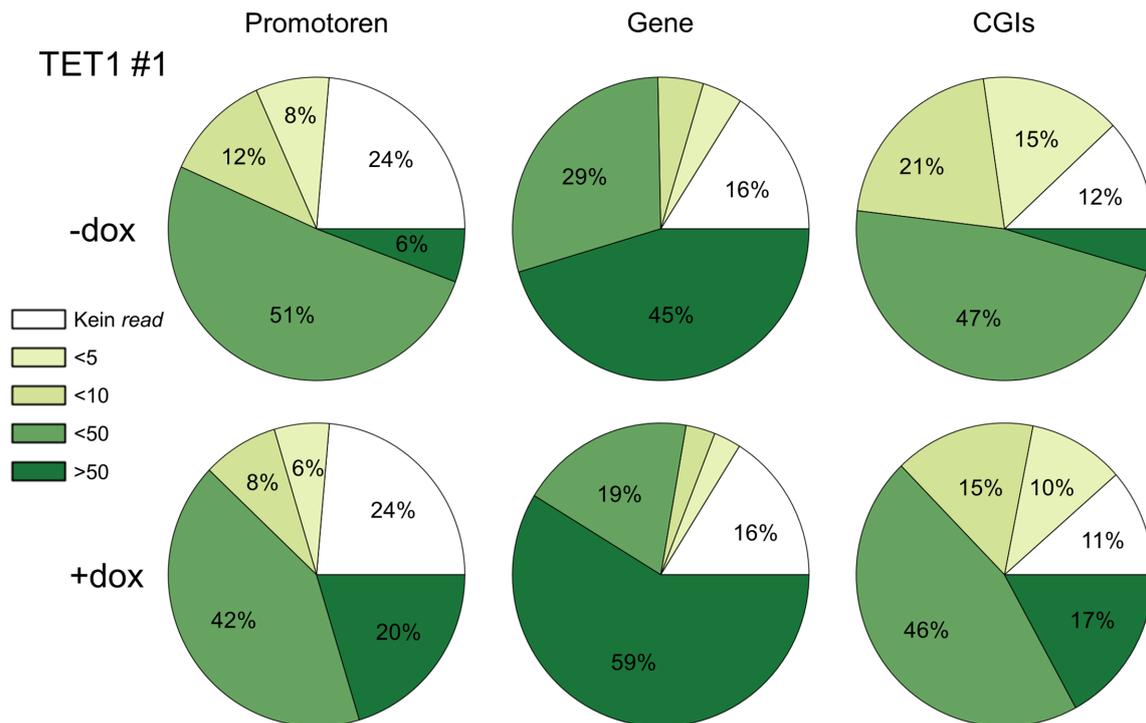
Abbildung 18: *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown veränderten Promotormethylierungslevel in Abhängigkeit der Expressionsstärke. Die bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren die eine Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression (A) bzw. eine Methylierungszunahme nach dem *TET*-Knockdown zeigten (B) sind den Expressionsquartilen der jeweiligen Kontrollzelllinien zugeordnet. Vergleiche von Methylierungsgrad und Genexpression wurden auf der Basis identischer Gensymbol-Annotationen in beiden Datensätzen durchgeführt (*TET1*-Überexpression: $n = 234$, *TET*-Knockdown: $n = 322$). Q1 – Q4: Genexpressionsquartile, aufsteigend nach Expressionsstärke. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

4.3.5 Detaillierte Analyse der 5hmC-Level nach *TET1*-Überexpression

Da die DNA *dot blot*-Analyse einen deutlichen Zuwachs des globalen 5hmC-Levels nach *TET1*-Überexpression anzeigte, wurden im Folgenden die Verteilungsmuster dieser DNA-Modifikation näher analysiert. Zu diesem Zweck wurde die DNA von zwei der drei zuvor analysierten Paaren von *TET1*-Überexpressions- und Kontrollzellen (T-REx-293-TET1 #1 und 3) von der Firma Zymo Research mithilfe des *Reduced Representation 5-Hydroxymethylcytosine Profiling* (RRHP) untersucht. Diese Methode ermöglicht die basengenaue 5hmC-Detektion an *MspI*-Schnittstellen des Genoms. Sie basiert auf der *Next-Generation-Sequenzier*technologie und erlaubt durch Vergleiche von *read*-Zahlen die Quantifizierung von 5hmC-Levels und den Vergleich verschiedener Proben (Pettersen *et al.*, 2014). Die Sequenzierung führte zu 22-25 Millionen zuordenbarer 5hmC-*reads* in nicht-induzierten Kontrollzellen und 40-41 Millionen *reads* in *TET1*-überexprimierenden Zellen und bestätigte somit die erhöhten 5hmC-Level des DNA *dot blot*-Experiments.

Detailliertere Analysen zeigten, dass 76-78% der Promotoren, 84-85% der Gene und 88-90% der CGIs mit zumindest einer 5hmC-Position sowohl in den *TET1*-überexprimierenden Zellen als auch in den Kontrollzellen versehen waren (Abbildung 19). Nach Induktion der *TET1*-Überexpression zeigte sich eine deutliche Zunahme 5hmC-reicher (d.h. >50 *reads*) Promotoren, Gene und CGIs in beiden Replikatzelllinien. In den Kreisdiagrammen ist dies an der Zunahme der dunkelgrünen Fläche in induzierten Zellen (+dox) zu erkennen.

A



B

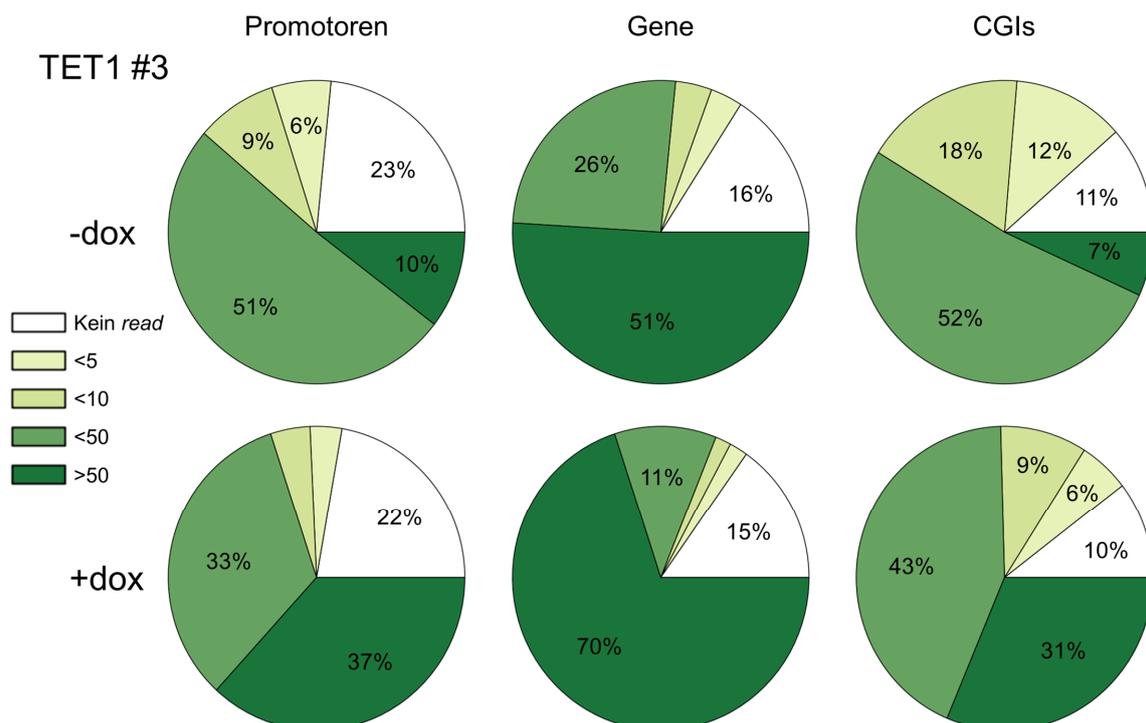


Abbildung 19: Die TET1-Überexpression führte zu einer starken Zunahme 5hmC-reicher Promotoren, Gene und CGIs. Verteilungen der 5hmC-DNA-Modifikation basierend auf den *read*-Zahlen der RRHP-Analyse für die TET1 #1 (A) und TET1 #3 (B) T-REx-293-TET1-Zelllinien im nicht-induzierten (-dox) und induzierten Zustand (+dox). Die Annotationen basieren hier auf RefSeq- und CGI-Listen der UCSC-Website (genome.ucsc.edu), Promotoren sind definiert als die Regionen 1 kb *upstream* bis 1 kb *downstream* von Transkriptionsstartstellen. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Für alle weiteren Analysen wurden die Sequenzierergebnisse der Replik-Zelllinien gemittelt und ein Schwellenwert von fünf *reads* für eine positive 5hmC-Identifikation eingeführt, der laut Zymo Research eine robuste 5hmC-Detektion ermöglicht. Unter Anwendung dieses Schwellenwerts ergaben sich nach *TET1*-Überexpression ein dreifacher Zuwachs 5hmC-positiver CpG-Dinukleotide und ein sechsfacher Zuwachs an gesamten 5hmC-*reads*. Zudem wurden die Regionsdefinitionen der RRHP-Daten angepasst, sodass dieselben Promotor-, Gen- und CGI-Definitionen für die RRHP- und HumanMethylation450 BeadChip-Datensätze verwendet wurden. An den meisten der 778.322 identifizierten 5hmC-Positionen zeigten *TET1*-überexprimierende Zellen eine deutliche Erhöhung der 5hmC-Level (Abbildung 20). Diese Zunahme umfasste Promotoren, Gene und CGIs, ebenso wie nicht-CGIs und intergenische Bereiche (Abbildung A8).

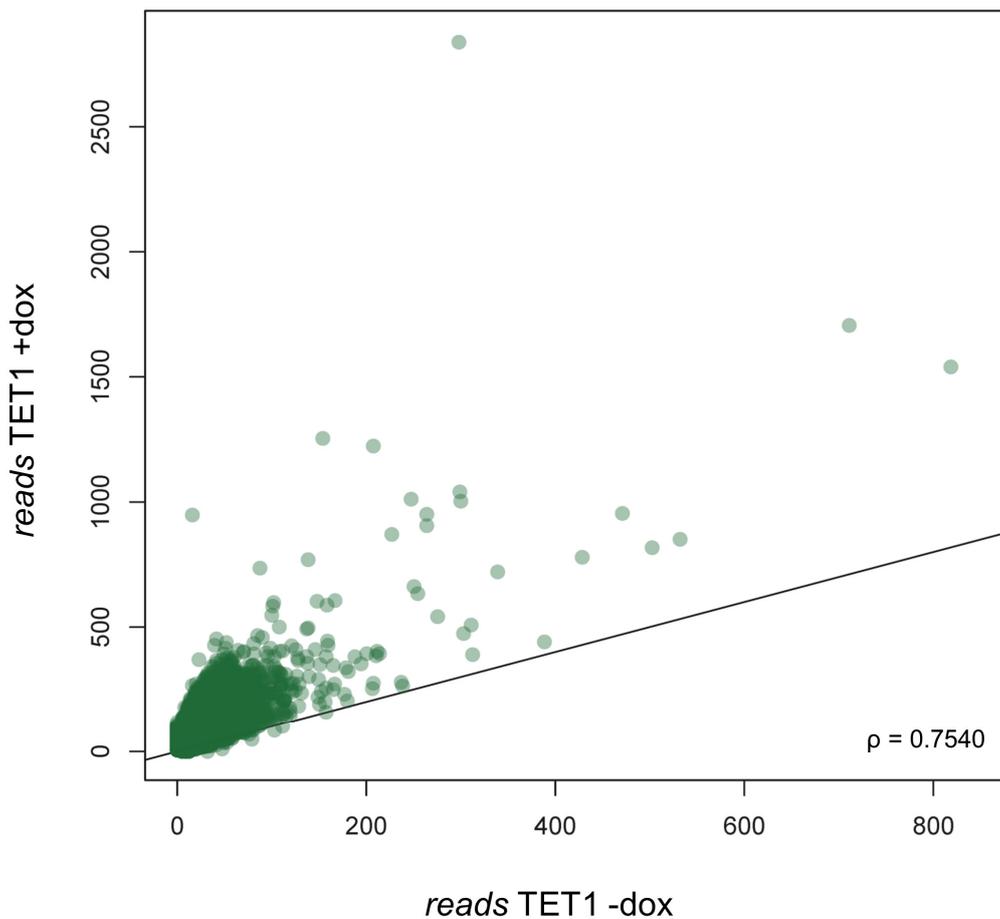
Alle 5hmC-Positionen ($n = 778.332$)

Abbildung 20: Die *TET1*-Überexpression führte zu erhöhten 5hmC-Leveln an nahezu allen identifizierten 5hmC-Positionen. Zwei T-REx-293-*TET1*-Zelllinien im induzierten und nicht-induzierten Zustand wurden mittels RRHP analysiert. Aufgetragen sind gemittelte *read*-Zahlen die das 5hmC-Vorkommen in *TET1*-überexprimierenden (*TET1* +dox) und Kontrollzellen (*TET1* -dox) widerspiegeln. CpG-Dinukleotide mit weniger als fünf *reads* wurden als Null erachtet. Die schwarze Linie verdeutlicht eine perfekte, positive Korrelation. ρ = Pearson-Korrelationskoeffizient. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Im Zuge dieser umfassenden Erhöhung der 5hmC-Level veränderte sich die relative Verteilung auf die verschiedenen genetischen Elemente und Regionen nur geringfügig zwischen *TET1*-überexprimierenden Zellen und nicht-induzierten Kontrollen (Abbildung 21). Die Überexpression von *TET1* führte folglich zu einer genomweiten Oxidation von 5mC, jedoch ohne einen erkennbaren Verteilungsschwerpunkt.

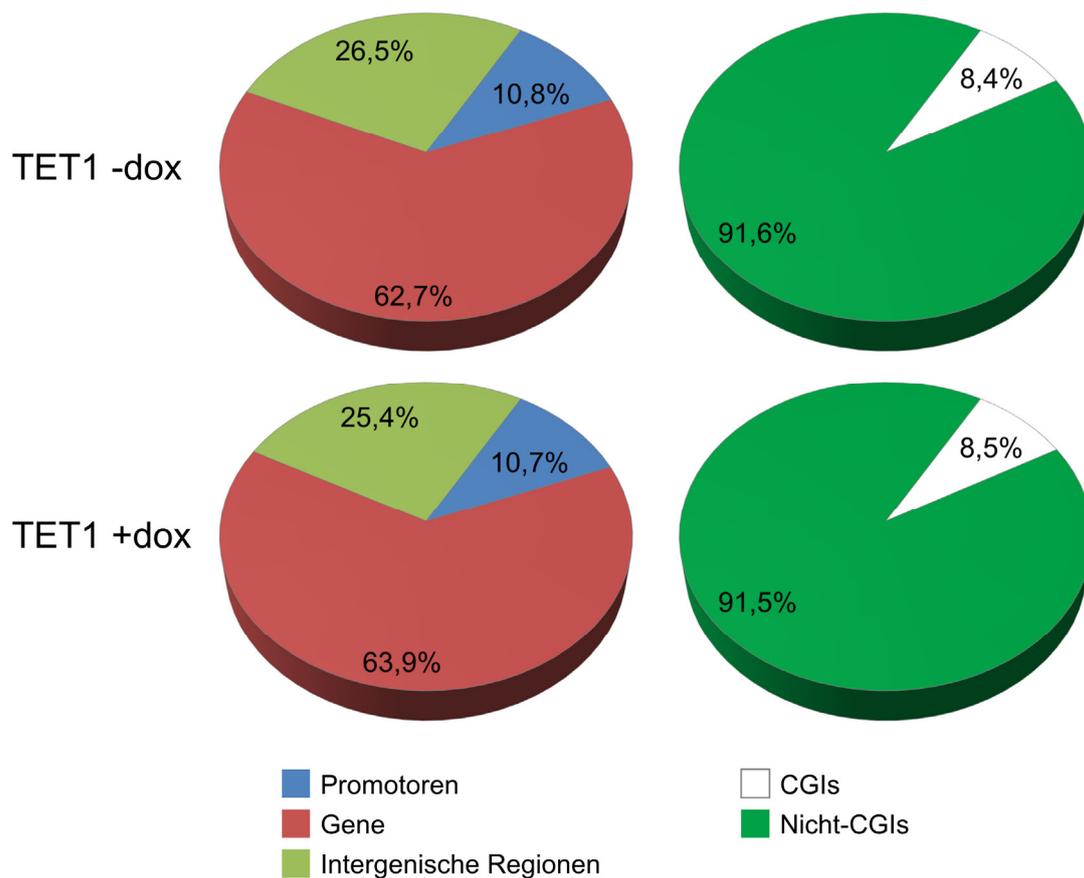


Abbildung 21: Nach *TET1*-Überexpression blieb die relative 5hmC-Verteilung auf verschiedene genetische Elemente nahezu unverändert. Dargestellt ist die relative Verteilung der 5hmC-reads auf verschiedene genetische Elemente und Regionen in Kontroll- (*TET1* -dox) und *TET1*-überexprimierenden Zellen (*TET1* +dox). Nur CpG-Dinukleotide mit mindestens fünf 5hmC-reads wurden gewertet. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Um zu überprüfen, ob die *TET1*-vermittelte Oxidation mit dem Vorkommen endogener 5hmC-Level assoziiert ist, wurde der *fold change*, also die x-fache Veränderung der 5hmC-read-Zahlen, die sich nach *TET1*-Überexpression ergab, mit den endogenen 5hmC-read-Zahlen der Kontrollzellen verglichen. Es zeigte sich ein Trend, dass diejenigen CpG-Dinukleotide, die bereits vor der Überexpression in einigen Zellen hydroxymethyliert waren (endogene 5hmC-read-Klasse 15-20), am anfälligsten für eine Hydroxymethylierung nach *TET1*-Überexpression waren (Abbildung 22). Die erhöhte Suszeptibilität dieser *read*-Klasse fand sich in allen analysierten genomischen Regionen, wie Promotoren, Genen, CGIs und intergenischen Bereichen (Abbildung A9).

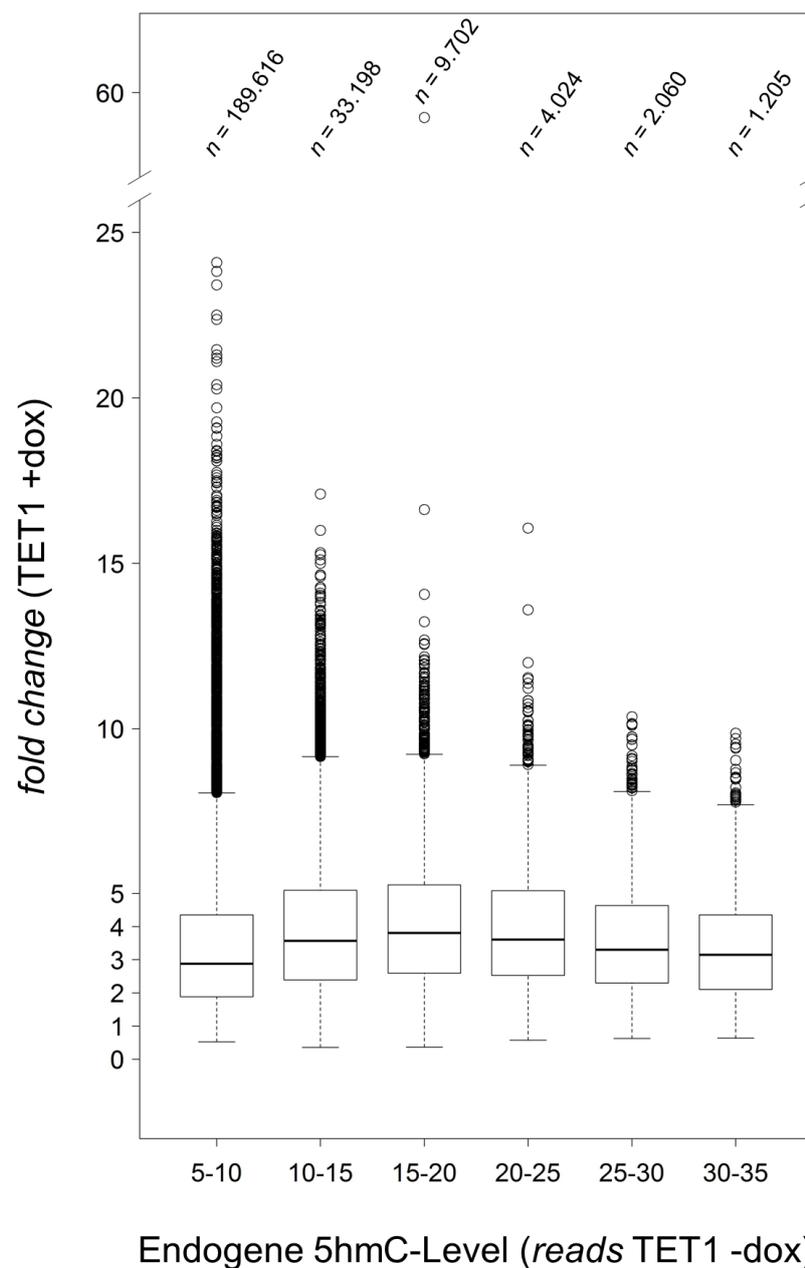
Alle 5hmC-Positionen ($n = 239.805$)

Abbildung 22: Die TET1-vermittelte 5mC-Oxidation war mit endogenen 5hmC-Leveln assoziiert. Die endogenen 5hmC-read-Level in Kontrollzellen (*reads* TET1 -dox) sind in 5er-Klassen gegen den *fold change* der 5hmC-Level aufgetragen, der sich nach TET1-Überexpression ergab (TET1 +dox). CpG-Dinukleotide mit einem endogenen 5hmC-Level von 15-20 *reads* zeigten den stärksten Zuwachs. Nur CpG-Dinukleotide mit mindestens fünf 5hmC-reads in Kontroll- bzw. TET1-überexprimierenden Zellen wurden gewertet. Die Länge der Boxen entspricht dem Interquartilsabstand; die Antennen markieren maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand. Ausreißer sind eingezeichnet. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

4.3.6 Charakterisierung der nach *TET1*-Überexpression hyperhydroxymethylierten Promotoren

Der Großteil aller mittels RRHP identifizierten 5hmC-Positionen (525.937) entstand *de novo* nach *TET1*-Überexpression, überschritt also erst nach der Überexpression den festgelegten Schwellenwert von fünf *reads* für eine positive 5hmC-Detektion. Auch wenn die meisten dieser Positionen (89-93%) weniger als 20 *reads* in den analysierten genetischen Elementen zeigten, fanden sich doch in allen Elementen Stellen mit hohem 5hmC-Vorkommen, die mehr als 20 und bis zu 119 *reads* aufwiesen. Da die Berechnung eines *fold change*-Zuwachses für *de novo*-5hmC-Positionen nicht möglich ist, wurden zwei separate Listen der 500 am stärksten hyperhydroxymethylierten Genpromotoren erstellt: Eine Liste basierte auf der größten *de novo*-5hmC-Zunahme gemessen an absoluten *read*-Zahlen (Tabelle E18), wohingegen die andere Liste diejenigen Promotoren umfasste, die bereits endogenes 5hmC besaßen und den größten *fold change*-Zuwachs nach *TET1*-Überexpression zeigten (Tabelle E19).

