

# **Untersuchung zur Rolle der Epigenetik bei der Pluripotenz und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz



Marieke Tesmer-Wolf  
Geboren am 25. August 1982 in Mainz-Mombach

Mainz, im April 2016



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Epigenetische Regulationsmechanismen .....	2
1.1.1. Die DNA- Methylierung .....	2
1.1.2. Die Bedeutung der DNA-Methylierung bei der genomischen Prägung und der epigenetischen Reprogrammierung .....	3
1.1.3. Weitere epigenetische Regulationsmechanismen: Histonmodifikationen und RNA-assoziierte Stilllegung von Genen .....	5
1.2. Fehlregulierung der DNA-Methylierung und Krankheitsentstehung .....	5
1.3. Die Epigenetik als Ansatzpunkt zur Therapie von Erkrankungen .....	7
1.4. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) .....	8
1.4.1. Anatomischer und histologischer Aufbau und Funktion des Gastrointestinaltraktes .....	8
1.4.2. Das Krankheitsbild von Morbus Crohn.....	9
1.4.3. Die Epidemiologie des Morbus Crohn.....	10
1.4.4. Das Krankheitsbild von Colitis ulcerosa .....	10
1.4.5. Die Epidemiologie der Colitis ulcerosa.....	10
1.4.6. Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen .....	10
1.5. Zielsetzung des Projekts „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ .....	11
1.6. Stammzellen.....	12
1.6.1. Embryonale und adulte Stammzellen .....	12
1.6.2. Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) und multipotente Keimbahnstammzellen (maGSCs).....	13
1.7. Zielsetzung des Projekts: „Vergleichende epigenetische Analyse von ESCs und maGSCs“ .....	15
2. Material .....	16
2.1. Geräte.....	16
2.2. Chemikalien.....	17
2.3. Enzyme.....	17
2.4. Lösungen und Medien .....	17
2.5. KIT-Systeme.....	18
2.6. Basenpaarstandard .....	18
2.7. Primer .....	18
2.8. Primer für die Pyrosequenzierung .....	21
2.9. Tiermaterial.....	22
2.10. Datenbanken und Software .....	23
2.10.1. Verwendete Datenbanken und Internetadressen.....	23
2.10.2. Verwendete Software .....	23
3. Methoden .....	24
3.1. Patientenkollektiv und Probensammlung .....	24
3.2. Die Extraktion genomischer DNA aus intestinalem Gewebe .....	25

3.3.	Die Bisulfit- Behandlung genomischer DNA .....	25
3.4.	Design der PCR- und Sequenzierungsprimer .....	26
3.5.	Die Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	26
3.6.	Die Pyrosequenzierung .....	30
3.6.1.	Das Grundprinzip der Pyrosequenzierung .....	30
3.6.2.	Die Aufarbeitung der Amplifikate.....	30
3.6.3.	Die Auswertung der Pyrosequenzierung.....	31
3.7.	Auswertung der Ergebnisse .....	31
4.	Ergebnisse.....	32
4.1.	Die für das Projekt „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ untersuchten Gene .....	32
4.1.1.	Das Claudin 1 ( <i>CLDN1</i> )-Gen .....	32
4.1.2.	Die Mucin-Gene <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> .....	33
4.1.3.	Das <i>PAX5</i> -Gen.....	34
4.1.4.	Das <i>IL17REL</i> - Gen.....	35
4.2.	Die Ergebnisse des Projekts „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ .....	35
4.2.1.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>CLDN1</i> bei M. Crohn- Patienten .....	36
4.2.2.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>CLDN1</i> bei C. ulcerosa- Patienten .....	38
4.2.3.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>MUC2</i> bei M. Crohn- Patienten .....	39
4.2.4.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>MUC2</i> bei C. ulcerosa- Patienten .....	41
4.2.5.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>MUC6</i> bei M. Crohn- Patienten .....	42
4.2.6.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>MUC6</i> bei C. ulcerosa- Patienten .....	44
4.2.7.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>MUC15</i> bei M. Crohn- Patienten .....	45
4.2.8.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>MUC15</i> bei C. ulcerosa- Patienten .....	47
4.2.9.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>PAX5</i> bei M. Crohn- Patienten .....	48
4.2.10.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>PAX5</i> bei C. ulcerosa- Patienten .....	50
4.2.11.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>IL17REL</i> bei M. Crohn- Patienten .....	51
4.2.12.	Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von <i>IL17REL</i> bei C. ulcerosa-Patienten .....	53
4.3.	Die für das Projekt „Vergleichende epigenetische Analyse von ESCs und maGSCs“ untersuchten Pluripotenzmarkergene, geprägten Gene und miRNA-Gene	

4.3.1.	Das Pluripotenzmarkergen <i>Oct4</i> .....	54
4.3.2.	4.3.2. Das Pluripotenzmarkergen <i>Nanog</i> .....	54
4.3.3.	Das Pluripotenzmarkergen <i>Nanog</i> .....	54
4.3.4.	Das potentielle Pluripotenzmarkergen <i>Lrrc34</i> .....	55
4.3.5.	Das potentielle Pluripotenzmarkergen <i>Stra8</i> .....	56
4.3.6.	Das geprägte Gen <i>Igf2r</i> .....	56
4.3.7.	Das geprägte Gen <i>H19</i> .....	57
4.3.8.	Das geprägte Gen <i>Snrpn</i> .....	58
4.3.9.	Das geprägte Gen <i>Snrpn</i> .....	58
4.3.10.	Das geprägte Gen <i>Meg3</i> .....	59
4.3.11.	Die miRNA-Gene <i>miR290</i> und <i>miR302</i> .....	59
4.4.	Die Methylierung der gesicherten und putativen Pluripotenzmarkergene.....	60
4.4.1.	Methylierungsanalyse des <i>Oct4</i> -Promoters.....	60
4.4.2.	Methylierungsanalyse des <i>Nanog</i> -Promoters.....	62
4.4.3.	Methylierungsanalyse des <i>Lrrc34</i> -Promoters.....	63
4.4.4.	Methylierungsanalyse des Gens <i>Stra8</i> .....	65
4.5.	Methylierung der paternal geprägten Gene.....	68
4.5.1.	Methylierungsanalyse des Gens <i>Meg3</i> .....	68
4.5.2.	Methylierungsanalyse des Gens <i>H19</i> .....	69
4.6.	Methylierung der maternal methylierten Gene.....	71
4.6.1.	Methylierungsanalyse des Gens <i>Igf2r</i> .....	71
4.6.2.	Methylierungsanalyse des Gens <i>Snrpn</i> .....	72
4.7.	Methylierungsanalyse der Pluripotenz- assoziierten miRNAs in maGSCs und ESCs im Vergleich zu der Expression von Pluripotenzmarkergenen.....	74
5.	Diskussion.....	78
5.1.	Diskussion zum Projekt: „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“.....	78
5.1.1.	Das Immunsystem und Autoimmunerkrankungen.....	78
5.1.2.	Das <i>CLDN1</i> -Gen: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED 80	
5.1.3.	Mucin-Gene: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED.....	81
5.1.4.	Das <i>PAX5</i> -Gen: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED ..	82
5.1.5.	Das <i>IL17REL</i> -Gen: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED	83
5.1.6.	Ausblick.....	83
5.2.	Die Bedeutung embryonaler Stammzellen in der Medizin und die dahinter stehende Problematik.....	85
5.2.1.	Adulte Stammzellen als Hoffnungsträger der Medizin.....	86
5.2.2.	Spermatogoniale Stammzellen und ihre Bedeutung in der medizinischen Forschung.....	87
5.2.3.	Die Generierung spermatogoniale Stammzellen.....	87
5.3.	Vergleichende Methylierungsanalyse von ESC- und maGSC-Zelllinien.....	89
5.3.1.	Die Methylierungsanalysen der gesicherten bzw. putativen Pluripotenzmarkergene.....	89
5.3.2.	Die Methylierungsanalysen der geprägten Gene.....	91

