

**Genomisches Imprinting**  
**Beckwith-Wiedemann Syndrom assoziierter Gene:**  
**Analyse differentieller Methylierung und**  
**allelspezifischer Genexpression**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Thorsten Enklaar**

geboren am 24.09.1967 in Rheda-Wiedenbrück

**Mainz, 2004**

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.05

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Mäusezucht.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Gewebepreparation .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Isolierung von Nukleinsäuren.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Isolierung von DNA aus Mausgeweben .....	23
2.3.2 Isolierung von DNA aus Blut .....	24
2.3.3 Isolierung von PAC-DNA.....	24
2.3.4 Isolierung von RNA aus Mausgeweben.....	24
2.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmungen.....	25
<b>2.4 Modifikation genomischer DNA mit Bisulfit.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 DNA und RNA-Standardmethoden .....</b>	<b>27</b>
2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.5.2 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen .....	28
2.5.3 Fällung von DNA.....	28
2.5.4 cDNA-Synthese durch reverse Transkription .....	29
2.5.5 Amplifikation von cDNA-Enden (RACE).....	29
2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.5.7 RNA-Transfer von Agarosegelen auf Nylonmembranen (Northern Blot).....	31
2.5.8 DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nylonmembranen (Southern Blot).....	32
<b>2.6 Radioaktive DNA-Markierung.....</b>	<b>32</b>
<b>2.7 Nukleinsäure-Hybridisierung.....</b>	<b>33</b>
2.7.1 DNA-RNA-Hybridisierung.....	33
2.7.2 DNA-DNA-Hybridisierung .....	33
<b>2.8 Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren .....</b>	<b>34</b>
2.8.1 Vektorvorbereitung .....	34
2.8.2 Ligation .....	34
2.8.3 Transformation und Klonierung.....	35
<b>2.9 DNA-Sequenzierung .....</b>	<b>36</b>
<b>2.10 GeneScan Fragmentanalysen.....</b>	<b>37</b>
<b>2.11 Echtzeit-PCR und Schmelzpunktbestimmung.....</b>	<b>37</b>
<b>2.12 Anhang.....</b>	<b>39</b>
2.12.1 Puffer und Lösungen.....	39
2.12.2 Oligonukleotidsequenzen.....	41
2.12.3 Chemikalien, Enzyme, Materialien.....	44
2.12.4 Geräte.....	46
2.12.5 Mauseinzuchtstämme .....	46
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der <i>H19</i>-Promotorregion .....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Sequenzierung der DNA von Kontrollpersonen .....	48
3.1.2 Sequenzierung der DNA von Patienten mit Verdacht auf BWS.....	51

<b>3.2 Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der <i>H19</i>-A1/ B1-Repeat-Region.....</b>	<b>54</b>
3.2.1 Sequenzierung der DNA von Kontrollpersonen .....	54
3.2.2 Sequenzierung der DNA von Patienten mit Verdacht auf BWS.....	57
<b>3.3 Untersuchung der KvDMR.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4 Untersuchung der Methylierung der BWS-assoziierten DMRs mit Hilfe der Echtzeit-PCR .....</b>	<b>63</b>
3.4.1 Echtzeit-PCR und Schmelzpunktbestimmung des <i>H19</i> -B1-Repeats .....	63
3.4.2 Echtzeit-Amplifikation der KvDMR .....	65
<b>3.5 Isolierung und Charakterisierung des murinen <i>Trpm5</i>-Gens.....</b>	<b>67</b>
3.5.1 Chromosomale Lokalisation des murinen <i>Trpm5</i> -Gens.....	67
3.5.2 Ermittlung der cDNA-Sequenz und der Exon-Intron Struktur des murinen <i>Trpm5</i> -Gens .....	67
3.5.3 Analyse der <i>Trpm5</i> -Expression.....	68
3.5.4 Vorhersage der <i>Trpm5</i> -Proteinstruktur .....	71
3.5.5 Etablierung einer Methode zur Untersuchung einer gewebe- und entwicklungsabhängigen allelspezifischen Genexpression .....	72
3.5.6 Biallelische Expression der <i>Trpm5</i> -mRNA .....	76
<b>3.6 Untersuchung der gewebe- und allelspezifischen Expression des murinen <i>Ascl3</i>-Gens in der     Embryonalentwicklung .....</b>	<b>78</b>
3.6.1 Expression des murinen <i>Ascl3</i> -Gens in der Embryonalentwicklung .....	78
3.6.2 Untersuchung der allelspezifischen <i>Ascl3</i> -Expression.....	80
<b>3.7 Untersuchung der allelspezifischen Expression weiterer Gene .....</b>	<b>83</b>
3.7.1 Imprintinguntersuchung des <i>Cd81</i> -Gens.....	83
3.7.2 Imprintinguntersuchung des <i>Kcnq1ot1</i> -Gens.....	84
3.7.3 Imprintinguntersuchung des <i>Nap114</i> -Gens .....	86
3.7.4 Untersuchung der allelspezifischen Expression von nicht auf dem murinen Chromosom 7 lokalisierten Genen .....	90
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>92</b>
<b>4.1 Untersuchung der Methylierung der Promotorregion des <i>H19</i>-Gens.....</b>	<b>94</b>
<b>4.2 Untersuchung der allelspezifischen Methylierung des B1/A1-Repeats in der <i>H19-IGF2</i>-     Insulatorregion.....</b>	<b>98</b>
4.2.1 Identifikation der parental Allele .....	99
4.2.2 Variable Methylierung des A1-Repeats .....	99
4.2.3 BWS-Patienten mit monoallelisch paternaler Methylierung des B1-Repeats.....	101
4.2.4 BWS-Patienten mit biallelisch unmethyliertem B1-Repeat.....	102
<b>4.3 Isolierung und Charakterisierung des murinen <i>Trpm5</i>-Gens.....</b>	<b>111</b>
<b>4.4 Untersuchung der allelspezifischen Expression weiterer Gene der distalen Imprintingregion des     murinen Chromosoms 7F4.....</b>	<b>118</b>
4.4.1 Expression des <i>Cd81</i> -Gens .....	118
4.4.2 Expression des <i>Kcnq1ot1</i> -Gens .....	119
4.4.3 Expression des <i>Nap114</i> -Gens .....	122
<b>4.5 Isolierung und Charakterisierung des murinen <i>Ascl3</i>-Gens.....</b>	<b>126</b>
<b>4.6 Ausblick.....</b>	<b>134</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>136</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Anordnung der Gene des distalen Abschnitts des humanen Chromosoms 11p15.5.....	5
Abbildung 1.2: Modelle für die Regulation der reziproken Expression der Gene <i>H19</i> und <i>Igf2</i> .....	10
Abbildung 1.3: Struktur der A- und B-Repeats der humanen <i>H19</i> -ICR.....	11
Abbildung 3.1: Darstellung der <i>H19</i> -Promotorregion (gb AF125183) .....	48
Abbildung 3.2: Methylierungsmuster der <i>H19</i> -Promotorregion der Kontrollperson 1087-01 .....	50
Abbildung 3.3: Methylierungsmuster der <i>H19</i> -Promotorregion der Kontrollpersonen 1073-00 (A) und 922-01 (B).....	51
Abbildung 3.4: Methylierungsmuster der <i>H19</i> -Promotorregion des BWS-Patienten 643-99 .....	52
Abbildung 3.5: Methylierungsmuster der <i>H19</i> -Promotorregion des BWS-Patienten 427-99 .....	53
Abbildung 3.6: Ausschnitt der <i>H19</i> -A1/B1-Repeat-Region (gb AF125183) .....	55
Abbildung 3.7: Methylierung der 27 untersuchten CpGs des B1/A1-Repeats der Kontrollperson 922-00.....	56
Abbildung 3.8: Methylierung der untersuchten CpGs der B1/A1-Repeats der BWS-Patienten 1524-99 (a), 568-01 (b), 806-00 (c) und 176-00 (d).....	58
Abbildung 3.9: Methylierung der untersuchten CpGs der B1/A1-Repeats der BWS-Patienten 536-99 (a), 738-99 (b), 287-00 (c) und 736-01 (d).....	59
Abbildung 3.10: Untersuchung der Methylierung der <i>KCNQ1OT1</i> assoziierten DMR .....	61
Abbildung 3.11: Allelspezifisches Methylierungsmuster der KvDMR der Kontrollperson 844-00 .....	62
Abbildung 3.12: Amplifikation eines 287 bp großen <i>H19</i> -B1-Fragments unter Einbau von SYBR-Green und Darstellung der allelabhängigen Schmelztemperaturen.....	64
Abbildung 3.13: Amplifikation eines 404 bp großen KvDMR-Fragments unter Einbau von SYBR-Green und Darstellung der allelabhängigen Schmelztemperaturen.....	65
Abbildung 3.14: Gemeinsame Amplifikation methylierter und unmethylierter Einzelklon-DNA.....	66
Abbildung 3.15: cDNA-Sequenz und vorhergesagte Aminosäuresequenz des <i>Trpm5</i> -Gens.....	69
Abbildung 3.16: Exon-Intron-Grenzen des murinen <i>Trpm5</i> -Gens .....	70
Abbildung 3.17: Hybridisierung der <i>Trpm5</i> -cDNA-Sonde auf einen murinen adulten Northern-Blot .....	71
Abbildung 3.18: Vergleich der putativen humanen und murinen Aminosäuresequenzen.....	72
Abbildung 3.19: Für die Untersuchungen der allelspezifischen Genexpression verwendete Maus- Inzuchtstämme .....	73
Abbildung 3.20: Biallelische Expression des <i>Th</i> -Gens .....	74
Abbildung 3.21: Allelspezifische Expression des <i>Igf2r</i> -Gens.....	75
Abbildung 3.22: Untersuchung der <i>Trpm5</i> -cDNA-Sequenzen der reziproken Kreuzungen der beiden Mausstämme JF1 und C57Bl/10 in embryonalen und adulten Geweben.....	77
Abbildung 3.23: Isoformen des <i>Ascl3</i> -Transkripts .....	79
Abbildung 3.24: Expression der <i>Ascl3</i> -Isoform II in der murinen Embryonalentwicklung .....	81
Abbildung 3.25: Expression der <i>Ascl3</i> -Isoformen I und III in der Embryonalentwicklung .....	82
Abbildung 3.26: Untersuchung der Expression der parentalen Allele des <i>Cd81</i> -Gens .....	83
Abbildung 3.27: Amplifikation der <i>Kcnq1ot1</i> -cDNA in Geweben 14,5 Tage alter Embryonen.....	84
Abbildung 3.28: Expression der Allele des <i>Kcnq1ot1</i> -Gens .....	85
Abbildung 3.29: Sequenzierung der cDNA-Amplifikate des <i>Nap114</i> -Gens.....	87

---

Abbildung 3.30: Darstellung der cDNA-Amplifikate der Milz des <i>Nap114</i> -Gens in der GeneScan-Analyse.....	88
Abbildung 3.31: Expression des <i>Glucokinase</i> -Gens in der Leber .....	91
Abbildung 4.1: Lokalisationen der untersuchten orthologen humanen und murinen Gene.....	93
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der TRP-Kanalproteine .....	113
Abbildung 4.3: Modelle für die Aktivität der <i>Kcnq1ot1</i> -ICR .....	120
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der alternativen Expression der <i>Asc13</i> -Isoformen .....	130
Tabelle T1.1: Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der <i>H19</i> -Promotorregion und der KvDMR in der Promotorregion des <i>KCNQ1OT1</i> -Gens. ....	15
Tabelle T3.1: Übersicht der untersuchten A1/B1-Einzelklonamplifikate aller Patienten-DNAs deren allelspezifische Methylierung ermittelt wurde.....	59
Tabelle T3.2: Quotient der Expressionsstärken der parentalen <i>Nap114</i> -Allele in untersuchten Geweben .....	89

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CpG	<i>cytosine phosphorylated guanine</i> , Cytosin-Guanin-Dinukleotid
cpm	<i>counts per minute</i>
CRC	Kolorektalkarzinom
CTCF	CCCTC-bindender Faktor
CTS	CTCF-Zielsequenz
DMR	differenziell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dpc	Tage nach Koitus
e	embryonal
E. coli	<i>Escherichia coli</i> -Bakterien
G	Guanin
IC	Imprintingzentrum
ICR	Imprinting-Kontrollregion
LOH	Verlust der Heterozygotie
LOI	Verlust der Prägung
LOM	Verlust der Methylierung
$\gamma$	mikro
mat.	mütterlich
Mb	Megabasen
nt	Nukleotid
pat.	väterlich
pc	nach Koitus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ROI	Beibehaltung der Prägung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TM	Transmembran-Domäne
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UPD	uniparentale Disomie
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht translatierte Region
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
Vol.	Volumen
♀	weiblich, Weibchen
♂	männlich, Männchen

# 1. Einleitung

Im menschlichen Genom existieren von jedem autosomalen Gen zwei Kopien, jeweils eine Kopie stammt von der Mutter und eine vom Vater. Die ursprüngliche Annahme, dass für die Funktion eines Gens grundsätzlich die elterliche Herkunft keine Rolle spielt, konnte Mitte der 80er Jahre durch Experimente mit gyno- und androgenetischen Mausembryonen widerlegt werden (McGrath und Solter 1984). Es konnte gezeigt werden, dass nicht allein ein vollständiger diploider Chromosomensatz für die Entwicklung des Embryos notwendig ist, sondern dass sowohl eine Kopie des väterlichen, wie auch des mütterlichen Genoms vorhanden sein muss. Der Grund hierfür ist, dass bei einer Gruppe von Genen in Abhängigkeit der elterlichen Herkunft eines der beiden Allele inaktiv vorliegt und die Expression daher vor allem oder ausschließlich von der anderen elterlichen Kopie stattfindet. Bis heute sind ca. 50 allelspezifisch aktive humane Gene bekannt (<http://cancer.otago.ac.nz/IGC/Web/home.html>) und es wird angenommen, dass im menschlichen Genom etwa 200 Gene existieren, von denen eine der beiden Kopien in Abhängigkeit von ihrer elterlichen Herkunft inaktiv ist. Eine in einer allelspezifischen Inaktivierung resultierende Unterscheidung der elterlichen Genkopien wird als genomische Prägung (*genomic imprinting*) bezeichnet. Dieser Begriff illustriert die Annahme, dass die betroffenen Gene bereits vor der Fusion der elterlichen Genome in der männlichen bzw. weiblichen Keimbahn unterschiedlich markiert werden (Brannan und Bartolomei 1999; Pfeifer, 2000), und dass eine solche genomische Markierung in der Zygote und über die folgenden Zellteilungen hinaus erhalten bleibt. Damit unterscheiden sich die elterlichen Genome auch bei identischen Nukleotidsequenzen in allen somatischen Zellen des Kindes. Es ist möglich, dass eine solche Prägung direkt die Aktivierbarkeit der Gene beeinflusst, oder zunächst nur eine generelle Unterscheidungsmöglichkeit der Allele darstellt, die erst später in der Inaktivierung einer Kopie resultiert. Die elternspezifische Allelmarkierung muss bei der Produktion der eigenen Gameten wieder gelöscht und geschlechtsspezifisch neu gesetzt werden. Da sich hierbei die DNA-Sequenz selbst nicht verändert, muss diese Markierung auf einer anderen, „epigenetischen“ Ebene stattfinden. Der Begriff „Epigenetik“ stammt bereits aus den 50-er Jahren und wurde damals schon verwendet, um Unterschiede in der Genexpression, die nicht auf Sequenzunterschiede zurückgehen, zu beschreiben (Waddington, 1957). Diese Definition wurde mit dem Wissen um die Charakteristika imprinteter Gene dahingehend erweitert, als dass man als „epigenetisch“ alle meiotisch und/oder mitotisch vererbaren Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch



Veränderungen der DNA-Sequenz selbst hervorgerufen werden, bezeichnet (Wu und Morris, 2001).

Ein solches epigenetisches Imprint kann z.B. in einer Modifikation des DNA-Strangs oder der DNA-assoziierten Moleküle, wie der Histone, bestehen. Bestimmte einzelne Histonaminosäuren können allelspezifisch acetyliert, methyliert oder phosphoryliert werden. Die einzige bisher bekannte Modifikation der DNA selbst, auf die die Definition eines epigenetischen Imprints zutrifft, ist die DNA-Methylierung. Bei Säugern sind vor allem Cytosinbasen in CpG- („*cytosine phosphorylated guanine*“-) Dinukleotiden methyliert.

Die Methylierung von Cytosin zu 5'-Methylcytosin erfolgt beim Menschen durch die von DNA-Methyltransferasen katalysierte Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das C5-Atom des Cytosinmoleküls.

Für die enzymatische Reaktion die durch die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) während der Zellproliferation in den Replikationsblasen katalysiert wird, muss die Ziel-DNA hemimethyliert vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass methylierte DNA allosterisch das katalytische Zentrum von DNMT1 aktivieren kann (Fatemi et al., 2001). Durch diese Reaktion wird die DNA an einer Stelle also nicht neu methyliert, sondern die Methylierung von CpG-Dinukleotiden wird nach der Zellteilung auf den komplementären neu synthetisierten Tochterstrang kopiert und damit zellteilungsstabil erhalten. Auch in anderen bekannten Nukleotidkonstellationen, die bezüglich der Cytosin-Guanin-Abfolge komplementär palindromisch sind, wie z.B. C<sup>m</sup>NG oder C<sup>m</sup>CATGG, können die Cytosinmethylierungen komplementär kopiert werden (Clark et al., 1995; Malone et al., 2001).

Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei einer Reihe physiologischer Prozesse, wie der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen, der Organisation der Chromatinstruktur, der Inaktivierung eines Allels beim genomischen Imprinting und bei der zelltypspezifischen Regulation der Expression nicht imprinteter Gene vor allem in der Embryonalentwicklung. Die Addition der Methylgruppe bewirkt zum einen eine Formveränderung der großen Furche der DNA (Razin und Riggs, 1980), in der die Bindung von Proteinen an die DNA stattfindet, zum anderen kann eine Gruppe von Proteinen, deren Mitglieder als MeCPs bezeichnet werden, spezifisch methylierte CpG-Dinukleotide erkennen und binden. Sie können, wie z.B. MeCP2, neben der Methyl-CpG bindenden Domäne (MBD) auch eine die Transkription unterdrückende Domäne (TRD) besitzen. Zusätzlich können durch die Bindung von MeCPs weitere Enzyme rekrutiert werden, die DNA-assoziierte Proteine modifizieren und dadurch eine Geninaktivierung auf Chromatinebene etablieren

können. Dies konnte ebenfalls für MeCP2 gezeigt werden, das als Mitglied eines Histon-Deacetylase-Komplexes über die Bindung an methylierte Cytosine eine Deacetylierung der N-terminalen Histonseitenketten initiiert, die zu einer dichteren Verpackung der DNA und damit zu einer potentiellen Inaktivierung der dort lokalisierten Gene führt (Bird und Wolffe, 1999; Cross et al., 1997; Hendrich und Bird, 1998).

Der Grad der DNA-Methylierung ist in den männlichen Keimzellen höher als in den weiblichen. Nach der Befruchtung der Eizelle nimmt der Grad der Methylierung des paternalen Genoms im männlichen Vorkern zunächst innerhalb der ersten vier Stunden stark ab. Da zu diesem Zeitpunkt die DNA-Replikation noch nicht eingesetzt hat, muss es sich dabei um einen aktiven Prozess handeln, dessen Katalysatoren jedoch noch unbekannt sind. Bis zum Blastozystenstadium erfolgt eine weitere, beide Genome betreffende, passive Demethylierung während der Replikationsphasen der Furchungsteilungen (Santos et al., 2002). Zu diesem Zeitpunkt allelspezifisch methylierte Regionen imprinteter Gene entgehen sowohl den aktiven, wie auch den passiven Demethylierungsprozessen. Nach dem Morula-Stadium folgt während der Implantations- und Gastrulationsstadien eine stadien- und gewebespezifische Neumethylierung, die wahrscheinlich durch Mitglieder der DNMT3-Familie, DNMT3A, B und eventuell auch DNMT3L katalysiert wird (Bour'his et al., 2001; Hata et al., 2002; Monk, 1995).

CpG-Dinukleotide sind in der humanen DNA unterrepräsentiert. Allerdings findet man sie häufig in Promotorregionen von Genen akkumuliert. Außerdem dienen sie vermutlich als Startpunkte der Replikation (Delgado et al., 1998). Die evolutive Herkunft der DNA-Methylierung liegt mutmaßlich in der Abwehr fremder DNA-Sequenzen, die sich in das humane Genom integriert haben, wie z.B. Transgene, Retrotransposons, Retroviren und andere repetitive parasitische Elemente. Der Großteil aller Methylcytosine liegt in diesen Elementen, und es ist daher wahrscheinlich, dass sie durch Methylierung inaktiviert wurden (Bestor und Tycko, 1996; Yoder et al., 1997).

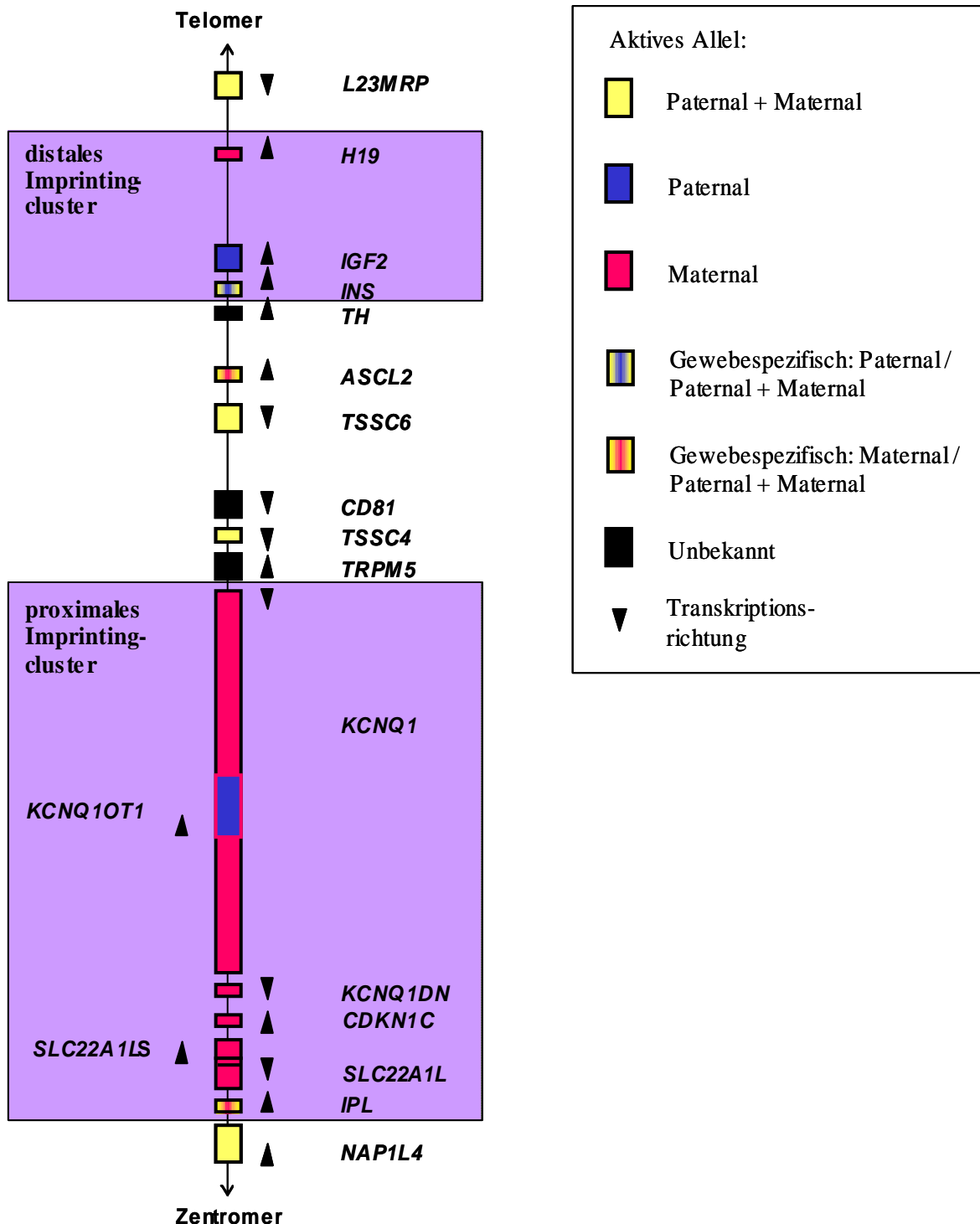
Als CpG-Inseln werden >200 bp große DNA Abschnitte bezeichnet, die eine signifikant erhöhte CpG-Dinukleotidkonzentration im Vergleich zum Großteil des Genoms haben (Bird et al., 1985; Gardiner-Garden und Frommer, 1987; Tykocinski und Max, 1984). Während ca. 70 bis 80 Prozent aller im Genom verteilten CpG-Dinukleotide methyliert sind, zeichnen sich die meisten CpG-Inseln durch das vollständige Fehlen methylierter Cytosine aus (Cross und Bird, 1995). Davon ausgenommen sind jedoch CpG-Inseln, die mit imprinteten oder X-Chromosom-gekoppelten Genen assoziiert sind und ein allelspezifisches Methylierungs-

muster zeigen (gDMRs) (Razin und Cedar, 1994). Außerdem gibt es von *Alu I*-Elementen dominierte (Ponger et al., 2001), sowie individuelle, in Isozentren besonders hoher CpG-Dichte lokalisierte CpG-Inseln (SMRs), die biallelisch methyliert sind (Strichman-Almashanu et al., 2002). Wahrscheinlich dienen hochrepetitive CpG-Inseln als initiatorische Signale für *de novo* Methylierung (Bestor und Tycko, 1996), während individuelle CpG-Inseln mit 50 bis 60 Prozent der Promotor humaner Gene assoziiert und häufig resistent gegenüber *de novo* Methylierungswellen sind. Im Fall imprinteter Loci entgehen sie einer Methylierung häufig durch allelspezifische Bindung von CpG-bindenden Zinkfingerproteinen, wie CTCF (CCCTC-bindender Faktor, siehe auch ab Seite 9 dieses Kapitels) (Strichman-Almashanu et al., 2002), hCGBP (Voo et al., 2000) oder SP1-Familienmitgliedern (Brandeis et al., 1994). Vor allem während der frühen Embryonalentwicklung erfolgt die Methylierung der regulativen Regionen eines Gens in Abhängigkeit ihrer Aktivität. CpG-Inseln eines aktiven Promotors können einer Methylierung entgehen, indem der Zugang von Methyltransferasen durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren eingeschränkt wird.

Es werden mindestens zwei Typen differentiell methylierter Regionen (DMRs) unterschieden: Bereits in Oozyten und Spermien unterschiedlich methylierte homologe DNA Sequenzen, deren Methylierungsmuster inert gegenüber Veränderungen in der Embryonalentwicklung sind (Mann, 2001; Olek und Walter, 1997), werden als primäre DMRs bezeichnet. Primäre DMRs können als Imprinting-Kontroll-Regionen (*imprinting control region*, ICR) fungieren, wenn sie in *cis* die monoallelische Expression von Genen regulieren, wie es z.B. für die differentiell methylierte CTCF-Bindestelle in der Nähe des murinen *H19*-Gens für *H19* und *Igf2* nachgewiesen werden konnte (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kaffer et al., 2000). Der zweite DMR-Typ, die sekundären DMRs, entsteht erst nach der *de novo* Methylierungswelle in der Postimplantationsphase der Embryonalentwicklung. Die sekundären DMRs können stadien- und gewebespezifisch methyliert sein und es wird angenommen, dass sie die allelspezifische Methylierung durch eine Ausbreitung primärer DMRs oder als Antwort auf differentielle Genaktivität entwickeln (Constancia et al., 1998).

Auf dem distalen Abschnitt des kurzen Arms der humanen Chromosomen 11 findet man eine auffällige Konzentration imprinteter Gene. Sie lassen sich in zwei Cluster unterteilen, die durch eine Gruppe biallelisch exprimierter Gene getrennt werden (siehe **Abbildung 1.1**). Es wird angenommen, dass die Expression der Gene eines Clusters koordiniert reguliert wird (Casparly et al., 1998). Für beide Bereiche konnte mindestens eine ICR identifiziert werden, die in *cis* für die allelspezifische Transkription bzw. Inaktivierung aller Gene eines Clusters verantwortlich ist (Reik et al., 2001). In der Maus existieren ebenfalls zwei syntäne Gen-

cluster auf dem orthologen distalen Abschnitt des Chromosoms 7 (Enklaar et al., 2000; Eßwein, 1999; Paulsen et al., 1998; Paulsen et al., 2000).



**Abbildung 1.1: Anordnung der Gene des distalen Abschnitts des humanen Chromosoms 11p15.5**

Die genomische Ausdehnung der Gene ist durch die Größe der sie symbolisierenden farbigen Boxen angedeutet, wobei die Farbe, wie in der Legende angegeben, dem jeweiligen Expressionsstatus entspricht. Das Gen *KCNQ1OT1* befindet sich in Intron 10 des *KCNQ1*-Gens und wird in umgekehrter (*antisense*) Richtung abgelesen. Auch die Gene *SLC22A1L* und *SLC22A1LS* liegen in gegensätzlicher Orientierung und überlappen in ihren 5'-Bereichen.

Das allelspezifische Expressionsmuster fast aller orthologen Gene dieser Region ist, soweit bekannt, identisch, mit Ausnahme der Gene *ASCL2* (maternal) / *Ascl2* (frühembryonal biallelisch), *TSSC4* (biallelisch) / *Tssc4* (präferentiell maternal in der Plazenta) und *CDKN1C* (unvollständige Inaktivierung des paternalen Allels) / *Cdkn1c* (maternal).

Beim Menschen sind Gene beider Cluster mit dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), einem embryonalen Überwuchssyndrom, assoziiert. Ursprünglich wurde BWS nach den drei Hauptsymptomen auch als EMG-Syndrom bezeichnet. Dies sind charakteristische Bauchwanddefekte, wie Nabel- oder Nabelschnurbrüche (**E**xomphalus), eine Vergrößerung der Zunge (**M**akroglossie) und prae- und/oder postnataler Überwuchs, mit einer Körpergröße und/oder einem Körpergewicht oberhalb der 90. Perzentile (**G**igantismus). Außerdem können noch eine Reihe weiterer Nebenmerkmale auftreten, wie Ohrmuschelkerben, eine asymmetrische Vergrößerung von Organen (Hemihypertrophie), eine nachgeburtlich auftretende Verminderung des Blutzuckers (neonatale Hypoglykämie), charakteristische Gefäßmale (Naevus flammeus), eine Vergrößerung innerer, vor allem urogenitaler Organe und ein erhöhtes Tumorrisiko. Die am häufigsten assoziierten Tumore sind Wilms Tumore (Nephroblastome), Lebertumore (Hepatoblastome), Neuroblastome, Tumore der Nebenniere (Adrenokortikalkarzinome), der quergestreiften Muskulatur (Rhabdomyosarkome) und der Harnblase. Ein vollständiger BWS-Phänotyp zeigt mindestens entweder die drei Hauptmerkmale, oder zwei Haupt- und drei Nebenmerkmale. Genetische Hinweise auf eine Kopplung des BWS zu den imprinteten Genen des distalen Chromosoms 11p ergaben sich bereits 1987 durch die Entdeckung, dass polymorphe 11p15.5-Marker häufig einen Verlust der Heterozygotie (LOH) in Tumoren von BWS-Patienten zeigten (Hayward et al., 1988; Henry et al., 1989; Little et al., 1988; Mannens et al., 1987). Die Kopplung des Syndroms zu den Genen dieser Region wurde anhand von cytogenetischen Mutationen bei BWS-Patienten mit Bruchpunkten in 11p15.5 und 11p15.3 (zusammengefasst in (Hoovers et al., 1995; Shows et al., 1996) und durch die Detektion von paternalen uniparentalen Disomien (UPD) der 11p-Region in ca. 10 bis 15 Prozent aller sporadischen BWS-Fälle (Henry et al., 1991), die zu einem ausschließlich paternalen Epigenotyp aller dort lokalisierten Gene führen, bestätigt.

Für die Entstehung des polymorphen BWS-Phänotyps wird angenommen, dass mehrere Gene der beiden Imprintingcluster beteiligt sind. Mutationen der Basensequenz in der DNA von BWS-Patienten, die zu einem Verlust der Genfunktion führen, konnten jedoch bisher ausschließlich für das Zellzyklusgen *CDKN1C* gefunden werden (Hatada et al., 1996; Hatada et al., 1997; Lam et al., 1999; Lee et al., 1997a; O'Keefe et al., 1997). Mutationen dieses Gens treten vor allem bei BWS-Patienten mit Bauchwanddefekten auf (Lam et al., 1999). Auch der

Phänotyp von *Cdkn1c*-Knockout-Mäusen deutet auf eine Korrelation von *Cdkn1c*-Mutationen und Bauchwanddefekten hin (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Die Expression des *CDKN1C*-Gens erfolgt präferentiell vom maternalen Allel (Hatada et al., 1996) und ist daher bei Patienten mit paternaler uniparentaler Disomie des Chromosoms 11p gestört. Da im Gegensatz zum Imprinting des murinen *Cdkn1c*-Gens, die Inaktivierung des humanen väterlichen Allels unvollständig ist, kommt es durch das Fehlen des mütterlichen Allels nicht zum völligen Verlust der Genexpression.

Der Hauptkandidat für die Merkmale Gigantismus und Makrosomien ist der in fast allen Geweben ausschließlich vom paternalen Gen exprimierte Wachstumsfaktor IGF2, der eine wichtige Rolle in der humanen und murinen Embryo- und Plazentaentwicklung spielt (DeChiara et al., 1991; Ferguson-Smith et al., 1991; Giannoukakis et al., 1993). Es konnten bisher keine strukturellen Mutationen des *IGF2*-Gens detektiert werden. Stattdessen wurden Imprintingmutationen (*Loss of imprinting*, LOI) gefunden, die in einer Überexpression des *IGF2*-Gens bei BWS- und anderen Überwuchssyndrom-Patienten resultieren (Joyce et al., 1997; Morison et al., 1996; Reik et al., 1995; Weksberg et al., 1993). Experimente mit transgenen *Igf2*-Mäusen, die konstitutiv *Igf2* überexprimieren, weisen ebenfalls auf eine zentrale Rolle dieses Gens bei der molekulargenetischen Grundlage von BWS hin, da der murine Phänotyp viele BWS-ähnliche Symptome zeigte, wie z.B. pränatalen Überwuchs, Makroglossie und andere unproportionale Organomegalien (Sun et al., 1997). Bei der Untersuchung von Mausembryonen mit einer Deletion der plazentaspezifischen *Igf2*-Isoform konnte ebenfalls ein, von der geringeren Plazentagröße abhängiges, vermindertes Wachstum des Fötus festgestellt werden (Constancia et al., 2002). Die Annahme liegt nahe, dass eine biallelische *Igf2*-Expression, z.B. als Folge einer paternalen uniparentalen Disomie, in einer vergrößerten Plazenta resultieren könnte, die zu einem Überwuchs des Embryos beitragen würde (Walter und Paulsen, 2003).

Die Repression des murinen und auch humanen *IGF2*-Gens auf dem maternalen Chromosom 7, bzw. 11, ist eng an die Expression des benachbarten *H19*-Gens gekoppelt und umgekehrt. Es konnte gezeigt werden, dass das cytoplasmatische *IGF2*-Expressionsniveau, z.B. in Wilmstumorzellen, reziprok mit dem *H19*-Expressionsniveau korreliert (Li et al., 1998). *H19* und *IGF2* werden jedoch nicht in allen Geweben monoallelisch exprimiert: in cytotrophoblastischen Zellen wird auch das paternale *H19*-Allel transkribiert (Adam et al., 1996; Jinno et al., 1995) und im Choroid-Plexus und Leptomeninges findet man bei maternaler *H19*- eine biallelische *Igf2*-Expression (DeChiara et al., 1991; Svensson et al., 1995).

Das *H19*-Gen wird vor allem während der Fetalentwicklung in Geweben meso- und endodermalen Ursprungs exprimiert (Pachnis et al., 1988; Poirier et al., 1991). Mit der Geburt wird die Expression des *H19*-Genprodukts herunterreguliert und adult nur noch in sehr geringen Mengen im Uterus, den Milchdrüsen, Herz- und Skelettmuskeln, sowie in noch geringeren Mengen in der Niere, Nebenniere und Lunge gefunden (Leibovitch et al., 1991; Pachnis et al., 1988).

Obwohl in der humanen, nicht jedoch in der murinen *H19*-RNA einige offene Leserahmen existieren, konnte unter physiologischen Bedingungen bisher kein Protein identifiziert werden, das von der *H19*-mRNA kodiert wird (Pachnis et al., 1988). Eine Translation der RNA mit dem längsten möglichen offenen Leserahmen gelang bisher nur in einem künstlichen Expressionssystem (Joubel et al., 1996). Es wird daher angenommen, dass das funktionelle Produkt des *H19*-Gens die reife, gespleißte RNA ist, die sich in spezifische, evolutiv konservierte Sekundärstrukturen faltet (Juan et al., 2000). Über die Rolle dieses Genprodukts während der Embryonalentwicklung ist jedoch noch sehr wenig bekannt.

Mehrere experimentelle Hinweise deuten auf einen direkten Einfluss des *H19*-Genprodukts auf die Expression des *IGF2*-Gens hin. Knockoutversuche des murinen *H19*-Gens zeigen einen Überwuchsphänotyp, der mit dem Verlust der *Igf2*-Inaktivierung auf dem maternalen Chromosom 7 in Zusammenhang gebracht wurde (Leighton et al., 1995a). Auch eine transgene Expression muriner *H19*-cDNA, vor allem wenn sie in „*antisense*“-Richtung erfolgt, geht mit einer Erhöhung des endogenen *Igf2*-Expressionsniveaus einher (Wilkin et al., 2000). Bei der Untersuchung parthenogenetischer Mausembryonen konnte festgestellt werden, dass Embryonen, die eine biallelische *H19*-Expression aufwiesen, sich bis zum Tag 13,5 dpc entwickelten, während parthenogenetische Embryonen, bei denen eine *H19*-Kopie deletiert wurde und daher das Gen monoallelisch exprimierten, erst nach Tag 17,5 dpc verstarben (Kono et al., 2002). Dies deutet auf einen schädigenden Effekt einer erhöhten *H19*-Expression auf die Embryonalentwicklung hin. Die künstliche Überexpression des murinen *H19*-Gens zeigte hingegen keinen Wachstumsphänotyp (Ainscough et al., 1997; Pfeifer et al., 1996).

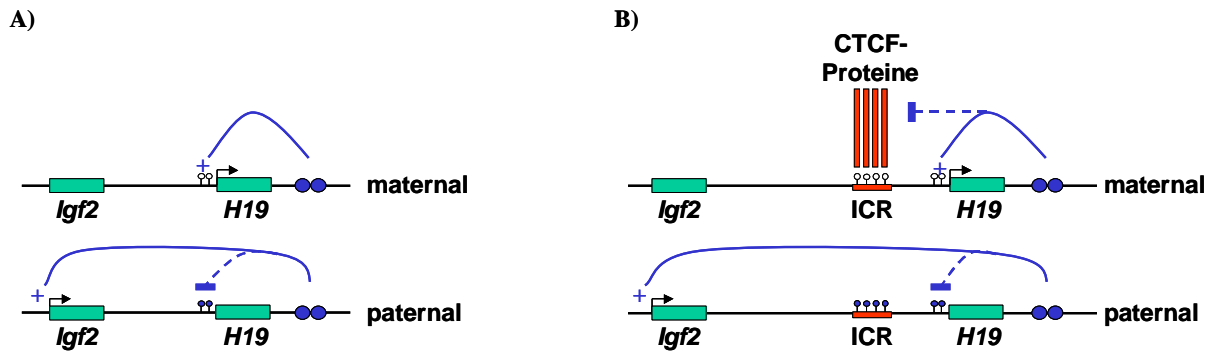
Neben ihrer Rolle bei der Regulation von Entwicklung und Wachstum des Embryos sind imprintete Gene wichtige Inhibitoren unkontrollierten Zellwachstums, und ihre Fehlregulation kann zu einer malignen Entartung und Entstehung von Tumoren führen. Da durch die Inaktivität des einen elterlichen Allels eine Mutation des zweiten Allels bereits zum vollständigen Genausfall führt, imprintete Gene also funktionell haploid vorliegen, sind Tumorsuppressorgene, die dem Mechanismus des genomischen Imprintings unterliegen, bevorzugte

Kandidaten für die Tumorentstehung (Plass und Soloway 2002; Schofield et al., 2001; Squire und Weksberg, 1996).

Untersuchungen der Expression des humanen *H19*-Gens in Tumorzellen zeigten jedoch, dass *H19* in vielen Tumorgeweben überexprimiert wird, was eine Rolle als Tumorsuppressorgen eher unwahrscheinlich macht. Dabei kann einerseits der parentale Ursprung monoallelisch (z.B. bei spermatocytischem Seminom), oder aber durch einen Verlust des Imprintings biallelisch sein (z.B. bei testikulärem Keimzelltumor, (Ariel et al., 2000)). Andererseits muss eine biallelische *H19*-Expression nicht unbedingt mit einer Überexpression einhergehen (Hibi et al., 1996; Yballe et al., 1996). Die Beobachtung, dass *H19* häufig in Tumoren überexprimiert wird, die Geweben entspringen, die während der Fetalentwicklung *H19* exprimierten, spricht für eine Rolle des *H19*-Genprodukts als onkofetale RNA (Ariel et al., 1997; Ariel et al., 2000).

Die Kontrolle der *H19*-Expression unterliegt unterschiedlichen Enhancern, die sowohl proximal als auch distal des Gens lokalisiert sind. Für das murine *H19*-Gen konnten mindestens drei gewebespezifische Enhancerregionen identifiziert werden (Ainscough et al., 2000). Leighton et al. konnten zeigen, dass die 3' des murinen *H19*-Gens gelegenen endodermalen Enhancer (Yoo-Warren et al., 1988) für das korrekte Imprinting sowohl des *H19*-, wie auch des *Igf2*-Gens wichtig sind, da die Deletion der Enhancerregion maternal vererbt den *H19*- und paternal vererbt den *Igf2*-Expressionsverlust zur Folge hat (Leighton et al., 1995b). Daher wurde ein „*enhancer-competition*“-Modell für die Regulation des reziproken Imprintings dieser beiden Gene postuliert (u.a. (Banerjee und Smallwood, 1995; Tilghman, 1999)). Dabei wurde der Methylierungsstatus des *H19*-Promotors als entscheidender Faktor für die alternative Expression der beiden Gene angesehen: ist dieser frei von CpG-Methylierung (maternales Chromosom) wird die Transkription des *H19*-Gens, bei dessen Methylierung stattdessen die des *Igf2*-Gens verstärkt (**Abbildung 1.2 A**). Mit der Identifizierung einer Gruppe von Bindestellen für das DNA-bindende Zinkfingerprotein CTCF (CCCTC bindender Faktor) 5' des *H19*-Gens als Imprinting-Kontrollregion (ICR) (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000), wurde dieses Modell zugunsten einer Regulation mittels Insulator- und Silencerelementen modifiziert (**Abbildung 1.2 B**). CTCF-Bindestellen wurden auch in der *SNURF-SNRNP*-ICR, der *Dlk/Gtl2*-ICR und in der *Kcnqlot1*-DMR gefunden (Klenova et al., 2002; Paulsen et al., 2001; Wylie et al., 2000; Ohta et al., 1999), so dass es sich wahrscheinlich nicht um einen für *H19* und *IGF2* spezifischen Mechanismus handelt.



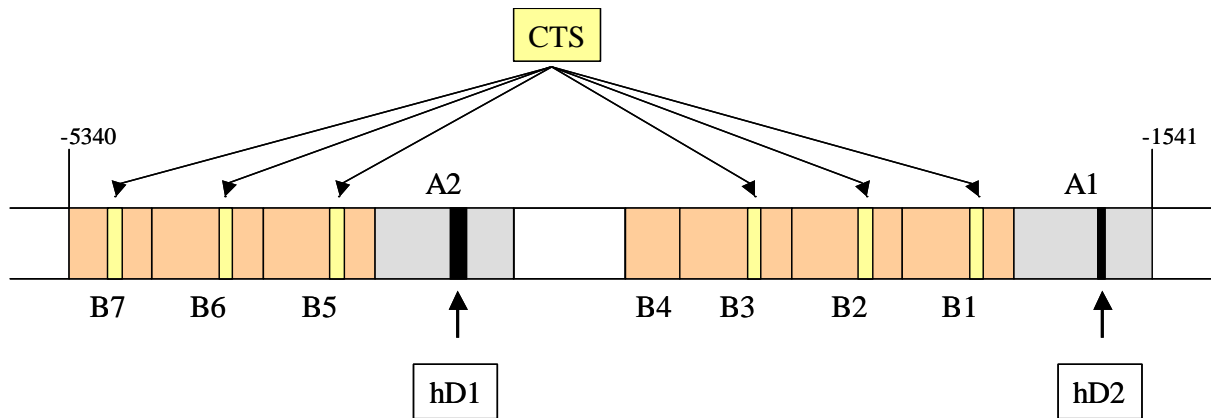


**Abbildung 1.2: Modelle für die Regulation der reziproken Expression der Gene *H19* und *Igf2***

Enhancer (blau), die die Expression sowohl des *H19*-, wie auch des *Igf2*-Gens positiv beeinflussen können, liegen „downstream“ des *H19*-Gens. **A)** Eine Interaktion findet primär (oben) mit dem *H19*-Promotor statt, eine allelspezifische Methylierung der *H19*-Promotorregion (unten) verhindert diese jedoch und es kommt zur Verstärkung der *Igf2*-Expression. **B)** Eine Regulation der alternativen Genexpression findet über eine Imprinting-Kontrollregion (rot) statt, die zwischen den beiden Genen liegt. In unmethyliertem Zustand (oben) kann dort ein Insulator (CTCF-Proteine) binden und die Aktivierung des *Igf2*-Gens blockieren.

Die Deletion der murinen *H19*-ICR bewirkt die Aktivierung der normalerweise inaktiven väterlichen *H19*- und mütterlichen *Igf2*-Allele in Leber, Niere, Darm, Lunge und Skelettmuskel (Kaffer et al., 2000). Die Bindung von CTCF an die DNA ist methylierungssensitiv. Sind die CpGs in der CTCF-Bindestelle der Ziel-DNA (CTCF *target sequence*, CTS) methyliert, nimmt die Bindungsaffinität stark ab (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000). Eine solche Abhängigkeit von der allelspezifischen *H19*-CTS-Methylierung konnte für die vier murinen (Hark und Tilghman, 1998) und mindestens für eine der sechs humanen Bindestellen (Hark et al., 2000) gefunden werden. Die menschliche ICR setzt sich aus der wiederholten Abfolge eines 450 bp (A-) Repeats und drei bzw. vier 400 bp (B-) Repeats zusammen (**siehe Abbildung 1.3**).

Dabei enthalten die B-Repeats, mit Ausnahme des verkürzten B4-Repeats, jeweils eine potentielle CTS, während die beiden A-Repeats ein evolutiv konserviertes, doppeltes Okta-mer-Motiv enthalten, das mit der Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustands der benachbarten maternalen B-Repeats in Zusammenhang gebracht wurde (Hori et al., 2002). Takai und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ausschließlich die CpGs des B1-Repeats allelspezifisch methyliert sind, während die CpGs der anderen B-Repeats unterschiedlich stark hypermethyliert vorliegen (Takai et al., 2001).



**Abbildung 1.3: Struktur der A- und B-Repeats der humanen *H19-ICR***

Die potentiellen CTCF-Bindungsstellen (CTS) sind gelb hervorgehoben, die in den A-Repeats gelegenen Oktaeder-Motive sind schwarz unterlegt. Die Lage der gezeigten Region ist relativ zum *H19*-Transkriptionsstart angegeben.

Als drittes Gen der distalen Imprintingregion des humanen Chromosoms 11p15.5 schließt sich proximal des *IGF2*-Gens das *Insulin*-Gen (*INS*) an, dessen Imprintingstatus noch nicht abschließend geklärt ist. Das murine orthologe Gen *Ins2* zeigt ein gewebe- und stadienspezifisches Imprinting. Im Dottersack wird ab dem Embryonalstadium des Tages 14,5 pc (*post coitum*) eine graduelle Inaktivierung des maternalen Allels beschrieben (Deltour et al., 1995; Giddings et al., 1994), während in Kopf und Körper des Embryos selbst eine Expression beider Allele nachgewiesen werden konnte (Deltour et al., 1995). Dieses gewebespezifische Imprinting hat seine Ursache vermutlich in der unterschiedlichen Nutzung der dem Gen benachbarten regulativen Sequenzen: Duvillié und Mitarbeiter konnten 1998 zeigen, dass im murinen Pankreas ein 5' gelegener Enhancer für die biallelische Expression des *Ins2*-Gens verantwortlich ist, während in extraembryonalen Geweben 3' gelegene Enhancer, die außerdem die *H19*- und *Igf2*-Expression regulieren, die monoallelische Expression des Gens steuern (Duvillie et al., 1998). Allelvarianten des humanen *INS*-Gens, die durch die Anzahl der Tandemrepeats (*variable number of tandem repeats*, VNTR) im 5'-Bereich des Gens entstehen, konnten mit Typ I-, Typ II-Diabetes, dem polyzystischen Ovarialsyndrom und einer erhöhten Geburtsgröße assoziiert werden (Bennett et al., 1995; Dunger et al., 1998; Ong et al., 1999; Waterworth et al., 1997). Letzteres könnte es als Kandidatengen für das Beckwith-Wiedemann Syndrom erscheinen lassen, da jedoch auch der *IGF2*-Expressionslevel in der Plazenta mit der Größe des Insulin-VNTRs assoziiert werden konnte (Paquette et al., 1998), bleibt eine Beteiligung des *INS*-Gens am BWS-Phänotyp fraglich. Hinweise auf eine ausschließlich paternale Expression des *INS*-Gens im humanen Dottersack, die mit einer

reziproken monoallelischen Expression der benachbarten *IGF2*- und *H19*-Gene einhergeht, wurden 2001 erstmals von Moore und Mitarbeitern beschrieben (Moore et al., 2001). Es könnte ebenfalls von Imprintingmutationen der *H19/IGF2*-Enhancerregion bei BWS-Patienten betroffen sein und es wurde spekuliert, dass es so eventuell zu Störungen des Zuckerhaushalts beitragen könnte, die wiederum zu Symptomen wie der postnatal auftretenden Hypoglykämie beisteuern könnten (DeBaun et al., 2002).

Zu der proximalen Imprintingregion gehören drei Gene, die mit dem BWS assoziiert werden konnten: *KCNQ1* (oder *KVLQT1*), *KCNQ1OT1* (oder *KVLQT1-AS*, *LIT1*) und *CDKN1C*. Das ausschließlich maternal transkribierte *KCNQ1*-Gen kodiert für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal mit sechs Transmembrandomänen. Mutationen dieses Gens können sowohl das Long-QT oder Romano-Ward Syndrom (Wang et al., 1996), als auch das Jervell-Lange-Nielsen (JLN) Syndrom (Neyroud et al., 1997) verursachen. Bei beiden Erkrankungen handelt es sich um eine erbliche Form von Herzrhythmusstörungen, die bei JLN-Patienten außerdem mit beidseitiger Taubheit einhergeht. Die Rolle von *KCNQ1* im Zusammenhang mit dem Beckwith-Wiedemann Syndrom ist noch unklar, da einerseits die Bruchpunkte einer Reihe chromosomaler Rearrangements bei BWS-Patienten und einem embryonalen Rhabdoidtumor in diesem Gen lokalisiert wurden (Lee et al., 1997b), andererseits eine Zuordnung eines *KCNQ1*-Gendefekts zu einer der phänotypischen Ausprägungen des BWS schwerfällt. Da außerdem sowohl eine homo- wie auch heterozygote Inaktivierung des murinen *Kcnq1*-Gens nicht zu BWS-typischen Symptomen führte (Lee et al., 2000), ist eine Beteiligung an diesem Krankheitsbild unwahrscheinlich. Eventuell bewirken die erwähnten chromosomalen Rearrangements auch eine Veränderung der Expression benachbarter Gene, wie des mit *KCNQ1* überlappenden *KCNQ1OT1*-Gens, indem sie z.B. zu dessen Trennung von regulatorischen Sequenzen führen.

Das *KCNQ1OT1* Gen liegt in Antisense-Orientierung im *KCNQ1*-Gen, erstreckt sich von dessen Intron 10 über Exon 10 bis zum Intron 9 und besteht selbst aus einem einzigen Exon (Mitsuya et al., 1999; Smilnich et al., 1999). Es zeigt ein zu *KCNQ1* reziprokes Imprintingmuster. In der putativen Promotorregion des *KCNQ1OT1* Gens wurde ein als KvDMR bezeichneter Locus identifiziert, der zwei CpG-Inseln enthält und eine allelspezifische Methylierung auf dem maternalen Chromosom zeigt (Lee et al., 1999; Smilnich et al., 1999). KvDMR wird als ICR für Gene des proximalen Imprinting-Clusters diskutiert, da Untersuchungen von Horike und Mitarbeiter die Reaktivierung der normalerweise ausgeschalteten paternalen Kopien der Gene *KCNQ1* und *CDKN1C* durch Deletion der KvDMR in der Zell-

linie DT40 nachweisen konnten (Horike et al., 2000). Außerdem konnte für den orthologen murinen Lokus eine unidirektionale Enhancer-blockierende Aktivität nachgewiesen werden, die durch Methylierung der CpG-Inseln reduziert werden kann (Kanduri et al., 2002).

Fitzpatrick und Mitarbeiter konnten durch gezielte Deletion der murinen KvDMR und deren paternale Vererbung eine Reaktivierung der sechs benachbarten in der Maus imprinteten Gene *Ascl2*, *Tssc4*, *Kcnq1*, *Cdkn1c*, *Slc22a11* und *Ipl* nachweisen (Fitzpatrick et al., 2002). Sie postulieren für den humanen Lokus, dass der Verlust der Methylierung des maternalen KvDMR-Allels zu einer Inaktivierung der orthologen imprinteten Gene führen könnte und damit zum BWS-Phänotyp beitragen würde (Fitzpatrick et al., 2002).

Kürzlich wurden erstmalig drei Patienten mit maternalen uniparentalen Disomien unterschiedlich langer Abschnitte des Chromosoms 11p beschrieben. Im Gegensatz zu Patienten mit BWS zeigten sie keine BWS-ähnlichen Symptome, sondern eine Wachstumsverzögerung (Fisher et al., 2002), die auf eine für das Wachstum inhibitorische Funktion der duplizierten maternal exprimierten Gene schließen lässt. Die Expression maternal aktiver wachstumshemmender und paternal aktiver, das embryonale Wachstum fördernder Gene des distalen kurzen Chromosom 11-Arms scheint in einer antagonistischen Balance vorliegen zu müssen, damit eine normale Embryonalentwicklung möglich ist.

Die Untersuchung von Imprintingdefekten bei BWS-Patienten hat vor allem zwei Ziele: zum einen kann, vor dem Hintergrund klinischer Symptome, die Identifizierung von Störungen der normalen epigenetischen Genregulation und der daraus resultierenden Veränderungen auf Protein- und Chromatinebene zu einem besseren Verständnis der Imprintingmechanismen selbst führen. So offenbaren zum Beispiel die Detektion von Missense-Mutationen in den Zinkfingerdomänen des *CTCF*-Gens der DNA aus Wilmstumorgeweben (Filippova et al., 2002) zusammen mit den Berichten von Methylierungsdefekten der maternalen *H19*-CTS ebenfalls in Wilmstumoren (Cui et al., 2001; Frevel et al., 1999b) den Zusammenhang der beteiligten Gene bei der Tumorentstehung. Zum anderen sollen die verschiedenen genetischen und epigenetischen Defekte mit den einzelnen klinischen Fehlbildungen korreliert werden, um sowohl eine genauere BWS-Diagnostik zu ermöglichen, als auch Vorhersagen bezüglich der Vererbung der Defekte und insbesondere des Tumorrisikos der betroffenen Patienten machen zu können.

Im Gegensatz zu Untersuchungen der Genexpression in Tumoren, die den Patienten operativ entfernt wurden, ist die Ermittlung eines Imprintingverlusts in betroffenen Geweben von BWS-Patienten in der Regel nicht möglich. Daher dient die DNA-Methylierung, die für

einige Gene mit der Inaktivierung eines elterlichen Allels korreliert werden konnte, stellvertretend als eine genomische Markierung, von der auf die Genexpression geschlossen werden kann. So wird bei der Untersuchung von BWS-Patienten häufig der Verlust des Imprintings durch den Verlust der allelspezifischen Methylierung (LOM) definiert.

Methylierungsuntersuchungen bei BWS-Patienten wurden in der Promotorregion des *H19*-Gens und in der mit dem *KCNQ1OT1*-Gen assoziierten KvDMR durchgeführt. Es wurde stellvertretend für die potentiell methylierten Cytosine der beiden Regionen eine 16 Basenpaare vor dem *H19*-Transkriptionsstart gelegene SmaI-Schnittstelle (CCC<sup>m</sup>-GGG), bzw. eine in der KvDMR gelegene NotI-Schnittstelle (GC<sup>m</sup>-GGCCGC) mittels Southern-Blot-Hybridisierung auf methylierungssensitiven Verdau getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der **Tabelle 1.1** zusammengefasst. Während für den *H19*-Promotor in einer kleineren Gruppe von BWS-Patienten (ca. 5 %) eine Hypermethylierung des maternalen Allels festgestellt wurde, zeigte dieses Allel in der KvDMR in mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle (ca. 62 %) eine geringere oder fehlende Methylierung der NotI-Schnittstelle. Beide Veränderungen des Imprints betreffen bei BWS-Patienten ausschließlich das maternale Chromosom 11. Da in Fällen paternaler uniparentaler Disomie der Region 11p15.5, die fast immer als somatisches Mosaik auftritt (Itoh et al., 2000), beide Allele beider Gene den gleichen väterlichen Epigenotyp tragen, findet man hier, in Abhängigkeit des Anteils uniparentaler Zellen, einen Verlust des Methylierungsprints beider Gene. Nur in einer Studie wurden in 3 von 83 Fällen ohne UPD Methylierungsveränderungen beider Gene gefunden (DeBaun et al., 2002), so dass neben der UPD für die beiden Imprintingcluster unabhängige Entstehungsmechanismen angenommen werden.

**Tabelle T1.1: Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der *H19*-Promotorregion und der KvDMR in der Promotorregion des *KCNQ1OT1*-Gens.**

In den oberen fünf Artikeln wurde in einem Großteil der Patienten die Methylierung der Promotor beider Gene untersucht, die früheren Arbeiten bis 2001 beschreiben jeweils nur eine DMR, während die andere nicht untersucht wurde. Die Anzahl der UPD-Patienten ist, sofern vorhanden, in Klammern angegeben. Der Anteil der Fälle mit *H19*-Hyper- und *KCNQ1OT1*-Hypomethylierung bzw. *H19*-Hypermethylierung an der Gesamtzahl der jeweils untersuchten Patienten ohne den Anteil der UPD-Fälle beträgt 0,9% bzw. 9,8%.

Publikationen: <i>H19/KCNQ1OT1</i> - Methylierung bei BWS- Patienten	<i>H19 und KCNQ1OT1</i>				<i>H19</i>		<i>KCNQ1OT1</i>	
	$\Sigma$	Hyper- und Hypo- meth.	<i>H19</i> - Hyper- meth.	<i>KCNQ1</i> <i>OT1</i> - Hypo- meth.	$\Sigma$	Hyper- meth.	$\Sigma$	Hypo- meth.
(DeBaun et al., 2002)	92 (9)	12 (9)	10	39				
(Blik et al., 2001)	56 (11)	11 (11)	4	31	46 (4)	4 (4)	33	8
(Gaston et al., 2001)	93 (11)	11 (11)	13	45				
(Li et al., 2001)	4	0	0	0				
(Weksberg et al., 2001)	72 (13)	13 (13)	3	35	53 (8)	8 (8)		
(Engel et al., 2000)							69	35
(Smilnich et al., 1999)							16	5
(Dutly et al., 1998)					4	4		
(Catchpoole et al., 1997)					63 (13)	18 (13)		
(Reik et al., 1995)					5	4		
(Reik et al., 1994)					31 (10)	10 (10)		
(Steenman et al., 1994)					5	1		
Gesamt:	317 (44)	47 (44)	30	150	207 (35)	49 (35)	118	48
% der Patientenzahl		14,8% (13,9%)	9,5%	47,3%		23,7% (16,9%)		40,7%

Die meisten in **Tabelle T1.1** zusammengefassten Imprintinganalysen untersuchen, ob das Auftreten der Methylierungsveränderungen mit einer spezifischen Gruppierung klinischer Symptome einhergeht, um so eine Epigenotyp-Phänotyp-Korrelation für BWS zu erstellen. Dabei konnte übereinstimmend festgestellt werden, dass die Frequenz einer KvDMR-Hypermethylierung und Mutationen des *CDKN1C*-Gens in Patienten mit abdominalen Bauchwanddefekten im Vergleich zu anderen Patienten signifikant erhöht war. Die Entwicklung von Wilmstumoren geht häufig mit einer Hypermethylierung des *H19*-Promotors oder einer uniparentalen Disomie, aber nie mit einer *KCNQ1OT1*-Hypomethylierung einher. Außerdem konnte ein gehäuftes Auftreten von paternaler UPD 11 bei Patienten mit Hemihyperplasien festgestellt werden. Trotz dieser ersten Ansätze der Zuordnung molekulargenetischer Befunde

zu BWS-Subgruppen, die sich in einzelnen Symptomen unterscheiden, bleibt das Verständnis der Auswirkungen der Funktionsstörungen der involvierten Genprodukte bruchstückartig. Eine Untersuchung weiterer allelspezifisch methylierter Regionen, wie der CTS in der *H19*-Repeatregion oder der DMR in Intron 2 des *IGF2*-Gens, die einen Zusammenhang zu Störungen der *IGF2*-Expression herstellen, ist daher sinnvoll.

Da eine Reihe von Tumoren, die teilweise auch bei Patienten mit Beckwith-Wiedemann Syndrom auftreten, ebenfalls eine Kopplung zu den Genen der 11p15.5 Imprintingcluster aufweisen, wurden auch hier intensiv Imprintingdefekte untersucht.

Die Methylierung der *H19*-Promotorregion und der CTCF-Bindestellen in den B-Repeats dient bei einer Reihe von Tumoren, bei denen Imprintingstörungen bekannt sind, als Marker für die Involvierung von *IGF2* und/oder *H19* bei der Tumorgenese. Ein Zusammenhang zwischen einem Verlust des *IGF2*-Imprintings und einer Hypermethylierung des *H19*-Promotors konnte bereits 1994 in Wilmstumoren hergestellt werden. Während die korrespondierenden Nieren- oder Lymphozyten-DNAs von Patienten mit Wilmstumor stets eine normale monoallelische Methylierung zeigten, waren neun von neun *H19*-Promotor der DNAs von Tumoren mit *IGF2*-Überexpression hypermethyliert. In vier von vier Tumoren mit normaler *IGF2*-Expression war auch das Methylierungsmuster unverändert (Steenman et al., 1994). Moulton und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in neun von zehn Wilmstumoren ohne LOH, die einen Verlust der *H19*-Expression aufwiesen, eine biallelische Methylierung des *H19*-Promotors vorlag. In dieser Studie wurde in zwei Fällen auch eine Hypermethylierung des korrespondierenden nicht-neoplastischen Nierenparenchyms gefunden (Moulton et al., 1994). Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchung des normalen Nierengewebes von Patienten mit unilateralem Wilmstumor bestätigt, für das eine biallelische *IGF2*-Expression und *H19*-Promotorhypermethylierung festgestellt wurde. Alle acht DNAs zeigten die gleichen epigenetischen Abberationen in unterschiedlichem Ausmaß, mit einer durchschnittlichen biallelischen *H19*-Methylierung in 37% und einer durchschnittlichen biallelischen *IGF2*-Expression in 42% der Zellen (Okamoto et al., 1997).