Statistische Überrepräsentationstests erbrachten keinen Hinweis auf über- bzw. unterrepräsentierte biologische Prozesse unter den am stärksten nach *fold change* 5hmC-gewinnenden Promotoren. Mit den Promotoren, die den größten *de novo*-5hmC-Zuwachs zeigten, wurden jedoch vermehrt Gene identifiziert, die der grundlegenden Ontologie-Kategorie „Biologische Regulation“ angehören (Tabelle A9).

Ein Abgleich der beiden Kandidatenlisten mit dem Grad der Genexpression zeigte, dass zwar Gene jeden Expressionsniveaus eine *de novo*- oder *fold change*-5hmC-Zunahme aufwiesen, es jedoch eine verstärkte Anreicherung von mittelstark exprimierten Genen in beiden Promotorlisten gab (Abbildung 23A). Genomweit wurden 9.900 CpG-Dinukleotide identifiziert, die nach *TET1*-Überexpression kein zuverlässig detektierbares 5hmC-Vorkommen mehr zeigten. Diese CpG-Dinukleotide waren über alle genetischen Elemente verteilt und wiesen vor der Überexpression niedrige 5hmC-Level knapp oberhalb des Schwellenwertes auf, sodass sie keine bevorzugten *TET1*-Ziele zu sein scheinen. Insgesamt wurden 257 Promotoren mit einem solchen vollständigen 5hmC-Verlust gefunden. Diese Promotoren und die 500 Promotoren, die nach *TET1*-Überexpression den niedrigsten 5hmC-*fold change* aufwiesen (im Mittel eine 1,03-fache Zunahme an 5hmC), wurden ebenfalls mit ihren entsprechenden Genexpressionsleveln verglichen (Abbildung 23B). Im Gegensatz zu

den am stärksten 5hmC-gewinnenden Promotoren, die ein großes Expressionspektrum und die besondere Anreicherung mittelstark exprimierter Gene aufwiesen, fanden sich hier nur sehr wenige nicht bzw. schwach exprimierte Gene. Zudem wurden mit ansteigender Expressionsstärke zunehmend mehr Promotoren identifiziert.

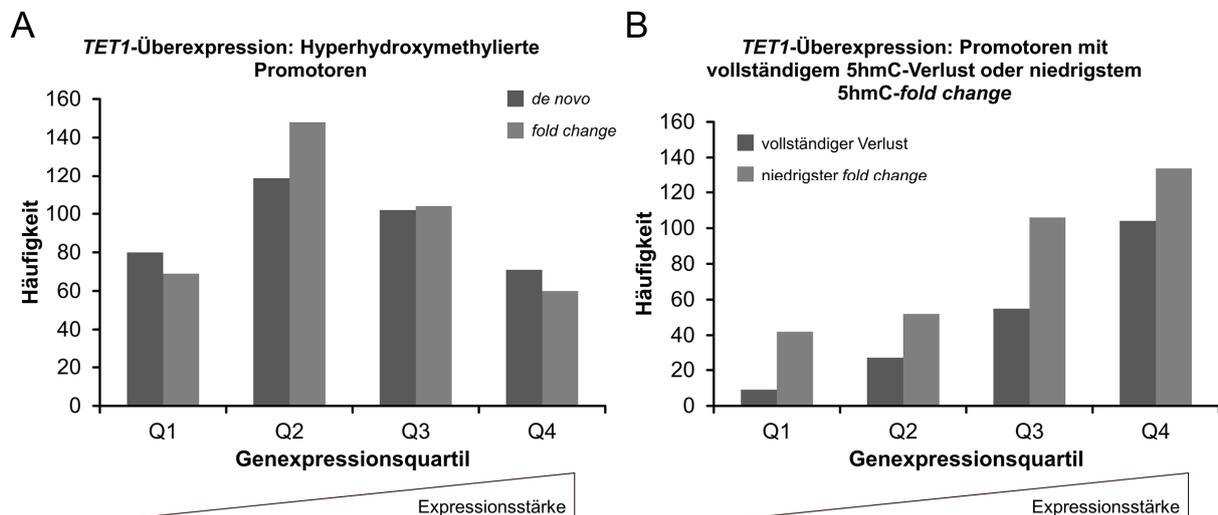


Abbildung 23: TET1 oxidierte Promotor-5mC in Abhängigkeit der Expressionsstärke. Die Promotoren mit der höchsten *de novo*- oder *fold change*-Zunahme an 5hmC (**A**) und diejenigen Promotoren mit einem vollständigen Verlust bzw. dem niedrigsten 5hmC-*fold change* nach *TET1*-Überexpression (**B**) sind den Expressionsquartilen der nicht-induzierten Kontrollzellen zugeordnet. Vergleiche von 5hmC-Methylierungsgrad und Genexpression wurden auf der Basis identischer Gensymbol-Annotationen in beiden Datensätzen durchgeführt (stärkste *de novo*-Zunahme: $n = 372$, stärkste *fold change*-Zunahme: $n = 381$; vollständiger Verlust: $n = 195$, niedrigster *fold change*: $n = 334$). Q1 – Q4: Genexpressionsquartile, aufsteigend nach Expressionsstärke. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

In einem weiteren Vergleich wurden die Promotoren mit der stärksten 5hmC-Zunahme auf ihre basalen, endogenen Methylierungslevel hin untersucht. Während sowohl die nach *de novo*- als auch die nach *fold change*-Berechnung am stärksten 5hmC-gewinnenden Promotoren alle Methylierungsklassen umfassten, gab es eine deutliche Anreicherung stark methylierter Promotoren (Beta-Wert 0,8-1; Abbildung 24A). Im Gegensatz dazu waren die Promotoren mit vollständigem 5hmC-Verlust bzw. niedrigstem *fold change* durch die starke Anreicherung unmethylierter und schwach methylierter Promotoren gekennzeichnet (Beta-Wert 0-0,2; Abbildung 24B).

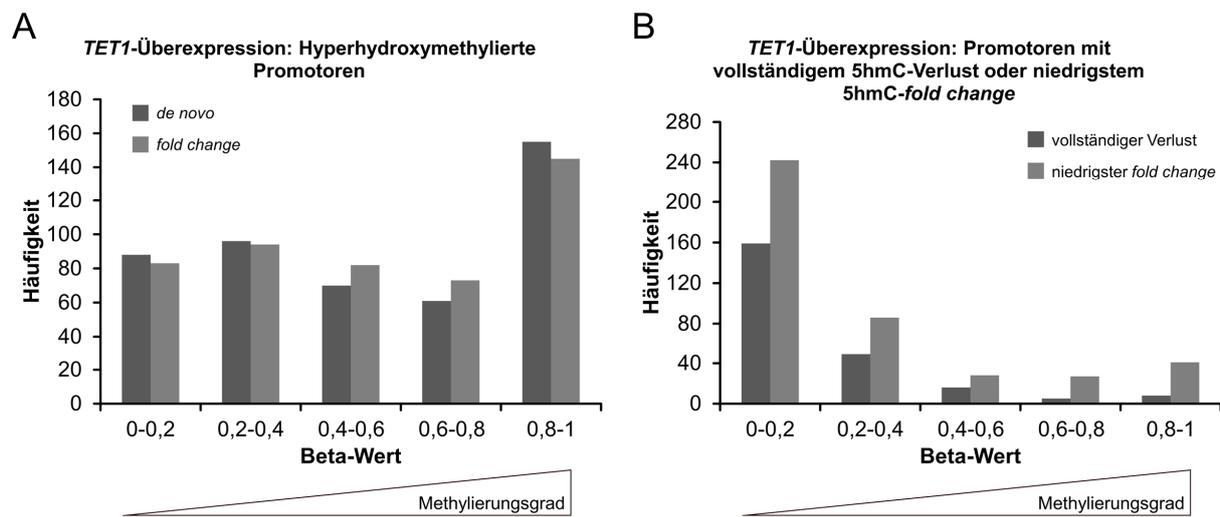


Abbildung 24: TET1 oxidierte 5mC vorzugsweise an stark methylierten Promotoren. Die Promotoren mit der höchsten *de novo*- oder *fold change*-Zunahme an 5hmC (**A**) und diejenigen Promotoren mit einem vollständigen Verlust bzw. dem niedrigsten 5hmC-*fold change* nach *TET1*-Überexpression (**B**) sind ihren basalen, endogenen Methylierungsleveln zugeordnet. Die Methylierungswerte stammen aus den HumanMethylation450 BeadChip-Experimenten. Vergleiche von 5hmC-Methylierungsgrad und den BeadChip-Daten erfolgte auf der Basis identischer Gensymbol-Annotationen in beiden Datensätzen (stärkste *de novo*-Zunahme: $n = 470$, stärkste *fold change*-Zunahme: $n = 477$; vollständiger Verlust: $n = 237$, niedrigster *fold change*: $n = 424$). Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

4.3.7 Vergleich differentiell methylierter und hydroxymethylierter Promotoren nach *TET1*-Überexpression

Da 5hmC als ein Zwischenprodukt der TET-induzierten DNA-Demethylierung gilt, wurde überprüft, in welchem Umfang die 500 bestbewerteten, größtenteils hypomethylierten Promotoren, die nach *TET1*-Überexpression identifiziert worden waren, ebenfalls unter den am stärksten an 5hmC gewinnenden Promotoren vertreten waren. Von den 500 mittels BeadChip-Analysen identifizierten differentiell methylierten Promotoren waren 18 unter den am stärksten (*de novo*- oder *fold change*-) 5hmC-gewinnenden Promotoren (Tabelle E20). Es zeigten jedoch nur 14 der 18 Promotoren eine Methylierungsabnahme bei gleichzeitiger Zunahme von 5hmC.

4.3.8 Suche nach Sequenzmotiven

Um nach angereicherten Sequenzmotiven in der Nähe (± 200 bp) der 5.000 CpG-Dinukleotide zu suchen, die die stärkste Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression oder die stärkste Methylierungszunahme nach Knockdown der *TET*-Transkripte aufwiesen, wurden von Dr. Nicholas Wagner (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) Motiv-Suchen mit der HOMER-Software (Heinz *et al.*, 2010) durchgeführt. In gleicher Weise wurden zudem die 5.000 am stärksten an 5hmC gewinnenden CpG-Dinukleotide analysiert. Um auch in den Datenbanken nicht erfasste Motive finden zu können, wurden *de novo*-Motiv-Suchen durchgeführt, wobei stets der ähnlichste bekannte Treffer mit ausgegeben wird.

Nach *TET1*-Überexpression zeigten zwei Motive eine signifikante Anreicherung, wohingegen nach *TET*-Knockdown 27 Motive in der Nähe der veränderten CpG-Dinukleotide überrepräsentiert waren (Tabelle A10). Übereinstimmende Motive zwischen beiden Experimenten konnten jedoch nicht identifiziert werden. Der Sequenzkontext der am stärksten *de novo*-5hmC-gewinnenden Dinukleotide war angereichert für sieben Motive. Das bestbewertete Sequenzmotiv wurde ebenfalls als bester Treffer unter den nach *fold change* an 5hmC gewinnenden CpG-Dinukleotiden ausgegeben. Hier konnten zudem 16 weitere Motive identifiziert werden.

5. Diskussion

5.1 Die reduzierten SST- und SSTR4-Level im Neokortex von Alzheimer-Patienten waren nicht mit einer Hypermethylierung des entsprechenden Promotors assoziiert

Reduzierte Somatostatin- und Somatostatin-Rezeptor-Level im Gehirn sind ein charakteristisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit (Burgos-Ramos *et al.*, 2008) und können mit der verstärkten Ablagerung von Amyloid- β -Peptiden in Verbindung gebracht werden (Saito *et al.*, 2005). Nach der Amyloid-Hypothese werden diese Ablagerungen als die primäre treibende Kraft der Alzheimer-Erkrankung angesehen (Hardy & Selkoe, 2002). Bestandteil der vorliegenden Dissertation ist eine Studie, die klären sollte, ob die Reduktion des Peptidhormons Somatostatin (SST) und des im Kortex von Alzheimer-Patienten am stärksten reduzierten Rezeptor-Subtyps 4 (SSTR4) (Kumar, 2005) auf eine Hypermethylierung der entsprechenden Promotorregion zurückzuführen sein könnte. In unmittelbarer Nähe der Transkriptionsstartstellen beider Gene befinden sich CGIs von deren Methylierungszustand eine regulatorische Funktion ausgehen könnte.

Die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte von Bisulfit-behandelter DNA zeigte insgesamt sehr niedrige Methylierungslevel im *SST*-CGI und die Abwesenheit von DNA-Methylierung im *SSTR4*-CGI in allen Proben der grauen und weißen Substanz des GFS und GTM der fünf Alzheimer-Patienten und fünf nicht-dementen Normalpersonen. Nur in der 5'-*shore*-Region des *SST*-CGIs lag generell ein höheres Maß an DNA-Methylierung vor. In keiner der Analysen zeigten jedoch Patienten Anzeichen von erhöhten Methylierungsleveln im Vergleich zu den Normalpersonen. Mit fünf untersuchten Alzheimer-Patienten bzw. nicht-dementen Normalpersonen ist der Umfang der Studie eher gering. Da es jedoch keinen Trend einer differentiellen Methylierung zwischen beiden Gruppen gab, erscheint die Untersuchung einer größeren Kohorte von Patienten und Normalpersonen als wenig erfolgversprechend. Die direkte Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten Bisulfit-behandelter DNA ermöglichte eine grobe Bestimmung der DNA-Methylierungslevel, wobei der Methylierungsgrad in den Elektropherogrammen stets gemittelt über alle in der PCR erzeugten DNA-Moleküle dargestellt wird. Auch wenn mit dieser Methode größere Methylierungsunterschiede zwischen Alzheimer-Patienten und nicht-dementen

Normalpersonen ausgeschlossen werden konnten, wurde exemplarisch die *SST*-Promotorregion der grauen Substanz des GFS hochauflösend mithilfe von *Next-Generation-Sequencing*-Technologie untersucht. So sollte einerseits ein Teil der bisherigen Ergebnisse mit präziseren Methylierungswerten einer weiteren Methode untermauert und andererseits die Detektion einzelner, hypermethylierter Allele ermöglicht werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der direkten Bisulfit-Sequenzierung zeigte die *shore*-Region einen höheren Methylierungsgrad (14-20%) als die CGI-Region (3,5-5,9%), wobei es jedoch keine größeren Unterschiede zwischen Patienten und Normalpersonen gab. Der sehr niedrige Methylierungsgrad der CGI-Region passt zu der allgemeinen Auffassung, nach der die Mehrheit aller CGIs in Vertebraten als unmethyliert gilt (Deaton & Bird, 2011). Als technische Kontrolle der hochauflösenden Methylierungsanalyse wurde DNA aus Sperma eines gesunden Spenders analysiert, da von CGIs dieses Gewebes die Tendenz einer geringeren Methylierung bekannt war (Weber *et al.*, 2007; Zeschnigk *et al.*, 2009). Auch wenn es keine Anhaltspunkte für den zu erwartenden Methylierungsgrad gab, wurde als weiteres und leicht zugängliches Gewebe die DNA aus Blut eines gesunden Spenders untersucht. Entsprechend der Vermutung zeigte die Spermaprobe in der CGI- aber auch in der *shore*-Region deutlich niedrigere Methylierungslevel als die Gehirnproben der Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen. Den höchsten Methylierungsgrad der beiden Regionen wies dagegen die Blutprobe auf. Die verwendete *Next-Generation-Sequencing*-Methode verifizierte die zuvor erhaltenen Ergebnisse und zeigte zudem gewebespezifische Methylierungsunterschiede der *shore*- und CGI-Regionen des *SST*-Promoters.

Das Altern wird generell als der bedeutendste Risikofaktor einer Alzheimer-Erkrankung angesehen (Ferri *et al.*, 2005; Querfurth & LaFerla, 2010). Im Gehirn von Menschen und Primaten kann während des normalen Alterungsprozesses eine Abnahme der *SST*-mRNA-Expression beobachtet werden (Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2004). Verschiedene Studien untersuchten die Rolle von *SST* als Tumorsuppressorgen und legen den Mechanismus der DNA-Methylierung zur Kontrolle der *SST*-Expression nahe (Jackson *et al.*, 2011; Misawa *et al.*, 2015; Ricketts *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Methylierungsmuster können sich im Laufe des Alterungsprozesses verändern (Fraga & Esteller, 2007; Jung & Pfeifer, 2015), und es besteht die Möglichkeit, dass eine altersabhängige Methylierungszunahme des *SST*-Promoters für den Expressionsrückgang

verantwortlich sein könnte. Nach der von Hama & Saido aufgestellten Hypothese initiiert eine altersbedingte Reduktion der SST-Level bereits zu einem frühen Zeitpunkt die allmähliche Erhöhung der A β -Level im Gehirn und setzt einen sich selbst verstärkenden Kreislauf in Gang, der zum Ausbruch der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit führt (Hama & Saido, 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigte die hochauflösende Analyse des CGIs im SST-Promotor einen Trend zu einer Methylierungszunahme mit steigendem Alter (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,08$) (Grosser *et al.*, 2014a). Solch ein Trend steht im Einklang mit einer Studie, die im menschlichen Neokortex mit steigendem Alter eine lineare Methylierungszunahme in den Promoter-CGIs verschiedener Gene beobachten konnte (Siegmond *et al.*, 2007). In dieser Studie war die Erhöhung der DNA-Methylierung typischerweise mit der Verringerung der entsprechenden mRNA-Level assoziiert. Auch eine weitere Studie berichtete von einer hoch signifikanten, CGI-abhängigen Korrelation von steigendem Alter und erhöhten Methylierungswerten im Gehirn (Christensen *et al.*, 2009). Erst kürzlich konnte eine größer angelegte Studie im menschlichen Gehirn die signifikante Methylierungszunahme der SST-Promotorregion mit steigendem Alter nachweisen (McKinney *et al.*, 2015). Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wurden in dieser Studie neben einer insgesamt größeren Personenzahl auch deutlich jüngere Personen untersucht. Die Autoren konnten zudem zeigen, dass der Methylierungsgrad der SST-Promotorregion negativ mit der mRNA-Expression korreliert.

Aufgrund der Hinweise auf einen Zusammenhang von Alter und DNA-Methylierung wurden die zwei nicht-dementen Normalpersonen stark abweichenden Alters von der Berechnung des Methylierungsdurchschnitts der SST-Promotorregion ausgeschlossen. Mit 4,8% durchschnittlicher Methylierung in der Gruppe der Alzheimer-Patienten und 4,5% in der Gruppe der Normalpersonen passenden Alters zeigte das SST-CGI nur geringfügige Methylierungsunterschiede. Der Methylierungsgrad der 5'-*shore*-Region beider Gruppen lag zwar höher, aber ebenfalls auf einem sehr ähnlichen Niveau. Folglich konnten nur geringfügige, nach Evaluation nicht-signifikante Abweichungen im Methylierungsgrad der SST-Promotorregion von Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen identifiziert werden (Grosser *et al.*, 2014a).

Um zu überprüfen, ob nur eine Subpopulation an Zellen Methylierungsveränderungen trug, wurde die graphische Darstellung der Sequenzierergebnisse genauer untersucht. Die Proben zeigten keine hypermethylierten oder vollständig methylierten Allele, sondern ein verstreutes

Methylierungsmuster. Ein solches Muster ist ein starker Hinweis auf stochastische Methylierungsereignisse und unterstützt nicht die Idee der krankheitsrelevanten Hypermethylierung des *SST*-Promotors in einer Subpopulation an Zellen der untersuchten Gehirnregion.

Die untersuchten Gewebeproben wurden von nicht-dementen bzw. an Alzheimer erkrankten Spendern beiderlei Geschlechts nach verschiedenen Zeitspannen *post mortem* entnommen. Zudem wiesen die Spender Unterschiede im pH der Zerebrospinalflüssigkeit auf, was oftmals als ein Maß zur Bewertung der Todesumstände verwendet wird. Keiner der Parameter zeigte eine Korrelation mit dem Methylierungsgrad des *SST*-CGIs bestimmt in der hochauflösenden Methylierungsanalyse der grauen Substanz des GFS. Dies zeigt, dass weder das Geschlecht, noch eine Zeitspanne vom Tod bis zur Probenkonservierung von bis zu 7:20 h oder ein pH der Zerebrospinalflüssigkeit bis hinunter zu 6,31 einen Einfluss auf den Methylierungsgrad der Gewebeproben besaßen.