5.3.3. Der Methylierungsstatus der Pluripotenz-assoziierten miRNA-Gene bei murinen ESCs und maGSCa .....	94
5.4. Zum Potential von maGSCs: ihre in vitro Differenzierung zu haploiden Keimzellen .....	96
5.5. Perspektiven der Stammzellforschung .....	97
5.5.1. Stammzelltherapie und Morbus Crohn.....	98
6. Zusammenfassung .....	99
7. Anhang: Statistik Auswertungen .....	100
8. Literatur.....	108
9. Danksagung.....	119
10. Eidesstattliche Erklärung .....	120
11. Lebenslauf .....	122

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>CLDN1</i> im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten	36
Abbildung 2: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>CLDN1</i> im Colon von M. Crohn-Patienten	37
Abbildung 3: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>CLDN1</i> im Colon von C. Ulcerosa-Patienten	38
Abbildung 4: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC2</i> im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten	39
Abbildung 5: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC2</i> im Colon von M. Crohn-Patienten	40
Abbildung 6: ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC2</i> im Colon von C. Ulcerosa-Patienten	41
Abbildung 7: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC6</i> im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten	42
Abbildung 8: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC6</i> im Colon von M. Crohn-Patienten	43
Abbildung 9: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC6</i> im Colon von C. Ulcerosa-Patienten	44
Abbildung 10: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC15</i> im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten	45
Abbildung 11: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC15</i> im Colon von M. Crohn-Patienten	46
Abbildung 12: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>MUC15</i> im Colon von C. Ulcerosa-Patienten	47
Abbildung 13: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>PAX5</i> im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten	48
Abbildung 14: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>PAX5</i> im Colon von M. Crohn-Patienten	49
Abbildung 15: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>PAX5</i> im Colon von C. Ulcerosa-Patienten	50
Abbildung 16: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>IL17REL</i> im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten	51
Abbildung 17: ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>IL17REL</i> von M. Crohn-Patienten	52
Abbildung 18: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von <i>IL17REL</i> im Colon von C. Ulcerosa-Patienten	53
Abbildung 37: Methylierung des <i>Nanog</i> -Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien	74
Abbildung 38: Methylierung des <i>Oct4</i> -Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien	75



Abbildung 39: Methylierung des <i>Mir290</i> -Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien	76
Abbildung 40: Methylierung des <i>Mir302</i> -Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien	77

# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
APS	Adenosin-5' phosphosulfat
AS	Angelman-Syndrom
ATP	Adenosibtriphosphat
BSAP	b-cell-specific activator protein
bp	Basenpaar
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
CD	Crohn's Disease
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChIP-Seq	Chromatin immunoprecipitation- Sequencing
CLDN1	Claudin 1
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTCF	CCCTC- binding factor
C. Ulcerosa	Colitis Ulcerosa
DMR	differentiell methylierte Region
DNA	desoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferasen
EB	embryoid bodies (Embryoid-Körper)
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
dpc	days post coitum (Tage nach Befruchtung)
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ESC	embryonic stem cell
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence activated cell sorting
G	Guanin
GDNF	glial cell derived neurotrophic factor
HDACi	Histon- Deacetylase Inhibitor
hESC	humane embryonale Stammzellen
hmaGSC	humane multipotente adulte Keimbahnstammzellen
ICR	Imprinting Control Region
IgA	Immunglobulin A

IgG	Immunglobulin G
IG-DMR	intergenic DMR
IGF2	Insulin-like growth factor 2
Igf2r	Insulin-like growth factor 2 receptor
iPS Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IL17REL	Interleukin 12 Receptor E-Like
kDA	Kilodalton
LIF	leukaemia inhibitory factor
Lrrc34	leucine rich repeat containing 34
maGSC	multipotent adult germline stem cell
M. Crohn	Morbus Crohn
MEF	Maus- Embryofibroblasten
Meg3	maternally expressed gene 3
mGC	multipotent germ cell
mGSC	multipotent germline stem cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MUC	Mucin
Nanog	Nanog homeobox
ug	Microliter
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PPi	Pyrophosphat
priRNA	primäre RNA
RISC	RNA- induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
SCF	Stammzellfaktor
SNP	single nucleotid polymorphism
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TJ	Tight junction
TNF	Tumornekrose Faktor
OD	optische Dichte
PAX5	paired box 5
p.c.	post conceptionem
PCR	polymerase chain reaction

PGC	primordial Germ Cell (primordiale Keimzelle)
PPi	Pyrophosphat
PWS	Prader- Willi- Syndrom
RA	retinoic acid
SAM S	Adenosylmethionin
Snrpn	small nuclear ribonucleoprotein n
SSC	Spermatogonial Stem Cell
Stra 8	Stimulated by retinoic acid gene 8
UC	ulcerative Colitis
UPD	uniparentale Disomie
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten sind eine Vielzahl eukaryotischer Genome sequenziert worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das humane Genom größer ist, als das Genom von weniger komplexen Organismen. Allerdings weist das menschliche Genom dabei keine proportional höhere Anzahl von proteincodierenden Genen auf. Dies lässt den Schluss zu, dass nicht nur die Anzahl der Gene ausschlaggebend für die biologische Komplexität ist. Vielmehr kommt es dabei darauf auch an, wie effektiv diese Gene genutzt werden und welchen Kontrollmechanismen sie unterliegen.

Die Epigenetik ist ein Forschungsfeld der modernen Biowissenschaft, das sich mit den Kontrollmechanismen, die nicht im genetischen Code festgelegt sind, befasst. Der Begriff „*Epigenetik*“ (*epi* = griech. „daneben“, „zusätzlich“, „obenauf“) wurde allerdings bereits, bevor die Struktur der DNA bekannt wurde von Conrad Hal Waddington eingeführt. Er definierte die Epigenetik als einen Vorgang, bei dem der Genotyp eines Organismus mit der Umwelt interagiert, wodurch ein bestimmter Phänotyp entsteht. Als Entwicklungsbiologe legte er dabei vor allem ein Augenmerk auf die Entfaltung des genetischen Programms während der Entwicklung eines Organismus (Holliday, 2006).

Mittlerweile ist die Definition des Begriffs „Epigenetik“ genauer: es handelt sich dabei um reversible Modifikationen der Chromosomen, welche sowohl die Expression als auch die Funktion von Genen beeinflussen, ohne dass dabei allerdings die Nucleotidabfolge, also die genetische Information der DNA, verändert wird (Buselmaier und Tariverdian, 2006).

Mittlerweile sind unterschiedliche epigenetische Mechanismen zur Regulation der Genexpression bekannt, darunter auch die DNA-Methylierung, mit der sich die vorliegende Arbeit befasst. Durch diese Regulationsmechanismen können Zellen mit den gleichen Genen durchaus unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. So unterscheiden sich eine Leber- und eine Muskelzelle grundlegend in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften, obwohl sie den gleichen Gensatz aufweisen. Aus einem Genotyp können also unterschiedliche Phänotypen hervorgehen. Die spezifischen epigenetischen Muster, die die Zellen dabei aufweisen, können dabei durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst werden und an die kommende Generation zusammen mit der DNA weitervererbt werden (Rakyan et al, 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass epigenetische Mechanismen für die gewebe-spezifische Genexpression, die Kontrolle von Entwicklungsabläufen während der Embryonalentwicklung und Gametogenese, sowie für die generelle Abschaltung von Genen entscheidend sind (Li et al., 2007). Dementsprechend können epigenetische Fehlregulationen, sogenannte Epimutationen, zur Entstehung von verschiedenen Krankheiten beitragen. Da epigenetische Prozesse allerdings grundsätzlich reversibel sind, könnten diese Epimutationen durch eine entsprechende Therapie beeinflusst werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle der Epigenetik bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Gleichzeitig soll auch das Potential epigenetischer Modulationen von Genen aufgezeigt werden, was gerade in der Zellersatztherapie von großer Bedeutung sein könnte. Dementsprechend befasst sich die vorliegende Arbeit zusätzlich mit dem Vergleich von multipotenten adulten Keimbahnstammzellen mit embryonalen Stammzellen und dem Potential der maGSCs für die regenerative Medizin.