Während in der kaukasischen Bevölkerung der Wilmstumor der am häufigsten mit BWS assoziierte Tumortyp ist, ist dies in Asien das Hepatoblastom. Ähnlich der Situation in Wilmstumoren, konnten Fukuzawa und Mitarbeiter einen Verlust der allelspezifischen *H19*-Expression in Hepatoblastomen feststellen, der teilweise mit einer biallelischen Methylierung einer HpaII-Schnittstelle im *H19*-Promotor assoziiert werden konnte (Fukuzawa et al., 1999). Ein weiterer, bei BWS-Patienten auftretender Tumor ist das Nebennierenkarzinom (Adrenokortikalkarzinom). In der fetalen humanen Nebenniere werden *H19* und *IGF2* stark exprimiert

(Voutilainen et al., 1994). Während die *IGF2*-Expression jedoch in der adulten Nebenniere sehr gering ist, bleibt die von *H19* relativ stark. In Adrenocortikalkarzinomen, in denen häufig ein LOH von *IGF2* und *H19* gefunden wird (Gicquel et al., 1997), konnte eine *IGF2*-Überexpression und eine *H19*-Inaktivierung festgestellt werden (Ilvesmaki et al., 1993; Liu et al., 1995). Erst kürzlich gelang es Gao und Mitarbeitern, die Methylierung des *H19*-Promotors mit der Expression der beiden Gene zu assoziieren. Die direkte Sequenzierung bisulfitbehandelter, PCR-amplifizierter DNA zeigte für alle 12 CpGs der Promotorregion eine Hypermethylierung in Nebennierenkarzinomen im Vergleich mit normalen, hyperplastischen oder adenomatösen Nebennieren (Gao et al., 2002).

Auch Tumore bei denen keine gehäufte Assoziation mit BWS bekannt ist, zeigen Methylierungsstörungen des *H19*-Gens. So konnte der Verlust des Imprintings von *IGF2* und *H19* bei unterschiedlichen Formen von Lungenkrebs, die ein sehr breites Spektrum genetischer und epigenetischer Abberationen zeigen, festgestellt werden (Kondo et al., 1995; Suzuki et al., 1994). Für Adenokarzinome und Squamous-Zell-Karzinome, mit einer Überexpression des *H19*-Gens, konnte eine Hypomethylierung der *H19*-Promotorregion in 5 von 9 Fällen nachgewiesen werden (Kondo et al., 1995). Im Gegensatz zu den Befunden der Untersuchungen der *H19*-Promotorregion bei BWS-Patienten und assoziierter Tumore, bei denen eine Hypermethylierung auf eine abnorme Methylierung des maternalen Allels hinweist, scheint hier also das paternale Allel betroffen zu sein, und der Verlust der Methylierung geht mit einer Aktivierung einher. Ein ähnliches Ergebnis ergab auch die Untersuchung der *H19*- und *IGF2*-Expression in tumorösen Gebärmutterhalsproben, bei der in 5 von 10, bzw. 2 von 12 Fällen ein unabhängiger Verlust des Imprintings von *IGF2* bzw. *H19* festgestellt werden konnte. In zwei Fällen mit *H19*-LOI wurde eine Hypomethylierung des normalerweise inaktiven paternalen *H19*-Allels nachgewiesen (Douc-Rasy et al., 1996). Ein Befund, der im Gegensatz zu den bisher aufgeführten steht, weil er nicht die Assoziation einer Methylierung des *H19*-Promotors mit der Inaktivierung dieses Allels beschreibt, ergab sich bei der Untersuchung von Chorionkarzinomen. Die Aktivität der Allele des *H19*-Gens in der humanen Plazenta ändert sich mit fortschreitender Schwangerschaft von einer anfangs biallelischen zu einer nach 10 Wochen monoallelischen Expression (Jinno et al., 1995). Das Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion ändert sich entsprechend: während in der frühen Plazenta der Promotor unmethyliert ist, nimmt die Methylierung in älteren Plazenten immer mehr zu (Arima et al., 1997; Jinno et al., 1995). In aus Chorionkarzinomen etablierten Zelllinien fanden Arima und Mitarbeiter eine *H19*-Hypermethylierung der ersten drei HpaII-Schnittstellen 5' des Transkriptionsstarts. Die Expression des Gens war jedoch im Vergleich zu



normalen Plazenten um ca. ein fünffaches erhöht, und ging teilweise mit einer Aktivierung des paternalen Allels einher (Arima et al., 1997).

Mit der zentralen Rolle, die der *H19*-Promotor im „*enhancer-competition*“-Modell (siehe **Abbildung 1.2A**) einnimmt, fällt eine widerspruchsfreie Erklärung der unterschiedlichen Tumorbefunde schwer. Die Beschreibung der methylierungssensitiven Bindung des CTCF-Proteins an die den Genen *H19* und *IGF2* benachbarte Repeat-Region und der Auswirkungen dieser Bindung auf die Expression der beiden Gene (Hark et al., 2000) (siehe **Abbildung 1.2B**), konnte die Bedeutung der Methylierung des Promotors relativieren und verlangt keine strenge Assoziation von Methylierungs- und Expressionsbefunden.

Die erste Methylierungsanalyse einer differentiell methylierten *H19*-CTCF-Bindestelle (CTS in B1, siehe **Abbildung 1.3**) in Wilmstumoren mit *IGF2*-LOI wies auf eine Hypermethylierung auch dieser regulativen Region in drei von fünf Wilmstumoren hin. In den, den Tumoren benachbarten, normalen Nierenzellen wurde ebenfalls eine partielle Hypermethylierung gefunden, während alle Wilmstumore mit monoallelischer *IGF2*-Expression, sowie deren dazugehörige Nieren eine normale, ausschließlich paternale Methylierung zeigten (Frevel et al., 1999b). Die Sequenzierung einzelner CpGs der benachbarten CTCF-Bindestellen von bisulfitbehandelter DNA aus Uretergewebe offenbarte eine generelle Hypermethylierung der anderen Bindestellen, so dass diese wahrscheinlich nicht zu der allelspezifischen Regulation der *IGF2*- und *H19*-Transkription beitragen (Takai et al., 2001). Die Untersuchung der proximalsten CTCF-Bindestelle (CTS in B7, siehe **Abbildung 1.3**) mittels Einzelklon-Sequenzierung bisulfitmodifizierter DNA aus normaler fetaler Niere zeigte jedoch in einer anderen Studie ein differentielles Methylierungsmuster und eine Hypermethylierung in sieben von sieben Wilmstumoren mit *IGF2*-LOI (Cui et al., 2001). In dieser Studie konnten in 25 untersuchten DNAs von Wilmstumorpatienten keine Mutationen des *CTCF*-Gens selbst gefunden werden. Filippova und Mitarbeiter fanden jedoch in einer von 31 Brustkrebs-, einer von 40 Prostata- und zwei von 59 Wilmstumor-DNAs vier unterschiedliche, tumorspezifische Missense-Mutationen in den Zinkfinger-Domänen des *CTCF*-Gens an Positionen, die entweder für die ZF-Formation oder deren DNA-Bindung kritisch sind. Diese Mutationen führten zwar nicht zu einem Verlust ihrer DNA-bindenden Fähigkeit, aber zu einer spezifischen, verminderten Affinität gegenüber bis zu neun von zwölf bekannten CTS. Die beiden untersuchten CTS der murinen *H19/Igf2*-Region zeigten hierbei für alle vier Mutationen eine fehlende Bindeaffinität (Filippova et al., 2002).

Auch in weiteren Tumoren konnte eine Veränderung der allelspezifischen Methylierung der untersuchten CTS festgestellt werden. Wie in anderen Geweben auch wird *H19* in der Harn-

blase ausschließlich fetal transkribiert und nach der Geburt ausgeschaltet. Eine Reaktivierung konnte in Karzinomen der Harnblase festgestellt werden, wobei dies vor allem mit höheren Tumorgraden assoziiert war (Cooper et al., 1996). Die Untersuchung der differentiell methylierten CTCF-Bindestelle des B1-Repeats des *H19*-Gens mittels Einzelklonsequenzierung bisulfitbehandelter DNA ergab in einem von vier Fällen eine Hypomethylierung aller CpGs der Region in ungefähr der Hälfte aller paternalen Klone (Takai et al., 2001).

Kolorektalkarzinome (CRC) sind durch eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Veränderungen gekennzeichnet (Issa, 2002). Cui und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Gruppe von CRC-Patienten mit *MLH1*-Hypermethylierung und Mikrosatelliteninstabilität eine erhöhte Rate biallelischer *IGF2*-Expression aufweisen (Cui et al., 1998). Die Untersuchung der mit *H19/IGF2* assoziierten CTS im B1-Repeat mittels Einzelklonsequenzierung der bisulfitbehandelten DNA aus CRC mit *IGF2*-LOI zeigte eine Hypermethylierung der maternalen Allele in ca. zwei Dritteln der untersuchten Tumore und einem Drittel der untersuchten normalen Darmschleimhäute, während alle untersuchten DNAs von CRC mit *IGF2*-ROI („*retention of imprinting*“) ein normales monoallelisches Methylierungsmuster aufwiesen (Nakagawa et al., 2001). In einer anderen Studie wurde eine Hypomethylierung der CTS in B1 und B7 in CRCs mit und ohne LOI von *IGF2* nachgewiesen (Cui et al., 2002). Hier konnte zusätzlich in allen CRC mit *IGF2*-LOI eine Hypomethylierung einer in Intron 2 des *IGF2*-Gens gelegenen DMR festgestellt werden, die bei keinem CRC mit normalem *IGF2*-Imprinting vorkam. Diese sehr unterschiedlichen Befunde in Kolorektalkarzinomen deuten auf eine eher untergeordnete Rolle der Insulatorbindestellen bei der Entstehung dieses Tumortyps hin. Cui und Mitarbeiter schließen daraus, dass der Wegfall der differentiellen Methylierung in der *IGF2*-DMR in CRC entscheidend ist und ein verloren gegangener Imprint zu einer Veränderung der *IGF2*-Expression unabhängig von einer Kontrolle der *H19/IGF2*-Enhancer führt.

Auch in Osteosarkomen wurde sowohl eine Hypo- wie auch eine Hypermethylierung der B1-CTS festgestellt. In 7 der 28 bzw. 7 der 34 Fälle, bei denen ein Verlust des *IGF2*- bzw. *H19*-Imprintings festgestellt werden konnte, zeigte das jeweils andere Gen eine normale monoallelische Expression. Vier der *H19*-LOI/*IGF2*-ROI-Fälle wiesen eine Hypomethylierung des paternalen Allels in der B1-CTS auf, während bei zwei *IGF2*-LOI/*H19*-ROI-Fälle eine entsprechende Hypermethylierung des maternalen Allels gefunden wurde (Ulaner et al., 2003). Diese Befunde lassen eine weitere Modifikation des „*enhancer-competition*“-Modells sinnvoll erscheinen: eine Veränderung des Methylierungsmusters in den *H19/IGF2*-CTS muss nicht in einem vollständigen Verlust bzw. Entstehung der CTCF-Bindung resultieren,

sondern kann einen ebenfalls graduellen Aufbau des Insulatorblocks zur Folge haben. Auf dem väterlichen Chromosom entstünde durch einen teilweisen Methylierungsverlust eine erhöhte (biallelische) *H19*-Expression zusammen mit einer monoallelischen *IGF2*-Expression. Eine verstärkte Methylierung der mütterlichen CTS würde weiterhin nur eine monoallelische Expression des *H19*-Gens erlauben, könnte aber eine biallelische *IGF2*-Expression zulassen (Ulaner et al., 2003).

Fasst man die Vielzahl und Vielfalt der in Tumoren erhobenen Befunde zusammen, erscheint die Rolle der differentiell methylierten CTCF-Bindungsstellen für die Expression der Gene des distalen Imprintingclusters der chromosomalen Bande 11p15.5 sowohl wichtig, wie auch in ihrer Flexibilität sehr komplex. Eine Untersuchung dieser zentralen regulatorischen Domäne bei einer so heterogenen Erkrankung, wie es das Beckwith-Wiedemann Syndrom ist, verspricht daher einerseits neue Erkenntnisse über ihre Funktionsweise und andererseits ein besseres Verständnis der molekularen Ursachen der Pathogenese.

## Zielsetzung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zwei Ziele verfolgt werden: bei Patienten mit Beckwith-Wiedemann Syndrom sollten epigenetische Mutationen identifiziert werden, die in einer Fehlregulation von in die Pathogenese involvierten Genen resultieren können. Zu diesem Zweck sollten allelspezifisch unterschiedlich methylierte Regionen, die mit imprinteten Genen assoziiert sind, lokalisiert werden und eine Methode zur Untersuchung der allelspezifischen Methylierung dieser DNA-Abschnitte etabliert werden, die eine Prüfung der identifizierten DMRs anhand der DNA von BWS-Patienten ermöglicht. Da zu Beginn dieser Arbeit ausschließlich Informationen über differentiell methylierte Schnittstellen von Restriktionsenzymen existierten, sollte der Ansatz der Sequenzierung bisulfitmodifizierter DNA gewählt werden, um in durchschnittlich 400 bp großen Abschnitten CpGs unabhängig von der umgebenden Sequenz auf ihre Methylierung hin untersuchen zu können. Im Falle der Identifikation von bei BWS-Patienten charakteristischen Methylierungsdefekten sollte versucht werden, die Untersuchungsmethode gezielt zu vereinfachen, um eine Anwendung in der routinemäßigen Diagnostik zu ermöglichen.

Parallel zu diesem Ansatz sollte die Aktivität der parentalen Allele weiterer potentiell imprinteter Gene, vor allem der BWS-kritischen Regionen, charakterisiert werden. Diese Untersuchungen sollten im murinen Organismus durchgeführt werden, da zum einen ein Hinweis auf den unbekanntem Imprintingstatus selbst identifizierter humaner Gene erhalten werden sollte, und außerdem auch der zeitliche Verlauf der allelspezifischen Expression während der Embryonalentwicklung aufgeklärt werden sollte. Hierzu wurden murine Inzuchtstämme ausgewählt, die aufgrund einer möglichst großen evolutiven Distanz eine große Anzahl von Polymorphismen aufweisen sollten. Eine reziproke Kreuzung sollte dabei zuverlässig in möglichst vielen Nachkommen resultieren, um aus ca. 16 Geweben verschiedener embryonaler, postnataler und adulter Entwicklungsstadien der F1-Generation Gesamt-RNA zu gewinnen und in cDNA umzuschreiben. Anhand dieser cDNA-Sammlung sollte durch spezifische Amplifikation und Sequenzierung polymorpher Transkriptabschnitte von Genen, bei denen Hinweise auf eine Regulation durch genomisches Imprinting besteht, die Beteiligung der elterlichen Allele an der RNA-Population der entsprechenden Gewebe festgestellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mäusezucht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zucht von Mäusen der Subspezies C57Bl/10 und FVB/N (*Mus musculus musculus*), JF1 (*Mus musculus molossinus*) und der Spezies SPRET/Ei (*Mus spretus*) im Tierstall des Instituts für Molekulargenetik der Universität Mainz (1998-2000) und im Tierstall der Universitätsklinik Mainz (2000-2004) eingerichtet. Der klassische Inzuchtstamm C57Bl/10 wurde 1998 von Prof. Dr. Mundlos, Kinderklinik Mainz und der häufig zur Herstellung transgener Tiere verwendete Inzuchtstamm FVB/N wurde von Prof. Dr. Blessing, Universitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Der ursprünglich aus einer Kreuzung der Subspezies *Mus musculus musculus* und *Mus musculus castaneus* entstandene Inzuchtstamm JF1 (Koide et al., 1998), stammt aus der Zucht des Instituts für Säugergenetik, Neuherberg, AG Prof. Dr. Balling. Der von E.M. Eicher etablierte Inzuchtstamm SPRET/Ei (Eicher und Shown, 1993) wurde über das Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA bezogen.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Als Futter wurde ausschließlich V-Alleinfutter ssniff R/M-Haltung, extrudiert, nitrosaminarm der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest verwendet. Ein definierter Hell/Dunkel-Rhythmus (je zwölf Stunden, 6:00/18:00) wurde über eine Zeitschaltuhr eingestellt.

Für die Imprintinguntersuchungen wurden reziproke Paarungen der Stämme C57Bl/10 + JF1, FVB/N + JF1 und C57Bl/10 + SPRET/Ei durchgeführt. Die Kreuzungen, bei denen in der Regel ein Männchen zu zwei Weibchen gesetzt wurde, wurden nach 16:00 angesetzt und die Präparation der Embryonen bzw. der Organe postnataler und adulter Mäuse erfolgte morgens, so dass deren Alter unter Annahme der Kopulation nach Beginn der Östrusphase um ca. 0:00 Uhr, auf die Zahl der Tage nach dem Zusammensetzen plus einen halben Tag festgelegt wurde. Die verpaarten Männchen und Weibchen, die nicht jünger als vier Monate und nicht älter als ein Jahr waren, wurden am Morgen nach dem Zusammensetzen wieder getrennt und die Weibchen wurden auf Bildung eines durch Koagulation des Ejakulats gebildeten „plugs“ in der Vaginaöffnung untersucht. Auch bei einem Fehlen dieses Hinweises auf eine erfolgte Kopulation, wurden die Weibchen sicherheitshalber 14 Tage lang nicht für weitere Kreuzungen verwendet.

## 2.2 Gewebepräparation

Die Präparation postnataler und adulter Gewebe erfolgte nach dem Tod der Tiere, der durch Einatmen einer Überdosis Chloroform herbeigeführt wurde, in eiskaltem PBS je nach Gewebe mit Hilfe eines Binokulars. Alle freipräparierten Organe wurden mit PBS abgespült, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

11,5, 14,5 und 17,5 Tage alte Embryonen wurden entsprechend nach dem Tod der Mutter in eiskaltem PBS freipräpariert und schockgefroren. Bei 11,5 Tage alten Embryonen wurden Kopf und Extremitäten vom Rumpf getrennt. Für die Untersuchung der Expression des *Glucokinase*-Gens (siehe **Kapitel 3.7.4**) wurde zusätzlich die Leber präpariert. Von 14,5 Tage alten Embryonen wurden Gehirn, Augen, Zunge, Thymus, Haut, Lunge, Herz, Leber, Nieren, Milz, Dick- und Dünndarm und die Harnblase präpariert, von 17,5 Tage alten Embryonen erfolgte, wie auch bei den postnatalen und adulten Mäusen, zusätzlich die Isolation der Speicheldrüsen, des Pankreas und des Magens. Von allen Embryonen wurde außerdem die innere und äußere Eihaut separiert.

## 2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.3.1 Isolierung von DNA aus Mausgeweben

Gesamtgenomische murine DNA wurde aus Schwanzspitzen und Leberpräparaten gewonnen. Die Lyse der Zellen aus dem Gewebeverband erfolgte bei  $56^{\circ}\text{C}$  über Nacht in  $700\ \mu\text{l}$  eines SDS- und Proteinase K-haltigen Lysepuffers. Unverdaute Gewebereste wurden in einer 30-minütigen Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $14000\ \text{Upm}$  abzentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mixtur, das im Verhältnis 25:24:1 gemischt wurde, durch zehnmütiges Invertieren und anschließender zehnmütiger Zentrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $14000\ \text{Upm}$ ) von den übrigen Zellbestandteilen und Proteinen getrennt, die in der unteren Phenol- und Interphase zurückblieben. Die obere wässrige Phase wurde durch erneute Extraktion mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) von Phenolresten befreit und mit einem Volumen 4-molarem Ammoniumacetat und zwei Volumen Isopropanol ausgefällt und auf einen Glasstab aufgewickelt. Die luftgetrockneten DNA-Fäden wurden in  $200\ \mu\text{l}$  Aqua bidest. bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Zeitraum von mindestens 3 Stunden gelöst.

### 2.3.2 Isolierung von DNA aus Blut

Für die Isolation genomischer DNA aus 5 ml Vollblut wurden 20 ml eiskalter Qiagen-G1-Puffer zugegeben und auf Eis 10 Minuten inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1300 g wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Es folgte die Resuspendierung des Pellets in 5 ml Qiagen-G2-Puffer und eine anschließende einstündige Inkubation mit 150 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) bei 50°C. Eine Qiagen-tip 100 Säule wurde mit Qiagen-QBT-Puffer äquilibriert und mit der DNA-haltigen Lösung bestückt. Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 5 ml Qiagen-QC-Puffer wurde die an der Säule immobilisierte DNA gereinigt und anschließend mit 5 ml Qiagen-QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit einem Volumen 4-molarem Ammoniumacetat und zwei Volumen Isopropanol gefällt und bei Raumtemperatur und 14000 Upm in einer 35-minütigen Zentrifugation pelletiert und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen (siehe auch **Kapitel 2.5.3**). Das Pellet wurde in 100 µl Aqua bidest. gelöst.

### 2.3.3 Isolierung von PAC-DNA

Die Isolierung von PAC-DNA erfolgte durch alkalische Lyse nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). PAC-Klone wurden in 20 ml LB-Medium, das mit 100 µl Kanamycin (10 mg/ml) versetzt wurde, über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert und nach maximal 16 Stunden bei 3000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert, vorsichtig mit dem gleichen Volumen Puffer P2 gemischt und zur Lyse 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die bakteriellen Proteine mit 300 µl Puffer P3 in einer fünfminütigen Inkubation auf Eis ausgefällt und durch zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 Upm von der DNA im Überstand getrennt. Diese wurde durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Isopropanol ausgefällt, abzentrifugiert und nach dem Waschen mit 70 %-igem Ethanol in 50 µl Tris-HCl resuspendiert.

### 2.3.4 Isolierung von RNA aus Mausgeweben

Die bei -80°C gelagerten embryonalen und adulten Gewebe wurden gewogen und in flüssigen Stickstoff gelegt. Die Präparation der murinen RNAs für die Imprinting- und anderen Expressionsstudien wurde mit dem Qiagen-„RNeasy Mini Kit“ durchgeführt. Alle benötigten Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt, es wurden ausschließlich gestopfte Spitzen

verwendet, und alle Glaswerkzeuge und -gefäße wurden vor ihrem Einsatz vier Stunden bei 250°C sterilisiert. Zu jeweils 30 mg Gewebe wurden 600 µl Qiagen-RLT-Puffer/β-Mercaptoethanol (10:1) zugegeben. Bei sehr kleinen embryonalen Geweben, mit einem Gewicht deutlich unter 30 mg, wurden mehrere Präparationen von Geschwistern zusammen homogenisiert. Das Aufschließen der Gewebe erfolgte entweder mit einem Glaspotter (Potter S, B.Braun, Melsungen) bei 8000 Upm für maximal eine Minute, oder mit einem Ultraturrax T25-Homogenisator (IKA Labortechnik) für 10 bis 30 Sekunden. Die Zellinhalte wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14000 Upm im Überstand isoliert. 600 µl davon wurden mit dem gleichen Volumen 70 %-igem Ethanol gründlich gemischt, auf eine Qiagen-RNeasy-Säule gegeben und kurz einzentrifugiert (15 sec, 14000 Upm bei Raumtemperatur). RNA-Moleküle ab einer Länge von ca. 200 Nukleotiden können in der Säule an eine Silikamembran binden, die Platz für ca. 100 µg RNA bietet, alle anderen Zellinhalte wurden durch Zugabe von 700 µl Qiagen-RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation eliminiert. Zur besseren Beseitigung der DNA von der Membran wurde die Säule ein zweites Mal mit dem Waschpuffer bestückt und vor der Zentrifugation fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein zweifaches Waschen der Säule mit 500 µl Qiagen-RPE-Puffer und einer abschließenden zweiminütigen Zentrifugation zur Trocknung der Membran. Die RNA wurde mit 50 µl DEPC-Wasser in einer erneuten zweiminütigen Zentrifugation eluiert und direkt im Anschluss einer DNase I-Behandlung unterzogen, um restliche DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Hierzu wurde das Eluat in einem Volumen von 80 µl mit 1xTE-Puffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM DTT, 40 Einheiten RNase-Inhibitor (MBI Fermentas) und 25 - 80 Einheiten RNase-freier DNase I (Roche Diagnostics) für zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf 100 µl aufgefüllt und zur Beseitigung der DNase mit 350 µl Qiagen-RLT-Puffer und 250 µl Ethanol gemischt und erneut über eine Qiagen-RNeasy-Säule aufgereinigt. Nach 15-sekündigem Einzentrifugieren bei 10000 Upm wurde die Säule zweifach mit 500 µl Qiagen-RPE-Puffer gewaschen und die RNA nach abschließender zweiminütiger Zentrifugation mit 35 µl DEPC-Wasser eluiert. Die RNA wurde nach dem Zufügen von 1 µl RNase-Inhibitor bei -80°C gelagert.

### **2.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmungen**

Die Konzentration der isolierten Nukleinsäuren wurde aufgrund ihrer Fähigkeit Licht im UV-Bereich bei 260 nm zu absorbieren photometrisch bestimmt. Hierbei wurde die optische Dichte einer Verdünnung der RNA- oder DNA-Lösung mit Hilfe eines GeneQuant-Photome-



ters (Pharmacia Biotech) ermittelt. Das Verhältnis optische Dichte : Nukleinsäure-Konzentration beträgt bei der Absorption durch RNA 1 : 40  $\mu\text{g/ml}$  und für DNA 1 : 50  $\mu\text{g/ml}$ . Anhand der Bestimmung der optischen Dichte der DNA- oder RNA-Lösungen bei 280 nm wurden diese auf eine eventuelle Verunreinigung mit Phenolrückständen oder nicht entfernten Proteinen überprüft. Der Quotient der optischen Dichten bei 260 nm : 280 nm sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

## 2.4 Modifikation genomischer DNA mit Bisulfit

Bei der Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit wird die unterschiedliche Reaktivität methylierter und unmethylierter Cytosine bei der Sulphonierung mit Bisulfit ausgenutzt. Die DNA wird für diese Reaktion vorbereitet, indem sie zunächst mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, aufgereinigt und in Einzelstränge aufgetrennt wird. Nach Umwandlung unmethylierter Cytosin- in Uracil-Nukleotide wurde die zu untersuchende genomische Region mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifisch amplifiziert, in einen geeigneten Vektor einligiert und in *E. coli*-Bakterien kloniert. Einzelklone wurden separiert und die zu untersuchende Region wurde erneut PCR-amplifiziert und anschließend sequenziert.

Die Restriktion von 5  $\mu\text{g}$  genomischer DNA wurde mit einer Gruppe von Enzymen durchgeführt, die bei gleichen Bedingungen und in allen drei zu untersuchenden Regionen eingesetzt werden konnten, da sie keinen der zu amplifizierenden Abschnitte zerstörten und diese durch den Verdau jeweils auf einem mittelgroßen DNA-Fragment (2-5 kb) zu liegen kamen. Es wurden jeweils zehn Einheiten AgeI, AseI, EcoRV, PstI und XhoI (NEB) mit 15  $\mu\text{l}$  P3-Restriktionspuffer (NEB) in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$  eingesetzt, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alternativ wurde 5  $\mu\text{g}$  DNA zur Vorbereitung der Untersuchung der *H19-A1/B1*-Region und der *KvDMR* mit je zehn Einheiten TliI, BsiWI und BsmBI (NEB), 15  $\mu\text{l}$  P3-Restriktionspuffer (NEB) und 1,5  $\mu\text{l}$  BSA (NEB) in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$  in einer Inkubation über Nacht bei 55°C verdaut. Die Restriktionen wurden einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (siehe **Kapitel 2.3.1**), mit 3 M Natriumacetat und eiskaltem Ethanol gefällt (siehe **Kapitel 2.5.3**) und in 110  $\mu\text{l}$  Aqua dest. gelöst. 10  $\mu\text{l}$  der aufgereinigten DNA wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel auf vollständige Restriktion hin überprüft (siehe **Kapitel 2.5.1**).

100  $\mu\text{l}$  der so vorbereiteten DNA wurden mit dem *CpGenome-Modifikation-Kit* (Invitrogen) nach leicht veränderten Angaben des Herstellers behandelt. Die aufgereinigte DNA wurde mit

14 µl 3 M NaOH für 10 Minuten bei 37°C denaturiert, und mit 550 µl Reagent 1, das frisch mit 0,378 g Reagent 1 in 571 µl Aqua dest. und 33 µl 3 M NaOH angesetzt wurde, gemischt und über Nacht bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach 16-20 Stunden wurde die modifizierte DNA auf Raumtemperatur abgekühlt und 5 µl des Glasmilch enthaltenden Reagents 3 zugegeben. Es folgte die Zugabe von 750 µl des Puffers Reagent 2, der zuvor aus 1,35 g Reagent 2 in 750 µl einer 0,005 %-igen β-Mercaptoethanol-Lösung hergestellt wurde. Die DNA wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Bindung an die Glasmilch zu ermöglichen, dann wurde diese in zehn Sekunden bei 5000 g pelletiert und dreimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Abzentrifugieren der Glasmilch erfolgte jedes Mal bei 5000 g für zehn Sekunden, anschließend wurde das Pellet in zwei bis drei Minuten bei 14000 Upm erneut abzentrifugiert, der restliche Überstand entfernt und in 50 µl einer frisch angesetzten 90 %-igen Ethanollösung mit 20 mM NaOH aufgerüttelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, bei der die Desulphonierungsreaktion zu Uracil stattfindet, wurde die DNA erneut zehn Sekunden bei 5000 g pelletiert und zweimal mit 90 %-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und in 15 Minuten mit 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) bei 55°C im Wasserbad eluiert. Die Glasmilch wurde bei 14000 Upm abzentrifugiert und die gelöste DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert. Ein µl der so modifizierten DNA wurde zur Amplifikation der zu untersuchenden Region eingesetzt (siehe **Kapitel 2.5.6**).

## 2.5 DNA und RNA-Standardmethoden

### 2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung genomischer, restringierter oder PCR-amplifizierter DNA oder cDNA, sowie der RNA-Präparationen wurden horizontale 0,8 bis 2,5 %-ige Agarosegele in 1x TBE als Laufpuffer verwendet. Den DNA- und cDNA-Lösungen wurden ein Viertel Volumen 5x Orange G-Marker (Sigma) zugegeben und mit der als Molekulargewichtsstandard dienenden HindIII-geschnittenen λ-DNA (Roche Diagnostics) und/oder der 100 bp-Leiter (Invitrogen) bei maximal 140 Volt aufgetrennt. Die Agarosegele wurden in einer Ethidiumbromid-Lösung (5µg/ml) für zehn Minuten inkubiert, gewaschen und die so markierte DNA unter UV-Licht detektiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Gel-Imaging-Systems (Fröbel Labortechnik) ausgewertet und dokumentiert.

### 2.5.2 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

In 0,8 bis 2 %-igen LMP-Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden im Gel mit Ethidiumbromid markiert und unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Wiedergewinnung der DNA erfolgte unter Verwendung des „Qiaquick“-Gel-Extraktions-Kits (Qiagen) durch zehninütiges Erhitzen des mit drei Volumen Qiagen QG-Puffer überschichteten Gelstücks bei 50°C. Die gelöste DNA wurde anschließend auf eine Qiaquick-Säule gegeben und durch einminütige Zentrifugation bei 14000 Upm an die Membran der Säule gebunden. Es folgte eine Reinigung der DNA mit 500 µl Qiagen QG-Puffer und 750 µl Qiagen PE-Puffer (14000 Upm, eine Minute) und die Elution von der durch zusätzliche einminütige Zentrifugation getrockneten Membran mit dem gewünschten Volumen Aqua dest..

### 2.5.3 Fällung von DNA

Gelöste DNA, PCR-Produkte, aufgereinigte Restriktionen oder Sequenzierreaktionen wurden zur Volumeneinengung und/oder Aufreinigung mit Salzen und Alkohol gefällt. Je nach Beschaffenheit der zu fällenden DNA und der weiteren Verwendung wurde entweder Isopropanol zusammen mit 4 M Ammoniumacetat oder Ethanol mit 3 M Natriumacetat eingesetzt. Kleine Volumina wurden auf 100 µl aufgefüllt. PCR-Produkte, die in eine zweite „nested“-PCR, eine Sequenzierreaktion oder Ligation eingesetzt werden sollten, wurden mit einem Volumen 4 M Ammoniumacetat und zwei Volumen Isopropanol für 35 Minuten bei 14000 Upm bei RT gefällt, da bei der Isopropanolfällung Oligonukleotide und kleine DNA-Fragmente mit weniger als 100 Nukleotiden weitgehend in Lösung bleiben. Gelöste DNA und Restriktionsansätze wurden mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol vermischt und einige Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 45 Minuten bei 4°C und 14000 Upm. DNA aus Sequenzierreaktionen wurde mit der Ausnahme, dass kein flüssiger Stickstoff verwendet wurde und die Zentrifugation bei Raumtemperatur stattfand („warme“ Ethanol-fällung), unter den gleichen Bedingungen gefällt. Alle pelletierten DNAs wurde mit 200 bis 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur erneut abzentrifugiert, unter Vakuum für zehn Minuten getrocknet und je nach der weiteren Verwendung in 5-10 µl (für Ligationen) oder 110 µl (für Bisulfitbehandlungen) Aqua dest., bzw. 2-3 µl „Loading“-Puffer (für die Auftrennung auf Sequenziergelen) resuspendiert.

### 2.5.4 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Aus murinen Geweben isolierte und DNaseI-behandelte RNA wurde durch die Synthese eines komplementären Strangs mit der aus dem Moloney Mäuseleukämievirus stammenden MMLV-Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 5 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 16,9 µl aufgefüllt und zunächst zur Beseitigung der Sekundärstrukturen zehn Minuten bei 70°C und anschließend auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 23,1 µl eines Gemisches aus 6,25 µM Oligo-dT<sub>16</sub>-Molekülen (Gibco BRL, Roth), je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Roche Diagnostics), 7,5 U/µl MMLV-Reverser Transkriptase (Gibco BRL), 1 U/ml RNase-Inhibitor (MBI Fermentas) und 10 mM Dithiothreitol (DTT) in 1x „1<sup>st</sup> strand“-Puffer (Gibco BRL), folgte die cDNA-Synthese in einer 90 bis 120-minütigen Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym durch zehnminütiges Erhitzen auf 94°C zerstört und die cDNA bei -20°C gelagert.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen cDNA-Synthese wurden 1-2 µl eines Ansatzes in einer PCR (siehe **folgendes Kapitel**) auf die Amplifizierbarkeit eines ubiquitär exprimierten Gens (*Igf2r*, *Cd81*) getestet. Um potentielle DNA-Kontaminationen zu detektieren wurde parallel zu jeder cDNA-Synthese mit der gleichen RNA ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt und anschließend auf die Amplifizierbarkeit des zu untersuchenden und/oder des Kontrollgens getestet.

### 2.5.5 Amplifikation von cDNA-Enden (RACE)

Die Identifizierung der ein Transkript am 3'- oder 5'-Ende abschließenden Sequenz erfordert die Synthese einer cDNA-Bank, die an den jeweiligen Enden einen künstlich angehängten Abschnitt besitzt, der sich zusammen mit der bekannten Sequenz des Transkripts spezifisch amplifizieren lässt. Für die Identifizierung der 3'- und 5'-Enden der *Ascl3* und *Trpm5*-Transkripte im Rahmen dieser Arbeit wurde der „SMART-RACE-cDNA-Amplification-Kit“ (Clontech) verwendet. Die Synthese der cDNA-Abschnitte erfolgte ähnlich wie im vorangehenden **Kapitel 2.5.4** beschrieben nach den Angaben des Herstellers: ein µg RNA wurde entweder mit den 3'-CDS- oder 5'-CDS-Oligonukleotiden und den SMART II-Oligonukleotiden für zwei Minuten bei 70°C und anschließend auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 Units der MMLV-Superscript II-Reversen Transkriptase (Gibco BRL), 1 mM dNTP-Mix und 10 mM DTT in 1x „1<sup>st</sup>-strand“-Puffer (Clontech) wurde der Ansatz zur cDNA-Synthese 90 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend mit 100 µl Tricine-EDTA abgestoppt und das Enzym durch siebenminütiges Erhitzen auf 72°C inaktiviert.

Die so hergestellten cDNA-Enden wurden mit dem Universal-Primer-Mix des „SMART-RACE-cDNA-Amplification-Kits“ und am Rande der bekannten Sequenzen gelegenen Oligonukleotiden mit dem „Advantage-2-PCR-Kit“ transkriptspezifisch amplifiziert (siehe folgendes **Kapitel 2.5.6**). Wenn nach dieser PCR noch kein auf einem Agarosegel sichtbares Produkt generiert werden konnte, wurde mit 1/20 der ersten, durch Isopropanolfällung (**Kapitel 2.5.3**) aufgereinigten Amplifikation eine zweite PCR mit einem zweiten transkriptspezifischen Oligonukleotid und dem „Nested-Universal-Primer“ des „SMART-RACE-cDNA-Amplification-Kits“ durchgeführt. PCR-Produkte, die nach Auftrennung im Agarosegel eine einzelne Bande zeigten, wurden erneut mit Isopropanol gefällt und sequenziert (**Kapitel 2.9**). Wurden mehrere Banden detektiert, wurden die unterschiedlich großen Produkte aus einem LMP-Agarosegel wiedergewonnen (**Kapitel 2.5.2**), aufgereinigt und einzeln sequenziert oder durch Subklonierung in T-Vektoren (**Kapitel 2.8**) einer getrennten Sequenzierung zugänglich gemacht.

### 2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden durch die Verwendung einer geeigneten thermostabilen DNA-Polymerase und zweier, die zu amplifizierende Region begrenzenden Oligonukleotide („Primer“) enzymatisch vervielfältigt (Saiki et al., 1988). Ein Standard-PCR-Ansatz bestand aus bis zu 100 ng DNA oder cDNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Gelatine, je 200 µM dNTPs, je 15 µM Primer und 1-2 Einheiten Taq-Polymerase (Roche Diagnostics) oder einer Einheit HotStar-Taq-Polymerase (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Eine Standard-Amplifikation in einem Peltier Thermal Cycler 100 oder 200 (MJ Research) bestand aus einer initialen Denaturierung der DNA bei 95°C, der zyklischen 25- bis 40-fachen Wiederholung der drei Phasen, bestehend aus einer einminütigen Denaturierung bei 95°C, einem einminütigen Annealing bei 50°C-68°C und einer Elongation bei 72°C, deren Länge sich nach der Größe der zu amplifizierenden Fragmente richtete, gefolgt von einer abschließenden siebenminütigen Elongation bei 72°C und dem Herunterkühlen der Ansätze auf 4°C. Bei Verwendung der HotStar-Taq-Polymerase (Qiagen) wurde die initiale Denaturierung auf 10 bis 13 Minuten verlängert, um eine Aktivierung des an ein hitzeinstabiles Protein gekoppelten Enzyms zu ermöglichen. Das Standardprogramm wurde je nach verwendeten Oligonukleotiden und zu amplifizierendem cDNA-Abschnitt angepasst. Zur Erhöhung der Stringenz wurde bei einigen cDNA-Matrizen dem PCR-Ansatz 10 % DMSO oder 5 % Glycerol zugegeben.

Bisulfitbehandelte DNA erforderte aufgrund der Umwandlung aller unmethylierten Cytosine in Uracile und der daraus resultierenden verminderten Diversität der genomischen DNA-Abschnitte, eine Amplifikation der zu untersuchenden Region in zwei Schritten. Die erste PCR mit einem Zehntel (5 µl) der aufgereinigten modifizierten DNA erfolgte für die *H19*-Promotorregion durch 13-minütige initiale Denaturierung bei 95°C, eine fünffache Wiederholung der drei Inkubationen bei 95°C für eine Minute, 57°C für zwei Minuten und 72°C für drei Minuten, eine 25-fache Wiederholung der drei Inkubationen bei 95°C für 30 Sekunden, 57°C für 30 Sekunden und 72°C für zwei Minuten, und einer abschließenden siebenminütigen Elongation bei 72°C. Dieser Ansatz wurde in einer Isopropanolfällung aufgereinigt, und 1/25 in eine zweite PCR mit einem zweiten Primerpaar eingesetzt. Die zweite PCR erfolgte erneut durch 13-minütige initiale Denaturierung bei 95°C, eine fünffache Wiederholung der drei Inkubationen bei 94°C für eine Minute, 55°C für zwei Minuten und 72°C für drei Minuten, eine 28-fache Wiederholung der drei Inkubationen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für zwei Minuten und 72°C für 50 Sekunden, und einer abschließenden sechsminütigen Elongation bei 72°C. Die PCR-Bedingungen für die zweistufige Amplifikation der anderen modifizierten DNA-Abschnitte entsprachen diesem und/oder dem Standardprotokoll, mit leichten Veränderungen in Anpassung an die verwendeten Oligonukleotide.

### **2.5.7 RNA-Transfer von Agarosegelen auf Nylonmembranen (Northern Blot)**

10-20µg Gesamt-RNA wurden zusammen mit 10 µl eines RNA-Puffers, bestehend aus 50 % deionisiertem Formamid, 14 % Glycerol, 7 % Formaldehyd und 0,04 % Bromphenolblau in 1x MOPS, zehn Minuten bei 65°C und dann auf Eis inkubiert. Die denaturierte RNA wurde auf einem mit 10 % 10x MOPS, 0,7 % Formaldehyd in DEPC-Wasser hergestellten 1,2 %-igen Agarosegel, das in 1x MOPS-Laufpuffer äquilibriert wurde, aufgetrennt. Als Längenstandard wurden 10µl einer RNA-Leiter (Gibco BRL) verwendet, die ebenfalls denaturiert und mit 2µg Ethidiumbromid gemischt aufgetrennt wurde. Die Banden des Längenstandards wurden unter UV-Licht durch Einstechen markiert und nach dem Transfer auf der Nylonmembran eingezeichnet. Das Agarosegel wurde zur Entfernung des Formaldehyds 3x 5 Minuten in DEPC-Wasser gewaschen. Um die RNA auf eine Hybond-N+-Nylonmembran zu transferieren, wurde nach dem Prinzip eines Kapillarblots auf das auf 3MM-Papier, das in 10x SSC getränkte wurde, liegende Agarosegel die, ebenfalls in 10x SSC getränkte Nylonmembran platziert und mit feuchtem 3MM-Papier bedeckt. Darauf wurde trockenes 3MM-Papier und

weiteres saugfähiges Papier geschichtet. Nach einem 16- bis 24-stündigen Transfer wurde die Nylonmembran getrocknet und die RNA auf ihr durch UV-„crosslinking“ ( $2 \times 1200 \text{ mL/cm}^2$ ) fixiert.

### 2.5.8 DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nylonmembranen (Southern Blot)

DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und in diesem 30 Minuten in einer 0,4 M NaOH-Denaturierungslösung inkubiert. Das Gel wurde anschließend zweimal fünf Minuten mit Aqua dest. gewaschen und zweimal 15 Minuten in Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer auf eine Amersham Hybond N+ Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillarblot wie in **Kapitel 2.5.6** beschrieben mit 20x SSC als Laufpuffer. Die Nylonmembran wurde nach mindestens 24 Stunden in 2x SSC gewaschen und nach dem Trocknen 20 Minuten bei 80°C gebacken. Abschließend wurde die DNA durch UV-„crosslinking“ zusätzlich an die Membran gebunden.

## 2.6 Radioaktive DNA-Markierung

DNA-Fragmente, die zur Hybridisierung an an Nylonmembranen gekoppelte Nukleinsäuren verwendet werden sollten, wurden mit der abgewandelten Methode des „Random primed oligolabelling“ nach Feinberg und Vogelstein entweder mit einer selbst hergestellten Markierungslösung mit sondenspezifischen Oligonukleotiden oder mit dem „Ready-to-Go“-DNA-Labeling Kit (Pharmacia) radioaktiv markiert. Für die „Ready-to-Go“-Markierung wurden bis zu 5 µg der PCR-amplifizierten und Isopropanol-gefällten DNA-Fragmente in einem Volumen von 10 µl zehn Minuten aufgeköcht und auf Eis mit der rekonstituierten RTG-Lösung und 50 µCi  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP gemischt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Alternativ wurde die gleiche Menge DNA-Fragmente zusammen mit je 20 pM geeigneter Oligonukleotide in einem Volumen von 20 µl hitzedenaturiert und auf Eis mit 10 µl Markierungslösung, bestehend aus 6 µl OLB-Puffer ohne Random-Hexamere, 60 µg BSA, 30 µCi  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP und drei Einheiten Klenow-DNA-Polymerase (NEB), gemischt, und zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung erfolgte bei beiden Markierungen über eine mit 1x TE-Puffer äquilibrierte Sephadex G-50 -Säule (Pharmacia), in der nicht eingebaute Nukleotide mit 400 µl TE-Puffer abgetrennt und die DNA in 400 µl TE-Puffer eluiert wurde.

Die Effektivität der Markierung wurde in einem 1/100 des Eluats in 10 ml Szintillationsflüssigkeit mit einem Szintillationsmessgerät (Beckmann) gemessen. In einer Hybridisierung wurde ein Anteil des Eluats verwendet, dessen Aktivität ca. 1 bis  $2 \times 10^6$  cpm pro ml eingesetzter Hybridisierungslösung betrug.

## 2.7 Nukleinsäure-Hybridisierung

### 2.7.1 DNA-RNA-Hybridisierung

Es wurden RNA-Filter hybridisiert, die entweder selbst hergestellt (**Kapitel 2.5.7**), oder von der Firma Clontech bezogen wurden. Die Filter wurden je nach Größe mit 5 bis 10 ml ExpressHyb-Lösung (Clontech) bei 68°C für 30 Minuten unter Rotation inkubiert, bevor diese Lösung entfernt und die radioaktiv markierte DNA-Sonde, die durch zehnmütiges Kochen denaturiert worden war, in 5 bis 10 ml frischer vorgewärmter ExpressHyb-Lösung auf den Filter gegeben wurde. Es folgte eine ein- bis zweistündige Inkubation bei 68°C unter Rotation, während der die DNA-Sonde an die immobilisierte RNA binden konnte. Die Hybridisierungslösung wurde entfernt und der Filter dreimal mit einer Waschlösung aus 2x SSC und 0,05 % SDS zwölf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer zweiten Lösung aus 0,1x SSC und 0,1 % SDS wurde zweimal bei 50°C für 15 Minuten gewaschen und der Filter anschließend feucht in Haushaltsfolie eingewickelt. Die Detektion der radioaktiv markierten, spezifisch gebundenen DNA-Fragmente erfolgte in Quanta III-Cronex-Cassetten (DuPont) durch Auflegen eines Hyperfilm-MP-Röntgenfilms (Amersham) und einer Exposition bei -80°C. Nach Abschluss der Dokumentation wurde der Filter durch zehnmütiges Aufkochen in 0,5 %-iger SDS-Lösung und mindestens zehnmütigem Abkühlen von den hybridisierten DNA-Fragmenten befreit und bei -80°C gelagert.

### 2.7.2 DNA-DNA-Hybridisierung

Durch einen Southern Blot hergestellte DNA-Filter wurden in einer rotierenden Hybridisierungsröhre zwei bis drei Stunden in 2x 10 bis 20 ml „Church“-Puffer bei 65°C zur Prähybridisierung inkubiert. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde durch zehnmütiges Kochen



denaturiert und nach Entfernen des Prähybridisierungspuffers in 10 bis 20 ml vorgewärmtem „Church“-Puffer in die Hybridisierungsröhre gegeben. Auf die 16- bis 20-stündige Inkubation bei 65°C folgte nach Entfernen des Hybridisierungspuffers ein zweifaches Waschen des Filters mit 20 bis 30 ml 100 mM NaHPO<sub>4</sub>, und zwei- bis dreimaliges Waschen mit 20 bis 30 ml 50 mM NaHPO<sub>4</sub>. Die Detektion und Dokumentation der radioaktiven hybridisierten DNA-Fragmente erfolgte wie in **Kapitel 2.7.1** beschrieben.

## 2.8 Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

### 2.8.1 Vektorvorbereitung

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde in der Regel ein selbst hergestellter oder von der Firma Promega bezogener (pGEM-) T-Vektor verwendet. Die Herstellung eines Vektors, der ein am 3'-Ende überhängendes Deoxy-Thymin-Nukleotid besitzt, erfolgte ausgehend von einem EcoRV-Verdau eines pBlueskript II KS+ Plasmidvektors. Hierfür wurden 3µg Vektor mit 20 Einheiten EcoRV in einem 30 µl-Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Phenol-Chloroform-Aufreinigung und Ethanol-Fällung (**2.5.3**) wurde das Pellet in Aqua dest. gelöst und mit 20 µl 1,25 mM dTTP und drei Einheiten Taq-Polymerase in 10x Polymerasepuffer in einem 200 µl-Ansatz zwei Stunden bei 75°C inkubiert. Zur Erhöhung der Klonierungseffizienz wurde der so präparierte T-Vektor nach Phenol-Chloroformaufreinigung mit aus Kälberdarm gewonnener alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Das bei 70°C in einer 20-minütigen Inkubation inaktivierte Enzym wurde durch erneute Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und der T-Vektor durch Agarosegelaufreinigung (**2.5.1**) und anschließender Wiedergewinnung (**2.5.2**) abschließend aufgereinigt.

### 2.8.2 Ligation

Mit Isopropanol gefällte PCR-Produkte, die in einen pGEM-T-Vektor (Promega) einligiert werden sollten, wurden mit diesem in einem Verhältnis von 1:3 in einem 10 µl-Ansatz mit drei Einheiten T4-DNA-Ligase (Promega) und dem mitgelieferten 2x Ligationspuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in einen selbst hergestellten T-Vektor wurden fünf Einheiten einer T4-DNA-Ligase der Firma Gibco BRL mit dem zugehörigen 5x Puffer verwendet und die Ligation über Nacht bei 16°C durchgeführt. 5 µl des

Ligationsansatzes wurden direkt im Anschluss für die Transformation in *E. coli*-Bakterien verwendet, die Lagerung der zweiten Hälfte erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.8.3 Transformation und Klonierung

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in T-Vektoren wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  mit einem modifizierten Protokoll nach Hanahan chemokompetent gemacht (Hanahan, 1985). 100 ml SOB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur der DH5 $\alpha$ -Bakterien angeimpft, so dass eine optische Dichte ( $\text{OD}_{550}$ ) von 0,05 als Ausgangskonzentration vorlag, und bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Schüttelinkubator auf eine Endkonzentration mit der  $\text{OD}_{550}$  von 0,5 vermehrt. Die Bakterien wurden durch zehnmütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1200 g pelletiert, in 30 ml TbfI-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in sechs Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 800 g abzentrifugiert und in vier ml TbfII-Puffer aufgenommen. Aliquotierte Suspensionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Transformation chemokompetenter DH5 $\alpha$ -Bakterien mit in T-Vektoren inklonierten DNA-Fragmenten wurde mit 50  $\mu\text{l}$  der tiefgefrorenen Bakteriensuspension, die fünf Minuten auf Eis aufgetaut wurden, und 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz, der der Suspension beigemischt wurde, durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde zunächst 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann einem einmütigen Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt und nach Zugabe eines Milliliters LB-Medium für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einen Schüttelinkubator gegeben. Anschließend wurden 50, 100 und 200  $\mu\text{l}$ -Aliquots auf LB-Agar-Platten, die unter Zugabe von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin (Ratiopharm), 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  X-Gal (AppliChem) und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IPTG (AppliChem) angesetzt worden waren, ausgestrichen und bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach 16 bis 24 Stunden wurden Klone, die aufgrund ihrer durch den Vektor vermittelten Ampicillin-Resistenz auf der Agarplatte angewachsen waren und aufgrund der erfolgreichen Ligation der DNA-Fragmente in die Klonierungsschnittstelle, durch die das lacZ-Gen zerstört wird und die Expression des  $\beta$ -Galactosidase-Gens ausfällt, nicht blau gefärbt sind, einzeln in eine 96-Lochplatte mit je 100  $\mu\text{l}$  mit Ampicillin versetztes LB-Medium überführt. Nach drei- bis vierstündiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde das inklonierte DNA-Fragment aus einem Mikroliter mit zu den der Klonierungsschnittstelle benachbarten Sequenzen komplementären Oligonukleotiden (M13-Primern oder T3/T7-Primern) in einer Standard-PCR amplifiziert. Die Einzelklone wurden mit einem Volumen 2x FM-Medium überschichtet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach dem von Sanger und Mitarbeitern entwickelten Prinzip des Kettenabbruchs durch zufälligen Einbau eines Didesoxynukleotids bei der Synthese des Komplementärstrangs (Sanger et al., 1977). Durch Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome zur Markierung der vier Nukleotide konnte eine Reduktion der ursprünglich benötigten vier Sequenzreaktion auf einen gemeinsamen Ansatz erreicht werden (Lee et al., 1992). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten automatisierten DNA-Sequenzierungen wurde bis 09/99 der ABI PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und ab 10/99 der ABI PRISM Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Version 2.0 (ab 08/03 Version 3.1, beide Applied Biosystems) eingesetzt.

Für die Sequenzierreaktion wurden in einem zehn µl-Ansatz ca. 20 bis 200 ng mit Isopropanol gefällte PCR-Produkte mit einem µM eines spezifischen Oligonukleotids und vier µl Terminator- oder Big Dye-Premix Version 2.0, bzw. zwei µl Big Dye-Premix Version 3.1 und zwei µl 5x Puffer eingesetzt. Der Einbau der markierten Abbruchnukleotide erfolgte durch zweiminütiges Denaturieren bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen einer fünf- bis zehnssekündigen Denaturierung und der vierminütigen Komplementärstrangbildung bei 55°C. Bei PCR-Produkten, die durch Amplifikation bisulfitbehandelter DNA-Fragmente entstanden sind, wurde der Einbau bei 50°C durchgeführt, bei Einsatz des Big Dye-Premix Version 2.0 wurde alternativ ein Drei-Schritt-Protokoll verwendet, bei dem einer zehnssekündigen Denaturierung fünf Sekunden bei 50°C und eine vierminütige Inkubation bei 60°C folgten. Abschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt und nach „warmer“ Ethanol-fällung (**Kapitel 2.5.3**) in zwei bis drei µl „Loading“-Puffer aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung von 1 bis 1,5 µl der markierten Fragmente auf einem 4,5 %-igen, harnstoffhaltigen PAA-Gel und die Detektion und Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgte nach zehnminütiger Denaturierung bei 95°C und einer kurzen Inkubation auf Eis mit einem automatischen Sequenziergerät (ABI PRISM 377, Applied Biosystems).

Die Auswertung der Intensitätsprofile der Fluoreszenzfarbstoffe wurde mit der Analysis 2.1.2-Software (Applied Biosystems) und der Sequencher 4.1-Software (Gene Codes Corporation Inc.) vorgenommen.

## 2.10 GeneScan Fragmentanalysen

Ähnlich der DNA-Sequenzierung werden für die Fragmentanalyse mit der GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems) DNA-Fragmente fluoreszenzmarkiert und über ein PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Markierung der DNA erfolgt dabei in der PCR-Reaktion durch Einbau eines am 5'-Ende markierten, als Primer fungierenden Oligonukleotids. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide waren mit 6-Carboxyfluorescein (6-Fam, Applied Biosystems) markiert und wurden nach einem Standard-PCR-Protokoll (**Kapitel 2.5.6**) in 25 Zyklen in die zu amplifizierenden DNA-Fragmente eingebaut. Die markierten Amplifikate wurden 1:6 verdünnt, und 1,5 µl mit der gleichen Menge Formamid und jeweils 0,5 µl Bluemarker und TAMRA 350-Längenstandard (Applied Biosystems) in Minuten aufgeköcht und auf Eis gestellt. 3,5 µl wurden auf einem Sequenziergel in einem automatischen Sequenziergerät (ABI Prism 373) elektrophoretisch aufgetrennt (**Kapitel 2.9**), mit der GeneScan Analysis Software 2.1 analysiert und im Vergleich mit dem beigefügten Längenstandard die Größen der DNA-Fragmente und deren Fluoreszenzintensitäten bestimmt.

## 2.11 Echtzeit-PCR und Schmelzpunktbestimmung

Die Amplifikation bisulfitbehandelter DNA-Fragmente mit anschließendem graduellem Aufschmelzen der Produkte erfolgte unter Verwendung eines LightCyclers (Roche) und der LightCycler Analyse Software Version 3.5.28 (Roche). Für die Bestimmung des spezifischen Schmelzpunktes eines PCR-Produkts wurde dieses in einen T-Vektor ligiert, in *E. coli* kloniert und Einzelklonkulturen angelegt (**Kapitel 2.8**). Um sowohl Einzelklone, die eine Umwandlung aller Cytosine in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden, wie auch solche, die aufgrund einer Methylierung aller CpGs keine Umwandlung aufweisen, zu identifizieren, wurde die eingebrachte DNA der Einzelklone in einer PCR mit Randprimern amplifiziert und sequenziert (**Kapitel 2.9**). Ein Mikroliter der so ausgewählten Einzelklone wurde mit Aqua dest. 1:100 bis 1:10000 verdünnt und auf Eis mit einem Gemisch aus 2,4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub> (entspricht einer Endkonzentration von 4 M im Ansatz), jeweils 6 mM spezifische Oligonukleotide und 2µl des „LightCycler - FastStart DNA Master SYBR Green I“, der durch Zugabe von 60 µl des „LightCycler - FastStart Reaction Mix SYBR Green I“ zum „LightCycler - FastStart Enzyme“ hergestellt wurde, in die Amplifikation mit einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Ansätze wurde bei maximal 2000 Upm in fünf Sekunden in die LightCycler Glaskapillare einzentrifugiert und zehn Minuten bei 96°C zur Denaturierung der

DNA-Fragmente und Aktivierung der FastStart DNA Polymerase inkubiert. Es folgte eine 28-fache zyklische Wiederholung der drei Inkubationen bei 95°C und 57 bis 58 °C für sechs Sekunden und bei 72°C für 26 Sekunden. Die PCR-Produkte wurden anschließend kurz auf 95°C gebracht und dann mit einer Geschwindigkeit 0,1°C pro Sekunde von 65°C auf 92°C erhitzt. Dabei wurde kontinuierlich die mit steigender Temperatur abnehmende Fluoreszenzintensität der Ansätze gemessen und durch die LightCycler software in der Darstellung der negativen Ableitung der Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Temperatur gegenüber der jeweiligen Temperatur wiedergegeben ( $-dF/dT$  gegenüber T). Daraus ergibt sich eine für ein PCR-Produkt spezifische Schmelzkurve mit mehreren oder einem Peak(s), der/die ein Aufschmelzen eines Abschnitts oder des ganzen amplifizierten DNA-Fragments anzeigen.

Nach Beendigung des Aufschmelzens wurden die Amplifikate kurz abgekühlt und aus den Glaskapillaren herauszentrifugiert, um sie auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufzutrennen und ihre Größe zu bestimmen. Dadurch konnten Verunreinigungen der spezifischen PCR-Produkte durch die Bildung von Primerdimeren und anderen unerwünschten Nebenprodukten ausgeschlossen werden.