Zusammenfassend unterstützen die ähnlichen Methylierungslevel der *SST*- und *SSTR4*-Promotorregionen in verschiedenen Gehirnregionen von Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen nicht die Hypothese eines Zusammenhangs von DNA-Hypermethylierung und den reduzierten *SST*- und *SSTR4*-Leveln einer Alzheimer-Erkrankung. Die hochauflösende Methylierungsanalyse des *SST*-CGIs und der flankierenden 5'-*shore*-Region unterstützt des Weiteren nicht die Idee, dass eine Subpopulation an Zellen in der grauen Substanz des GFS eine Alzheimer-spezifische Hypermethylierung aufweist.

5.2 Das transgene Mausmodell zeigte trotz ubiquitärer Überexpression von *Dnmt1s*-mRNA keine erhöhten Proteinlevel

Im Allgemeinen zeigen Krebszellen eine globale Hypomethylierung ihres Genoms bei gleichzeitiger regionaler Hypermethylierung der Promotoren bestimmter Tumorsuppressorgene (Esteller, 2008; Kulis & Esteller, 2010; You & Jones, 2012). Ein charakteristisches Merkmal vieler Krebsarten ist die Überexpression von DNMT1 (Etoh *et al.*, 2004; Kanai *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2005) und es gibt direkte Hinweise auf eine *de novo*-Methylierungsaktivität von DNMT1 in Krebszellen (Jair *et al.*, 2006). Zusätzlich zu der etablierten Rolle als Erhaltungs-DNA-Methyltransferase weisen auch verschiedene Studien mit *DNMT1*-überexprimierenden Zellen auf eine *de novo*-Methylierungsaktivität hin (Vertino *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1993). Um die Auswirkungen einer ubiquitären Überexpression der somatischen Form von *Dnmt1*, *Dnmt1s*, *in vivo* untersuchen zu können ist von Dr. Nicholas Wagner (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) während seiner Promotion ein entsprechendes Mausmodell generiert worden (Wagner, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die weitere Charakterisierung dieses Modells, von dem drei unabhängige Mauslinien fortgeführt worden waren.

Alle Nachkommen der transgenen Linien waren lebensfähig und wiesen keine offensichtlichen Anzeichen einer Krankheit oder einen ansonsten auffälligen Phänotyp auf. Ein Vergleich der totalen *Dnmt1*-Expression von transgenen Mäusen der Linie 4 und Wildtypgeschwistertieren zeigte die ubiquitäre Überexpression von *Dnmt1*-mRNA, wobei es starke, gewebeabhängige Expressionsunterschiede gab. Diese reichten von einer 1,6-fachen Überexpression im Thymus und Knochenmark bis hin zu einer 55-fachen Erhöhung im Herz und einer 229-fachen Erhöhung im Skelettmuskel. Die *Dnmt1*-Überexpression der transgenen Linie 2 fiel generell niedriger aus, folgte jedoch einem ähnlichen, gewebeabhängigen Muster. Die Linie 3 war die schwächste der transgenen Linien, ließ ein vergleichbares Muster aber noch erahnen.

Die gewebeabhängigen Expressionsunterschiede waren vermutlich zu einem Großteil auf die differentielle Aktivität des transgenen CAG-Promotors in verschiedenen Geweben zurückzuführen. So konnten auch Ishikawa und Herschman die größte Aktivität eines mittels CAG-Promotor exprimierten Luciferase-Transgens im murinen Herz und Skelettmuskel detektieren (Ishikawa & Herschman, 2011). Da für jedes Gewebe ein Vergleich der Expression in transgenen Tieren relativ zu

Wildtypgeschwistertieren durchgeführt wurde, beeinflussten auch die endogenen *Dnmt1*-Ausgangslevel direkt den Faktor der Expressionszunahme: bei konstanter CAG-Promotoraktivität würden Gewebe mit einer niedrigeren endogenen *Dnmt1*-Expression eine stärkere Zunahme zeigen als Gewebe mit einem höheren Ausgangslevel.

Die Expressionsunterschiede zwischen den Mauslinien waren vermutlich primär ein Resultat der zufälligen Integrationsstellen der Transgenkonstrukte nach den Pronucleusinjektionen. In Abhängigkeit von der Umgebung können sich für eine Integrationsstelle verschiedene expressionsfördernde oder reprimierende Positionseffekte ergeben, die sich auf die globale Transgenexpression oder auch nur auf die Expression in bestimmten Geweben auswirken können (Gama Sosa *et al.*, 2010). Beispiele für mögliche Positionseffekte wären die Integration des Transgens in inaktives Heterochromatin oder die Effekte endogener Enhancer (Gama Sosa *et al.*, 2010).

Obwohl die transgene mRNA in allen untersuchten Geweben exprimiert wurde und mittels qRT-PCR die ubiquitäre *Dnmt1*-Überexpression gezeigt werden konnte, gelang es nicht, spezifisch das RGS-His-markierte Dnmt1s-Protein oder eine Erhöhung der totalen Dnmt1-Proteinlevel nachzuweisen. Untersucht wurden verschiedene Gewebe adulter transgener Mäuse aller Linien sowie murine embryonale Fibroblasten, wobei verschiedene *western blot*-Techniken, -Materialien und Antikörper zum Einsatz kamen¹.

Ähnlich dem hier verwendeten RGS-His-*Dnmt1s*-Transgen erschufen Choi und Kollegen ein *DNMT1*-Transgen, das ebenfalls eine N-terminale Protein-Markierung trug (Choi *et al.*, 2011). Die stabile Integration ins Genom von HEK293T-Zellen führte zu einer etwa 10-fachen Überexpression von *DNMT1*-mRNA, aber nur zu einer 1,5-fachen Erhöhung der totalen *DNMT1*-Proteinlevel im Vergleich zu Kontrollzellen. Die *Dnmt1*-mRNA-Expression im Mausmodell war gewebeabhängig bis zu 229-fach erhöht, jedoch konnten mittels semi-quantitativer *western blot*-Untersuchungen keine signifikant erhöhten totalen Dnmt1-Proteinlevel festgestellt werden. Zusammengefasst weisen beide Studien darauf hin, dass sich erhöhte

¹ Im Rahmen der ersten Charakterisierung der transgenen Linien konnte auch damals trotz hohen Aufwands das RGS-His-markierte Dnmt1s-Protein nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigten zwei von drei untersuchten Geweben transgener Tiere reproduzierbar eine Erhöhung der totalen Dnmt1-Proteinlevel (Wagner, 2010). Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte von dem weiter fortgeführten Rückkreuzen der Mäuse in einen reinen C57BL/6-Hintergrund herrühren.

DNMT1/Dnmt1-mRNA-Level nicht im gleichen Maß auf Proteinebene widerspiegeln. Allerdings konnten Choi und Kollegen spezifisch das mit einer Markierung versehene transgene Protein detektieren (Choi *et al.*, 2011), was in der vorliegenden Arbeit nicht gelang.

Eine mögliche Ursache könnte das zweite ATG-Startcodon nahe dem N-Terminus darstellen (Abbildung 12A, unteres Konstrukt). Dieses Startcodon stammt aus der *Dnmt1*-cDNA-Sequenz und könnte theoretisch zu einer Überexpression von Protein ohne N-terminalen RGS-His-*tag* führen (QIAGEN, 2002). Jedoch erscheint die Überexpression einer größeren Menge nicht-markierten transgenen Proteins unwahrscheinlich, da dieses zweite Startcodon eine deutlich schwächere Kozak-Sequenz besitzt (Kozak, 1987) und zudem keine Erhöhung der totalen *Dnmt1*-Level in transgenen Mäusen oder embryonalen Fibroblasten festgestellt werden konnte.

Eine Möglichkeit für das Ausbleiben einer Überexpression von *Dnmt1s*-Protein könnte die beeinträchtigte Translation der transgenen mRNA sein. Im Vergleich zum endogenen *Dnmt1s*-Transkript fehlten dem Transgen die komplette endogene 5'-UTR und alle Introns; zudem war nur ein Teil der endogenen 3'-UTR vorhanden. Der CAG-Promotor (Niwa *et al.*, 1991) fügte die 5'-UTR und das erste Intron des β -*Aktin*-Gens aus dem Huhn dem *Dnmt1s*-Transgen hinzu - eine expressionsfördernde Maßnahme (Miyazaki *et al.*, 1989), die mit Erfolg für die Expression von cDNA-basierten Transgenen in Mausmodellen verwendet wird (Ikawa *et al.*, 1995; Kamei *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2002).

Im nicht-aktivierten, unrekombinierten Zustand exprimierten die Mäuse EGFP-Markerprotein, nach Rekombination jedoch kein *Dnmt1s*-Protein. Da beide Transgene vom selben Promotor angetrieben wurden, sich aber in ihren Kozak-Sequenzen unterschieden, wurde die Translationseffizienz dieser Sequenzen mithilfe von Luciferase-Reporter-Gen-Assays untersucht. Die Verwendung der *Dnmt1s*-Kozak-Sequenz führte zu einer 30% niedrigeren Luciferase-Aktivität verglichen mit der *EGFP*-Kozak-Sequenz, die aus der optimalen Kozak-Konsensussequenz bestand (Kozak, 1987). Ungeachtet der verwendeten Kozak-Sequenzen führte das Hinzufügen der RGS-His-*tag*-Sequenz des transgenen Mausmodells zu einer Verringerung der Luciferase-Aktivität um 70%. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein N-terminaler His-*tag* keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des Luciferase-Enzyms besitzt (Min & Steghens, 1999). Daher erscheint es wahrscheinlicher, dass sich die Sequenz des RGS-His-*tags* störend auf die Proteintranslation auswirkt. Ungeklärt bleibt, warum sich in Kombination mit der *tag*-

Sequenz kein zusätzlicher Effekt der unterschiedlich effizienten Kozak-Sequenzen ergab. Trotz der 70%igen Reduktion der Translationseffizienz würde man im Mausmodell zumindest in Geweben mit hoher mRNA-Überexpression dennoch die spezifische Detektion RGS-His-markierten Dnmt1s-Proteins und die Detektion erhöhter totaler Dnmt1-Proteinlevel erwarten.

Rutledge und Kollegen konnten zeigen, dass die 3'-UTR der *Dnmt1*-mRNA einen konservierten Block funktionaler Elemente enthält, der wichtig für eine effiziente Translation ist. Unter Verwendung der *Dnmt1*-3'-UTR führten sie Luciferase-Reportergen-Assays in HeLa-Zellen durch, die nach Entfernen dieses Blocks einen etwa 60%igen Expressionsrückgang im Vergleich zur wildtypischen 3'-UTR anzeigten (Rutledge *et al.*, 2014). Die transgenen Zellen von Choi und Kollegen wiesen nur eine geringe DNMT1-Proteinüberexpression auf, aber die Publikation enthält keine Informationen über die 3'-UTR des Transgens (Choi *et al.*, 2011). Das *Dnmt1s*-Transgen des hier untersuchten Mausmodells besitzt eine unvollständige endogene 3'-UTR. Der von Rutledge und Kollegen beschriebene konservierte Block funktionaler Elemente fehlte, was zu einer reduzierten Translation des *Dnmt1s*-Transkripts beigetragen haben könnte.

Eine verringerte Translation könnte auch durch microRNAs verursacht worden sein, die typischerweise an die 3'-UTR von Ziel-mRNAs binden und die Translation der Transkripte reprimieren oder ihre Degradation induzieren (Filipowicz *et al.*, 2008). Interessanterweise identifizierten zwei Studien microRNAs, deren Überexpression zwar zu einer Reduzierung der DNMT1-Proteinlevel führte, die mRNA-Level aber nicht beeinflusste (Pan *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011).

Die Stabilität des DNMT1-Proteins wird strikt durch ein komplexes, in sich verschaltetes Netzwerk verschiedener posttranslationaler Modifikationen kontrolliert (Denis *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2011). Daher bestünde eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben der Proteinüberexpression im Mausmodell in der raschen Degradation neu synthetisierten Proteins aufgrund einer stringenten Kontrolle der zellulären Dnmt1-Proteinlevel. Da die posttranslationalen Modifikationen an etlichen Positionen verschiedener Domänen des Dnmt1-Proteins in einem komplexen Wechselspiel stattfinden (Agoston *et al.*, 2005; Denis *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2011), könnte auch vom RGS-His-*tag* des transgenen Proteins ein störender Einfluss ausgegangen sein. Vor der Durchführung der Pronucleusinjektionen und Generierung transgener Linien, ist das konditionelle Transgenkonstrukt in NIH-3T3-Mausfibroblasten erfolgreich auf seine Funktion getestet worden: im unrekombinierten Zustand exprimierten die

Zellen EGFP-Markerprotein und nach Co-Transfektion des Transgenkonstrukts mit einem *Cre*-Rekombinase-Plasmid konnte RGS-His-markiertes Dnmt1s-Protein mit *western blot*-Untersuchungen nachgewiesen werden (Wagner, 2010). Der Funktionstest erfolgte über transiente Transfektionen, die zu einer hohen Kopienzahl führten und so möglicherweise zu einer Kompensation von verringerter Translation oder gezielter Proteindegradation führten. Im transgenen Mausmodell dagegen verblieben nach Rekombination und Aktivierung der *Dnmt1s*-Überexpression nur eine oder aber sehr wenige Kopien im Genom (Lakso *et al.*, 1992; Orban *et al.*, 1992), so dass eine ineffiziente Translation oder Proteindegradation zu sehr wenigem oder gar keinem transgenen Protein geführt haben könnte.

Das Ausbleiben einer detektierbaren Proteinüberexpression passt zur Lebensfähigkeit der transgenen Tiere und dem Fehlen von Anzeichen pathologischer Veränderungen. Das Überleben der transgenen Tiere steht somit nicht im Widerspruch zu der beschriebenen embryonalen Letalität einer *Dnmt1*-Überexpression (Biniszkiewicz *et al.*, 2002), auch wenn die genannte Studie offen ließ, welche der drei Dnmt1-Isoformen verantwortlich war(en).

Zusammenfassend wurden drei unabhängige transgene Mauslinien zur ubiquitären Überexpression von *Dnmt1s* untersucht. Trotz eines erfolgreichen Vorabtests des Transgenkonstrukts in Mausfibroblasten zeigten transgene Tiere aller Linien eine gewebeabhängige Überexpression von *Dnmt1*-mRNA, jedoch keine erhöhten Dnmt1-Proteinlevel. Es bleibt offen, ob dies auf spezifische Eigenschaften des Transgens oder auf eine stringente Kontrolle der Dnmt1-Level *in vivo* zurückzuführen ist (Grosser *et al.*, 2014b).

5.3 Beeinflussung der DNA-Methylierung von HEK293-Zellen durch veränderte TET-Dioxygenase-Level

Seit der Entdeckung der Initiierung von aktiver und passiver DNA-Demethylierung durch die Familie der TET-Dioxygenasen lag ein großer Forschungsschwerpunkt auf der Rolle dieser Enzyme während der Zelldifferenzierung und Zellreprogrammierung (Delatte *et al.*, 2014). Obwohl sie in verschiedenem Ausmaß auch in somatischen Zellen exprimiert werden (Ito *et al.*, 2010; Lorsbach *et al.*, 2003; Szwagierczak *et al.*, 2010), untersuchten bisher nur wenige Studien die Funktion der TET-Enzyme in bereits differenzierten Zellen. Um mehr über die TET-Enzyme außerhalb von Entwicklungsprozessen zu erfahren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen einer *TET1*-Überexpression sowie eines simultanen Knockdowns von *TET1*, *TET2* und *TET3* auf die DNA-Methylierung und Genexpression von HEK293-Zellen untersucht (Grosser *et al.*, 2015).

5.3.1 Methylierungsveränderungen in Abhängigkeit von endogenen Methylierungsleveln

Die verwendeten HEK293-Zellen besaßen niedrige endogene *TET*-Level, wobei in etwa gleichem Maße *TET1* und *TET3* exprimiert wurden, während die *TET2*-Expression deutlich niedriger ausfiel. Eine 2,5-fache Überexpression von *TET1*-mRNA führte zu einer starken Zunahme der globalen 5hmC-Signale im DNA *dot blot*. Die Zunahme an TET1-Protein fiel dabei höher aus als die Zunahme auf mRNA-Ebene und deutet auf eine unterschiedliche Stabilität von Protein und mRNA hin. Im Gegensatz zur *TET1*-Überexpression führte der simultane Knockdown der drei *TET*-Transkripte bei einer durchschnittlichen Reduzierung der Transkriptmengen von etwa 60% zu deutlich verringerten globalen 5hmC-Leveln. Gemeinsam betrachtet verdeutlichen beide Versuche einen Einfluss moderat veränderter TET-Dioxygenase-Level auf den genomischen 5hmC-Gehalt von HEK293-Zellen.

Mithilfe von Infinium HumanMethylation450 BeadChips wurden die Zellen im genomweiten Maßstab auf Methylierungsveränderungen hin untersucht. So sollte geklärt werden, ob einerseits die *TET1*-Überexpression durch 5mC-Oxidation zu DNA-Hypomethylierung und andererseits der *TET*-Knockdown aufgrund verringerter Oxidationsaktivität zu DNA-Hypermethylierung führte. Da diese Array-Analysen auf der Bisulfitbehandlung von DNA aufbauen, verkomplizieren die Oxidationsprodukte

der TET-Enzyme die Datenauswertung: Nach Bisulfitbehandlung gibt 5hmC das gleiche Signal wie 5mC, wohingegen 5fC und 5caC nicht von unmodifiziertem Cytosin unterschieden werden können (Booth *et al.*, 2012; He *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010). Für die Analyse der *TET1*-Überexpression bedeutete dies, dass ein Anstieg an 5hmC nicht spezifisch gemessen werden konnte. Auch wenn die Oxidation von 5mC zu 5hmC nicht erfasst wurde, bleibt anzumerken, dass dies ein wichtiger epigenetischer Prozess ist, da 5hmC entlang von Genen angereichert ist und positiv mit der Genexpression vieler Säugerzelltypen korreliert (Pastor *et al.*, 2013). Mit den BeadChips konnten jedoch Demethylierungsereignisse erfasst werden, da „unmethylierte“ Signale mit größerer Wahrscheinlichkeit auf tatsächlich unmodifizierte Cytosine zurückzuführen waren als auf 5fC/5caC, deren Vorkommen typischerweise ein bis mehrere Größenordnungen niedriger ist als das von 5hmC (Delatte *et al.*, 2014). Es wurde berichtet, dass die transiente Überexpression der katalytischen Tet2-Domäne in HEK293-Zellen neben erhöhten 5hmC-Leveln auch eine Zunahme an 5fC/5caC verursachte (Ito *et al.*, 2011). Obwohl das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellsystem die moderate Überexpression des vollständigen TET1-Enzyms aufwies, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass erhöhte 5fC/5caC-Level existierten, die bis zu einem gewissen Grad mit der Interpretation der Demethylierungsdaten interferieren. Ein verzeichneter Methylierungsanstieg dagegen ging eindeutig auf erhöhte 5mC-Level zurück. Obwohl sie auf der Bisulfitbehandlung von DNA beruhen, konnten die Infinium HumanMethylation450 BeadChips folglich angemessen eine Hypo- bzw. Hypermethylierung basierend auf der 5mC-DNA-Modifikation untersuchen.

Die Auswertung der Methylierungsdaten zeigte, dass die *TET1*-Überexpression zu einer leichten DNA-Hypomethylierung von Promotoren, Genen und CGIs führte. Da die Experimente in sich teilenden Zellen durchgeführt worden waren, bleibt offen, ob es sich dabei um aktive und/oder passive, replikationsabhängige Demethylierungsereignisse handelte. Während die hypomethylierten Regionen eine große Spannbreite an endogenen Methylierungsleveln aufwiesen, zeigte sich eine größere Präferenz für die Hypomethylierung derjenigen Promotoren und Gene, die mittelstarke Ausgangsmethylierungslevel besaßen. Im Gegensatz dazu wurden vorzugsweise bereits schwach methylierte CGIs weiter demethyliert. In einem ähnlichen Experiment untersuchten Jin und Kollegen die Konsequenzen einer *TET1*-Überexpression in HEK293T-Zellen und konnten nur in CGIs mit niedrigen endogenen Methylierungsleveln eine signifikante DNA-Demethylierung von CpG-

Dinukleotiden beobachten (Jin *et al.*, 2014). Die Demethylierung betraf also die Kategorie von CGIs, in der die bevorzugte *TET1*-induzierte Demethylierung in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde. Im Gegensatz zu der DREAM-Methode, die Jin und Kollegen anwandten, untersuchten die HumanMethylation450 BeadChips etwa die zehnfache Anzahl an CpG-Positionen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Methylierungsdaten auf der Regionsebene ausgewertet, wobei meist der Methylierungsgrad mehrerer CpG-Dinukleotide in die Berechnung des Methylierungsdurchschnitts einer Region einfluss. Die Identifizierung der bestbewerteten, differentiell methylierten Regionen erfolgte anschließend mithilfe der RnBeads-Software über eine Methode verschiedener kombinierter Ränge. Dies war möglicherweise ein sensitiverer Ansatz zur Detektion geringer Methylierungsunterschiede.

Die Beobachtung, dass die Methylierungsveränderungen gering ausfielen und die *TET1*-Überexpression keine massive, genomweite Demethylierung induzierte, könnte mit der CXXC-Domäne des *TET1*-Enzyms zusammenhängen. Es wurde gezeigt, dass diese Domäne die Bindung des *TET1*-Proteins an CpG-reiche, hypomethylierte Regionen begünstigt, wo das Substrat 5mC rar ist und folglich die Möglichkeiten der 5mC-Oxidation und DNA-Demethylierung begrenzt sind (Jin *et al.*, 2014). Dieser Zustand trifft auf die meisten CGIs zu (Illingworth & Bird, 2009), und somit auf die Regionen, in denen in der vorliegenden Arbeit sowie in der Studie von Jin und Kollegen *TET1*-induzierte Demethylierung festgestellt werden konnte. Im Falle der Überexpression konnte überschüssiges *TET1*-Protein womöglich auch an Zielregionen niedrigerer Priorität binden, wie stärker methylierte oder weniger CpG-reiche Regionen, und dort Demethylierung initiieren. Dies würde erklären, warum in der vorliegenden Studie eine Demethylierung auch in CGIs mit mittleren und hohen Methylierungsleveln sowie in Genen detektiert werden konnte.