## **1.1. Epigenetische Regulationsmechanismen**

### **1.1.1. Die DNA-Methylierung**

Grundlage eines jeden Differenzierungsgeschehens ist die entwicklungs- und gewebe-spezifische Regulierung der Aktivität der unterschiedlichen proteincodierenden Gene. Gerade für multizelluläre Organismen, die aus einer befruchteten Eizelle entstehen, die sich wiederum zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren muss, ist das von essentieller Bedeutung. Die Regulierung der Genaktivität erfolgt dabei durch das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen, wie der RNA-Interferenz, der Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung (Jones, 2005; Kim et al, 2009).

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um einen hochkonservierten Prozess, der im Allgemeinen die Reprimierung von Genen hervorruft (Li et al., 2007). Dabei wird das fünfte Kohlenstoffatom der Base Cytosin mit einer Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) kovalent modifiziert, wodurch 5-Methylcytosin (5mC) entsteht. Diese Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert, wobei S-Adenosylmethionin als Methyl donor fungiert. Grundsätzlich kann jedes Cytosin methyliert werden (Razin und Riggs, 1980), jedoch sind bei Säugetieren häufig die Cytosine von 5'-CpG-3' Dinukleotiden methyliert. Interessanterweise existieren im Genom Bereiche, die eine erhöhte CpG-Dinukleotid-Dichte aufweisen. Es handelt sich dabei um sogenannte CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Inseln), die eine Länge von etwa 0,5-2 kb haben und hauptsächlich im Promotor von exprimierten Genen, in der kodierenden Region, oder aber auch in der Region um die Transkriptionsinitiationsstelle herum lokalisiert sind (Gardiner-Garden und Frommer, 1987).

Die DNA-Methylierung kommt sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten vor. Bei Bakterien nimmt die Methylierung beispielsweise eine wichtige Schutzfunktion ein: Durch ein bestimmtes Methylierungsmuster, das von dem Muster der zelleigenen DNA abweicht, können Bakterien die fremde DNA erkennen und abbauen. In Eukaryoten wird die Methylierung im Genom vorgenommen, um parasitäre Sequenzen wie Transposons, Retrotransposons und retrovirale DNA stillzulegen, und nimmt somit auch hier eine wichtige Schutzfunktion ein. Ferner dient die Methylierung der Unterscheidung von transkriptionell inaktiven und aktiven Bereichen der DNA. Ein Beispiel hierfür ist die X-Inaktivierung. Um beim weiblichen Geschlecht eine Überexpression der auf dem X-Chromosom befindlichen Gene zu verhindern, wird in den Zellen des frühen Embryo jeweils ein X-Chromosom transkriptionell stillgelegt (Barr-Körperchen). Auf diese Art und Weise wird eine Dosiskompensation im Vergleich zum männlichen Geschlecht erreicht (Farthing et al., 2008).

Ein weiterer epigenetisch regulierter Prozess ist die sogenannte genomische Prägung, auch „genomic imprinting“ genannt. Dabei handelt es sich um die Regulation der Expression eines Genes in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft, worauf in Abschnitt 1.1.2 genauer eingegangen wird (Buselmaier und Tariverdian, 2006).

Einmal methyliert, bleiben Gene für gewöhnlich auch während der nächsten Zellteilungen in diesem Zustand, was durch die semikonservative Replikation erklärt werden kann, bei der jedes Tochtermolekül eine neu synthetisierte Polynucleotidkette und eine Polynucleotidkette des ursprünglichen DNA-Moleküls erhält (Reineke, 2004). Die für hemimethylierte DNA spezifische Aktivität der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) erhält dabei die Methylierungsmuster, die bereits während der Embryonalentwicklung festgelegt wurden.

### **1.1.2. Die Bedeutung der DNA-Methylierung bei der genomischen Prägung und der epigenetischen Reprogrammierung**

Unter der genomischen Prägung („genomic imprinting“) von Genen versteht man die Regulation der Expression eines Genes in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft. Dies bedeutet, dass entweder das paternale oder das maternale Allel exprimiert wird, während das andere Allel transkriptionell stillgelegt ist (Buselmaier und Tariverdian, 2006). Gene, bei denen eine solche monoallelische Expression vorzufinden ist, werden als geprägte Gene bezeichnet. Sie sind häufig durch CpG-reiche, differentiell methylierte Regionen (DMRs) gekennzeichnet, in denen sich das Methylierungsmuster der elterlichen Allele unterscheidet. Geprägte Gene machen wahrscheinlich nur etwa 0,1-0,5 % des Genoms aus, spielen aber speziell bei der frühen Entwicklung eine wichtige Rolle (Fowden et al., 2006).

Die geprägte Expression von Genen wurde in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts zunächst für das Gen *Igf2* und später auch für die in der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Gene *Igf2r*, *H19*, *Snrpn* und *Meg3* beschrieben (Reik und Walter, 2001). Die geprägten Gene sind meistens in Clustern angeordnet, in denen sie häufig durch gemeinsame regulatorische Elemente kontrolliert werden. Die Produkte der geprägten Gene sind häufig Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, aber auch Transkriptionsfaktoren, Spleißfaktoren sowie Regulatoren des Zellzyklus und nichttranslatierte funktionelle RNAs, also Produkte, die bei der embryonalen Entwicklung von entscheidender Bedeutung sind. Bisher sind circa 80 geprägte Gene bekannt, man schätzt allerdings, dass weit mehr als hundert solcher Gene existieren (Fowden et al., 2006).

Die elternspezifische Prägung von Genen findet in der elterlichen Keimbahn statt. Zunächst werden in primordialen Keimzellen (PGCs) im Zuge einer genomweit stattfindenden Demethylierung auch die elternspezifischen Methylierungsmuster (Imprints) der vorherigen Generation, als von den großelterlichen Chromosomen, entfernt. Diese genomweite Demethylierung beginnt in der Maus am Tag 10,5 p.c. (post conceptionem), bevor die PGCs in die Genitalleiste einwandern, und ist am Tag 13,5 p.c. beendet (Hajkova et al., 2002; Yamazaki et al., 2003). Anschließend werden während der Gametogenese die geschlechtsspezifischen Methylierungsmuster von geprägten Genen neu etabliert. Diese elternspezifischen Methylierungsprozesse sind für die Regulation der parentalen Interessen

bei der embryonalen Entwicklung wichtig, da dadurch eine veränderte Chromatinstruktur und somit eine veränderte Transkriptionsrate erzielt wird. Somit sind die Eizelle und das Spermium nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell unterschiedlich. In der männlichen Keimbahn beginnt die Neuetablierung der Methylierungsmuster von geprägten Genen am Tag 15,5 p.c. und ist erst nach der Geburt beendet (Davis et al., 1999, Davis et al., 2000, Li et al., 2004). Nach der Befruchtung findet dann während der Präimplantationsentwicklung eine Reprogrammierung der parental Genome in ein somatisches Genom statt. Diese Reprogrammierung ist zuerst wiederum durch eine genomweite Demethylierung gekennzeichnet, von der die geprägten Gene nicht betroffen sind. Die keimbahnspezifische Methylierung dieser Gene bleibt während der gesamten Entwicklung erhalten. Durch die Demethylierung des restlichen Genoms wird allerdings die Totipotenz der Zellen wiederhergestellt, damit ein neuer Organismus entstehen kann. Anschließend erfolgt eine *de novo* Methylierung, bei der entwicklungspezifische somatische Methylierungsmuster etabliert werden. Die Prozesse, die die Methylierungsreprogrammierung umfassen, stehen letztendlich unter der maternalen Kontrolle, da die Eizelle die dafür nötige zelluläre Maschinerie wie beispielsweise bisher noch unbekannte Demethylasen mit sich bringt (Haaf, 2003).