## 2.12 Anhang

### 2.12.1 Puffer und Lösungen

Agarosegel ( x %-ig)	x g Agarose 100 ml 1 x TBE-Puffer
<i>Church</i> -Hybridisierungspuffer	1 mM EDTA 0,5 M NaHPO <sub>4</sub> , (pH 7,2) 7 % SDS 1 % BSA
Denaturierungspuffer	50 mM NaOH 10 mM NaCl
2 x FM-Medium	65 % Glycerol 10 mM MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l Aqua bidest. (pH 7,5)
<i>Loading-Buffer</i>	5 Volumen deionisiertes Formamid 1 Volumen 25 mM EDTA 50 mg/ml Blue Dextran (pH 8,0)
Lysepuffer	100 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl 100 µg/ml Proteinase K
10 x MOPS	0,2 M 3(N-morpholin)-Propan- Sulfonsäure 0,05 M Na-Acetat 0,01 M EDTA (pH 7,0)
Neutralisierungspuffer	0,2 M Tris pH 7,4 10 x SSC
OLB	1 M HEPES / DTM / OL (25/25/7)
5 x Orange Dye Marker	30 % Sucrose 0,35 % Orange G (Sigma)
10 x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 15 mM MgCl <sub>2</sub>

PBS (Phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /7 x H <sub>2</sub> O 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (pH 7,3)
Puffer P1	50 mg Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml Rnase A (pH 8,0)
Puffer P2	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer P3	2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8)
QBT- Puffer (Qiagen)	50 mM MOPS 750 mM NaCl 15 % Ethanol 0,15 % Triton X-100 (pH 7,0)
QC- Puffer (Qiagen)	50 mM MOPS 1 M NaCl 15 % Ethanol (pH 7,0)
QF-Puffer (Qiagen)	1,25 M NaCl 50 mM Tris 15 % Ethanol (pH 8,5)
RNA Sample Buffer	50 % deionisiertes Formamid 1 x MOPS 7 % Formaldehyd 14 % Glycerol 0,04 % Bromphenolbau
20 x SSC-Puffer (Standard saline citrat)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
SOB-Medium	2 % Tryptone 0,5 % Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub>
1 x TBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA
10 x TE-Puffer	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA (pH 7,5)

Tfb I	30 mM K Acetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin (pH 5,8 mit Essigsäure)
Tfb II	10 mM NaMOPS (pH 7,0) 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15 % Glycerin
Waschpuffer I (Northern-Blot)	2 x SSC 0,05% SDS
Waschpuffer II (Northern Blot)	0,1 x SSC 0,1% SDS

## 2.12.2 Oligonukleotidsequenzen

### Ascl3

F2	5' -ACACCAGAAGCTACCCCAG-3'
F2LONG	5' -GATGGACACCAGAAGCTACCCCAG-3'
1BF2	5' -AGCGTCGAGAATCTCTTAGG-3'
F3	5' -AGCATCTTGAACACTACAAAACA-3'
F4	5' -CTTGTACCCGGATGAATCTG-3'
R3	5' -ATGAGAATGTACTGGCTGCG-3'
R4	5' -GCCTGTAGTTGGTGTAAGGC-3'
R4LONG	5' -ACAGCGCCTGTAGTTGGTGTAAGGC-3'
RACEREV	5' -CTGGGGTAGCTTCTGGTGTCCATC-3'
RaceR	5' -GATTCAAATGACTCTCAGAGCCGG-3'

### Cd81

Tapa-p1F	5' -TGAGATGATTTCTGAGCATGG-3'
Tapa-p1R	5' -AGTTGAAGGTGACACGTTAG-3'
Tapa-p2F	5' -GGAAGCTGTACCTCATTGG-3'
Tapa-p2R	5' -CATGTGTGATGTCAGCTCC-3'

### Glucokinase

Gk-p2F	5' -GAAGAGTAAGGGCTGCCC-3'
Gk-p2R	5' -CATGGTTCCAAGCTGGTGT-3'
Gk-p3F	5' -CTTCAGCAGCTTGGCCAG-3'
Gk-p3R	5' -CATGGCATCTGGGAAACCT-3'

### H19/IGF2-ICR

B1R	5' -TTAATAAAAACACACTMTAATCATCAC-3'
B1-(20/21)R	5' -ACCTAAAAATCTAATAC-3'
B1-3bisF	5' -TGTGGTTTGTGGTGTAGAAATATTTYGGTTAATAGG-3'



B1-3bisiF	5' -GGGGTTTTTGTATAGTATATG-3'
B1-3bisR	5' -AACATCCTAACCCCATCAAAATCCCCACCCC-3'
B1-3bisiR	5' -AACTATAATATATAAACCTACACT-3'
Bis2oF	5' -GAGATGAGAGGAGATATTTGGGGGATAGTGAAG-3'
Bis2iF	5' -GTAGGGTTTTTGGTAGGTATAGAG-3'
Bis2oR	5' -CCAAACATTATAAAAAAACTAACACAAAATCC-3'
Bis2iR	5' -CACTAAAAAACAATTATCAATTC-3'
Bis2inner2F	5' -GGAATAATGAGGTGTTTTYAGTTTTA-3'
Bis2inner2R	5' -CACCTCAAACCTRCATTAAATAAA-3'
Bis2normoF02	5' -GGGACAGTGAAGTGTCCCCATTCTTTG-3'
Bis2normiF02	5' -GCCCTAGTGTGAAACCCTTC-3'
Bis2normoR02	5' -ACATCCTAACCCCATCAGGATCCCCAC-3'
Bis2normiR02	5' -TGCTCTGGGATAGATGTGGA-3'

### **H19-Promotorregion**

Bis1oF	5' -TGATGGTGGTAGGAAGGGGTTTTTTGTGTT-3'
Bis1iF	5' -GGTATGGTGTTTTTTGAGGGGAGAT-3'
Bis1oR	5' -CTCCTCCAACACCCCATCTTCCCCTAATTA-3'
Bis1iR	5' -CATCCACCCCCTCCCTCACCTA-3'
Norm1oF	5' -TGATGGTGGCAGGAAGGGG-3'
Norm1iF	5' -AGCAGGCATGGTGTCCCCT-3'
Norm1oR	5' -TCCTCCAGCACCCCATCTTC-3'
Norm1iR	5' -ATCCACCCCCTCCCTCAC-3'

### **Igf2r**

Igf2r-p1F	5' -GACTTCAGCTCGATGATGC
Igf2r-p1R	5' -CAGCTCACTAAGTGTGCATC
Igf2r-p2F	5' -GCATAAGGTGAAGCTGGCCG
Igf2r-p2R	5' -CTCTATAATGTGACAAGTCAC-3'
Igf2r-p3F	5' -GTGACTTATTACAGACACCG-3'

### **Kcnq1ot1**

Kvlqt1-as-p1F	5' -ACCTGACTGGGCAGTACAG-3'
Kvlqt1-as-sc34.1	5' -TTGCCTGAGGATGGCTGTG-3'
Kvlqt1-as-sc34.2	5' -CTTTCCGCTGTAACCTTTCTG-3'

### **KvDMR**

LitoF	5' -TATTTTTTGGAGGTTTTAAGTTTTTAGGGGT-3'
LitiF	5' -TATAGTAGTGGGGTTTTAGAAATATTT-3'
LitoR	5' -TAACAAAATCTTACTAAAAAACTCCCTAAAAAT-3'
LitiR	5' -CATAAAACACTAACTAAATATAAAATAAC-3'
NLitoF	5' -CACCCCCTGAGGTCCCAAGTCCTCAGGGG-3'
NLitiF	5' -CACAGCAGTGGGGGCTTCAGAACATCC-3'
NLitoR	5' -GCAGGATCTTGCTGAGGAGCTCCCTGGAGG-3'
NLitiR	5' -ATGAGGCACTGGCTGGGTGTGAGGTGG-3'

**Nap114**

Nap1L4-p2F 5' -GAACTGCGTGGGAAGCTG-3'  
 Nap1L4-p2R 5' -CACACTCTACAATGGCTGG-3'  
 Nap1L4-0pF 5' -AGCGAGCTTAGGACAGGCGC-3'  
 Nap1L4-In5R 5' -GTGCCACGCTGACTCTGCTAC-3'  
 Nap1L4-p3F-FAM6 5' -FAM-CAGCACCATCGGGTTCAC-3'  
 Nap1L4-p3F 5' -CAGCACCATCGGGTTCAC-3'  
 Nap1L4-p3R 5' -CTCCCTCCACTTGGTGTC-3'  
 Nap-2pF 5' -GCCCCGAGAACCCACGCGAAG-3'

**Th**

Th-p2F 5' -GAAGTTTGACCCGTACACC-3'  
 Th-p2R 5' -CCTTTCCTTCCTTTATTGAG-3'

**Trpm5**

5UTRR3 5' -AGAAGCATCACGAGCAACAG-3'  
 2RACE5a 5' -ACTTCATAGCCAAAGGTCGTTCCCTCAC-3'  
 2RT3 5' -ATGAAGTCGTGGCTTCGGG-3'  
 2RT5 5' -GTGAGCAGGAGTTCAAAGAG-3'  
 2RT5a 5' -AGGTGCACTCGGTGAGCAG-3'  
 3RT5 5' -ACTACACGGATCTTGGTGG-3'  
 3RT3 5' -GGACAACATGTACGTGATCA-3'  
 4RT3 5' -GATGAGGGCAACATTCAGGG-3'  
 4RT5 5' -GCCTGACTCCACAAGGATG-3'  
 5RT5 5' -GTCACCATTGACCAACAGGC-3'  
 5RT3 5' -GCTGCATCCAGATACCTGTC-3'  
 6RT5 5' -CTCTCTGAACTGCTTCTCAG-3'  
 6RT3 5' -CTGAGAAGCAGTTCAGAGAG-3'  
 7RT5 5' -GGATGACAGTGTCCAGGTC-3'  
 7RT3 5' -GCTCACAGTATATGACTTCGA-3'  
 8RT5 5' -CCAGGCCACTGCTAACTTG-3'  
 8RT3a 5' -GACTACCTAGATGAGCTCAAG-3'  
 9RT5 5' -GCCCATAGGTCAAGAACTCG-3'  
 9RT3 5' -GCTGCAGCGTAAGCATGAG-3'  
 11RT5 5' -GCTCATACTTGGCCTCACG-3'  
 11RT3 5' -GCTGCCTGCAAGATCATAAAG-3'  
 12RT5 5' -GCCTTGGCATCAGCTTCAG-3'  
 12RT3 5' -GTGAGGACCGTGCCTTTGTC-3'  
 13RT5 5' -GTAGATGAGGGCTGGGCAG-3'  
 13RT3 5' -GCACACCCATCCTACGGCT-3'  
 14RT5 5' -GCTGTCTGGCTCCTGCAGATC-3'  
 14RT3 5' -GATCTGCAGGAGCCAGACAGC-3'  
 15RT5 5' -GAACTTCCTCCACCTTGTG-3'  
 15RT3 5' -GTCTGGATCCGAGGTTACC-3'  
 16RT5 5' -GGAAGATGGCCACCATGTC-3'  
 16RT3 5' -GTGGAAGACAACCTGGAACAAG-3'  
 17RT3 5' -GACCGTTCTGGCCATTGAC-3'  
 17RT5 5' -GGATGAGCCGAAGTGTGAAC-3'  
 18RT3 5' -GTATGGCTTGTGGCCTATGG-3'

18RT5	5' -GATGCAGCAGGGCCTGAGT-3'
20RT3a	5' -GCCCTAATCTCTATGCCAAC-3'
21RT3	5' -GCAATGCAGACATGTTCTGG-3'
21RT5	5' -GCTGGTCTTCCATGGTATTC-3'
22RT3	5' -GGACCAGAAGATCATTACCTG-3'
22RT5	5' -CATGGTACTCAGGAAGTTCTC-3'
23aRT3a	5' -GTGGACTTGATTGCCAAATAC-3'
23aRT5a	5' -GTGATTCCAGACACTTGATCC-3'
23aRACE3	5' -GAGCAAGAAAAGAGGATCAAGTGTCTGG-3'
24RT5	5' -GACATGAGTTTCATTCTCTTAGG-3'

### Vektorrandprimer

M13F	5' -GTAAAACGACGGCCA-3'
M13R	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'

### 2.12.3 Chemikalien, Enzyme, Materialien

0,24 - 9,5 kb RNA-Marker	Invitrogen (USA)
100 bp-Leiter	Invitrogen (USA)
1 x „1 <sup>st</sup> strand“-Puffer	Gibco BRL (Eggenstein), Clontech
$\alpha$ [ <sup>32</sup> P]dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham (Braunschweig)
$\beta$ -Mercaptoethanol	BioRad (USA)
$\lambda$ -DNA (HindIII-geschnitten)	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>ABI PRISM Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems (Weiterstadt)
<i>ABI PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
<i>Advantage-2-PCR-Kit</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Agar-Agar	Difco (USA)
Agarose	Eurogentec (Belgien)
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
BSA (Bovines Serum Albumin)	NEB (USA), Sigma (Deisenhofen)
<i>CpGenome-Modifikation-Kit</i>	Invitrogen (USA)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (Deisenhofen), Eurogentec (Belgien)
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL (Eggenstein)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTPs	Promega (USA), PeqLab (Erlangen)
EDTA	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ethanol	Riedel-de-Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Oncor (USA)
<i>ExpressHyb</i> Solution	Clontech (USA)
G1-Lösung	Qiagen (Hilden)
G2-Lösung	Qiagen (Hilden)
Gel-Blotting-Paper (3MM)	Schleicher & Schüll (Dassel)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen)

Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Difco (USA)
<i>HotStar</i> -Taq-Polymerase	Qiagen (Hilden)
IPTG	AppliChem (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim)
Isopropanol	Fluka (Schweiz)
Isoprophylalkohol	Riedel-de-Haen (Seelze)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Ratiopharm (Ulm)
Klenow DNA-Polymerase	NEB (USA)
<i>LightCycler - FastStart Enzyme</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>LightCycler - FastStart</i> <i>Reaction Mix SYBR Green I</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Methanol	Riedel-de-Haen (Seelze)
<i>Microspin G50</i> -Säulen	Pharmacia (Schweden)
MMLV-Reverse Transkriptase	Gibco BRL (Eggenstein)
MMLV- <i>Superscript II</i> -Reverse Transkriptase	Gibco BRL (Eggenstein)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Nylon Transfermembran Hybond TM/XL	Amersham (Braunschweig)
Oligo-dT <sub>16</sub> -Moleküle	Gibco BRL (Eggenstein), Roth (Karlsruhe)
<i>Qiaquick</i> -Gel-Extraktions-Kit	Qiagen (Hilden)
<i>pGEM-T</i> -Vektor	Promega (USA)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
<i>Ready-to-Go</i> -DNA-Labeling-Kit	Pharmacia (Schweden)
Restriktionsendonukleasen	NEB (USA)
RNase Inhibitor	MBI Fermentas (Italien)
<i>RNeasy-Mini-Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Röntgenfilm Hyperfilm RPN8	Amersham (Braunschweig)
SDS	ICN (USA)
<i>SMART-RACE-cDNA-Amplification-Kit</i>	Clontech
Szintillationsflüssigkeit <i>Rotiszint plus</i>	Roth (Karlsruhe)
<i>TAMRA</i> 350-Längenstandard	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Trypton	Difco (USA)
tri-Natriumcitratdihydrat	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Gerbu (Gaiberg)
Trizol	Gibco BRL (Eggenstein)
V-Alleinfutter <i>ssniff</i> R/M-Haltung, extrudiert, nitrosaminarm	ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest)
X-Gal	AppliChem (Darmstadt), Eurogentec (Belgien)

## 2.12.4 Geräte

Bakterieninkubatoren	
Typ B5042	Heraeus (Hanau)
Schüttelinkubator Lab-Therm	Kühner (Schweiz)
Binokular SZ30	Olympus (Japan)
DNA-Sequenziergeräte	
ABI PRISM 373, 377, 377XL	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Elektrophoresekammer	Renner (Finnland)
Gel-Imaging-Systems	Fröbel Labortechnik, Vilber Lourmet (Frankreich)
GeneQuant-Photometer	Pharmacia (Schweden)
Glaspotter	Potter S.B.Braun (Melsungen)
LightCycler	Roche Diagnostics (Mannheim)
Liquid Scintillation System LS1801	Beckman (USA)
Peltier Thermal Cycler 100, 200	MJ Research (USA)
Spannungsgeräte	
Electrophoresis Power Supply	
EPS300, EPS1000	Pharmacia (Schweden)
Model 250/2.5	BioRad (USA)
Röntgenkassetten Quanta III, Cronex Cassette	Du Pont (USA)
Speed-Vac Univapo 100H	Uniequip (Martinsried)
Ultraturrax T25-Homogenisator	IKA Labortechnik
UV-Stratalinker 1800	Stratagene (USA)
Wasserbäder Haake D8	Windaus (Clausthal-Zellerfeld)
Julabo U3,13	Julabo (Seelbach)
Zentrifugen	
Biofuge A	Heraeus (Hanau)
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Hettich Zentrifuge EBA 12R	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)
Sorvall RT 6000D und RC5C	Du Pont (USA)

## 2.12.5 Mausinzuchtstämme

C57Bl/10	AG Prof. Mundlos, Kinderklinik Mainz
FVB/N	AG Prof. Blessing, Universitätsklinik Mainz
JF1	AG Prof. Balling, Institut für Säugergenetik (Neuherberg)
SPRET/Ei	Jackson Laboratory, Bar Harbor (USA)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der *H19*-Promotorregion

Die Promotorregion des *H19*-Gens ist seit langem als allelspezifisch methyliert bekannt (Zhang et al., 1993), und ihre Hypermethylierung ist ein wiederholt gefundener epigenetischer Defekt bei BWS-Patienten. Untersuchungen dieses DNA-Abschnitts bei BWS-Patienten wurden bisher ausschließlich mittels Southern Hybridisierung der Schnittstellen methylierungssensitiver Restriktionsenzyme durchgeführt. Hierbei wird exemplarisch die Methylierung eines einzelnen CpGs untersucht, das in der Erkennungssequenz des Enzyms liegt und in methyliertem Zustand dessen Schneiden verhindert. Im Gegensatz zu dieser Technik kann nach einer Umwandlung aller unmethylierten Cytosine in Uracile durch Bisulfitbehandlung eine Amplifikation einer mehrere hundert Basen langen Region erfolgen, bei deren Sequenzierung die Methylierung aller CpGs der Region untersucht werden kann. So konnten Frevel und Mitarbeiter ca. 300 bp der *H19*-Promotorregion einschließlich der HpaII- und SmaI-Schnittstellen von Nieren- und Wilmstumor-DNA analysieren und fanden eine uneinheitliche Methylierung der maternalen und paternalen Allele (Frevel et al., 1999b). Daher sollte diese Region auf ihre allelspezifische DNA-Methylierung in Lymphozyten von BWS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen mittels Einzelklonsequenzierung der bisulfitbehandelten amplifizierten DNA überprüft werden.

##### **Polymorphismen in der *H19*-Promotorregion**

Um die Herkunft der differentiell methylierten parentalen Allele der *H19*-Promotorsequenz feststellen zu können, wurden die DNAs von Kontrollpersonen und BWS Patienten zunächst im Bereich des zu untersuchenden Abschnitts amplifiziert und sequenziert.

258 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart wurde ein Einzelbasenpaar-Polymorphismus („*single nucleotide polymorphism*“, SNP) identifiziert (siehe **Abbildung 3.1**). Zeigte die Sequenzierung der zu untersuchenden Patienten-DNA an dieser Position sowohl ein Adenin wie auch ein Guanin, konnte durch die Sequenzierung der elterlichen DNAs die Herkunft der Allele bestimmt werden, wenn mindestens eine der elterlichen DNAs homozygot für den Polymorphismus war.

### 3.1.1 Sequenzierung der DNA von Kontrollpersonen

Die Bisulfitbehandlung der DNA von Kontrollpersonen, wie auch die der Patienten mit Verdacht auf BWS, erfolgte nach einem Verdau mit einem Gemisch der Restriktionsenzyme AgeI, AseI, EcoRV, PstI und XhoI, das eine starke Fragmentierung der genomischen DNA bewirkt, ohne in den zu untersuchenden Regionen zu schneiden. Hierdurch sollte die Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge bei möglichst milder Denaturierung erleichtert werden. Außerdem sollte gewährleistet werden, dass nach der Umwandlung der unmethylierten Cytosine, wenn nur noch drei verschiedene Nukleotide die Sequenz spezifizieren, die amplifiziert werden soll, keine alternative Produkte durch Fehlpriming entstehen können. Aus diesem Grund wurde die Amplifikation der umgewandelten und aufgereinigten DNA-Fragmente auch nacheinander mit zwei Primerpaaren durchgeführt, indem zunächst ein größeres, 492 bp langes Produkt generiert wurde, um dies dann als Vorlage für die Amplifikation mit dem zweiten Primerpaar einzusetzen. So konnte ein 326 bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden, das 12 potentiell allelspezifisch methylierte CpGs enthielt. Die hierfür verwendeten Primer (siehe **Abbildung 3.1**), die der umgewandelten Sequenz entsprachen, wurden nach zwei Kriterien ausgewählt: zum einen sollte in der ursprünglichen Sequenz kein CpG-Dinukleotid vorliegen, um eine Selektion je nach Methylierung dieses CpGs bei der Amplifikation zu verhindern.



**Abbildung 3.1: Darstellung der *H19*-Promotorregion (gb|AF125183)**

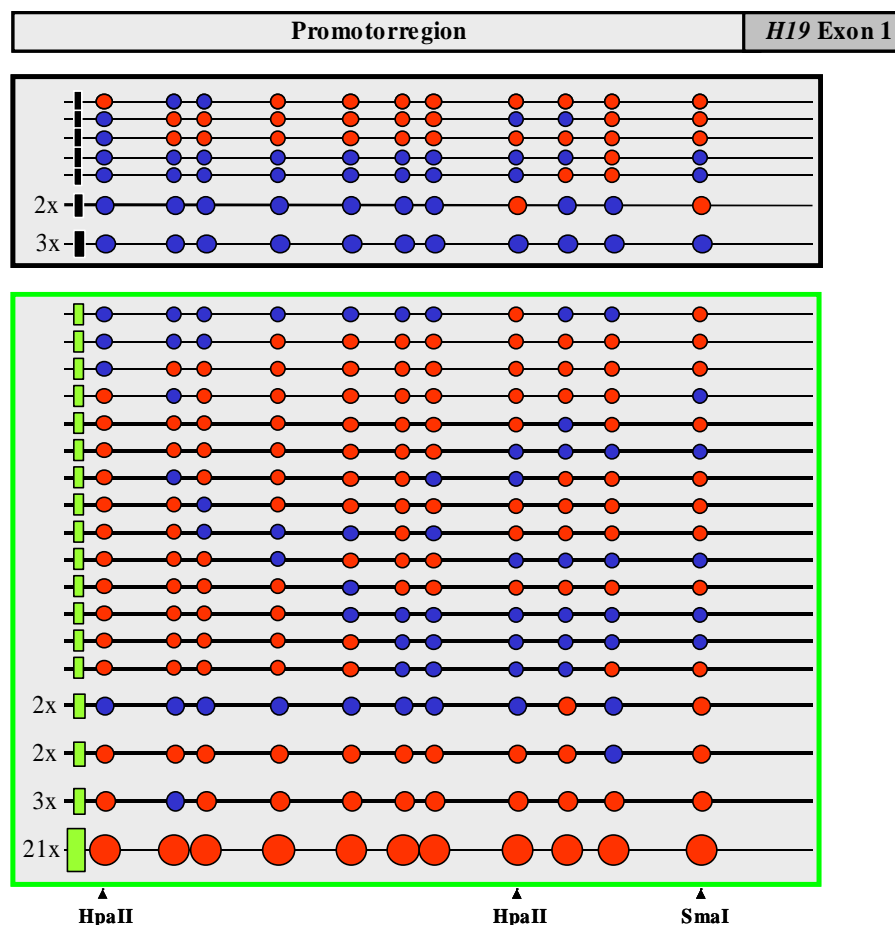
Die Lage der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide wird durch die farbigen Pfeile dargestellt. Der Adenin/Guanin-Polymorphismus ist türkis, potentiell methylierte Cytosinbasen sind dunkelgrün und die in von anderen Arbeitsgruppen (vergleiche **Tabelle T1.1** im Kapitel Einleitung) in Restriktionsanalysen verwendeten HpaII- (ccgg) und SmaI- (ccggg) Schnittstellen sind hellgrün hervorgehoben. Die Sequenz des *H19*-Transkripts ist gelb unterlegt.

Zum anderen sollten sich in der Originalsequenz vor der Umwandlung mehrere Cytosinbasen befinden, um die Amplifikation von korrekt umgewandelter DNA in Relation zu eventuell noch vorhandener, nicht vollständig umgewandelter DNA zu begünstigen.

Das so generierte PCR-Produkt wurde in einen T-Plasmidvektor ligiert (siehe **Kapitel 2.8**) und mit diesem zusammen in *E. coli*-Bakterien eingebracht und durch deren Klonierung vervielfältigt. Für jedes PCR-Produkt wurden bis zu 96 rekombinante Klone als individuelle Kolonien angezüchtet, so dass durch eine Amplifikation der Integrate mit M13-Randprimern letztendlich die Sequenz der individuellen zugrundeliegenden PCR-Moleküle untersucht werden konnte. Jede einzelne erhaltene Sequenz entspricht damit der DNA-Sequenz eines der beiden parentalen Allele einer Zelle. Um eine Beurteilung des Methylierungsstatus der elterlichen Allele vornehmen zu können, sollten ca. 20 Einzelklone sequenziert werden. Da jedoch bei vielen DNAs ein teilweise stark ungleichmäßiger Anteil maternaler und paternaler Amplifikate identifiziert wurde, wurden pro Kontrollperson zwischen 7 und 15 Einzelsequenzen des väterlichen Allels und zwischen 14 und 42 Einzelsequenzen des mütterlichen Allels sequenziert. Anhand der Sequenzen wurde zunächst überprüft, ob die DNA vollständig umgewandelt wurde, indem der prozentuale Anteil der umgewandelten Cytosine in CpA, CpC und CpT-Dinukleotiden ermittelt wurde. Der chemische Prozess der Umwandlung der Cytosine zu Uracil verläuft nicht zu 100 % erfolgreich, da die Deaminierung des Cytosins durch die Anlagerung des Bisulfits ausschließlich im DNA-Einzelstrang möglich ist. Da die Denaturierung der DNA möglichst schonend sein sollte, um eine zu starke Zerstörung der DNA-Fragmente zu vermeiden, können einzelne Abschnitte zeitweilig in doppelsträngigem Zustand der Umwandlung entgehen. Es sollten jedoch keine längeren nicht umgewandelten Abschnitte bestehen bleiben, da sonst eine Beurteilung der potentiell methylierten Cytosine nicht mehr möglich ist. Einzelklone mit unvollständig umgewandelten Abschnitten wurden daher nicht in die Auswertung mit einbezogen. Das PCR-Produkt enthält 50 Cytosine, auf die ein Adenin, Cytosin oder Thymin folgt. Lag der Anteil der umgewandelten Cytosine unter 98 % aller Nicht-CpGs, wurde die Bisulfitbehandlung der zu untersuchenden DNA wiederholt.

In **Abbildung 3.2** sind die CpGs der Einzelklonsequenzen für die DNA der Kontrollperson 1087-01 exemplarisch dargestellt. Die Einzelklone wurden nach parentaler Herkunft getrennt gruppiert und Einzelklone mit identischen Sequenzen wurden repräsentativ von einem Strang unter Angabe der Anzahl der zugrundeliegenden Sequenzen wiedergegeben. Diese Darstellung der Amplifikate der Kontrollperson 1087-01 zeigt beispielhaft die bei allen Kontrollpersonen beobachtete große Variabilität der Methylierung der einzelnen CpGs.





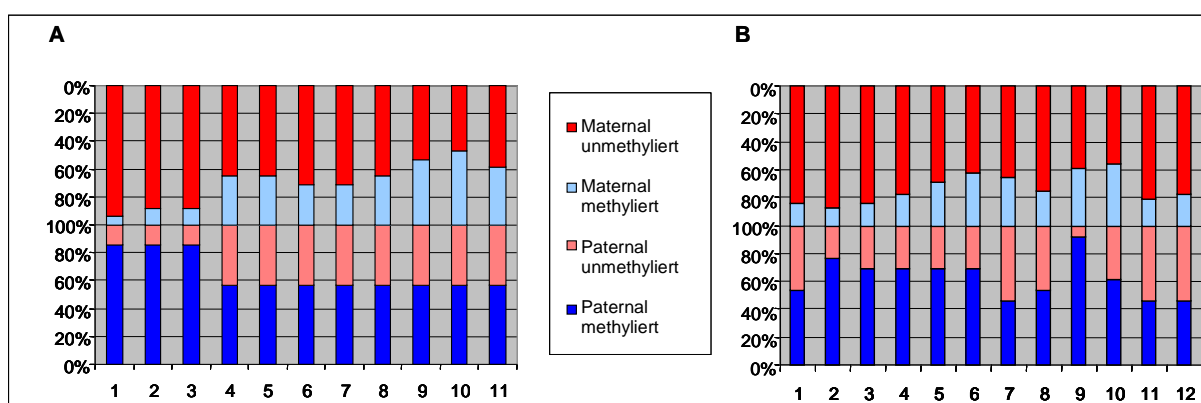
**Abbildung 3.2: Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion der Kontrollperson 1087-01**

Potentiell methylierte CpGs sind als farbige Kreise dargestellt. Die rote Färbung stellt ein umgewandeltes Thymin dar, methylierte, nicht umgewandelte Cytosine sind blau gefärbt. Ein Strang entspricht einem oder einer Gruppe von identischen Einzelklonen (2-21). Der Adenin/Guanin-Polymorphismus ist als Rechteck dargestellt und die Einzelklone wurden nach parentaler Herkunft gruppiert: oben = paternale Einzelklone (schwarz); unten = maternale Einzelklone (grün). Die in Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen gelegenen CpGs, für die eine Untersuchung der Methylierung von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurde, sind mit Pfeilspitzen markiert.

Insgesamt konnte für unterschiedliche DNAs von Kontrollpersonen festgestellt werden, dass die väterlichen Allele aus überwiegend (ca. 85 %) methylierten CpGs bestehen, während die maternalen CpGs in 60 bis 80 Prozent unmethyliert sind. Dabei ist der einzelne väterliche Klon zu durchschnittlich 50 % vollständig methyliert, d.h. alle CpGs einer Sequenz sind methyliert, und der einzelne mütterliche Klon zu durchschnittlich 40 % komplett unmethyliert.

**Abbildung 3.3** zeigt zwei weitere Beispiele für das Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion bei Kontrollpersonen (1073-00 und 922-01). Die gewählte Darstellung verzichtet hier auf die Auflistung jedes einzelnen Amplifikats zugunsten einer Gegenüberstellung der methylierten und unmethylierten CpGs der elterlichen Allele an den untersuchten Positionen.

Die Abweichungen vom überwiegenden Methylierungsmuster paternal = methyliert und maternal = unmethyliert, wie es zu annähernd 100 Prozent in einer differentiell methylierten Region zu erwarten wäre, werden dadurch hervorgehoben. Es zeigt sich, dass sie nicht auf einzelne CpG-Positionen konzentriert, sondern scheinbar zufällig über die gesamte Region verteilt sind. Die Methylierung der *H19*-Promotorregion in Lymphozyten erwies sich als sehr variabel, wobei eine Tendenz zu einer stärkeren Methylierung des väterlichen Allels festgestellt wurde. Die teilweise erheblichen Abweichungen hiervon, die bei allen Kontrollpersonen auftraten, verteilen sich individuell auf verschiedene CpGs.



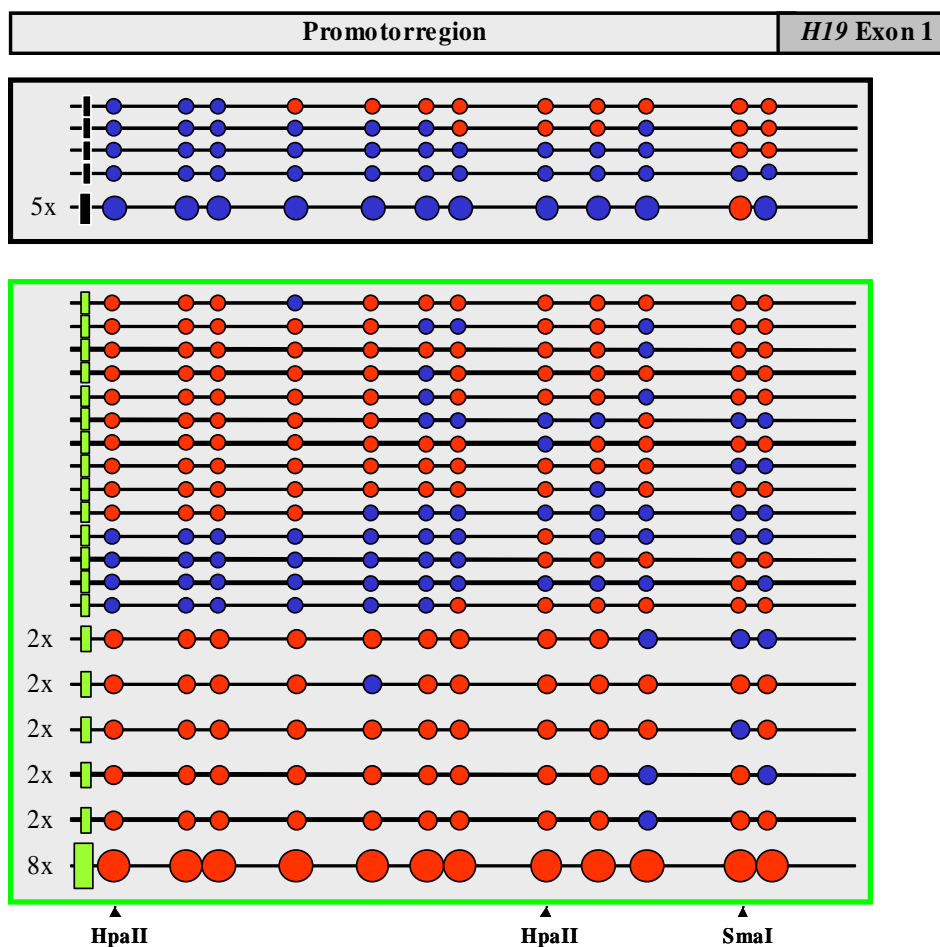
**Abbildung 3.3: Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion der Kontrollpersonen 1073-00 (A) und 922-01 (B)**

Auf der X-Achse sind die elf potentiell methylierten Cytosine aufgetragen. Die Y-Achse gibt die relative Anzahl der methylierten maternalen (oben) und paternalen (unten) Einzelklone an diesen Positionen an. Die hellblauen, bzw. -roten Balken geben den Grad der Abweichung von einer allelspezifischen Methylierung wieder.

### 3.1.2 Sequenzierung der DNA von Patienten mit Verdacht auf BWS

Obwohl das Methylierungsmuster für die *H19*-Promotorregion der Kontrollpersonen nur eine verminderte Allelspezifität aufweist, sollten die DNAs einer kleinen Gruppe von BWS-Patienten untersucht werden, um festzustellen, ob dort eine grundsätzliche Veränderung der Methylierung, vor allem der HpaII- und SmaI-Schnittstellen, die Ergebnisse, die mit diesen Enzymen erzielt wurden, erklären könnten. Es wurden ein Patient (514-99) mit sehr stark ausgeprägtem BWS-Phänotyp (die drei Haupt- und zwei weitere Nebenmerkmale), einer (643-99) mit einer mittelstarken Ausprägung (zwei Haupt-, ein weiteres Nebenmerkmal) und ein Patient (427-99) mit isolierten, bei BWS auftretenden Merkmalen untersucht. Die DNAs aller drei Patienten zeigten ein den Kontrollpersonen sehr ähnliches Methylierungsmuster. Die paternalen Allele sind in fast allen CpGs stärker methyliert als die maternalen Allele, mit Ausnahme der CpGs 10 bei Patient 427-99 (siehe **Abbildung 3.5**) und CpG 11 bei Patient

643-99 (**Abbildung 3.4**), die eine Hypomethylierung der paternalen Allele zeigen, sowie des CpGs 8 bei Patient 427-99 (**Abbildung 3.5**), bei dem die Methylierung des maternalen Allels überdurchschnittlich groß ist. **Abbildung 3.4** zeigt repräsentativ für die drei DNAs die große Zahl unterschiedlich methylierter Einzelklone des Patienten 643-99. Nur ein Viertel der maternalen Amplifikate war an allen Positionen unmethyliert und nur ein einziger von 9 paternalen Klonen zeigte ausschließlich methylierte CpGs.

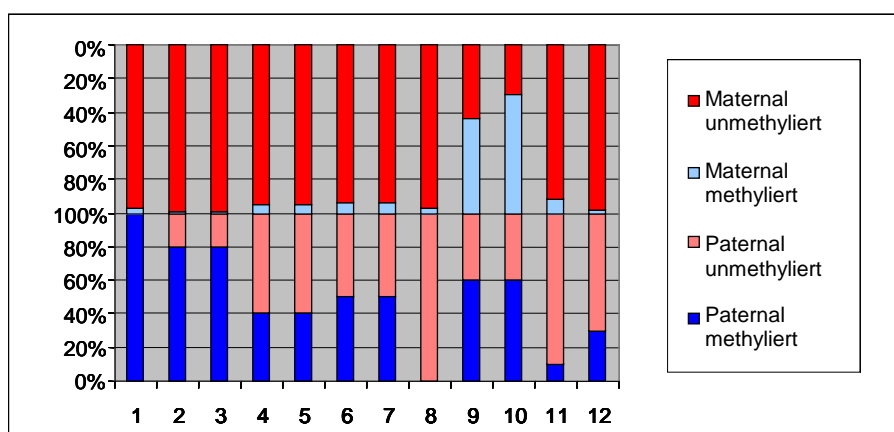


**Abbildung 3.4: Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion des BWS-Patienten 643-99**

Potentiell methylierte CpGs sind als farbige Kreise dargestellt. Die rote Färbung stellt ein umgewandeltes Thymin dar, methylierte, nicht umgewandelte Cytosine sind blau gefärbt. Ein Strang entspricht einem oder einer Gruppe von identischen Einzelklonen (2-8). Der Adenin/Guanin-Polymorphismus ist als Rechteck dargestellt und die Einzelklone wurden nach parental Herkunft gruppiert: oben = paternale Einzelklone (schwarz); unten = maternale Einzelklone (grün). Die in Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen gelegenen CpGs, für die eine Untersuchung der Methylierung von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurde, sind mit Pfeilspitzen markiert.

In **Abbildung 3.5** wurde die allelunspezifische Methylierung an den verschiedenen Positionen der Amplifikate der DNA des Patienten 427-99 hervorgehoben. Die Methylierungsrate pro Position schwankt für die parental Allele zwischen 0 % (CpG 8) und 100 %

(CpG 1), für die maternalen Allele liegt sie zwischen 1 % (CpG 2 und 3) und 70 % (CpG 10). Wie die Kontrollpersonen zeigten die drei Patienten mit Verdacht auf BWS individuelle Unterschiede des Methylierungsgrades an den einzelnen Positionen, wiesen aber alle eine starke Variabilität der Promotormethylierung auf, die nur an einzelnen, individuell unterschiedlichen, Positionen als allelspezifisch bezeichnet werden kann. Dies trifft am stärksten für die ersten drei CpGs zu, so dass die größte Übereinstimmung mit den durch methylierungssensitiven enzymatischen Verdau gewonnenen Daten für die HpaII-Schnittstelle mit CpG 1 an Position 9887 (gb|AF125183, siehe **Abbildung 3.1**) besteht. Die SmaI-Schnittstelle mit CpG 11 an Position 10081 (gb|AF125183, siehe **Abbildung 3.1**) war jedoch bei den Patienten mit Verdacht auf BWS, wie auch bei den Kontrollpersonen sehr variabel und unabhängig von der elterlichen Herkunft methyliert (siehe **Abbildungen 3.2 - 3.5**).



**Abbildung 3.5: Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion des BWS-Patienten 427-99**

Auf der X-Achse sind die zwölf potentiell methylierten Cytosine aufgetragen. Die Y-Achse gibt die relative Anzahl der methylierten maternalen (oben) und paternalen (unten) Einzelklone an diesen Positionen an. Die hellblauen, bzw. -roten Balken geben den Grad der Abweichung von einer allelspezifischen Methylierung wieder.

## 3.2 Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der *H19-A1/B1-Repeat-Region*

Die zweite untersuchte differentiell methylierte Region wird von Primern an den Positionen -7834-57 und -8314-37 vor dem *H19* Transkriptionsstart amplifiziert. Die CpGs 1-20 liegen somit in dem 400 bp großen B1-Repeat und die CpGs 21-27 in dem 450 bp großen A1-Repeat. Die CpGs 5-9 befinden sich in der Erkennungssequenz für die Bindung des CTCF-Proteins (CTS), deren Methylierung eine starke Affinitätsminderung der Protein-DNA-Interaktion bewirkt.

In der amplifizierten Region sind 5 Einzelbasenpaarpolymorphismen (P1-5) beschrieben (Frevel et al., 1999b). P1 liegt 11 Basen hinter dem ersten CpG des Amplifikats. Er zeigt nur eine sehr geringe Frequenz des Cytosin-Allels, so dass P1 nur für einen einzigen Patienten informativ war. P2 liegt als CpG 8 in der CTCF-Bindestelle und hat als zum Cytosin alternatives Allel ein Thymin. Es eignet sich nicht zur Identifizierung der elterlichen Allele nach Behandlung der DNA mit Bisulfit, da ein nicht methyliertes Cytosin letztlich zu Thymin umgewandelt wird und so nicht von dem anderen Allel unterschieden werden kann. P3 ist ein Cytosin/Adenin-Polymorphismus und liegt in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *DraI* (TTTAAA) und ermöglicht somit einen allelspezifischen Verdau des Amplifikats (siehe **Kapitel 3.2.3**). Es konnte bei fast der Hälfte der untersuchten Patienten (47,4 %) zwei unterschiedliche Allele identifiziert werden. Die Frequenz der Allele von P4 (Adenin/Guanin) und P5 (Cytosin/Guanin), die im A1 Repeat liegen, ist ähnlich hoch, so dass die parentale Herkunft der Amplifikate von 37 (64,9 %) der insgesamt getesteten 57 Patienten untersucht werden konnte.

### 3.2.1 Sequenzierung der DNA von Kontrollpersonen

Um BWS Patienten auf ein verändertes Methylierungsmuster in der A1/B1-Repeat-Region untersuchen zu können, war es zunächst notwendig die Methylierung der parentalen Allele bei Normalpersonen zu überprüfen. Da auch hier die Herkunft der Amplifikate über die genannten Polymorphismen bestimmt werden sollte, wurden DNAs von Personen ausgewählt, bei denen ebenfalls DNA ihrer Eltern zur Verfügung stand. Die isolierten DNAs wurden der Bisulfitbehandlung unterzogen und in einem „*nested*“ PCR-Ansatz wurde ein 453 bp großes B1-A1 Fragment amplifiziert (**Abbildung 3.6**). Die das Fragment begrenzenden Oligonukleotide wurden dabei komplementär zu DNA-Abschnitten gewählt, die mehrere durch die

Bisulfitbehandlung umgewandelte Cytosine, aber keine Cytosin-Guanin-Dinukleotide enthalten. Die Amplifikate wurden in einen T-Vektor inkloniert, der in E.coli-Bakterien eingebracht und dort in Einzelklonen vermehrt wurde, um so einzelne DNA-Moleküle auf die parentale Herkunft und die CpG-Methylierung hin untersuchen zu können. Für jede DNA wurden, je nach Verteilung der parental Allele, zwischen 20 und 70 Einzelklone sequenziert.

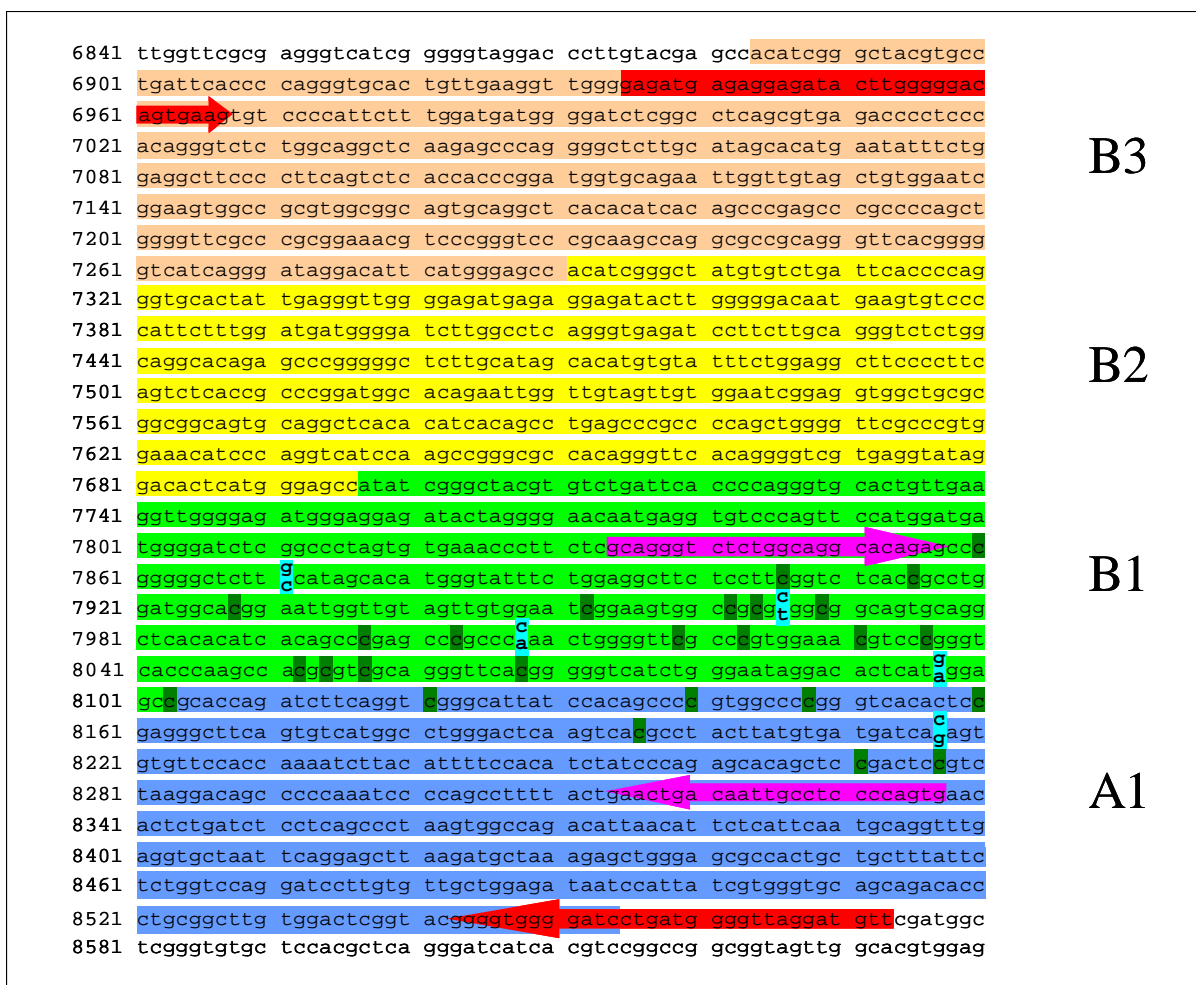
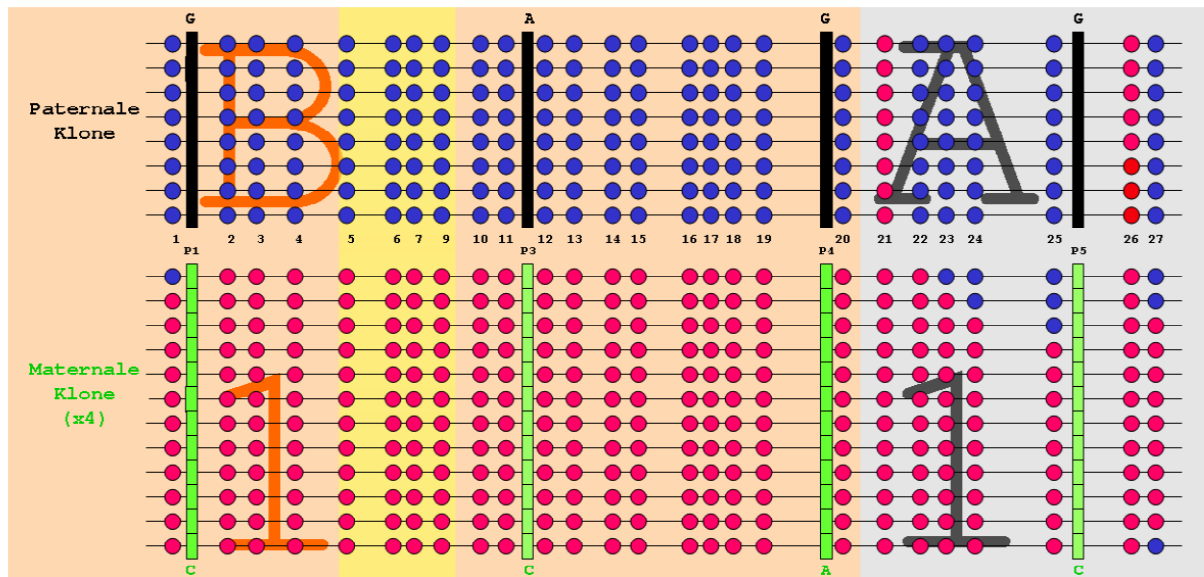


Abbildung 3.6: Ausschnitt der *H19*-A1/B1-Repeat-Region (gb|AF125183)

Die untersuchten CpGs des B1- (grün) und A1-Repeats (blau) sind orange, die Einzelbasenpaar-Polymorphismen sind türkis hervorgehoben. Die Amplifikation der bisulfitbehandelten DNA wurde zunächst mit Hilfe der als rote Pfeile dargestellten Oligonukleotide durchgeführt, es folgte eine zweite „nested“ PCR mit den als pinke Pfeile dargestellten Oligonukleotiden, die auch für die Sequenzierung der Einzelklone verwendet wurden.

Im Gegensatz zum Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion konnten die A1/B1-Amplifikate eindeutig als paternal methyliert oder maternal unmethyliert eingeteilt werden. Diese strenge Korrelation zeigte sich in allen untersuchten Kontrollpersonen, wobei alle CpGs des paternalen B1-Repeats außerhalb der CTS gleichermaßen methyliert vorlagen. Auch die CTS

selbst, zu der die CpGs 5-9 gerechnet werden, waren ausschließlich auf dem paternalen Allel methyliert, da CpG 8 jedoch polymorph sein kann (C/T, siehe **Kapitel 3.2**), zeigte die Sequenzierung von DNA-Amplifikaten in solchen Fällen an dieser Position auch für das väterliche Allel eine Thyminbase, die nicht durch Umwandlung eines Cytosins entstanden war. Die allelspezifische Methylierung war jedoch nur auf die CpGs des B1-Repeats beschränkt, nicht aber für die in A1 gelegenen CpGs 21-27, die ein von der elterlichen Herkunft unabhängiges Methylierungsmuster zeigten (siehe **Abbildung 3.7**). Hierbei wiesen CpG 21 und 26 häufig ein vollständiges Fehlen der allelspezifischen Methylierung auf, während für die übrigen CpGs des A1-Repeats eine mehr oder weniger starke Hypermethylierung gefunden wurde. Diese Abweichungen von einer allelspezifischen Methylierung im A1-Repeat variierten bei den untersuchten Kontrollpersonen in der Position des CpGs und der Anzahl der unspezifisch methylierten Einzelklone, während die CpGs des B1-Repeats einheitlich gemäss ihrer elterlichen Herkunft methyliert waren. Die in **Abbildung 3.7** an Position 1 der ersten maternalen Einzelklongruppe dargestellte Abweichung betraf ausschließlich die DNA der Kontrollperson 922-00, alle anderen Kontrollen zeigten eine 100-prozentige Allelspezifität der Methylierung des B1-Repeats.



**Abbildung 3.7: Methylierung der 27 untersuchten CpGs des B1/A1-Repeats der Kontrollperson 922-00**

Methylierte, nicht umgewandelte Cytosine eines Einzelklons sind als blaue Kreise, nicht methylierte, zu Uracil umgewandelte Cytosine sind als rote Kreise dargestellt. Die polymorphen Nukleotide (P1, P3-P5), die zur Unterscheidung der Allele verwendet wurden, sind für die paternalen Klone durch schwarze (GAGG), für maternale Klone durch grüne Rechtecke (CCAC) symbolisiert. P2 ist nicht aufgeführt, da beide elterlichen Allele an dieser Position eine Thyminbase enthielten. CpGs die in der potentiellen CTCF-Bindestelle liegen sind gelb, die des A1-Repeats sind grau hinterlegt. Jeder Strang paternaler Herkunft entspricht einem, jeder maternale Strang entspricht vier identischen Einzelklonen. Das Methylierungsmuster dieser, wie auch aller anderer nicht abgebildeter Kontrollpersonen, zeigt im B1-Repeat eine strenge allelspezifische Unterteilung in paternal methylierte und maternal unmethylierte Einzelklone.

### 3.2.2 Sequenzierung der DNA von Patienten mit Verdacht auf BWS

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten-DNAs von insgesamt 32 Patienten mit Verdacht auf BWS bisulfitbehandelt und mittels Einzelklonsequenzierung auf ihr parentales Methylierungsmuster hin untersucht (siehe **Tabelle T3.1**). Da ein möglichst breites Spektrum phänotypischer Merkmalskombinationen vorhanden sein sollte, wurden sowohl Patienten, die nach den Elliott-Kriterien ein vollständiges BWS-Krankheitsbild haben, als auch Patienten mit unvollständiger Ausprägung (maximal 2 Haupt- und Nebenmerkmale), oder vereinzelt BWS-Merkmalen ausgewählt. Vier Patienten zeigten fünf oder sechs Charakteristika, unter denen mindestens zwei der drei Hauptmerkmale vertreten waren (Elliott-Kriterien, (Elliott et al., 1994)) und siebzehn Patienten zeigten mindestens zwei der fünf am häufigsten mit BWS assoziierten Symptome (BWS-Definition nach (DeBaun und Tucker, 1998)).

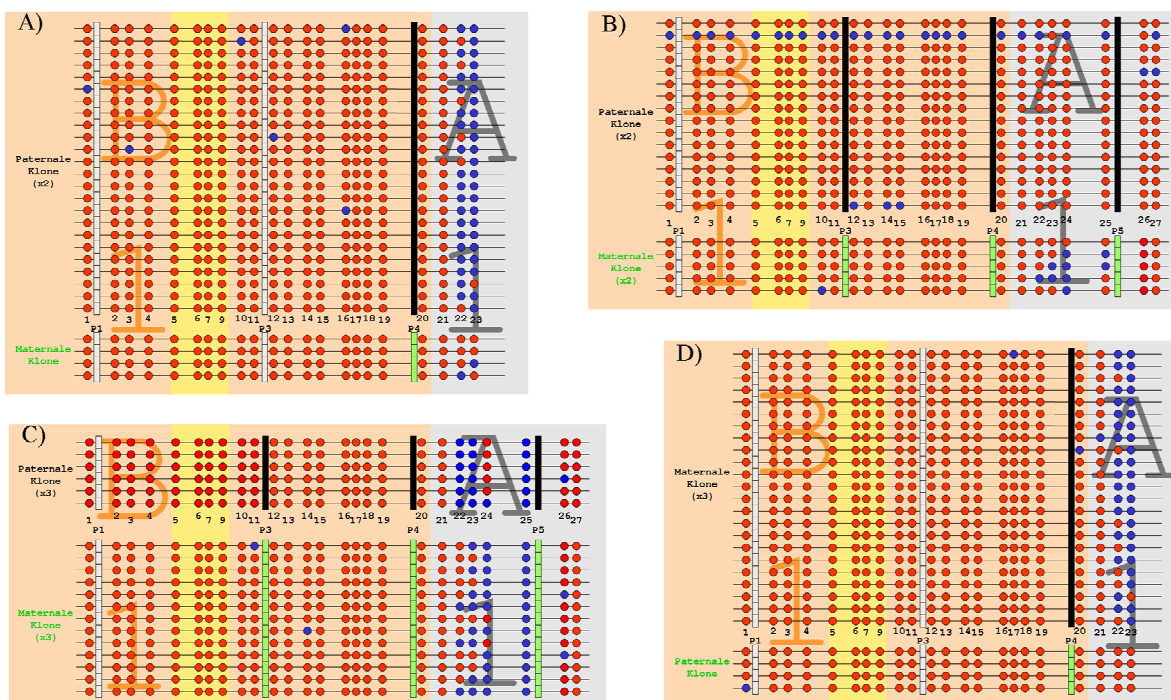
Die Sequenzierung der Einzelklone zeigte in vierzehn Fällen eine einheitlich Methylierung der CpGs des B1-Repeats paternalen Ursprungs und ein Fehlen dieser Methylierung bei allen maternalen Amplifikaten, also ein Methylierungsmuster, wie es auch für B1-Repeats der Kontroll-DNAs gefunden wurde. Zeigten sich nach der Sequenzierung von 20 Einzelklonen hiervon keine Abweichungen wurde das Methylierungsmuster als „normal“, also der genomischen Prägung entsprechend, eingestuft. Zeigten maternale Klone methylierte oder paternale Klone unmethylierte CpGs, oder war ein parentales Allel stark unterrepräsentiert, wurden bis zu 50 weitere Einzelklone untersucht.

Es konnten vier DNAs identifiziert werden, bei denen sowohl das maternale, wie auch das paternale Allel ein Fehlen der Methylierung in den CpGs 1-21 aufwiesen (**Abbildung 3.8**). Dabei konnten nur vereinzelte methylierte CpGs an unterschiedlichen Positionen gefunden werden, die in den DNAs der Patienten 1524-99, 176-00 und 806-00 weniger als 0,8 Prozent ausmachen (**3.8 a, c, d**). Die DNA des Patienten 568-01 zeigt ebenfalls wenige vereinzelte methylierte CpGs, hier sind jedoch 2 der 29 sequenzierten paternalen Einzelklone fast durchgehend methyliert (**3.8 b**).

Vier weitere DNAs zeigten kleinere bis mittelstarke Abweichungen vom normalen allelspezifischen Methylierungsmuster (**Abbildung 3.9**), die zum Teil nur einzelne CpGs außerhalb der B1-CTS betrafen, wie z.B. die Hypomethylierung des CpGs 17 bei Patient 736-01 (**3.9 d**) und des CpGs 12 bei Patient 536-99 (**3.9 a**). Andererseits konnte auch eine generelle Hypo- oder Hypermethylierung einiger Einzelklone festgestellt werden, bei der auch die 5 CpGs der CTS betroffen waren. Für die DNA des Patienten 738-99 (**3.9 b**) wurde ein leicht unregelmäßiges



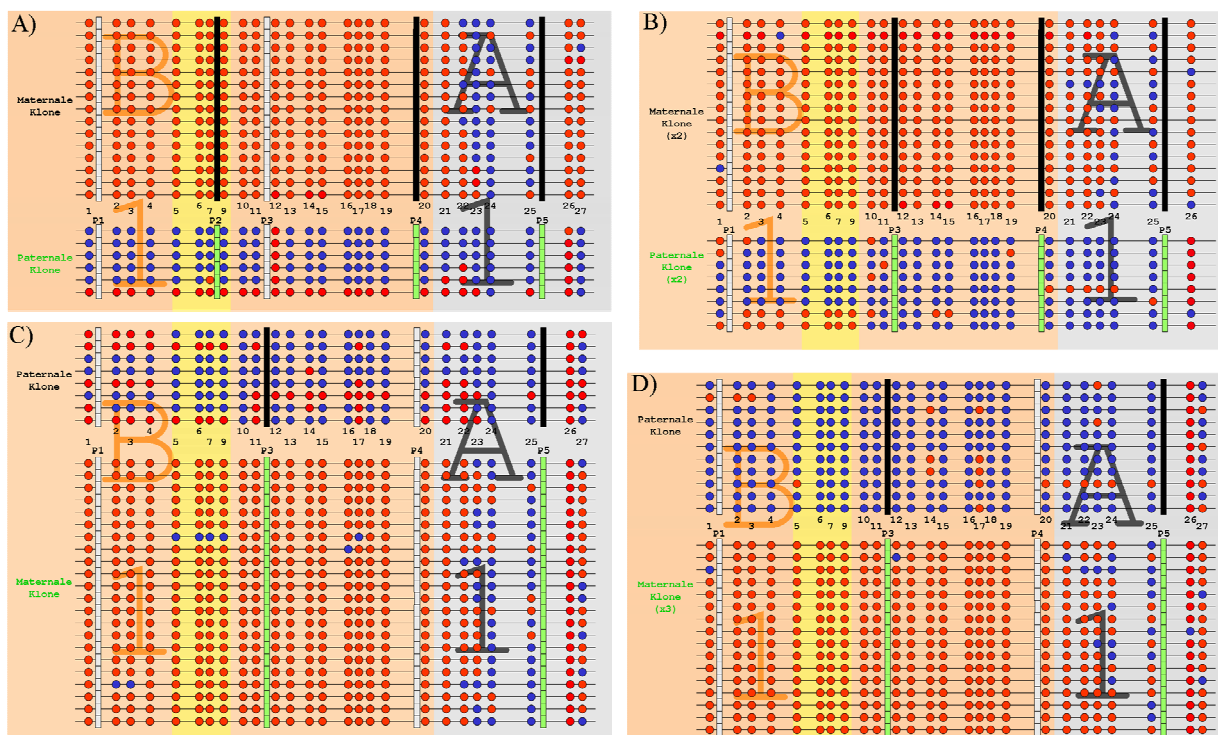
Methylierungsmuster gefunden, das vor allem im Bereich der CpGs 2 bis 9 eine Hypomethylierung des paternalen Allels aufwies.



**Abbildung 3.8: Methylierung der untersuchten CpGs der B1/A1-Repeats der BWS-Patienten 1524-99 (a), 568-01 (b), 806-00 (c) und 176-00 (d)**

Die Darstellung der Einzelklone entspricht der in **Abbildung 3.7**. Potentiell polymorphe Nukleotide, die für die elterlichen Allele identisch waren, sind als graue Rechtecke dargestellt. Je nach Wahl der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide konnten 23 (**a, d**) oder 27 CpGs (**b, c**) untersucht werden. Jeder Strang entspricht ein bis drei (x3) identischen Einzelklonen.

Die DNA des Patienten 287-00 zeigte ein weniger allelspezifisches Methylierungsmuster (**3.9 c**) mit einer Hypermethylierung des maternalen und einer Hypomethylierung des paternalen Allels in der CTCF-Bindungssequenz, sowie einer starken Hypomethylierung der paternalen CpGs 1 bis 4, 11 und 17. Im Gegensatz zur Methylierung der in **Abbildung 3.8** gezeigten vier Patienten, die sich fast vollständig auf CpGs des A1-Repeats beschränkt, sind die DNAs der vier Patienten, die in **Abbildung 3.9** dargestellt sind, jedoch überwiegend allelspezifisch methyliert.



**Abbildung 3.9:** Methylierung der untersuchten CpGs der B1/A1-Repeats der BWS-Patienten 536-99 (a), 738-99 (b), 287-00 (c) und 736-01 (d)

Die Darstellung der Einzelklone entspricht der in **Abbildung 3.7**. Potentiell polymorphe Nukleotide, die für die elterlichen Allele identisch waren, sind als graue Rechtecke widergegeben. Jeder Strang entspricht ein bis drei (x3) identischen Einzelklonen. Auch hier sind alle unmethylierten CpGs als rote und alle methylierten Cytosine als blaue Kreise dargestellt und die der CTS wurden gelb unterlegt.

In der **Tabelle T3.1** sind die Ergebnisse der Untersuchung der A1/B1-Repeat-Region mit Angabe der jeweiligen klinischen Symptome der Patienten zusammengefasst.

**Tabelle T3.1:** Übersicht der untersuchten A1/B1-Einzelklonamplifikate aller Patienten-DNAs deren allelspezifische Methylierung ermittelt wurde.

DNAs die Abweichungen vom Methylierungsmuster der Kontrollpersonen zeigten sind hervorgehoben. Zusätzlich sind die Anzahl der jeweils untersuchten Einzelklone pro paternalem und maternalem Allel und die zur Unterscheidung der Allele informativen SNPs in der Reihenfolge P1-P5 (siehe **Abb. 3.6-3.9**) angegeben, sowie, wenn möglich, die wichtigsten klinischen Merkmale der Patienten aufgeführt (**G**igantismus, **M**akroglossie, **E**xomphalus und andere Bauchwanddefekte, **H**emihypertrophie, **r**enale und **G**enitalfehlbildungen, **N**aevus Flammeus, charakteristische **O**hrkerben, postnatale **H**ypoglykämie, k. A. = keine Angaben).