Im Genom von Vertebraten ist die Mehrheit aller Promotoren mit CGIs assoziiert (Saxonov *et al.*, 2006). Von den 1.000 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren zeigten jedoch nur 28% eine solche Assoziation. Promotorregionen wurden als die Regionen 1,5 kb *upstream* und 0,5 kb *downstream* von Transkriptionsstartstellen definiert, sodass vorhandene CGIs den Methylierungsgrad von Promotorregionen beeinflussten, aber flankierende Regionen der CGIs ebenfalls zur Berechnung des Promotormethylierungsdurchschnitts beigetragen haben. Diese Umstände könnten erklären, warum die *TET1*-Überexpression einerseits die Demethylierung bevorzugt an niedrig methylierten

CGIs, andererseits aber an Promotoren mit mittleren endogenen Methylierungsleveln induzierte.

Der *TET*-Knockdown führte zu einer leichten Hypermethylierung von Promotoren, Genen und CGIs. Ähnlich der *TET1*-Überexpression zeigten die betroffenen Regionen eine große Spannbreite endogener Methylierungslevel, doch gab es hier eine klare Präferenz für die Hypermethylierung von Regionen mit einem höheren endogenen Methylierungsgrad. Diese deutliche Präferenz galt übereinstimmend für Promotoren, Gene und CGIs, und im Gegensatz zur Überexpression von *TET1* waren 52% der Promotoren mit einem CGI assoziiert. Auch wenn nicht spezifisch zwischen Funktionen der einzelnen TET-Enzyme unterschieden werden kann, so deutet dies auf eine generelle Rolle hinsichtlich der Vermeidung einer Methylierungszunahme von ohnehin schon stark methylierten Regionen hin.

Obwohl die endogenen *TET*-Level in HEK293-Zellen niedrig ausfallen und *TET1* nur moderat überexprimiert worden war, verursachten sowohl die *TET1*-Überexpression als auch der *TET*-Knockdown Methylierungsveränderungen. Dabei gab es unter den bestbewerteten Zielregionen jedoch nur eine geringe Anzahl an reziproken Veränderungen. Dies mag daran liegen, dass die Auswirkungen der Überexpression eines *TET*-Transkripts mit denen eines Knockdowns aller drei bekannten *TET*-Transkripte verglichen wurden.

Statistische Tests zur Identifizierung von über- bzw. unterrepräsentierten biologischen Prozessen in den Kandidatenlisten differentiell methylierter Promotoren, Gene und CGIs zeigten zwar die Anreicherung einiger Genontologie-Kategorien in der Gruppe der differentiell methylierten Promotoren und Gene, ließen aber keinen übergeordneten Zusammenhang erkennen. Die assoziierten Gene differentiell methylierter CGIs wiesen dagegen keine signifikant veränderten Kategorien auf. Ebenfalls zeigten Tests mit den reziprok in ihrer Methylierung veränderten Promotoren, Genen und CGIs keine über- bzw. unterrepräsentierten biologischen Prozesse.

5.3.2 Promotormethylierungsunabhängiger Einfluss auf die Genexpression

Sowohl nach der *TET1*-Überexpression als auch nach dem Knockdown der *TET*-Transkripte wurden geringfügig hoch- und herunterregulierte Gene identifiziert. Mit nur zwei deregulierten Genen (*ARRDC4*, *HOXA13*) war die Überschneidung

zwischen beiden Experimenten jedoch sehr gering und statistische Tests lieferten keinen Hinweis auf über- bzw. unterrepräsentierte biologische Prozesse. Die Expressionsveränderungen beider Studien waren nicht mit den veränderten Methylierungsleveln der bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren assoziiert. Möglicherweise fanden expressionsrelevante Methylierungsveränderungen an Promotor-distalen regulatorischen Regionen statt. In solchen Regionen beschrieb eine Studie ein hohes 5hmC-Vorkommen und deutete dies als Hinweis auf aktive Demethylierungsprozesse (Yu *et al.*, 2012). Doch auch das Netzwerk von TET-interagierenden Proteinen könnte zu der Diskrepanz zwischen Methylierungs- und Genexpressionsveränderungen, sowie zu der begrenzten Anzahl reziproker Effekte beigetragen haben. Seit der Entdeckung der TET-Enzyme wurden zahlreiche TET-interagierende Faktoren mit Einfluss auf die Genexpression identifiziert. Dies umfasst Transkriptionsfaktoren/nukleäre Rezeptoren und Chromatin-assoziierte Proteine, die eine Funktion in der transkriptionellen Aktivierung oder Repression ausüben können (Delatte *et al.*, 2014). Ein starker TET-Interaktionspartner ist das Enzym OGT (O-linked N-acetylglucosamine transferase) (Chen *et al.*, 2013; Deplus *et al.*, 2013; Vella *et al.*, 2013). Abhängig vom Zellkontext scheinen alle TET-Enzyme mit OGT zu interagieren, was zum vorgeschlagenen Modell der „hydroxymethylierungsunabhängigen“ Genaktivierung führte (Delatte *et al.*, 2014). Demnach assoziieren die TET-Enzyme mit OGT an Promotoren und verstärken die Glycosyltransferaseaktivität des OGT-Enzyms auf das Histon H2B und den SET1/COMPASS-Komplex, was letzten Endes zu H3K4-Trimethylierung und transkriptioneller Aktivierung führt (Chen *et al.*, 2013; Delatte *et al.*, 2014; Deplus *et al.*, 2013; Vella *et al.*, 2013). Da es viele Zielproteine des OGT-Enzyms gibt, werden zudem weitere Konsequenzen der TET-vermittelten OGT-Rekrutierung angenommen (Pastor *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass TET1 und TET3, nicht jedoch TET2, den SIN3A-Co-Repressor-Komplex zu ihren genomischen Zielregionen führen können, um auf diese Weise transkriptionelle Repression zu vermitteln (Deplus *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2011). Der transkriptionelle Regulator PRDM14 interagiert mit TET1 und TET2, verstärkt deren Rekrutierung zu Zielregionen und fördert die aktive DNA-Demethylierung in embryonalen Stammzellen (Okashita *et al.*, 2014). Ein weiteres Beispiel differentieller TET-Interaktion ist der transkriptionelle Repressor REST, der spezifisch mit der neuronalen Isoform von TET3 interagiert, nicht jedoch mit anderen TET3- bzw. TET1- oder TET2-Proteinen (Perera *et al.*, 2015).

Im Gegensatz zu der moderaten *TET1*-Überexpression in der vorliegenden Arbeit wurde *TET1* in der Studie von Jin und Kollegen äußerst stark überexprimiert und führte ebenfalls zur Identifizierung von hoch- und herunterregulierten Genen (Jin et al., 2014). Der simultane Knockdown der drei *TET*-Transkripte wurde in der vorliegenden Arbeit mittels siRNA für 96h in HEK293-Zellen durchgeführt, die ein geringes Maß endogener *TET*-Expression aufweisen. Daher wurden hier die unmittelbaren Auswirkungen weiter reduzierter *TET*-Level untersucht. Jin und Kollegen führten dagegen eine shRNA-vermittelte Langzeitrepression von *TET1* in HEK293T-Zellen durch und identifizierten ebenfalls hoch- und herunterregulierte Gene. Da in der Publikation keine vollständigen Angaben der nach *TET1*-Überexpression bzw. *TET1*-Knockdown deregulierten Gene enthalten sind, konnte kein Vergleich mit der vorliegenden Arbeit vollzogen werden.

Die Autoren zeigten, dass die Expressionsveränderungen nach Überexpression oder Knockdown von *TET1* unabhängig von der Demethylierungsaktivität des *TET1*-Enzyms waren. Die transkriptionelle Hoch- und Herunterregulierung und die fehlende Assoziation mit differentiell methylierten Promotoren in den Überexpressions- bzw. Knockdown-Experimenten der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit diesen Forschungsergebnissen.

5.3.3 Methylierungsveränderungen an Promotoren in Abhängigkeit von der Expressionsstärke

In der vorliegenden Studie veränderten die *TET1*-Überexpression und der *TET*-Knockdown die Promotormethylierungslevel mit unterschiedlicher Präferenz in Abhängigkeit vom endogenen Methylierungsgrad. Um zu untersuchen, ob der Grad der endogenen Promotormethylierung mit dem Expressionsniveau der betroffenen Gene korrelierte, wurden die bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren, die eine Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression oder eine Methylierungszunahme nach dem *TET*-Knockdown zeigten, mit den zugehörigen Expressionsquartilen der Kontrollzellen verglichen. Während Promotormethylierung und Genexpression generell negativ korrelierten, offenbarte dieser Vergleich die Diskrepanz von bevorzugtem endogenen Methylierungsgrad und Expressionsstärke: Obwohl die *TET1*-Überexpression vorzugsweise zu einer Demethylierung von Promotoren mit mittleren endogenen Methylierungsleveln führte, zeigte diese

Analyse eine Anreicherung schwach exprimierter Gene. Im Gegensatz dazu führte der *TET*-Knockdown vorrangig zu einer Methylierungszunahme bereits stark methylierter Promotoren, aber zu einer Überrepräsentation moderat exprimierter Gene.

5.3.4 Globale 5mC-Oxidation nach *TET1*-Überexpression

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis des DNA *dot blot*-Experiments, zeigte auch die basengenaue 5hmC-Detektion mittels RRHP eine starke Zunahme der genomischen 5hmC-Level nach *TET1*-Überexpression. Dennoch blieb die relative Verteilung dieser DNA-Modifikation auf Promotoren, Gene, intergenische Regionen und CGIs bzw. Nicht-CGIs nahezu unverändert. Dies weist darauf hin, dass die *TET1*-Überexpression die genomweite 5mC-Oxidation ohne einen erkennbaren Verteilungsschwerpunkt induzierte.

Der Vergleich der 5hmC-Level vor und nach *TET1*-Überexpression offenbarte einen Trend unterschiedlicher Suszeptibilität für eine Oxidation durch TET1, der abhängig vom endogenen 5hmC-Vorkommen war und in allen untersuchten genomischen Elementen und Regionen vorlag. CpG-Dinukleotide, die bereits vor der Überexpression in einer bestimmten Menge an Zellen hydroxymethyliert waren, zeigten eine höhere *fold change*-5hmC-Zunahme als diejenigen Dinukleotide, die entweder in einer geringeren oder aber in einer größeren Anzahl an Zellen hydroxymethyliert waren. Dies könnte einerseits durch einen Sättigungszustand erklärt werden: CpG-Dinukleotide, die vor *TET1*-Überexpression in vielen Zellen hydroxymethyliert waren, konnten zwar in weiteren Zellen hydroxymethyliert werden. Doch je größer die Anzahl an hydroxymethylierten Ausgangszellen war, desto schwieriger war es, eine höhere *fold change*-Zunahme zu erreichen, wenn ab einem gewissen Punkt die Verfügbarkeit des Substrats 5mC limitierend wirken konnte. Andererseits besaßen CpG-Dinukleotide, die in nur wenigen Zellen hydroxymethyliert waren, möglicherweise eine ungünstige Sequenzumgebung oder waren aus anderen Gründen nicht gut zugänglich für eine Oxidation durch TET1. Zudem könnte auch hier eine begrenzte Substratverfügbarkeit eine höhere *fold change*-Zunahme verhindert haben.

5.3.5 Charakterisierung der nach *TET1*-Überexpression hyperhydroxymethylierten Promotoren

Nach *TET1*-Überexpression entstand die Mehrheit der 5hmC-Positionen *de novo*, d.h. diese Stellen zeigten weniger als fünf 5hmC-*reads* in Kontrollzellen, aber fünf oder mehr *reads* und eine zuverlässige 5hmC-Detektion in *TET1*-überexprimierenden Zellen. Solche *de novo*-5hmC-Positionen kamen in allen untersuchten genomischen Regionen vor. Daher wurden zwei separate Kandidatenlisten der 500 am stärksten hyperhydroxymethylierten Genpromotoren erstellt: Eine Liste basierte auf der größten *de novo*-5hmC-Zunahme, wohingegen die andere Liste auf der größten *fold change*-Zunahme von 5hmC aufbaute. Statistische Tests erbrachten keine Hinweise auf konsistent über- bzw. unterrepräsentierte biologische Prozesse in den beiden Listen.

Verglichen mit dem Grad der Genexpression zeigten die Kandidatenlisten jedoch übereinstimmend, dass Gene jeden Expressionsniveaus eine 5hmC-Zunahme aufwiesen und eine verstärkte Anreicherung mittelstark exprimierter Gene vorlag. Weitere Untersuchungen offenbarten eine Diskrepanz zwischen Expressionsstärke und endogenen Promotormethylierungsleveln, da stark methylierte Promotoren überrepräsentiert waren.

Es gab jedoch auch Promotoren, die nahezu unbeeinflusst von der *TET1*-Überexpression waren und nur geringfügige Veränderungen ihres 5hmC-Gehalts aufwiesen. Diese Promotoren verteilten sich ganz anders auf die Expressionsquartile, mit wenigen nicht bzw. schwach exprimierten Genen und einer steigenden Anzahl an Genen mit zunehmender Expressionsstärke. Die Beobachtung, dass stark exprimierte Gene weniger anfällig für eine *TET1*-vermittelte Oxidation waren, kann durch die geringe Substratverfügbarkeit in solchen Promotorregionen erklärt werden, die sich generell durch einen niedrigen Methylierungsgrad auszeichnen.

5.3.6 Geringe Reziprozität differentiell methylierter und hydroxymethylierter Promotoren nach *TET1*-Überexpression

Obwohl die 5hmC-Modifikation als ein Zwischenprodukt der DNA-Demethylierung angesehen wird (Kroeze *et al.*, 2015), konnten nach *TET1*-Überexpression nur wenige reziproke Effekte unter den am stärksten an 5hmC gewinnenden Promotoren

und den bestbewerteten, demethylierten Promotoren beobachtet werden. Eine Erklärung für die geringe Überschneidung der Promotoren beider Analysen könnten der fortgeschrittene, replikationsabhängige Verlust von 5hmC oder die in weiten Teilen bereits vollzogene, aktive Entfernung von 5hmC aus dem Großteil der demethylierten Promotoren sein. Zudem untersuchten die RRHP- und BeadChip-Verfahren zwar meist mehrere CpG-Dinukleotide pro Promotorregion (RRHP: durchschnittlich 3,45 CpGs/Promotor; BeadChip: durchschnittlich 7,66 CpGs/Promotor), aber nicht notwendigerweise die gleichen Positionen. Auch wenn es üblich ist, den Methylierungsstatus einer Promotorregion vom Methylierungsgrad einiger weniger CpG-Dinukleotide abzuleiten, so erschwert dies die Interpretation einer Überschneidung beider Analysen. Es sollte erwähnt werden, dass die untersuchten CpG-Dinukleotide der BeadChip-Experimente durch das Array-Design vorgegeben waren und immer einen Methylierungs-Beta-Wert zurück gaben, wohingegen die analysierten CpG-Dinukleotide der RRHP-Experimente (I) innerhalb von *MspI*-Schnittstellen liegen mussten und (II) ein gewisses Maß an Hydroxymethylierung aufweisen mussten, da anderenfalls keine *reads* zustande gekommen und die CpG-Positionen in der Auswertung nicht erfasst worden wären. Dennoch wurden von den 22.394 untersuchten Promotorregionen der BeadChip-Experimente insgesamt 12.667 Promotoren ebenfalls per RRHP evaluiert.

5.3.7 Allgemeine Diskussion

In ihrer Studie zeigten Jin und Kollegen, dass TET1 in differenzierten Zellen die anomale Ausbreitung von DNA-Methylierung von methylierten flankierenden Bereichen hinein in hypomethylierte CGIs verhindert und bezeichneten TET1 daher als „Erhaltungs-DNA-Demethylase“ (Jin *et al.*, 2014). Aufgrund der im vorigen Kapitel beschriebenen limitierten Auflösung der Methoden zur 5mC- und 5hmC-Quantifizierung konnten diese schmalen Grenzbereiche von 5mC-Oxidation und DNA-Demethylierung in der vorliegenden Arbeit nicht spezifisch untersucht werden. Dennoch steht die bevorzugte TET1-induzierte Demethylierung von schwach methylierten CGIs im Einklang mit der vorgeschlagenen Rolle von TET1, schwach methylierte CGIs weiterhin in diesem Zustand zu halten. Die Beobachtung, dass der simultane Knockdown der drei *TET*-Transkripte nicht vornehmlich zu einer Hypermethylierung solcher schwach methylierten CGIs führte, könnte mit dem

Knockdown von *TET2* und insbesondere *TET3* zusammenhängen, die ebenfalls in HEK293-Zellen exprimiert werden und möglicherweise andere Zielregionen und katalytische Effizienzen besitzen.

Die TET-Enzyme interagieren mit einer Vielzahl verschiedener Proteine, darunter auch Transkriptionsfaktoren, welche die TET-Enzyme zu deren genomischen Zielpositionen führen (Costa *et al.*, 2013; de la Rica *et al.*, 2013; Fujiki *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte in der Nähe differentiell methylierter bzw. hydroxymethylierter CpG-Dinukleotide eine signifikante Anreicherung verschiedener Sequenzmotive identifiziert werden. Diese umfassen möglicherweise Bindestellen von Transkriptionsfaktoren oder anderen TET-interagierenden Proteinen, welche die TET-Enzyme rekrutieren und 5mC-Oxidation bzw. DNA-Demethylierung initiieren konnten.

Die *TET1*-Überexpression führte nicht nur zur Hypomethylierung von CGIs mit einem niedrigen endogenen Methylierungsgrad, sondern beeinflusste auch andere Regionen mit einer großen Spannbreite endogener Methylierungslevel. Zudem wurde nach Überexpression von *TET1* eine Zunahme der 5hmC-Level an allen untersuchten genetischen Elementen und Regionen festgestellt. Die 5hmC-DNA-Modifikation wird zwar einerseits als ein Zwischenprodukt zur Initiierung von DNA-Demethylierung angesehen, stellt aber womöglich auch ein eigenständiges epigenetisches Signal mit spezifisch bindenden Faktoren dar (Delatte *et al.*, 2014; Pastor *et al.*, 2013). Ebenfalls ist es denkbar, dass die Oxidation von 5mC zu 5hmC den Effekten der 5mC-DNA-Methylierung entgegenwirkt (Pastor *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2011). So zeigen verschiedene 5mC-bindende Proteine eine deutlich niedrigere Affinität zu 5hmC (Hashimoto *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2010). Zusammengenommen deutet dies auf weitere Funktionen des TET1-Enzyms in Ergänzung der Erhaltungs-Demethylase-Aktivität an hypomethylierten CGIs hin. Obwohl keine Funktionen einzelner TET-Enzyme aus dem Knockdown-Experiment abgeleitet werden können, weist die Hypermethylierung von Promotoren, Genen und CGIs auf eine ausgedehnte Rolle der TET-Familie bei der Regulation der DNA-Methylierungslevel hin. Die statistischen Tests zur Identifizierung von über- bzw. unterrepräsentierten biologischen Prozessen in den verschiedenen Kandidatenlisten zeigten mitunter signifikant veränderte Ontologie-Kategorien, ließen jedoch keinen übergeordneten Zusammenhang erkennen. Dies könnte ebenfalls als Hinweis auf eine global ausgerichtete Funktion der TET-Enzyme gedeutet werden, die zumindest

im verwendeten Zellsystem übergreifend auf Gene verschiedener biologischer Prozesse und Signalwege wirken.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der DNA-Methylierung und methylierungsmodulierender Enzyme in verschiedenen Geweben untersucht.

Ein charakteristisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit sind reduzierte Somatostatin- und Somatostatin-Rezeptor-Level im Gehirn, die mit dem Ausbruch der sporadischen Form der Krankheit in Verbindung gebracht werden. Um zu klären, ob die Reduktion des Peptidhormons Somatostatin (SST) und des im Kortex von Alzheimer-Patienten am stärksten reduzierten Rezeptor-Subtyps 4 (SSTR4) auf eine Hypermethylierung der entsprechenden Promotorregion zurückzuführen sein könnte, wurden diese Regionen mittels Bisulfit-Sequenzierung in Zellen von Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Normalpersonen analysiert. Die ähnlichen Methylierungslevel dieser Promotorregionen in verschiedenen Gehirnregionen von Patienten und nicht-dementen Normalpersonen unterstützen jedoch nicht die Hypothese eines Zusammenhangs von DNA-Hypermethylierung und den reduzierten SST- und SSTR4-Leveln einer Alzheimer-Erkrankung. Es fand sich jedoch ein Trend zu erhöhter Methylierung des SST-Promotors mit erhöhtem Alter.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden drei unabhängige transgene Linien eines Mausmodells zur ubiquitären Überexpression der somatischen Form der *DNA-Methyltransferase 1*, *Dnmt1s*, untersucht. Anhand dieses Modells sollten ursprünglich die Konsequenzen einer solchen Überexpression analysiert werden. Es stellte sich heraus, dass transgene Tiere zwar eine bis zu 229-fach erhöhte *Dnmt1*-mRNA-Expression aufwiesen, jedoch keine erhöhten Dnmt1-Proteinlevel besaßen. Reportergergenversuche weisen auf eine reduzierte Translationseffizienz des Transgenkonstrukts hin, die jedoch nicht allein das Ausbleiben erhöhter Proteinlevel im Mausmodell erklären kann. Es bleibt offen, ob die statischen Proteinlevel auf spezifische Eigenschaften des Transgens oder auf eine stringente Kontrolle der Dnmt1-Level *in vivo* zurückzuführen sind.

Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss moderat veränderter TET-Dioxygenase-Level auf HEK293-Zellen untersucht. Die Überexpression von *TET1* führte zu erhöhten globalen 5hmC-Leveln und verursachte eine leichte Hypomethylierung von Promotoren, Genen und CpG-*islands*. Im Gegensatz dazu führte der simultane Knockdown von *TET1*, *TET2* und *TET3* zu verringerten globalen 5hmC-Leveln und einer leichten Hypermethylierung der genannten Regionen. Auch wenn die Überexpressions- bzw. Knockdown-Experimente entgegengesetzte

Methylierungsveränderungen hervorriefen, gab es nur eine kleine Anzahl reziproker Veränderungen. Die Methylierungsveränderungen beider Experimente geschahen mit unterschiedlicher Präferenz in Abhängigkeit vom endogenen Methylierungsgrad und der Stärke der Genexpression. Sowohl nach der *TET1*-Überexpression als auch nach dem *TET*-Knockdown wurden geringfügig hoch- und herunterregulierte Gene identifiziert. Die Expressionsveränderungen konnten jedoch nicht mit Methylierungsveränderungen der Genpromotoren in Verbindung gebracht werden und sind womöglich auf nicht-katalytische Funktionen der TET-Enzyme zurückzuführen. Die Kartierung der 5hmC-DNA-Modifikation im genomweiten Maßstab zeigte, dass die *TET1*-Überexpression die genomweite 5mC-Oxidation ohne einen erkennbaren Verteilungsschwerpunkt induzierte. Detailliertere Analysen offenbarten den Trend einer unterschiedlichen Suszeptibilität für eine Oxidation durch TET1, der abhängig vom endogenen 5hmC-Vorkommen war und in allen untersuchten genomischen Elementen und Regionen vorlag. Zusammengenommen weisen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf eine ausgedehnte Rolle der TET-Familie bei der Regulation der DNA-Methylierungslevel hin.

7. Literaturverzeichnis

ABI (2008) Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Part Number 4371095 Rev B http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf

Agoston AT, Argani P, Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Ansari-Lari MA, Hicks JL, Davidson NE, Nelson WG (2005) Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer. *J Biol Chem* **280**: 18302-18310

Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, Jenuwein T, Xu G, Leonhardt H, Wolf V, Walter J (2012) In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet* **8**: e1002750

Assenov Y, Muller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C (2014) Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat Methods* **11**: 1138-1140

Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S (2008) Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**: 822-825

Baubec T, Schubeler D (2014) Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr Opin Genet Dev* **25**: 85-92

Beisel C, Paro R (2011) Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* **12**: 123-135

Bergman Y, Cedar H (2013) DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 274-281

Bertram L, Lill CM, Tanzi RE (2010) The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* **68**: 270-281

Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**: 2395-2402

Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2013) Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **12**: 92-104

Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, Rademacher K, Guala A, Enklaar T, Anichini C, Cirillo Silengo M, Graf N, Prawitt D, Cubellis MV, Horsthemke B, Buiting K, Riccio A (2013) The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet* **22**: 544-557

Biniszkiwicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, Eggan K, Humpherys D, Mastrangelo MA, Jun Z, Walter J, Jaenisch R (2002) Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **22**: 2124-2135

- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**: 6-21
- Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 1499-1504
- Booth MJ, Branco MR, Ficz G, Oxley D, Krueger F, Reik W, Balasubramanian S (2012) Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science* **336**: 934-937
- Bossers K, Wirz KT, Meerhoff GF, Essing AH, van Dongen JW, Houba P, Kruse CG, Verhaagen J, Swaab DF (2010) Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain* **133**: 3699-3723
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**: 1760-1764
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239-259
- Breiling A, Lyko F (2015) Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin* **8**: 24
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **3**: 186-191
- Bruniquel D, Schwartz RH (2003) Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* **4**: 235-240
- Burgos-Ramos E, Hervas-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jimenez L, Hernandez-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E (2008) Somatostatin and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol* **286**: 104-111
- Burns A, Iliffe S (2009) Alzheimer's disease. *BMJ* **338**: b158
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ (2010) Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* **143**: 1084-1096
- Chen CC, Wang KY, Shen CK (2012) The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J Biol Chem* **287**: 33116-33121
- Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X (2013) TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* **493**: 561-564
- Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F (2005) Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem* **95**: 902-917

- Choi SH, Heo K, Byun HM, An W, Lu W, Yang AS (2011) Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **39**: 104-118
- Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Padbury JF, Bueno R, Sugarbaker DJ, Yeh RF, Wiencke JK, Kelsey KT (2009) Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet* **5**: e1000602
- Cohen NM, Kenigsberg E, Tanay A (2011) Primate CpG islands are maintained by heterogeneous evolutionary regimes involving minimal selection. *Cell* **145**: 773-786
- Colquitt BM, Allen WE, Barnea G, Lomvardas S (2013) Alteration of genic 5-hydroxymethylcytosine patterning in olfactory neurons correlates with changes in gene expression and cell identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 14682-14687
- Cooper DN, Mort M, Stenson PD, Ball EV, Chuzhanova NA (2010) Methylation-mediated deamination of 5-methylcytosine appears to give rise to mutations causing human inherited disease in CpNpG trinucleotides, as well as in CpG dinucleotides. *Hum Genomics* **4**: 406-410
- Costa Y, Ding J, Theunissen TW, Faiola F, Hore TA, Shliaha PV, Fidalgo M, Saunders A, Lawrence M, Dietmann S, Das S, Levasseur DN, Li Z, Xu M, Reik W, Silva JC, Wang J (2013) NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* **495**: 370-374
- Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, Gao Q, Powell BE, Li Z, Xu M, Faull KF, Lyko F, Jaenisch R (2013) Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell* **24**: 310-323
- Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu YC, Markoulaki S, Cheng AW, Gao Q, Kim J, Choi SW, Page DC, Jaenisch R (2011) Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell* **9**: 166-175
- Dayeh T, Volkov P, Salo S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Eliasson L, Ronn T, Bacos K, Ling C (2014) Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet* **10**: e1004160
- de la Rica L, Rodriguez-Ubreva J, Garcia M, Islam AB, Urquiza JM, Hernando H, Christensen J, Helin K, Gomez-Vaquero C, Ballestar E (2013) PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome Biol* **14**: R99
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**: 1010-1022
- Delatte B, Deplus R, Fuks F (2014) Playing TETris with DNA modifications. *EMBO J* **33**: 1198-1211

- Delatte B, Fuks F (2013) TET proteins: on the frenetic hunt for new cytosine modifications. *Brief Funct Genomics* **12**: 191-204
- Denis H, Ndlovu MN, Fuks F (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep* **12**: 647-656
- Deplus R, Delatte B, Schwinn MK, Defrance M, Mendez J, Murphy N, Dawson MA, Volkmar M, Putmans P, Calonne E, Shih AH, Levine RL, Bernard O, Mercher T, Solary E, Urh M, Daniels DL, Fuks F (2013) TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J* **32**: 645-655
- Ding F, Chaillet JR (2002) In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14861-14866
- Dong E, Gavin DP, Chen Y, Davis J (2012) Upregulation of TET1 and downregulation of APOBEC3A and APOBEC3C in the parietal cortex of psychotic patients. *Transl Psychiatry* **2**: e159
- Erdmann S, Senkel S, Arndt T, Lucas B, Lausen J, Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Thomas H (2007) Tissue-specific transcription factor HNF4alpha inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line. *Biol Chem* **388**: 91-106
- Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, Galfalvy H, Pavlidis P, Smyrniotopoulos P, Mann JJ, Sibille E (2005) Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol Psychiatry* **57**: 549-558
- Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**: 1148-1159
- Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S (2004) Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* **164**: 689-699
- Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM (2003) Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12253-12258
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**: 2112-2117
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**: 102-114
- Fraga MF, Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* **23**: 413-418

- Frauer C, Rottach A, Meilinger D, Bultmann S, Fellingner K, Hasenoder S, Wang M, Qin W, Soding J, Spada F, Leonhardt H (2011) Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS One* **6**: e16627
- Fujiki K, Shinoda A, Kano F, Sato R, Shirahige K, Murata M (2013) PPARgamma-induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Commun* **4**: 2262
- Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S (2005) S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* **28**: 195-204
- Gama Sosa MA, De Gasperi R, Elder GA (2010) Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct* **214**: 91-109
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282
- Gebhard C, Benner C, Ehrich M, Schwarzfischer L, Schilling E, Klug M, Dietmaier W, Thiede C, Holler E, Andreesen R, Rehli M (2010) General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer Res* **70**: 1398-1407
- Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Bruckl T, Biel M, Carell T (2010) Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* **5**: e15367
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**: 777-781
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514
- Grosser C, Neumann L, Horsthemke B, Zeschnigk M, van de Nes J (2014a) Methylation analysis of SST and SSTR4 promoters in the neocortex of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* **566**: 241-246
- Grosser C, Vassen L, Horsthemke B, Wagner N (2014b) A transgenic mouse model ubiquitously overexpressing Dnmt1s mRNA lacks increased protein levels. *PeerJ PrePrints* **2**: e550v1 <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.550v1>
- Grosser C, Wagner N, Grothaus K, Horsthemke B (2015) Altering TET dioxygenase levels within physiological range affects DNA methylation dynamics of HEK293 cells. *Epigenetics* **10**: 819-833
- Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabo PE, Pfeifer GP, Li J, Xu GL (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* **477**: 606-610
- Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J (2012) The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging* **33**: 437-456

- Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Cordelier P, Bousquet C, Pyronnet S, Susini C (2005) Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest* **28**: 5-9
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H (2011a) Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* **10**: 2662-2668
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H (2011b) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**: 423-434
- Hahn MA, Qiu R, Wu X, Li AX, Zhang H, Wang J, Jui J, Jin SG, Jiang Y, Pfeifer GP, Lu Q (2013) Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep* **3**: 291-300
- 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
- Hama E, Saido TC (2005) Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatin, neprilysin, and amyloid beta peptide. *Med Hypotheses* **65**: 498-500
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184-185
- Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, Zhang X, Cheng X (2012) Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* **40**: 4841-4849
- Hayashi M, Yamashita A, Shimizu K (1997) Somatostatin and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the primate brain: decreased levels of mRNAs during aging. *Brain Res* **749**: 283-289
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**: 1303-1307
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* **38**: 576-589
- Herrup K (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**: 794-799
- Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232

- Hsu CH, Peng KL, Kang ML, Chen YR, Yang YC, Tsai CH, Chu CS, Jeng YM, Chen YT, Lin FM, Huang HD, Lu YY, Teng YC, Lin ST, Lin RK, Tang FM, Lee SB, Hsu HM, Yu JC, Hsiao PW, Juan LJ (2012) TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep* **2**: 568-579
- Huang H, Jiang X, Li Z, Li Y, Song CX, He C, Sun M, Chen P, Gurbuxani S, Wang J, Hong GM, Elkahoun AG, Arnovitz S, Szulwach K, Lin L, Street C, Wunderlich M, Dawlaty M, Neilly MB, Jaenisch R, Yang FC, Mulloy JC, Jin P, Liu PP, Rowley JD, Xu M, Chen J (2013) TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11994-11999
- Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A (2010) The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* **5**: e8888
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y, Okabe M (1995) A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett* **375**: 125-128
- Illingworth RS, Bird AP (2009) CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* **583**: 1713-1720
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyani S, Feinberg AP (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* **41**: 178-186
- Ishikawa TO, Herschman HR (2011) Conditional bicistronic Cre reporter line expressing both firefly luciferase and beta-galactosidase. *Mol Imaging Biol* **13**: 284-292
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**: 1129-1133
- 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
- Iurlaro M, Ficuz G, Oxley D, Raiber EA, Bachman M, Booth MJ, Andrews S, Balasubramanian S, Reik W (2013) A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Biol* **14**: R119
- Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, Saido TC (2004) Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* **24**: 991-998
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC (2002) Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* **70**: 493-500

- Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L (2009) Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* **8**: 1698-1710
- Jackson K, Soutto M, Peng D, Hu T, Marshal D, El-Rifai W (2011) Epigenetic silencing of somatostatin in gastric cancer. *Dig Dis Sci* **56**: 125-130
- Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, Chevassut T, Forrester L, Ansell J, Ramsahoye B (2004) Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **24**: 8862-8871
- Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2006) De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* **66**: 682-692
- Jin C, Lu Y, Jelinek J, Liang S, Estecio MR, Barton MC, Issa JP (2014) TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells. *Nucleic Acids Res* **42**: 6956-6971
- Jin SG, Kadam S, Pfeifer GP (2010) Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res* **38**: e125
- Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* **13**: 484-492
- Jung M, Pfeifer GP (2015) Aging and DNA methylation. *BMC Biol* **13**: 7
- Kaas GA, Zhong C, Eason DE, Ross DL, Vachhani RV, Ming GL, King JR, Song H, Sweatt JD (2013) TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron* **79**: 1086-1093
- Kamei K, Ishikawa TO, Herschman HR (2006) Transgenic mouse for conditional, tissue-specific Cox-2 overexpression. *Genesis* **44**: 177-182
- Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S (2001) DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and pericentromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* **91**: 205-212
- Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2014) ApoE and Abeta in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron* **81**: 740-754
- Kelly TK, Miranda TB, Liang G, Berman BP, Lin JC, Tanay A, Jones PA (2010) H2A.Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes. *Mol Cell* **39**: 901-911
- Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Aijo T, Pastor WA, Segal MF, Li H, Koh KP, Lahdesmaki H, Hogan PG, Aravind L, Rao A (2013) Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* **497**: 122-126

- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**: 8125-8148
- Kriaucionis S, Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**: 929-930
- Kroeze LI, van der Reijden BA, Jansen JH (2015) 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1855**: 144-154
- Kulis M, Esteller M (2010) DNA methylation and cancer. *Adv Genet* **70**: 27-56
- Kumar U (2005) Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **134**: 525-538
- Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H (2008) Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol* **313**: 335-346
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6232-6236
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* **40**: 1087-1093
- Li A, Omura N, Hong SM, Goggins M (2010) Pancreatic cancer DNMT1 expression and sensitivity to DNMT1 inhibitors. *Cancer Biol Ther* **9**: 321-329
- Li LC, Dahiya R (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* **18**: 1427-1431
- Li Z, Cai X, Cai CL, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang FC, Xu M (2011) Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* **118**: 4509-4518
- Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q, Lee CW, Hu D, Lian BQ, Kleffel S, Yang Y, Neiswender J, Khorasani AJ, Fang R, Lezcano C, Duncan LM, Scolyer RA, Thompson JF, Kakavand H, Houvras Y, Zon LI, Mihm MC, Jr., Kaiser UB, Schatton T, Woda BA, Murphy GF, Shi YG (2012) Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* **150**: 1135-1146
- Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schubeler D (2011) Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet* **43**: 1091-1097

- Lister R, Ecker JR (2009) Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* **19**: 959-966
- Long HK, Blackledge NP, Klose RJ (2013) ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans* **41**: 727-740
- Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR (2003) TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* **17**: 637-641
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* **429**: 883-891
- Malik N, Moaen-ud-Din M, Zhao R (2013) Ontogeny of mRNA expression of somatostatin and its receptors in chicken embryos in association with methylation status of their promoters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **165**: 260-270
- 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
- McKinney BC, Lin CW, Oh H, Tseng GC, Lewis DA, Sibille E (2015) Hypermethylation of BDNF and SST Genes in the Orbital Frontal Cortex of Older Individuals: A Putative Mechanism for Declining Gene Expression with Age. *Neuropsychopharmacology*
- Meissner A (2011) Guiding DNA methylation. *Cell Stem Cell* **9**: 388-390
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**: 766-770
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* **125**: 889-897
- Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D (2014) DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev* **28**: 812-828
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2013) Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* **8**: 1551-1566
- Min KL, Steghens JP (1999) The emitting species dissociated from the enzyme can emit the light in *Photinus pyralis* luciferase system. *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 273-278
- Minor EA, Court BL, Young JI, Wang G (2013) Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem* **288**: 13669-13674

Misawa K, Misawa Y, Kondo H, Mochizuki D, Imai A, Fukushima H, Uehara T, Kanazawa T, Mineta H (2015) Aberrant methylation inactivates somatostatin and somatostatin receptor type 1 in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **10**: e0118588

Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K (1989) Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* **79**: 269-277

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273

Musiek ES, Holtzman DM (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci* **18**: 800-806

Neumann LC, Markaki Y, Mladenov E, Hoffmann D, Buiting K, Horsthemke B (2012) The imprinted NPAP1/C15orf2 gene in the Prader-Willi syndrome region encodes a nuclear pore complex associated protein. *Hum Mol Genet* **21**: 4038-4048

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**: 193-199

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

Okashita N, Kumaki Y, Ebi K, Nishi M, Okamoto Y, Nakayama M, Hashimoto S, Nakamura T, Sugasawa K, Kojima N, Takada T, Okano M, Seki Y (2014) PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development* **141**: 269-280

Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, 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

Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6861-6865

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

Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, Li J, Zhou H, Tang Y, Shen N (2010) MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* **184**: 6773-6781

Pastor WA, Aravind L, Rao A (2013) TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 341-356

- Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S (2005) Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* **96**: 403-408
- Perera A, Eisen D, Wagner M, Laube SK, Kunzel AF, Koch S, Steinbacher J, Schulze E, Splith V, Mittermeier N, Muller M, Biel M, Carell T, Michalakis S (2015) TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and induction of gene expression. *Cell Rep* **11**: 283-294
- Petterson A, Chung TH, Tan D, Sun X, Jia XY (2014) RRHP: a tag-based approach for 5-hydroxymethylcytosine mapping at single-site resolution. *Genome Biol* **15**: 456
- QIAGEN (2002) QIAexpress Detection and Assay Handbook.
- Qin W, Leonhardt H, Pichler G (2011) Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. *Nucleus* **2**: 392-402
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**: 329-344
- Raddatz G, Guzzardo PM, Olova N, Fantappie MR, Rampp M, Schaefer M, Reik W, Hannon GJ, Lyko F (2013) Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8627-8631
- Rahmann S, Beygo J, Kanber D, Martin M, Horsthemke B, Buiting K (2013) Amplifyzer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing. *PeerJ PrePrints* **1**: e122v2
<https://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.122v2>
- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5237-5242
- Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093
- Ricketts CJ, Morris MR, Gentle D, Brown M, Wake N, Woodward ER, Clarke N, Latif F, Maher ER (2012) Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma. *Epigenetics* **7**: 278-290
- Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**: 9-25
- Roberson ED, Mucke L (2006) 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* **314**: 781-784
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* **6**: 597-610
- Rudenko A, Dawlaty MM, Seo J, Cheng AW, Meng J, Le T, Faull KF, Jaenisch R, Tsai LH (2013) Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction. *Neuron* **79**: 1109-1122

- Rutledge CE, Lau HT, Mangan H, Hardy LL, Sunnotel O, Guo F, MacNicol AM, Walsh CP, Lees-Murdock DJ (2014) Efficient translation of Dnmt1 requires cytoplasmic polyadenylation and Musashi binding elements. *PLoS One* **9**: e88385
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005) Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* **11**: 434-439
- Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2002) Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 1265-1272
- Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, 2nd ed. edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1412-1417
- Schiesser S, Hackner B, Pfaffeneder T, Muller M, Hagemeyer C, Truss M, Carell T (2012) Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 6516-6520
- Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Edinger M, Rehli M (2009) Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res* **19**: 1165-1174
- Schubeler D (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature* **517**: 321-326
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**: 908-912
- Shen L, Wu H, Diep D, Yamaguchi S, D'Alessio AC, Fung HL, Zhang K, Zhang Y (2013) Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell* **153**: 692-706
- Shi X, Li X, Chen L, Wang C (2013) Analysis of somatostatin receptors and somatostatin promoter methylation in human gastric cancer. *Oncol Lett* **6**: 1794-1798
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S (2007) DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* **2**: e895

- Smith ZD, Meissner A (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* **14**: 204-220
- Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, Pfaffeneder T, Jansen PW, Bauer C, Munzel M, Wagner M, Muller M, Khan F, Eberl HC, Mensinga A, Brinkman AB, Lephikov K, Muller U, Walter J, Boelens R, van Ingen H, Leonhardt H, Carell T, Vermeulen M (2013) Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* **152**: 1146-1159
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* **279**: 27816-27823
- Susini C, Buscail L (2006) Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol* **17**: 1733-1742
- Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H (2010) Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **38**: e181
- 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
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3740-3745
- Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Genda Y, Ukitsu M (1999) Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res* **70**: 288-292
- Valinluck V, Sowers LC (2007) Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* **67**: 946-950
- Vardy ER, Catto AJ, Hooper NM (2005) Proteolytic mechanisms in amyloid-beta metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* **11**: 464-472
- Vella P, Scelfo A, Jammula S, Chiacchiera F, Williams K, Cuomo A, Roberto A, Christensen J, Bonaldi T, Helin K, Pasini D (2013) Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell* **49**: 645-656
- Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB (1996) De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* **16**: 4555-4565
- Villar-Menendez I, Blanch M, Tyebji S, Pereira-Veiga T, Albasanz JL, Martin M, Ferrer I, Perez-Navarro E, Barrachina M (2013) Increased 5-methylcytosine and decreased

- 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. *Neuromolecular Med* **15**: 295-309
- Wagner N (2010) A mouse model for the overexpression of methyltransferases. Inaugural Dissertation to obtain the degree of Dr. rer. nat., University of Duisburg-Essen, Essen
- Wang F, Yang Y, Lin X, Wang JQ, Wu YS, Xie W, Wang D, Zhu S, Liao YQ, Sun Q, Yang YG, Luo HR, Guo C, Han C, Tang TS (2013) Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **22**: 3641-3653
- Ward RJ, Alvarez-Curto E, Milligan G (2011) Using the Flp-In T-Rex system to regulate GPCR expression. *Methods Mol Biol* **746**: 21-37
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* **39**: 457-466
- Weber M, Schubeler D (2007) Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 273-280
- Williams K, Christensen J, Helin K (2012) DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* **13**: 28-35
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J, Helin K (2011) TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* **473**: 343-348
- Wisniewski T, Goni F (2015) Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease. *Neuron* **85**: 1162-1176
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y (2011) Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* **473**: 389-393
- Wu H, Zhang Y (2014) Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* **156**: 45-68
- Wu J, Issa JP, Herman J, Bassett DE, Jr., Nelkin BD, Baylin SB (1993) Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8891-8895
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 607-620
- Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, Barbera AJ, Zheng L, Zhang H, Huang S, Min J, Nicholson T, Chen T, Xu G, Shi Y, Zhang K, Shi YG (2011) Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell* **42**: 451-464
- Xu Y, Xu C, Kato A, Tempel W, Abreu JG, Bian C, Hu Y, Hu D, Zhao B, Cerovina T, Diao J, Wu F, He HH, Cui Q, Clark E, Ma C, Barbara A, Veenstra GJ, Xu G, Kaiser

- UB, Liu XS, Sugrue SP, He X, Min J, Kato Y, Shi YG (2012) Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell* **151**: 1200-1213
- Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* **297**: 97-100
- Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, Weng Z, Rando OJ, Fazio TG (2011) Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell* **147**: 1498-1510
- Yin R, Mao SQ, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, Zhang D, Huang H, Gao J, Li Z, Jiao Y, Li C, Liu S, Wu D, Gu W, Yang YG, Xu GL, Wang H (2013) Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc* **135**: 10396-10403
- You JS, Jones PA (2012) Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* **22**: 9-20
- Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song CX, Zhang L, Kim A, Li X, Dai Q, Shen Y, Park B, Min JH, Jin P, Ren B, He C (2012) Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* **149**: 1368-1380
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* **5**: 94-98
- Zeschnigk M, Martin M, Betzl G, Kalbe A, Sirsch C, Buiting K, Gross S, Fritzilas E, Frey B, Rahmann S, Horsthemke B (2009) Massive parallel bisulfite sequencing of CG-rich DNA fragments reveals that methylation of many X-chromosomal CpG islands in female blood DNA is incomplete. *Hum Mol Genet* **18**: 1439-1448
- Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG (2010) TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res* **20**: 1390-1393
- Zhang RR, Cui QY, Murai K, Lim YC, Smith ZD, Jin S, Ye P, Rosa L, Lee YK, Wu HP, Liu W, Xu ZM, Yang L, Ding YQ, Tang F, Meissner A, Ding C, Shi Y, Xu GL (2013) Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell* **13**: 237-245
- Zhang Z, Tang H, Wang Z, Zhang B, Liu W, Lu H, Xiao L, Liu X, Wang R, Li X, Wu M, Li G (2011) MiR-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. *Mol Cancer* **10**: 124
- Zhao S, Wang Y, Liang Y, Zhao M, Long H, Ding S, Yin H, Lu Q (2011) MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4⁺ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum* **63**: 1376-1386

Ziller MJ, Muller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, Boyle P, Epstein CB, Bernstein BE, Lengauer T, Gnirke A, Meissner A (2011) Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet* 7: e1002389

8. Anhang

Tabelle A1: Synthetische Oligonukleotide (Primer).