Anhand von Untersuchungen mit Antikörpern gegen 5-Methylcytosin konnte gezeigt werden, dass die parental Genome nach der Befruchtung zunächst räumlich voneinander getrennt bleiben. Das Spermienchromatin wird innerhalb von ein bis zwei Stunden durch die bisher unbekanntes Demethylasen aktiv demethyliert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Demethylierung des mütterlichen Genoms passiv, so dass erst im 16-bis 32-Zellstadium eine vollständige Demethylierung zu erkennen ist. Die passive Demethylierung des maternalen Genoms kann auf die mit den Zellteilungen einhergehenden DNA-Verdopplungen und die in dieser Phase fehlende Aktivität der DNMT1 zurückgeführt werden. Da die Demethylierungsprozesse der elterlichen Genome durch unterschiedliche Mechanismen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden, resultiert dadurch nicht nur eine Asymmetrie der Methylierung, sondern auch eine Asymmetrie der Funktionalität der Genome. Ab dem Blastocystenstadium ist dann das Expressionsniveau der Gene für die *de novo*-Methylierung zuständigen DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B relativ hoch, deren Aktivität folglich zur Ausbildung der gewebespezifischen somatischen Methylierungsmuster führt (Okano et al, 1999).

Die oben beschriebenen Prozesse sind für die normale embryonale Entwicklung von großer Bedeutung, da es dadurch zu einer transkriptionellen Aktivierung von zygotischen Genen kommt, die für die frühe Entwicklung unabdingbar sind. Reprogrammierungsfehler können daher schwere Entwicklungsstörungen beim Embryo hervorrufen, zu denen auch die sogenannten Imprintingstörungen zählen, auf die in Abschnitt 1.2. noch genauer eingegangen wird. (Diplomarbeit Wolf M, 2009).



### **1.1.3. Weitere epigenetische Regulationsmechanismen:**

#### **Histonmodifikationen und RNA-assoziierte Stilllegung von Genen**

Die DNA-Methylierung wirkt häufig auch mit weiteren epigenetischen Mechanismen zusammen. Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass Methyltransferasen mit Histondeacetylasen interagieren, weshalb auch in methylierten Bereichen häufig eine Deacetylierung von Histonen beobachtet werden kann, was zu einer dichten Nukleosomenstruktur und somit zu einer erniedrigten Transkriptionsrate führt (Craig, 2005).

Auch die Modifikation der Histone stellt also eine Form der Regulation der Genaktivität dar. Dabei werden die Aminosäurereste der Histone durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung modifiziert, wodurch eine Veränderung der Nukleosomenstruktur erzielt wird. Bei einer dichten Anordnung von Nukleosomen, wie sie beispielsweise beim Heterochromatin vorliegt, ist eine geringe bis gar keine Transkriptionsrate vorhanden, während eine aufgelockerte Chromatinstruktur die Zugänglichkeit für den Transkriptionsapparat erhöht (Franz und de Jong, 2002).

Unter RNA- Interferenz von Genen versteht man die Regulation der Genexpression durch RNA-Moleküle. Dieser Mechanismus dient der gezielten Stilllegung von Genen und ist somit nicht nur wichtig für die Regulation der Genexpression, sondern auch für die Kontrolle von Transposons und die Abwehr viraler Partikel. Bei diesem Mechanismus werden zunächst doppelsträngige RNA-Moleküle durch Ribonuclease-Enzyme in kürzere Fragmente geschnitten und in Einzelstränge aufgespalten. Der dabei entstehende Leitstrang wird in den RNA-induced silencing (RISC)- Komplex eingebaut. Der dadurch aktivierte Enzymkomplex kann anschließend die Ziel-mRNA entweder spalten oder aber dessen Translation verhindern. Welcher Weg dabei eingeschlagen wird, hängt vom Grad der Komplementarität zwischen dem Leitstrang und der Ziel-mRNA ab (Du und Zamore, 2005).

## **1.2. Fehlgeregulation der DNA-Methylierung und Krankheitsentstehung**

Die biomedizinische Relevanz der Epigenetik, hat dazu geführt, dass das humane Epigenom- Projekt ins Leben gerufen wurde. Dabei wird der Methylierungsstatus der regulatorischen Regionen der Gene des humanen Genoms ermittelt. Dadurch können die spezifischen Methylierungsmuster der unterschiedlichen Zelltypen charakterisiert werden und mit pathophysiologisch veränderten Zellen verglichen werden. Auf diese Art und Weise erhofft man sich, ein besseres Verständnis für pathophysiologische Vorgänge zu verschaffen (Esteller, 2006).

Es ist bekannt, dass ein Funktionsverlust von geprägten Genen verschiedene sogenannte „Imprinting“-Erkrankungen bedingt. Dazu gehören unter anderem das Prader-Willi-Syndrom (PWS), das Angelman-Syndrom (AS) und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS). Sowohl PWS als auch AS sind neurogenetische Erkrankungen, die mit einer Fehlgeregulation der geprägten Gene auf dem menschlichen Chromosom 15q11-q13 assoziiert sind. Dabei

kommt es beim PWS zum Funktionsverlust von paternal exprimierten geprägten Genen (*ZNF127*, *NDN*, *MAGEL2*, *SNRPN* und *IPW*), während AS aus einem Verlust der maternalen Genexpression derselben Region auf Chromosom 15 oder aus Mutationen im maternal exprimierten *UBE3A*-Gen resultiert. Für das PWS sind eine Muskelhypotonie, Adipositas, Minderwuchs und eine milde mentale Retardierung typisch, während das AS unter anderem durch eine schwere mentale Retardierung und Ataxie gekennzeichnet ist. Das BWS ist mit einer Imprintingstörung der chromosomalen Region 11p15.5 assoziiert, welche unter anderem die geprägten Gene *H19*, *IGF2*, *CDKN1C*, *KCNQ1* und *KCNQ1OT1* enthält. Es handelt sich dabei um ein Überwuchersyndrom, das mit einem erhöhten Risiko für embryonale Tumore assoziiert ist (Lucifero et al., 2004).

Dass veränderte Methylierungsmuster bei verschiedenen Tumoren auftreten, ist bereits seit längerem bekannt. So konnte bei verschiedenen Krebserkrankungen eine übermäßige Methylierung von Tumorsuppressorgenen festgestellt werden, wodurch wichtige zelluläre Mechanismen, wie DNA-Reparatur, Regulation des Zellzyklus oder aber Apoptose nicht mehr kontrolliert werden. Neben genassoziierten hypermethylierten Bereichen konnten Wissenschaftler feststellen, dass die DNA in verschiedenen Krebserkrankungen eine ausgeprägte genomweite Hypomethylierung aufweist. Betrifft die Hypomethylierung die Promotorregion eines Protoonkogens, so ist die Aktivität dieses Gens gesteigert, weshalb es dann als Onkogen („Krebs-Gen“) bezeichnet werden kann. Diese Gene codieren häufig für Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Moleküle von Signaltransduktionskaskaden und Bestandteile der Zellzykluskontrollmaschinerie. Eine Dysfunktion eines solchen Gens in Form einer stärkeren Aktivität, führt zum Verlust der Zellteilungskontrolle (Ehrlich, 2002).

Fehlregulierte epigenetische Prozesse, die mit einem veränderten Genexpressionsmuster einhergehen, tragen allerdings nicht nur zur Entstehung von Krebs und verschiedenen genetischen Erkrankungen bei. Man ist zunehmend der Ansicht, dass epigenetische Veränderungen auch bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen. Bei Autoimmunerkrankungen handelt es sich um komplexe Erkrankungen, bei denen das körpereigene Gewebe durch Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen angegriffen wird. Durch diese Fehlfunktion des Immunsystems kommt es zu wiederkehrenden entzündlichen Reaktionen, die letztendlich zur Zerstörung des jeweiligen Gewebes führen. Autoimmunerkrankungen haben durchaus eine genetische Komponente. Zwillingsstudien zeigen allerdings, dass monozygote Zwillinge, die ja genetisch identisch sind, diskordant für Autoimmunerkrankungen sind. Ferner konnten in unterschiedlichen Zelltypen von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine veränderte globale DNA-Methylierung festgestellt werden. So zeigen beispielsweise die T- Lymphozyten und die Mukosazellen des Rectums von Colitis ulcerosa- Patienten einen deutlich geringeren Level an 5- Methylcytosin, als Kontrollindividuen (Javierre et al, 2011).