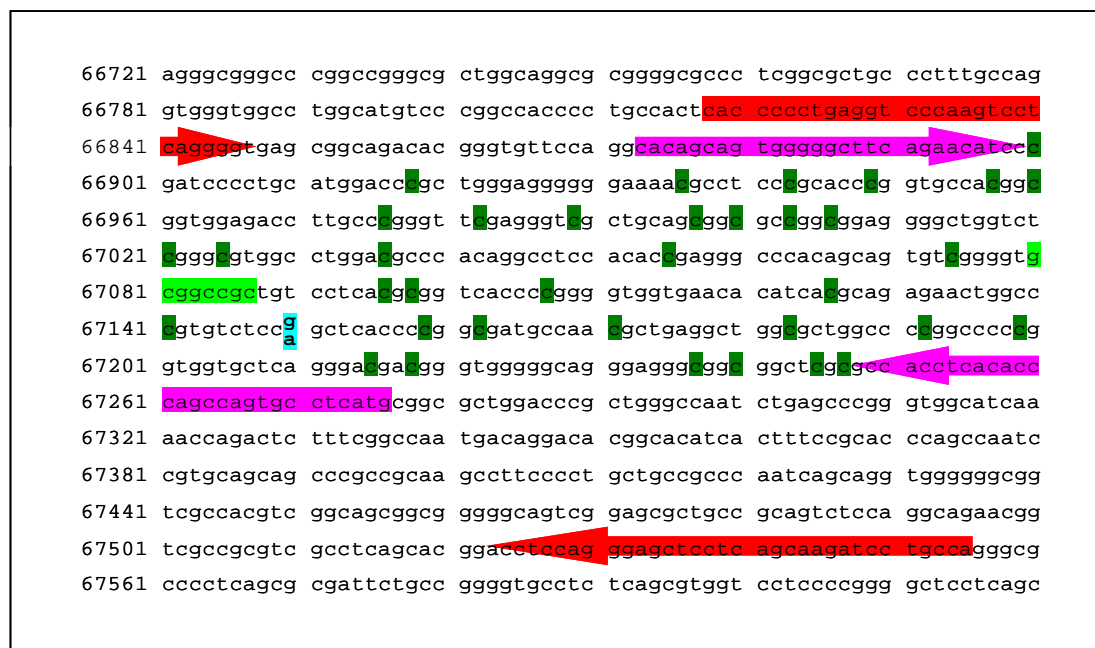
DNA Nr.	Symptome	Polymorphismen		EK-Zahl		Ergebnisse (CpGs 1-20)	
		Pat	Mat	Pat	Mat	Paternal	Maternal
615-97	<b>Ex M G</b> Hemi	--A-G	--C-C	2	9	methyliert	unmethyliert
718-97	<b>G</b> RG	--AGG	--CAC	9	13	methyliert	unmethyliert
27-99	k. A.	-----	-----	44		5 methyliert / 39	unmethyliert
479-99	k. A.	--CA-	--AG-	0	60	--	unmethyliert
427-99	<b>M</b> NF Hemi	-CCAC	-TAGG	1	48	methyliert	unmethyliert
514-99	<b>Ex M G</b> Hyp O	-CCAC	-TAGG	3	41	methyliert	unmethyliert
<b>536-99</b>	<b>M G</b> Hyp	-CC-C	-TA-G	6	19	partielle Hypomethylierung ( <b>Abb. 3.9</b> )	
643-99	<b>Ex M</b> O	--A-G	--C-C	50	17	methyliert	unmethyliert

## Fortsetzung Tabelle T3.1

DNA Nr.	Symptome	Polymorphismen		EK-Zahl		Ergebnisse (CpGs 1-20)	
		Pat	Mat	Pat	Mat	Paternal	Maternal
<b>738-99</b>	<b>M G O</b>	--AGG	--TAC	15	33	partielle Hypomethylierung ( <b>Abb. 3.9</b> )	
807-99	<b>Ex M NF</b>	--AGG	--CAC	8	52	methyliert	unmethyliert
896-99	<b>M</b>	--A-G	--C-C	20	47	methyliert	
1150-99	<b>M</b>	--CAC	--AGG	0	34	--	unmethyliert
1276-99	<b>Ex M O Hemi RG</b>	---A-	---G-	0	50	--	unmethyliert
<b>1524-99</b>	<b>Ex G</b>	---G-	---A-	48	4	beide Allele unmethyliert ( <b>Abb. 3.8</b> )	
<b>176-00</b>	<b>M G</b>	---A-	---G-	4	69	beide Allele unmethyliert ( <b>Abb. 3.8</b> )	
177-00	norm	-CCAC	-TAGG	6	14	methyliert	unmethyliert
178-00	norm	-CC-C	-TA-G	2	18	methyliert	unmethyliert
<b>287-00</b>	<b>Ex M G O NF RG</b>	--A-G	--C-C	8	22	partielle Hypomethylierung ( <b>Abb. 3.9</b> )	
312-00	<b>Ex G O</b>	-CCAC	-TAGG	0	24	--	unmethyliert
<b>806-00</b>	<b>G Hyp RG</b>	--AGG	--CAC	18	39	beide Allele unmethyliert ( <b>Abb. 3.8</b> )	
908-00	k. A.	-TAGG	-CCAC	0	22	--	unmethyliert
1074-00	<b>G Org</b>	--AGG	--CAC	6	22	methyliert	unmethyliert
13-01	<b>Ex M G O</b>	---A-	---G-	2	17	methyliert	unmethyliert
307-01	<b>Ex M G</b>	--AGG	--CAC	9	43	methyliert	unmethyliert
<b>568-01</b>	<b>M G RG</b>	--AGG	--CAC	29	10	beide Allele unmethyliert ( <b>Abb. 3.8</b> )	
<b>736-01</b>	<b>G O NF</b>	--A-G	--C-C	20	48	partielle Hypomethylierung ( <b>Abb. 3.9</b> )	
807-01	O	-CCAC	-TAGG	7	61	methyliert	unmethyliert
888-01	k. A.	-CC-C	-TA-G	9	21	methyliert	unmethyliert

### 3.3 Untersuchung der KvDMR

Neben der mit *H19* assoziierten DMR ist eine zweite Region bekannt, die ein allelspezifisches Methylierungsmuster zeigt und mit Kandidatengen für das Beckwith-Wiedemann-Syndrom gekoppelt ist. Es handelt sich um die dem *KCNQ1OT1*-Gen benachbarte CpG-Insel, die auch als KvDMR bezeichnet wird, in der sich eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI befindet. Die Methylierung dieser Schnittstelle findet sich ausschließlich auf dem mütterlichen Chromosom und der Verlust dieser allelspezifischen Methylierung konnte als häufiges Ereignis bei Beckwith-Wiedemann-Patienten identifiziert werden (Blik et al., 2001; DeBaun et al., 2002; Engel et al., 2000; Gaston et al., 2001; Lee et al., 1999; Smilnich et al., 1999). Um die KvDMR in Patienten, deren differentiell methylierte *H19*-B1-Repeatregion mit Hilfe der Bisulfitbehandlung und anschließender Einzelklonsequenzierung untersucht werden sollte, ebenfalls mit dieser Technik analysieren zu können, wurde ein die NotI-Schnittstelle umgebender DNA-Abschnitt auf die Existenz von Einzelnukleotid-Polymorphismen hin untersucht (siehe **Abbildung 3.10**).



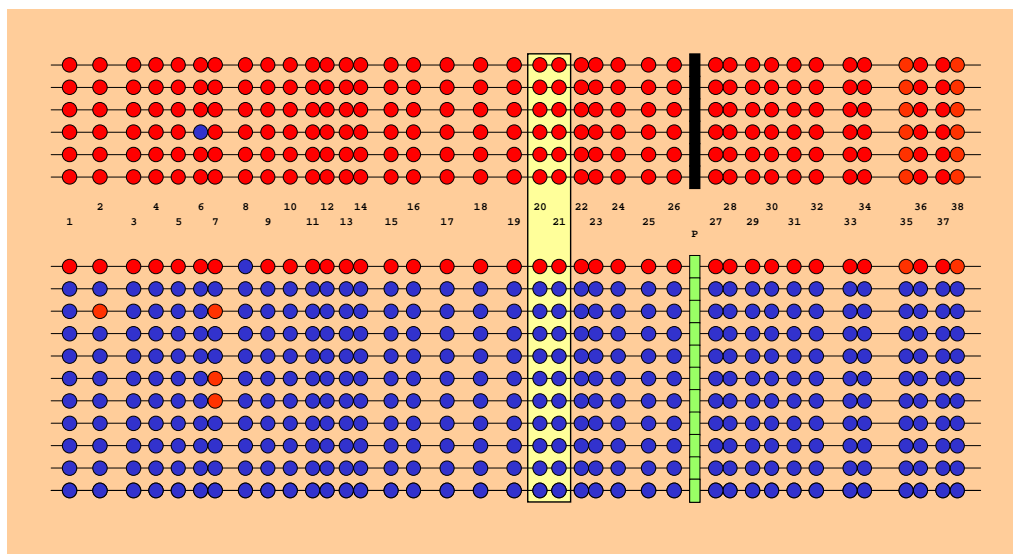
**Abbildung 3.10: Untersuchung der Methylierung der *KCNQ1OT1* assoziierten DMR**

Die Lage der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide wird durch die farbigen Pfeile dargestellt: LitiF/R = rot, LitiF/R = rosa. Der gefundene Adenin/Guanin-Polymorphismus ist türkis, potentiell methylierte Cytosinbasen sind dunkelgrün und die für Restriktionsanalysen verwendete NotI-Schnittstelle ist hellgrün hervorgehoben.

Die in einer „*nested*“-PCR verwendeten Oligonukleotidpaare umspannten zunächst ein 738 bp großes Fragment, das als Vorlage für die Amplifikation eines 404 bp großen Fragments mit 38 CpGs eingesetzt wurde.

Es konnte zwischen den CpGs 26 und 27 an Position 278 des Amplifikats ein Guanin/Adenin-Polymorphismus gefunden werden, der in der DNA der Eltern von sieben Kontrollpersonen heterozygot gefunden wurde. Die Kontrollpersonen selbst waren jedoch alle homozygot, so dass eine Bestimmung der elterlichen Herkunft methylierter und unmethylierter Allele für sie nicht möglich war. Daher wurden zwei für den Polymorphismus biallelische DNAs von Eltern der Kontrollpersonen für die Bisulfitbehandlung ausgewählt. Damit war zwar keine parentale Zuordnung, aber eine Unterscheidung der Allele möglich.

**Abbildung 3.11** zeigt das exemplarische Ergebnis der Einzelklonsequenzierung der bisulfit-behandelten DNA 844-00. Das Methylierungsmuster ist bis auf wenige Ausnahmen allelspezifisch: die Einzelklone, an deren polymorpher Position sich ein Adenin befindet, enthielten mit Ausnahme eines fast vollständig unmethylierten Klons nahezu ausschließlich methylierte CpGs, während alle Klone mit einer Guaninbase an dieser Position nur unmethylierte CpGs aufwiesen, inklusive der gelb hervorgehobenen CpGs 20 und 21 der NotI-Schnittstelle. Nur das Cytosin an Position 7 zeigt in der hier untersuchten DNA eine leichte Tendenz zur Hypomethylierung.



**Abbildung 3.11: Allelspezifisches Methylierungsmuster der KvDMR der Kontrollperson 844-00**

Die Darstellung der Einzelklone entspricht der der **Abbildung 3.7**. Gelb unterlegt sind hier die beiden in der NotI-Schnittstelle gelegenen CpGs 20 und 21. Die Einzelklone sind mit Hilfe des schwarz/grün markierten SNPs zwischen den CpGs 26 und 27 der parentalen Herkunft entsprechend gruppiert, eine Zuordnung der Allele war aufgrund des Fehlens der elterlichen DNA nicht möglich.

### 3.4 Untersuchung der Methylierung der BWS-assoziierten DMRs mit Hilfe der Echtzeit-PCR

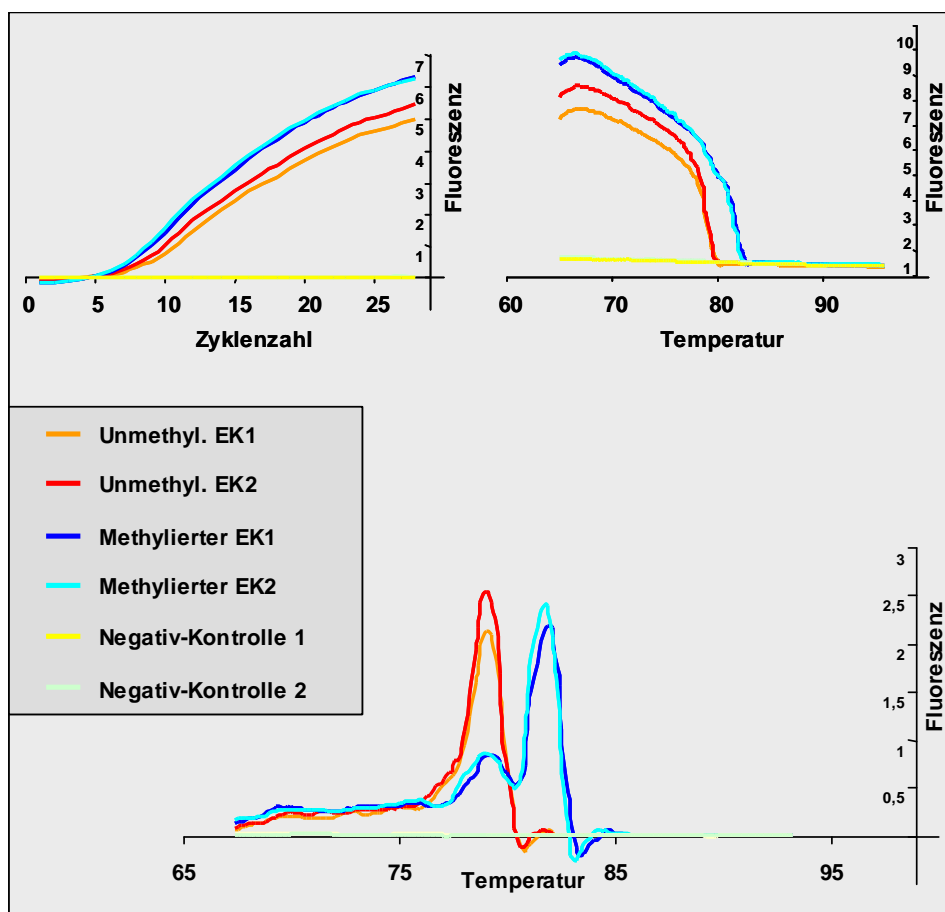
#### 3.4.1 Echtzeit-PCR und Schmelzpunktbestimmung des *H19-B1-Repeats*

Die Untersuchung der CTS im B1-Repeat durch Sequenzierung der Einzelklonamplifikate erlaubt eine sehr differenzierte und allelspezifische Aussage über das Methylierungsmuster dieser Region, ist jedoch auch sehr zeit- und kostenaufwendig. Für eine schnelle und routinemäßig durchführbare Diagnostik sollte daher eine alternative Technik zur Untersuchung der allelspezifischen Methylierung etabliert werden.

Werden doppelsträngige DNA-Moleküle mit zunehmender Temperatur graduell erhitzt, schmelzen sie in mehreren Schritten in einzelnen Abschnitten auf. Die Schmelztemperatur hängt dabei von der Nukleotidsequenz und vor allem vom GC-Gehalt der Fragmente ab, so dass AT-reiche Abschnitte zuerst aufschmelzen. Da durch die Behandlung der DNA mit Bisulfit unmethylierte Cytosinbasen in Uracilbasen umgewandelt werden, die in der darauf folgenden PCR durch Thyminbasen ersetzt werden, unterscheiden sich die Allele je nach Grad der Methylierung in ihrem GC-Gehalt und damit auch in ihrer thermischen Stabilität. Bei der Amplifikation bisulfitbehandelter DNA unter Zugabe eines doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) und anschließender Messung der Abnahme der Fluoreszenzintensität beim Aufschmelzen der PCR-Produkte können methylierte und unmethylierte Fragmente daher anhand ihres ungleichen GC-Gehalts unterschieden werden.

Das B1-Repeat enthält 24 allelspezifisch methylierte CpGs, die einen sehr deutlichen Unterschied im GC-Gehalt ergeben. Die gewählte Sequenz, die ein Amplifikat von 287 Basenpaaren ergibt, enthält 19 potentiell methylierte CpGs und drei Sequenzpolymorphismen, die den GC-Gehalt beeinflussen konnten. Zur Ermittlung der spezifischen Schmelzpunkte der methylierten und unmethylierten Allele wurde für die Amplifikation DNA aus Einzelklonen mit bekanntem Methylierungsmuster verwendet. Hierzu wurde das zu untersuchende Fragment bisulfitbehandelter DNA eines BWS-Patienten mit allelspezifischem Methylierungsmuster mit der gleichen Primerpaarkombination (Bis2iF, B1-(20/21)R) amplifiziert, wie sie auch bei der „*Real-time*“ PCR gewählt werden sollten. Das Produkt wurde anschließend in einen T-Vektor inkloniert, vereinzelte Klone sequenziert und jeweils zwei vollständig methylierte und unmethylierte Klone ausgewählt. Die vollständig methylierten Einzelklone mit einem GC-Gehalt von 40,4 % zeigten ein Schmelzpunktmaximum bei 81,8 °C, während die Produkte mit vollständig unmethylierten Einzelklonen mit einem GC-Gehalt von 33,8 %

bei 79,0 °C aufschmelzen (**Abbildung 3.12**). Diese Differenz von 2,8 °C erlaubt eine genaue Unterscheidung der Allele nach ihrem Methylierungsgrad und damit eine Untersuchung der DNA von BWS-Patienten auf Hyper- oder Hypomethylierung des *H19*-B1-Repeats.

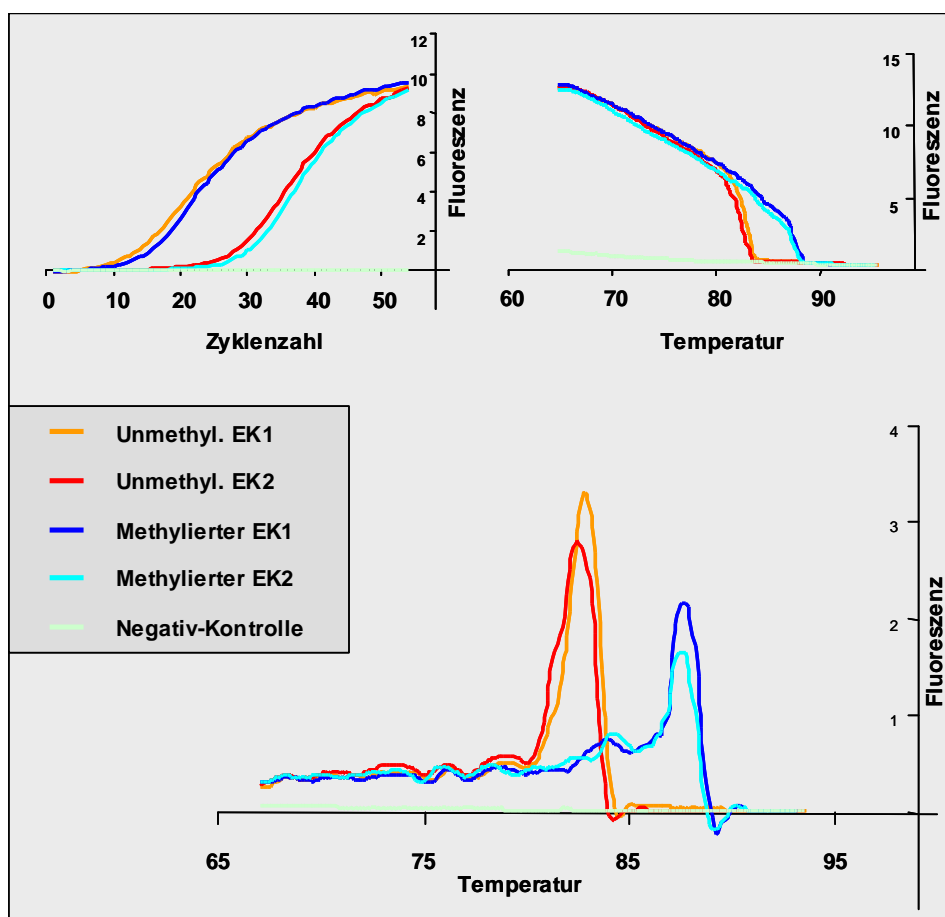


**Abbildung 3.12: Amplifikation eines 287 bp großen *H19*-B1-Fragments unter Einbau von SYBR-Green und Darstellung der allelabhängigen Schmelztemperaturen**

Es wurden die DNAs von zwei methylierten und zwei unmethylierten Einzelklonen (EK1, EK2) in insgesamt 28 Zyklen amplifiziert und die Fluoreszenzintensität des eingebauten SYBR-Greens nach jeder Elongationsphase gemessen (oben links). In den Negativkontrollen wurde keine DNA eingesetzt. Anschließend wurde die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs beim graduellen Aufschmelzen der Produkte anhand der Verringerung der Fluoreszenzintensität gemessen (oben rechts). Um den Zeitpunkt des Aufschmelzens als Zeitpunkt größter SYBR-Green-Freisetzung darzustellen, wurde die Veränderung der gemessenen Fluoreszenzintensität in Relation zur Temperatur gesetzt (unten). Der spezifische Schmelzpunkt der PCR-Produkte wird in der graphischen Darstellung als Kurvenpeak wiedergegeben. Er unterscheidet sich für die methylierten Einzelklone (hell-, dunkelblaue Kurven) um 2,8 °C von dem der unmethylierten Einzelklone (rot, orange Kurven).

### 3.4.2 Echtzeit-Amplifikation der KvDMR

In der differentiell methylierten Region vor dem *KCNQ1OT1*-Gen sollte ein 404 bp großes Fragment untersucht werden (LitiF-LitiR-Amplifikat), dessen allelspezifische Schmelzpunkte durch 38 potentiell methylierte CpGs und einen Guanin/Adenin-Polymorphismus bestimmt werden. Wie für die *H19*-B1-Region sollte der Unterschied der Schmelztemperaturen der methylierten und unmethylierten Allele zunächst mit Hilfe charakterisierter Einzelklon-DNA ermittelt werden. Die in jeweils zwei unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzten Fragmente zeigten ein Aufschmelzen mit einem einzelnen Maximum bei jeweils spezifischen Temperaturen (**Abbildung 3.13**).

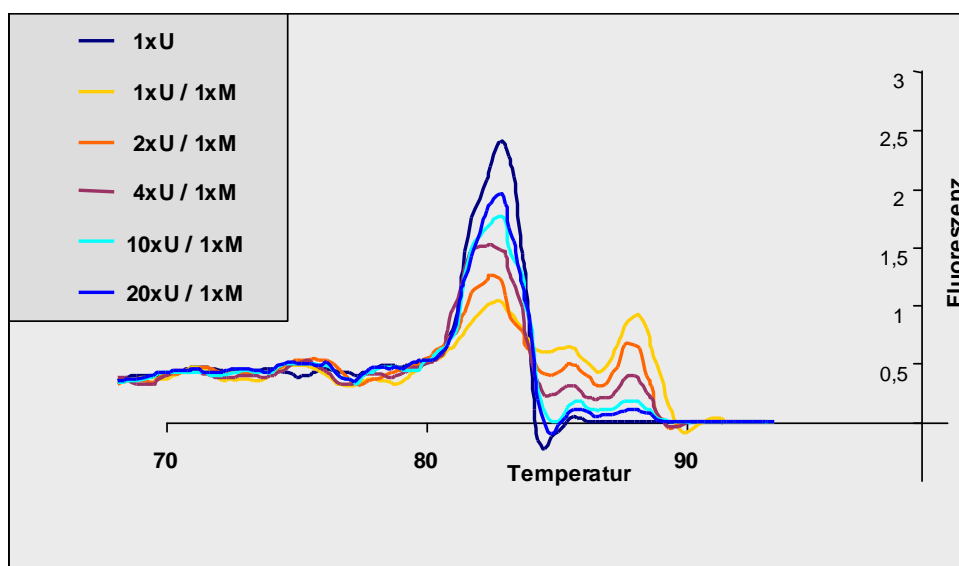


**Abbildung 3.13: Amplifikation eines 404 bp großen KvDMR-Fragments unter Einbau von SYBR-Green und Darstellung der allelabhängigen Schmelztemperaturen**

Die Amplifikation der zwei methylierten und unmethylierten Einzelklon- (EK1- und EK2-) DNAs wird durch die zunehmende Fluoreszenzabgabe des eingelagerten SYBR-Greens angezeigt (oben links) (siehe auch **Abbildung 3.12**). Die Kurven der Einzelklone 2 steigen später an, da jeweils die Konzentration der eingesetzten DNA-Menge um den Faktor 100 geringer war als die der Einzelklone 1. Dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf das Schmelzverhalten der Amplifikate, dass durch die abnehmende Fluoreszenzintensität bei steigender Temperatur angezeigt werden kann (oben rechts). Im unteren Teil der Abbildung wurden die Veränderungen der SYBR-Green-Freisetzung gegen die jeweilige Schmelztemperatur aufgetragen. Die spezifische Schmelztemperatur der methylierten Einzelklone war 5,1 °C höher als die der unmethylierten Einzelklone (unten).



Da im Gegensatz zur Einzelklonsequenzierung bei der Schmelzpunktanalyse die beiden parentalen Allele gleichzeitig analysiert werden müssen, sollte getestet werden, ob auch bei ungleichen Einsatzmengenverhältnissen methylierter und unmethylierter DNA eine Darstellung beider Allele mit unterschiedlichen Schmelzpunkten möglich ist. Hierzu wurden vollständig unmethylierte und methylierte Einzelklon-DNAs in Verhältnissen zwischen 1:1 und 1:20 gemischt und amplifiziert. Eine Amplifikation beider Allele war möglich und die Darstellung des Schmelzpunktes des unterrepräsentierten Allels war bis zu einem Verhältnis von 1:10 noch erkennbar, lag jedoch nur wenig über dem Hintergrundniveau (**Abbildung 3.14**). Um beide Allele analysieren zu können, sollte das Verhältnis der beiden gleichzeitig zu amplifizierenden Allele daher nicht einen 5- bis 6-fachen Überschuss eines Allels überschreiten.



**Abbildung 3.14: Gemeinsame Amplifikation methylierter und unmethylierter Einzelklon-DNA**

Die graphische Darstellung der Schmelzpunkte methylierter und unmethylierter Einzelklon-PCR-Produkte zeigt die charakteristischen Kurvenpeaks bei 87,6 °C und 82,5 °C (siehe auch **Abbildung 3.13**). Als PCR-„*template*“ (gleichbleibender Gesamteinsatzmenge) wurde eine Mischung der Einzelklon-DNAs eingesetzt: das den einzelnen Graphen zugrundeliegende Verhältnis unmethylierter DNA (1xU bis 20xU) zu dem methylierter DNA (1xM) ist in der Legende angegeben. In der PCR 1xU wurde ausschließlich unmethylierte Einzelklon-DNA amplifiziert.

### 3.5 Isolierung und Charakterisierung des murinen *Trpm5*-Gens

Der distale Abschnitt des murinen Chromosoms 7 ist die evolutionär homologe Region der humanen Chromosomenbande 11p15.5. Das humane *TRPM5*-Gen lokalisiert am distalen Rand eines Clusters imprinteter Gene und wurde daher auf seine allelspezifische Expression hin untersucht. Das Expressionsmuster des Gens in monoallelischen Mensch-Nager-Zellhybriden, bei denen entweder nur das väterliche oder nur das mütterliche Chromosom 11 im Genom vorhanden ist, deutet auf eine Inaktivierung des mütterlichen Allels durch genomisches Imprinting hin (Prawitt et al., 2000). Da das Imprintingmuster vieler monoallelisch exprimierter Gene sehr häufig im humanen und murinen Organismus gleich ist, sollte das murine orthologe *Trpm5*-Gen identifiziert und charakterisiert werden, und sein Imprintingstatus detailliert untersucht werden.

#### 3.5.1 Chromosomale Lokalisation des murinen *Trpm5*-Gens

Mit Hilfe der Primer E15F und E16R des humanen *TRPM5*-Gens konnte ein 922 bp großes Fragment des murinen PAC Klons 112O10 amplifiziert werden. Dieser PAC-Klon wurde von Dao und Mitarbeitern in einen Contig eingeordnet, der die der BWSCR1 orthologe murine Region des distalen Chromosoms 7 überspannt (Dao et al., 1999). Das humane *TRPM5*-Gen wird distal von den Genen *CD81* und *TSSC4* und proximal von *KCNQ1* flankiert (Prawitt et al., 2000). Unter Verwendung des PAC Klons 112O10 als PCR-„template“ konnten genomische Fragmente der murinen *Cd81*- und *Kcnq1*-Gene amplifiziert und das *Trpm5*-Gen zwischen ihnen lokalisiert werden (nicht abgebildet). Die Syntanie dieses Chromosomenabschnitts ist also zwischen Mensch und Maus evolutiv erhalten geblieben.

#### 3.5.2 Ermittlung der cDNA-Sequenz und der Exon-Intron Struktur des murinen *Trpm5*-Gens

Der murine PAC Klon 112O10 wurde durch Nebulisierung sequenzunabhängig in 800 bis 1400 bp große überlappende Fragmente zerlegt, die so den genomischen Lokus des murinen *Trpm5*-Gens überspannten. Die Fragmente wurden in einen pBluescript-Vektor einligiert, in *E.coli*-Bakterien kloniert und im 96 Lochformat angeordnet auf Nylon-Filter übertragen. Da mit Hilfe der für das humane orthologe Gen ermittelten Exonsequenzen die erwartungsgemäß sehr ähnlichen murinen Exons identifiziert werden sollten, wurden die Filter mit radioaktiv

markierten Sonden hybridisiert, die die ersten 17 bzw. letzten 9 Exons der humanen *TRPM5*-cDNA enthielten. Die inklonierte DNA der Kulturen, die ein Hybridisierungssignal zeigten, wurden unter Verwendung der vektorspezifischen M13-Primer sequenziert, mit der Basenabfolge der humanen Exons verglichen und eine erste Anordnung der identifizierten genomischen Fragmente ermöglicht. Die so ermittelten Sequenzen stammten aus den Exons 2, 6, 8, 15, 16, 19 und 21, sowie der benachbarten Intron-DNA. Ausgehend von diesen Sequenzinformationen konnte zum einen durch Amplifikation revers transkribierter muriner mRNA, die aus postnatale und adulter Milz und Leber isoliert wurde, mit Primern, deren Sequenz sich aufgrund der Position der entsprechenden humanen Basenabfolge in *Trpm5*-Exonbereichen befanden, die weiteren zwischen den identifizierten Abschnitten liegenden Exons identifiziert werden. Zum anderen konnte mit zunehmender Kenntnis der mRNA-Sequenz auch die genomische DNA-Sequenz des *Trpm5*-Gens durch sukzessive Amplifikation des PAC-Klons 112O10 ermittelt werden (**Abbildung 3.15**) und die Exon-Intron-Grenzen durch Vergleich der cDNA- und genomischen DNA-Sequenzen festgestellt werden (**Abbildung 3.16**).

Eine Amplifikation der 5'- und 3'-Enden des *Trpm5*-Transkripts über RACE-PCR ermöglichte die Identifizierung des Exons 1, das den Translationsstart enthält, sowie eines zusätzlichen untranslatierten 5'-Exons (u1) und weiterer drei 3'-Exons (Exon 22-24) inklusive eines mindestens 163 bp großen 3-UTRs. Die insgesamt 25 Exons des inklusive der untranslatierten Bereiche 3727 bp großen Gesamttranskripts variieren in der Länge von 65 bp (Exon 5) bis 339 bp (Exon 9) (**Abbildung 3.15**) und werden auf einem 22455 bp großen genomischen Abschnitt durch Introns der Größen 65 bis 4947 bp getrennt. Alle Exon-Intron Grenzen folgen der AG-GT Regel für das Spleißen von mRNAs mit Ausnahme der Spleiß-Donor Sequenz des Exons 22, die wie die der humanen Sequenz ein auf das Exon folgendes GC-Dinukleotid enthält (**Abbildung 3.16**).

### 3.5.3 Analyse der *Trpm5*-Expression

Die Expression der *Trpm5*-RNA konnte durch Amplifikation der cDNA aus murinen Geweben, die aufgrund der bekannten Expression des humanen orthologen Gens ausgewählt wurden, für diese Organe nachgewiesen werden. Um das Expressionsmuster und die Größe des *Trpm5*-Transkripts festzustellen, wurde eine Northern-Blot-Hybridisierung mit einem die Exons 21 bis 24 enthaltenden RT-PCR Produkt als Sonde und einem „*Adult-multiple-mouse-tissue-Northern-blot*“ (Clontech), mit der RNA aus adultem murinem Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Nieren und Hoden, durchgeführt.



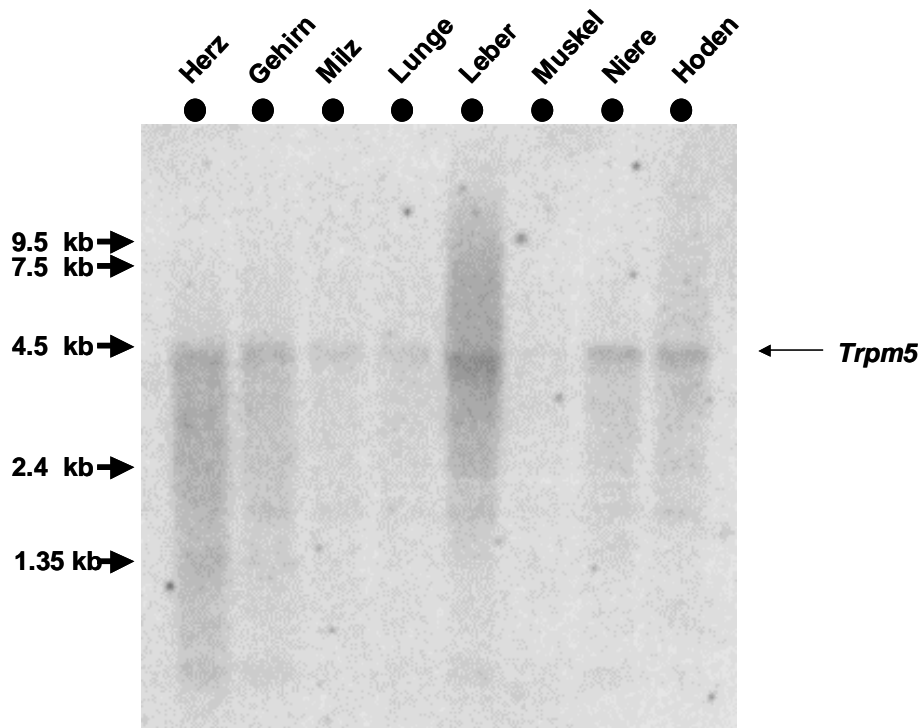
Exon Nr.					Exonlänge	Intronlänge
	Intron(3'-Ende)	Exon(5'-Ende)	Exon(3'-Ende)	Intron(5'-Ende)	(bp)	(bp)
Exon u1	xxxxxxxxxx	AAGCATCACG	TGCCCTGACTG	<b>g</b> taagtagct	77	4947
Exon 1	tgttteac <b>ag</b>	GAAAGCCACC	GCGAGGCAAG	<b>g</b> taggggcaa	127	400
Exon 2	taccctgc <b>ag</b>	TTGTGAAGG	CAGAGCACAG	<b>g</b> taaggctgg	181	1037
Exon 3	cctcccat <b>ag</b>	GTGCCTGGAT	CCACCAAAG	<b>g</b> ttagtgaca	173	658
Exon 4	cttggcac <b>ag</b>	GAGGATACTC	GTTATGGGG	<b>g</b> taaggcttg	187	1335
Exon 5	ctgcccac <b>ag</b>	GCACCAGCTG	CACCCTAGAG	<b>g</b> taagggcag	65	146
Exon 6	cctcccc <b>ag</b>	AGGATTCCA	GACAGAGCTG	<b>g</b> tatgtgctg	192	259
Exon 7	ctggtett <b>ag</b>	TTACAGAACA	CTTGTGAAAG	<b>g</b> tgagccaag	103	1219
Exon 8	ccaccac <b>ag</b>	CCTGCAAGAG	GGAATGGAAG	<b>g</b> tgetctccc	119	356
Exon 9	gtgaatcc <b>ag</b>	TCCTGTGACT	CAGGATGGAG	<b>g</b> tgagtagag	339	65
Exon 10	tgtttcgc <b>ag</b>	GAGAGAGGGC	CTGGCCATG	<b>g</b> tgagcagcc	141	108
Exon 11	catcttc <b>ag</b>	GGCCGGGAGG	CTGGCCCTGG	<b>g</b> tgagtcaca	124	392
Exon 12	ttgtttac <b>ag</b>	ATCTTTTCTC	CGGTGTGCAA	<b>g</b> taagtagtt	146	675
Exon 13	tttattcc <b>ag</b>	GCATTCCTGA	TCTCCTCAG	<b>g</b> taggtggac	113	150
Exon 14	tgtgttc <b>ag</b>	TGAGGATGCC	GGGTGGCCA	<b>g</b> taaggagta	93	341
Exon 15	actcacac <b>ag</b>	ATTGAGAAG	AATCCGACAG	<b>g</b> tcagtgccc	259	601
Exon 16	cctctgcc <b>ag</b>	GGCTTCTCA	TCACCTGTAG	<b>g</b> tatgtgggc	119	162
Exon 17	ccctctcc <b>ag</b>	AATGGTGCCC	AGAGCGAATG	<b>g</b> tggtgctct	133	634
Exon 18	ccctctgc <b>ag</b>	ATGAAGGATG	GAAATGATG	<b>g</b> tttgtgctg	175	2645
Exon 19	tgccttac <b>ag</b>	AGGCTCGTGT	CCATGTTAG	<b>g</b> taccctcct	154	889
Exon 20	tgtectg <b>ag</b>	CTACACATTC	CAACATCTGG	<b>g</b> tgaggcccc	182	320
Exon 21	acattgcc <b>ag</b>	AGAGAGACTT	CGGCACACAG	<b>g</b> tggggcagc	133	734
Exon 22	ctttctac <b>ag</b>	AGTGGACTTG	GGAATCACAG	<b>g</b> caagctagc	73	364
Exon 23	ctctctcc <b>ag</b>	GCCAACTACT	ACCTACTCAA	<b>g</b> taagtatgg	67	294
Exon 24	ttgetccc <b>ag</b>	GCTCTCAGAA	CTCATGTCAG	xxxxxxxxxx	252	

### Abbildung 3.16: Exon-Intron-Grenzen des murinen *Trpm5*-Gens

Es konnten 25 Exons identifiziert werden: Exon u1 besteht ausschließlich aus 5'-UTR, das für den Translationsstart kodierende Basentriplett liegt in Exon 1. Exon 24 enthält das Ende des offenen Leserahmens und den bekannten Teil der 3'-UTR. Exonsequenzen sind in Groß-, Intronsequenzen in Kleinbuchstaben angegeben. Die Spleiß-Donor- und -Akzeptor-Sequenzen sind in Fettdruck wiedergegeben und entsprechen denen des humanen orthologen Gens.

Ein Transkript mit einer ungefähren Größe von 4,4 kb konnte vor allem für Leber, Herz, Gehirn, Nieren und Hoden nachgewiesen werden. Sehr schwache Signale wurden für Milz und Lunge gefunden (siehe **Abbildung 3.17**). In RT-PCR Experimenten mit RNA-Präparationen aus zwanzig verschiedenen Geweben und sechs unterschiedlichen Zeitpunkten der prä- und postnatalen murinen Entwicklung wurde die Expression von *Trpm5*, wie sie mit Hilfe des Northern-Blots festgestellt wurde, in diesen Geweben bestätigt und zusätzlich für die adulten Organe Haut, Augen, Magen, Dünn- und Dickdarm, Harnblase, Pankreas und Thymus nachgewiesen (ohne Abbildung). Die Untersuchung der *Trpm5*-Expression während der Embryonalentwicklung, bei der die Gewebe 14,5 und 17,5 Tage post coitum (pc) entnommen wurden,

ergab den Nachweis von Transkripten vor allem in Leber, Nieren, Milz, Gehirn, Herz und Lunge. Von 11,5 Tage alten Embryonen wurden Kopf, Rumpf und Extremitäten separat analysiert. Es konnten für dieses Stadium in allen drei Körperteilen Transkripte gefunden werden.



**Abbildung 3.17: Hybridisierung der *Trpm5*-cDNA-Sonde auf einen murinen adulten Northern-Blot**

Die verwendete Sonde vom 3'-Ende des *Trpm5*-Gens detektiert ein Transkript mit einer Größe von ungefähr 4,4 kb. Die Laufweiten der Fragmente des RNA-Längenstandards sind am linken Abbildungsrand durch die Pfeile unter Angabe der Fragmentgrößen markiert. Es konnten nur relativ schwache Signale detektiert werden, die am deutlichsten in Leber, Herz, Gehirn, Niere und Hoden hervortraten.

### 3.5.4 Vorhersage der *Trpm5*-Proteinstruktur

Das für den Start der Translation der murinen *Trpm5*-mRNA notwendige AUG-Triplett, das für die Aminosäure Methionin kodiert, existiert innerhalb der ersten 150 Nukleotide des Transkripts dreimal, jeweils einmal in jedem Leserahmen (siehe **Abbildung 3.15**). Das zweite AUG-Triplett ist Teil einer nahezu idealen Kozak-Konsensussequenz (GCCRC CAUGG, (Kozak, 1991; Kozak, 1996)). Der sich aus der Translation von diesem Start-Kodon ergebende offene Leserahmen wird durch ein UGA-Stop-Kodon nach 3474 Nukleotiden begrenzt. Das mögliche murine TRPM5-Protein mit 1158 Aminosäuren zeigt ausnahmslos die gleichen mit Hilfe von Sekundärstruktur-Vorhersage-Algorithmen (SOSUI) postulierten Motive und Domänen, wie sie für das humane TRPM5-Protein beschrieben wurden (Prawitt

et al., 2000). Es konnten sechs wahrscheinliche Transmembran-Domänen (TM) identifiziert werden, die, mit Ausnahme eines Leucin/Valin-Austausches in TM 3, eine identische Aminosäurenabfolge zeigen, wie das vorhergesagte humane TRPM5-Protein. Das murine Protein zeigt außerdem an gleicher Position und mit identischer Aminosäuresequenz wie das humane, ein in Exon 19 kodiertes, zu **FWKQ** modifiziertes, für die TRP-Genfamilie typisches EWKFAKAR-Motiv. 82,5 % der Aminosäuren der vorhergesagten humanen und murinen TRPM5-Proteine sind identisch, und bei weiteren 7 % handelt es sich um konservative Austausche, die keine strukturellen Veränderungen der Proteine bewirken. **Abbildung 3.18** zeigt die vorgesagten Aminosäuresequenzen des humanen und murinen TRPM5-Proteins im Vergleich.

humanes Trpm5	MQDVQGFRRGSGDADRRRLGLHRGEVNFQSSGKRRKGFVRFVSPVAPSVLFDLLIAEW	humanes TRPM5	ARAPALLVRRNRCSKTTCLHLATEADAKAFFAHDQVQAFITRIWGDMAAGTPIRLLLG
murines Trpm5	MQTTSQCFSGSPDTEDQWEPFLCRGEINFGSSGKRRKGFVRFVSPVAPSVLFEILLITW	murines Trpm5	DRAPALLVRRNRCSKTTCLHLATEADAKAFFAHDQVQAFITRIWGDMAAGTPIRLLLG
humanes TRPM5	HLPAPNLVSVLVGEEQPFAMKSWLRDVLRRKGLVKAQSTGANILTSALRWGLARHVQAV	humanes TRPM5	AFLCPALVYTNLITFSEAPLRTGLLEDLQDLDSLDEKTESPLVQLQSRVBEVLEAPRAQGD
murines Trpm5	HLPAPNLVSVLVGEEERPLAMKSWLRDVLRRKGLVKAQSTGANILTSALRWGLARHVQAV	murines Trpm5	AFTCPALVYTNLITFSEADAPQRMLEDLQDLDSLDEKTESFLCSRGGQLEKLETPRAPQGD
humanes TRPM5	RDHSLASTSKVRVAVGMSLGRVLRHRILE--EAQEDFPVHYPEDDGGSQQLCSLDS	humanes TRPM5	RGPRAVFLITRWKRFWGAQVTVFLGNVVMVFAPLFLFTYVLLVDFRPPQSGSPVFLY
murines Trpm5	RDHSLASTSKIRVVAIGMSLDRILHRQLLDGVHQKEDTPIHYPADEGNIQQGLCPDLS	murines Trpm5	LGPQAFLITRWKRFWGAQVTVFLGNVVMVFAPLFLFTYVLLVDFRPPQSGSPVFLY
humanes TRPM5	NLSHPILVEPQPKG-DGLTELRLELREKHSIQRAQVGGTSGIEIPVLCLLVNGDPNTL	humanes TRPM5	FVWFVTLVLEIRQGFEDTTHLVKRFVTVLVEDNWNKCDMVAFLFIVGVTCRMVPSVFE
murines Trpm5	NLSHPILVESGALGSDNDGTEIQLSLEKHSIQRTGYGGTSCIQIPVLCLLVNGDPNTL	murines Trpm5	FVWFVTLVLEIRQGFEDTTHLVKRFVTVLVEDNWNKCDMVAFLFIVGVTCRMVPSVFE
humanes TRPM5	ERISRAVEQAAPWLLVSGSGIADVLAALVNPQHLLVPKVAEKQFKKFPSEKHSWEDIV	humanes TRPM5	AGRTVLAIDFMVFTLRLLHIFAHKQLGPKITIVERMNKDVFVFLFSLVWLVAVGVTTQ
murines Trpm5	ERISRAVEQAAPWLLVSGSGIADVLAALVNPQHLLVPKVAEKQFKKFPSEKHSWEDIV	murines Trpm5	AGRTVLAIDFMVFTLRLLHIFAHKQLGPKITIVERMNKDVFVFLFSLVWLVAVGVTTQ
humanes TRPM5	RWTLLQNTTSHQHLLTVYDFEQGSEELDTVILKALVKACKSHSQEQDYLDELKLAVA	humanes TRPM5	ALLHPHDGRLEWIFRRVLYRVPYLIQPGQIPDLEIDEARVNCSTHPLLEDSPSCPGLVAN
murines Trpm5	HWTLELQNTAHPHLLTVYDFEQGSEELDTVILKALVKACKSHSQEQDYLDELKLAVA	murines Trpm5	ALLHPHDGRLEWIFRRVLYRVPYLIQPGQIPDLEIDEARVNCSTHPLLEDSPSCPGLVAN
humanes TRPM5	WDRVDIAKSEIFNCDVEKSCDLEFVMDALVSNKPEFVRLFVFNQADVADFLTYGRLQE	humanes TRPM5	WLVITILLVTFLLVTVLMLNLLIAMSPTVTEQVQGNADMFVRFQRVHIVEVHRERLALP
murines Trpm5	WDRVDIAKSEIFNCDVEKSCDLEFVMDALVSNKPEFVRLFVFNQADVADFLTYGRLQE	murines Trpm5	WLVITILLVTFLLVTVLMLNLLIAMSPTVTEQVQGNADMFVRFQRVHIVEVHRERLALP
humanes TRPM5	LYRSVSKSLFLDRLQRQBEARLTLAGLSTQQAAREPPAGPPAFSLHVSRLVKDFLQDA	humanes TRPM5	PFILLSHLSLTLRRVFKKEARHREHLGEXEKHREHLERDLDPLDQKVVITWETVQKKNF
murines Trpm5	LYRSVSKSLFLDRLQRQBEARLTLAGLSTQQAAREPPAGPPAFSLHVSRLVKDFLQDA	murines Trpm5	PFTLLSHLSLTLRRVFKKEARHREHLGEXEKHREHLERDLDPLDQKVVITWETVQKKNF
humanes TRPM5	CRGFYQDQGRDRRAEKQPAKRFYQKWLLDLNGKSENPWRDLFVAVLQNRHMMATYF	humanes TRPM5	LSKMEKRRRDSEGEVLRKTAHRVDFIAKVLGGLRQEKRIKCLSESQINVCVLSVAVDV
murines Trpm5	CRGFYQDQGRDRRAEKQPAKRFYQKWLLDLNGKSENPWRDLFVAVLQNRHMMATYF	murines Trpm5	LSTMKRRRDSEGEVLRKTAHRVDFIAKVLGGLRQEKRIKCLSESQINVCVLSVAVDV
humanes TRPM5	WAMGQGVAAALAAACKILKEMSHLETEAEEAARTREAKYERLALGPPGADLFSECYNSNE	humanes Trpm5	LAQCGPSSQHCQEGSGLVAADHRGGLDQWQPGAGQPSDT
murines Trpm5	WAMGQGVAAALAAACKILKEMSHLETEAEEAARTREAKYERLALGPPGADLFSECYNSNE	murines Trpm5	LAPGGTYSSSQHCQEGSGLVAADHRGGLDQWQPGAGQPSDT

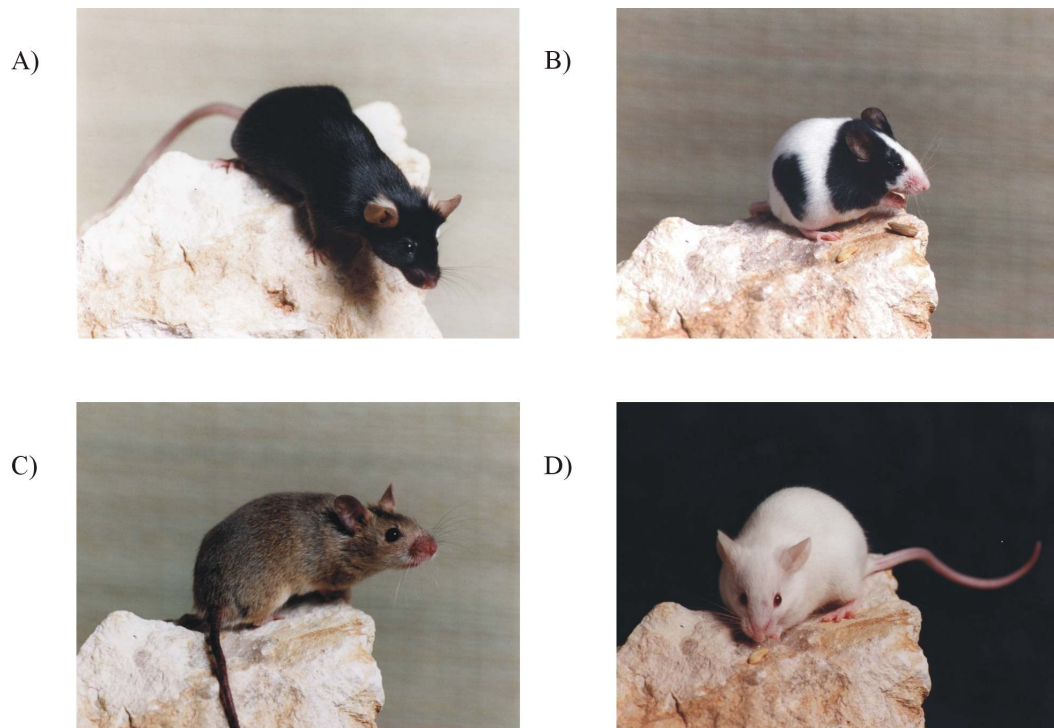
**Abbildung 3.18: Vergleich der putativen humanen und murinen Aminosäuresequenzen**

Identische Aminosäuren sind durch einen Stern, konservative Aminosäureaustausche durch einen Doppelpunkt unterhalb des Alignments markiert. Die sechs vorgesagten Transmembrandomänen (TM1-6) und das Trp-Genfamilien-Motiv sind durch Einrahmung hervorgehoben.

### 3.5.5 Etablierung einer Methode zur Untersuchung einer gewebe- und entwicklungsabhängigen allelspezifischen Genexpression

Um Gene schnell und sicher auf eine putative allelspezifische Expression hin untersuchen zu können, wurden Tiere zweier möglichst polymorpher Mäusestämme gekreuzt und eine cDNA-Bank angelegt, die RNA aus zweik weit verschiedenen Geweben und sechs unterschiedlichen Zeitpunkten der prä- und postnatalen murinen Entwicklung beinhaltet. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Marion Eßwein, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde, erarbeitet (Eßwein, 1999). Bei den verwendeten Mäusestämmen handelt es sich um den weit verbreiteten Inzuchtstamm *Mus musculus musculus* C57BL/10 und den

weniger verbreiteten, erst 1993 von Koide und Mitarbeitern neu etablierten Inzuchtstamm *Mus musculus molossinus* Japanese Fancy 1 (JF1) (**Abbildung 3.19**). Die Polymorphismusrate für Mikrosatellitenmarker der Kreuzungen JF1 x C57BL/6 beträgt 81,2 % (Koide et al., 1998) und weist auf eine hohe Divergenz der beiden Stämme hin. Die Zucht und Kreuzung dieser beiden Inzuchtstämme war sehr unproblematisch, die mittlere Wurfgröße lag für beide Stämme und auch für die Kreuzungen beider Subspezies zwischen 5 und 6 Neugeborenen.



**Abbildung 3.19: Für die Untersuchungen der allelspezifischen Genexpression verwendete Maus-Inzuchtstämme**

A) C57BL/10 (*Mus musculus musculus*)

B) Japanese Fancy 1 (JF1) (*Mus musculus molossinus*)

C) SPRET/Ei (*Mus spretus*)

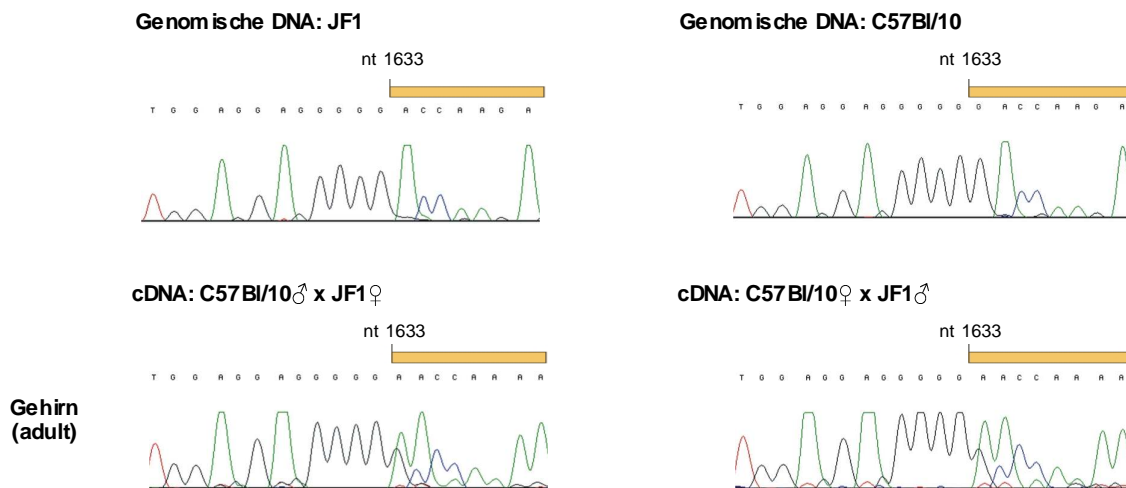
D) FVB/N (*Mus musculus musculus*)

Für fast alle Imprintinguntersuchungen wurden die C57BL/10- und JF1-Mäuse verwendet. Bei Schwierigkeiten mit stammspezifischen Unterschieden in der Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens (siehe **Kapitel 3.7.3** und **3.7.4**) wurden ersatzweise Kreuzungen mit FVB/N- oder SPRET/Ei-Mäusen durchgeführt. (Abbildung aus (Eßwein, 1999))

Zur Etablierung der Methode wurden zwei Gene ausgewählt, deren allelspezifische Methylierungsmuster bereits bekannt waren: das auf dem murinen Chromosom 17 gelegene *Igf2r*-Gen, für das eine spezifische Inaktivierung des paternalen Allels nachgewiesen werden konnte (Barlow et al., 1991), und das auf Chromosom 7 proximal des *Ascl2*-Gens lokalisierte *Tyrosinhydroxylase* (*Th*)-Gen, das in allen untersuchten Geweben biallelisch exprimiert wird (Kitsberg et al., 1993).



Für das *Th*-Gen konnte im 3'-UTR an Position nt1633 ein Polymorphismus in Form eines fehlenden Guanins in der Sequenz des JF1 Allels im Vergleich zu der des C57Bl/10 Allels identifiziert werden, der die Unterscheidung der parental Allele bei der Untersuchung der cDNA der Kreuzungen der beiden Mausstämmen ermöglicht. Mit ebenfalls in der 3'-UTR gelegenen Primern konnten cDNA-Produkte in adulten Tieren ausschließlich im Gehirn amplifiziert werden, während in jungen Tieren, bei denen die Gewebe kurz nach der Geburt präpariert wurden, oder in 14,5 und 17,5 Tage alten Embryonen (e14,5 und e17,5) eine Expression in zahlreichen Geweben, wie z.B. Gehirn, Auge, Herz, Pankreas, Magen, Thymus und Zunge, festgestellt werden konnte. Auch in 11,5 Tage alten Embryonen (e11,5), bei denen RNA aus Kopf, Rumpf und Extremitäten isoliert wurde, konnte jeweils ein cDNA-Produkt generiert und sequenziert werden. Alle Produkte zeigten erwartungsgemäß eine Beteiligung beider parentaler Kopien an der Expression des *Th*-Gens in den beteiligten Zellen, die bei der Sequenzierung aufgrund der Deletion im JF1-Allel zu einer Überlagerung der paternalen und maternalen Sequenzen führte (**Abbildung 3.20**). Die von Kitsberg und Mitarbeitern 1993 beschriebene biallelische Expression des murinen *Th*-Gens (Kitsberg et al., 1993), konnte also mit dem hier verwendeten experimentellen Ansatz bestätigt werden.

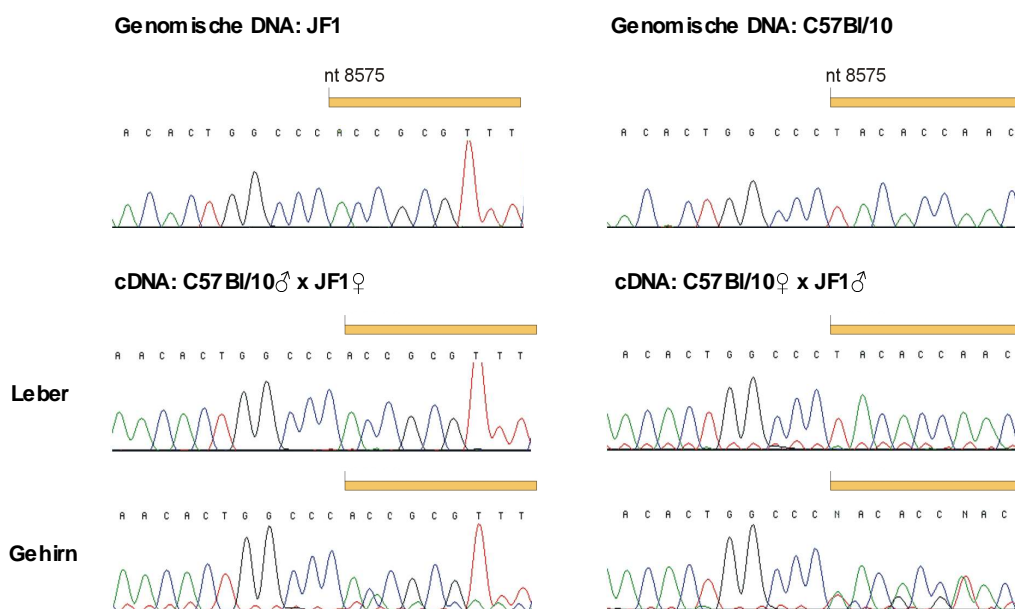


**Abbildung 3.20: Biallelische Expression des *Th*-Gens**

Die rechts und links oben abgebildeten Sequenzen der genomischen DNAs der beiden Maus-Inzuchtstämme unterscheiden sich in dem durch den gelben Balken markierten Bereich (1 bp-Deletion im JF1-Allel). Die Expression des *Th*-Transkripts wurde anhand von RNA-Präparaten aus Geweben von C57Bl/10xJF1-Kreuzungen untersucht. In dieser, wie in allen folgenden Abbildungen der cDNA-Elektropherogramme, ist/sind links die Sequenz(en) der Kreuzung eines C57Bl/10-Männchens mit einem JF1-Weibchen und rechts die der reziproken Kreuzung abgebildet. In der cDNA des adulten Gehirns, deren Sequenz exemplarisch für die untersuchten Gewebe ausgewählt wurde, ist eine Überlagerung der Sequenzen des jeweiligen maternalen und paternalen Allels zu erkennen. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

Im Gegensatz zum *Th*-Gen sollte mit der verwendeten Methode für das *Igf2r*-Gen eine ausschließliche Beteiligung der maternalen Genkopie an der RNA-Synthese festgestellt werden können. Das *Igf2r*-Gen wird präimplantativ noch biallelisch exprimiert, aber 5-6 Tage nach der Befruchtung ist das paternale Allel vollständig inaktiviert und die Expression erfolgt ausschließlich vom maternalen Allel. Dies trifft mit der Ausnahme des Gehirns, das eine gleichbleibende Expression beider Allele in allen Entwicklungsstadien zeigt, auf alle embryonalen und adulten Gewebe zu.

Für die Zuordnung der parental Allele konnte eine 17 bp-Duplikation in der 3'UTR des *Igf2r*-Gens identifiziert werden, die charakteristisch für die C57/B10-Sequenz ist, aber nicht mit der JF1-DNA amplifiziert werden kann. Ein cDNA-PCR-Produkt mit diesem Polymorphismus konnte mit der DNA aller untersuchter Gewebe aller Stadien der reziproken JF1-C57Bl/10 Kreuzungen generiert werden. Die Sequenzierung dieser Amplifikate zeigte, wie erwartet, ausschließlich eine der maternalen DNA-Sequenz entsprechende Basenabfolge, unabhängig davon ob JF1-Männchen oder -Weibchen für die Kreuzungen verwendet wurden. Nur die DNAs der Gehirnpräparationen zeigten zusätzlich auch die paternale Sequenz, so dass es dort zu einer Überlagerung der unterschiedlichen parental Sequenzen im Elektropherogramm kam (**Abbildung 3.21**).



**Abbildung 3.21: Allelspezifische Expression des *Igf2r*-Gens**

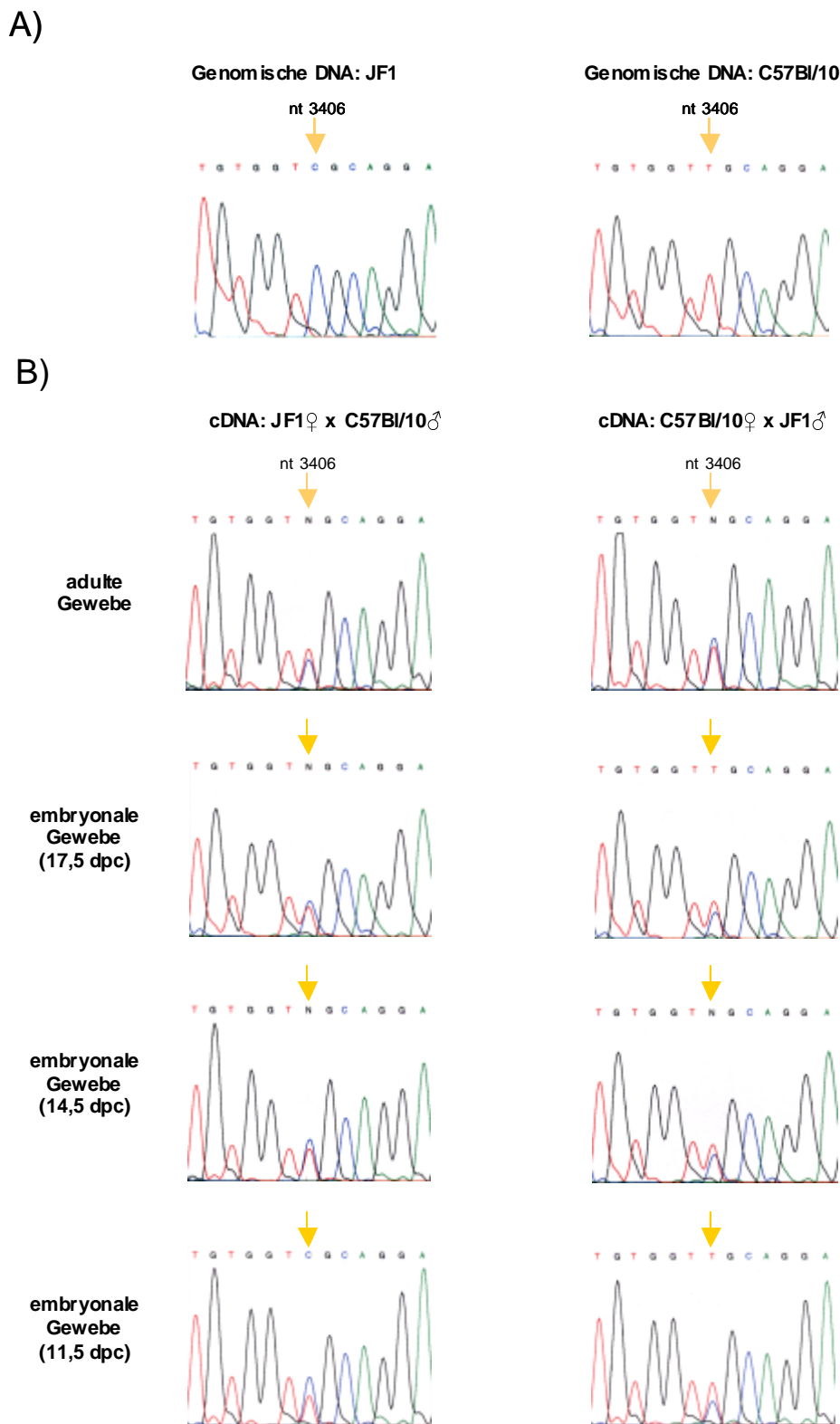
Die rechts und links oben abgebildeten Sequenzen der genomischen DNAs der beiden Maus-Inzuchtstämme unterscheiden sich in dem durch den gelben Balken markierten Bereich (17 bp-Duplikation im C57Bl/10-Allel). Die cDNA-Sequenzen der adulten Leber zeigen ausschließlich das jeweils maternale Allel, während sich die Sequenzen der beiden Allele der Gehirn-cDNA ab Nukleotid 8575 überlagern. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

Da die biallelische Expression von *Igf2r* nur auf den Choroidplexus beschränkt zu sein scheint (Lerchner und Barlow, 1997), kommt es bei der Verwendung von RNA homogenisierter Gesamtgehirnpräparate zu einer überwiegenden Beteiligung des maternalen Allels bei der Amplifikation des PCR-Produkts, so dass die maternale die paternale Sequenz „überlagerte“. Obwohl der gewählte Ansatz der Sequenzierung eine Quantifizierung der Allele nicht erlaubt, kann eine ungleiche Fluoreszenzintensität daher auf eine unvollständige Inaktivierung eines der elterlichen Allele, oder ein Gemisch von Zellen mit und ohne allelspezifische Expression des untersuchten Gens hindeuten.