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (Kapitel)
1	HIS_RT_US2	TCATCACCATCACCATATGCC	4.2.1 Transgenspezifische RT-PCR, 209 bp
2	PRIMER3_RT_LS	CCAAGTCACACAACCTGGCTTT	
3	GFP_US1	CCAACGAGAAGCGCGATCACATG	3.2.1.1 Multiplex- PCR: Transgenspezifisch 532 bp; <i>Rag1</i> - Kontrollfragment 295 bp
4	Dnmt1_rec_LS1	CCGGGAGCGAGCCTGCCGGGGAG	
5	mRag1.1	GCTGATGGGAAGTCAAGCGAC	
6	mRag1.3	GGGAACTGCTGAACTTTCTGTG	
7	CAG_US1	CTGGTTATTGTGCTGTCTCATC	3.2.1.1 Transgenspezifische PCR, 218 bp
8	Dnmt1_rec_LS1	CCGGGAGCGAGCCTGCCGGGGAG	

Tabelle A2: Primer und UPL-Sonden für Expressionsuntersuchungen in HEK293-Zellen. Die ProbeFinder Software kann im Assay Design Center aufgerufen werden (<http://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?catalogId=10001&ab=&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1#tab-3>).

Gensymbol	Name	Sequenz (5'-3')	UPL-Sonde
<i>TET1</i>	Taq_TET1_for	tctgtgtgtgcctctgga	#57
	Taq_TET1_rev	gcctttaaactttgggcttc	
<i>GAPDH</i>	Taq_GAPDH_for	agccacatcgctcagacac	#60
	Taq_GAPDH_rev	gcccaatcgcaccaaattcc	
<i>TET2</i>	Taq_TET2_B_for	aaactctactcggagcttaccg	#73
	Taq_TET2_B_rev	tgacaggcgcaagttctct	
<i>TET3</i>	Taq_TET3_for	ccattgcaaagtgggtga	#25
	Taq_TET3_rev	cgcaccaggcagagtagc	
<i>ASMTL</i>	Taq_ASMTL_for	gagaagccggtggacaag	#89
	Taq_ASMTL_rev	tgtgttctctcccactcaacc	
<i>TRAPPC6A</i>	Taq_TRAPPC6A_for	gttccagaagcagatggacag	#52
	Taq_TRAPPC6A_rev	ccagatactgcaggccaga	
<i>WIPI1</i>	Taq_WIPI1_for	gaccgtagccagaccaagtg	#41
	Taq_WIPI1_rev	cgccgtctcagaataacc	
<i>ACPL2</i>	Taq_ACPL2_for	aataatgctttccgcaacc	#30
	Taq_ACPL2_rev	accgggatcaggtggaag	
<i>ARRDC4</i>	Taq2_ARRDC4_f	cactgaccctgccagagc	#6
	Taq2_ARRDC4_r	tgagggttaaggaggaatgtgtc	
<i>ERBB3</i>	Taq2_ERBB3_f	ccgagatgctgagatagtgg	#29
	Taq2_ERBB3_r	cttgcaaacctcatgacagg	
<i>VTA1</i>	Taq_VTA1_for	catcaggcaactatactggaataca	#78
	Taq_VTA1_rev	ggttgatagtattacttgctcacct	
<i>ZNF678</i>	Taq2_ZNF678_f	ttgaactcctccctcaagtg	#29
	Taq2_ZNF678_r	ctgaatgccagtagtccctgt	

Tabelle A3: Einstellungen des Programms RnBeads zur Analyse der Infinium HumanMethylation450 BeadChips.

Preprocessing

Option	Value
filtering.whitelist	
filtering.blacklist	
filtering.snp	3
filtering.missing.value.quantile	1
filtering.greedy	yes
filtering.greedy.pvalue.threshold	0,05
filtering.greedy.rc.ties	row
distribution.subsample	1000000
normalization.method	swan
normalization.background.method	methylumi.noob
normalization.plot.shifts	yes
filtering.context.removal	CC, CAG, CAH, CTG, CTH, Other
filtering.missing.value.quantile	1
filtering.sex.chromosomes.removal	no
filtering.deviation.threshold	0
distribution.subsample	1000000

Exploratory Analysis

Option	Value
replicate.id.column	default
distribution.subsample	1000000

Differential Methylation

Option	Value
analyze.sites	yes
region.types	default
differential.permutations	0
differential.comparison.columns	default
differential.comparison.columns.all.pairwise	default
columns.pairing	default
differential.site.test.method	limma
covariate.adjustment.columns	default
differential.adjustment.sva	yes
differential.adjustment.celltype	yes

Tabelle A4: Klinisch-pathologische Informationen zu nicht-dementen Normalpersonen und Alzheimer-Patienten.

Proben-ID	Alter [Jahre]	Geschlecht	pmd [h:min]	CSF pH	ApoE	Braak-Stadium		Todesursache
						A β	NFT	
Normalpersonen								
NP 08/230	50	w	4:10	6,98	n. a.	0	I	Metastasiertes Lungenkarzinom
NP 09/007	62	m	7:20	6,36	n. a.	0	I	Plötzlicher Tod
NP 09/300	71	w	7:10	6,31	n. a.	A	I	Nierenversagen
NP 09/009	82	m	5:10	6,75	n. a.	0	I	Pneumonie
NP 08/153	92	w	7:00	6,55	n. a.	A	I	Plötzlicher Tod
Alzheimer-Patienten								
Pat 04/232	72	w	6:30	6,60	4,4	C	VI	Plötzlicher Tod
Pat 02/097	79	m	4:45	6,84	4,3	C	V	Dehydratation
Pat 04/271	85	w	5:40	7,16	4,3	C	VI	Kachexie und Dehydratation
Pat 01/195	89	w	3:15	7,08	4,3	C	V	Dehydratation
Pat 05/013	94	w	4:30	7,33	3,3	C	V	Herzdekompensation

w: weiblich; m: männlich; pmd: *post-mortem delay* (Zeitspanne vom Tod bis zur Probenkonservierung); CSF pH: pH der Zerebrospinalflüssigkeit; ApoE: Status des APOE-Polymorphismus mit der Isoform E4 als Risikofaktor einer Alzheimer-Erkrankung; n. a.: nicht angegeben; A β : Grad der kortikalen Amyloid-Ablagerung (Braak & Braak, 1991); NFT: Grad neurofibrillärer Veränderungen (Braak & Braak, 1991). Tabelle verändert nach Grosser *et al.*, 2014a.

Tabelle A5: Methylierungsgrad einzelner CpG-Dinukleotide der SST-Promotorregion. Die DNA stammte aus der grauen Substanz des GFS und wurde nach Bisulfit-Behandlung mittels Next-Generation-Sequencing-Technologie analysiert. 0: unmethyliert, 1: 100% methyliert; MW: Mittelwert; n. a.: nicht angegeben. Tabelle verändert nach Grosser et al., 2014a.

	Alter [Jahre]	5'-shore-Region														SST-CGI														MW
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	MW	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	
NP 08/230	50	0,34	0,34	0,16	0,26	0,09	0,02	0,03	0,18	0,10	0,03	0,03	0,03	0,05	0,04	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	0,02	0,05	0,05	0,05	0,02	0,038
NP 09/007	62	0,30	0,26	0,12	0,17	0,06	0,01	0,01	0,13	0,05	0,03	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,04	0,05	0,06	0,06	0,05	0,04	0,02	0,02	0,035
NP 09/300	71	0,27	0,31	0,12	0,27	0,10	0,02	0,04	0,16	0,09	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,01	0,06	0,01	0,04	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04	0,02	0,035
NP 09/009	82	0,29	0,34	0,09	0,27	0,10	0,01	0,05	0,16	0,13	0,03	0,06	0,03	0,02	0,04	0,04	0,08	0,06	0,04	0,03	0,05	0,06	0,05	0,06	0,08	0,08	0,03	0,04	0,03	0,052
NP 08/153	92	0,31	0,34	0,14	0,27	0,12	0,01	0,02	0,17	0,09	0,01	0,05	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,06	0,05	0,06	0,09	0,09	0,09	0,05	0,04	0,03	0,047
Pat 04/232	72	0,24	0,28	0,17	0,20	0,07	0,02	0,02	0,14	0,09	0,04	0,03	0,04	0,01	0,02	0,02	0,07	0,04	0,04	0,02	0,07	0,04	0,02	0,04	0,05	0,05	0,03	0,05	0,03	0,040
Pat 02/097	79	0,36	0,39	0,18	0,27	0,10	0,03	0,05	0,20	0,12	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06	0,02	0,05	0,02	0,05	0,04	0,04	0,09	0,06	0,07	0,06	0,08	0,04	0,054
Pat 04/271	85	0,28	0,38	0,18	0,26	0,11	0,01	0,08	0,19	0,09	0,05	0,11	0,04	0,07	0,06	0,08	0,07	0,04	0,04	0,02	0,05	0,05	0,04	0,09	0,06	0,09	0,04	0,05	0,03	0,059
Pat 01/195	89	0,29	0,24	0,14	0,21	0,07	0,03	0,01	0,14	0,09	0,05	0,05	0,03	0,02	0,01	0,03	0,07	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,06	0,07	0,04	0,07	0,02	0,03	0,04	0,039
Pat 05/013	94	0,28	0,28	0,12	0,21	0,09	0,02	0,04	0,15	0,12	0,04	0,07	0,05	0,04	0,03	0,03	0,05	0,05	0,03	0,02	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,04	0,04	0,02	0,049
Sperma	n. a.	0,02	0,21	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,003
Blut	6,5	0,65	0,38	0,24	0,25	0,02	0,04	0,11	0,24	0,17	0,07	0,06	0,05	0,06	0,03	0,05	0,10	0,05	0,04	0,04	0,07	0,08	0,07	0,14	0,07	0,13	0,07	0,09	0,05	0,075

Tabelle A7: Statistischer Überrepräsentationstest der Promotoren, Gene und CGIs die nach *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown reziproke Methylierungsveränderungen zeigten. Die Analyse erfolgte mit dem PANTHER-Überrepräsentationstest mit Standardinstellungen. Tabelle verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

PANTHER Overrepresentation Test (release 20150430)
 PANTHER version 10.0 Released 2015-05-15
 Bonferroni-Korrektur für multiples Testen
 Annotationsdatensatz: PANTHER GO-Slim Biological Process

Reference List:

Homo sapiens (all genes in database)
 Mapped IDs: 20814
 Unmapped IDs: 0

Displaying only results with $P < 0.05$

PANTHER GO-Slim Biological Process

Homo sapiens (REF)	Reziproke Methylierungsveränderungen nach <i>TET1</i> -Überexpression / <i>TET</i> -Knockdown									
	38 reziproke Promotoren (30 mapped IDs)		26 reziproke Gene (15 mapped IDs)		42 reziproke CGIs (20 Promotor-assoziierte CGIs, 15 mapped IDs)					
#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value

Tabelle A8: Statistischer Überrepräsentationstest der nach *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown deregulierten Gene. Die Analyse erfolgte mit dem PANTHER-Überrepräsentationstest mit Standardeinstellungen. Tabelle verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

PANTHER Overrepresentation Test (release 20150430)
 PANTHER version 10.0 Released 2015-05-15
 Bonferroni-Korrektur für multiples Testen
 Annotationsdatensatz: PANTHER GO-Slim Biological Process

Reference List:
 Homo sapiens (all genes in database)
 Mapped IDs: 20814
 Unmapped IDs: 0

Displaying only results with $P < 0.05$

PANTHER GO-Slim Biological Process

	<i>TET1</i> -Überexpression				<i>TET</i> -Knockdown					
Homo sapiens (REF)	21 deregulierte Gene (19 mapped IDs)				191 deregulierte Gene (179 mapped IDs)					
#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value

Tabelle A9: Statistischer Überrepräsentationstest der nach *TET1*-Überexpression am stärksten hyperhydroxymethylierten Promotoren. Die Analyse erfolgte mit dem PANTHER-Überrepräsentationstest mit Standardeinstellungen. Tabelle verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

PANTHER Overrepresentation Test (release 20150430)
 PANTHER version 10.0 Released 2015-05-15
 Bonferroni-Korrektur für multiples Testen
 Annotationsdatensatz: PANTHER GO-Slim Biological Process

Reference List:
 Homo sapiens (all genes in database)
 Mapped IDs: 20814
 Unmapped IDs: 0

Displaying only results with $P < 0.05$

PANTHER GO-Slim Biological Process
 biological regulation

	<i>TET1</i> -Überexpression									
Homo sapiens (REF)	500 Promotoren mit stärkster <i>de novo</i> -5hmC-Zunahme (406 mapped IDs)				500 Promotoren mit stärkster <i>fold change</i> -5hmC-Zunahme (424 mapped IDs)					
#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
3918	110	76.42	1.44	+	6.51E-03					

Tabelle A10: Ergebnisse der *de novo*-Motiv-Suche mit dem Programm HOMER. Tabelle verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

Angereicherte Motive nahe der 5.000 am stärksten nach *TET1*-Überexpression hypomethylierten CpG-Dinukleotide

Rank	Motif	P-value	log P-value	% of Targets	% of Background	Best Match/Details
1		1e-32	-7.508e+01	8.90%	4.83%	Fra1(bZIP)/BT549-Fra1-ChIP-Seq(GSE46166)/Homer(0.981)
2		1e-12	-2.800e+01	2.08%	0.94%	byn/dmmpmm (SeSiMCMC)/fly(0.726)

Angereicherte Motive nahe der 5.000 am stärksten nach *TET*-Knockdown hypermethylierten CpG-Dinukleotide

Rank	Motif	P-value	log P-value	% of Targets	% of Background	Best Match/Details
1		1e-20	-4.832e+01	12.12%	8.17%	Ets1-distal(ETS)/CD4+-PolII-ChIP-Seq (Barski et al.)/Homer(0.932)
2		1e-19	-4.417e+01	46.22%	39.86%	MA0598.1_EHF/Jaspar(0.688)
3		1e-18	-4.270e+01	0.46%	0.03%	ROX1/Literature (Harbison)/Yeast(0.704)
4		1e-17	-4.045e+01	0.70%	0.10%	MA0592.1_ESRRA/Jaspar(0.679)
5		1e-16	-3.704e+01	0.26%	0.01%	MA0035.3_Gata1/Jaspar(0.649)
6		1e-15	-3.580e+01	6.00%	3.64%	HLHm5/dmmpmm (Pollard)/fly(0.669)
7		1e-15	-3.573e+01	1.02%	0.25%	Oct2(POU,Homeobox)/Bcell-Oct2-ChIP-Seq (GSE21512)/Homer(0.638)
8		1e-14	-3.450e+01	0.64%	0.10%	Unknown3/Arabidopsis-Promoters/Homer(0.616)
9		1e-14	-3.441e+01	2.20%	0.92%	MA0329.1_MBP1/Jaspar(0.675)
10		1e-14	-3.429e+01	0.98%	0.24%	PB0047.1_Myf6_1/Jaspar(0.683)
11		1e-14	-3.416e+01	0.46%	0.04%	Reverb(NR),DR2/RAW-Reverba.biotin-ChIP-Seq(GSE45914)/

						Homer(0.648)
12		1e-14	-3.405e+01	0.64%	0.10%	MA0362.1_RDS2/ Jaspar(0.796)
13		1e-14	-3.363e+01	19.52%	15.36%	hkb/dmmpmm (Papatsenko)/ fly(0.844)
14		1e-14	-3.361e+01	4.62%	2.64%	GAMYB(MYB)/ Hordeum vulgare/ AthaMap(0.590)
15		1e-14	-3.319e+01	0.24%	0.01%	MA0427.1_YJL103C/ Jaspar(0.643)
16		1e-14	-3.316e+01	0.40%	0.03%	MET31(MacIsaac)/ Yeast(0.654)
17		1e-14	-3.262e+01	47.88%	42.43%	MA0056.1_MZF1_1-4/ Jaspar(0.818)
18		1e-13	-3.204e+01	21.16%	16.96%	PB0100.1_Zfp740_1/ Jaspar(0.718)
19		1e-13	-3.156e+01	0.62%	0.10%	PB0155.1_Osr2_2/ Jaspar(0.669)
20		1e-13	-3.152e+01	0.38%	0.03%	MA0123.1_abi4/ Jaspar(0.689)
21		1e-13	-3.060e+01	0.24%	0.01%	Smad4(MAD)/ESC- SMAD4-ChIP-Seq (GSE29422)/ Homer(0.684)
22		1e-13	-3.039e+01	3.80%	2.11%	byn/dmmpmm (Pollard)/fly(0.675)
23		1e-12	-2.946e+01	18.60%	14.79%	PB0199.1_Zfp161_2/ Jaspar(0.870)
24		1e-12	-2.914e+01	1.04%	0.31%	UME1/UME1_YPD/[] (Harbison)/ Yeast(0.683)
25		1e-12	-2.825e+01	8.38%	5.85%	SeqBias: CA-repeat(0.858)
26		1e-12	-2.818e+01	7.60%	5.20%	ara/dmmpmm (Pollard)/fly(0.789)
27		1e-12	-2.766e+01	0.22%	0.01%	SKN7/SKN7_H2O2Lo/[] (Harbison)/Yeast(0.604)

Angereicherte Motive nahe der 5.000 am stärksten nach *TET1*-Überexpression an 5hmC gewinnenden CpG-Dinukleotide (*de novo*-Zunahme)

Rank	Motif	P-value	log P-value	% of Targets	% of Background	Best Match/Details
1		1e-164	-3.781e+02	55.84%	36.70%	MA0280.1_CAT8/Jaspar(0.841)
2		1e-16	-3.736e+01	0.36%	0.02%	Dr/dmmpmm (Noyes_hd)/fly(0.651)
3		1e-14	-3.334e+01	46.14%	40.67%	ttk/dmmpmm (Bigfoot)/fly(0.766)
4		1e-14	-3.238e+01	13.64%	10.19%	MA0485.1_Hoxc9/Jaspar(0.763)
5		1e-14	-3.235e+01	5.62%	3.45%	MA0280.1_CAT8/Jaspar(0.635)
6		1e-13	-3.049e+01	24.84%	20.48%	PB0143.1_Klf7_2/Jaspar(0.742)
7		1e-12	-2.785e+01	25.96%	21.73%	SWI4(MaClisaac)/Yeast(0.818)

Angereicherte Motive nahe der 5.000 am stärksten nach *TET1*-Überexpression an 5hmC gewinnenden CpG-Dinukleotide (*fold change*-Zunahme)

Rank	Motif	P-value	log P-value	% of Targets	% of Background	Best Match/Details
1		1e-312	-7.185e+02	56.18%	30.26%	MA0280.1_CAT8/Jaspar(0.829)
2		1e-22	-5.167e+01	4.50%	2.17%	MA0473.1_ELF1/Jaspar(0.722)
3		1e-20	-4.630e+01	10.68%	7.06%	PHD1/PHD1_BUT90/8-SUT1(Harbison)/Yeast(0.685)
4		1e-17	-3.999e+01	38.44%	32.64%	POL010.1_DCE_S_III/Jaspar(0.667)
5		1e-17	-3.991e+01	3.76%	1.88%	MA0280.1_CAT8/Jaspar(0.665)
6		1e-16	-3.810e+01	19.14%	14.76%	PL0017.1_hlh-2::hlh-10/Jaspar(0.726)
7		1e-15	-3.554e+01	52.70%	46.97%	MA0403.1_TBF1/Jaspar(0.736)