### **1.3. Die Epigenetik als Ansatzpunkt zur Therapie von Erkrankungen**

Epigenetische Muster, so auch Epimutationen können durch bestimmte Umweltfaktoren moduliert werden. Da sie also grundsätzlich reversibel sind, macht es sie zu einem interessanten Ansatzpunkt, um Therapien zu entwickeln. In der Medizin kommt es bereits heute zum Einsatz von Arzneimitteln, die einen Einfluss auf die Epigenetik von Zellen haben. Beispiele für solche Wirkstoffe sind DNA-Methyltransferase-Hemmer und Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi).

DNA-Methyltransferase-Hemmer können auf unterschiedliche Art und Weise wirken. Bestimmte Vertreter dieser Gruppe sind in der Lage, am katalytischen Zentrum von DNMTs zu binden, wodurch diese Enzyme gehemmt werden. Weitere Wirkstoffe werden wiederum während der Replikation in die DNA eingebaut, wodurch die DNMTs ebenfalls inhibiert werden. Ferner gibt es dann auch noch Substanzen, die in der Lage sind an CG-Dinucleotiden zu binden und dadurch eine Interaktion zwischen dem Substrat und seinem Enzym zu verhindern. DNA-Methyltransferase-Hemmer werden in der Therapie gegen Krebs eingesetzt (Ganesan et al, 2009).

HDACi sind in der Lage, Histon-Deacetylasen zu hemmen und dadurch, eine Hyperacetylierung von Histonen herbeizuführen. HDACi weisen Anti-Tumor-Eigenschaften auf. Diese Wirkstoffe führen zu einer Arretierung der Tumorzellen in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus, induzieren Apoptose oder aber führen zur Ausdifferenzierung von entarteten Zellen (Huang, 2006). Neben ihrem Einsatz in der Krebs-Therapie, werden bestimmte HDAC-Hemmer auch bei der Behandlung neurologischer Erkrankungen, wie Epilepsie verwendet. Interessanterweise weisen aber HDACi auch eine antiinflammatorische Wirkung auf (Adcock, 2007).

Dass epigenetische Muster potentiell reversibel sind, ist auch im Bereich der Stammzell-Forschung von großer Bedeutung. Embryonale Stammzellen (ESCs) sind bekanntlich pluripotent, weshalb sie mit Hilfe von bestimmten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in unterschiedliche Zelltypen ausdifferenziert werden können. Eine Tatsache, die sie für die medizinische Forschung natürlich interessant macht, da man sie zum einen zur Klärung der spezifischen molekularen Prozesse der frühen Embryonalentwicklung einsetzen kann. Gleichzeitig können sie auch als Grundlage dienen, um herauszufinden, welche Abweichungen in diesen molekularen Prozessen zu krankhaften Veränderungen führen. Der wichtigste Nutzen von Stammzellen besteht im Rahmen von Zellersatztherapien, d.h., um Erkrankungen zu heilen, bei denen Zellen zugrunde gegangen sind (Brewer, 2006).

## **1.4. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)**

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man rezidivierende, oder aber auch konstante inflammatorische Veränderungen des Gastrointestinaltrakts. Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa (C.ulcerosa) sind die zwei wichtigsten und häufigsten Vertreter dieser Gruppe (Shivananda et al, 1996). Die genaue Ätiologie von CED ist bis heute noch nicht vollständig geklärt; man geht allerdings davon aus, dass es sich dabei um multifaktorielle Erkrankungen handelt. Beide Erkrankungen zeigen häufig einen lebenslangen Verlauf, wobei sich meistens akute Krankheitsschübe mit Remissionsphasen abwechseln. Um die Pathomechanismen dieser Erkrankungen besser verstehen zu können, soll an dieser Stelle zunächst der Aufbau und die Funktion des Gastrointestinaltrakts erläutert werden.

### **1.4.1. Anatomischer und histologischer Aufbau und Funktion des Gastrointestinaltraktes**

Der Darm ist Teil des Verdauungstraktes und kann in Ileum (Dünndarm), Colon (Dickdarm) und Rectum (Mastdarm) unterteilt werden.

Der hauptsächliche Ort der Verdauung und Resorption von Nährstoffen, Elektrolyten und Vitaminen ist das Ileum. Er ist beim lebenden Menschen in etwa drei bis vier Meter lang und kann in drei Abschnitte eingeteilt werden: das Duodenum (Zwölffingerdarm), das Jejunum (Leerdarm) und das Ileum (Krummdarm). Der letzte Abschnitt des Ileums ist im rechten Unterbauch lokalisiert und wird als terminales Ileum bezeichnet. Das terminale Ileum mündet über die Ileozökalklappe in das Colon. Das Colon ist in etwa 1,5 Meter lang und kann in einem aufsteigenden Ast (Colon ascendens), einen horizontalen Abschnitt (Colon transversum) und den absteigenden Ast (Colon descendens) eingeteilt werden. Hauptfunktion des Colons ist die Rückresorption von Wasser und Salzen und somit auch das Eindicken des Kots. Das Rectum ist der letzte Abschnitt des Darms und dient der Zwischenspeicherung des Kots, bis er durch den Defäkationsreflex über den Anus abgegeben wird (Campbell, 2003).

Der histologische Aufbau der einzelnen Darmabschnitte ist in seinen Grundzügen gleich. Die Darmwand besteht aus vier Schichten: die Mukosa, die Submukosa, die Muskularis und die Serosa.

Die innerste Schicht der Darmwand ist die Darmschleimhaut, auch Mukosa genannt. Sie weist im Bereich des Dünndarms mehr Aus (Zotten)- und Einstülpungen (Krypten) auf, als im Colon. Die Mukosa selbst besteht aus einem bindegewebigen Anteil (Lamina propria mucosae) und einer einschichtigen Epithelschicht, in der unterschiedliche Zelltypen vorkommen: die Enterozyten, die Goblet-Zellen, die enteroendokrinen Zellen und die Paneth-Zellen. Bei Enterozyten handelt es sich um hochprismatische Zellen, die im Dünndarm mit einem aus Mikrovilli bestehenden apikalen Bürstensaum (Saumzellen) ausgestattet sind. Mikrovilli sind ins Darmlumen reichende fingerförmige Zellausstülpungen, die zur Oberflächenvergrößerung der Zelle führen und somit eine gesteigerte Resorption von Nährstoffen, Gallensäure und Wasser ermöglichen. Untereinander sind die Enterozyten

durch lateral gelegene Tight junctions verbunden, die eine Diffusionsbarriere bilden und somit für die Intakthaltung der Epithelschicht entscheidend sind.

Die Goblet-Zellen, auch Becherzellen genannt, sind muköse Drüsenzellen, die die epithelbedeckende gelartige Schleimschicht sezernieren. Diese Schleimschicht dient dem Schutz der Oberfläche und dem Gleiten des Darminhaltes. Enteroendokrine Zellen produzieren Gastrin, Sekretin, Cholezystokinin und Serotonin und sind somit für die Steuerung der Motilität des Darms essentiell. Die Paneth-Zellen, auch Körnerzellen genannt, geben Lysozym und Defensine ins Lumen ab, welches Bakterien unwirksam macht. Dementsprechend kommt diesen Zellen eine wichtige Schutzfunktion zu.

Ferner enthält die Mukosa auch eine Vielzahl an freien Zellen, die ebenfalls für die Abwehr wichtig sind: Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten und Plasmazellen.

Unter der Mukosa, die diese unterschiedlichen Zelltypen beherbergt, befindet sich die Submukosa. Dabei handelt es sich um eine bindegewebige Schicht, in der Neurone, Blutgefäße und Lymphbahnen enden. Der Submukosa schließt sich die Tunica muscularis an, die aus quer- und längsangeordneten glatten Muskelzellen besteht. Diese sind in der Lage, einen basalen elektrischen Rhythmus zu generieren, der zusammen mit endogenen Reflexen die Peristaltik erzeugt. Dabei handelt es sich um regelmäßige Kontraktionswellen, die den Darminhalt von oral nach aboral transportieren. Bei der abschließenden Schicht handelt es sich um die bindegewebige Serosa (Junqueira et al, 2005).