### 3.5.6 Biallelische Expression der *Trpm5*-mRNA

Da das *Trpm5*-Gen in einer Region lokalisiert ist, in der benachbarte Gene dem genomischen Imprinting unterliegen, wurde es auf die von der elterlichen Herkunft abhängige Inaktivierung eines Allels hin untersucht. Zur Identifizierung der Herkunft der Transkripte wurde ein Polymorphismus in Exon 24 an Nukleotidposition 3406 genutzt (**Abbildung 3.22 A**), der für die JF1-DNA in einem Cytosin und für C57/Bl10 in einem Thymin resultiert. Um stammspezifische Expressionsstärken, wie sie für die Gene *Nap114* und *Glucokinase* (siehe **Kapitel 3.7.3** und **3.7.4**) gefunden wurden, für das *Trpm5*-Gen als Ursache einer möglichen Über- bzw. Unterrepräsentation der beiden Allele auszuschließen, wurden alle Untersuchungen mit RNA aus reziproken Kreuzungen der beiden Mausstämme durchgeführt. Unterschiede zwischen den reziproken Kreuzungen bezüglich des Verhältnisses der Expressionsstärken der elterlichen Allele zueinander wurden nicht gefunden. Die Kreuzungen der verwendeten Mausstämme erlauben also die Untersuchung einer potentiellen allelspezifischen *Trpm5*-Expression.

Es konnten insgesamt jeweils 13 RNAs der reziproken Kreuzungen sowohl aus embryonalen, wie auch aus adulten Geweben auf die allelspezifische *Trpm5*-Expression untersucht werden. Alle sequenzierten cDNAs zeigten für die polymorphe Position die Existenz beider Allele und deuten damit auf eine biallelische Expression des Gens mindestens ab Tag 11,5 der Embryonalentwicklung und in adulten Mäusen hin.



**Abbildung 3.22: Untersuchung der *Trpm5*-cDNA-Sequenzen der reziproken Kreuzungen der beiden Mausstämme JF1 und C57Bl/10 in embryonalen und adulten Geweben.**

A) Sequenzierung der DNA-Sequenzen der Mausstämme JF1 und C57Bl/10 im Bereich der 3'-UTR des *Trpm5*-Gens. Die zur Unterscheidung der parentalen Allele verwendete polymorphe Position nt 3406 ist durch die gelben Pfeile markiert. B) Auf der rechten Seite sind die Sequenzen um die polymorphe Position nt 3406 (gelber Pfeil) der Nachkommen von JF1-Müttern und C57Bl/10-Vätern dargestellt, auf der linken Seite die der Gewebe reziproker Paarungen. Die Elektropherogramme zeigen in allen untersuchten Transkripten die Sequenzen von beiden elterlichen Allelen.

### 3.6 Untersuchung der gewebe- und allelspezifischen Expression des murinen *Ascl3*-Gens in der Embryonalentwicklung

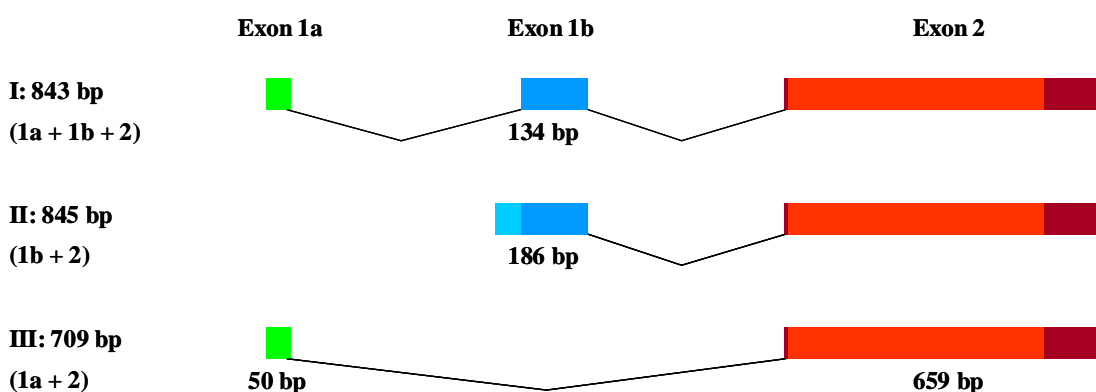
Die orthologen murinen und humanen *Ascl3*-Gene („*achaete-scute-complex, homolog-like 3*“) wurden im Rahmen der vergleichenden Sequenzierung eines 620 kb großen DNA-Abschnitts des murinen Chromosoms 7 und einer 730 kb großen Region des humanen Chromosoms 11p15.3 identifiziert (Amid et al., 2001). Das murine *Ascl3*-Gen hat einen offenen Leserahmen von 522 bp, der sich vollständig in Exon 2 des Gens befindet. Das potentielle ASCL3-Protein weist die für diese Familie von Transkriptionsfaktoren charakteristische basische DNA-Bindungsdomäne, sowie das Helix-Loop-Helix-Motiv auf, das eine Homo- oder Heterodimerisierung ermöglicht. Die bekannten Familienmitglieder *Ascl1* und *Ascl2* sind bei der Entwicklung neuraler Vorläuferzellen des zentralen und peripheren Nervensystems, bzw. des Trophektoderms von Bedeutung (Lo et al., 1991; Guillemot et al., 1994). Die Transkription des *Ascl2*-Gens ist ab Tag 8,5 der murinen Embryonalentwicklung auf das maternale Allel beschränkt. Daher sollte die Expression des neu identifizierten *Ascl3*-Gens in den zur Verfügung stehenden embryonalen Geweben untersucht und eine allelspezifische Inaktivierung überprüft werden.

#### 3.6.1 Expression des murinen *Ascl3*-Gens in der Embryonalentwicklung

Die Untersuchung des *Ascl3*-Gens erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schmidt (Molekulargenetisches Institut der Universität Mainz), der es gelang, durch die Sequenzierung des cDNA Klon IMAGp998L19859 und RT-PCR-Amplifikationen der RNA von 13,5 und 14,5 Tage alten Gesamtembryonen, einen 706 bp langen Abschnitt der *Ascl3*-mRNA zu beschreiben. Diese Sequenz war auf zwei Exons verteilt, wobei nur 47 Nukleotide auf das Exon 1, und 659 Nukleotide, inklusive des gesamten offenen Leserahmens, auf Exon 2 entfielen. Ausgehend von dieser Sequenz wurde die cDNA-Bank der Embryonalstadien Tag 11,5, 14,5 und 17,5 mit intronüberspannenden Primern untersucht. Eine Amplifikation gelang ausschließlich mit Zungengewebe 14,5 und 17,5 Tage alter Embryonen, hier konnten jedoch zwei Produkte unterschiedlicher Größe detektiert werden. Die Amplifikate wurden zur Identifizierung aus dem Agarosegel eluiert, in einen T-Vektor inkloniert und nach Vervielfältigung in *E.coli*-Bakterien sequenziert (siehe **Kapitel 2.5.2** und **2.9**). Die gefundenen Basenabfolgen weisen auf zwei alternative mRNA-Versionen hin, wobei eine aus den bereits bekannten Exons 1 und 2 besteht, während die zweite ein zusätzliches Exon zwischen diesen beiden Exons aufweist (**Abbildung 3.23**). Daher wurde Exon 1 zu Exon 1a und das neu identifizierte

Exon zu Exon 1b umbenannt. Die Amplifikation der cDNA-Sammlung mit Hilfe von Primern aus Exon 1b und Exon 2 zeigte eine Expression dieser Spleißvariante in Zunge, Gehirn, Auge, Lunge, Milz, Pankreas, Darm und Harnblase 17,5 Tage alter Embryonen, sowie in Zunge, Gehirn, Auge, Leber und Magen 14,5 Tage alter Embryonen. In 11,5 Tage alten Embryonen konnte eine Expression im Rumpf festgestellt werden.

Um den entgültigen Umfang und die alternativen Spleißformen des *Ascl3*-Trankripts zu ermitteln, sollten die 5'- und 3'-Enden der cDNA mittels RACE-PCR bestimmt werden. Zur Erfassung der alternativen Exons wurden Transkripte aus Gehirn und Zunge 17,5 Tage alter Embryonen verwendet. Die Sequenzierung des ca. 700 bp großen 3'-RACE-Produkts ergab eine Sequenzverlängerung in der 3'-UTR von 32 bp. Im 5'-UTR wurden drei Produkte amplifiziert und sequenziert: ein ca. 380 bp großes Amplifikat, das aus den Exons 1a und 2 zusammengesetzt war und ein ca. 520 bp großes Produkt, das aus den Exons 1a - 1b - 2 bestand, konnten in der mRNA-Population des Zungengewebes nachgewiesen werden. Eine weitere *Ascl3*-Isoform, die einen alternativen Transkriptionsstart des Exons 1b zeigte, konnte in der RNA der Gehirnpräparation identifiziert werden.



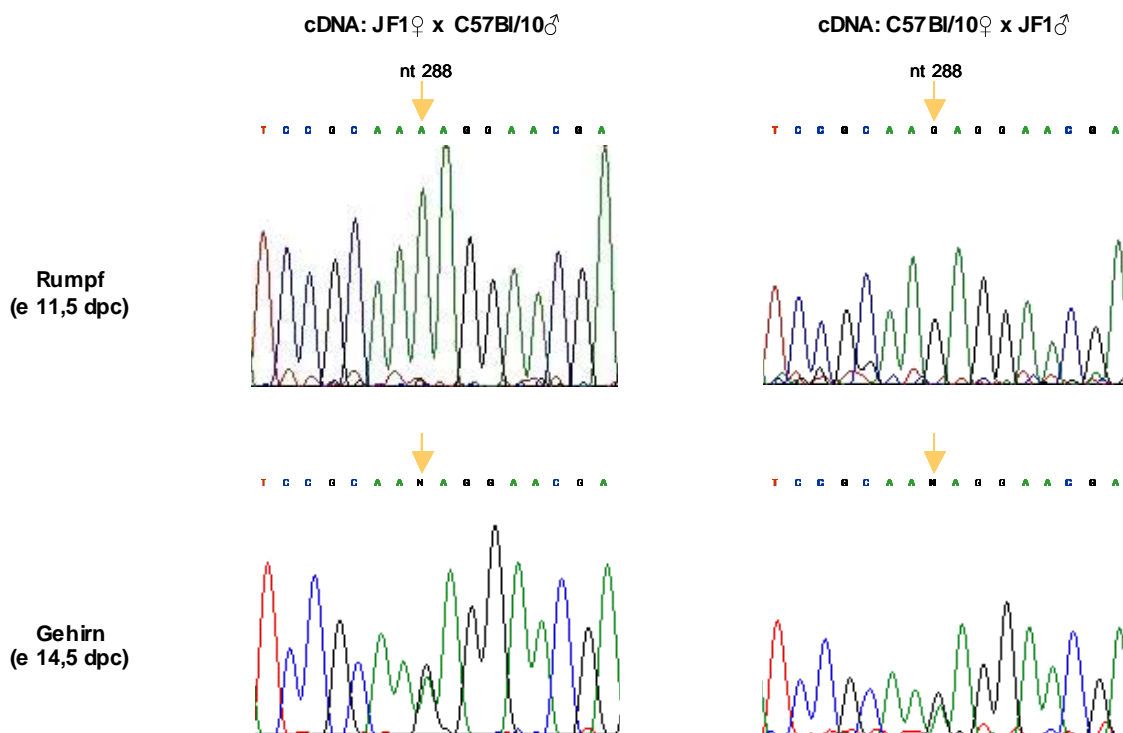
**Abbildung 3.23: Isoformen des *Ascl3*-Transkripts**

Es konnten drei Isoformen des *Ascl3*-Transkripts identifiziert werden. Die Isoformen I und III wurden ausschließlich in der Zunge gefunden, während Isoform II exklusiv in allen anderen *Ascl3*-exprimierenden Geweben detektiert werden konnte. Die translatierte Region in Exon 2 ist hell-, der untranslatierte Bereich dunkelrot dargestellt. Der hellblaue, 52 bp-große 5'-Abschnitt des Exons 1b wurde ausschließlich in Transkripten der Isoform II gefunden.

### 3.6.2 Untersuchung der allelspezifischen *Ascl3*-Expression

Zur Identifizierung von Unterschieden der Nukleotidabfolge der JF1- und der C57BL/10-DNA wurde die Sequenz des *Ascl3*-Gens für diese beiden Mausstämme ermittelt und verglichen. Es konnten fünf Einzelbasenpaar-Polymorphismen gefunden werden, von denen drei im translatierten Bereich (nt 132, 288, 507), einer im Stop-Kodon (nt 524) und einer in der 3'-UTR (nt 541) lagen. Die vier im Leserahmen, bzw. im Stop-Kodon gelegenen Polymorphismen befinden sich an „wobble“-Positionen, die nicht die Kodierung unterschiedlicher Proteine bewirken. Aufgrund der geringen Größe des *Ascl3*-Transkripts konnte bei der Untersuchung der allelspezifischen Expression ein cDNA-Abschnitt sequenziert werden, der alle fünf Polymorphismen enthielt und eine Unterscheidung der alternativen Spleißvarianten zuließ. So wurden je nach Gewebe alternative Primer aus den Exons 1a und 1b zur Amplifikation verwendet.

Um in der Zunge die Allelspezifität des aus den Exons 1a und 2 bestehenden Transkripts getrennt von der alle drei Exons enthaltenden Isoform untersuchen zu können, wurde die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und das kürzere, 614 bp-große Produkt aus dem Agarosegel eluiert. In 11,5 Tage alten Embryonen konnte eine monoallelische Expression des *Ascl3*-Transkripts beobachtet werden. Während im Kopf der Embryonen beide Kopien des Gens inaktiv waren, konnte im Rumpf und in den Extremitäten ausschließlich eine Expression des maternalen Allels nachgewiesen werden (**Abbildung 3.24** oben). Die Untersuchung der *Ascl3*-RNA der Gewebepräparationen des Rumpfes 14,5 und 17,5 Tage alter Embryonen zeigten eine biallelische Genexpression in Lunge, Magen, Darm, Pankreas und Milz. Auch in den untersuchten Organen des Kopfes (Gehirn, Augen) konnte in diesen Embryonalstadien die Expression beider Allele festgestellt werden (**Abbildung 3.24** unten).

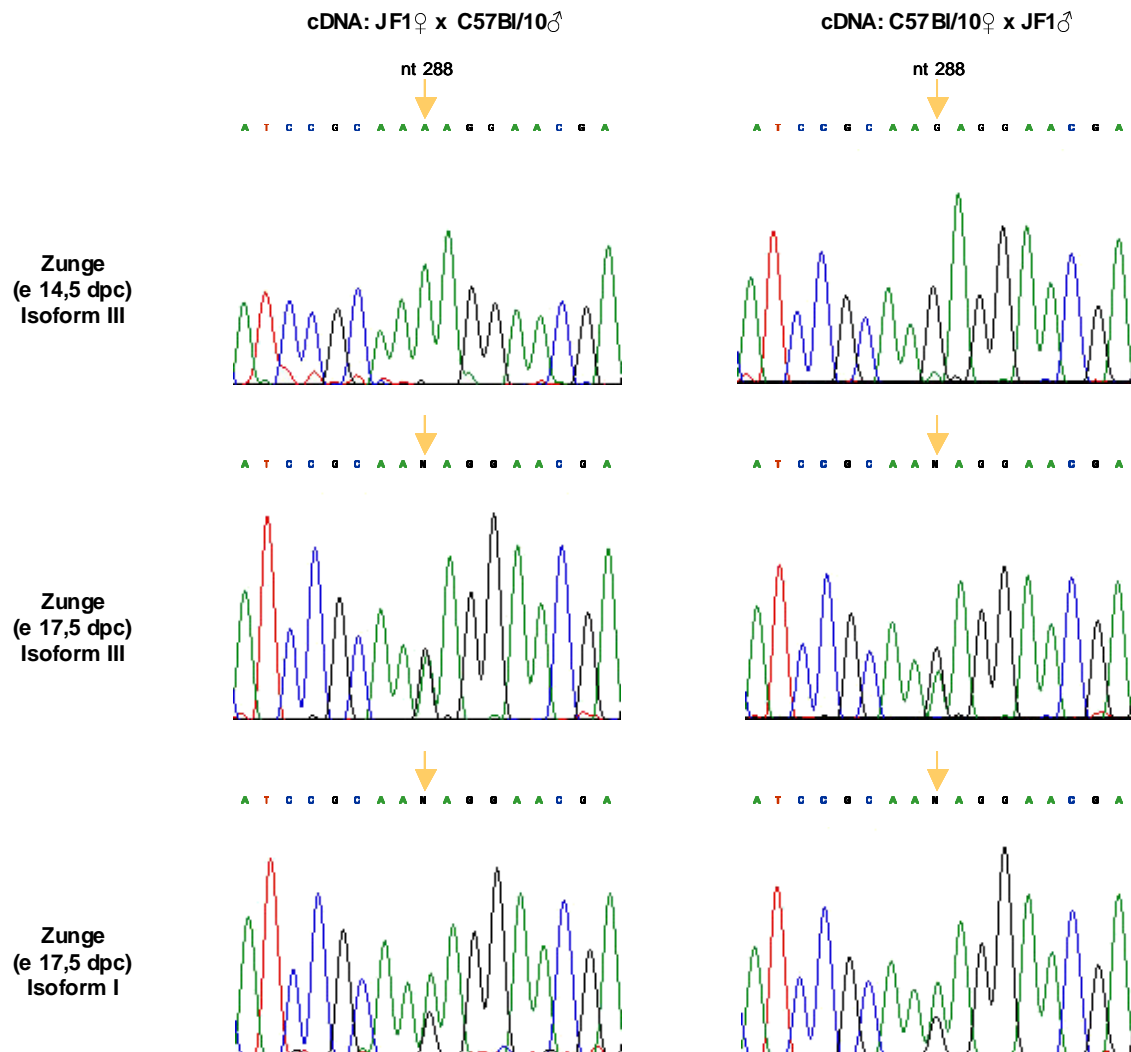


**Abbildung 3.24: Expression der *Ascl3*-Isoform II in der murinen Embryonalentwicklung**

Die Sequenzierung der Transkripte 11,5 Tage alter Embryonen reziproker Kreuzungen zeigte ausschließlich die charakteristische Basenabfolge des jeweils maternalen Mausstammes: ein Adenin an Position nt 288 für das JF1-Allel (oben links), bzw. ein Guanin für das C57Bl/10-Allel (oben rechts). Wie für das Gehirn 14,5 Tage alter Embryonen beispielhaft gezeigt (unten), konnten in allen späteren Stadien beide Allele nachgewiesen werden. (Abbildung nach (Keller, 2001))

In der Zunge wurde jedoch ein Unterschied der Expression der alternativen Spleißformen sichtbar: während *Ascl3-I* mindestens ab E 14,5 pc von beiden Allelen abgelesen wurde (**Abbildung 3.25** unten), konnte das paternale *Ascl3-III*-Transkript erst in der Zunge 17,5 Tage alter Embryonen identifiziert werden (**Abbildung 3.25** Mitte). Die Sequenzierung der cDNA-Produkte der Zunge 14,5 Tage alter Embryonen aus den beiden reziproken JF1-C57BL/10-Kreuzungen zeigte ausschließlich das jeweils maternale Allel (**Abbildung 3.25** oben).





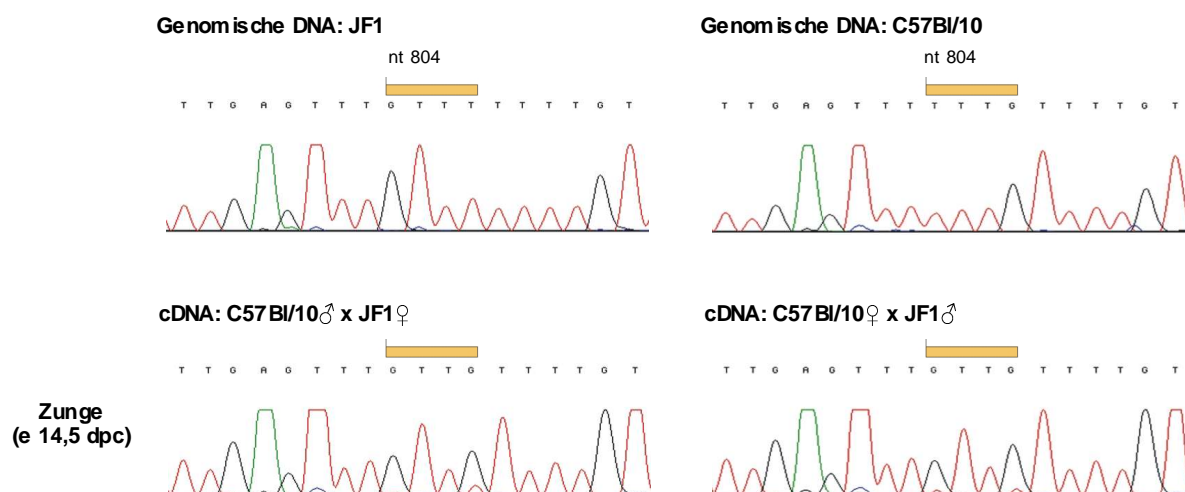
### Abbildung 3.25: Expression der *Ascl3*-Isoformen I und III in der Embryonalentwicklung

Die Allele der Isoform III konnten in der Entwicklung der Zunge zum Zeitpunkt e 14,5 dpc exklusiv in Abhängigkeit der elterlichen Herkunft nachgewiesen werden: die Elektropherogramme zeigten jeweils die maternalen Sequenzen (oben). Die Sequenzierungen der Transkripte dieser Isoform zu einem späteren Zeitpunkt (e 17,5 dpc, Mitte), sowie aller Transkripte der Isoform I (als Beispiel zum Zeitpunkt e 17,5 dpc, unten) zeigten eine Überlagerung beider Allele. (Abbildung nach (Keller, 2001))

## 3.7 Untersuchung der allelspezifischen Expression weiterer Gene

### 3.7.1 Imprintinguntersuchung des *Cd81*-Gens

Das murine *Cd81*-Gen („*cluster of differentiation 81*“), das auch als *Tapal* („*target of an antiproliferative antibody 1*“) bezeichnet wird, ist auf Chromosom 7F zwischen den Genen *Tssc4* und *Tssc6* lokalisiert. Es kodiert für ein Protein der Transmembran-4-Superfamilie, das zu einer Gruppe von Zelloberflächenmolekülen gehört, die häufig als Rezeptoren auf Leukozyten und anderen Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums exprimiert werden. *Cd81* wird auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen gefunden und ist mit den Zelloberflächenmolekülen *Cd19* und *Cd21* assoziiert. Zu Beginn der Arbeit war der Imprintingstatus dieses Gens noch unbekannt und sollte aufgrund seiner chromosomalen Lokalisation auf eine allelspezifische Expression untersucht werden. Es konnte eine die JF1- und C57BL/10-Allele unterscheidende 4bp-Inversion (oder doppelte Punktmutation) an Position nt 804-807 (GTTT/TTTG) im 3'-UTR des *Cd81*-Gens identifiziert werden. Die *Cd81*-RNA konnte in allen hier untersuchten embryonalen Geweben der Stadien 11,5/14,5/17,5 und allen postnatalen und adulten Geweben in cDNA umgeschrieben und amplifiziert werden. Die Sequenzierung der Amplifikate zeigte, dass die Expression immer gleichmäßig von beiden parental Allelen erfolgte (**Abbildung 3.26**) und daher, zumindest in den untersuchten Entwicklungsstadien, nicht durch genomisches Imprinting reguliert wird.

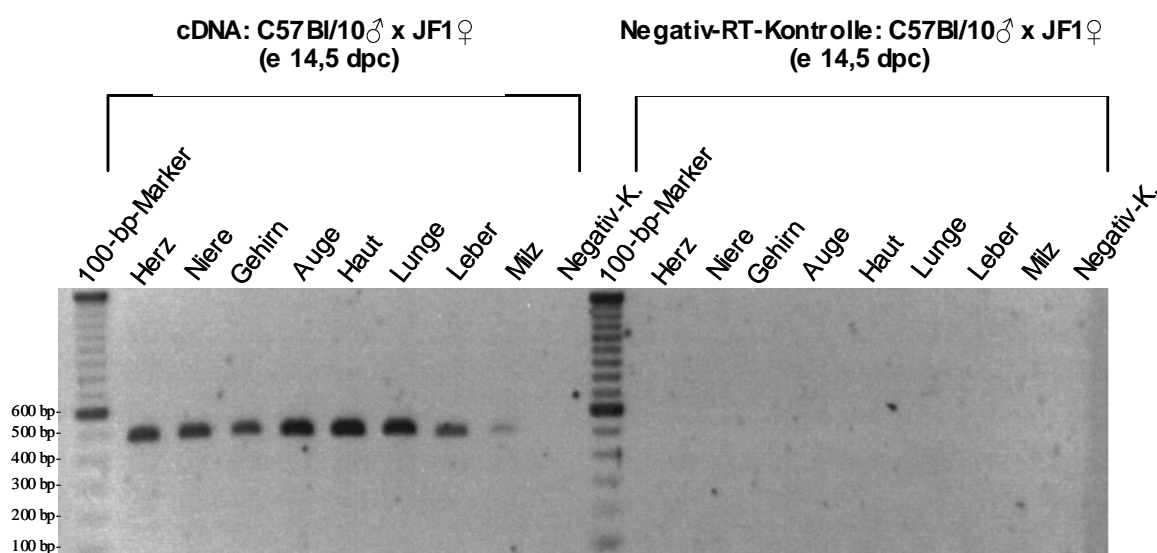


**Abbildung 3.26: Untersuchung der Expression der parental Allele des *Cd81*-Gens**

Die Position der die elterlichen Allele unterscheidenden vier Nukleotide an Position nt 804-807 ist durch den gelben Balken angegeben. Als repräsentatives Beispiel für die Allelverteilung der Transkripte dieses ubiquitär exprimierten Gens ist die Sequenzierung der cDNAs der Zunge 14,5 Tage alter Embryonen abgebildet (unten). (Abbildung nach (EBwein, 1999))

### 3.7.2 Imprintinguntersuchung des *Kcnq1ot1*-Gens

Das *Kcnq1ot1*-Gen wurde 1999 von Smilnich und Mitarbeitern als Antisense-Transkript des *Kcnq1*-Gens erstmalig beschrieben (Smilnich et al., 1999). Sie konnten zeigen, dass in den vier von ihnen untersuchten Geweben Herz, Lunge, Niere und Darm der 14,5 Tage alten Embryonen das maternale Allel inaktiv ist. In Absprache mit dieser, von Dr. Mike Higgins geleiteten Arbeitsgruppe, mit der eine langjährige Kooperation besteht, sollte das Imprinting des *Kcnq1ot1*-Gens anhand der hier beschriebenen cDNA-Sammlung weiter untersucht werden. Es konnte ein Ein-Basenpaar-Sequenzunterschied zwischen der JF1- (Cytosin) und C57BL/10-DNA (Thymin) identifiziert werden, der in einem 496 bp großen Fragment amplifiziert wurde. Da es sich bei *Kcnq1ot1* um ein intronloses Gen handelt, wurde für die Amplifikationen der cDNA aller Gewebe zusätzlich eine RT- Negativkontrolle mitgeführt, bei der die RNA nicht durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde (**Kapitel 2.5.4**) und ein PCR-Produkt daher die Amplifikation einer DNA-Kontamination aufzeigen würde. **Abbildung 3.27** zeigt die 496 bp-großen Banden, die sich nur bei Verwendung der revers transkribierten RNA produzieren ließen und liefert damit den eine solche Kontamination ausschließenden Nachweis der *Kcnq1ot1*-Expression in den aufgeführten Geweben der 14,5 Tage alten Embryonen. Dies konnte für alle Gewebe der untersuchten embryonalen, postnatalen und adulten Stadien reproduziert werden.

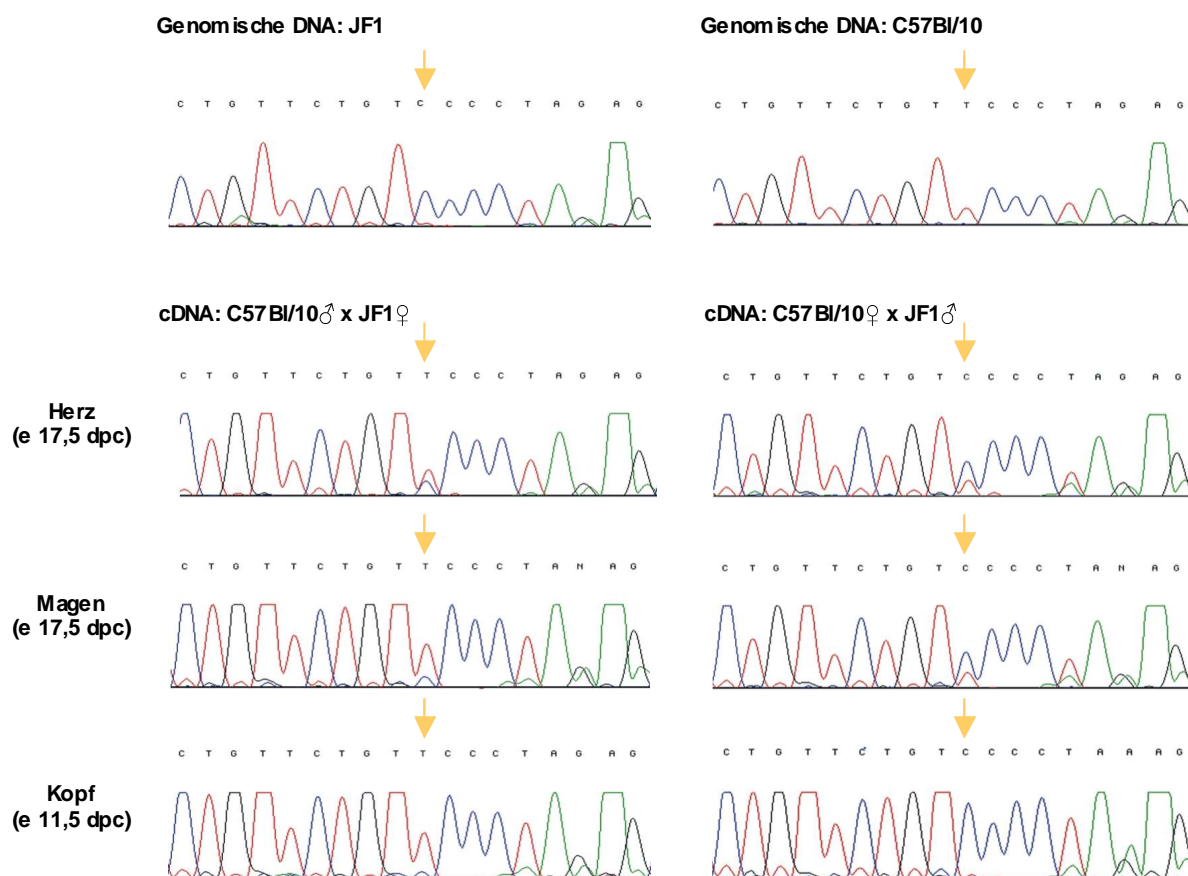


**Abbildung 3.27: Amplifikation der *Kcnq1ot1*-cDNA in Geweben 14,5 Tage alter Embryonen**

Die Amplifikationen der cDNAs aller untersuchter Gewebe (linke Hälfte) ergab im Gegensatz zur Amplifikation der Negativ-RT-Kontrollen der entsprechenden Gewebe (rechte Hälfte), bei denen keine RT-Reaktion durchgeführt wurde, ein 496 bp-großes Produkt. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

Die Sequenzierung der Amplifikate zeigte eine deutliche Repression des mütterlichen *Kcnqlot1*-Allels, die je nach verwendetem Gewebe unterschiedlich stark war. So konnte zum Beispiel für die cDNA des Herzens 17,5 Tage alter Embryonen nur eine leichte Dominanz des väterlichen Allels festgestellt werden, während im Kopf 11,5 Tage alter Embryonen die Inaktivierung des mütterlichen Allels fast vollständig ist (**Abbildung 3.28**).

Die Expression des *Kcnqlot1*-Gens kann daher als paternal allelspezifisch, mit gewebe- und stadienspezifisch unterschiedlich vollständiger Inaktivierung des mütterlichen Allels beschrieben werden.



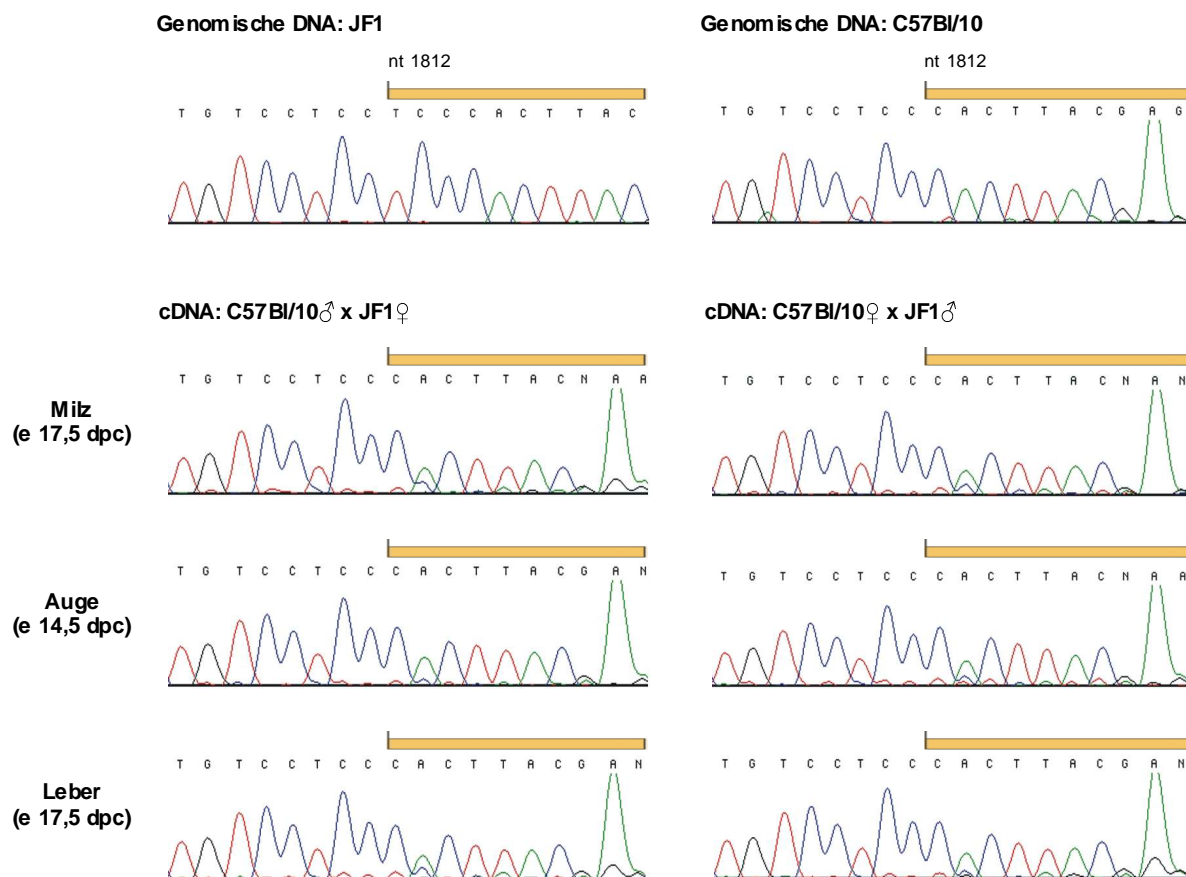
**Abbildung 3.28: Expression der Allele des *Kcnqlot1*-Gens**

Die Allele des *Kcnqlot1*-Gens der Mausstämmen JF1 und C57Bl/10 unterscheiden sich in der mit einem gelben Pfeil markierten Position durch den Basenaustausch Cytosin/Thymin. Die Sequenzen der Transkripte der reziproken Kreuzungen zeigten eine unterschiedlich starke Beteiligung der Allele in den untersuchten Geweben. Das väterliche Allel wies in allen cDNA-Sequenzierungen ein stärkeres Fluoreszenzsignal auf als das mütterliche, wobei der Unterschied z.B. im Herz 17,5 Tage alter Embryonen (2. Sequenzen von oben) nicht signifikant war, während z.B. im Kopf 11,5 Tage alter Embryonen (untere Sequenzen) fast ausschließlich ein väterliches Signal detektiert werden konnte. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

### 3.7.3 Imprintinguntersuchung des *Nap114*-Gens

Vom *Nap114*-Gen wird angenommen, dass es das erste nicht imprintete Gen ist, das distal auf die Gene des distalen Imprintingclusters des murinen Chromosoms 7 folgt (siehe syntäne Anordnung der humanen Gene in **Abbildung 1.1**). Dies wurde für neonatale und Gewebe 15,5 Tage alter Embryonen nachgewiesen (Paulsen et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde jedoch in der gleichen Arbeit bei Mäusen mit einer maternalen Disomie des distalen Chromosoms 7 eine leicht verstärkte Genexpression im Vergleich zu der des Wildtyps festgestellt. Eigene Arbeiten gaben ebenfalls Hinweise auf eine unterschiedliche Aktivität der beiden parental Genkopien des humanen *NAP114*-Gens. So zeigte es zum einen ein asynchrones Replikationsmuster in Lymphozyten (Enklaar, 1997) und zum anderen konnten für das humane orthologe Transkript weitere alternative Spleißformen identifiziert werden, die eine unterschiedliche Beteiligung der parental Allele an der Genexpression aufwiesen (Prawitt, persönliche Mitteilung). Daher sollte der Imprintingstatus des murinen *Nap114*-Gens mit Hilfe der umfangreichen RNA-Sammlung überprüft werden. Die Unterscheidung der alternativen Transkripte war hierbei jedoch nicht möglich, da Polymorphismen ausschließlich im 3'-UTR des Gens gefunden wurden, die mindestens 1811 Nukleotide vom Transkriptionsstart entfernt sind. Es handelt sich dabei um drei verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen und eine Insertion von drei Basenpaaren in der DNA der JF1-Mäuse im Vergleich zur C57BL/10-DNA. Die Sequenzierung der Amplifikate eines cDNA-Fragments der Nachkommen reziproker Kreuzungen beider Mausstämme zeigte jedoch jeweils eine starke Dominanz des C57BL/10-Allels, unabhängig davon ob es über die väterliche oder mütterliche Keimbahn weitergegeben wurde (**Abbildung 3.29**).

Um zu klären, ob stammspezifische Unterschiede in der Genexpression für dieses Ergebnis verantwortlich sind, wurden Kreuzungen sowohl von JF1- mit FVB/N-Mäusen, sowie von C57BL/10- Mäusen mit Tieren des Inzuchtstamms *Mus spretus* (SPRET/Ei) untersucht. Während die 3,5 Tage alten Nachkommen eines SPRET/Ei-Männchens und eines C57BL/10-Weibchens eine gleiche Expressionsstärke der elterlichen Allele zeigten, konnte für die reziproken Kreuzungen der Inzuchtstämme JF1 und FVB/N in postnatalen und adulten Nachkommen eine wesentlich schwächere Expression des JF1-Allels nachgewiesen werden, wiederum unabhängig von der parental Herkunft. Diese Daten sprechen für eine geringere Transkriptmenge des *Nap114*-Gens bei JF1-Mäusen im Vergleich zu der der anderen untersuchten Mausstämme.



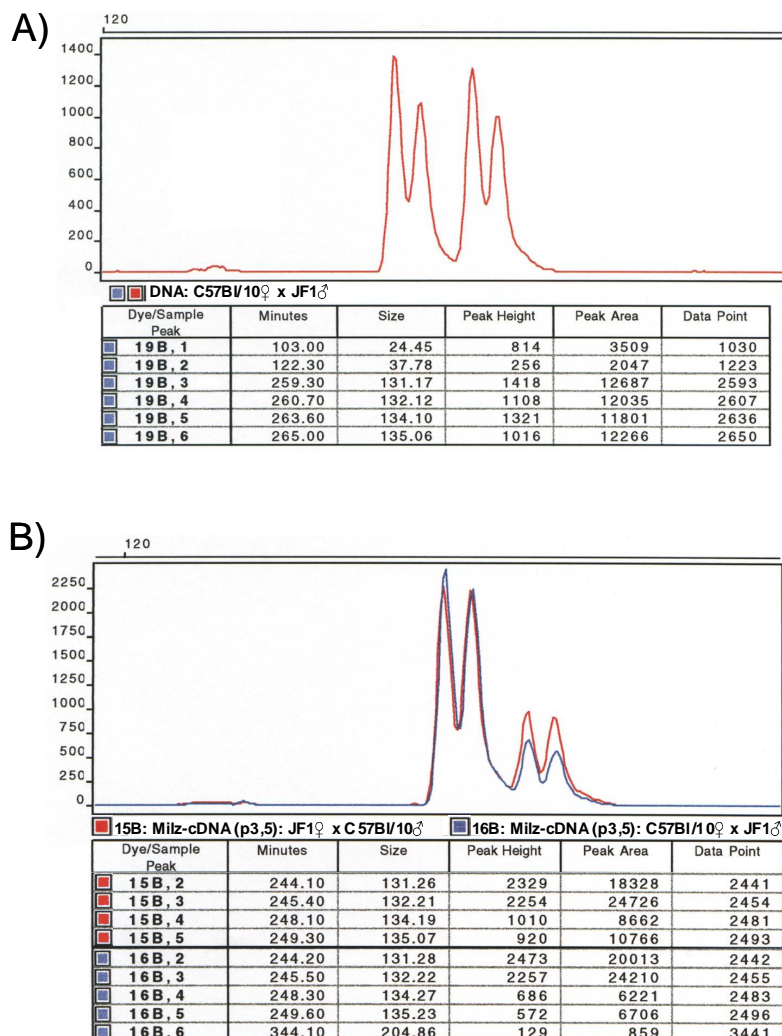
**Abbildung 3.29: Sequenzierung der cDNA-Amplifikate des *Nap114*-Gens**

Die *Nap114*-cDNA-Amplifikate der Mausstämmen JF1 und C57Bl/10 unterscheiden sich ab der Position nt 1812 (gelber Balken), da die JF1-Sequenz hier drei zusätzliche Nucleotide (Thymin-Cytosin-Cytosin) aufweist. Dadurch kommt es bei einer biallelischen Expression des Gens zu einer Überlagerung der Sequenzen ab dieser Position. Die C57Bl/10-Sequenz zeigte unabhängig von der elterlichen Herkunft stärkere Signale als die JF1-Sequenz. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

Um dieses Ergebnis in den einzelnen Geweben genauer zu quantifizieren und eventuelle Sequenzartefakte auszuschließen, sollte die Beteiligung der parental Allele an der *Nap114*-Expression, unter Ausnutzung des durch die Insertion entstandenen Längenunterschieds, mit Hilfe der GeneScan-Fragmentanalyse charakterisiert werden. Hierzu wurde das 131 bp bzw. 134 bp große Fragment mit einem FAM6-gekoppelten Primer amplifiziert und fluoreszenzmarkiert. **Abbildung 3.30** zeigt die Analyse der Auftrennung der beiden Fragmente mit Hilfe eines ABI 373-Sequenziergerätes. Die Amplifikate der genomischen DNA und der cDNA lassen sich entsprechend ihrer Größe als „Peaks“ im Elektropherogramm darstellen, deren Höhen und dadurch unter ihnen entstehenden unterschiedlich großen Flächen, die relativen Konzentrationen der Allele in der eingesetzten Probe angeben.

Der Unterschied in der Expressionsstärke des *Nap114*-Gens zwischen den beiden Mausstämmen, zugunsten des C57Bl/10-Allels, ist in fast allen Geweben sehr deutlich und es fällt

außerdem auf, dass diese Differenz beim Vergleich der reziproken Kreuzungen oft nicht gleich groß ist. In **Abbildung 3.30** beträgt diese Abweichung im Beispiel der Transkriptmengen der postnatalen Milz ca. 60 %.



**Abbildung 3.30: Darstellung der cDNA-Amplifikate der Milz des *Nap114*-Gens in der GeneScan-Analyse**

**A)** Der obere Teil der Abbildung zeigt die elektrographische Darstellung der Fragmentgrößen durch „Kurvenpeaks“, der untere die tabellarische Auflistung dieser Spitzenwerte: die ersten beiden Ausschläge (19B, 3+4) entstehen durch das C57Bl/10-, die folgenden beiden (19B, 5+6) durch das um drei Nukleotide größere JF1-Allel. Der jeweils zweite Spitzenwert (19B, 4+6) entspricht dabei den um ein Adenin-Nukleotid verlängerten PCR-Produkten. **B)** Die mit 15B, 2 und 15B, 3 bezeichneten „Peaks“ (rot) entsprechen der Expression des väterlichen C57Bl/10-Allels in der postnatalen Milz, die entsprechenden blauen „Peaks“ (16B, 2+3) der des mütterlichen C57Bl/10-Allels der reziproken Kreuzung. Die jeweiligen väterlichen und mütterlichen Maxima des JF1-Allels bei 134 und 135 bp (15B und 16B, 4+5) zeigen eine sehr viel geringere Fluoreszenzsignalintensität als die der C57Bl/10-Allele. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

In der **Tabelle T3.1** sind die relativen Mengenverhältnisse der beiden Allele in den wichtigsten untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien zusammengefasst. Zur Berechnung des Quotienten wurden die Flächen unter den „Peaks“ des C57Bl/10-Allels mit denen des JF1-

Allels dividiert (C57BL/10 : JF1). Die ermittelten Quotienten zeigen ein deutliches Übergewicht des C57BL/10-Allels, das in den meisten Geweben in 2 - 4-facher Menge des JF1-Allels vorlag. Die farblich hervorgehobenen Quotienten markieren eine besonders starke relative Expression des C57BL/10-Allels (rot), bzw. in vier Geweben (blau) eine nahezu gleich starke Expression der Allele. Es wurden, wenn möglich, in jedem Stadium Gewebe beider reziproker Kreuzungen untersucht, und es zeigte sich, dass in einigen Geweben die Werte der Quotienten einen erheblichen Unterschied aufwiesen, wie z.B. im Gehirn (e14,5 und postnatal), der Harnblase (e17,5), der Lunge (e17,5), dem Magen (e17,5) und der postnatalen Niere. Hier scheint zusätzlich zu den beobachteten stammspezifischen Faktoren die Herkunft der Allele vom Vater oder der Mutter eine Rolle zu spielen.

**Tabelle T3.2: Quotient der Expressionsstärken der parental *Nap114*-Allele in untersuchten Geweben**

Alle Expressionsstärken wurden als Quotient der Summe der von den beiden Peaks eingeschlossenen Flächen des C57Bl/10-Allels (C) mit der des JF1-Allels (JF) berechnet. Besonders geringe Quotienten, die weniger als die doppelte Menge des C57Bl/10- als des JF1-Transkripts beschrieben, sind blau gekennzeichnet, besonders große Quotienten mit einem mehr als vierfachen Überschuss des C57Bl/10-Allels sind rot dargestellt. (Tabelle nach (Eßwein, 1999))

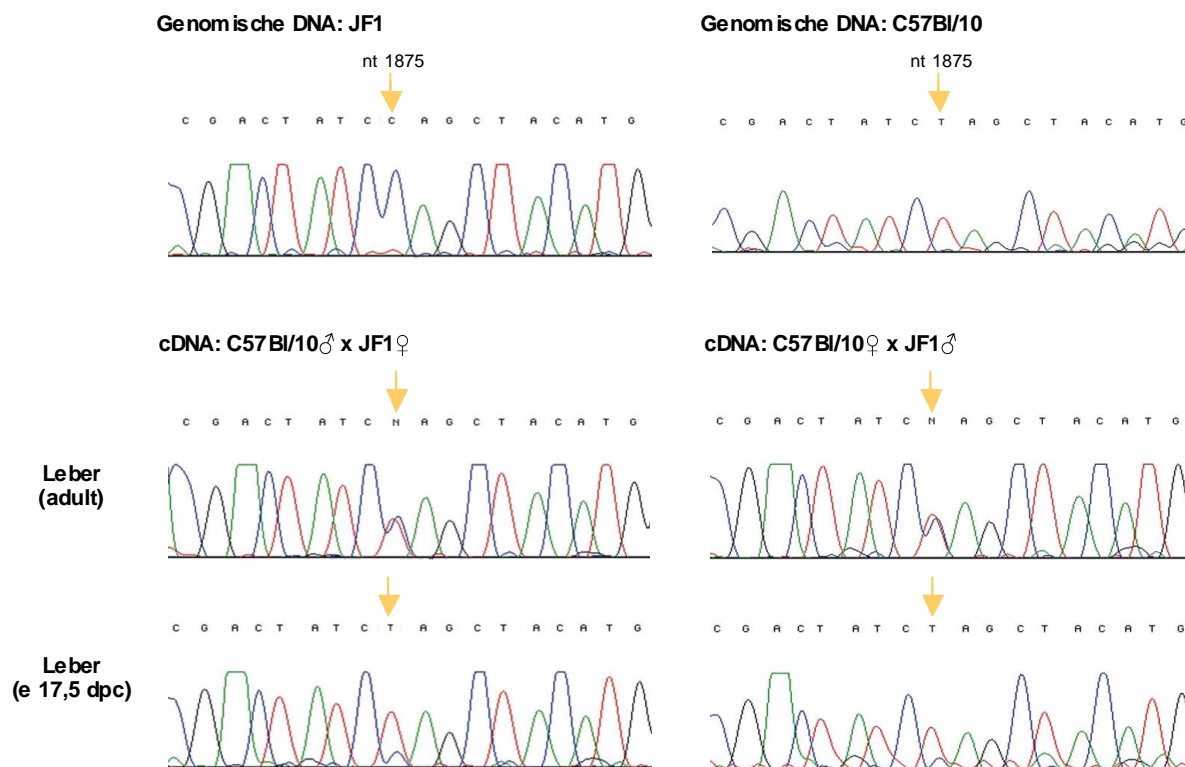
	e11,5		e14,5		e17,5		postnatal		adult	
	C♀:JF♂	C♂:JF♀	C♀:JF♂	C♂:JF♀	C♀:JF♂	C♂:JF♀	C♀:JF♂	C♂:JF♀	C♀:JF♂	C♂:JF♀
<b>Kopf</b>	4,2	3,4								
Auge			5,2	4,3	3,6	2,9	-	-	-	-
Gehirn			2,1	6,3	2,9	3,8	4,1	2,1	2,1	2,4
Zunge			5,2	4,2	-	-	-	-	-	-
<b>Rumpf</b>			2,4	2,3						
Darm			-	-	2,6	1,7	2,9	3,9	-	-
Harnblase			-	-	4,5	1,9	-	4,0	3,1	3,4
Herz			-	4,6	2,2	3,0	-	-	2,0	2,0
Leber			4,2	5,5	3,0	2,3	2,2	3,2	2,3	3,0
Lunge			4,8	4,7	5,4	2,9	2,5	3,2	2,5	2,6
Milz			-	-	2,9	1,0	3,4	2,1	2,3	2,6
Magen			-	-	5,7	1,0	-	3,8	-	-
Niere			-	4,5	2,4	2,3	5,5	2,3	-	-
<b>Extremitäten</b>	4,4	3,0								



### 3.7.4 Untersuchung der allelspezifischen Expression von nicht auf dem murinen Chromosom 7 lokalisierten Genen

In der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Marion Eßwein wurden eine Reihe weiterer Gene untersucht, die nicht auf dem murinen Chromosom 7 lokalisiert sind (Eßwein, 1999). Hierzu gehören Gene des distalen Abschnitts des murinen Chromosoms 11 (*Ikaros*, *Ddc*, *Adcy*, *Igfbp3*, *Pold2*, *Igfbp1* und *Glucokinase*) sowie Gene der „paired-box“-Genfamilie (*Pax*-Gene). Diese Gene stehen, soweit bekannt, nicht in Verbindung zu den orthologen Genen der BWS-kritischen Regionen des humanen Chromosoms 11p15, und sind daher nicht Gegenstand dieser Arbeit. An dieser Stelle soll jedoch die Imprintinguntersuchung des *Glucokinase*-Gens (*Gk*) beschrieben werden, da die Ergebnisse für die Diskussion der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Untersuchungsmethode einer allelspezifischen Genexpression von Bedeutung sind.

Das *Gk*-Gen liegt auf dem distalen Abschnitt des murinen Chromosoms 11, der eine syntäne Anordnung der Gene zum humanen Chromosom 7p11-13 zeigt. Diese Region des Menschen ist mit dem Silver-Russel Syndrom gekoppelt (Jerome et al., 1997), und kann eine maternale UPD dieser Region aufweisen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren neun murine Gene in diesem Bereich bekannt. Die Expression des *Grb10*-Gens findet allelspezifisch vom maternalen Chromosom statt (Miyoshi et al., 1998). Für das *Egfr*-Gen war eine biallelische Expression in Gesamtembryonen und eine ebenfalls biallelische Expression des humanen orthologen Gens festgestellt worden (Wakeling et al., 1998). Von den anderen Genen war nicht bekannt, ob ihre Expression einer genomischen Prägung unterliegt. Das vom *Glucokinase*-Gen kodierte Enzym ist für die Phosphorylierung der Glucose in der Glycolyse zuständig. Das *Gk*-Transkript wird in leber- und  $\beta$ -zellspezifischen Spleißvarianten gefunden. Während die Expression des Gens in der adulten Maus auf diese beiden Gewebe beschränkt ist, konnten in den embryonalen Stadien eine Transkription in nahezu allen untersuchten Geweben festgestellt werden (Eßwein, 1999). Neben mehreren Einzelnukleotidsubstitutionen in der 3'-UTR wurde eine 1 bp-Insertion im JF1-Allel des *Gk*-Gens identifiziert. **Abbildung 3.31** zeigt die Untersuchung der C/T-Basensubstitution an Nukleotidposition 1875.



### Abbildung 3.31: Expression des *Glucokinase*-Gens in der Leber

Die Untersuchung der leberspezifischen *Glucokinase*-Transkripte mit Hilfe des SNPs an Nukleotidposition 1875 (gelber Pfeil), zeigte eine biallelische Expression mit einer stammspezifischen Dominanz des C57Bl/10-Allels (Thymin) in der spätembryonalen Leber. (Abbildung nach (Eßwein, 1999))

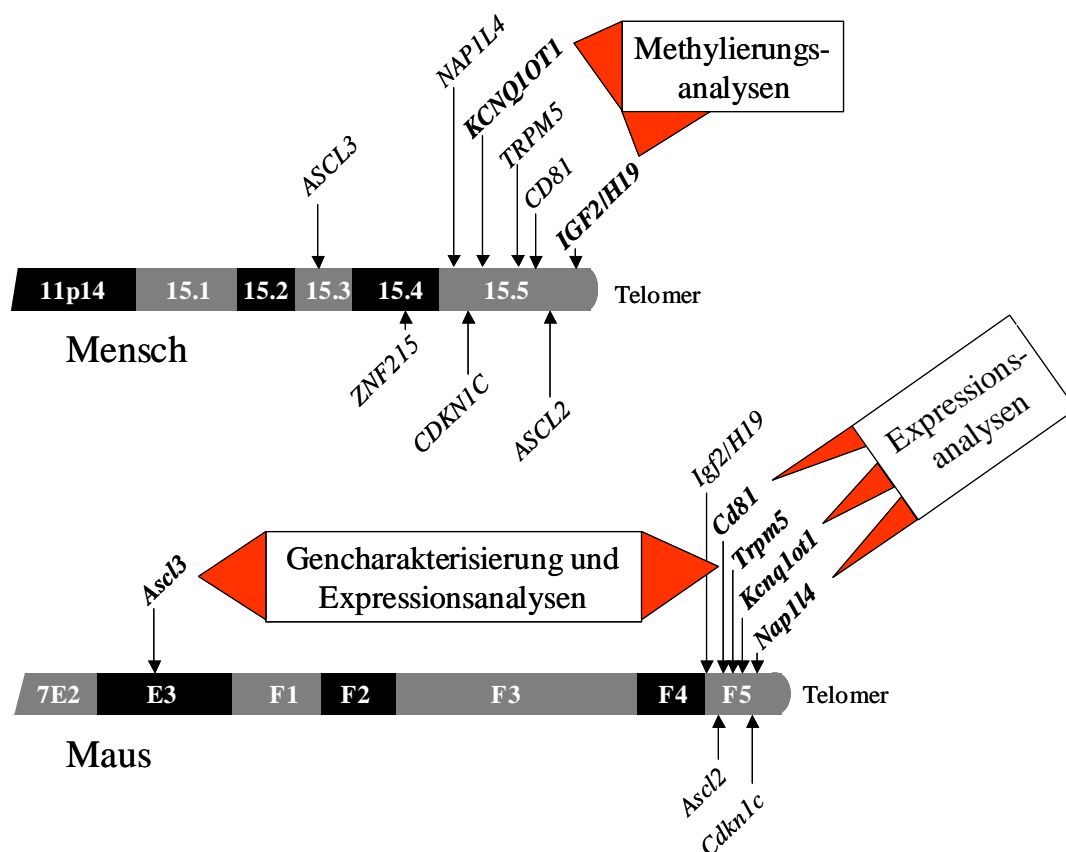
Es konnte eine biallelische Expression in allen Geweben festgestellt werden, bei der vor allem in der spätembryonalen und postnatalen Leber eine deutlich stammspezifisch überwiegende Expression des C57Bl/10-Allels gefunden wurde. Dieses Ergebnis konnte durch Sequenzierung der weiteren drei Polymorphismen im 3'-UTR des *Gk*-Transkripts (Basensubstitutionen an den Positionen nt 1875, nt 1906 und nt 2084, ohne Abbildung) bestätigt werden.

## 4. Diskussion

Genomisches Imprinting ist ein epigenetischer Mechanismus, der in einer allelspezifischen Inaktivierung einer der beiden elterlichen Genkopien resultiert. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung der Allele muss bereits in der elterlichen Keimbahn geschaffen werden, in der eine spezifische epigenetische Modifizierung, bei der die CpG-Methylierung eine wichtige Rolle spielt, stattfindet (Li et al., 1993). Für die meisten imprinteten Gene konnte in unmittelbarer Nähe eine differentiell methylierte Region (DMR) identifiziert werden. Häufig geht die Methylierung der DMR mit der Inaktivierung der assoziierten Genkopie einher, aber bei einer Reihe von Genen ist im Gegenteil das aktive elterliche Allel methyliert (Constancia et al., 1998). Eine allelspezifische Methylierung kann in der Promotorregion von Genen lokalisiert sein und dort einen direkten Einfluss auf die Genexpression haben, indem z.B. die Affinität der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA durch deren Methylierung stark vermindert wird, oder eine Bindung von inhibitorischen oder aktivierenden Proteinen, die eine methylierte Zielsequenz benötigen, ermöglicht wird. Es können auch andere Regionen in der Umgebung imprinteter Gene allelspezifisch methyliert sein und indirekt die Expression der benachbarten Gene beeinflussen. In einem Imprintingcluster, in dem mehrere allelspezifisch exprimierte Gene liegen, die einer gemeinsamen Regulation unterliegen, kann die differentielle Methylierung einer Imprinting-Kontrollregion („*imprinting control region*“, ICR) in der gleichzeitigen Aktivierung und Reprimierung der Expression der benachbarten Gene resultieren. In der Chromosomenregion 11p15.5 des Menschen sind zwei Cluster allelspezifisch aktiver Gene lokalisiert (**Abbildung 1.1**), deren fehlerhaftes Imprinting mit dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die allelspezifische Methylierung zweier regulativer DNA-Abschnitte bei BWS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen untersucht. Dies waren erstens die Promotorregion eines der Gene des distalen der beiden 11p15.5-Imprintingcluster, des *H19*-Gens, und zweitens eines Teils der Imprinting-Kontrollregion dieses Clusters, der *H19/IGF2*-Insulatorregion. Die Ergebnisse der Untersuchung der *H19*-Promotorregion werden im ersten, die der *H19/IGF2*-Insulatorregion im zweiten Teil dieses Kapitels diskutiert.

In der chromosomalen Region 11p15 und dem orthologen murinen Abschnitt auf Chromosom 7E/F wurden im Rahmen dieser Arbeit, sowie von Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe oder in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen eine Reihe neuer Gene identifiziert und charakterisiert. Aufgrund ihrer Lokalisation in dieser Region mit einer auffälligen Akkumulation imprinteter Gene, ist eine Untersuchung der allelspezifischen Genexpression

sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die eine detaillierte Analyse der Genexpression im Hinblick auf die elterliche Herkunft der Transkripte im murinen Organismus ermöglicht. Nicht alle Gene, die einem genomischen Imprinting unterliegen, werden in allen Organen monoallelisch exprimiert, sondern können eine gewebespezifische Relaxierung der allelischen Inaktivierung zeigen. Da außerdem die Inaktivierung eines Allels während der Entwicklung nachlassen, oder es nach anfänglich biallelischer Expression erst zu einem späten Abschalten eines Allels kommen kann, wurde die Imprintinguntersuchung der neu identifizierten Gene gewebespezifisch und zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt. Die Ergebnisse der Identifizierung und Charakterisierung des murinen *Trpm5*-Gens, einschließlich der Untersuchung einer potentiellen allelspezifischen Expression, und der Imprintinganalysen weiterer Gene der chromosomalen Region 11p15.5 werden in den **Kapiteln 4.3** und **4.4** besprochen. Im fünften Abschnitt dieses Kapitels wird die Untersuchung des neu identifizierten, isoform- gewebe- und entwicklungsabhängig imprinteten *Ascl3*-Gens diskutiert.



**Abbildung 4.1: Lokalisationen der untersuchten orthologen humanen und murinen Gene**

Die Größe der Banden und die Entfernungen zwischen den Genen sind nur angedeutet und entsprechen nicht den exakten Werten. Untersuchte Gene sind in der jeweiligen Spezies fett hervorgehoben.