8		1e-15	-3.477e+01	38.06%	32.68%	MA0067.1_Pax2/ Jaspar(0.726)
9		1e-14	-3.406e+01	39.98%	34.59%	Initiator/Drosophila- Promoters/ Homer(0.791)
10		1e-14	-3.345e+01	15.46%	11.74%	Trl/dmmpmm (Pollard)/fly(0.641)
11		1e-14	-3.333e+01	35.36%	30.20%	MA0294.1_EDS1/ Jaspar(0.815)
12		1e-13	-3.190e+01	0.28%	0.01%	PB0174.1_Sox30_2/ Jaspar(0.700)
13		1e-13	-3.170e+01	15.22%	11.62%	MA0391.1_STB4/ Jaspar(0.728)
14		1e-13	-3.106e+01	0.24%	0.01%	MA0256.1_zen/ Jaspar(0.758)
15		1e-13	-3.034e+01	0.24%	0.01%	PH0062.1_Hoxb7/ Jaspar(0.692)
16		1e-12	-2.913e+01	22.80%	18.68%	ETS1(ETS)/Jurkat- ETS1-ChIP-Seq (GSE17954)/ Homer(0.699)
17		1e-12	-2.826e+01	41.94%	37.01%	MA0282.1_CEP3/ Jaspar(0.725)

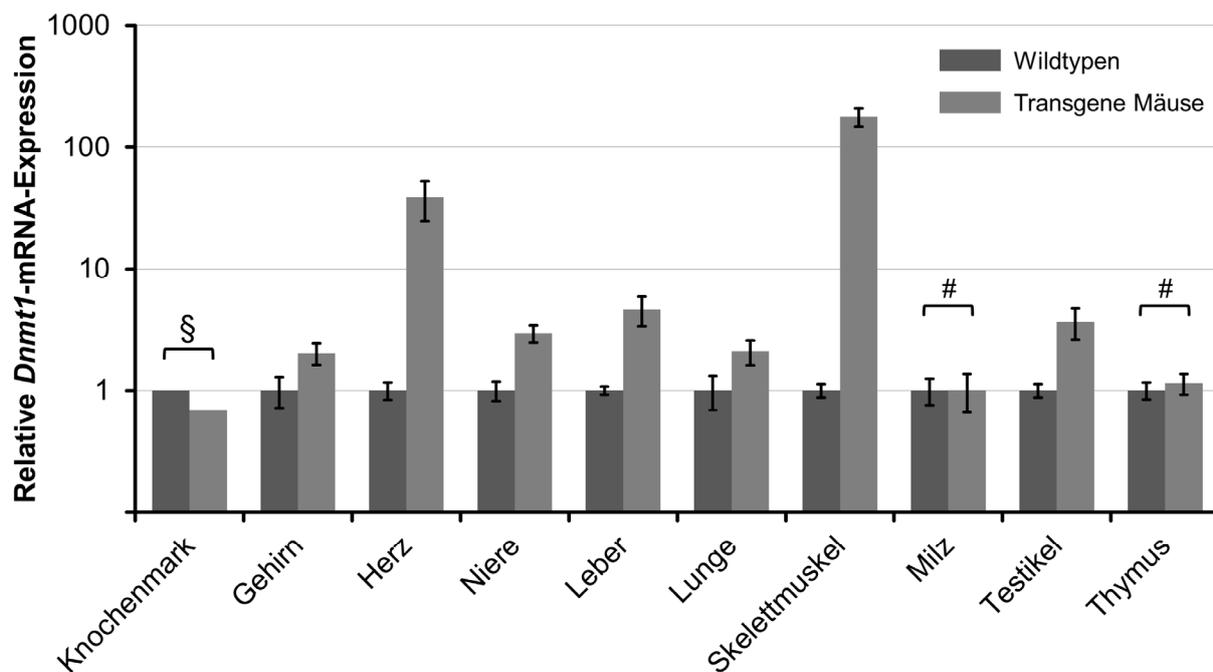


Abbildung A1: Die gewebeabhängige *Dnmt1*-Überexpression in transgenen Mäusen der Linie 2 folgte einem ähnlichen Muster wie Linie 4. Mittels qRT-PCR wurde die *Dnmt1*-Expression von transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistertieren verglichen. Für jedes Gewebe wurde die Expression der Wildtypen auf 1 gesetzt. Die relative *Dnmt1*-Expression war mit Ausnahme von Knochenmark, Milz und Thymus in Geweben transgener Tiere signifikant höher und zeigte gewebeabhängige Unterschiede [$n \geq 3$; $p < 0,05$, Student-*t*-Test; Knochenmark: je 5 vereinigte Proben]. Gezeigt sind Mittelwerte mitsamt Standardabweichung. Die höchste *Dnmt1*-Überexpression wiesen der Skelettmuskel ($179,2 \pm 30,7$) und das Herz auf ($38,6 \pm 14,0$). Eine zwei- bis fünffache Überexpression zeigten Gehirn ($2,0 \pm 0,4$), Niere ($2,9 \pm 0,5$), Leber ($4,6 \pm 1,3$), Lunge ($2,1 \pm 0,5$) und Testikel ($3,6 \pm 1,0$). Keine (signifikante) Überexpression wiesen Knochenmark ($0,7$), Milz ($1,0 \pm 0,4$) und Thymus ($1,1 \pm 0,2$) auf. §: keine Signifikanzberechnung, da vereinigte Gewebeproben; #: nicht signifikant. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014b.

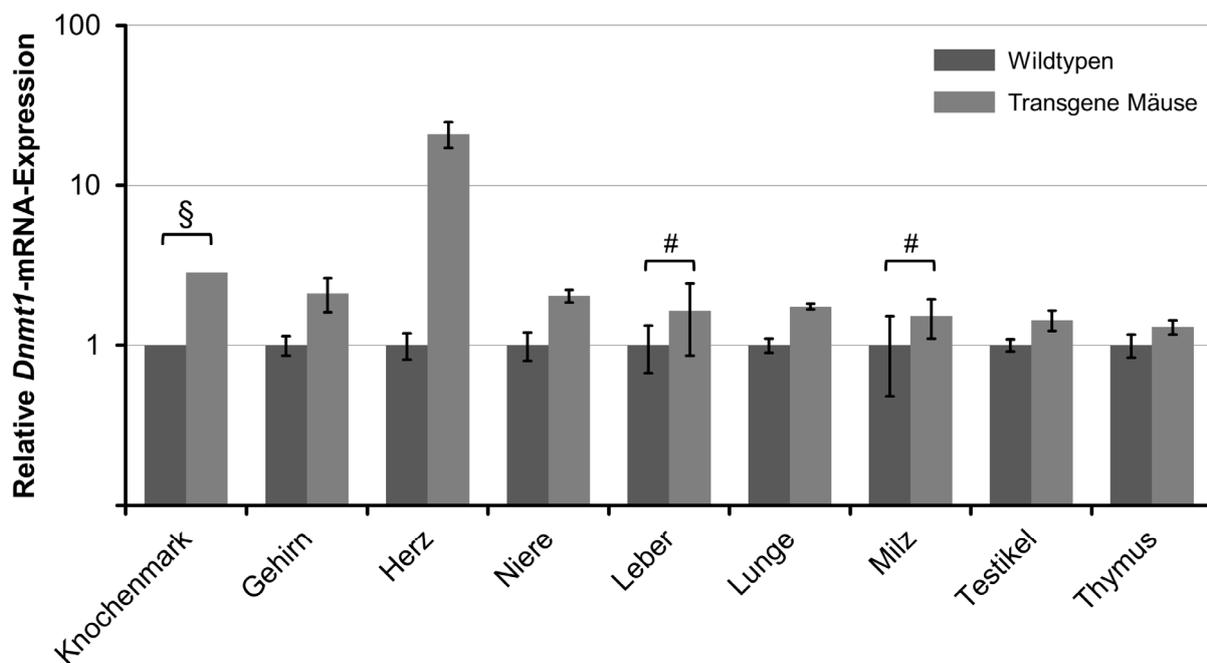


Abbildung A2: Transgene Mäuse der Linie 3 zeigten die schwächste gewebeabhängige *Dnmt1*-Überexpression aller drei Linien. Mittels qRT-PCR wurde die *Dnmt1*-Expression von transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistertieren verglichen. Für jedes Gewebe wurde die Expression der Wildtypen auf 1 gesetzt. Die relative *Dnmt1*-Expression war mit Ausnahme von Knochenmark, Leber und Milz in Geweben transgener Tiere signifikant höher und zeigte gewebeabhängige Unterschiede [$n = 4$; $p < 0,05$, Student-*t*-Test; Knochenmark: je 4 vereinigte Proben]. Gezeigt sind Mittelwerte mitsamt Standardabweichung. Die höchste *Dnmt1*-Überexpression wies das Herz auf ($21,1 \pm 4,0$). Eine 1,3- bis 2,9-fache Überexpression zeigten Knochenmark ($2,9$), Gehirn ($2,1 \pm 0,5$), Niere ($2,0 \pm 0,2$), Lunge ($1,7 \pm 0,1$), Testikel ($1,4 \pm 0,2$) und Thymus ($1,3 \pm 0,1$). Keine signifikante Überexpression wiesen Leber ($1,6 \pm 0,8$) und Milz ($1,5 \pm 0,4$) auf. §: keine Signifikanzberechnung, da vereinigte Gewebeproben; #: nicht signifikant. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2014b.

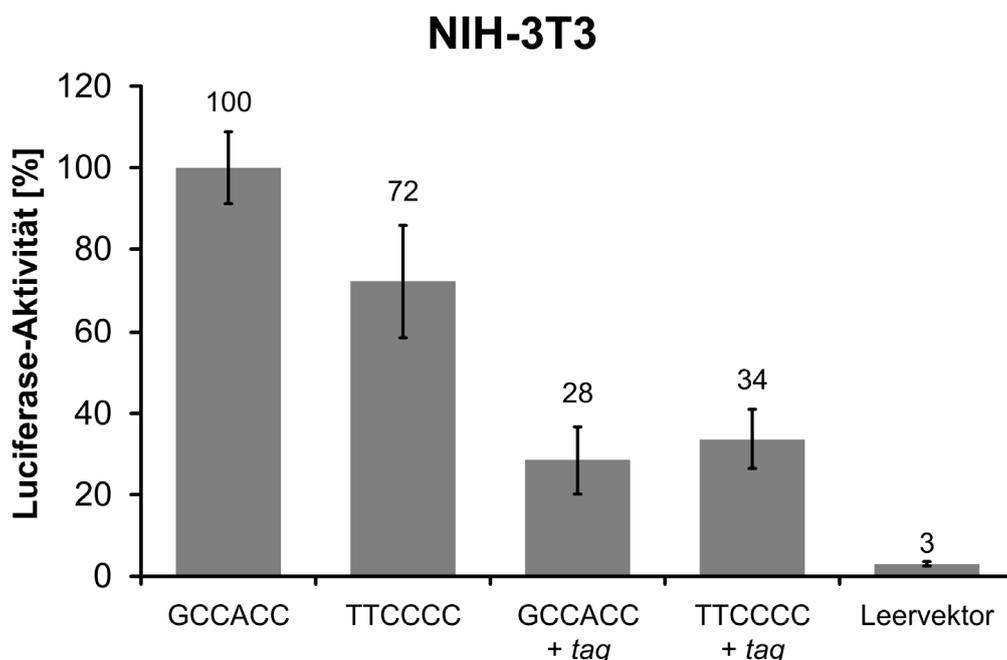


Abbildung A3: Die transgene *Dnmt1s*-Kozak-Sequenz und die Sequenz des RGS-His-tags verhinderten nicht die Proteintranslation in NIH-3T3-Mausfibroblasten (Experiment #1). Gezeigt ist das erste von drei unabhängigen Experimenten. Die Kozak-Sequenz des RGS-His-*Dnmt1s*-Gens (TTCCCC) aus der rekombinierten Version des Transgen-Konstrukts reduzierte die Luciferase-Aktivität auf 72% verglichen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCCACC) des *EGFP*-Gens aus der unrekombinierten Version. Das Anfügen des RGS-His-tags vor das Luciferase-Startcodon beider Konstrukte führte zu einer stärkeren Reduktion der Luciferase-Aktivität auf etwa 30%, ungeachtet der verwendeten Kozak-Sequenz. Verglichen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCCACC, auf 100% gesetzt) zeigten die übrigen Konstrukte einen signifikanten Aktivitätsverlust ($p < 0,01$, Student-*t*-Test). Bei dem Leervektor handelte es sich um das promotorlose Kontroll-Plasmid. Es wurden jeweils fünf Transfektionsansätze gemessen, dargestellt als Mittelwert mitsamt Standardabweichung.

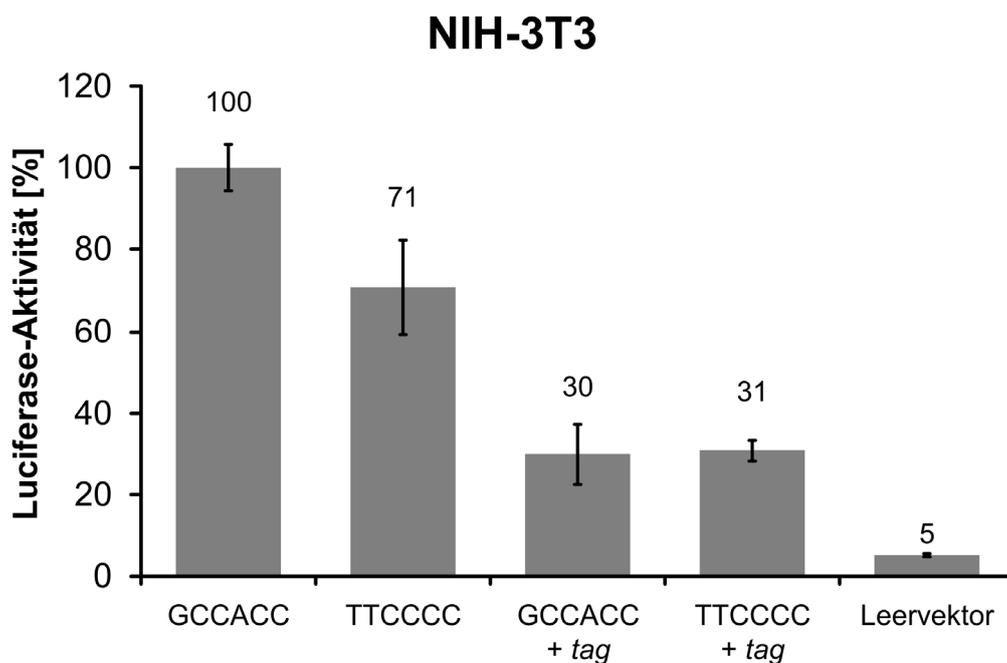


Abbildung A4: Die transgene *Dnmt1s*-Kozak-Sequenz und die Sequenz des RGS-His-tags verhinderten nicht die Proteintranslation in NIH-3T3-Mausfibroblasten (Experiment #3). Gezeigt ist das dritte von drei unabhängigen Experimenten. Die Kozak-Sequenz des RGS-His-*Dnmt1s*-Gens (TTCCCC) aus der rekombinierten Version des Transgen-Konstrukts reduzierte die Luciferase-Aktivität auf 71% verglichen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCCACC) des *EGFP*-Gens aus der unrekombinierten Version. Das Anfügen des RGS-His-tags vor das Luciferase-Startcodon beider Konstrukte führte zu einer stärkeren Reduktion der Luciferase-Aktivität auf etwa 30%, ungeachtet der verwendeten Kozak-Sequenz. Verglichen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCCACC, auf 100% gesetzt) zeigten die übrigen Konstrukte einen signifikanten Aktivitätsverlust ($p < 0,01$, Student-*t*-Test). Bei dem Leervektor handelte es sich um das promotorlose Kontroll-Plasmid. Es wurden jeweils fünf Transfektionsansätze gemessen, dargestellt als Mittelwert mitsamt Standardabweichung.

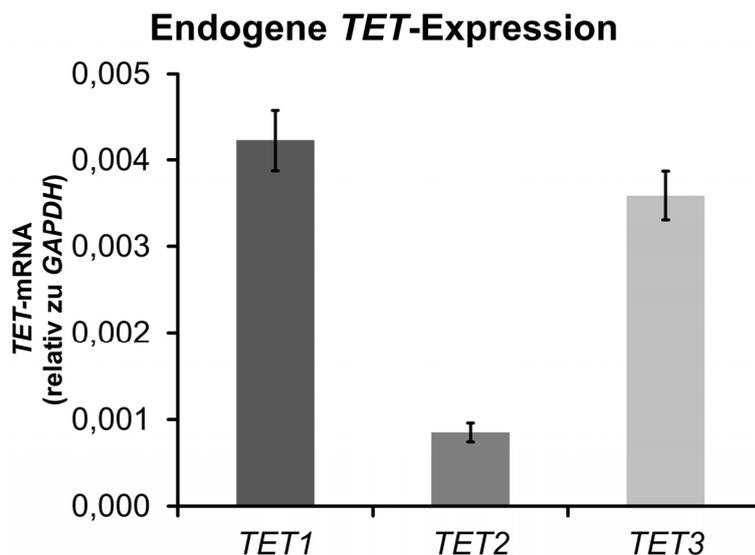


Abbildung A5: HEK293-Zellen besitzen niedrige endogene *TET*-Level. Die qRT-PCR zeigt niedrige basale *TET*-Transkriptlevel in mit Kontroll-siRNA behandelten T-REx-293-GFP-Zellen. Messungen wurden in Triplikaten in den T-REx-293-GFP-Zelllinien #1-3 durchgeführt und sind als Mittelwert mitsamt Standardabweichung aufgetragen. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

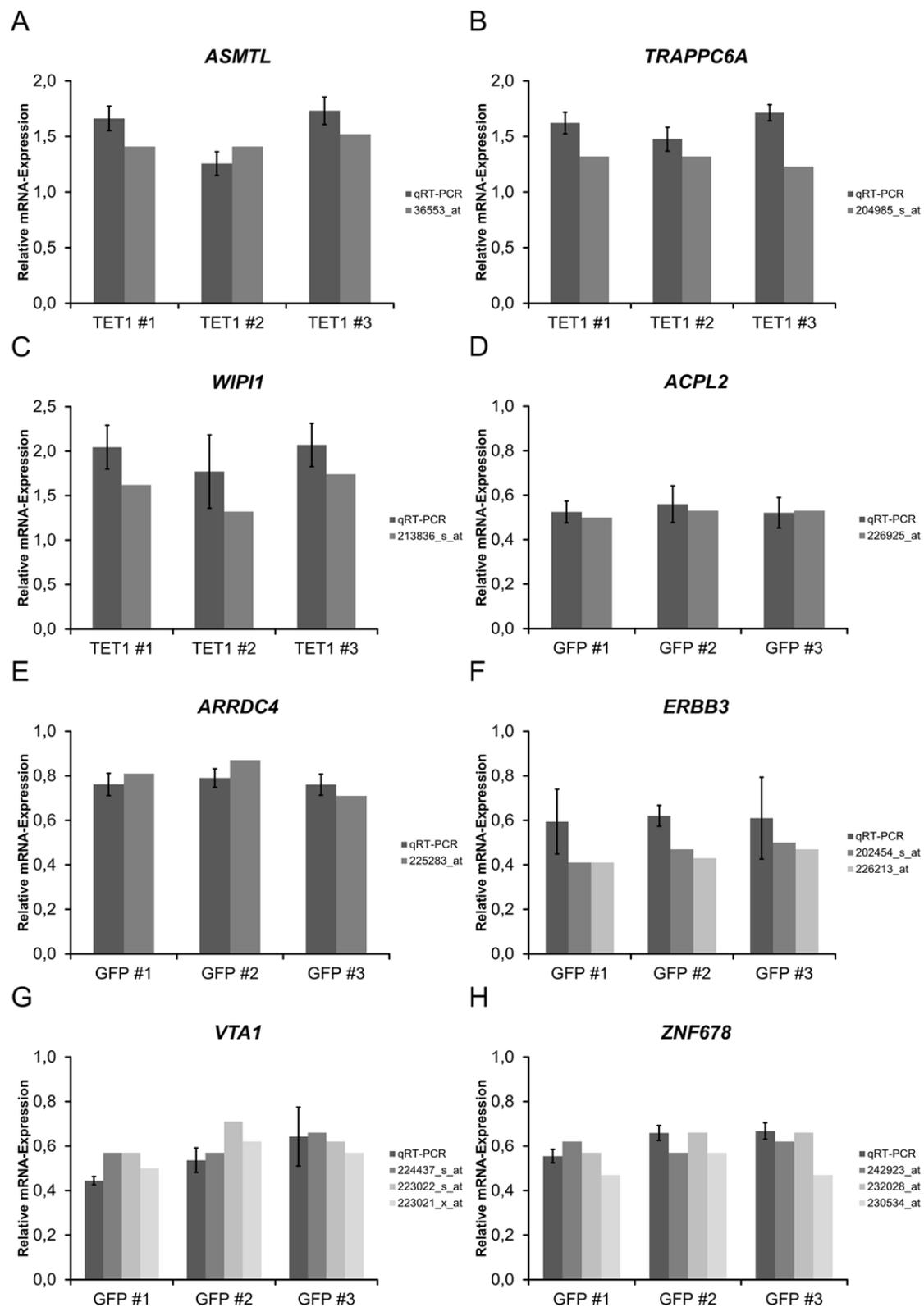


Abbildung A6: Exemplarische Verifikation der globalen Genexpressionsprofile mittels qRT-PCR. Expression hochregulierter Gene nach *TET1*-Überexpression (A-C) und herunterregulierter Gene nach *TET*-Knockdown (D-H) relativ zu nicht-induzierten bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Die Messungen mittels qRT-PCR erfolgten als Vierfach-Bestimmungen und sind als Mittelwert mitsamt Standardabweichung aufgetragen. Die interne Normalisierung erfolgte mittels *GAPDH*-Expression. Daten aus den globalen Expressionsprofilen sind mitsamt der Sonden-Set-Nummern (Affymetrix probe set IDs) angegeben. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