#### **1.4.2. Das Krankheitsbild von Morbus Crohn**

Die chronisch entzündliche Darmerkrankung M. Crohn wurde nach dem Gastroenterologen Burrill Bernard Crohn benannt, der das Krankheitsbild bereits im Jahr 1932 beschrieb (Crohn et al, 1932). Die häufigsten klinischen Symptome bei dieser Erkrankung sind wiederkehrende Diarrhoen, abdominelle Schmerzen, Anämien, allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber und Gewichtsverlust. Tritt M. Crohn bereits im Kindesalter auf, so kann zusätzlich eine Wachstumsverzögerung auftreten. Bei M. Crohn können die inflammatorischen Prozesse grundsätzlich im gesamten Verdauungstrakt auftreten, wobei eine Lokalisationshäufigkeit im terminalen Ileum und proximalen Colon beobachtet werden kann. Die Entzündungen sind typischerweise transmural und diskontinuierlich (Mutschler, 2007). Häufig liegen ödematöse sowie fibrotische Veränderungen der Darmwand vor, die langfristig zu segmentalen Stenosen führen. Auch fissurale Ulcera sind typisch für diese Erkrankung. Das gleichzeitige Auftreten von ödematös aufgetriebener Schleimhaut und fissuralen Ulcera führen zu einem für M. Crohn typischen „Pflastersteinrelief“ der Darmschleimhaut. Im fortgeschrittenen Stadium können die Schleimhautulcera in tiefere Wandschichten des Intestinaltrakts vordringen, wodurch es nicht selten zur Ausbildung von Fistelgängen zur Hautoberfläche oder benachbarten Organen kommt. Zudem können auch noch extraintestinale Manifestationen auftreten, wie beispielsweise Arthritis, Iritis, Uveitis, oder aber auch Osteoporose. Die Therapie erfolgt mit Kortikosteroiden und Immunsuppressiva. Die chirurgische Therapie von M. Crohn führt zu einer vorübergehenden Beseitigung der Symptome, allerdings kann die Erkrankung dadurch nicht geheilt werden (Gerok et al, 2000).

### **1.4.3. Die Epidemiologie des Morbus Crohn**

Die Inzidenz beträgt für M. Crohn in Europa bis zu 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Die Prävalenz beträgt 40- 70 Erkrankte pro 100.000 Einwohner. M. Crohn tritt vorwiegend zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade auf, wobei Männer und Frauen in etwa gleich häufig betroffen sind (Gerok et al, 2000).

### **1.4.4. Das Krankheitsbild von Colitis ulcerosa**

Das Krankheitsbild von C. ulcerosa wurde erstmals im Jahr 1859 vom britischen Arzt Sir Samuel Wilks beschrieben. C. ulcerosa ist durch den ausschließlichen Befall des Colons und Rectums gekennzeichnet, der sich kontinuierlich oralwärts ausbreitet. In seltensten Fällen ist auch der letzte Abschnitt des terminalen Ileums betroffen, was als „Backwashileitis“ bezeichnet wird (Heuschen et al, 2000). Klinische Symptome bei dieser Erkrankung sind Diarrhoen, Tenesmen, intestinale Blutungen, Fieber, Anämien sowie abdominelle Schmerzen. Im Gegensatz zu M. Crohn beschränkt sich die Entzündung allerdings auf die Mukosa und Submukosa. Wie bei M. Crohn, können auch hier extraintestinale Manifestationen auftreten, wie Sakroiliitis, Uveitis und Osteoporose. Nach mehrjährigem Verlauf haben die Patienten zusätzlich ein erhöhtes Risiko, an einem kolorektalem Karzinom zu erkranken. Die Therapie erfolgt auch hier mit Kortikosteroiden und Immunsuppressiva. Die chirurgische Therapie von C. ulcerosa, bei der das Colon vollständig entfernt wird, führt zur Heilung dieser Erkrankung (Gerok et al, 2000).

### **1.4.5. Die Epidemiologie der Colitis ulcerosa**

Die Inzidenz beträgt für C. ulcerosa in Europa 2-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Die Prävalenz beträgt 40 Erkrankte pro 100.000 Einwohner. Diese Erkrankung tritt vorwiegend zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade auf, wobei auch hier Männer und Frauen in etwa gleich häufig betroffen sind (Gerok, 2000).

### **1.4.6. Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und C. ulcerosa ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, man geht allerdings davon aus, dass ein komplexes Zusammenspiel von genetischen, immunologischen und mikrobiologischen Faktoren sowie Umwelteinflüssen die Grundlage für diese Erkrankung bilden (Fiocchi, 1998).

Es ist bekannt, dass die Genetik eine Rolle bei der Entstehung von M. Crohn und C. ulcerosa spielt, da bei beiden Erkrankungen durchaus eine familiäre Häufung beobachtet werden kann. Auch bei bestimmten ethnischen Gruppen, wie den Juden, konnte eine Häufung von CED festgestellt werden (Gerok et al, 2000). Der genetische Einfluss wird ebenfalls durch Zwillingsstudien deutlich: bei monozygoten Zwillingen konnte im Vergleich zu dizygoten Zwillingen eine erhöhte Konkordanz (58,3%) festgestellt werden. Bei Colitis ulcerosa ist die Konkordanz für monozygote Zwillinge deutlich niedriger (6,3%) (Tysk et al, 1988). Da in bestimmten Familien allerdings sowohl M. Crohn, als auch C. ulcerosa vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass eine Überlappung bestimmter krankheitsassoziiierter Gene wahrscheinlich ist (Orholm et al, 1991). Verschiedene

Assoziationsstudien konnten Risiko- Loci in den Chromosomen 1, 3, 5, 7, 12, 16 und 19 identifizieren (Mathew und Lewis, 2004).

Das gute Ansprechen von CED- Patienten auf immunsupprimierende Medikamente und Cortison lässt den Schluss nahe, dass es sich dabei um eine Autoimmunerkrankung handelt (Gerok et al, 2000). Die Tatsache, dass Verwandte von M. Crohn-Patienten einen erhöhten Antikörper-Titer gegen die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) aufweisen, obwohl sie selber keinerlei Symptome aufweisen, deutet ebenfalls darauf hin. Bei ASCA handelt es sich um einen serologischen Marker, der mit M. Crohn assoziiert werden konnte (Vermeire et al, 2001). Ein genauer Auslöser für eine solche Autoimmunantwort ist allerdings nicht bekannt. Möglicherweise führen Antigene, die in der Darmflora vorhanden sind zu einer überschießenden Immunantwort, wodurch es zur Aktivierung von Entzündungskaskaden kommt.

Wegen der bei CED ständig auftretenden Entzündungen werden auch infektiöse Faktoren als Ursache diskutiert (Nell et al, 2010). Bisher konnte allerdings kein spezieller Erreger nachgewiesen werden.

Auch Umweltfaktoren, wie Ernährungsgewohnheiten und Rauchen werden als Ursache für beide Erkrankungen in Betracht gezogen. Gerade bei CED-Patienten können verschiedene Nahrungsmittelunverträglichkeiten beobachtet werden (Momma et al, 2010). Allerdings ist bis heute nicht klar, ob es sich dabei um eine Ursache oder um eine Folge dieser Erkrankung handelt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Raucher zwar ein vermindertes Risiko haben an *C. ulcerosa* zu erkranken, allerdings steigt dadurch das Risiko, an M. Crohn zu erkranken (Rubin und Hanauer, 2000).