## 4.1 Untersuchung der Methylierung der Promotorregion des *H19*-Gens

Die Expression der Mehrzahl der Gene des humanen Chromosoms 11p15.5 erfolgt präferentiell oder ausschließlich von einem der beiden elterlichen Allele. Im distalen Abschnitt dieser Region sind dies vor allem die Gene *H19* und *IGF2*, die einem reziproken Imprinting bei stark überlappendem Expressionsmuster unterliegen. Eventuell kann das proximal folgende Insulin-Gen (*INS*), für das es Hinweise auf eine gewebespezifische Inaktivierung des maternalen Allels gibt (Moore et al., 2001), diesem Cluster hinzugerechnet werden. Von diesem Abschnitt durch eine Gruppe biallelisch aktiver Gene getrennt, folgt ein zweites Cluster mit den maternal aktiven Genen *KCNQ1*, *KCNQ1DN*, *CDKN1C*, *SLC22A1L* und *IPL* und dem ausschließlich paternal abgelesenen Antisense-Transkript von *KCNQ1* (*KCNQ1OT1*) (siehe auch **Abbildung 1.1**). Während in diesem proximalen Imprintingcluster eine allelspezifisch methylierte Region im Promotorbereich des *KCNQ1OT1*-Gens identifiziert werden konnte (Smilnich et al., 1999), für die postuliert wird, dass sie als Imprintingzentrum („*imprinting center*“, IC) die Expression der Gene dieser Region reguliert (Cleary et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2002; Horike et al., 2000), konnten im distalen Cluster drei Regionen differentieller Methylierung beschrieben werden: eine im Promotorbereich des *H19*-Gens (Zhang et al., 1993), eine zweite in einer repetitiven Region im 5'-Bereich des *H19*-Gens (Frevel et al., 1999a; Jinno et al., 1996) und eine dritte Region in Intron zwei des *IGF2*-Gens (Cui et al., 2002). Die Promotorregion des *H19*-Gens wurde zunächst ausschließlich mit Hilfe von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen untersucht (Zhang et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die dort gelegenen HpaII- und SmaI-Schnittstellen in Wilmstumoren (Moulton et al., 1994; Steenman et al., 1994) und BWS-Patienten (Reik et al., 1994; Reik et al., 1995) stärker methyliert sein können als in den untersuchten Kontrollgeweben. 1999 veröffentlichten Frevel und Mitarbeiter erstmals Ergebnisse einer Untersuchung der Methylierung der ersten zwölf dem Transkriptionsstart des *H19*-Gens benachbarten CpGs mittels Einzelklonsequenzierung von Amplifikaten bisulfitmodifizierter DNA von Wilmstumoren mit und ohne *IGF2*-LOI („*loss of imprinting*“) und der korrespondierenden Nierengewebe. Es zeigte sich, dass die CpGs dieser Region ein sehr variables Methylierungsmuster aufwiesen, das teilweise unabhängig von der elterlichen Herkunft war. Obwohl der Anteil methylierter CpGs der paternalen Allele deutlich größer als der der maternalen Allele war, konnte für keine Position eine einheitliche Methylierung aller untersuchter Einzelklone festgestellt werden und es wurde gefolgert, dass diese Region nicht geeignet für eine Untersuchung einer potentiell pathologischen Methylierung in

Wilmstumoren und BWS-Patienten sei (Frevel et al., 1999b). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den mit Hilfe der methylierungssensitiven Restriktionsenzyme beschriebenen Befunden. Dennoch wurde die Promotorregion bis zur Fertigstellung dieser Arbeit weiterhin durch Bestimmung der Methylierung des CpGs der SmaI-Schnittstelle an Position -15 vor dem *H19*-Transkriptionsstart untersucht (Blick et al., 2001; DeBaun et al., 2002; Gaston et al., 2001; Li et al., 2001; Weksberg et al., 2001).

Da die Methylierung der Promotorregion für die Expression des *H19*-Gens eine wichtige epigenetische Modifikation darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Methylierungsstatus der CpGs eines 326 bp großen Abschnitts dieser Region der DNA aus Lymphozyten von BWS-Patienten und Kontrollpersonen mit Hilfe der Bisulfit-Einzelklon-Sequenzierungstechnik überprüft. Ähnlich den von Frevel und Mitarbeitern für Wilmstumore ohne Verlust des *IGF2*-Imprintings und der Kontrollnieren beschriebenen Befunden, konnte sowohl für die DNAs der Kontrolllymphozyten, wie auch der BWS-Patienten ein sehr variables Methylierungsmuster festgestellt werden (siehe **Abbildungen 3.2-3.5**). Keine der zwölf untersuchten Cytosinbasen ist zu 100% allelspezifisch methyliert. Das Verhältnis methylierter CpGs (<sup>m</sup>CpGs) zu unmethylierten CpGs ist für die paternalen Allele fast immer größer eins, während es für die maternalen Allele mit Ausnahme einer Position bei einer Kontrollperson kleiner eins ist. Vergleicht man unabhängig von der elterlichen Herkunft den Anteil methylierter CpGs, so variieren die Werte je nach Position zwischen 34% und 68%, liegen aber häufig nahe an 50%. Da die Identifizierung der parentalen Herkunft der Einzelklone mit Hilfe eines Einzelnukleotidpolymorphismus („*single nucleotide polymorphism*“, SNP) innerhalb der amplifizierten Region möglich war, konnte diese Verteilung auf eine an den einzelnen Positionen unterschiedliche, individuenspezifisch variierende Beteiligung der Allele zurückgeführt werden. So kann der Anteil des väterlichen Allels an den methylierten CpGs und der Anteil des maternalen Allels an den unmethylierten CpGs über 90% betragen, wie z.B. das methylierte Allel im CpG 1 der DNA 1073-00 (93% paternal), oder methylierte und unmethylierte CpGs sind fast zur Hälfte paternaler und maternaler Herkunft wie z.B. jeweils 52% im CpG 10 der DNA 1073-00 (siehe **Abbildung 3.3 B**). CpG 11 in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym SmaI lag bei den Kontrollpersonen in durchschnittlich 34 von 100 Einzelklonen methyliert vor. Da bis zu ca. 40% (DNA 1073-00) der an dieser Stelle methylierten Einzelklone zudem maternaler Herkunft waren, kann man auch hier nicht von einer spezifischen Methylierung des väterlichen Allels sprechen. Vergleicht man die Methylierung der unterschiedlichen CpGs eines Einzelklons, offenbart sich eine zusätzliche Variabilität: viele sowohl maternale, wie

auch paternale Einzelklone zeigen ein Gemisch methylierter und unmethylierter CpGs, wobei die Abfolge der Methylierungen der einzelnen Positionen in den Einzelklonen einer DNA ebenfalls hochvariabel sein kann (**Abbildung 3.2**).

Zusammenfassend kann die Methylierung der Promotorregion des *H19*-Gens bereits bei den untersuchten Kontrollpersonen als sehr heterogen und nur tendenziell allelspezifisch beschrieben werden. Daher erscheint eine Untersuchung von BWS-Patienten wenig sinnvoll, um eine Imprintingstörung, die mit der Pathogenese ursächlich zusammenhängt zu identifizieren. Aufgrund der verbreiteten Verwendung der mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktionsenzyme ermittelten Daten bei der molekulargenetischen Einordnung von BWS-Patienten (siehe **Tabelle T1.1**), wurde die Methylierung der *H19*-Promotorregion dennoch auch an BWS-DNAs untersucht.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war dem der Kontrollpersonen sehr ähnlich, da die BWS-DNAs ebenfalls einen hohen Anteil unmethylierter CpGs auf dem väterlichen Allel und methylierter CpGs auf dem mütterlichen Allel aufwiesen. Es konnten nur geringfügige Unterschiede zwischen dem Methylierungsmuster der *H19*-Promotorregion von BWS-Patienten und Kontrollpersonen festgestellt werden. **Abbildung 3.5** zeigt für Patient 427-99 die, verglichen mit Kontrollpersonen, größte gefundene Abweichung der prozentualen Verteilung methylierter und unmethylierter Allele. Die CpGs 8 und 11, die beide Schnittstellen methylierungssensitiver Restriktionsenzyme (HpaII und SmaI) sind, wiesen eine starke Hypomethylierung des paternalen Allels auf. Da für die *H19*-Promotorregion als epigenetischer Defekt jedoch ausschließlich Hypermethylierungen beschrieben worden sind (siehe **Tabelle T1.1**), handelt es sich hierbei vermutlich um eine zufällige extremere Verteilung der Methylierung, die keine epigenetische Mutation darstellt. Für eine genaue Charakterisierung der Methylierung der Promotorregion des *H19*-Gens ist die Untersuchung einer großen Gruppe von Kontroll-DNAs, und eventuell auch der von BWS-Patienten notwendig. Aufgrund der Widersprüche der Befunde, die mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktionsenzyme und durch die Sequenzierung von Einzelklonen bisulfitbehandelter DNA für die Methylierung dieser Region erhalten wurden, ist es außerdem notwendig, die Ergebnisse mit beiden Methoden zu überprüfen, wie dies zum Teil von Frevel und Mitarbeitern für Wilmstumore und Nierengewebe durchgeführt wurde (Frevel et al., 1999a).

Die Befunde der hier durchgeführten Untersuchung weisen darauf hin, dass ähnlich wie in der Niere auch in Lymphozyten die Methylierung der *H19*-Promotorregion nicht, oder nur in sehr geringem Maße allelspezifisch ist. Der Mechanismus der epigenetischen Inaktivierung des

---

paternalen *H19*-Allels scheint entweder die Methylierung der Promotorregion nicht einzubeziehen, oder aber dort nur in bestimmten Geweben und/oder in bestimmten Stadien der Entwicklung nachweisbar zu sein. Es wäre auch vorstellbar, dass eine Methylierung des paternalen Allels eines bestimmten Abschnitts der Promotorregion, wie z.B. der ersten CpGs des amplifizierten Fragments, wenn sie, im Gegensatz zu der des maternalen Allels, einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, zu einer anderen, die Repression manifestierenden Modifikation dieser Region führen könnte, wie z.B. der Rekrutierung von die Transkription inhibierenden Komplexen. Auf der Ebene der DNA-Methylierung allein lassen sich die elterlichen Allele jedoch nur schwer unterscheiden, und eine Interpretation potentieller Veränderungen des Methylierungsmusters bei BWS-Patienten hinsichtlich eines relaxierten Imprintings des *H19*-Gens erscheint unmöglich. Daher wurde der Schwerpunkt der Methylierungsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit, die auf die Identifikation eines defekten Imprintings bei BWS-Patienten abzielt, auf die Analyse der differentiell methylierten *H19*-Repeatregion gelegt.



## 4.2 Untersuchung der allelspezifischen Methylierung des B1/A1-Repeats in der *H19-IGF2*-Insulatorregion

Bereits 1996 beschrieben Jinno und Mitarbeiter die allelspezifische Methylierung einer 2,0 bis 3,4 kb vor dem *H19*-Transkriptionsstart gelegenen Region, die aus der 3,5-fachen direkten Wiederholung einer 400 bp langen Sequenz besteht, indem sie eine Hybridisierung des Southern-Blots der Restriktion von DNA aus u.a. Spermien, Lymphozyten, Plazenta und fetaler Leber mit den methylierungssensitiven Enzymen HpaII und HhaI durchführten (Jinno et al., 1996). Sie konnten jedoch weder Bindestellen bekannter Transkriptionsfaktoren identifizieren, noch eine evolutive Konservierung dieser Sequenz auf dem orthologen distalen murinen Chromosom 7 finden. In der murinen *H19*-5'-Region stellten 1998 Hark und Tilghman eine epigenetische Markierung des maternalen Allels in Form allelspezifischer DNaseI-Hypersensitivität fest (Hark und Tilghman, 1998). Frevel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine dieser hypersensitiven Stellen ein 42 bp großes Element enthält, das in Maus, Mensch und Ratte eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweist (Frevel et al., 1999a). Sie stellten fest, dass 5' der beschriebenen 3,5 Kopien des 400 bp-Repeats (B1-B4) weitere 2,5 Wiederholungen dieser Sequenz (B5-B7) existieren, 3' flankiert von jeweils einem 450 bp-Repeat (A1, A2) und dass das konservierte 42 bp-Element in sechs der sieben B-Repeats vorhanden ist (siehe **Abbildung 1.3**). Die Vermutung, dass es sich dabei um eine Erkennungssequenz eines DNA-bindenden Proteins handeln könnte, wurde schließlich von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt und das dort bindende Protein als CTCF (CCCTC bindender Faktor) identifiziert (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000). Die methylierungssensitive Bindung des sich aus elf Zinkfingern zusammensetzenden CTCF-Proteins bewirkt auf dem maternalen Chromosom die funktionelle Trennung der *IGF2*-Promotoren von den telomerwärts des *H19*-Gens gelegenen Enhancern und damit die Inaktivierung des maternalen *IGF2*-Allels (Hark et al., 2000). Damit kommt der Methylierung der CTS („CTCF target sequence“) der *H19*-Repeat-Region eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Genexpression in der distalen Imprintingdomäne zu. Eine fehlerhafte Methylierung ist ein wahrscheinlicher epigenetischer Defekt, der zur Fehlregulation der betroffenen Gene in Tumoren und Erkrankungen, für die Imprintingmutationen dieser Region bekannt sind, führen könnte. Dies konnte für Wilmstumore (Frevel et al., 1999b), Osteosarkome (Ulaner et al., 2003), Kolorektal- (Cui et al., 2002; Nakagawa et al., 2001) und Blasenkarzinome (Takai et al., 2001) nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung der CTS des B1-Repeats in BWS-Patienten durchgeführt. Nach Amplifikation eines 406 bp großen Fragments bisulfitmodifizierter DNA der Lymphozyten von BWS-Patienten und Klonierung des Produkts in *E. coli*, konnte die Methylierung von 20 CpGs des B1-Repeats und sieben CpGs des A1-Repeats durch Sequenzierung der erhaltenen Einzelklone geprüft werden.

#### 4.2.1 Identifikation der parentalen Allele

Die elterlichen Allele wurden anhand von bis zu fünf Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) unterschieden und so getrennt auf ihre Methylierung untersucht. Von den 57 auf einen Polymorphismus getesteten Patienten waren 35 in mindestens einer Position heterozygot und bei 33 Patienten konnte die parentale Herkunft der beiden Allele eindeutig zugeordnet werden.

Bei der Amplifikation eines DNA-Abschnitts besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass während der PCR entstandene Fragmente sich an die komplementäre Sequenz anlagern und so während der Anlagerungsphase selbst als Primer fungieren. Hierdurch können PCR-Amplifikate entstehen, die sich aus einem Teil maternaler und einem Teil paternaler Sequenz zusammensetzen. Dieses Problem könnte bei der Untersuchung von Einzelklonen, die auf ein einzelnes einligiertes PCR-Amplifikat zurückgehen, zu einer Fehlinterpretation des Methylierungsmusters führen, wenn ein solcher Vorfall nicht mit Hilfe zweier ausreichend entfernt voneinander liegender SNPs aufgedeckt werden kann. Aufgrund der hohen Polymorphisdichte in der A1-B1-Region konnte die Häufigkeit der Entstehung von derartigen PCR-Artefakten in 23 Patienten untersucht werden. Im Gegensatz zu Berichten anderer Arbeitsgruppen (Buiting, pers. Mitteilung) wies jedoch im Mittel nur ein von durchschnittlich 21 Einzelklonen pro Allel solch eine artifizielle Amplifikation auf, so dass auch in den Patienten, in denen nur ein einzelner informativer Polymorphismus zur Verfügung stand, eine Auswertung der allelspezifischen Methylierung möglich war.

#### 4.2.2 Variable Methylierung des A1-Repeats

Die in der vorliegenden Arbeit amplifizierten DNA-Fragmente enthalten 27 CpGs, von denen sich 20 im B1-Repeat und sieben im A1-Repeat befinden (**Abbildung 3.6**). Die CpGs des A1-Repeats zeigten nur teilweise eine ihrer parentalen Herkunft entsprechende Methylierung. Während in einigen DNAs von Kontrollpersonen und BWS-Patienten, bei einer ansonsten

sehr allelspezifischen Methylierung der anderen Cytosine des A1-Repeats, einzelne CpGs beider Allele in allen Einzelklonen umgewandelt vorlagen (z.B. CpG 21 und CpG 26 bei der Kontroll-DNA 922-00, **Abbildung 3.7**), zeigten andere DNAs ein sehr heterogenes Methylierungsmuster nahezu aller A1-CpG-Dinukleotide (wie z.B. bei der DNA des BWS-Patienten 539-99, **Abbildung 3.9a**). Die Methylierung des A1-Repeats schien dabei in den meisten Fällen unabhängig von der des B1-Repeats zu sein, da auch bei den Patienten, bei denen eine Hypomethylierung des paternalen Allels im B1-Repeat gefunden wurde, die CpGs der Einzelklone beider Allele im A1-Repeat sowohl methyliert wie auch unmethyliert vorlagen (**Abbildungen 3.8a-c**).

Ein ähnlicher Befund wird auch von Frevel und Mitarbeitern für die Methylierung dieser Region in der Niere beschrieben: Die Einzelklone vor allem der maternalen Allele zeigten mit einer Ausnahme in Wilmstumoren ohne *IGF2-LOI* und gesunden Nieren immer auch eine Hypermethylierung der CpGs des A1-Repeats. Die paternalen Allele waren dagegen in den A1-CpGs nur vereinzelt hypomethyliert. Teilweise lässt sich dies auf die Vorauswahl der amplifizierten Einzelklone zurückführen, die durch die Restriktion der untersuchten DNAs mit HpaII vor der Bisulfitbehandlung vorgenommen wurde. CpG 23 ist Teil einer HpaII-Schnittstelle und unmethylierte DNA-Abschnitte wurden daher fragmentiert und konnten in der anschließenden Amplifikation nicht vervielfältigt werden. Vor allem die maternalen Einzelklone die durch Klonierung der Amplifikate von DNA ohne vorhergehende HpaII-Restriktion entstanden sind, lassen jedoch eine deutliche Hypermethylierung im A1-Bereich erkennen. Frevel und Mitarbeiter vermuten, dass das A1-Repeat in 3'-Richtung eine Grenze für die Ausdehnung des Methylierungsimprints darstellt (Frevel et al., 1999b). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse unterstützen diese Hypothese. Spätestens ab CpG 23 konnte vor allem für das maternale Allel eine stark nachlassende Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustands festgestellt werden. In einigen Fällen war jedoch keine klare 3'-Grenze des Methylierungsimprints zu erkennen, da nur einige CpGs weniger Einzelklone keine allelspezifische Methylierung zeigten (z.B. **Abbildung 3.7**).

Hori und Mitarbeiter konnten 2002 in den beiden A-Repeats jeweils zwei tandemartig angeordnete Sequenzen identifizieren, die als Bindestellen für Proteine der Oct-Familie dienen können, und die für den Schutz vor einer *de novo*-Methylierung der CpGs in und um die CTCF-Bindestellen der benachbarten Repeats notwendig sind (Hori et al., 2002). Die demethylierende Aktivität dieser Protein-DNA-Bindung ist jedoch nur zu beobachten, wenn die Ziel-DNA selbst nicht stark methyliert ist, so dass auf dem paternalen Allel, das in Spermien bereits methyliert vorliegt (Ueda et al., 2000), eine Oct-Bindung nicht stattfinden

kann. Während die Methylierung der B-Repeats die Bindung des Zinkfingerproteins CTCF verhindert, bewirkt die Methylierung der A-Repeats wahrscheinlich, dass eine Bindung der Oct-Proteine nicht stattfinden kann. Wenn die Oct-Bindung in A1 zu einem Schutz vor einer Methylierung des B1-Repeats führt, sollte das maternale Chromosom einheitlich sowohl in A1, wie auch in B1 unmethyliert sein. Normalpersonen, Wilmstumore und BWS-Patienten zeigten jedoch ein gleichermaßen heterogenes A1-Methylierungsmuster, so dass anzunehmen ist, dass für die Oct-Bindung in den A-Repeats eine weniger stringente Nichtmethylierung ausreicht und dort einzelne CpGs methyliert sein können, ohne dass der maternale Imprint verloren geht. Alternativ könnten die gefundenen Methylierungen auf dem maternalen Allel auch zu einem Zeitpunkt entstanden sein, zu dem keine Oct-Bindung zur Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustands der B-Repeats mehr erforderlich war.

#### **4.2.3 BWS-Patienten mit monoallelisch paternaler Methylierung des B1-Repeats**

In 20 der untersuchten BWS-Patienten zeigte das paternale Allel, wie in den untersuchten Kontrollen, aufgrund ihrer Methylierung eine Resistenz der Cytosine gegen eine Umwandlung in Uracilbasen in allen CpGs des B1-Repeats, während alle entsprechenden maternal vererbten Cytosine als Thyminbasen sequenziert wurden, da sie unmethyliert nicht gegen die Umwandlung durch den Bisulfitangriff geschützt waren (**Abbildungen 2.1 und 3.7**). Ein solches allelspezifisches Methylierungsmuster des B1-Repeats entspricht dem Normalzustand, wie er in allen bisher untersuchten somatischen Geweben gefunden wurde. Es resultiert vermutlich in einer jeweils monoallelischen Expression sowohl des *H19*-, wie auch des *IGF2*-Gens, da die CTCF-Proteine ausschließlich die unmethylierte maternale CTS binden können (Hark et al., 2000). Leider konnte diese Annahme nicht überprüft werden, da von den untersuchten Patienten ausschließlich Blutproben zur Verfügung standen, in denen *H19* als nicht und *IGF2* als individuell biallelisch oder monoallelisch exprimiert beschrieben wurde (Giannoukakis et al., 1996). Die bis heute publizierten Methylierungsanalysen der *H19*-Repeats, bei denen die allelspezifische Expression der Gene *IGF2* und *H19* in den entsprechenden Geweben möglich war, deuten darauf hin, dass zumindest die Expression des *H19*-Gens monoallelisch erfolgt, da für eine biallelische Expression eine Hypomethylierung der *H19*-Repeatregion notwendig zu sein scheint (Ulaner et al., 2003). Die *IGF2*-Expression kann jedoch bei monoallelischer Methylierung ausschließlich paternal, oder von beiden

Allelen erfolgen (Cui et al., 2002; Frevel et al., 1999b; Nakagawa et al., 2001) und damit auch unabhängig von der Zugänglichkeit der Enhancer gestört sein.

Da bisher eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Mutationen bei BWS-Patienten beschrieben wurde, ist es nicht überraschend, dass ein Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Patienten eine völlig normale monoallelische Methylierung der *H19*-B1-CTS aufwies. Eine Beteiligung der Gene dieses Imprintingclusters an der Entstehung des Krankheitsbildes kann jedoch auch bei ihnen nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.4 BWS-Patienten mit biallelisch unmethyliertem B1-Repeat

In acht der 33 untersuchten DNAs von BWS-Patienten konnte eine Abweichung vom allelspezifischen Methylierungsmuster des B1-Repeats festgestellt werden. Vier DNAs (1524-99, 176-00, 806-00, 568-01) zeigten eine Hypomethylierung des väterlichen Allels, die sich über alle 20 untersuchten CpGs des B1-Repeats erstreckte. Beim Patienten 568-01 waren zwei der 29 väterlichen Einzelklone methyliert, bei den anderen drei Patienten wurde nur eine isolierte Methylierung einzelner CpGs unterschiedlicher Einzelklone beobachtet (siehe **Abbildung 3.8**). Die vier Patienten 536-99, 738-99, 287-00 und 736-01 zeigten eine leichtere Hypomethylierung, von der nur wenige väterliche Einzelklone, oder CpGs außerhalb der CTS betroffen waren. Eine allelspezifische Bindung des Insulators CTCF ist bei diesen vier DNAs höchstwahrscheinlich noch möglich, während bei den vier Patienten mit zwei unmethylierten Allelen eine Bindung an beide Kopien angenommen werden muss.

Die Ursache der Hypomethylierung der väterlichen B1-Repeat-Region ist unbekannt. Es wäre denkbar, dass entweder die Etablierung des paternalen Imprints in der männlichen Keimbahn fehlerhaft war, oder während der Embryonalentwicklung verloren ging, indem z.B. die Region nicht gegen die generelle Demethylierung des Genoms, die nach der Implantation des Embryos stattfindet, geschützt werden konnte.

Als Konsequenz sollte nach dem Insulator-Modell ein solcher Verlust des paternalen Methylierungsprints in der *H19*-CTS in einer biallelischen Inaktivierung des *IGF2*-Gens und einer biallelischen Expression des *H19*-Gens resultieren (Bell und Felsenfeld, 2000). Eine Hypomethylierung der *H19*-Repeatregion konnte bereits für Blasen- (Takai et al., 2001), Kolorektalkarzinome (Cui et al., 2002; Nakagawa et al., 2001) und Osteosarkome (Ulaner et al., 2003) beschrieben werden. Eine *H19*-Expressions-Untersuchung der hypomethylierten Allele in den informativen Blasenkarzinomen zeigte jedoch keine Relaxierung der

Inaktivierung des paternalen Allels (Takai et al., 2001), so dass ein funktioneller Zusammenhang von CTS-Methylierung und *H19*-Expression nicht hergestellt werden konnte. Es könnte sich also bei der Hypomethylierung des B1-Repeats um das Ergebnis z.B. einer generellen Demethylierung eines größeren DNA-Abschnitts oder einer Reihe einzelner Regionen handeln, die nicht ursächlich für eine Fehlregulation des *H19*-Gens im Tumor wäre. Die *IGF2*-Expression wurde in den hypomethylierten Blasenkarzinomen nicht untersucht.

Die Befunde für Kolorektalkarzinome sind widersprüchlich: Während eine Arbeitsgruppe in 2/3 der Karzinome mit *IGF2*-LOI eine Hypermethylierung des B1-Repeats fanden (Nakagawa et al., 2001), stellten Cui und Mitarbeiter fest, dass diese Region in den von ihnen untersuchten Kolorektalkarzinomen häufig hypomethyliert war und dass dieser Zustand sowohl mit einer mono-, wie auch einer biallelischen *IGF2*-Expression einhergehen kann (Cui et al., 2002). Eine Veränderung der *H19*-Expression wurde in dieser Studie nicht gefunden. Die Hypermethylierung der Insulatorbindestelle zusammen mit einer biallelischen *IGF2*-Expression steht in Übereinstimmung mit den Vorhersagen des Insulator-Modells für *H19/IGF2*, während eine Hypomethylierung, die gemeinsam mit einer biallelischen *IGF2*-Expression auftreten kann, dazu im Widerspruch steht. Cui und Mitarbeiter vermuten daher, dass die Hypomethylierung der in Intron 2 des *IGF2*-Gens gelegenen DMR, die in allen von ihnen untersuchten Kolorektalkarzinomen zusammen mit einem Verlust des *IGF2*-Imprintings auftrat, ursächlich für die biallelische *IGF2*-Expression ist. Diese DMR ist auf dem maternalen Chromosom methyliert und die Autoren glauben, dass eine Methylierung eine Assoziation von Repressoren bewirken könnte, die durch die Hypomethylierung im Tumor verloren ginge. Dieser Mechanismus würde eine Aktivierung der *IGF2*-Expression über andere Enhancer postulieren und damit das Insulator-Modell umgehen. Drewell und Mitarbeiter konnten ein Paar mesodermaler Enhancer 12 und 14 kb 5' des *H19*-Transkriptionsstarts identifizieren. Dieses Enhancerpaar kann wie der 10 kb 3' des *H19*-Gens gelegene endo-/mesodermale Enhancer mit den Promotoren beider Gene interagieren und deren Expression amplifizieren (Drewell et al., 2002). Da die bekannte CTS-Insulatorregion nicht zwischen diesen mesodermalen Enhancern und dem *IGF2*-Gen, sondern zwischen den mesodermalen Enhancern und dem *H19*-Gen liegt, könnten sie eine wichtige Rolle bei der CTS-unabhängigen *IGF2*-Aktivierung spielen.

Für den BWS-Phänotyp ist die Regulation der Genexpression in Geweben mesodermalen Ursprungs besonders interessant, da insbesondere die Makroglossie eines der häufigsten Symptome ist und der Wilmstumor als häufigster embryonaler Tumor das lebensbedrohlichste Merkmal darstellt. Die in dieser Arbeit gefundene Hypomethylierung der *H19*-CTS wurde in

Lymphozyten-DNAs von BWS-Patienten nachgewiesen, also im Gegensatz zu den Tumorbefunden nicht in einem Zelltyp, der direkt mit dem Phänotyp der Betroffenen in einem Zusammenhang steht. Um zur Entstehung der Krankheit beizutragen, sollte sie daher nicht gewebespezifisch sein. Es wäre also möglich, dass in Geweben mesodermalen Ursprungs die *IGF2*-Expression nicht direkt von der CTS-Hypomethylierung beeinflusst wird, sondern stattdessen z.B. vom Methylierungsstatus der *IGF2*-DMR. Der Verlust der Methylierung auf dem väterlichen Allel sollte aber dennoch Auswirkungen auf die Expression des *IGF2*-Gens in anderen, nicht mesodermalen Geweben haben.

Die Ergebnisse der Untersuchungen weiterer Tumore mit einem verändertem *IGF2*- und/oder *H19*-Imprinting zeigen, dass die potentiellen Regulationsmechanismen der allelspezifischen Genexpression noch komplexer zu sein scheinen: Ulaner und Mitarbeiter stellten fest, dass in Osteosarkomen mit einer Hypomethylierung des *H19*-B1-Repeats eine monoallelische Expression des *IGF2*-Gens vom väterlichen Chromosom und eine biallelische Expression des *H19*-Gens vorlag (Ulaner et al., 2003). Sie vermuten, dass bei diesem Verlust der Methylierung die Bindung des CTCF-Proteins keine vollständigen Trennung von Enhancer und *IGF2*-Promotor bewirkt und noch eine Expression des väterlichen Allels zulässt, die wahrscheinlich zu einer geringeren Transkriptionsrate führt, aber nicht zu einem vollständigen Abschalten des Gens. Die *H19*-Expressionsstärke würde sich entsprechend erhöhen, da auch auf dem väterlichen Chromosom eine Interaktion der Enhancer mit dem *H19*-Promotor möglich würde und zu der gefundenen biallelischen Transkription des Gens führen könnte. Ulaner und Mitarbeiter konnten mit Hilfe dieses Modells ebenfalls den reziproken Zustand, den sie bei einer Hypermethylierung der B1-CTS in Osteosarkomen fanden, erklären. Eine biallelische Expression des *IGF2*-Gens zusammen mit einer ausschließlich maternalen Expression von *H19* wurde bereits für andere Tumore, wie dem Zervix- oder Ovarialkarzinom beschrieben (Douc-Rasy et al., 1996; Kim et al., 1998). Im Rahmen des vorgeschlagenen Modells würde dementsprechend der Befund einer biallelischen Expression des einen Gens zusammen mit der kompletten Inaktivierung des anderen Gens mit einer vollständigen Hyper-, bzw. Hypomethylierung der CTS einhergehen.

Es stellt sich die Frage, ab wann eine aberrante (Hyper-) Methylierung vollständig ist, bzw. wie ein Methylierungsmuster aussieht, das zu einer lückenhaften Blockade führt (Hypomethylierung). Untersucht man die CTS des B1-Repeats mit Hilfe der Sequenzierung von Einzelklonen der Amplifikate bisulfitbehandelter DNA, so könnte eine unvollständige Methylierung sich entweder in einer Mischung methylierter und unmethylierter Einzelklone eines Allels und/oder einer Mischung methylierter und unmethylierter CpGs in der CTS der

Einzelklone eines Allels widerspiegeln. Beide Befunde konnten bei der Untersuchung von Osteosarkomen mit sowohl *H19*-LOI, wie auch *IGF2*-LOI dokumentiert werden. Allerdings wurden in der Arbeit von Ulaner und Mitarbeitern nur wenige (vier bis neun) Einzelklone untersucht, so dass eine Quantifizierung nicht sinnvoll erscheint.

Die Methylierung der BWS-Patienten-DNA in der vorliegenden Arbeit zeigte in den Fällen, in denen sie vom allelspezifischen Muster abwich, entweder nur eine Hypomethylierung weniger väterlicher Einzelklone, oder eine nahezu vollständige Hypomethylierung des paternalen Allels. Eine am ehesten den Ergebnissen von Ulaner und Mitarbeitern entsprechende Methylierung der B1-CTS konnte für die BWS-DNAs 738-99 und 287-00 (siehe **Abbildung 3.9**) gefunden werden. Die Anzahl der untypisch methylierten Einzelklone war hier jedoch wesentlich geringer als in den beschriebenen Osteosarkomen, so dass eine Relaxierung des inaktiven Status des paternalen *H19*-Allels und ebenso eine Reduktion der *IGF2*-Expression fraglich bleiben. Der Befund methylierter und unmethylierter Einzelklone eines Allels, bei denen die einzelnen CpGs eines Einzelklons einheitlich methyliert bzw. unmethyliert vorliegen, kann auch durch das Auftreten eines Imprintingfehlers in einzelnen Zellen in der postzygotischen Entwicklung entstehen. Liegt für einen bestimmten Zelltyp, der mit der hier beschriebenen Methode untersucht wird, ein solches Mosaik aus korrekt und fehlerhaft methylierten Zellen vor, so würde sich ein solches Muster unterschiedlich methylierter Einzelklone ergeben, wie es z.B. ansatzweise für DNA 536-99 (siehe **Abbildung 3.9**) gefunden wurde. Ein Mosaik für Imprintingmutationen wurde bei einer Gruppe untypischer BWS-Patienten als Ursache für eine partielle *H19*-Hypermethylierung, die mit biallelischer *IGF2*-Expression assoziiert war, vorgeschlagen (Morison et al., 1996). Eine unterschiedliche Methylierung der CpGs eines Einzelklons, wie sie vor allem für die DNAs 738-99, 287-00 und 736-01 festgestellt wurde, kann jedoch nicht durch ein Zellmosaik entstehen. Hier könnte vielmehr eine fehlerhaft arbeitende Methyltransferase oder partielle Demethylierung als Ursachen zu suchen sein.

Die paternalen Einzelklone der DNAs 1524-99, 176-00, 806-00 (mit Ausnahme von zwei Einzelklonen) und 568-01 (siehe **Abbildung 3.8**) zeigten einen vollständigen Verlust des Methylierungsprints, so dass eine Expression des *IGF2*-Gens von diesem Chromosom unter dem Einfluss des 3' von *H19* gelegenen Enhancers sehr unwahrscheinlich ist. Es wäre jedoch möglich, dass die Hypomethylierung der CTS mit weiteren Hypomethylierungen benachbarter DNA-Abschnitte einherginge und damit z.B. die *IGF2*-DMR betroffen wäre, was, wie für Kolorektalkarzinome beschrieben, eine biallelische *IGF2*-Expression unabhängig von dem 3' von *H19* gelegenen Enhancer zur Folge haben könnte. Die paternale *H19*-Kopie



könnte entweder in Analogie zu den Befunden in Osteosarkomen zusätzlich aktiviert sein, oder aber, wie in den Blasenkarzinomen beobachtet, von der Hypomethylierung nicht betroffen sein. Um diese Frage zu klären wäre es sinnvoll, die Methylierung der *IGF2*-DMR bei diesen vier CTS-hypomethylierten BWS-Patienten zu untersuchen. In der Arbeit von Cui und Mitarbeitern konnte jedoch innerhalb der DMR kein Polymorphismus identifiziert werden, der eine Unterscheidung der elterlichen Allele ermöglichen würde (Cui et al., 2002). Die erhaltenen Einzelklone wurden lediglich nach ihrem Methylierungsstatus sortiert und die Anzahl methylierter und unmethylierter Einzelklone wurde in Fällen mit und ohne *IGF2*-LOI verglichen. Da Sullivan und Mitarbeiter bereits 1999 mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktionsenzyme zeigen konnten, dass nur das mütterliche Allel methyliert ist, weil die differentiell methylierten Schnittstellen in Wilmstumoren mit Verlust des maternalen Allels ausschließlich unmethyliert vorlagen (Sullivan et al., 1999), wurde für die methylierten Einzelklone eine maternale Herkunft angenommen.

Eine solche Analyse der allelspezifischen Methylierung ohne Unterscheidung der Einzelklone anhand eines Polymorphismus erfordert eine gleichmäßige Amplifikation unmethylierter und methylierter Fragmente. Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung der *H19*-B1-DMR der DNA von BWS-Patienten zeigte jedoch, dass die Allele häufig nicht unabhängig ihrer elterlichen Herkunft amplifiziert werden, sondern die Anzahl der mütterlichen, unmethylierten Einzelklone in der Regel überwiegt. In 13 Fällen betrug die Anzahl der mütterlichen im Verhältnis zu der der väterlichen Einzelklone mindestens das Fünffache, in elf Fällen immerhin noch mindestens das Doppelte, während in nur drei Fällen das väterliche Allel in drei- bis zwölflichem Überschuss vorlag. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten von einer solchen Präferenz bei der Amplifikation bisulfitbehandelter DNA (Frevel et al., 1999b), die Gründe hierfür sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Eventuell spielt die unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA aufgrund der Methylierung, und damit vielleicht auch der Heterochromatisierung des chromosomalen Abschnitts, eine Rolle. Hierfür spricht, dass in der vorliegenden Arbeit zwei der drei DNAs, bei denen das paternale Allel präferenziell amplifiziert wurde, hypomethyliert waren. Dennoch bleiben einzelne Fälle die dieser Argumentation widersprechen, wie DNA 643-99 mit 50 methylierten und 17 unmethylierten Einzelklonen oder DNA 176-00 mit 69 unmethylierten Einzelklonen maternaler und nur vier unmethylierten Einzelklonen paternaler Herkunft.

Während das Problem der ungleichmäßigen Allel amplifikation bei der Einzelklonsequenzierung durch die Unterscheidung der Allele für die Mehrzahl der DNAs anhand von Sequenz-

polymorphismen gelöst werden kann, führt es bei anderen Methoden zu größeren Schwierigkeiten. Dies ist zum Beispiel bei der Amplifikation bisulfitbehandelter DNA unter Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green mit anschließender Schmelzpunktermittlung (siehe **Kapitel 3.4**) der Fall und macht eine Aussage über die relativen Anteile der methylierten und unmethylierten Allele nahezu unmöglich. Eine Lösung dieses Problems konnte durch eine Modifizierung der Amplifikationsbedingungen, wie Veränderungen der Denaturierungs- und Annealingtemperaturen, oder der Zugabe von Reagenzien, die eine Veränderung der Stabilität der G/C- und A/T-Bindungen bewirken, nicht erreicht werden. Eine Verbesserung der Verteilung auf durchschnittlich 22% paternale Einzelklone erbrachte eine der Bisulfitbehandlung vorgeschaltete Restriktion der DNA mit einer Kombination von Enzymen, die eine möglichst starke Fragmentierung der genomischen DNA herbeiführten, ohne in den zu amplifizierenden Abschnitten (*H19*-Promotor, -Repeat-Region, *KCNQ1OT1*-DMR) zu schneiden. Dies deutet darauf hin, dass die Umwandlung der unmethylierten Cytosine, die nur bei einzelsträngigem Zustand der DNA möglich ist, auf dem unmethylierten Chromosomenabschnitt besser funktioniert, als auf dem eventuell stärker heterochromatisierten methylierten Allel. Für die Auswertbarkeit der Einzelklonsequenzierung konnte durch die Restriktion der BWS-Patienten-DNA mit TliI, BsmBI und BsiWI bei 55°C eine ausreichende Verteilung der elterlichen Allele erzielt werden. Für die Analyse der differentiellen Methylierung mit Hilfe der Schmelzpunktuntersuchung ist jedoch noch eine weitere Optimierung notwendig. Eventuell kann durch stärker denaturierende Bedingungen während der Bisulfitbehandlung, z.B. durch Erhöhung der Temperatur oder der NaOH-Konzentration, das Verhältnis zugunsten der methylierten Allele verschoben werden, da hierdurch einerseits mehr einzelsträngige methylierte Fragmente entstehen und ein zusätzlicher Anteil vor allem unmethylierter Allele durch die Alkalibehandlung beschädigt wird. Frevel und Mitarbeiter wählten zur Lösung dieses Problems eine Vorbehandlung eines Teils der DNA mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym HpaII, die zur Eliminierung der unmethylierten Moleküle aus dem Gemisch der zu amplifizierenden DNA führte, da in der Sequenz zwischen den verwendeten Primern drei HpaII-Schnittstellen existieren (Frevel et al., 1999b). Dies ist bei der LightCycler-Amplifikation der Region mit anschließender Schmelzpunktuntersuchung der entstandenen Produkte nicht möglich, da durch den allelspezifischen Verdau nur noch die Existenz des methylierten Allels nachgewiesen werden könnte.

Ein Ziel der Methylierungsuntersuchungen bei BWS-Patienten ist es, einem oder mehreren Symptomen der Krankheit eine gemeinsam auftretende Veränderung des normalen Methy-

lierungsmusters zuordnen zu können, um hierdurch die Involvierung und eventuell die Funktion der mutierten genomischen Region nachweisen zu können. Eine Korrelation der Auswirkungen einer möglichen biallelischen *H19*-Expression bzw. einer unterdrückten oder abgeschwächten *IGF2*-Expression und gemeinsamer klinischer Merkmale der vier in der B1-CTS hypomethylierten Patienten fällt sehr schwer. Zum einen ist die Funktion des *H19*-Gens noch stark umstritten, zum anderen sind die klinischen Merkmale der vier Patienten sehr unterschiedlich. Als einzige Gemeinsamkeit zeigten die vier Patienten zum Zeitpunkt der Geburt einen embryonalen Überwuchs oberhalb der 90. Perzentile, zwei Patienten hatten eine Makroglossie, zwei zeigten renale Anomalien, ein Patient wies eine Nabelhernie und ein anderer eine postnatale Hypoglykämie auf. Das *H19*-Gen wird sowohl als Tumorsuppressor (Moulton et al., 1994; Steenman et al., 1994), wie auch als onkofetales Gen (Ariel et al., 1997) diskutiert. Da keiner der vier Patienten einen embryonalen Tumor entwickelte, ist es eher unwahrscheinlich, dass das *H19*-Gen für ein onkofetales Genprodukt kodiert, da aufgrund der biallelischen Methylierungsdefizienz eine Überexpression zu erwarten wäre, die die Entstehung eines Tumors begünstigen würde. Auch die Überexpression eines *H19*-Gens, dessen Genprodukt als Tumorsuppressor fungiert, lässt sich nicht mit der Entstehung des BWS-Phänotyps in Zusammenhang bringen. Ebenso erlaubt eine stark reduzierte *IGF2*-Expression, wie sie bei einer Hypomethylierung der B1-CTS, die eine Bindung des Insulatorproteins CTCF zur Folge haben könnte, ebenfalls vorstellbar wäre, keine Erklärung der BWS-typischen Symptome. Als mögliche Ursache für den embryonalen Überwuchs, von dem alle vier Patienten mit B1-Hypomethylierung betroffen sind, würde im Gegenteil eine verstärkte *IGF2*-Expression in Frage kommen, wie sie bei einer Hypermethylierung der CTS zu erwarten wäre. Cui und Mitarbeiter fanden bei Kolorektalkarzinom-Patienten eine gemeinsame Hypomethylierung sowohl des paternalen Chromosoms 11 in der B1-Repeat-Region, als auch des maternalen Chromosoms 11 in der *IGF2*-DMR (Cui et al., 2002). Da eine Hypomethylierung der maternalen *IGF2*-DMR mit einem *IGF2*-LOI korreliert werden konnte, würde ein solcher Befund für die BWS-Patienten ebenfalls mit einer *IGF2*-Überexpression einhergehen können. Es ist jedoch noch völlig ungeklärt, wie eine Hypomethylierung der B1-CTS auf dem paternalen Chromosom mit einer Hypomethylierung der *IGF2*-DMR des maternalen Chromosoms mechanistisch verknüpft sein könnte. Eventuell handelt es sich hierbei ursächlich um zwei unterschiedliche genetische oder epigenetische Mutationen, deren Zusammentreffen eine gravierende Fehlregulierung der Gene des distalen Imprinting-Clusters des Chromosomenabschnitts 11p15.5 zur Folge hat.

Ein weiterer auffälliger Befund der Untersuchung der Methylierung der *H19*-CTS bei BWS-Patienten ist das Fehlen einer Hypermethylierung der maternalen CpGs, wie sie bei Wilmstumoren, Kolorektalkarzinomen und Osteosarkomen gefunden wurde (Frevel et al., 1999b; Nakagawa et al., 2001; Ulaner et al., 2003). Alle 28 Patienten, für die eine Einzelklonsequenzierung durchgeführt wurde, zeigten stets ein vollständig unmethyliertes mütterliches B1-Repeat. Bei wenigen Patienten waren allenfalls einzelne CpGs unterschiedlicher maternaler Einzelklone nicht umgewandelt, standen jedoch einer Vielzahl völlig unmethylierter Einzelklone gegenüber, so dass eine funktionelle Relevanz sehr unwahrscheinlich ist. Da für BWS bisher als epigenetische Mutation des *H19*-Gens ausschließlich die Hypermethylierung der Promotorregion beschrieben wurde, und ein Modell in Anlehnung an die Befunde in Wilmstumoren angenommen wird, bei dem die Methylierung der B1-CTS auf dem väterlichen Chromosom mit einer Methylierung der Promotorregion einhergeht, ist die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in ein solches bestehendes Modell nicht möglich.

Zusammenfassend zeigt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Methylierung der *H19/IGF2*-Repeatregion, dass eine Hypermethylierung der B1-CTS, wie sie z.B. in Wilmstumoren beschrieben wurden, kein häufiges Ereignis bei BWS-Patienten ist. Obwohl der Verlust des *IGF2*-Imprintings, der daraus resultieren würde, in einer Vielzahl von in der Literatur beschriebenen BWS-Fällen detektiert werden konnte, scheint eine gestörte Bindung des CTCF-Proteins an die mütterliche B1-CTS dafür nicht ursächlich zu sein. Im Gegenteil wurde in einem Achtel der untersuchten Patienten-DNAs eine vollständige Hypomethylierung der väterlichen Sequenz festgestellt, bei der angenommen werden muss, dass ein Schutz vor einer CTCF-Bindung nicht mehr existiert. Während nach dem Insulator-Modell (**Abbildung 1.2B**) hieraus eine *IGF2*-Inaktivierung gefolgert werden muss, könnte in Analogie zu den für Kolorektalkarzinome beschriebenen Befunden auch eine biallelische *IGF2*-Expression auftreten. Da diese dort stets mit einer Hypomethylierung der maternalen *IGF2*-DMR einherging, ist diese Hypothese durch die Untersuchung dieser Region für die vier im B1-Repeat hypomethylierten BWS-Patienten zu überprüfen. Ein solcher Zusammenhang zwischen der normalerweise reziproken Methylierung der beiden DMRs und der *IGF2*-Expression könnte durch eine Interaktion beider Regionen über Proteine mit methylierungssensitiver DNA-Bindung, eventuell in einem Komplex mit CTCF, entstehen. Eine *IGF2*-Überexpression ist bei dem heterogenen Krankheitsbild des Beckwith-Wiedemann Syndroms nicht als alleinige Ursache zu erwarten. Da die vier Patienten mit B1-CTS-Hypomethylierung als einziges gemeinsames Symptom embryonalen Überwuchs aufweisen, lässt sich der

---

molekulargenetische Befund am ehesten mit einer erhöhten Dosis dieses Gens in Zusammenhang bringen. Eine biallelische *IGF2*-Expression aufgrund einer Hypomethylierung der *IGF2*-DMR könnte auch ohne Beteiligung der 3' des *H19*-Gens gelegenen Enhancer auftreten. Die Methylierung der *H19/IGF2*-Insulatorregion wäre dann für die *IGF2*-Expression irrelevant. Da die B1-Hypomethylierung jedoch in 12,5% der in dieser Arbeit untersuchten BWS-Patienten gefunden wurde, und auch für Kolorektal-, Blasenkarzinome und Osteosarkome beschrieben wurde, handelt es sich sicherlich nicht um einen zufälligen Methylierungsverlust, sondern scheint, auch wenn sie nicht das für die Pathogenese ursächliche Ereignis sein sollte, mit diesem assoziiert zu sein.

### 4.3 Isolierung und Charakterisierung des murinen *Trpm5*-Gens

Während der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Gene der humanen BWS-kritischen Region 1 auf Chromosom 11p15.5 charakterisiert. Mit Hilfe einer positionellen Klonierungsstrategie wurde unter anderen ein Gen beschrieben, das eine starke Homologie zur Familie der *Transienten-Rezeptor-Potential*-Gene (*TRP*-Gene) aufweist (Prawitt et al., 2000). Bei den *TRP*-Genen handelt es sich um eine mindestens 26 Mitglieder umfassende Superfamilie (Birnbaumer et al., 2003), die für Proteine mit sechs Transmembrandomänen kodieren und Kationenkanäle bilden können. Der Name leitet sich von dem *Drosophila trp*-Gen ab, welches für die visuelle Signaltransduktion benötigt wird, und bei dessen Ausfall nur eine kurze, nicht anhaltende („*transiente*“) Antwort auf Lichtsignale möglich ist. Die stärkste Homologie zeigte das neu identifizierte Gen zu den Genen *Melastatin1* und *TRPC7*. Es wurde daher als *MTR1*-Gen („*Melastatin1- and TRP-related gene 1*“) bezeichnet (Prawitt et al., 2000). Aufgrund der strukturellen Merkmale des resultierenden Proteins wurde später im Rahmen einer Vereinheitlichung der Nomenklatur der *TRP*-Gene eine Umbenennung in *TRPM5* vorgeschlagen (Montell et al., 2002), daher wird dieser Name im Folgenden verwendet.

Für die Untersuchung der Funktion eines menschlichen Genprodukts ist es hilfreich, auf die entsprechenden Daten, die für ein orthologes Gen der Maus als Modellorganismus gewonnen wurden, zurückgreifen zu können. Insbesondere detaillierte Studien der Genexpression, die auch die Embryonalentwicklung mit einschließen, und die eine Unterscheidung der transkribierten elterlichen Allele ermöglichen, können im Gegensatz zum Menschen in der Maus vergleichsweise unkompliziert durchgeführt werden. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das murine orthologe *Trpm5*-Gen identifiziert und einer detaillierten Expressionsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten im Jahr 2000 in der Zeitschrift *Genomics* veröffentlicht werden (Enklaar et al., 2000).

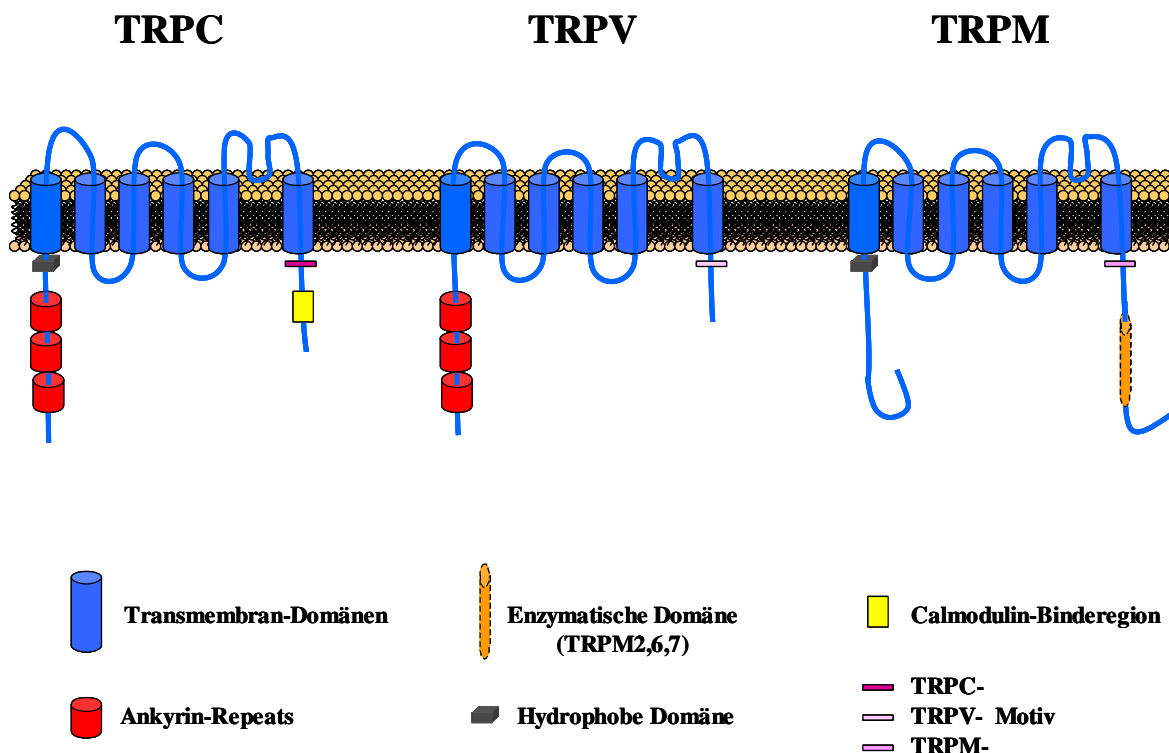
Der Nachweis der Existenz des orthologen murinen *Trpm5*-Gens wurde durch Hybridisierung humaner *TRPM5*-Sonden auf murine DNA-Klone der Region des distalen Chromosoms 7 erbracht, die eine syntäne Gruppe dem humanen Abschnitt 11p15.5 entsprechend angeordneter orthologer Gene enthält. Das *TRPM5*-Gen des Menschen befindet sich proximal des *CD81*- und distal des *KCNQ1*-Gens (Prawitt et al., 2000). Für den murinen PAC-Klon 112O10 konnten Sequenzen sowohl des *Trpm5*-Gens, wie auch der *Cd81*- und *Kcnq1*-Gene nachgewiesen werden. Da die orthologen humanen und murinen Gene dieser Region in der gleichen Reihenfolge angeordnet sind, konnte angenommen werden, dass das klonierte

genomische Fragment das vollständige *Trpm5*-Gen enthielt. Daher wurde eine Subklonbibliothek überlappender ca. 1000 bp großer Fragmente des PAC-Klons 112O10 hergestellt, im 96-Lochformat auf Nylonfiltern angeordnet und mit cDNA-Sonden des humanen *TRPM5*-Gens hybridisiert. Die so identifizierten Fragmente des murinen *Trpm5*-Gens wurden sequenziert und konnten aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der Basenabfolge des humanen *TRPM5*-Gens als Gerüst für die weitere Aufklärung der genomischen und der transkribierten Sequenz verwendet werden. Mit Hilfe Exon-verbinder RT-PCR- und RACE-Experimente, sowie der Sequenzierung der entsprechenden genomischen Abschnitte konnte die vollständige cDNA-Sequenz und die Exon-Intron-Struktur des *Trpm5*-Gens ermittelt werden. Der Vergleich des mit 1158 Aminosäuren vorhergesagten murinen Trpm5-Proteins mit dem humanen Orthologen zeigt eine identische Anordnung der Aminosäurekette in 82,5%. In den vorhergesagten sechs Transmembrandomänen und dem *TRP*-Genfamilien-Motiv liegt sogar eine 99,3-prozentige Identität der Aminosäuren vor und auch der Abstand der Domänen zueinander ist bei Mensch und Maus gleich. Das murine Trpm5-Protein lässt sich daher allein auf struktureller Ebene in enger Nachbarschaft zum humanen TRPM5-Protein in die Familie der TRP-Proteine einordnen.

Die Familie der TRP-Proteine lässt sich nach funktioneller und struktureller Ähnlichkeit in drei Gruppen unterteilen (**Abbildung 4.2**). Zu einer solchen Einteilung wurden zwei Vorschläge publiziert, die sich nur in der Namensgebung der drei Gruppen unterscheiden. Es wird hierbei einerseits vor allem die strukturelle Ähnlichkeit betont und zwischen kurzen, langen und osm9-ähnlichen TRPs unterschieden (Harteneck et al., 2000), während der zweite Ansatz zur Gruppierung die Verwandtschaft der Familienmitglieder zu den Begründern der Unterfamilien, den Genen für *Melastatin (TRPM)*, dem *Vanilloid-Rezeptor (TRPV)* und dem *Drosophila-TRP-Gen (TRPC, für „canonic TRP“)*, hervorhebt (Montell et al., 2002). Für die TRP-Proteine der TRPC-Subfamilie ist das Vorhandensein von drei bis vier Ankyrin-Repeats im N-terminalen intrazellulären Abschnitt, eine intrazelluläre hydrophobe Domäne und die TRP-Domäne im C-terminalen Bereich charakteristisch. Nur von den TRPC-Proteinen ist die Existenz einer Calmodulin-Bindestelle im C-terminalen Abschnitt bekannt. Den TRPM-Proteinen fehlen außerdem die Ankyrin-Repeats und den TRPV-Proteinen die intrazelluläre hydrophobe Domäne.

Das TRP-Motiv EWKFAR ist bei den TRPC-Familienmitgliedern identisch, bei denen der TRPM-Subfamilie leicht und bei den TRPV-Proteinen stärker abgewandelt. Den TRPM-Proteinen ist außerdem ein verhältnismäßig langer intrazellulärer N-terminaler Abschnitt gemeinsam, der eine enzymatische Domäne enthalten kann (TRPM2, TRPM6 und TRPM7).

Nach diesen Kriterien können das humane TRPM5 und das murine Orthologe, die keine Ankyrin-Repeats, aber sowohl ein leicht verändertes TRP-Motiv, wie auch einen langen intrazellulären N-terminalen Anteil und eine hydrophobe Domäne aufweisen, als fünftes Mitglied der TRPM/Trpm-Subfamilie eingruppiert werden.



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der TRP-Kanalproteine**

Die TRP-Proteine können aufgrund charakteristischer Unterschiede und Gemeinsamkeiten in die drei Subfamilien der TRPC-, TRPV- und TRPM-Proteine eingeteilt werden. Die putativen Domänen sind farblich gekennzeichnet, die Orientierung der Aminosäureketten in der Zellmembran, deren Enden jeweils im Zellinneren liegen, ist nur angedeutet.

Für das murine Trpm5-Protein ist mittlerweile bekannt, dass es als Ionenkanal an der Signaltransduktion für die Wahrnehmung süßer, bitterer (Perez et al., 2002) und aminosaurer (Zhang et al., 2003) Geschmacksreize in sensorischen Neuronen beteiligt ist. Entgegen erster Annahmen, dass es sich hierbei um einen kalziumpermeablen Kanal handelt, der nach Entleerung der internen Kalziumspeicher aktiviert wird (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003), konnte jetzt gezeigt werden, dass TRPM5/Trpm5 unspezifisch permeabel für monovalente Kationen, wie z.B. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Cs<sup>+</sup> und impermeabel für divalente Kationen, wie z.B. Ca<sup>2+</sup>, ist und durch schnelle Konzentrationserhöhungen des internen Kalziumlevels im mikromolaren Bereich aktiviert wird (Liu und Liman, 2003; Prawitt et al., 2003). Dieser



Aktivierungsmechanismus sowie die Selektivität des Ionenflusses bringen Trpm5 in engste funktionale Verwandtschaft mit dem Trpm4-Protein (Launay et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte das *Trpm5*-Transkript in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden. Eine Expression des humanen *TRPM5*-Transkripts konnte ebenfalls in einer großen Zahl unterschiedlicher Gewebe anhand einer Northern-Blot-Hybridisierung, Dot-Northern-Blot-Hybridisierung und in RT-PCR-Amplifikationen dokumentiert werden (Prawitt et al., 2000; Prawitt et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Rolle des Proteins nicht allein in der Geschmackserkennung liegt, die auf sensorische Neuronen des lingualen Epithels beschränkt ist. Eine ähnliche Funktion des Membrankanals, wie sie für erregbare Zellen beschrieben wurde, die letztlich in der Umwandlung eines chemischen in ein elektrisches Signal besteht, kann auch für nicht erregbare Zellen angenommen werden. In pankreatischen Beta-Zellen der Ratte, in denen eine *Trpm5*-Expression nachgewiesen wurde, konnten für Trpm5 typische Membranspannungs-Stromverhältnisse nach charakteristischer Trpm5-Aktivierung durch intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung dokumentiert werden (Prawitt et al., 2003), die auf eine Beteiligung des Trpm5-Kanals an der Membrandepolarisierung hindeuten. Eine Funktion des Trpm5-Kanals in nicht erregbaren Zellen wäre vor allem im Zusammenhang mit exkretorischen oder internalisierenden Prozessen vorstellbar, bei denen eine Änderung des Membranpotentials stattfindet.

Das humane *TRPM5*-Gen zeigte bei der Untersuchung somatischer Zellhybride mit je einem einzelnen humanen Chromosom 11 ausschließlich eine Expression in Zelllinien mit einem väterlichen Chromosom 11 (Prawitt et al., 2000). Dies deutete auf eine Inaktivierung des maternalen Allels durch genomisches Imprinting hin. Daher sollte das Expressionsmuster des murinen *Trpm5*-Gens auf eine mögliche allelspezifische Regulation durch genomisches Imprinting untersucht werden. Hierzu wurde eine Methode zur Untersuchung der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression der parental Allele eines Gens in der Maus etabliert.

Um die Transkripte des murinen *Trpm5*-Gens anhand der Sequenz ihrem elterlichen Ursprung zuordnen zu können, müssen sich die elterlichen Allele an mindestens einer Position in einem Exon unterscheiden. Daher wurden in der Elterngeneration der zu untersuchenden Tiere zwei Mausinzuchtstämme verwendet, die eine möglichst hohe Polymorphismenrate aufwiesen, ohne dass größere Schwierigkeiten bei der Kreuzung und Zucht auftraten. Die Wahl fiel auf den weit verbreiteten Inzuchtstamm C57Bl/10 (*Mus musculus musculus*), der im Institut bereits gezüchtet wurde und den Inzuchtstamm Japanese Fancy 1 (JF1) (*Mus musculus*

*molossinus*), der von Prof. Balling vom Institut für Säugergenetik in Neuherberg zur Verfügung gestellt wurde. Die Polymorphismenrate für Mikrosatellitenmarker der Kreuzungen JF1 x C57BL/6 beträgt 81,2% (Koide et al., 1998) und weist auf eine hohe Divergenz der beiden verwendeten Stämme hin. Zucht und Kreuzung waren sehr unproblematisch, die mittlere Wurfgröße lag für beide Stämme und auch für die Kreuzungen beider Subspezies zwischen fünf und sechs Neugeborenen (Eßwein, 1999). Eine Interspezies-Kreuzung der C57Bl/10-Mäuse mit den Stämmen *Mus spretus* (SPRET) oder *Mus castaneus*, die eine noch größere Anzahl von Polymorphismen aufweisen (Takahashi und Ko, 1993), war wesentlich problematischer. Da lediglich Kreuzungen mit männlichen C57Bl/10- und weiblichen SPRET-Tieren erfolgreich waren, nicht aber die reziproke Paarung, konnte dieser Mausstamm nicht für die Imprintinguntersuchungen verwendet werden. Mit der Wahl der Mausstämme C57Bl/10 und JF1 als Eltern der zu untersuchenden Embryonen konnte bei 15 der 18 Gene, die auf eine allelspezifische Expression geprüft werden sollten, mindestens ein Sequenzpolymorphismus im transkribierten Bereich gefunden werden.

Für das murine *Trpm5*-Gen lag dieser in Exon 24 an Position 3406 der mRNA (**Abbildung 3.22 A**). Für die im Rahmen dieser Arbeit angelegte cDNA-Bank wurde Gesamt-RNA aus Präparationen von Kopf, Rumpf und Extremitäten 11,5 Tage alter Embryonen, von 13 Geweben 14,5 und jeweils von 16 Geweben 17,5 Tage alter Embryonen, sowie postnataler und adulter Mäuse extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Um zu überprüfen, ob die gewählte Methode der Sequenzierung der cDNA ausreichend sensitiv und genau ist, Unterschiede in der Transkriptionsstärke der elterlichen Allele festzustellen, wurden zwei Testgene, von denen das Expressionsmuster bekannt ist, ausgewählt und untersucht. Für das murine *Igf2r*-Gen konnte die monoallelische Expression des maternalen Allels in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme des Gehirns, das eine biallelische Expression zeigte, nachgewiesen werden (**Abbildung 3.21**). Dies entspricht den publizierten Befunden, nach denen das väterliche Allel des *Igf2r*-Gens nach der Einnistung des Embryos in den Uterus zwischen dem vierten und siebten Tag der Embryonalentwicklung dauerhaft inaktiviert wird, aber im Gehirn in allen Entwicklungsstadien aktiv bleibt (Hu et al., 1998; Kalscheuer et al., 1993; Lerchner und Barlow, 1997). Die Fluoreszenzsignale, die für die JF1- und C57Bl/10-spezifischen Sequenzen der *Igf2r*-cDNA des Gehirns detektiert wurden, zeigten unterschiedlich starke Intensitäten in Abhängigkeit der elterlichen Herkunft, wobei die des jeweils maternalen stärker als die des paternalen Allels waren. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass nicht im gesamten Gehirn eine Aktivität des paternalen Allels beschrieben wurde, sondern nur in den Bereichen des Choroid-Plexus (Lerchner und Barlow, 1997). Da

die amplifizierte RNA, die aus einer Präparation des ganzen Gehirns extrahiert wurde, zum Teil aus Bereichen mit biallelischer und zum Teil aus solchen mit maternaler Expression stammt, ergibt sich bei der Sequenzierung ein unterschiedlich starker Anteil maternaler und paternaler Signale. Eine Auflösung dieser relativen Signalstärken im Rahmen der methodisch bedingten Schwankungen, die aufgrund der nicht für eine Quantifizierung ausgerichteten Berechnung der Peakhöhen durch die ABI-Analysis 2.1.2-Software entstehen, ist als Beleg für die Sensitivität der Methode zu werten. Frühe Embryonalstadien können mit der gewählten Methode jedoch nicht auf ein gewebespezifisches Imprinting untersucht werden, da bei Embryonen, die jünger als 11,5 Tage alt waren, ausschließlich eine Präparationen des gesamten Embryos möglich war und die RNA-Ausbeute bei zehn Tage alten oder noch jüngeren Embryonen sehr gering war. Für das zweite Testgen, das für die murine *Tyrosinhydroxylase (Th)* kodiert, und das ausgewählt wurde, weil es ebenfalls ein breites Expressionsspektrum und im Gegensatz zu *Igf2r* keine Allelspezifität aufweist, wurde in Übereinstimmung mit den bekannten Expressionsdaten (Casparly et al., 1998; Kitsberg et al., 1993) eine biallelische Expression nachgewiesen (**Abbildung 3.20**).