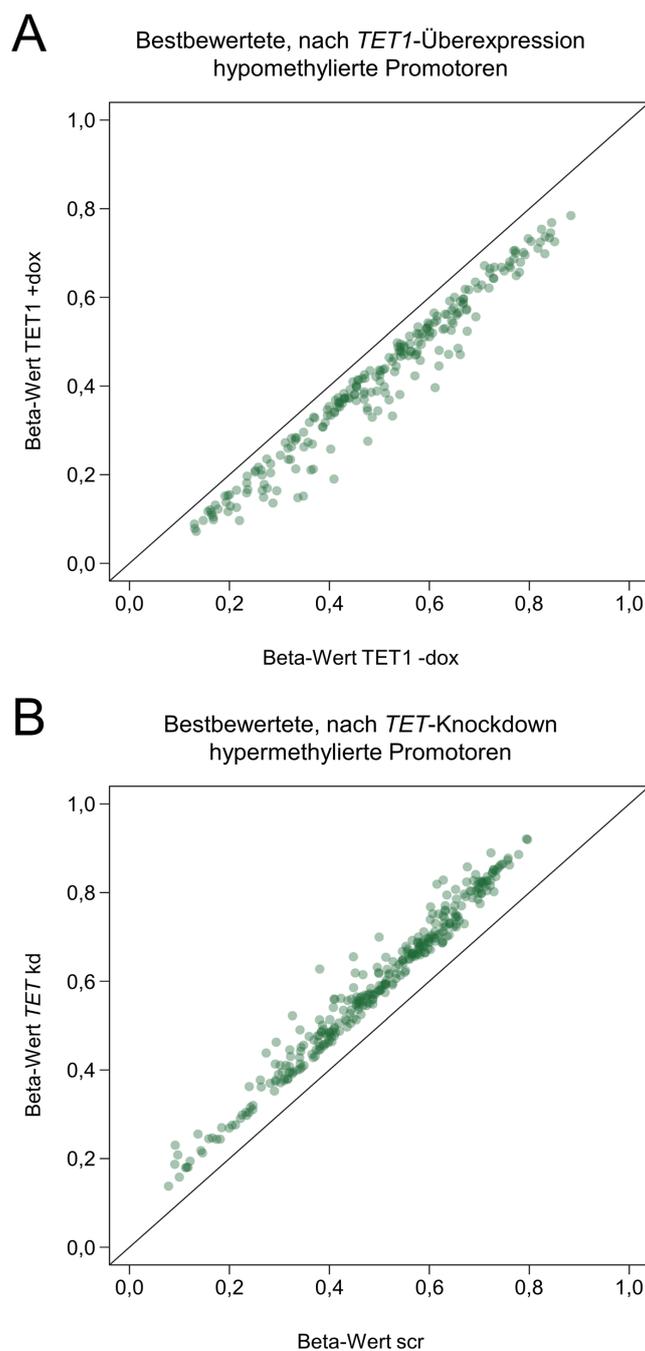


Abbildung A7: Bewahrung der charakteristischen Verteilungsmuster der bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren. Nach dem Filterschritt auf identische Gensymbole zwischen den Methylierungs- und Expressionsdatensätzen behielten die verbliebenen bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren die eine Methylierungsabnahme nach *TET1*-Überexpression (**A**) oder eine Methylierungszunahme nach dem *TET*-Knockdown zeigten (**B**), ihr charakteristisches, vom endogenen Methylierungsgrad abhängiges Verteilungsmuster bei. Gezeigt sind Vergleiche der durchschnittlichen Methylierungs-Beta-Werte nach induzierter Überexpression von *TET1* (*TET1* +dox) und Knockdown der *TET*-Transkripte (*TET* kd) mit den entsprechenden nicht-induzierten (*TET1* -dox) oder mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (scr). Die schwarze Linie verdeutlicht eine perfekte, positive Korrelation. *TET1*-Überexpression: $n = 234$; *TET*-Knockdown: $n = 322$. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

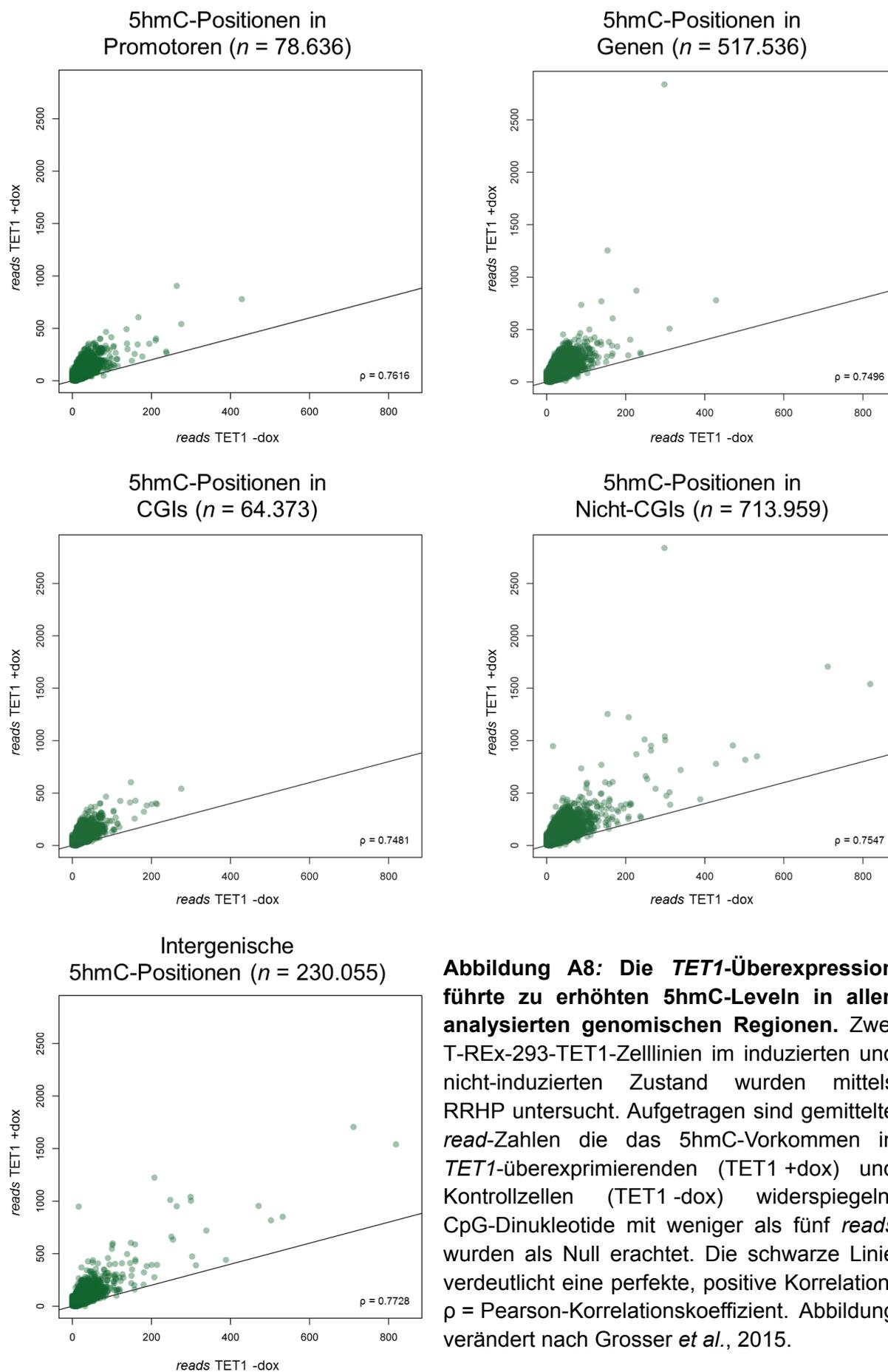


Abbildung A8: Die *TET1*-Überexpression führte zu erhöhten 5hmC-Leveln in allen analysierten genomischen Regionen. Zwei T-Rex-293-TET1-Zelllinien im induzierten und nicht-induzierten Zustand wurden mittels RRHP untersucht. Aufgetragen sind gemittelte *read*-Zahlen die das 5hmC-Vorkommen in *TET1*-überexprimierenden (TET1 +dox) und Kontrollzellen (TET1 -dox) widerspiegeln. CpG-Dinukleotide mit weniger als fünf *reads* wurden als Null erachtet. Die schwarze Linie verdeutlicht eine perfekte, positive Korrelation. ρ = Pearson-Korrelationskoeffizient. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

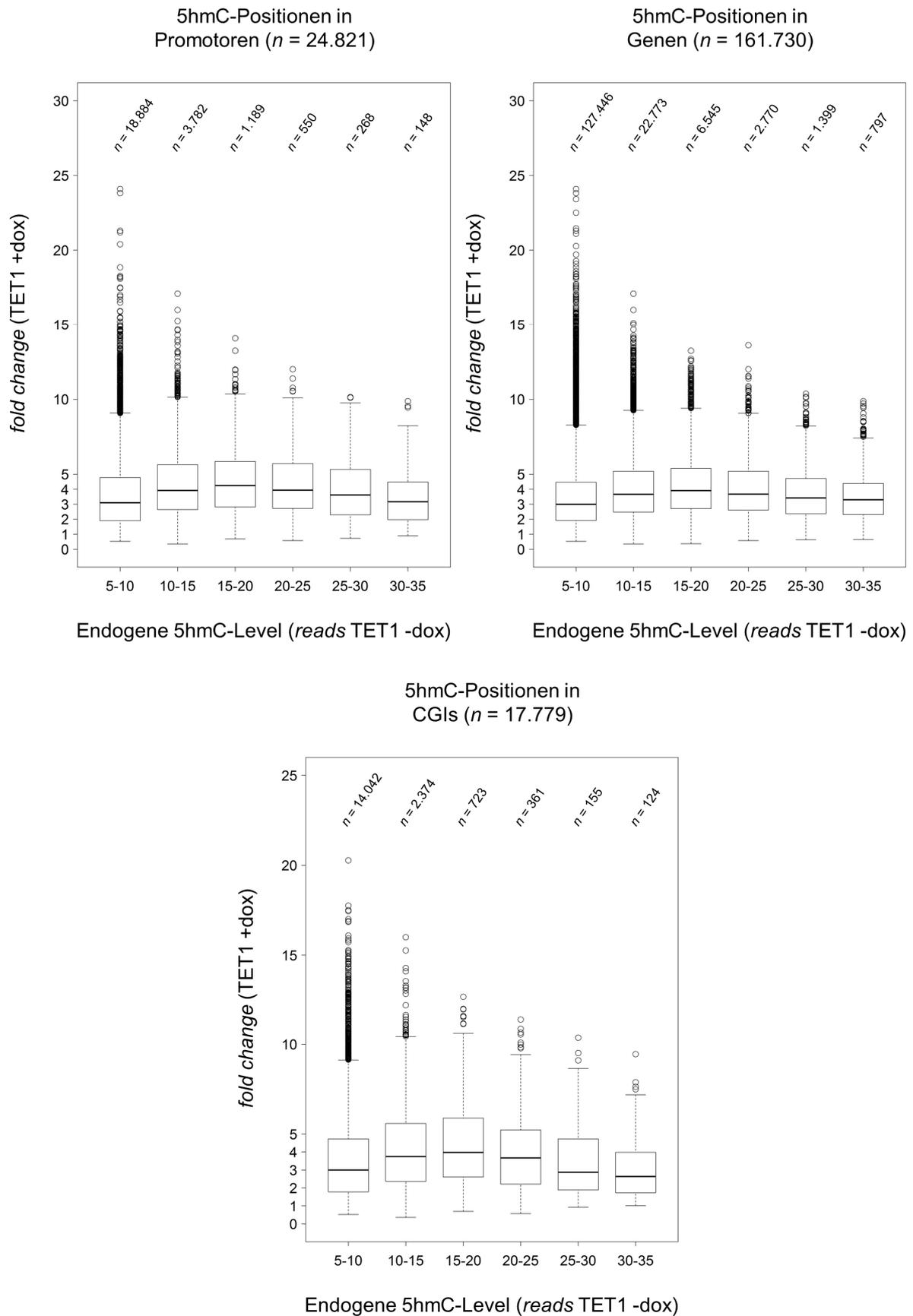


Abbildung A9: Die TET1-vermittelte 5mC-Oxidation war in verschiedenen genomischen Regionen mit endogenen 5hmC-Leveln assoziiert. (Fortsetzung nächste Seite)

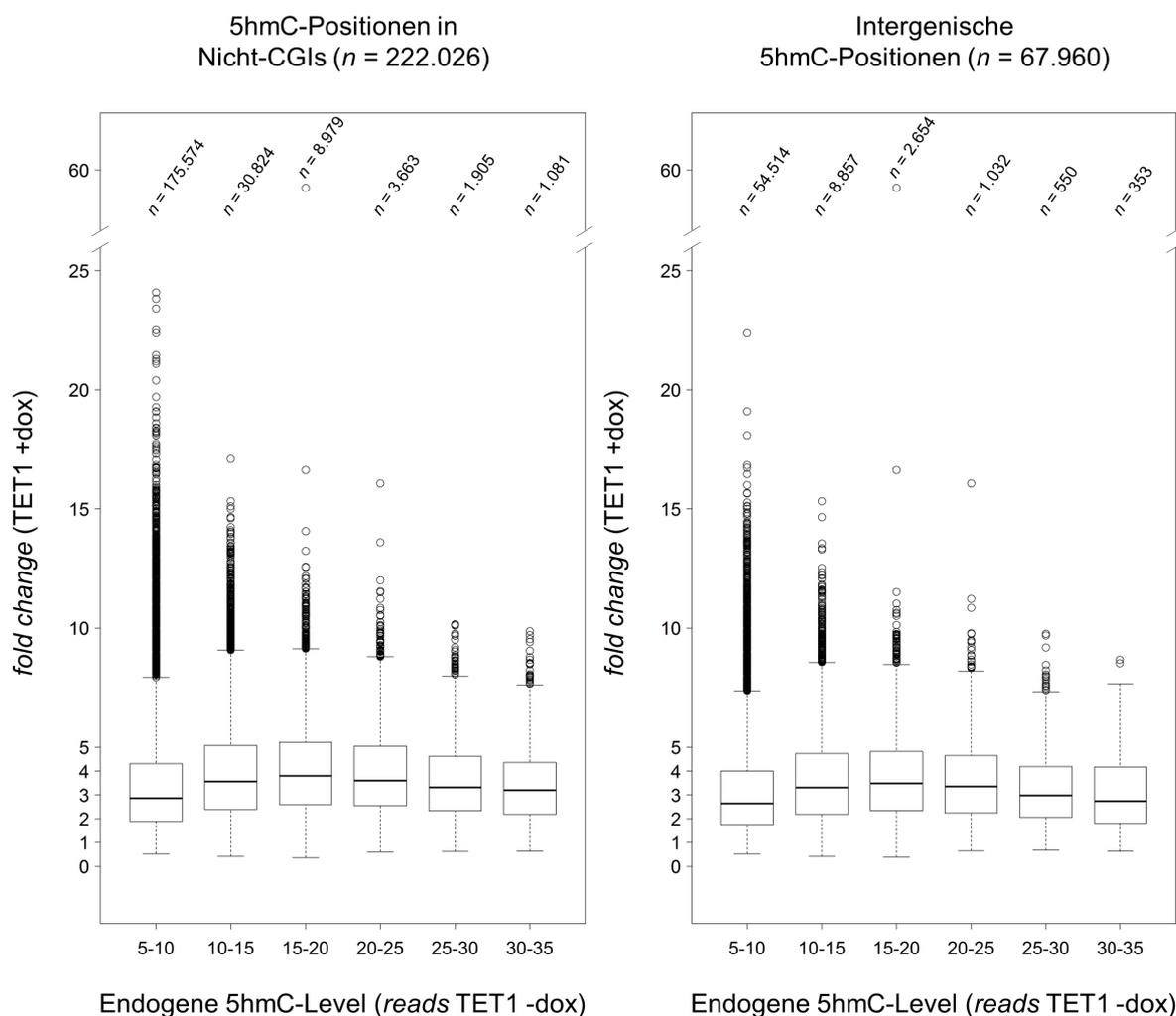


Abbildung A9: Die TET1-vermittelte 5mC-Oxidation war in verschiedenen genomischen Regionen mit endogenen 5hmC-Leveln assoziiert. Die endogenen 5hmC-read-Level in Kontrollzellen (*reads TET1 -dox*) sind in 5er-Klassen gegen den *fold change* der 5hmC-Level aufgetragen, der sich nach *TET1*-Überexpression ergab (*TET1 +dox*). CpG-Dinukleotide mit einem endogenen 5hmC-Level von 15-20 *reads* zeigten den stärksten Zuwachs. Nur CpG-Dinukleotide mit mindestens fünf 5hmC-reads in Kontroll- bzw. *TET1*-überexprimierenden Zellen wurden gewertet. Die Länge der Boxen entspricht dem Interquartilsabstand; die Antennen markieren maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand. Ausreißer sind eingezeichnet. Abbildung verändert nach Grosser *et al.*, 2015.

9. Übersicht des erweiterten Anhangs

Der erweiterte, digitale Anhang dieser Arbeit enthält Details zum Einfluss veränderter TET-Dioxygenase-Level auf HEK293-Zellen und ergänzt die beschriebenen Ergebnisse. Die zusätzlichen Informationen sind in den Tabellen E1- E20 aufgeführt.

Tabelle E1. Liste der 1.000 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren. Die Tabelle bezieht sich auf Abbildung 16A.

Tabelle E2. Liste der 1.000 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, differentiell methylierten Gene. Die Tabelle bezieht sich auf Abbildung 16B.

Tabelle E3. Liste der 1.000 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, differentiell methylierten CGIs. Die Tabelle bezieht sich auf Abbildung 16C.

Tabelle E4. Liste der 1.000 nach *TET*-Knockdown bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren. Die Tabelle bezieht sich auf Abbildung 16D.

Tabelle E5. Liste der 1.000 nach *TET*-Knockdown bestbewerteten, differentiell methylierten Gene. Die Tabelle bezieht sich auf Abbildung 16E.

Tabelle E6. Liste der 1.000 nach *TET*-Knockdown bestbewerteten, differentiell methylierten CGIs. Die Tabelle bezieht sich auf Abbildung 16F.

Tabelle E7. Liste der 500 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, mit einem Gensymbol annotierten differentiell methylierten Promotoren.

Tabelle E8. Liste der 500 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, mit einem Gensymbol annotierten differentiell methylierten Gene.

Tabelle E9. Liste der 500 nach *TET1*-Überexpression bestbewerteten, differentiell methylierten CGIs.

Tabelle E10. Liste der 500 nach *TET*-Knockdown bestbewerteten, mit einem Gensymbol annotierten differentiell methylierten Promotoren.

Tabelle E11. Liste der 500 nach *TET*-Knockdown bestbewerteten, mit einem Gensymbol annotierten differentiell methylierten Gene.

Tabelle E12. Liste der 500 nach *TET*-Knockdown bestbewerteten, differentiell methylierten CGIs.

Tabelle E13. Liste der nach *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown konsistent identifizierten Promotoren. Analysiert wurden die 500 bestbewerteten, differentiell methylierten Promotoren. Diese Tabelle bezieht sich auf Tabelle 3.

Tabelle E14. Liste der nach *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown konsistent identifizierten Gene. Analysiert wurden die 500 bestbewerteten, differentiell methylierten Gene. Diese Tabelle bezieht sich auf Tabelle 3.

Tabelle E15. Liste der nach *TET1*-Überexpression und *TET*-Knockdown konsistent identifizierten CGIs. Analysiert wurden die 500 bestbewerteten, differentiell methylierten CGIs. Diese Tabelle bezieht sich auf Tabelle 3.

Tabelle E16. Liste der nach *TET1*-Überexpression deregulierten Transkripte.

Tabelle E17. Liste der nach *TET*-Knockdown deregulierten Transkripte.

Tabelle E18. Liste der 500 nach *TET1*-Überexpression am stärksten *de novo* 5hmC-gewinnenden Promotoren.

Tabelle E19. Liste der 500 nach *TET1*-Überexpression am stärksten nach *fold change* an 5hmC-gewinnenden Promotoren.

Tabelle E20. Liste der 18 Promotoren, die eine differentielle Methylierung in den BeadChip-Analysen zeigten und eine *de novo*- oder *fold change*-5hmC-Zunahme nach *TET1*-Überexpression aufwiesen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für die Vergabe der interessanten Forschungsprojekte, die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreichen Ideen und Anregungen zum Verlauf dieser Arbeit.

Meinem „Vorgänger“ Dr. Nicholas Wagner danke ich für die umfangreiche Einarbeitung, seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei verschiedenen Projekten. Meinen Labornachbarn Jasmin Beygo und Lisa Neumann möchte ich für viele spannende Diskussionen, zahlreiche Tipps & Tricks und ein leises Radio danken.

Dank gebührt auch Dr. Laura Steenpaß - als Ratsuchender war man bei ihr stets gut aufgehoben.

Des Weiteren danke ich **allen** Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung und die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1431 „Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung“.

Bei Dr. Hans Klafki und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für interessante Diskussionen und die Hilfe beim Arbeiten mit Proteinen bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung.

Ganz besonders danke ich aber Patrizia für ihr Vertrauen und ihr Verständnis!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zur Bedeutung der DNA-Methylierung und methylierungsmodulierender Enzyme in verschiedenen Zellsystemen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christian Grosser befürworte.

Essen, den _____ Prof. Dr. Bernhard Horsthemke _____
Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____ _____
Unterschrift des Doktoranden
(Christian Grosser)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____ _____
Unterschrift des Doktoranden
(Christian Grosser)