### **1.5. Zielsetzung des Projekts „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“**

Bei M. Crohn und *C. ulcerosa* handelt es sich um chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), von denen laut dem Bundesministerium für Bildung und Forschung in Deutschland zurzeit in etwa 300.000 Menschen betroffen sind. Die Ursachen und die Entstehung von CED sind vielseitig und bis heute nicht vollständig geklärt. Neben Umwelteinflüssen, Ernährungs- und Hygienegewohnheiten sowie einer Barrierestörung werden auch genetische Faktoren diskutiert (Fiocchi, 1998).

Im Rahmen dieses Projektes sollte erstmals der Fokus auf die Epigenetik dieser Erkrankungen gerichtet werden, da es zunehmende Evidenz gibt, dass die Epigenetik auch eine Schlüssel-rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen spielt (Javierre et al., 2011). Ziel dieses Projektes war es, epigenetisch regulierte Suszeptibilitätsgene für CED zu identifizieren. Dazu sollte die Promotormethylierung einzelner aus der Literatur bekannter Kandidatengene (*Mucin-Gene*, *Claudin- 1*, *PAX5* und *IL17REL*) in entzündeten und nicht-entzündeten Mucosa-Arealen von CED-Patienten sowie in Mucosa-Arealen von nicht an CED erkrankten Kontrollindividuen mit Hilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung bestimmt werden. Die für diese Untersuchungen notwendigen Biopsate wurden im Rahmen von

Koloskopien, die in der ersten Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg Universitätsmedizin durchgeführt wurden, Mainz, gewonnen.

Langfristiges Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Entwicklung von neuen Biomarkern für CED zu leisten und gleichzeitig auch für ein besseres Verständnis der Ätiopathogenese von CED zu sorgen.

## **1.6. Stammzellen**

Bei Stammzellen handelt es sich um Körperzellen, die sich noch nicht ausdifferenziert haben und durch asymmetrische Zellteilung sowohl organspezifische Tochterzellen, als auch Zellen mit Stammzeleigenschaften hervorbringen können. Diese Zellen können sich unter bestimmten Bedingungen sowohl im Körper, also *in vivo*, als auch in der Zellkultur, also *in vitro*, unbegrenzt teilen und vermehren. Diese Eigenschaft bezeichnet man als Selbsterneuerung. Je nach Herkunftsort können Stammzellen in embryonale, fetale und adulte Stammzellen eingeteilt werden (Avasthi et al., 2008). Eine weitere Unterteilungsmöglichkeit kann durch die Klassifizierung des Differenzierungspotentials erfolgen.

Als „totipotent“ werden Stammzellen bezeichnet, die sich zu allen embryonalen und extraembryonalen Zelltypen ausdifferenzieren können. Sowohl die befruchtete Eizelle (Zygote), als auch die Zellen des embryonalen zwei- bis acht- Zellstadiums von Säugern sind totipotent. Als „pluripotent“ werden Stammzellen bezeichnet, die sich zu den Zellen der drei Keimblätter (Ekto-, Meso-, Endoderm) differenzieren können. Sie haben allerdings die Fähigkeit verloren eine Embryonalhülle zu bilden. „Multipotent“ sind Stammzellen, die sich in den unterschiedlichen Zelltypen eines Keimblatts differenzieren können, während „unipotente“ Stammzellen nur noch einen Zelltyp hervorbringen können. Diese Zellen werden auch als „Progenitorzellen“ bezeichnet (Blum, 2007).

### **1.6.1. Embryonale und adulte Stammzellen**

Embryonalen Stammzellen (ESCs) werden aus der inneren Zellmasse der Blastocyste gewonnen und können sich sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu den Zellen der drei Keimblätter, Ekto-, Meso- und Endoderm und den Keimbahnzellen ausdifferenzieren. Es handelt sich also um pluripotente Zellen. Bereits in den 80er Jahren konnten die ersten murinen ESCs isoliert werden. Im Jahr 1998 gelang es dann der Arbeitsgruppe um Thomson, die erste humane ES-Zelllinie zu isolieren.

Für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten und pluripotenten Zustands von ESCs und frühen embryonalen Zellen sind die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog unerlässlich. Die Gene, die diese Transkriptionsfaktoren codieren werden daher als sogenannte Pluripotenz-Markergene bezeichnet (Niwa, 2007). Die Promotoren von *Oct4* und *Nanog* weisen dabei in ESCs einen transkriptionell aktiven, unmethylierten Zustand und in somatischen Zellen einen transkriptionell reprimierten, voll methylierten Zustand auf (Okita et al., 2007 und Wernig et al., 2007). Um die ESCs *in vitro* in ihrem pluripotenten, undifferenzierten Zustand zu erhalten, ist die Einhaltung bestimmter Kulturbedingungen wichtig. So ist beispielsweise ein Feeder-Layer aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) nötig, da von diesen Zellen der Wachstumsfaktor LIF (leukemia inhibitory factor) kontinuierlich ins Medium abgegeben wird.



Das Entwicklungspotenzial von ESCs ist gerade für die Medizin von besonderem Interesse, da durch ein bestimmtes Signal diese Zellen auch *in vitro* zur Ausdifferenzierung in andere Zelltypen angeregt werden können und somit gerade in der Zellersatztherapie eine herausragende Rolle spielen könnten.

Die Verwendung von ESCs birgt allerdings ein ethisches Problem, da zur Gewinnung dieser Zellen „überzählige Embryonen“ zerstört werden müssen. Da ferner der Empfänger und die ESCs genetisch verschieden sind, muss davon ausgegangen werden, dass durch das Immunsystem des Empfängers eine Abstoßungsreaktion hervorgerufen wird (Bartram et al., 2006).

Neben ESCs gibt es ferner noch postembryonale Stammzellen, zu denen auch die adulten Stammzellen gezählt werden, die sich während der gesamten Lebensdauer eines Organismus zu spezialisierten Zellen ausdifferenzieren können. Bisher konnten in über zwanzig Organen des Körpers adulte Stammzellen nachgewiesen werden. Diese gewebespezifischen Stammzellen können Zellen, die durch Verletzung oder Zellverlust zugrunde gegangen sind, ersetzen. Da das Differenzierungspotential von adulten Stammzellen dennoch eingeschränkt ist, werden sie als multipotente Zellen bezeichnet (Blum, 2007).

Der Vorteil adulter Stammzellen liegt darin, dass sie den Patienten entnommen werden können, ohne dass ethische Bedenken bestehen und spätere Abstoßungsreaktionen zu erwarten wären. Der Einsatz von autologen adulten Stammzellen wäre allerdings nur dann sinnvoll, wenn sie zur Heilung von Erkrankungen eingesetzt würden, die keine genetische Ursache haben. Ferner muss in Betracht gezogen werden, dass auch adulte Stammzellen im Laufe der Zeit altern und dementsprechend alterungsbedingte Schäden aufweisen (Bartram et al., 2006). (Diplomarbeit Wolf M, 2009)

### **1.6.2. Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) und multipotente Keimbahnstammzellen (maGSCs)**

Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) sind an der Basalmembran der Tubuli seminiferi im Testis von Säugern lokalisiert. Sie sind für die lebenslange Spermatogenese in männlichen Lebewesen verantwortlich und besitzen dementsprechend sowohl die Eigenschaft der Selbsterneuerung, als auch die Eigenschaft der Differenzierung (Nayernia et al, 2004).

SSCs leiten sich von den primordialen Keimzellen (PGCs) ab, die wiederum aus Epiblastenzellen hervorgehen. Nach Migration der PGCs in die Genitalleiste werden sie von sogenannten Sertolizellen umschlossen und entwickeln sich dadurch zu Gonocyten, die zum Zeitpunkt der Geburt in der  $G_0/G_1$ - Phase des Zellzyklus arretiert sind. Erst in der postnatalen präpubertären Phase differenzieren sich die Gonocyten zu den SSCs. Durch mitotische Teilungen, gehen aus SSCs neben Spermatogonien des Typs A auch Spermatogonien des Typs B hervor, die sich zu primären Spermatocyten entwickeln. Diese primären Spermatocyten können dann wiederum in die Meiose-Phase eintreten. Dadurch

entstehen zwei haploide sekundäre Spermatocyten entstehen, die durch eine erneute Reifeteilung und die Spermiogenese zu vier reifen Spermien werden (Nayernia et al, 2004).