Während die gewählte Methode für die Analyse des Imprintings der Testgene zuverlässig die überprüfbareren Ergebnisse lieferte, stellte sich im Laufe der Untersuchung weiterer Gene eine zusätzliche Einschränkung heraus: Bei zwei der 15 insgesamt analysierten Gene wurden stammspezifische Unterschiede in der Expressionsstärke festgestellt, die unabhängig von der Vererbung der Allele zu unterschiedlich starken Fluoreszenzsignalen an der jeweiligen polymorphen Position führten. Das *Nap114*-Gen, ausführlich in **Kapitel 4.4.3** diskutiert, zeigte in allen exprimierenden Geweben eine schwächere Expression des JF1-Allels (**Abbildung 3.29**), während für das *Glucokinase*-Gen ausschließlich in der Leber geringere Transkriptmengen dieses Allels gefunden wurden (**Abbildung 3.31**). Bei einer Überlagerung der allelspezifischen Expressionsstärken durch stammspezifische Unterschiede ist mit dieser Methode eine Beurteilung der Regulation der Genexpression durch genomisches Imprinting nicht möglich. Da durch die Verwendung reziproker Kreuzungen diese beiden Formen der allelspezifischen Expression jedoch leicht zu unterscheiden sind, besteht nicht die Gefahr einer Fehlinterpretation der Ergebnisse und die stammspezifische Expression stellt daher lediglich eine Einschränkung dar, die bei einigen Genen auftreten, aber eventuell durch einen Austausch der verwendeten Mausinzuchtstämme behoben werden kann. Die anderen in dieser Arbeit untersuchten Gene waren keinen weiteren Einschränkungen bei der Untersuchung der allelspezifischen Expression unterworfen.

So konnte das *Trpm5*-Gen über einen großen Zeitraum der embryonalen und postnatalen Entwicklung und in adulten Mäusen gewebespezifisch auf die Allelspezifität der Expression hin untersucht werden. Die Sequenzierung der cDNAs zeigte an der polymorphen Position der *Trpm5*-Sequenz stets eine Überlagerung der beiden Signale für die Nukleotide Thymin, das dort nur bei C57Bl/10-Mäusen vorliegt und Cytosin, das spezifisch für die JF1-Sequenz ist, so dass hiermit eine biallelische Expression in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 3.21 B**).

Sollte das humane orthologe Gen einem genomischen Imprinting unterliegen, bestünde somit ein entscheidender Unterschied in der allelspezifischen Expression des humanen und murinen *TRPM5/Trpm5*-Gens. Obwohl bei den meisten Genen, die in der einen dieser beiden Spezies einem Imprinting unterliegen, dies auch für die andere nachgewiesen werden konnte, gibt es eine Reihe von Ausnahmen, wie z.B. die Gene *Igf2r* (Kalscheuer et al., 1993), *U2afbp-rs* (Pearsall et al., 1996), *Mas* (Riesewijk et al., 1996) und *Impact* (Okamura et al., 2000), die in der Maus aber nicht im Menschen monoallelisch exprimiert werden. Für *Trpm5* ist jedoch ein eindeutiger Hinweis auf eine Regulation der Expression durch genomisches Imprinting nötig, da der Nachweis einer allelspezifischen Inaktivierung in humanen Zellen noch aussteht. Für die verwendeten Hybridzelllinien (GM07300, GM13400, GM10927B, GM11941, GM11944) konnte zwar eine Aufrechterhaltung der ausschließlich maternalen Methylierung der KvDMR (Gabriel et al., 1998; Prawitt et al., 2000), sowie eine allelspezifische Expression der reziprok imprinteten Gene *H19* und *IGF2* in GM07300 und GM11944 (Gabriel et al., 1998), nachgewiesen werden, aber eine fehlende Expression von *TRPM5* in den beiden Zelllinien GM134900 und GM07300 mit maternalem humanem Chromosom 11 muss nicht auf einer Inaktivierung durch Imprinting beruhen. Das Ursprungsgewebe der humanen Donorzellen, die für die Fusion mit einer CHO- („*chinese hamster ovary*“) bzw. CHL- („*chinese hamster lung*“) Zelle verwendet wurden, war bei der Zelllinie GM13400 ein Ewing-Sarkom und für die Zelllinie GM07300 unbekannt (Gabriel et al., 1998). Daher ist fraglich, ob überhaupt eine *TRPM5*-Expression, unabhängig von der parentalen Herkunft des verbliebenen Chromosoms 11, feststellbar sein kann, oder ob dieses Gen in den Donorzellen generell nicht angeschaltet ist. Die drei Zelllinien mit paternalem humanem Chromosom 11 sind aus Fusionen mit Lymphozyten (GM11941) oder amniotischen Fibroblasten entstanden (Gabriel et al., 1998), so dass eine Vergleichbarkeit nicht gegeben ist.

## 4.4 Untersuchung der allelspezifischen Expression weiterer Gene der distalen Imprintingregion des murinen Chromosoms 7F4

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren in der murinen distalen Imprintingregion neun allelspezifisch exprimierte Gene bekannt: für die zwei Gene *Igf2* und *Ins2* konnte eine Inaktivierung des mütterlichen Allels nachgewiesen werden, die bei *Igf2* in allen Geweben mit Ausnahme einiger Gehirnbereiche vorliegt (Hemberger et al., 1998), während das Imprinting von *Ins2* entwicklungs- und gewebespezifisch auf den Dottersack ab Tag 14,5 der Embryonalentwicklung beschränkt ist (Deltour et al., 1995; Giddings et al., 1994). Von sieben Genen war bekannt, dass von ihnen das väterliche Allel inaktiv vorliegt: *H19*, *Igf2as*, *Ascl2*, *Kcnq1*, *Cdkn1c*, *Slc22a11* und *Ipl*. Dabei zeigen *Ascl2* und *Ipl* gewebespezifisch eine biallelische Expression (Guillemot et al., 1995; Qian et al., 1997), während für *Kcnq1* und *Slc22a11* eine postnatale Reaktivierung des väterlichen Allels, also ein entwicklungs-spezifisches Imprinting, festgestellt wurde (Dao et al., 1998; Gould und Pfeifer, 1998; Jiang et al., 1998). Drei weitere Gene dieser chromosomalen Region, *Cd81*, *Kcnq1ot1* und *Nap114*, sollten in der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Marion Eßwein auf ein gewebe- und entwicklungs-spezifisches Imprinting untersucht werden.

### 4.4.1 Expression des *Cd81*-Gens

Weder vom humanen noch vom murinen *Cd81*-Gen („*cluster of differentiation 81*“) war zum Zeitpunkt der Untersuchung eine allelspezifische Expression bekannt. Mit der cDNA aller untersuchter embryonaler, postnataler und adulter Gewebe wurde ein PCR-Produkt amplifiziert und sequenziert. Aufgrund der Sequenzunterschiede der elterlichen Allele an den Positionen 804-807 wurde die biallelische Expression in allen Geweben und zu allen untersuchten Zeitpunkten festgestellt (siehe auch **Abbildung 3.26**). Gleichzeitig wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls eine biallelische Expression des *Cd81*-Gens ab Tag 8,5 der Embryonalentwicklung beschrieben. Bei Präparationen 6,5 und 7,5 Tage alter Embryonen wurde außerdem eine partielle Inaktivierung des mütterlichen Allels gefunden (Casparly et al., 1998). Dieser Befund wurde jedoch nicht durch eine reziproke Kreuzung der Eltern abgesichert, so dass die Möglichkeit besteht, dass es sich hierbei um eine stammspezifische Präferenz der Genexpression handelt. Dennoch zeigt dieses Ergebnis die Grenzen der hier verwendeten Methode: Sehr frühe Stadien wurden nicht untersucht, da das gewebespezifische Imprinting im Vordergrund stand, und eine Präparation einzelner Organe, wie z.B. Gehirn

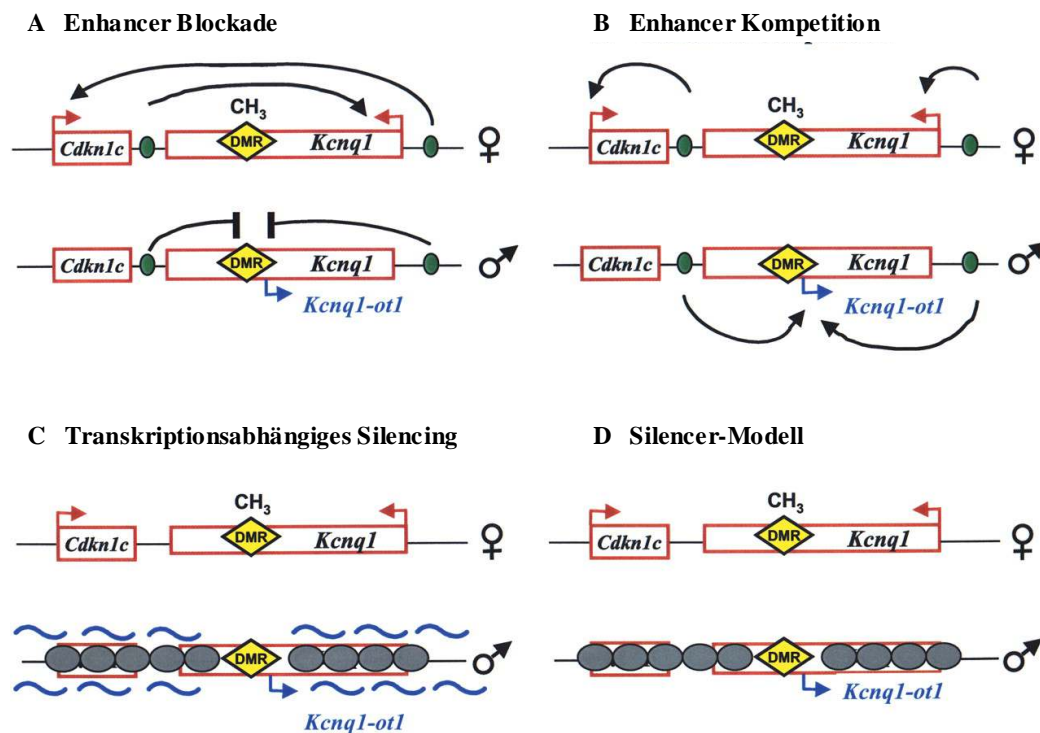
oder Leber, erst bei ca. elf Tage alten Embryonen die Extraktion einer ausreichenden RNA-Menge ermöglicht. Im Einzelfall können gezielt bestimmte Gewebe auch zu sehr frühen Zeitpunkten aus mehreren Embryonen präpariert und zusammen für die RNA-Extraktion verwendet werden. Wenn jedoch, wie bei der Untersuchung des *Cd81*-Gens, keine Hinweise auf eine allelspezifische Expression vorliegen, kann ein Imprinting, das auf diese Stadien beschränkt ist, übersehen werden.

#### 4.4.2 Expression des *Kcnq1ot1*-Gens

Kurz vor Beginn der hier beschriebenen Imprintinguntersuchungen wurde für das humane *KCNQ1OT1*-Gen, das in Intron 9 bis 10 des *KCNQ1*-Gens lokalisiert ist, ein gewebe-spezifisches Imprinting mit Inaktivierung des mütterlichen Allels festgestellt (Lee et al., 1997b). Das orthologe Gen der Maus konnte von der Arbeitsgruppe von Dr. M. Higgins in Buffalo, USA isoliert werden. Mit der Erstbeschreibung des Gens, die im Juli 1999 erfolgte (Smilnich et al., 1999), wurden auch initiale Imprintingstudien einiger fetaler Gewebe (Herz, Lunge, Niere und Darm; 14,5 dpc) durchgeführt, die, wie das humane orthologe Gen, eine ausschließlich paternale Expression zeigten. Aufgrund der mit Dr. M. Higgins seit Jahren bestehenden Kooperation, sollte daher eine detaillierte Untersuchung der allelspezifischen *Kcnq1ot1*-Expression im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.

Die Sequenzierung der cDNA-Amplifikate mit einer für die verwendeten elterlichen Mausstämme polymorphen Stelle zeigte in allen untersuchten Geweben das Fluoreszenzsignal des väterlichen Allels und mit unterschiedlicher Intensität auch das des mütterlichen Allels (siehe **Abbildung 3.28**). Das Signal des jeweils väterlichen Allels war bei allen cDNA-Amplifikaten unabhängig davon, ob es von einem JF1- oder B57Bl/10-Vater stammt, das stärkere der elterlichen Allele, aber eine vollständige Inaktivierung des mütterlichen Allels konnte in keinem Gewebe festgestellt werden. Obwohl eine genaue Quantifizierung der Fluoreszenzsignale bei der angewandten Untersuchungsmethode nicht sinnvoll ist (siehe auch **Kapitel 4.3**, Diskussion der *Igf2r*-Signale), deuten die Befunde auf eine präferentiell allelspezifische Expression des paternalen *Kcnq1ot1*-Gens mit gewebe- und entwicklungs-spezifisch unterschiedlich vollständig ausgeprägter Inaktivierung des maternalen Allels hin. Dies zeigt, dass genomisches Imprinting nicht in einer absoluten Inaktivierung eines der elterlichen Allele resultieren muss, sondern eine graduell differentielle Beteiligung der beiden Genkopien an der Summe der Transkripte eines Gens in einer Zelle zur Folge haben kann.

Die Rolle des *Kcnqlot1*-Gens bezüglich des Imprintings der benachbarten Gene *Kcnq1* und *Cdkn1c* ist noch unklar. Dem Transkriptionsstart benachbart wurde eine differentiell methylierte CpG-reiche Region (KvDMR) identifiziert (Smilinich et al., 1999), die für das Imprinting der Gene dieses Clusters verantwortlich gemacht werden konnte (Fitzpatrick et al., 2002). Die Art und Weise in der KvDMR, *Kcnqlot1* und das Imprinting der benachbarten Gene funktionell verknüpft sind, wird zur Zeit noch diskutiert (Mancini-DiNardo et al., 2003): Die KvDMR könnte wie die *H19*-CTS als Enhancer-Blocker (**Abbildung 4.3A**) oder als Silencer-Element (**4.3D**) fungieren, das *Kcnqlot1*-Gen könnte mit den benachbarten Genen um gemeinsame Enhancer konkurrieren (**4.3B**) oder das *Kcnqlot1*-Transkript könnte, ähnlich wie es für die *Air*-Transkripte bei der X-Chromosom-Inaktivierung beschrieben wurde (Sleutels et al., 2002), als Silencer wirken (**4.3C**).



**Abbildung 4.3: Modelle für die Aktivität der *Kcnqlot1*-ICR**

Nach dem Enhancer-Blockade Modell (**A**) könnte die KvDMR wie die *H19*-CTS als Enhancer-Blocker fungieren. Alternativ könnte das *Kcnqlot1*-Gen mit den benachbarten Genen um putative gemeinsame Enhancer (grüne Ovale) konkurrieren (**B**). Abbildung (**C**) zeigt das *Kcnqlot1*-Transkript (S-förmige Linien) als Silencer, ähnlich wie es für die *Air*-Transkripte bei der X-Chromosom-Inaktivierung beschrieben wurde. Nach dem Silencer-Modell (**D**) bewirkt die KvDMR eine Heterochromatinisierung (graue Kreise) der Umgebung. (Abbildung nach (Mancini-DiNardo et al., 2003))

Während für die ersten beiden Möglichkeiten (A, D) die Expression des *Kcnqlot1*-Gens unerheblich sein kann, verlangen die zwei letztgenannten Hypothesen (B, C) eine Koexpression mit den benachbarten imprinteten Genen. Eine gemeinsame Expression mit

*Kcnql1* und *Cdkn1c* kann wegen der ubiquitären Expression des *Kcnqlot1*-Gens grundsätzlich in allen Geweben, in denen diese Gene angeschaltet werden, stattfinden. In Geweben in denen ausschließlich *Kcnqlot1*-Transkripte vorhanden sind, sollte die Expression nach der Enhancer-Kompetitions-Hypothese biallelisch sein. Umgekehrt sollte dort wo eine Expression des mütterlichen *Kcnqlot1*-Allels stattfindet, ein gemeinsamer Enhancer nicht für die um ihn konkurrierenden Gene zur Verfügung stehen. Wie in **Abbildung 3.28** gezeigt, ist zum Beispiel das Signal des maternalen Allels für das Herz 17,5 Tage alter Embryonen annähernd so stark wie das des paternalen Allels. Dort wurde jedoch eine starke Expression des maternalen *Cdkn1c*-Allels beschrieben (Matsuoka et al., 1995), und die des *Kcnql1*-Gens ist ab Tag 16,5 dpc sogar biallelisch (Gould und Pfeifer, 1998). Die in dieser Arbeit beschriebene partielle Relaxierung des inaktiven Zustands des maternalen *Kcnqlot1*-Allels spricht daher gegen eine Regulation des Imprintings in diesem Cluster durch Enhancer-Kompetition. Aus dem gleichen Grund erscheint eine Steuerung analog der Inaktivierung der X-chromosomalen Gene durch die *Air*-Transkripte unwahrscheinlich.

Das Modell, das in Analogie zur Imprintingregulation der *Igf2/H19*-Region eine allelspezifische Blockade gemeinsamer Enhancer vorschlägt, ist geeignet, eine partiell biallelische Expression des *Kcnqlot1*-Gens bei gleichzeitig monoallelischer Expression z.B. des *Kcnql1*- oder *Cdkn1c*-Gens zu erklären. Eine unvollständige Methylierung der maternalen KvDMR könnte in der Expression der normalerweise reziprok aktiven benachbarten Gene resultieren. Eine solche Situation konnte für die humane *H19/IGF2*-Region in Osteosarkomen beschrieben werden (Ulaner et al., 2003) und wurde in **Kapitel 4.2.3** dieser Arbeit bereits ausführlich diskutiert. Das Enhancer-Blockade-Modell verlangt jedoch die Existenz entsprechend relativ zu DMR und Promotoren positionierter Enhancer, und außerdem Zielsequenzen in der DMR, an die Proteine, die zu einer Blockade fähig sind, binden können. Bisher sind noch nicht alle Enhancerelemente bekannt, die die Expression der Gene dieses Imprintingclusters beeinflussen. Für *Cdkn1c* konnten z.B. zwei Regionen definiert werden, in denen sich Enhancer für unterschiedliche Gewebe befinden, und eine der beiden Regionen könnte in einer Entfernung vom *Cdkn1c*-Promotor liegen, die eine Trennung von Enhancer und Promotor durch Insulatorbindung an die KvDMR ermöglicht (John et al., 2001). Es ist bisher unklar, ob die KvDMR als Insulator oder als Silencer fungieren kann. Es gibt von mehreren Arbeitsgruppen Befunde für eine bidirektionale Silencerfunktion der KvDMR (Du et al., 2003; Mancini-DiNardo et al., 2003; Thakur et al., 2003) und auch eine Rolle als Insulator konnte nachgewiesen werden (Kanduri et al., 2002). Schwierigkeiten entstehen bei einer Erklärung der allelspezifischen Expression anhand des Silencer-Modells vor allem



durch das paternal exprimierte *Kcnq1ot1*-Gen, das aus einer repressiven Chromatin-Domäne heraus aktiviert werden müsste. Es wäre vorstellbar, dass ähnlich der bei *Drosophila melanogaster* bekannten Beispiele (Howe et al., 1995), eine Genexpression eine Position innerhalb einer heterochromatischen Umgebung erfordert. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene gewebespezifisch unvollständige Inaktivierung des maternalen *Kcnq1ot1*-Allels könnte in diesem Zusammenhang auf eine partielle Heterochromatisierung auch des maternalen Chromosomenabschnitts hinweisen, die aber nicht zu einer Inaktivierung der anderen Gene des Imprintingclusters führt.

#### 4.4.3 Expression des *Nap114*-Gens

Das *Nap114*-Gen („*nucleosome assembly protein 1 like 4*“) kodiert für ein Protein, das Histone binden kann und an der Zusammenlagerung der Nucleosomen beteiligt ist. Es ist dem *Ipl*-Gen telomerwärts benachbart und es wird angenommen, dass es in diese Richtung das distale Imprintingcluster begrenzt, da es als biallelisch exprimiert beschrieben wurde (Paulsen et al., 1998). Es gibt jedoch eine Reihe von Befunden, die für eine zumindest partielle allelspezifische Expression des *Nap114*-Gens sprechen. Die Untersuchung der Expression des Gens bei Mäusen mit maternaler uniparentaler Chromosom 7-Disomie zeigte eine im Vergleich zur Expression in wildtypischen Mäusen erhöhte Transkriptmenge (Paulsen et al., 1998), was auf eine Inaktivierung des paternalen Allels zurückgehen könnte. Auch das Expressionsmuster des humanen *NAP14*-Gens, das als biallelisch exprimiert beschrieben wurde (Hu et al., 1996), scheint komplexer zu sein als ursprünglich angenommen: Neben zwei alternativen Spleißprodukten, die sich am 3'-Ende des offenen Leserahmens in 33 Nucleotiden unterscheiden, konnten drei alternative 5'-Exons als Transkriptionsstarts identifiziert werden, denen unterschiedliche Promotorsequenzen vorausgehen (Prawitt, 1999).

Eine Untersuchung der *NAP14*-Transkripte in somatischen Hybridzelllinien, die entweder ein mütterliches oder väterliches humanes Chromosom 11 in einem Nagerhintergrund besitzen und für die eine korrekte Beibehaltung des Imprintings der dort lokalisierten Gene nachgewiesen werden konnte (Gabriel et al., 1998), zeigte, dass eine der drei Isoformen eine Expression ausschließlich von väterlichen Chromosomen 11 aufwies (Prawitt, unveröffentlicht). Auch bei der Replikation des *NAP14*-Gens kommt es zu einer unterschiedlich frühen Komplementierung der Allele (Enklaar, 1997), wie sie für geprägte Gene beschrieben wurde (Kitsberg et al., 1993). Ein solches asynchrones Replikationsmuster deutet darauf hin, dass das *NAP14*-Gen, wie die benachbarten geprägten Gene, zu einem chromosomalen

Abschnitt gehört, der eine allelspezifische Chromatinstruktur aufweist. Da auch für das murine orthologe *Nap114*-Gen zwei alternative 5'-Spleissformen gefunden wurden (Prawitt, 1999), könnten die genannten Expressionsanalysen (Paulsen et al., 1998), die dies nicht berücksichtigt haben, eine allelspezifische Herkunft eines der beiden Transkripte übersehen haben. Außerdem wurden nur zwei Entwicklungsstadien (15 dpc und postnatal) und einige exemplarisch ausgewählte Gewebe untersucht, so dass in der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Marion Eßwein eine detaillierte Imprintinganalyse durchgeführt wurde. Mit Hilfe eines Nukleotidtriplets an Position 1812-1815 der JF1-mRNA, das in der Sequenz der C57Bl/10-mRNA fehlt, konnte die Herkunft der Transkripte bestimmt werden. Es zeigte sich, dass, unabhängig von der parentalen Herkunft, alle amplifizierten cDNA-Produkt sehr schwache Signale der JF1-typischen Sequenz aufwiesen, während die der C57Bl/10-Sequenz deutlich stärker waren (siehe **Abbildung 3.29**). Eine Quantifizierung dieses Ergebnisses wurde mittels einer GeneScan-Fragmentanalyse durchgeführt, da das um drei Nukleotide längere JF1-Transkript elektrophoretisch vom C57Bl/10-Transkript getrennt werden konnte. Durch die Kopplung eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids an die Amplifikate konnte anhand der Fluoreszenzintensitätsmessungen eine Schätzung der relativen Anteile der elterlichen Transkripte an der *Nap114*-Expression erfolgen (siehe **Abbildung 3.30**). Der Anteil der C57Bl/10-Transkripte war in fast allen Geweben zwei- bis viermal so groß wie der der JF1-Transkripte (siehe **Tabelle T3.1**). Es handelt sich also um eine stammspezifisch ungleich starke Expression des *Nap114*-Gens, die in den Tieren, die aus einer Kreuzung der beiden Mausstämme hervorgehen, zu einer unterschiedlichen Beteiligung der Allele an der Summe der Transkripte des Gens führt.

Eine ungleiche Beteiligung der Allele aufgrund einer stammspezifischen Variabilität der Genexpression stellt ein grundsätzliches Problem der gewählten Methode dar, von dem bereits einige Berichte von anderen Arbeitsgruppen existieren. So wurde z.B. bei der Untersuchung des Imprintings des *Grfl*-Gens eine in Hoden und Ovar stammspezifisch stärkere Expression des C57Bl/6- gegenüber der des PWK/Ros-Allels festgestellt (Plass et al., 1996). Auch das *Igf2*-Gen wird nicht in allen Mausstämmen gleich stark exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Allel der *Mus spretus* Vorfahren in den *Igf2* biallelisch exprimierenden Bereichen des Gehirns stets in geringerer Dosis vorliegt als das der Kreuzungspartner der *Mus musculus*-Familie (Hemberger et al., 1998).

Es sind mehrere Ursachen denkbar, die in einer unterschiedlichen Expressionsstärke eines Gens bei zwei Mausstämmen resultieren können. Neben epigenetischen Besonderheiten, wie einer stammspezifischen Chromatinstruktur oder DNA-Methylierung, die gerade in einer

Region, wie dem distalen Imprintingcluster des Chromosoms 7F, nicht unwahrscheinlich sind, könnten auch stammspezifisch unterschiedliche *cis*- und *trans*-Faktoren, sowie eine differierende Stabilität der Transkripte von Bedeutung sein. In der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Marion Eßwein wurde bei einem weiteren Gen, das für das Enzym Glucokinase kodiert, eine stammspezifische Expression festgestellt, die sich im Unterschied zu den Befunden des *Nap114*-Gens aus einer Vielzahl von Geweben, jedoch nur in einem einzigen Organ, der spätebryonalen und postnatalen Leber finden lässt ((Eßwein, 1999) ohne Abbildung). Eine solche differentielle Glucokinaseaktivität konnte bereits für andere Mausstämme gezeigt werden, die daher in Glucokinase-hochaktive und -niedrigaktive Stämme eingeteilt wurden (Coleman, 1977; James et al., 1985; Lavender et al., 1983). Da das *Glucokinase*-Gen einen leberspezifischen Promotor besitzt (Magnuson, 1990), wurde diese genomische Region vergleichend für die verwendeten Mausstämme JF1, C57Bl/10, SPRET und FVB sequenziert. Es konnten unter anderen JF1- und SPRET-spezifische Sequenzunterschiede in einer putativen HNF-4-Bindestelle nachgewiesen werden, die vermuten lassen, dass der Grund für die stammspezifisch schwächere Genexpression in der eventuell verminderten Bindungsaffinität dieses leberspezifischen Transkriptionsfaktors zu suchen ist (Eßwein, 1999). Eine Untersuchung der alternativen 5'-UTR-Regionen des *Nap114*-Gens zeigte hingegen beim Vergleich der Sequenzen von JF1- und C57Bl/10-Mäusen keine Unterschiede in der Nukleotidabfolge. Da zum Zeitpunkt der Arbeit die murine genomische Sequenz um das *Nap114*-Gen noch nicht vollständig bekannt war, ist es dennoch möglich, dass ähnlich wie beim *Gk*-Gen, eine unterschiedliche Zielsequenz eines Transkriptionsfaktors zu einer stammspezifischen Genexpression führen kann, oder andere regulative Elemente in *cis*, wie z.B. Enhancersequenzen oder Insulatorbindestellen die Expressionsstärken beeinflussen.

Um zu klären, ob sich das Problem der stammspezifischen *Nap114*-Expression, dass eine Identifikation einer allelspezifischen Expression durch genomisches Imprinting nahezu unmöglich macht, durch die Verwendung eines alternativen Mausstamms, der die gleiche Expressionsstärke aufweist wie der Kreuzungspartner, lösen lässt, wurden reziproke Kreuzungen der JF1- und C57Bl/10-Mäuse mit FVB- und SPRET-Partnern durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die *Nap114*-Expressionsstärke der C57Bl/10-, FVB- und SPRET-Mäuse ungefähr gleich stark und die der JF1-Mäuse deutlich geringer ist. Die Kreuzung der SPRET-Mäuse mit den C57Bl/10-Partnern war nur in einem Einzelfall erfolgreich, und ansonsten wies nur der JF1-Stamm die nötige evolutive Entfernung auf, die

in Polymorphismen im transkribierten Bereich der zu untersuchenden Gene resultiert. Daher war es nicht möglich, eine alternative Paarung der zur Verfügung stehenden Mausstämme durchzuführen. Daher ist eine Beurteilung der Beteiligung der genomischen Prägung an der Expression des *Nap114*-Gens mit der in dieser Arbeit gewählten Methode nicht möglich.

Anhaltspunkte dafür, dass dieser epigenetische Mechanismus möglicherweise eine Rolle bei der Expression dieses Gens spielen könnte, sind jedoch vorhanden. Betrachtet man das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der reziproken JF1- und C57Bl/10-Kreuzungen, die durch die GeneScan-Fragmentanalyse in einer Reihe von Geweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien ermittelt wurden (siehe **Tabelle T3.1**), so fällt auf, dass es in einigen Geweben signifikante Unterschiede gibt, je nachdem ob das C57Bl/10-Allel (und entsprechend das JF1-Allel) paternaler oder maternaler Herkunft war. Beispielsweise steht einer ca. doppelt so starken Expression des C57Bl/10-Allels (im Vergleich zu der des JF1-Allels) im Gehirn 14,5 Tage alter Embryonen in der reziproken Kreuzung eine mehr als sechsfache Expression des C57Bl/10-Allels gegenüber. Auch postnatal und in einigen Gewebe 17,5 Tage alter Embryonen (Lunge, Harnblase und Magen) konnte eine ähnliche Differenz der Quotienten beobachtet werden (siehe **Tabelle T3.1**). Hier scheint zusätzlich zu den stammspezifischen Unterschieden der Genexpression, die Vererbung der Allele über die mütterliche oder väterliche Keimbahn eine Rolle zu spielen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine dem genomischen Imprinting unterliegende Expression, aber auch systemimmanente Schwankungen, bedingt durch nicht auszuschließende Unterschiede bei den reziproken Kreuzungen bezüglich Alter und Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen in den jeweiligen Müttern könnten eine Ursache sein. Der letztendliche Nachweis, ob Imprinting bei der Expression von *Nap114* eine Rolle spielt, ist allerdings nur möglich, wenn die Überlagerung durch eine stammspezifische Expression eliminiert wird. Die Identifizierung eines Mausstamms mit einer *Nap114*-Expression, die quantitativ der der JF1- oder C57Bl/10-Mäuse entspricht, und der im Vergleich der Transkriptsequenzen Polymorphismen aufweist, die vorzugsweise im 5'-Bereich des Gens liegen sollten, ist daher das vordringlichste Ziel bei der Erforschung der allelspezifischen Expression des *Nap114*-Gens.

## 4.5 Isolierung und Charakterisierung des murinen *Ascl3*-Gens

Im Rahmen der vergleichenden Sequenzierung des humanen und murinen Genoms wurde von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. E. Schmidt und Prof. T. Hankeln die chromosomale Region 11p15.3 des Menschen und die orthologe Region des murinen distalen Chromosoms 7 untersucht. Hierbei konnten in beiden Organismen die Gene für einen Transkriptionsfaktor mit „*basic Helix-Loop-Helix*“ (bHLH)-Motiv identifiziert werden, die aufgrund der Ähnlichkeit mit den beiden bei Mensch und Maus bekannten Genen der „*Achaete-Scute-like*“ (ASCL)-Genfamilie *ASCL1* (bzw. *Mash1* oder *Ascl1*) und *ASCL2* (bzw. *Mash2* oder *Ascl2*) als *ASCL3* (bzw. *Ascl3*) bezeichnet wurden. Als Teil der vorliegenden Arbeit sollte das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des murinen *Ascl3*-Gens aufgeklärt werden, wobei gleichzeitig festgestellt werden sollte, ob eine Regulation der Genexpression durch genomisches Imprinting vorliegt.

Eine Imprintinguntersuchung war aufgrund der chromosomalen Lokalisation des murinen und humanen Gens zusammen mit der Zugehörigkeit zur Familie der *Ascl*-Gene besonders interessant. Die Gene *Ascl2* und *Ascl3* gehören zu einer Syntäniegruppe, die sich auf dem distalen murinen Chromosom 7 und dem humanen Chromosom 11p15 zwischen den Genen *Hras/HRAS* und *Pth/PTH* erstreckt. Hierzu existiert jeweils eine paraloge Region, zu der das *Ascl1/ASCL1*-Gen gehört, die sich auf den murinen Chromosomen 6 und 10 und dem kurzen und langen Arm des humanen Chromosoms 12 befindet (Prawitt, 1999). Während das *Ascl2*-Gen als Teil des distalen Imprintingclusters des Chromosoms 7F ab Tag 8,5 der Embryonalentwicklung ausschließlich maternal exprimiert wird, zeigt das paraloge *Ascl1*-Gen auf Chromosom 10C1 eine gleichbleibend biallelische Expression. Die Ähnlichkeit des *Ascl3*-Proteins mit dem *Ascl2*-Protein (35,1%) ist größer als die mit dem *Ascl1*-Protein (25%) (Bahr, 1999) und deutet auf eine engere verwandtschaftliche Beziehung mit dem imprinteten *Ascl2*-Gen hin. Die Regulation der Expression eines Gens durch genomisches Imprinting ist häufig durch seine chromosomale Lokalisation, wie z.B. der Lage innerhalb eines Imprintingclusters mit einer Imprinting-Kontrollregion, festgelegt. Wenn ein imprintetes Gen jedoch nicht in einem Cluster, sondern isoliert liegt, müssen Faktoren, die allein dieses Gen betreffen dafür verantwortlich sein. Möglicherweise spielt die evolutive Herkunft des Gens, wie z.B. eine Entstehung durch Duplikation eines imprinteten Gens, hierbei eine wichtige Rolle. Die Untersuchung der allelspezifischen *Ascl3*-Expression bietet eine gute Möglichkeit, dieser Frage nachzugehen.

Das murine *Ascl3*-Gen wurde von Dr. André Bahr im Rahmen seiner Promotionsarbeit erstmalig beschrieben (Bahr, 1999). Eine Sequenz von 706 Nukleotiden wurden als Teil eines Transkripts 13,5 und 14,5 Tage alter Embryonen identifiziert, die für ein putatives Protein mit 174 Aminosäuren kodiert. Vor dem von 43 Aminosäuren gebildeten HLH-Motiv liegen sechs Aminosäuren (*RKRNER*), die vermutlich eine DNA-bindende Domäne formen. Genomisch wurden zwei Exons identifiziert, von denen das zweite den gesamten kodierenden Teil des Gens enthält (Bahr, 1999).

In der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Bettina Keller konnten neben diesem Transkript, das eine vollständige Länge von 709 Nukleotiden hat (im folgenden als Isoform 3 bezeichnet), noch zwei weitere alternative Transkripte bestehend aus 843 (Isoform 1) und 845 Nukleotiden (Isoform 2) identifiziert werden (siehe auch **Abbildung 3.23**). Diese beiden Transkripte, die in der 5'-UTR variieren, beinhalten ein weiteres Exon 1b, das eine interne Spleißstelle enthält. Der Vorgang des alternativen Spleißens der unreifen RNA scheint für das *Ascl3*-Transkript gewebespezifisch zu sein. Die Isoformen 1 und 3 konnten ausschließlich in der embryonalen und postnatalen Zunge nachgewiesen werden, während die Isoform 2 in Gehirn, Auge, Lunge, Milz, Pankreas, Darm und Harnblase 17,5 Tage alter Embryonen, sowie in Gehirn, Auge, Leber und Magen 14,5 Tage alter Embryonen detektiert wurde. In 11,5 Tage alten Embryonen konnte eine Expression der Isoform 2 im Rumpf festgestellt werden. Während also die Expression des *Ascl3*-Gens in der Embryonalentwicklung über die Spleißform 2 keine stark ausgeprägte Gewebespezifität aufweist, wird sie nach der Geburt auf zwei Gewebe beschränkt: die Zunge, für die zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Expression der Isoformen 1 und 3 nachgewiesen werden konnte, und die Lunge, in der ab spätestens Tag 17,5 pc die Isoform 2 gebildet wird.

Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich deutlich von denen der beiden anderen *Ascl*-Familienmitglieder, weist aber auch einige Gemeinsamkeiten auf. Das murine *Ascl1*-Gen wird vor allem in der frühen Embryonalentwicklung (8,5 bis 10,5 dpc) im Neuroepithel des Mittel- und Vorderhirns, später aber auch unter anderem im gesamten Gehirn (Guillemot et al., 1993), im sich entwickelnden olfaktorischen Epithel (Seta et al., 1999) und in neuroendokrinen Zellen der Lunge exprimiert (Ito et al., 2001). Zumindest in der späteren pränatalen Entwicklung und postnatal könnten sich die Expressionsmuster von *Ascl3* und *Ascl1* daher überschneiden. Eine gemeinsame Expression mit dem *Ascl2*-Gen konnte nicht festgestellt werden, da dessen Produkt mit Ausnahme einer Expression in den Schwannschen Zellen adulter peripherer Nerven (Kury et al., 2002) ausschließlich in extraembryonalen Zellen, vor

allem denen des Synzytiotrophoblasten, gefunden wurde (Alders et al., 1997; Guillemot et al., 1994; Jiang et al., 2000). Da es sich bei den bekannten bHLH-Proteinen in der Regel um Transkriptionsfaktoren handelt, die in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung spielen, ist es wahrscheinlich, dass auch *Ascl3* zu einem bestimmten Zeitpunkt vorwiegend von einem bestimmten Zelltyp gebildet wird. Die Genprodukte der *achaete-scute*-Familie können mit ihren  $\alpha$ -helikalen Abschnitten Protein-Protein-Bindungen eingehen und so mit sich selbst oder bestimmten Partnern, die ebenfalls Mitglieder dieser Familie sein können, Homo- bzw. Heterodimere bilden. Daher ist es auch möglich, dass die Zelltypspezifität erst durch die gemeinsame Expression mit dem Partner entsteht. Die gefundene Expression in Gehirn, Auge, Zunge, Lunge, Milz, Pankreas, Darm, Leber, Magen und Harnblase deutet eher auf die zuletzt genannte Möglichkeit hin.

Mittlerweile wurde die *Ascl3*-Expression auch von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht, die bei der Suche nach Dimerisierungspartnern des humanen E12-Proteins in einem Yeast-Two-Hybrid-Experiment eine Bindung des murinen *Ascl3*-Proteins einer Spermatogonien-cDNA-Bank nachweisen konnten (Yoshida et al., 2001). Sie konnten anhand der Hybridisierung eines Dot-Northern-Blots eine Expression in adulter Speicheldrüse, Hoden und Nebenhoden nachweisen, embryonale Organe wurden dabei nicht einzeln, sondern nur als gesamtembryonale Präparate untersucht. In weiteren Yeast-Two-Hybrid-Experimenten wurde eine Dimerisierung mit vier bekannten Klasse 1-bHLH-Proteinen (E47, E12, Itf2, Alf1, Einteilung nach (Massari und Murre, 2000)) festgestellt. Wesentlich schwächere Signale konnten ebenfalls für eine Homodimerbildung des *Ascl3*-Proteins detektiert werden, und eine Untersuchung der Fähigkeit dieser Homodimere an E-box-Sequenzen zu binden, zeigte im Vergleich mit der einer *Ascl3*-E47-Heterodimerbindung nur eine schwache Affinität (Yoshida et al., 2001). Diese Daten sprechen dafür, dass eine DNA-Bindung des *Ascl3*-Proteins zusammen mit den eher ubiquitär exprimierten E-Proteinen erfolgt, und damit die Zellspezifität nur durch die Expression des *Ascl3*-Gens selbst reguliert würde.

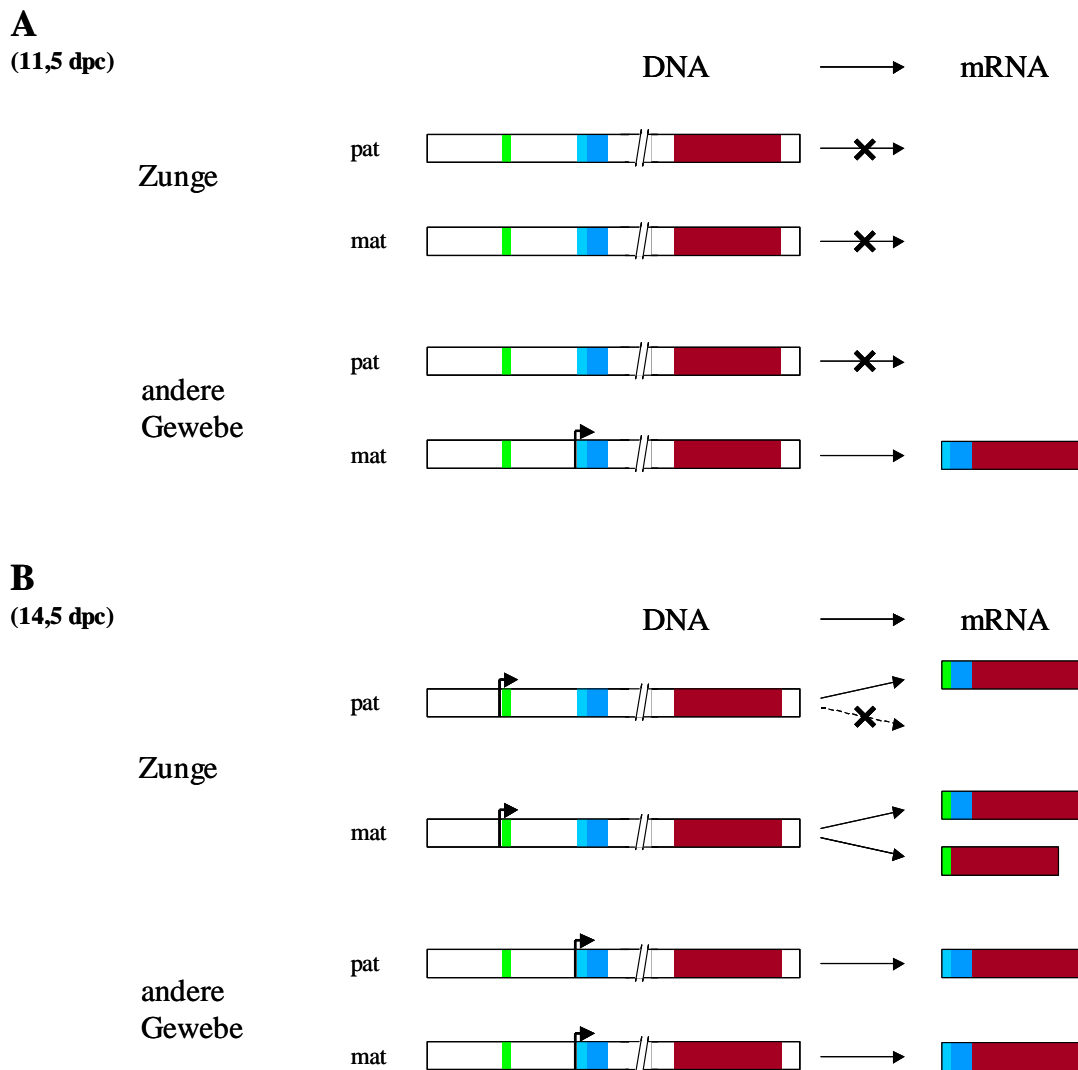
Obwohl bei der ersten Untersuchung der Allelspezifität der *Ascl3*-Expression mit RNA-Präparationen 13,5 und 14,5 Tage alter Gesamtembryonen keine präferentielle Aktivität einer der beiden elterlichen Genkopien festgestellt werden konnte (Bahr, 1999), wurde diese Untersuchung gewebespezifisch auf die Entwicklungszeitpunkte 11,5 dpc, 14,5 dpc, 17,5 dpc und postnatal ausgedehnt. Mit dem Wissen um die Expression der unterschiedlichen Isoformen, und da z.B. für das humane und murine *GRB10/Grb10*-Gen eine unterschiedliche Nutzung der elterlichen Genkopien in Abhängigkeit vom Transkriptionsstart bekannt ist

(Arnaud et al., 2003; Blagitko et al., 2000; Hitchins et al., 2001; Miyoshi et al., 1998), wurden die Amplifikate unter Einbeziehung der alternativen 5'-Regionen spleißformspezifisch generiert. So konnte für die frühen Entwicklungszeitpunkte eine gewebe- und isoformspezifische Inaktivierung des väterlichen *Ascl3*-Allels festgestellt werden, die in späteren Entwicklungsstadien und postnatal aufgehoben zu sein scheint. Es wurde eine ausschließlich vom mütterlichen Allel stammende Expression der Isoform 3 in der Zunge 14,5 Tage alter Embryonen (**Abbildung 3.25**) und der Isoform 2 im Rumpf 11,5 Tage alter Embryonen festgestellt (**Abbildung 3.24**). Spätestens ab dem embryonalen Alter von 17,5 (Zunge) bzw. 14,5 Tagen (alle Gewebe des Rumpfes) erfolgte die Expression dann von beiden elterlichen Chromosomen. Da ab einem Alter von 14,5 Tagen die einzelnen Organe des Rumpfes separat untersucht wurden, ist auch denkbar, dass die in den untersuchten Geweben gefundene biallelische Expression der Isoform 2 nur in Geweben auftritt, die zum Zeitpunkt 11,5 dpc noch keine *Ascl3*-Transkription gezeigt haben, während die monoallelische Expression der früheren Stadien in einem nicht untersuchten Gewebe möglicherweise weiterbesteht. So konnte z.B. für Milz und Pankreas eine (biallelische) Expression der Isoform 2 ab einem embryonalen Alter von 17,5 Tagen nachgewiesen werden, die jedoch zum Zeitpunkt 14,5 dpc nicht untersucht werden konnte, da die Präparation dieser Gewebe keine ausreichenden mRNA-Mengen lieferte. Hier ist eine noch genauere Differenzierung der Expression der Gewebe des Rumpfes erforderlich, bei der alle Gewebe möglichst früh präpariert und zur Erhöhung der RNA-Ausbeute aus mehreren Embryonen gesammelt werden sollten. Leider wurden bei dem Versuch eines Nachweises der embryonalen *Ascl3*-mRNA mittels „Whole-mount-*in situ*-Hybridisierung“ keine Signale im Rumpfbereich 11,5 Tage alter Embryonen detektiert (ohne Abbildung), so dass die mit Hilfe der RT-PCR gefundene Expression nicht genauer einzelnen Geweben zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse der Untersuchung der Allelspezifität der *Ascl3*-Expression sind in **Abbildung 4.4** zusammengefasst.

Vor allem für die Zunge ist eine Interpretation der allelspezifischen Expression bezüglich möglicher Konsequenzen für die Feinregulation der Transkriptpopulation der betroffenen Zellen schwierig. Die beiden gleichzeitig gebildeten Isoformen unterscheiden sich nur durch das Ausspleißen des Exons 1b, so dass die reifen mRNAs alternative 5'-Bereiche besitzen. Ein Effekt auf die folgende Translation wäre möglich, wenn dadurch z.B. mRNA-Destabilisierungssequenzen entstünden oder in ihrer Zugänglichkeit variierten, oder in den alternativen 5'-Bereichen Sequenzen lokalisiert wären, die für die Einleitung der Translation oder die Wanderung der mRNA aus dem Kern eine Rolle spielten. So wäre vorstellbar, dass



das spezifische Fehlen der väterlichen Isoform 3 während der Embryonalentwicklung um den Zeitpunkt 14,5 dpc herum für die *Ascl3*-exprimierenden Zellen der Zunge wesentlich ist. Eine isoformspezifische Quantifizierung der in der Zunge gebildeten *Ascl3*-Transkripte ist jedoch notwendig, um eine Aussage zur Bedeutung des Imprintings hinsichtlich einer *Ascl3*-Dosisregulation machen zu können.



**Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der alternativen Expression der *Ascl3*-Isoformen**

Die Transkription des *Ascl3*-Gens erfolgt gewebeabhängig von zwei alternativen (putativen) Promotoren und ist durch Pfeilspitzen vor den Exons 1a bzw. 1b gekennzeichnet. Bei den primären Transkripten der Zunge kann alternativ mit den Introns auch Exon 1b ausgespleißt werden - die entstehenden Spleißprodukte sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt. Da die *Ascl3*-Expression während der abgebildeten Zeitpunkte 11,5 dpc (A) und 14,5 dpc (B) zum Teil monoallelisch erfolgt, sind die elterlichen Allele (paternal, pat und maternal, mat) und die von ihnen gebildeten Transkripte separat aufgeführt.

In den anderen Geweben, in denen ausschließlich die Isoform 2 gefunden wurde, könnte die Inaktivierung des väterlichen Allels in einer geringeren *Ascl3*-Transkriptmenge resultieren. Auch hier ist für die Einschätzung der Bedeutung der *Ascl3*-Expressionsregulation durch

genomisches Imprinting eine Bestimmung der Transkriptmenge erforderlich. Eine schwache Expression kann vor allem auch allelunspezifisch durch die verminderte Existenz aktivierender Transkriptionsfaktoren entstehen und eine allelspezifische Expression muss im Vergleich zu einer biallelischen nicht zwangsläufig in einer geringeren Transkriptmenge resultieren, wie z.B. für die Expression von *IGF2* und *H19* gezeigt werden konnte (Yballe et al., 1996).

Entscheidend für eine Einordnung der Funktion des putativen *Ascl3*-Proteins ist außerdem die Identifikation potentieller Dimerisierungspartner, deren Existenz aufgrund der Fähigkeit der *achaete-scute*-Proteine zur Bildung von Heterodimeren zu postulieren ist, und die für Speicheldrüsenzellen auch identifiziert wurden (Yoshida et al., 2001). Für die beiden Familienmitglieder *Ascl1* und *Ascl2* sind bisher nur wenige Bindungspartner bekannt, mit denen eine Dimerisierung nachgewiesen werden konnte. Beide sind in der Lage mit dem E-Protein E12 eine Dimerbildung einzugehen und so an E-Box-Motive zu binden (Johnson et al., 1992), es wird jedoch vermutet, dass E12 nicht der Hauptbindungspartner ist, da durch Dimerisierung von *Ascl1* und E12 die Affinität der DNA-Bindung von *Ascl1* nicht signifikant erhöht wird (Meierhan et al., 1995). Sehr wahrscheinlich liegt eine Hauptrolle des *Ascl3*-Proteins in seiner Funktion bei der Entwicklung der Speicheldrüsen. Es wird angenommen, dass *Ascl3* an der Etablierung der Identität und/oder der Differenzierung der Speicheldrüsenkanalzellen beteiligt ist (Yoshida et al., 2001). Diese Vorgänge finden um den Zeitpunkt der Geburt herum und in der ersten Woche danach statt (Poulsen et al., 1986), und es wurde ab dem ersten Tag nach der Geburt eine zunächst schwache, dann stärkere *Ascl3*-Expression in den exkretorischen Speicheldrüsenkanälen detektiert (Yoshida et al., 2001). Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Expression des Gens in verschiedenen Geweben während der Embryonalentwicklung ist eine weitere Rolle für *Ascl3* anzunehmen. Vor allem die Identifizierung verschiedener Isoformen in der embryonalen Zunge, von denen außerdem eine zunächst allelspezifisch, dann aber, wie die andere, biallelisch exprimiert wird, deutet auf eine sensible Einstellung der Proteindosis hin.

Weiterführende Arbeiten zur Klärung der Funktion des *Ascl3*-Gens sollten daher Protein- und DNA-Bindungsstudien beinhalten, die zeigen sollten, ob eine Heterodimerisierung des *Ascl3*-Proteins mit E-Proteinen auch in den embryonalen Geweben stattfindet, oder ob hier eine Bindung an bHLH-Proteine anderer Klassen stattfindet. Dies könnte z.B. durch Koimmunpräzipitationsstudien gewebespezifisch untersucht werden, bei denen die gefundenen Partner durch Test auf bekannte Kandidaten oder durch Ansequenzierung der kopräzipitierten Proteine identifiziert werden könnten. Eine DNA-Bindung eines so identifizierten Dimers könnte in *band-shift*-Analysen überprüft werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte detaillierte *Ascl3*-

Expressionsstudie stellt die Voraussetzung dar, um die Gene potentieller Dimerisierungspartner, die zum gleichen Zeitpunkt in den gleichen Geweben aktiv sind, zu identifizieren.

Dies ist der erste Bericht eines Gens der chromosomalen Region 7E3 der Maus das dem genomischen Imprinting unterliegt. Auch von den dem humanen *ASCL3*-Gen benachbarten orthologen Genen der Bande 11p15.3 ist keine allelspezifische Expression bekannt. Distal des *Ascl3*-Gens liegt ein der Region 11p15.5 orthologes Cluster mit den imprinteten Genen um *Igf2* und *Cdkn1c* (7F5), zentral auf diesem Chromosom (7C) befinden sich die der humanen PWS/AS-Imprintingregion orthologen Gene um *Ube3a* und *Snrpn* und im proximalen Bereich befindet sich ein weiteres Imprintingcluster, zu dem die Gene *Zim1*, *Zim3* und *Peg3* gehören. Beim Menschen wurde außerdem in der chromosomalen Bande 11p15.4 das Zinkfingerogen *ZNF215* identifiziert, das wie *ASCL3/Ascl3* als einziges Gen in seiner Umgebung gewebespezifisch monoallelisch exprimiert wird (Alders et al., 2000; Mannens et al., 1994). *ZNF215* befindet sich auf dem humanen Chromosom 11 ca. 2,15 Mb distal des *ASCL3*-Gens und ca. 4 Mb proximal des letzten als imprintet bekannten Gens des Imprintingclusters in 11p15.5. Bisher konnte jedoch noch kein murines orthologes *Znf215*-Gen identifiziert werden. *Ascl3* ist also das einzige bekannte geprägte Gen proximal des 7F5-Imprinting-Clusters, das noch zu der Syntäniegruppe des distalen Chromosoms 7 der Maus (zwischen *Hras* und *Pth*) gehört.

In direkter Nachbarschaft wurden vier neue putative Gene identifiziert, jeweils zwei distal und proximal des *Ascl3*-Gens, deren Expression noch nicht untersucht ist (Amid et al., 2001). Es ist daher nicht auszuschließen, dass *Ascl3* in einem kleinen Imprintingcluster liegt, welches diese putativen neuen Gene beinhaltet. Sollte das väterliche *Ascl3*-Allel aufgrund der Lage des Gens in *cis* zu regulativen Abschnitte, bzw. der Lokalisation innerhalb einer Domäne, die einer Inaktivierung auf diesem Chromosom unterliegt, in den genannten Geweben und Stadien nicht exprimiert werden, ist zu vermuten, dass auch benachbarte Gene von einer solchen Regulation betroffen sind. Ein weiterer Hinweis auf die Entstehung eines Imprintings in dieser Region ergibt sich aus der stärkeren strukturellen Ähnlichkeit des *Ascl3*-Proteins zu dem ebenfalls monoallelisch exprimierten *Ascl2*-Protein im Vergleich zum biallelisch gebildeten *Ascl1*-Protein: Diesen Befund würde man erwarten, wenn eines der beiden Gene, z.B. durch Duplikation als Folge ungleichen „*cross-overs*“, aus dem anderen entstanden ist. Da die Ähnlichkeit der *Ascl*-Proteine sich vorwiegend auf die bHLH-Domänen beschränkt, ist eine solche Hypothese jedoch nicht durch einen Vergleich der murinen und humanen Familienmitglieder zu be- oder widerlegen. Mit fortschreitender genomischer Sequenzierung

weiterer Säugerspezies und der Identifizierung der orthologen Gene in deren Genom wird es in absehbarer Zeit vielleicht möglich sein, solche evolutiven Prozesse nachzuvollziehen.

## 4.6 Ausblick

Imprintingmutationen, wie der Verlust einer differentiellen Methylierung, als Mitursache einer komplexen Erkrankung, können wertvolle Hinweise auf die Regulationsmechanismen der involvierten Gene liefern. Bei der Pathogenese des Beckwith-Wiedemann Syndroms sind dies vor allem Hyper- und Hypomethylierungen der Imprinting-Kontroll-Regionen. In der *H19/IGF2*-ICR stellt die CTS des B1-Repeats eine differentiell methylierte Region dar, die für die allelspezifische Bindung des Insulatorproteins CTCF eine wichtige Rolle spielt. Es ist jedoch noch unklar, ob die CTCF-Bindung ausschließlich im mütterlichen B1-Repeat erfolgen kann, da alle anderen CTS durch Hypermethylierung blockiert sind, wie von Takai und Mitarbeitern vorgeschlagen (Takai et al., 2001), oder ob eine differentielle Methylierung auch in anderen CTS nachgewiesen werden kann. Eigene Vorarbeiten deuten darauf hin, dass mindestens eine weitere CTS zur differentiellen Bindung von CTCF und damit zur Etablierung des Enhancerblocks beiträgt. Die Aufklärung der allelspezifischen Methylierung der übrigen B-Repeats in der *H19/IGF2*-ICR ist daher eine der zentralen Aufgaben bei der weiteren Analyse dieser Region.

Sind mehrere differentiell methylierte CTS an der Ausbildung eines funktionellen Enhancerblocks beteiligt, kann in Fällen, in denen eine Störung der allelspezifischen *IGF2*-Aktivierung vorliegt, eine Mutation in einem oder mehreren B-Repeats ursächlich sein. Daher schließt sich die Frage an, wieviele und welche CTS zu einer Blockade der Enhancer führen. Mit Hilfe eines von G. Felsenfeld und Mitarbeitern entwickelten Testsystems, bei dem das Neomycin-Resistenzgen unter Kontrolle des humanen  $\gamma$ -Globin-Promotors durch das Einklonieren der zu untersuchenden Sequenz von einem starken Enhancer getrennt wird, kann die Insulatorfunktion der *H19/IGF2*-CTS anhand der Anzahl neomycinresistenter Klone nach stabiler Transfektion in humane K562-Zellen gemessen werden (Du et al., 2003). Eine Insulatorfunktion mit unterschiedlicher Kombination beteiligter CTS kann untersucht werden, indem eine komplette ICR verwendet wird, deren CTCF-Bindesequenzen einzelner B-Repeats zur Simulation ihrer Methylierung durch *in vitro*-Mutagenese verändert wurden. Die Definition der für eine differentielle *IGF2*-Expression notwendigen Komponenten der ICR würde eine Einschätzung der Rolle von (Epi-) Mutationen dieser Region bei der Entstehung u.a. des Beckwith-Wiedemann Syndroms erleichtern.

Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Befunde einer Hypomethylierung der *H19/IGF2*-ICR, die nicht als direkte Ursache einer zum Krankheitsbild führenden, fehlerhaften Genexpression interpretiert werden können, deuten auf eine wichtige Rolle

benachbarter DMRs hin. Eine Untersuchung der bereits identifizierten DMRs in Intron 2 des *IGF2*-Gens und in der Promotorregion des *IGF2-AS-* (*PEG8-*) Gens bei den beschriebenen BWS-Patienten mit ICR-Methylierungsdefekten wird zu weiteren Erkenntnissen über die Rolle der an der allelspezifischen *IGF2/H19*-Expression beteiligten regulativen Abschnitte führen.

Während die Expression der Gene der Chromosomenregion 11p15.5 des Menschen mittlerweile gut untersucht ist, und ihr Imprintingstatus mit wenigen Ausnahmen bekannt ist (vergleiche **Abbildung 1.1**), wird angenommen, dass gesamtgenomisch erst ca. ein Viertel aller allelspezifisch exprimierten Gene identifiziert wurden. Mit der Entdeckung eines geprägten Gens in der dem humanen Abschnitt 11p15.3 orthologen Region 7E3 der Maus stellt sich die Frage, ob es sich hierbei nur um ein einzelnes Gen in einer ansonsten nicht durch genomisches Imprinting betroffenen Umgebung handelt, oder ob es, wie viele andere geprägte Gene, Teil eines Imprintingclusters ist. Die sowohl dem humanen, wie auch murinen *ASCL3-/Ascl3*-Gen benachbarten genomischen Abschnitte wurden von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schmidt und Prof. Dr. T. Hankeln im Rahmen einer vergleichenden Sequenzierung intensiv charakterisiert und eine Reihe neu identifizierter potentieller Gene beschrieben (Amid et al. 2001; Cichutek et al. 2001). Daher sind die Voraussetzungen für eine Untersuchung benachbarter Transkripte auf eine allelspezifische Expression mit Hilfe der etablierten cDNA-Bank gegeben. Bei der Identifikation von *Ascl3*-Transkripten in murinen Speicheldrüsenzellen durch Yoshida und Mitarbeiter wurde eine potentielle Allelspezifität der Genexpression außer Acht gelassen (Yoshida et al., 2001). Da in der vorliegenden Arbeit eine Inaktivierung des väterlichen Allels in Zungengewebe 14,5 Tage alter Embryonen festgestellt werden konnte, sollten die sich anschließenden Untersuchungen des *Ascl3*-Gens die Frage klären, ob bei der Speicheldrüsenentwicklung ebenfalls ein genomisches Imprinting vorliegt.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Imprinting von Genen der Chromosomenregion 11p15.5 des Menschen und des orthologen murinen Abschnitts 7F5 untersucht. Bei der Analyse der humanen Gene *H19*, *IGF2* und *KCNQ1OT1* stand deren Regulation durch differentiell methylierte Regionen und die Identifizierung von Methylierungsfehlern bei Patienten mit Verdacht auf Beckwith-Wiedemann Syndrom im Vordergrund. Hierzu wurden unmethylierte Cytosinnukleotide durch Bisulfitbehandlung chemisch verändert, so dass die allelspezifische Methylierung jedes CpG-Dinukleotids eines PCR-amplifizierten DNA-Fragments mittels Sequenzierung festgestellt werden konnte. Die Identifizierung von SNPs im amplifizierten Bereich ermöglichte die Unterscheidung der elterlichen Sequenzen. Eine Untersuchung der *H19*-Promotorregion, ergab sowohl für die DNAs der Kontrolllymphozyten, wie auch der BWS-Patienten ein sehr variables Methylierungsmuster. Wie bereits für die menschliche Niere beschrieben, ist auch in Lymphozyten die Methylierung der *H19*-Promotorregion wenig allelspezifisch. Daher wurde der Schwerpunkt der Methylierungsuntersuchungen auf die Analyse der *H19/IGF2*-Repeatregion gelegt, und ein die Zielsequenz des CTCF-Proteins überspannender Teil des B1- und A1-Repeats untersucht. Eine spezifische Methylierung des väterlichen B1-Repeats wurde für alle Kontroll- und 20 Patienten-DNAs festgestellt. Jeweils vier DNAs von Patienten, deren einziges gemeinsames Symptom pränataler Überwuchs war, zeigten eine leichte und eine (nahezu) vollständige Hypomethylierung des väterlichen B1-Allels. Für die CpGs des A1-Repeats wurde bei Kontrollpersonen und Patienten eine uneinheitliche Methylierung festgestellt, die von der des B1-Repeats unabhängig war. Die Einordnung dieser Ergebnisse in aktuelle Modelle der Regulation des *IGF2*- und *H19*-Imprintings werden zusammen mit vergleichbaren Befunden bei unterschiedlichen Tumoren diskutiert.

In der zweiten mit BWS assoziierten, proximalen differentiell methylierten Region (KvDMR) wurde ein aus 404 Nukleotiden bestehender DNA-Abschnitt untersucht. Es wurde eine über die bekannte NotI-Schnittstelle hinausgehende allelspezifische Methylierung der ihr benachbarten 36 CpGs von Normalpersonen-DNAs nachgewiesen, jedoch wegen mangelnder Heterogenität des einzigen SNPs des Fragments in BWS-Patienten nicht untersucht.

Um weitere Gene innerhalb des 11p15.5-Imprinting-Clusters zu identifizieren und auf eine dem genomischen Imprinting unterliegende Aktivität zu untersuchen, wurde eine detaillierte gewebe- und entwicklungsspezifische Expressionsanalyse von Kandidatengenen durchgeführt. Da die meisten bei Mensch und Maus bekannten Gene bezüglich der Allelspezifität ihrer Expression identisch sind, wurde diese Untersuchung durch reziproke Kreuzung der

murinen Subspezies JF1 und C57Bl/10 durchgeführt. Hierzu wurde cDNA von je 64 Präparationen unterschiedlicher Gewebe und Entwicklungsstadien hergestellt. Sensitivität und Genauigkeit der gewählten Methode in der Detektion der allelspezifisch differentiellen Transkriptionsstärken wurden anhand der zwei Gene *Igf2r* und *Th*, deren Expressionsmuster bekannt war, ermittelt.

In der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Marion Eßwein wurde u. a. die Expression der drei Gene *Cd81*, *Kcnqlot1* und *Nap114* untersucht. Während das *Cd81*-Gen ab Tag 11,5 pc in allen Geweben eine biallelische Expression zeigte, offenbarte die Untersuchung des *Kcnqlot1*-Gens eine gewebe- und entwicklungsabhängige Inaktivierung des mütterlichen Allels. Das *Nap114*-Gen zeigte in allen Geweben, unabhängig von der parentalen Herkunft der Allele, stammspezifisch unterschiedlich starke Signale der JF1- und C57Bl/10-typischen Sequenzen mit relativen Anteilen der C57Bl/10-Transkripte an der *Nap114*-Expression von ca. 60 bis 85 %. Signifikante Unterschiede im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der reziproken JF1- und C57Bl/10-Kreuzungen schließen jedoch eine zusätzliche Regulation durch genomisches Imprinting nicht aus. Die für diese drei Gene beschriebenen Befunde werden im Rahmen aktueller Imprinting-Modelle dieses Clusters diskutiert.

Zwischen den Genen *Cd81* und *Kcnq1* wurde das *Trpm5*-Gen als neues Mitglied der *Trp*-Genfamilie identifiziert und lokalisiert. Die vollständige cDNA-Sequenz und die Exon-Intron-Struktur des *Trpm5*-Gens wurde ermittelt und die Expression des Gens durch Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen für eine Vielzahl embryonaler, postnataler und adulter Gewebe nachgewiesen. Eine Inaktivierung eines elterlichen Allels durch genomisches Imprinting konnte für alle untersuchten cDNAs ausgeschlossen werden.

In der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit von Bettina Keller wurde die allelspezifische Expression eines zweiten neu identifizierten Gens, das aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit den Genen der „*achaete-scute*“-Familie als *Ascl3* bezeichnet wurde, untersucht. Mittels RT-PCR- und RACE-Experimenten konnten drei *Ascl3*-Isoformen beschrieben werden, von denen zwei ausschließlich in embryonaler und postnataler Zunge und das dritte in einer Reihe von Geweben detektiert wurde. Präparationen des Rumpfes 11,5 Tage alter Embryonen zeigten ausschließlich eine Aktivität des mütterlichen Allels und in der Zunge 14,5 Tage alter Embryonen wurden Transkripte der Isoform 3 nur vom mütterlichen Allel gebildet. Bei den beschriebenen Befunden handelt es sich um den ersten Bericht eines genomisch geprägten Gens in der chromosomalen Region 7E3 der Maus. Mögliche evolutive Entstehungsmechanismen sowie die Bedeutung eines isoformspezifischen Imprintings hinsichtlich Translation und Funktion des putativen Genprodukts werden diskutiert.



## 6. Literaturverzeichnis

### A

- Adam, G. I.; Cui, H.; Miller, S. J.; Flam, F. und Ohlsson, R. (1996)**  
Allele-specific in situ hybridization (ASISH) analysis: a novel technique which resolves differential allelic usage of H19 within the same cell lineage during human placental development  
*Development* 122 (3): 839-847
- Ainscough, J. F.; Dandolo, L. und Surani, M. A. (2000)**  
Appropriate expression of the mouse H19 gene utilises three or more distinct enhancer regions spread over more than 130 kb  
*Mech. Dev.* 91 (1-2): 365-368
- Ainscough, J. F.; Koide, T.; Tada, M.; Barton, S. und Surani, M. A. (1997)**  
Imprinting of Igf2 and H19 from a 130 kb YAC transgene  
*Development* 124 (18): 3621-3632
- Alders, M.; Hodges, M.; Hadjantonakis, A. K.; Postmus, J.; van, Wijk, I.; Blik, J.; de Meulemeester, M.; Westerveld, A.; Guillemot, F.; Oudejans, C.; Little, P. und Mannens, M. (1997)**  
The human Achaete-Scute homologue 2 (ASCL2, HASH2) maps to chromosome 11p15.5, close to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblasts  
*Hum. Mol. Genet.* 6 (6): 859-867
- Alders, M.; Ryan, A.; Hodges, M.; Blik, J.; Feinberg, A. P.; Privitera, O.; Westerveld, A.; Little, P. F. und Mannens, M. (2000)**  
Disruption of a novel imprinted zinc-finger gene, ZNF215, in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Am. J. Hum. Genet.* 66 (5): 1473-1484
- Amid, C.; Bahr, A.; Mujica, A.; Sampson, N.; Bikar, S. E.; Winterpacht, A.; Zabel, B.; Hankeln, T. und Schmidt, E. R. (2001)**  
Comparative genomic sequencing reveals a strikingly similar architecture of a conserved syntenic region on human chromosome 11p15.3 (including gene ST5) and mouse chromosome 7  
*Cytogenet. Cell Genet.* 93 (3-4): 284-290
- Ariel, I.; Ayesh, S.; Perlman, E. J.; Pizov, G.; Tanos, V.; Schneider, T.; Erdmann, V. A.; Podeh, D.; Komitowski, D.; Quasem, A. S.; de Groot, N. und Hochberg, A. (1997)**  
The product of the imprinted H19 gene is an oncofetal RNA  
*Mol. Pathol.* 50 (1): 34-44
- Ariel, I.; de Groot, N. und Hochberg, A. (2000)**  
Imprinted H19 gene expression in embryogenesis and human cancer: the oncofetal connection  
*Am. J. Med. Genet.* 91 (1): 46-50
- Arima, T.; Matsuda, T.; Takagi, N. und Wake, N. (1997)**  
Association of IGF2 and H19 imprinting with choriocarcinoma development  
*Cancer Genet. Cytogenet.* 93 (1): 39-47
- Arnaud, P.; Monk, D.; Hitchins, M.; Gordon, E.; Dean, W.; Beechey, C. V.; Peters, J.; Craigen, W.; Preece, M.; Stanier, P.; Moore, G. E. und Kelsey, G. (2003)**  
Conserved methylation imprints in the human and mouse GRB10 genes with divergent allelic expression suggests differential reading of the same mark  
*Hum. Mol. Genet.* 12 (9): 1005-1019

## B

**Bahr, A. (1999)**

Die molekulare Struktur der Chromosomenregion 11p15.3 des Menschen und des homologen Abschnitts der Maus: Nukleotidsequenz, neue Gene und Interspeziesvergleich  
*Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

**Banerjee, S. und Smallwood, A. (1995)**

A chromatin model of IGF2/H19 imprinting  
*Nat. Genet.* 11 (3): 237-238

**Barlow, D. P.; Stoger, R.; Herrmann, B. G.; Saito, K. und Schweifer, N. (1991)**

The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus  
*Nature* 349 (6304): 84-87

**Bell, A. C. und Felsenfeld, G. (2000)**

Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene  
*Nature* 405 (6785): 482-485

**Bennett, S. T.; Lucassen, A. M.; Gough, S. C.; Powell, E. E.; Undlien, D. E.; Pritchard, L. E.; Merriman, M. E.; Kawaguchi, Y.; Dronsfield, M. J.; Pociot, F. et al. (1995)**

Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus  
*Nat. Genet.* 9 (3): 284-292

**Bestor, T. H. und Tycko, B. (1996)**

Creation of genomic methylation patterns  
*Nat. Genet.* 12 (4): 363-367

**Bird, A.; Taggart, M.; Frommer, M.; Miller, O. J. und Macleod, D. (1985)**

A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA  
*Cell* 40 (1): 91-99

**Bird, A. P. und Wolffe, A. P. (1999)**

Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin  
*Cell* 99 (5): 451-454

**Birnbaumer, L.; Yidirim, E. und Abramowitz, J. (2003)**

A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives  
*Cell Calcium* 33 (5-6): 419-432

**Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979)**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA  
*Nucleic Acids Res.* 7 (6): 1513-1523

**Blagitko, N.; Mergenthaler, S.; Schulz, U.; Wollmann, H. A.; Craigen, W.; Eggermann, T.; Ropers, H. H. und Kalscheuer, V. M. (2000)**

Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion  
*Hum. Mol. Genet.* 9 (11): 1587-1595

**Blik, J.; Maas, S. M.; Ruijter, J. M.; Hennekam, R. C.; Alders, M.; Westerveld, A. und Mannens, M. M. (2001)**

Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS  
*Hum. Mol. Genet.* 10 (5): 467-476

**Bourc'his, D.; Xu, G. L.; Lin, C. S.; Bollman, B. und Bestor, T. H. (2001)**

Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints  
*Science* 294 (5551): 2536-2539

**Brandeis, M.; Frank, D.; Keshet, I.; Siegfried, Z.; Mendelsohn, M.; Nemes, A.; Temper, V.; Razin, A. und Cedar, H. (1994)**

Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation  
*Nature* 371 (6496): 435-438

**Brannan, C. I. und Bartolomei, M. S. (1999)**

Mechanisms of genomic imprinting  
*Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 (2): 164-170

## C

**Caspary, T.; Cleary, M. A.; Baker, C. C.; Guan, X. J. und Tilghman, S. M. (1998)**

Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster  
*Mol. Cell Biol.* 18 (6): 3466-3474

**Catchpoole, D.; Lam, W. W.; Valler, D.; Temple, I. K.; Joyce, J. A.; Reik, W.; Schofield, P. N. und Maher, E. R. (1997)**

Epigenetic modification and uniparental inheritance of H19 in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*J. Med. Genet.* 34 (5): 353-359

**Cichutek, A.; Brueckmann, T.; Seipel, B.; Hauser, H.; Schlaubitz, S.; Prawitt, D.; Hankeln, T.; Schmidt, E. R.; Winterpacht, A. und Zabel, B. U. (2001)**

Comparative architectural aspects of regions of conserved synteny on human chromosome 11p15.3 and mouse chromosome 7 (including genes WEE1 and LMO1)  
*Cytogenet. Cell Genet.* 93 (3-4): 277-283

**Clark, S. J.; Harrison, J. und Frommer, M. (1995)**

CpNpG methylation in mammalian cells  
*Nat. Genet.* 10 (1): 20-27

**Cleary, M. A.; van Raamsdonk, C. D.; Levorse, J.; Zheng, B.; Bradley, A. und Tilghman, S. M. (2001)**

Disruption of an imprinted gene cluster by a targeted chromosomal translocation in mice  
*Nat. Genet.* 29 (1): 78-82

**Coleman, D. L. (1977)**

Genetic control of glucokinase activity in mice  
*Biochem. Genet.* 15 (3-4): 297-305

**Constancia, M.; Hemberger, M.; Hughes, J.; Dean, W.; Ferguson-Smith, A.; Fundele, R.; Stewart, F.; Kelsey, G.; Fowden, A.; Sibley, C. und Reik, W. (2002)**

Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth  
*Nature* 417 (6892): 945-948

**Constancia, M.; Pickard, B.; Kelsey, G. und Reik, W. (1998)**

Imprinting mechanisms  
*Genome Res.* 8 (9): 881-900

**Cooper, M. J.; Fischer, M.; Komitowski, D.; Shevelev, A.; Schulze, E.; Ariel, I.; Tykocinski, M. L.; Miron, S.; Ilan, J.; de Groot, N. und Hochberg, A. (1996)**

Developmentally imprinted genes as markers for bladder tumor progression  
*J. Urol.* 155 (6): 2120-2127

**Cross, S. H. und Bird, A. P. (1995)**

CpG islands and genes  
*Curr. Opin. Genet. Dev.* 5 (3): 309-314

**Cross, S. H.; Meehan, R. R.; Nan, X. und Bird, A. (1997)**

A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins  
*Nat. Genet.* 16 (3): 256-259

**Cui, H.; Horon, I. L.; Ohlsson, R.; Hamilton, S. R. und Feinberg, A. P. (1998)**  
Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability  
*Nat. Med.* 4 (11): 1276-1280

**Cui, H.; Niemitz, E. L.; Ravenel, J. D.; Onyango, P.; Brandenburg, S. A.; Lobanekov, V. V. und Feinberg, A. P. (2001)**  
Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms' tumor commonly involves altered methylation but not mutations of CTCF or its binding site  
*Cancer Res.* 61 (13): 4947-4950

**Cui, H.; Onyango, P.; Brandenburg, S.; Wu, Y.; Hsieh, C. L. und Feinberg, A. P. (2002)**  
Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2  
*Cancer Res.* 62 (22): 6442-6446

## D

**Dao, D.; Frank, D.; Qian, N.; O'Keefe, D.; Vosatka, R. J.; Walsh, C. P. und Tycko, B. (1998)**  
IMPT1, an imprinted gene similar to polyspecific transporter and multi-drug resistance genes  
*Hum. Mol. Genet.* 7 (4): 597-608

**Dao, D.; Walsh, C. P.; Yuan, L.; Gorelov, D.; Feng, L.; Hensle, T.; Nisen, P.; Yamashiro, D. J.; Bestor, T. H. und Tycko, B. (1999)**  
Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7: inclusion of H19/IGF2 in the minimal WT2 region, gene specificity of H19 silencing in Wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of H19 imprinting  
*Hum. Mol. Genet.* 8 (7): 1337-1352

**DeBaun, M. R.; Niemitz, E. L.; McNeil, D. E.; Brandenburg, S. A.; Lee, M. P. und Feinberg, A. P. (2002)**  
Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects  
*Am. J. Hum. Genet.* 70 (3): 604-611

**DeBaun, M. R. und Tucker, M. A. (1998)**  
Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry  
*J. Pediatr.* 132 (3 Pt 1): 398-400

**DeChiara, T. M.; Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1991)**  
Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene  
*Cell* 64 (4): 849-859

**Delgado, S.; Gomez, M.; Bird, A. und Antequera, F. (1998)**  
Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes  
*EMBO J.* 17 (8): 2426-2435

**Deltour, L.; Montagutelli, X.; Guenet, J. L.; Jami, J. und Paldi, A. (1995)**  
Tissue- and developmental stage-specific imprinting of the mouse proinsulin gene, *Ins2*  
*Dev. Biol.* 168 (2): 686-688

**Douc-Rasy, S.; Barrois, M.; Fogel, S.; Ahomadegbe, J. C.; Stehelin, D.; Coll, J. und Riou, G. (1996)**  
High incidence of loss of heterozygosity and abnormal imprinting of H19 and IGF2 genes in invasive cervical carcinomas. Uncoupling of H19 and IGF2 expression and biallelic hypomethylation of H19  
*Oncogene* 12 (2): 423-430

**Drewell, R. A.; Arney, K. L.; Arima, T.; Barton, S. C.; Brenton, J. D. und Surani, M. A. (2002)**  
Novel conserved elements upstream of the H19 gene are transcribed and act as mesodermal enhancers  
*Development* 129 (5): 1205-1213

**Du, M.; Beatty, L. G.; Zhou, W.; Lew, J.; Schoenherr, C.; Weksberg, R. und Sadowski, P. D. (2003)**  
Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5  
*Hum. Mol. Genet.* 12 (15): 1927-1939

**Dunger, D. B.; Ong, K. K.; Huxtable, S. J.; Sherriff, A.; Woods, K. A.; Ahmed, M. L.; Golding, J.; Pembrey, M. E.; Ring, S.; Bennett, S. T. und Todd, J. A. (1998)**

Association of the INS VNTR with size at birth. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood

*Nat. Genet.* 19 (1): 98-100

**Dutly, F.; Baumer, A.; Kayserili, H.; Yuksel-Apak, M.; Zerova, T.; Hebisch, G. und Schinzel, A. (1998)**

Seven cases of Wiedmann-Beckwith syndrome, including the first reported case of mosaic paternal isodisomy along the whole chromosome 11

*Am. J. Med. Genet.* 79 (5): 347-353

**Duvillie, B.; Bucchini, D.; Tang, T.; Jami, J. und Paldi, A. (1998)**

Imprinting at the mouse Ins2 locus: evidence for cis- and trans-allelic interactions

*Genomics* 47 (1): 52-57

## E

**Eicher, E. M. und Shown, E. P. (1993)**

Molecular markers that define the distal ends of mouse autosomes 4, 13, and 19 and the sex chromosomes

*Mamm. Genome* 4 (4): 226-229

**Elliott, M.; Bayly, R.; Cole, T.; Temple, I. K. und Maher, E. R. (1994)**

Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases

*Clin. Genet.* 46 (2): 168-174

**Engel, J. R.; Smallwood, A.; Harper, A.; Higgins, M. J.; Oshimura, M.; Reik, W.; Schofield, P. N. und Maher, E. R. (2000)**

Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome

*J. Med. Genet.* 37 (12): 921-926

**Enklaar, T. (1997)**

Untersuchung des Replikationsmusters von Genen der Chromosomenregion 11p15.5 durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung.

*Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

**Enklaar, T.; Eßwein, M.; Oswald, M.; Hilbert, K.; Winterpacht, A.; Higgins, M.; Zabel, B. und Prawitt, D. (2000)**

Mtr1, a novel biallelically expressed gene in the center of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster, is a member of the Trp gene family

*Genomics* 67 (2): 179-187

**Eßwein, M. (1999)**

Untersuchung der Gewebespezifität des genomischen Imprintings

*Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

## F

**Fatemi, M.; Hermann, A.; Pradhan, S. und Jeltsch, A. (2001)**

The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA

*J. Mol. Biol.* 309 (5): 1189-1199

**Ferguson-Smith, A. C.; Cattanach, B. M.; Barton, S. C.; Beechey, C. V. und Surani, M. A. (1991)**

Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7

*Nature* 351 (6328): 667-670

**Filippova, G. N.; Qi, C. F.; Ulmer, J. E.; Moore, J. M.; Ward, M. D.; Hu, Y. J.; Loukinov, D. I.; Pugacheva, E. M.; Klenova, E. M.; Grundy, P. E.; Feinberg, A. P.; Cleton-Jansen, A. M.; Moerland, E. W.; Cornelisse, C. J.; Suzuki, H.; Komiya, A.; Lindblom, A.; Dorion-Bonnet, F.; Neiman, P. E.; Morse, H. C., III; Collins, S. J. und Lobanenko, V. V. (2002)**

Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity

*Cancer Res.* 62 (1): 48-52

**Fisher, A. M.; Thomas, N. S.; Cockwell, A.; Stecko, O.; Kerr, B.; Temple, I. K. und Clayton, P. (2002)**

Duplications of chromosome 11p15 of maternal origin result in a phenotype that includes growth retardation

*Hum. Genet.* 111 (3): 290-296

**Fitzpatrick, G. V.; Soloway, P. D. und Higgins, M. J. (2002)**

Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1

*Nat. Genet.* 32 (3): 426-431

**Frevel, M. A.; Hornberg, J. J. und Reeve, A. E. (1999a)**

A potential imprint control element: identification of a conserved 42 bp sequence upstream of H19

*Trends Genet.* 15 (6): 216-218

**Frevel, M. A.; Sowerby, S. J.; Petersen, G. B. und Reeve, A. E. (1999b)**

Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms tumor

*J. Biol. Chem.* 274 (41): 29331-29340

**Fukuzawa, R.; Umezawa, A.; Ochi, K.; Urano, F.; Ikeda, H. und Hata, J. (1999)**

High frequency of inactivation of the imprinted H19 gene in "sporadic" hepatoblastoma

*Int. J. Cancer* 82 (4): 490-497

## G

**Gabriel, J. M.; Higgins, M. J.; Gebuhr, T. C.; Shows, T. B.; Saitoh, S. und Nicholls, R. D. (1998)**

A model system to study genomic imprinting of human genes

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (25): 14857-14862

**Gao, Z. H.; Suppola, S.; Liu, J.; Heikkila, P.; Janne, J. und Voutilainen, R. (2002)**

Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors

*J. Clin. Endocrinol. Metab* 87 (3): 1170-1176

**Gardiner-Garden, M. und Frommer, M. (1987)**

CpG islands in vertebrate genomes

*J. Mol. Biol.* 196 (2): 261-282

**Gaston, V.; Le Bouc, Y.; Soupre, V.; Burglen, L.; Donadieu, J.; Oro, H.; Audry, G.; Vazquez, M. P. und Gicquel, C. (2001)**

Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome

*Eur. J. Hum. Genet.* 9 (6): 409-418

**Giannoukakis, N.; Deal, C.; Paquette, J.; Goodyer, C. G. und Polychronakos, C. (1993)**

Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene

*Nat. Genet.* 4 (1): 98-101

**Giannoukakis, N.; Deal, C.; Paquette, J.; Kukulitis, A. und Polychronakos, C. (1996)**

Polymorphic functional imprinting of the human IGF2 gene among individuals, in blood cells, is associated with H19 expression

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220 (3): 1014-1019

**Gicquel, C.; Raffin-Sanson, M. L.; Gaston, V.; Bertagna, X.; Plouin, P. F.; Schlumberger, M.; Louvel, A.; Luton, J. P. und Le Bouc, Y. (1997)**

Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors  
*J. Clin. Endocrinol. Metab* 82 (8): 2559-2565

**Giddings, S. J.; King, C. D.; Harman, K. W.; Flood, J. F. und Carnaghi, L. R. (1994)**

Allele specific inactivation of insulin 1 and 2, in the mouse yolk sac, indicates imprinting  
*Nat. Genet.* 6 (3): 310-313

**Gould, T. D. und Pfeifer, K. (1998)**

Imprinting of mouse Kvlqt1 is developmentally regulated  
*Hum. Mol. Genet.* 7 (3): 483-487

**Guillemot, F.; Caspary, T.; Tilghman, S. M.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Anderson, D. J.; Joyner, A. L.; Rossant, J. und Nagy, A. (1995)**

Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development  
*Nat. Genet.* 9 (3): 235-242

**Guillemot, F.; Lo, L. C.; Johnson, J. E.; Auerbach, A.; Anderson, D. J. und Joyner, A. L. (1993)**

Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons  
*Cell* 75 (3): 463-476

**Guillemot, F.; Nagy, A.; Auerbach, A.; Rossant, J. und Joyner, A. L. (1994)**

Essential role of Mash-2 in extraembryonic development  
*Nature* 371 (6495): 333-336

## H

**Hanahan, D (1985)**

Techniques for transformation in Escherichia coli.  
*DNA cloning I* Glover D.M., (ed)109-135

**Hark, A. T.; Schoenherr, C. J.; Katz, D. J.; Ingram, R. S.; LeVorse, J. M. und Tilghman, S. M. (2000)**

CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus  
*Nature* 405 (6785): 486-489

**Hark, A. T. und Tilghman, S. M. (1998)**

Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark  
*Hum. Mol. Genet.* 7 (12): 1979-1985

**Harteneck, C.; Plant, T. D. und Schultz, G. (2000)**

From worm to man: three subfamilies of TRP channels  
*Trends Neurosci.* 23 (4): 159-166

**Hata, K.; Okano, M.; Lei, H. und Li, E. (2002)**

Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice  
*Development* 129 (8): 1983-1993

**Hatada, I.; Nabetani, A.; Morisaki, H.; Xin, Z.; Ohishi, S.; Tonoki, H.; Niikawa, N.; Inoue, M.; Komoto, Y.; Okada, A.; Steichen, E.; Ohashi, H.; Fukushima, Y.; Nakayama, M. und Mukai, T. (1997)**

New p57KIP2 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Hum. Genet.* 100 (5-6): 681-683

**Hatada, I.; Ohashi, H.; Fukushima, Y.; Kaneko, Y.; Inoue, M.; Komoto, Y.; Okada, A.; Ohishi, S.; Nabetani, A.; Morisaki, H.; Nakayama, M.; Niikawa, N. und Mukai, T. (1996)**

An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Nat. Genet.* 14 (2): 171-173

- Hayward, N. K.; Little, M. H.; Mortimer, R. H.; Clouston, W. M. und Smith, P. J. (1988)**  
Generation of homozygosity at the c-Ha-ras-1 locus on chromosome 11p in an adrenal adenoma from an adult with Wiedemann-Beckwith syndrome  
*Cancer Genet. Cytogenet.* 30 (1): 127-132
- Hemberger, M.; Redies, C.; Krause, R.; Oswald, J.; Walter, J. und Fundele, R. H. (1998)**  
H19 and Igf2 are expressed and differentially imprinted in neuroectoderm-derived cells in the mouse brain  
*Dev. Genes Evol.* 208 (7): 393-402
- Hendrich, B. und Bird, A. (1998)**  
Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins  
*Mol. Cell Biol.* 18 (11): 6538-6547
- Henry, I.; Bonaiti-Pellie, C.; Chehense, V.; Beldjord, C.; Schwartz, C.; Utermann, G. und Junien, C. (1991)**  
Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome  
*Nature* 351 (6328): 665-667
- Henry, I.; Grandjouan, S.; Couillin, P.; Barichard, F.; Huerre-Jeanpierre, C.; Glaser, T.; Philip, T.; Lenoir, G.; Chaussain, J. L. und Junien, C. (1989)**  
Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86 (9): 3247-3251
- Hibi, K.; Nakamura, H.; Hirai, A.; Fujikake, Y.; Kasai, Y.; Akiyama, S.; Ito, K. und Takagi, H. (1996)**  
Loss of H19 imprinting in esophageal cancer  
*Cancer Res.* 56 (3): 480-482
- Hitchins, M. P.; Monk, D.; Bell, G. M.; Ali, Z.; Preece, M. A.; Stanier, P. und Moore, G. E. (2001)**  
Maternal repression of the human GRB10 gene in the developing central nervous system; evaluation of the role for GRB10 in Silver-Russell syndrome  
*Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2): 82-90
- Hoovers, J. M.; Kalikin, L. M.; Johnson, L. A.; Alders, M.; Redeker, B.; Law, D. J.; Blik, J.; Steenman, M.; Benedict, M.; Wiegant, J.; Lengauer, C.; Taillon-Miller, P.; Schlessinger, D.; Edwards, M. C.; Elledge, S. J.; Ivens, A.; Westerveld, A.; Little, P.; Mannens, M. und Feinberg, A. P. (1995)**  
Multiple genetic loci within 11p15 defined by Beckwith-Wiedemann syndrome rearrangement breakpoints and subchromosomal transferable fragments  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92 (26): 12456-12460
- Hori, N.; Nakano, H.; Takeuchi, T.; Kato, H.; Hamaguchi, S.; Oshimura, M. und Sato, K. (2002)**  
A dyad oct-binding sequence functions as a maintenance sequence for the unmethylated state within the H19/Igf2-imprinted control region  
*J. Biol. Chem.* 277 (31): 27960-27967
- Horike, S.; Mitsuya, K.; Meguro, M.; Kotobuki, N.; Kashiwagi, A.; Notsu, T.; Schulz, T. C.; Shirayoshi, Y. und Oshimura, M. (2000)**  
Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Hum. Mol. Genet.* 9 (14): 2075-2083
- Howe, M.; Dimitri, P.; Berloco, M. und Wakimoto, B. T. (1995)**  
Cis-effects of heterochromatin on heterochromatic and euchromatic gene activity in *Drosophila melanogaster*  
*Genetics* 140 (3): 1033-1045
- Hu, J. F.; Oruganti, H.; Vu, T. H. und Hoffman, A. R. (1998)**  
Tissue-specific imprinting of the mouse insulin-like growth factor II receptor gene correlates with differential allele-specific DNA methylation  
*Mol. Endocrinol.* 12 (2): 220-232



**Hu, R. J.; Lee, M. P.; Johnson, L. A. und Feinberg, A. P. (1996)**

A novel human homologue of yeast nucleosome assembly protein, 65 kb centromeric to the p57KIP2 gene, is biallelically expressed in fetal and adult tissues

*Hum. Mol. Genet.* 5 (11): 1743-1748

**I****Ivesmaki, V.; Kahri, A. I.; Miettinen, P. J. und Voutilainen, R. (1993)**

Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas

*J. Clin. Endocrinol. Metab* 77 (3): 852-858

**Issa, J. P. (2002)**

Epigenetic variation and human disease

*J. Nutr.* 132 (8): 2388S-2392S

**Ito, T.; Udaka, N.; Ikeda, M.; Yazawa, T.; Kageyama, R. und Kitamura, H. (2001)**

Significance of proneural basic helix-loop-helix transcription factors in neuroendocrine differentiation of fetal lung epithelial cells and lung carcinoma cells

*Histol. Histopathol.* 16 (1): 335-343

**Itoh, N.; Becroft, D. M.; Reeve, A. E. und Morison, I. M. (2000)**

Proportion of cells with paternal 11p15 uniparental disomy correlates with organ enlargement in Wiedemann-beckwith syndrome

*Am. J. Med. Genet.* 92 (2): 111-116

**J****James, P. A.; Lavender, F. L.; Lawrence, G. M. und Walker, D. G. (1985)**

Comparison of glucokinase in C3H/He and C58 mice that differ in their hepatic activity

*Biochem. Genet.* 23 (7-8): 525-538

**Jerome, C. A.; Scherer, S. W.; Tsui, L. C.; Gietz, R. D. und Triggs-Raine, B. (1997)**

Assignment of growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10) to human chromosome 7p11.2-p12

*Genomics* 40 (1): 215-216

**Jiang, B.; Kamat, A. und Mendelson, C. R. (2000)**

Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian achaete-scute homologous protein-2)

*Mol. Endocrinol.* 14 (10): 1661-1673

**Jiang, S.; Hemann, M. A.; Lee, M. P. und Feinberg, A. P. (1998)**

Strain-dependent developmental relaxation of imprinting of an endogenous mouse gene, Kvlqt1

*Genomics* 53 (3): 395-399

**Jinno, Y.; Ikeda, Y.; Yun, K.; Maw, M.; Masuzaki, H.; Fukuda, H.; Inuzuka, K.; Fujishita, A.; Ohtani, Y.; Okimoto, T. und . (1995)**

Establishment of functional imprinting of the H19 gene in human developing placentae

*Nat. Genet.* 10 (3): 318-324

**Jinno, Y.; Sengoku, K.; Nakao, M.; Tamate, K.; Miyamoto, T.; Matsuzaka, T.; Sutcliffe, J. S.; Anan, T.; Takuma, N.; Nishiwaki, K.; Ikeda, Y.; Ishimaru, T.; Ishikawa, M. und Niikawa, N. (1996)**

Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus

*Hum. Mol. Genet.* 5 (8): 1155-1161

**John, R. M.; Ainscough, J. F.; Barton, S. C. und Surani, M. A. (2001)**

Distant cis-elements regulate imprinted expression of the mouse p57( Kip2) (Cdkn1c) gene: implications for the human disorder, Beckwith--Wiedemann syndrome

*Hum. Mol. Genet.* 10 (15): 1601-1609

**Johnson, J. E.; Birren, S. J.; Saito, T. und Anderson, D. J. (1992)**

DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 (8): 3596-3600

**Joubel, A.; Cury, J. J.; Pelczar, H.; Begue, A.; Lagrou, C.; Stehelin, D. und Coll, J. (1996)**

The 5' part of the human H19 RNA contains cis-acting elements hampering its translatability  
*Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 42 (8): 1159-1172

**Joyce, J. A.; Lam, W. K.; Catchpoole, D. J.; Jenks, P.; Reik, W.; Maher, E. R. und Schofield, P. N. (1997)**

Imprinting of IGF2 and H19: lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Hum. Mol. Genet.* 6 (9): 1543-1548

**Juan, V.; Crain, C. und Wilson, C. (2000)**

Evidence for evolutionarily conserved secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA  
*Nucleic Acids Res.* 28 (5): 1221-1227

**K****Kaffer, C. R.; Srivastava, M.; Park, K. Y.; Ives, E.; Hsieh, S.; Battle, J.; Grinberg, A.; Huang, S. P. und Pfeifer, K. (2000)**

A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 locus  
*Genes Dev.* 14 (15): 1908-1919

**Kalscheuer, V. M.; Mariman, E. C.; Schepens, M. T.; Rehder, H. und Ropers, H. H. (1993)**

The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans  
*Nat. Genet.* 5 (1): 74-78

**Kanduri, C.; Fitzpatrick, G.; Mukhopadhyay, R.; Kanduri, M.; Lobanenkova, V.; Higgins, M. und Ohlsson, R. (2002)**

A differentially methylated imprinting control region within the Kcnq1 locus harbors a methylation-sensitive chromatin insulator  
*J. Biol. Chem.* 277 (20): 18106-18110

**Kanduri, C.; Pant, V.; Loukinov, D.; Pugacheva, E.; Qi, C. F.; Wolffe, A.; Ohlsson, R. und Lobanenkova, V. V. (2000)**

Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive  
*Curr. Biol.* 10 (14): 853-856

**Keller, B. (2001)**

Die allelspezifische Expression des murinen *Ascl3*-Gens während der Embryonalentwicklung  
*Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

**Kim, H. T.; Choi, B. H.; Niikawa, N.; Lee, T. S. und Chang, S. I. (1998)**

Frequent loss of imprinting of the H19 and IGF-II genes in ovarian tumors  
*Am. J. Med. Genet.* 80 (4): 391-395

**Kitsberg, D.; Selig, S.; Brandeis, M.; Simon, I.; Keshet, I.; Driscoll, D. J.; Nicholls, R. D. und Cedar, H. (1993)**

Allele-specific replication timing of imprinted gene regions  
*Nature* 364 (6436): 459-463

**Klenova, E.; Morse, H.; Ohlsson, R. und Lobanenkova, V. (2002)**

The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer  
*Semin. Cancer Biol.* 12 (5): 399-414

**Koide, T.; Moriwaki, K.; Uchida, K.; Mita, A.; Sagai, T.; Yonekawa, H.; Katoh, H.; Miyashita, N.; Tsuchiya, K.; Nielsen, T. J. und Shiroishi, T. (1998)**

A new inbred strain JF1 established from Japanese fancy mouse carrying the classic piebald allele  
*Mamm. Genome* 9 (1): 15-19

**Kondo, M.; Suzuki, H.; Ueda, R.; Osada, H.; Takagi, K.; Takahashi, T. und Takahashi, T. (1995)**  
Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers  
*Oncogene* 10 (6): 1193-1198

**Kono, T.; Sotomaru, Y.; Katsuzawa, Y. und Dandolo, L. (2002)**  
Mouse parthenogenetic embryos with monoallelic H19 expression can develop to day 17.5 of gestation  
*Dev. Biol.* 243 (2): 294-300

**Kozak, M. (1991)**  
An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control  
*J. Cell Biol.* 115 (4): 887-903

**Kozak, M. (1996)**  
Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation  
*Mamm. Genome* 7 (8): 563-574

**Kury, P.; Greiner-Petter, R.; Cornely, C.; Jurgens, T. und Muller, H. W. (2002)**  
Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells  
*J. Neurosci.* 22 (17): 7586-7595

## L

**Lam, W. W.; Hatada, I.; Ohishi, S.; Mukai, T.; Joyce, J. A.; Cole, T. R.; Donnai, D.; Reik, W.; Schofield, P. N. und Maher, E. R. (1999)**  
Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation  
*J. Med. Genet.* 36 (7): 518-523

**Launay, P.; Fleig, A.; Perraud, A. L.; Scharenberg, A. M.; Penner, R. und Kinet, J. P. (2002)**  
TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization  
*Cell* 109 (3): 397-407

**Lavender, F. L.; James, P. A. und Walker, D. G. (1983)**  
Hepatic glucokinase activity and circulating insulin concentrations in two inbred mouse strains  
*Diabetologia* 25 (2): 114-119

**Lee, L. G.; Connell, C. R.; Woo, S. L.; Cheng, R. D.; McArdle, B. F.; Fuller, C. W.; Halloran, N. D. und Wilson, R. K. (1992)**  
DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments  
*Nucleic Acids Res.* 20 (10): 2471-2483

**Lee, M. P.; DeBaun, M.; Randhawa, G.; Reichard, B. A.; Elledge, S. J. und Feinberg, A. P. (1997a)**  
Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Am. J. Hum. Genet.* 61 (2): 304-309

**Lee, M. P.; DeBaun, M. R.; Mitsuya, K.; Galonek, H. L.; Brandenburg, S.; Oshimura, M. und Feinberg, A. P. (1999)**  
Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (9): 5203-5208

**Lee, M. P.; Hu, R. J.; Johnson, L. A. und Feinberg, A. P. (1997b)**  
Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements  
*Nat. Genet.* 15 (2): 181-185

**Lee, M. P.; Ravenel, J. D.; Hu, R. J.; Lustig, L. R.; Tomaselli, G.; Berger, R. D.; Brandenburg, S. A.; Litz, T. J.; Bunton, T. E.; Limb, C.; Francis, H.; Gorelikow, M.; Gu, H.; Washington, K.; Argani, P.; Goldenring, J. R.; Coffey, R. J. und Feinberg, A. P. (2000)**

Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice  
*J. Clin. Invest* 106 (12): 1447-1455

**Leibovitch, M. P.; Nguyen, V. C.; Gross, M. S.; Solhonne, B.; Leibovitch, S. A. und Bernheim, A. (1991)**

The human ASM (adult skeletal muscle) gene: expression and chromosomal assignment to 11p15  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180 (3): 1241-1250

**Leighton, P. A.; Ingram, R. S.; Eggenschwiler, J.; Efstratiadis, A. und Tilghman, S. M. (1995a)**

Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice  
*Nature* 375 (6526): 34-39

**Leighton, P. A.; Saam, J. R.; Ingram, R. S.; Stewart, C. L. und Tilghman, S. M. (1995b)**

An enhancer deletion affects both H19 and *Igf* expression  
*Genes Dev.* 9 (17): 2079-2089

**Lerchner, W. und Barlow, D. P. (1997)**

Paternal repression of the imprinted mouse *Igf2r* locus occurs during implantation and is stable in all tissues of the post-implantation mouse embryo  
*Mech. Dev.* 61 (1-2): 141-149

**Li, E.; Beard, C. und Jaenisch, R. (1993)**

Role for DNA methylation in genomic imprinting  
*Nature* 366 (6453): 362-365

**Li, M.; Squire, J.; Shuman, C.; Fei, Y. L.; Atkin, J.; Pauli, R.; Smith, A.; Nishikawa, J.; Chitayat, D. und Weksberg, R. (2001)**

Imprinting status of 11p15 genes in Beckwith-Wiedemann syndrome patients with CDKN1C mutations  
*Genomics* 74 (3): 370-376

**Li, Y. M.; Franklin, G.; Cui, H. M.; Svensson, K.; He, X. B.; Adam, G.; Ohlsson, R. und Pfeifer, S. (1998)**

The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans  
*J. Biol. Chem.* 273 (43): 28247-28252

**Little, M. H.; Thomson, D. B.; Hayward, N. K. und Smith, P. J. (1988)**

Loss of alleles on the short arm of chromosome 11 in a hepatoblastoma from a child with Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Hum. Genet.* 79 (2): 186-189

**Liu, D. und Liman, E. R. (2003)**

Intracellular  $Ca^{2+}$  and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (25): 15160-15165

**Liu, J.; Kahri, A. I.; Heikkila, P.; Ilvesmaki, V. und Voutilainen, R. (1995)**

H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells  
*J. Clin. Endocrinol. Metab* 80 (2): 492-496

**Lo, L. C.; Johnson, J. E.; Wuenschell, C. W.; Saito, T. und Anderson, D. J. (1991)**

Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells  
*Genes Dev.* 5 (9): 1524-1537

## M

**Magnuson, M. A. (1990)**

Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies  
*Diabetes* 39 (5): 523-527

- Malone, C. S.; Miner, M. D.; Doerr, J. R.; Jackson, J. P.; Jacobsen, S. E.; Wall, R. und Teitell, M. (2001)**  
CmC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (18): 10404-10409
- Mancini-DiNardo, D.; Steele, S. J.; Ingram, R. S. und Tilghman, S. M. (2003)**  
A differentially methylated region within the gene *Kcnq1* functions as an imprinted promoter and silencer  
*Hum. Mol. Genet.* 12 (3): 283-294
- Mann, J. R. (2001)**  
Imprinting in the germ line  
*Stem Cells* 19 (4): 287-294
- Mannens, M.; Hoovers, J. M.; Redeker, E.; Verjaal, M.; Feinberg, A. P.; Little, P.; Boavida, M.; Coad, N.; Steenman, M.; Blik, J. et al. (1994)**  
Parental imprinting of human chromosome region 11p15.3-pter involved in the Beckwith-Wiedemann syndrome and various human neoplasia  
*Eur. J. Hum. Genet.* 2 (1): 3-23
- Mannens, M.; Slater, R. M.; Heyting, C.; Geurts, van Kessel; Goedde-Salz, E.; Frants, R. R.; Van Ommen, G. J. und Pearson, P. L. (1987)**  
Regional localization of DNA probes on the short arm of chromosome 11 using aniridia-Wilms' tumor-associated deletions  
*Hum. Genet.* 75 (2): 180-187
- Massari, M. E. und Murre, C. (2000)**  
Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms  
*Mol. Cell Biol.* 20 (2): 429-440
- Matsuoka, S.; Edwards, M. C.; Bai, C.; Parker, S.; Zhang, P.; Baldini, A.; Harper, J. W. und Elledge, S. J. (1995)**  
p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene  
*Genes Dev.* 9 (6): 650-662
- McGrath, J. und Solter, D. (1984)**  
Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes  
*Cell* 37 (1): 179-183
- Meierhan, D.; el Ariss, C.; Neuenschwander, M.; Sieber, M.; Stackhouse, J. F. und Allemann, R. K. (1995)**  
DNA binding specificity of the basic-helix-loop-helix protein MASH-1  
*Biochemistry* 34 (35): 11026-11036
- Mitsuya, K.; Meguro, M.; Lee, M. P.; Katoh, M.; Schulz, T. C.; Kugoh, H.; Yoshida, M. A.; Niikawa, N.; Feinberg, A. P. und Oshimura, M. (1999)**  
LIT1, an imprinted antisense RNA in the human *KvLQT1* locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids  
*Hum. Mol. Genet.* 8 (7): 1209-1217
- Miyoshi, N.; Kuroiwa, Y.; Kohda, T.; Shitara, H.; Yonekawa, H.; Kawabe, T.; Hasegawa, H.; Barton, S. C.; Surani, M. A.; Kaneko-Ishino, T. und Ishino, F. (1998)**  
Identification of the *Meg1/Grb10* imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (3): 1102-1107
- Monk, M. (1995)**  
Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution  
*Dev. Genet.* 17 (3): 188-197

**Montell, C.; Birnbaumer, L.; Flockerzi, V.; Bindels, R. J.; Bruford, E. A.; Caterina, M. J.; Clapham, D. E.; Harteneck, C.; Heller, S.; Julius, D.; Kojima, I.; Mori, Y.; Penner, R.; Prawitt, D.; Scharenberg, A. M.; Schultz, G.; Shimizu, N. und Zhu, M. X. (2002)**

A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels  
*Mol. Cell* 9 (2): 229-231

**Moore, G. E.; Abu-Amero, S. N.; Bell, G.; Wakeling, E. L.; Kingsnorth, A.; Stanier, P.; Jauniaux, E. und Bennett, S. T. (2001)**

Evidence that insulin is imprinted in the human yolk sac  
*Diabetes* 50 (1): 199-203

**Morison, I. M.; Becroft, D. M.; Taniguchi, T.; Woods, C. G. und Reeve, A. E. (1996)**

Somatic overgrowth associated with overexpression of insulin-like growth factor II  
*Nat. Med.* 2 (3): 311-316

**Moulton, T.; Crenshaw, T.; Hao, Y.; Moosikasuwana, J.; Lin, N.; Dembitzer, F.; Hensle, T.; Weiss, L.; McMorrow, L.; Loew, T. et al. (1994)**

Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients  
*Nat. Genet.* 7 (3): 440-447

## N

**Nakagawa, H.; Chadwick, R. B.; Peltomaki, P.; Plass, C.; Nakamura, Y. und de La, Chapelle A. (2001)**

Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (2): 591-596

**Neyroud, N.; Tesson, F.; Denjoy, I.; Leibovici, M.; Donger, C.; Barhanin, J.; Faure, S.; Gary, F.; Coumel, P.; Petit, C.; Schwartz, K. und Guicheney, P. (1997)**

A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome  
*Nat. Genet.* 15 (2): 186-189

## O

**O'Keefe, D.; Dao, D.; Zhao, L.; Sanderson, R.; Warburton, D.; Weiss, L.; Anyane-Yeboah, K. und Tycko, B. (1997)**

Coding mutations in p57KIP2 are present in some cases of Beckwith-Wiedemann syndrome but are rare or absent in Wilms tumors  
*Am. J. Hum. Genet.* 61 (2): 295-303

**Ohta, T.; Gray, T. A.; Rogan, P. K.; Buiting, K.; Gabriel, J. M.; Saitoh, S.; Muralidhar, B.; Bilienska, B.; Krajewska-Walasek, M.; Driscoll, D. J.; Horsthemke, B.; Butler, M. G. und Nicholls, R. D. (1999)**

Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome  
*Am. J. Hum. Genet.* 64 (2): 397-413

**Okamoto, K.; Morison, I. M.; Taniguchi, T. und Reeve, A. E. (1997)**

Epigenetic changes at the insulin-like growth factor II/H19 locus in developing kidney is an early event in Wilms tumorigenesis  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94 (10): 5367-5371

**Okamura, K.; Hagiwara-Takeuchi, Y.; Li, T.; Vu, T. H.; Hirai, M.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Hoffman, A. R. und Ito, T. (2000)**

Comparative genome analysis of the mouse imprinted gene impact and its nonimprinted human homolog IMPACT: toward the structural basis for species-specific imprinting  
*Genome Res.* 10 (12): 1878-1889

**Olek, A. und Walter, J. (1997)**

The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint  
*Nat. Genet.* 17 (3): 275-276

**Ong, K. K.; Phillips, D. I.; Fall, C.; Poulton, J.; Bennett, S. T.; Golding, J.; Todd, J. A. und Dunger, D. B. (1999)**

The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight  
*Nat. Genet.* 21 (3): 262-263

## P

**Pachnis, V.; Brannan, C. I. und Tilghman, S. M. (1988)**

The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis  
*EMBO J.* 7 (3): 673-681

**Paquette, J.; Giannoukakis, N.; Polychronakos, C.; Vafiadis, P. und Deal, C. (1998)**

The INS 5' variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans  
*J. Biol. Chem.* 273 (23): 14158-14164

**Paulsen, M.; Davies, K. R.; Bowden, L. M.; Villar, A. J.; Franck, O.; Fuermann, M.; Dean, W. L.; Moore, T. F.; Rodrigues, N.; Davies, K. E.; Hu, R. J.; Feinberg, A. P.; Maher, E. R.; Reik, W. und Walter, J. (1998)**

Syntenic organization of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster and the Beckwith-Wiedemann syndrome region in chromosome 11p15.5  
*Hum. Mol. Genet.* 7 (7): 1149-1159

**Paulsen, M.; El Maarri, O.; Engemann, S.; Strodicke, M.; Franck, O.; Davies, K.; Reinhardt, R.; Reik, W. und Walter, J. (2000)**

Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse  
*Hum. Mol. Genet.* 9 (12): 1829-1841

**Paulsen, M.; Takada, S.; Youngson, N. A.; Benchaib, M.; Charlier, C.; Segers, K.; Georges, M. und Ferguson-Smith, A. C. (2001)**

Comparative sequence analysis of the imprinted Dlk1-Gtl2 locus in three mammalian species reveals highly conserved genomic elements and refines comparison with the Igf2-H19 region  
*Genome Res.* 11 (12): 2085-2094

**Pearsall, R. S.; Shibata, H.; Brozowska, A.; Yoshino, K.; Okuda, K.; deJong, P. J.; Plass, C.; Chapman, V. M.; Hayashizaki, Y. und Held, W. A. (1996)**

Absence of imprinting in U2AFBPL, a human homologue of the imprinted mouse gene U2afp-rs  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222 (1): 171-177

**Perez, C. A.; Huang, L.; Rong, M.; Kozak, J. A.; Preuss, A. K.; Zhang, H.; Max, M. und Margolskee, R. F. (2002)**

A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells  
*Nat. Neurosci.* 5 (11): 1169-1176

**Pfeifer, K. (2000)**

Mechanisms of genomic imprinting  
*Am. J. Hum. Genet.* 67 (4): 777-787

**Pfeifer, K.; Leighton, P. A. und Tilghman, S. M. (1996)**

The structural H19 gene is required for transgene imprinting  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (24): 13876-13883

**Plass, C.; Shibata, H.; Kalcheva, I.; Mullins, L.; Kotelevtseva, N.; Mullins, J.; Kato, R.; Sasaki, H.; Hirotsume, S.; Okazaki, Y.; Held, W. A.; Hayashizaki, Y. und Chapman, V. M. (1996)**

Identification of Grf1 on mouse chromosome 9 as an imprinted gene by RLGS-M  
*Nat. Genet.* 14 (1): 106-109

**Plass, C. und Soloway, P. D. (2002)**

DNA methylation, imprinting and cancer  
*Eur. J. Hum. Genet.* 10 (1): 6-16

**Poirier, F.; Chan, C. T.; Timmons, P. M.; Robertson, E. J.; Evans, M. J. und Rigby, P. W. (1991)**  
The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo  
*Development* 113 (4): 1105-1114

**Ponger, L.; Duret, L. und Mouchiroud, D. (2001)**  
Determinants of CpG islands: expression in early embryo and isochore structure  
*Genome Res.* 11 (11): 1854-1860

**Poulsen, K.; Jakobsen, B. K.; Mikkelsen, B. M.; Harmark, K.; Nielsen, J. T. und Hjorth, J. P. (1986)**  
Coordination of murine parotid secretory protein and salivary amylase expression  
*EMBO J.* 5 (8): 1891-1896

**Prawitt, D. (1999)**  
Identifizierung genetischer Faktoren der Tumorprädisposition in der Chromosomenregion 11p15  
*Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

**Prawitt, D.; Enklaar, T.; Klemm, G.; Gartner, B.; Spangenberg, C.; Winterpacht, A.; Higgins, M.; Pelletier, J. und Zabel, B. (2000)**  
Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression  
*Hum. Mol. Genet.* 9 (2): 203-216

**Prawitt, D.; Monteilh-Zoller, M. K.; Brixel, L.; Spangenberg, C.; Zabel, B.; Fleig, A. und Penner, R. (2003)**  
TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (25): 15166-15171

## Q

**Qian, N.; Frank, D.; O'Keefe, D.; Dao, D.; Zhao, L.; Yuan, L.; Wang, Q.; Keating, M.; Walsh, C. und Tycko, B. (1997)**  
The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis  
*Hum. Mol. Genet.* 6 (12): 2021-2029

## R

**Razin, A. und Cedar, H. (1994)**  
DNA methylation and genomic imprinting  
*Cell* 77 (4): 473-476

**Razin, A. und Riggs, A. D. (1980)**  
DNA methylation and gene function  
*Science* 210 (4470): 604-610

**Reik, W.; Brown, K. W.; Schneid, H.; Le Bouc, Y.; Bickmore, W. und Maher, E. R. (1995)**  
Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain  
*Hum. Mol. Genet.* 4 (12): 2379-2385

**Reik, W.; Brown, K. W.; Slatter, R. E.; Sartori, P.; Elliott, M. und Maher, E. R. (1994)**  
Allelic methylation of H19 and IGF2 in the Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Hum. Mol. Genet.* 3 (8): 1297-1301

**Reik, W.; Dean, W. und Walter, J. (2001)**  
Epigenetic reprogramming in mammalian development  
*Science* 293 (5532): 1089-1093



**Riesewijk, A. M.; Schepens, M. T.; Mariman, E. M.; Ropers, H. H. und Kalscheuer, V. M. (1996)**  
The MAS proto-oncogene is not imprinted in humans  
*Genomics* 35 (2): 380-382

## S

**Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988)**  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase  
*Science* 239 (4839): 487-491

**Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977)**  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74 (12): 5463-5467

**Santos, F.; Hendrich, B.; Reik, W. und Dean, W. (2002)**  
Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo  
*Dev. Biol.* 241 (1): 172-182

**Schofield, P. N.; Joyce, J. A.; Lam, W. K.; Grandjean, V.; Ferguson-Smith, A.; Reik, W. und Maher, E. R. (2001)**  
Genomic imprinting and cancer; new paradigms in the genetics of neoplasia  
*Toxicol. Lett.* 120 (1-3): 151-160

**Seta, Y.; Toyono, T.; Takeda, S. und Toyoshima, K. (1999)**  
Expression of Mash1 in basal cells of rat circumvallate taste buds is dependent upon gustatory innervation  
*FEBS Lett.* 444 (1): 43-46

**Shows, T. B.; Alders, M.; Bennett, S.; Burbee, D.; Cartwright, P.; Chandrasekharappa, S.; Cooper, P.; Courseaux, A.; Davies, C.; Devignes, M. D.; Devilee, P.; Elliott, R.; Evans, G.; Fantes, J.; Garner, H.; Gaudray, P.; Gerhard, D. S.; Gessler, M.; Higgins, M.; Hummerich, H.; James, M.; Lagercrantz, J.; Litt, M.; Little, P.; Zabel, B. et al. (1996)**  
Report of the Fifth International Workshop on Human Chromosome 11 Mapping 1996  
*Cytogenet. Cell Genet.* 74 (1-2): 1-56

**Sleutels, F.; Zwart, R. und Barlow, D. P. (2002)**  
The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes  
*Nature* 415 (6873): 810-813

**Smilnich, N. J.; Day, C. D.; Fitzpatrick, G. V.; Caldwell, G. M.; Lossie, A. C.; Cooper, P. R.; Smallwood, A. C.; Joyce, J. A.; Schofield, P. N.; Reik, W.; Nicholls, R. D.; Weksberg, R.; Driscoll, D. J.; Maher, E. R.; Shows, T. B. und Higgins, M. J. (1999)**  
A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (14): 8064-8069

**Squire, J. und Weksberg, R. (1996)**  
Genomic imprinting in tumours  
*Semin. Cancer Biol.* 7 (1): 41-47

**Steenman, M. J.; Rainier, S.; Dobry, C. J.; Grundy, P.; Horon, I. L. und Feinberg, A. P. (1994)**  
Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour  
*Nat. Genet.* 7 (3): 433-439

**Strichman-Almashanu, L. Z.; Lee, R. S.; Onyango, P. O.; Perlman, E.; Flam, F.; Frieman, M. B. und Feinberg, A. P. (2002)**  
A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes  
*Genome Res.* 12 (4): 543-554

**Sullivan, M. J.; Taniguchi, T.; Jhee, A.; Kerr, N. und Reeve, A. E. (1999)**

Relaxation of IGF2 imprinting in Wilms tumours associated with specific changes in IGF2 methylation  
*Oncogene* 18 (52): 7527-7534

**Sun, F. L.; Dean, W. L.; Kelsey, G.; Allen, N. D. und Reik, W. (1997)**

Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Nature* 389 (6653): 809-815

**Suzuki, H.; Veda, R.; Takahashi, T. und Takahashi, T. (1994)**

Altered imprinting in lung cancer  
*Nat. Genet.* 6 (4): 332-333

**Svensson, K.; Walsh, C.; Fundele, R. und Ohlsson, R. (1995)**

H19 is imprinted in the choroid plexus and leptomeninges of the mouse foetus  
*Mech. Dev.* 51 (1): 31-37

## T

**Takahashi, N. und Ko, M. S. (1993)**

The short 3'-end region of complementary DNAs as PCR-based polymorphic markers for an expression map of the mouse genome  
*Genomics* 16 (1): 161-168

**Takai, D.; Gonzales, F. A.; Tsai, Y. C.; Thayer, M. J. und Jones, P. A. (2001)**

Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer  
*Hum. Mol. Genet.* 10 (23): 2619-2626

**Thakur, N.; Kanduri, M.; Holmgren, C.; Mukhopadhyay, R. und Kanduri, C. (2003)**

Bidirectional silencing and DNA methylation-sensitive methylation-spreading properties of the Kcnq1 imprinting control region map to the same regions  
*J. Biol. Chem.* 278 (11): 9514-9519

**Tilghman, S. M. (1999)**

The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development  
*Cell* 96 (2): 185-193

**Tykocinski, M. L. und Max, E. E. (1984)**

CG dinucleotide clusters in MHC genes and in 5' demethylated genes  
*Nucleic Acids Res.* 12 (10): 4385-4396

## U

**Ueda, T.; Abe, K.; Miura, A.; Yuzuriha, M.; Zubair, M.; Noguchi, M.; Niwa, K.; Kawase, Y.; Kono, T.; Matsuda, Y.; Fujimoto, H.; Shibata, H.; Hayashizaki, Y. und Sasaki, H. (2000)**

The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development  
*Genes Cells* 5 (8): 649-659

**Ulaner, G. A.; Vu, T. H.; Li, T.; Hu, J. F.; Yao, X. M.; Yang, Y.; Gorlick, R.; Meyers, P.; Healey, J.; Ladanyi, M. und Hoffman, A. R. (2003)**

Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site  
*Hum. Mol. Genet.* 12 (5): 535-549

## V

**Voo, K. S.; Carlone, D. L.; Jacobsen, B. M.; Flodin, A. und Skalnik, D. G. (2000)**

Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1  
*Mol. Cell Biol.* 20 (6): 2108-2121

**Voutilainen, R.; Ilvesmaki, V.; Ariel, I.; Rachmilewitz, J.; de Groot, N. und Hochberg, A. (1994)**  
Parallel regulation of parentally imprinted H19 and insulin-like growth factor-II genes in cultured human fetal adrenal cells  
*Endocrinology* 134 (5): 2051-2056

## W

**Waddington, C. H. (1957)**  
The strategy of genes  
*London: Allen & Unwin*

**Wakeling, E. L.; Abu-Amero, S. N.; Stanier, P.; Preece, M. A. und Moore, G. E. (1998)**  
Human EGFR, a candidate gene for the Silver-Russell syndrome, is biallelically expressed in a wide range of fetal tissues  
*Eur. J. Hum. Genet.* 6 (2): 158-164

**Walter, J. und Paulsen, M. (2003)**  
Imprinting and disease  
*Semin. Cell Dev. Biol.* 14 (1): 101-110

**Wang, Q.; Curran, M. E.; Splawski, I.; Burn, T. C.; Millholland, J. M.; VanRaay, T. J.; Shen, J.; Timothy, K. W.; Vincent, G. M.; de Jager, T.; Schwartz, P. J.; Toubin, J. A.; Moss, A. J.; Atkinson, D. L.; Landes, G. M.; Connors, T. D. und Keating, M. T. (1996)**  
Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias  
*Nat. Genet.* 12 (1): 17-23

**Waterworth, D. M.; Bennett, S. T.; Gharani, N.; McCarthy, M. I.; Hague, S.; Batty, S.; Conway, G. S.; White, D.; Todd, J. A.; Franks, S. und Williamson, R. (1997)**  
Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome  
*Lancet* 349 (9057): 986-990

**Weksberg, R.; Nishikawa, J.; Caluseriu, O.; Fei, Y. L.; Shuman, C.; Wei, C.; Steele, L.; Cameron, J.; Smith, A.; Ambus, I.; Li, M.; Ray, P. N.; Sadowski, P. und Squire, J. (2001)**  
Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1  
*Hum. Mol. Genet.* 10 (26): 2989-3000

**Weksberg, R.; Shen, D. R.; Fei, Y. L.; Song, Q. L. und Squire, J. (1993)**  
Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Nat. Genet.* 5 (2): 143-150

**Wilkin, F.; Paquette, J.; Ledru, E.; Hamelin, C.; Pollak, M.; Deal, C. L. und Mamelin, C. (2000)**  
H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels  
*Eur. J. Biochem.* 267 (13): 4020-4027

**Wu, Ct und Morris, J. R. (2001)**  
Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence  
*Science* 293 (5532): 1103-1105

**Wylie, A. A.; Murphy, S. K.; Orton, T. C. und Jirtle, R. L. (2000)**  
Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation  
*Genome Res.* 10 (11): 1711-1718

## Y

**Yan, Y.; Frisen, J.; Lee, M. H.; Massague, J. und Barbacid, M. (1997)**  
Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development  
*Genes Dev.* 11 (8): 973-983

**Yballe, C. M.; Vu, T. H. und Hoffman, A. R. (1996)**

Imprinting and expression of insulin-like growth factor-II and H19 in normal breast tissue and breast tumor  
*J. Clin. Endocrinol. Metab* 81 (4): 1607-1612

**Yoder, J. A.; Walsh, C. P. und Bestor, T. H. (1997)**

Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites  
*Trends Genet.* 13 (8): 335-340

**Yoo-Warren, H.; Pachnis, V.; Ingram, R. S. und Tilghman, S. M. (1988)**

Two regulatory domains flank the mouse H19 gene  
*Mol. Cell Biol.* 8 (11): 4707-4715

**Yoshida, S.; Ohbo, K.; Takakura, A.; Takebayashi, H.; Okada, T.; Abe, K. und Nabeshima, Y. (2001)**

Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice  
*Dev. Biol.* 240 (2): 517-530

**Z****Zhang, P.; Liegeois, N. J.; Wong, C.; Finegold, M.; Hou, H.; Thompson, J. C.; Silverman, A.; Harper, J. W.; DePinho, R. A. und Elledge, S. J. (1997)**

Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome  
*Nature* 387 (6629): 151-158

**Zhang, Y.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Cook, B.; Wu, D.; Zuker, C. S. und Ryba, N. J. (2003)**

Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways  
*Cell* 112 (3): 293-301

**Zhang, Y.; Shields, T.; Crenshaw, T.; Hao, Y.; Moulton, T. und Tycko, B. (1993)**

Imprinting of human H19: allele-specific CpG methylation, loss of the active allele in Wilms tumor, and potential for somatic allele switching  
*Am. J. Hum. Genet.* 53 (1): 113-124