Der prozentuale Anteil von SSCs beträgt im adulten Testis einer Maus in etwa 0,03%. Dementsprechend müssen die SSCs erst angereichert werden, bevor sie erfolgreich kultiviert werden können (Tegelenbosch und de Rooij, 1993).

Kanatsu-Shinohara und Kollegen konnten im Jahr 2004 aus dem Testis neonataler Mäuse SSCs isolieren. Da in diesem Entwicklungsstadium nur die frühesten Spermatogonien und SSCs im Testis enthalten sind, konnte auf diese Weise eine Anreicherung erzielt werden. Die Kultivierung dieser Maus-SSCs führte zur Entstehung von multipotenten Keimbahnstammzellen, die pluripotente Eigenschaften aufweisen. So können diese Zellen - ähnlich wie die ESCs - zu unterschiedlichen Zelltypen differenziert werden, Teratome in immundefizienten Mäusen produzieren und nach der Injektion in Blastocysten Keimbahnchimären hervorbringen.

Während die Arbeitsgruppe um Kanatsu-Shinohara den Testis neonataler Mäuse zur Isolierung von SSCs nutzten, verwendete die Arbeitsgruppe um Wolfgang Engel und Gerd Hasenfuß von der Universität Göttingen das Testisgewebe von adulten Mäusen. In Hinblick auf eine Übertragung dieser Methode auf das humane System ist dies sehr sinnvoll, da adultes Gewebe in der Humanmedizin voraussichtlich häufiger zum Einsatz kommt. Für dieses Vorhaben, entwickelten die Göttinger Forscher eine genetische Selektionsstrategie: Sie generierten eine transgene Maus, die EGFP („enhanced green fluorescent protein“) unter der Kontrolle der Promotorregion des Gens *Stra8* exprimiert. Da *Stra8* für ein nur in männlichen Keimzellen exprimiertes Protein codiert, können die einzelnen Keimzellen der prämeiotischen Stadien über die Expression von EGFP identifiziert werden und mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) isoliert und angereichert werden. Fünf bis sechs Wochen nach der Transplantation von solchen EGFP<sup>+</sup>- Zellen in durch Cytostatika geschädigten Testes von Mäusen konnte eine erneute Spermienbildung beobachtet werden.

Als nächstes wurden diese Zellen unter ES-Zell- Bedingungen kultiviert, wodurch Zellkolonien entstanden, die vereinzelt wurden und weiter kultiviert wurden. Auf diese Art und Weise gelang es ESC-ähnliche Zelllinien zu generieren, die als multipotente adulte Keimbahnstammzellen (maGSCs, multipotent adult germline stem cells) bezeichnet werden. Diese maGSCs können ebenfalls in unterschiedliche Zelltypen differenziert werden, produzieren nach der subkutanen Injektion in immundefiziente Mäuse Teratome und bringen nach Blastocysteninjektion Keimbahnchimären hervor. Interessanterweise ähneln die maGSCs den ESCs morphologisch und sie exprimieren ebenfalls Pluripotenzmarkergene, wie *Oct4*, *Nanog* und *Sox2*.

Die Isolierung von SSC aus GFP<sup>+</sup>-transgenen Mäusen und ihre Kultivierung, lieferten die nötigen Erfahrungen, um später diese Zellen nur anhand der Morphologie aus unterschiedlichen WT-Mausstämmen identifizieren und isolieren zu können. Auch diese SSCs konnten zu maGSCs kultiviert werden (Guan et al, 2006).

Wenn es gelingen würde, humane multipotente adulte Keimbahnstammzellen (hmaGSCs) zu gewinnen, könnten diese Zellen eine geeignete Alternative zu humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) sein. Die Verwendung von hmaGSCs hätte den Vorteil, dass im

Gegensatz zu hESCs keine Abstoßungsreaktionen zu erwarten wären und auch keine ethischen Bedenken vorhanden wären. Da die DNA in Keimbahnzellen konserviert vorliegt, sollten ferner auch keine alterungsbedingten Schäden vorhanden sein sollten.

### **1.7. Zielsetzung des Projekts: „Vergleichende epigenetische Analyse von ESCs und maGSCs“**

Aus adultem Testisgewebe der Maus konnten SSCs isoliert werden und daraus unter Standardbedingungen der ES-Zellkultur maGSCs etabliert werden, die wesentliche Pluripotenzmerkmale aufweisen (Guan et al. 2006).

Im Rahmen von Vorarbeiten sollten verschiedene aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Engel erhaltene maGSC- und ESC-Linien bezüglich der Methylierung von Pluripotenzmarkergenen (*Nanog*, *Oct4*, *Lrrc34*, *Stra8*) und DMRs von geprägten Genen (*H19*, *Meg3*, *Snrpn*, *Igf2r*) verglichen werden. Dabei wurden maGSC-Linien und entsprechende männliche ESC-Linien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, d.h. von verschiedenen Maus-Stämmen (jeweils *Stra8*, 129/Sv, FVB, C57BL/6), untersucht. Zudem wurde analysiert, wie sich die Methylierung der oben genannten Genregionen während der Differenzierung von maGSC- und ESC-Linien verändert. Dabei sollte insbesondere überprüft werden, ob maGSCs im undifferenzierten und differenzierten Zustand im Gegensatz zu ESCs eher Keimbahn-spezifische Imprintingmuster aufweisen, die einen Einsatz von maGSCs in der Zellersatztherapie erschweren würden. Insgesamt sollten diese Untersuchungen dazu dienen, die Pluripotenz von maGSCs und ihr Potenzial für die regenerative Medizin zusätzlich zu unterstützen. Neben der Promotormethylierung von Pluripotenzmarkergenen wurde zusätzlich auch noch die Promotormethylierung von Pluripotenz-assoziierten miRNAs untersucht. Ziel war es auch hier zu überprüfen, ob sich die Methylierung der Gene im Zuge der Differenzierung der maGSCs und ESCs verändert und ob die Expressionsmuster der beiden Stammzelltypen einander ähneln.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

#### **Agarose –Gelelektrophorese–System**

Gelkammern, Gelschlitten, Gelkämme  
Spannungsquelle

PeqLab Biotechnologie, Erlangen  
Sigma-Aldrich, Deutschland

#### **pH-Meter**

Digital pH-Meter WTW

inoLab, Weilheim

#### **Photometer**

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

PeqLab Biotechnologie, Erlangen

#### **Pyrosequenzierer und Zubehör**

Vacuum Prep Tool  
PSQ™96MA Pyrosequencing System

Biotage, Deutschland  
Biotage, Deutschland

#### **Thermocycler**

DNA-Engine Tetrad® 2

Bio-RAD Laboratories GmbH,  
München

#### **Transilluminator**

Intas UV-Systeme,  
Intas Gel Jet Imager

Intas, Göttingen

#### **Vortexgerät**

Vortex-Genie2

Scientific Industries, Schwerte

#### **Waage**

Präzisionswaage CP220S-0CE

Sartorius, Göttingen

## **Zentrifugen**

Tischzentrifuge Centrifuge 5415D  
Minizentrifuge MICRO-Centrifuge II

Eppendorf, Hamburg  
NeoLab, Heidelberg

## **2.2. Chemikalien**

Agarose

Invitrogen, Karlsruhe

dNTPs

Roche Diagnostics, Mannheim

Ethanol

AppliChem GmbH, Darmstadt

TRIS

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Streptavidin Sepharose Beads

GE Healthcare, Deutschland

## **2.3. Enzyme**

FastStart Taq DNA Polymerase

Roche Diagnostics, Mannheim

## **2.4. Lösungen und Medien**

Annealing buffer, pH 7,6

20 mM Tris-Acetat  
2 mM Mg-Acetat

Binding buffer, pH 7,6

10 mM Tris-HCl  
2 M NaCl  
1 mM EDTA  
0,1 % Tween™ 20

Denaturation solution

0,2 M NaOH

Washing buffer, pH 7,6

10 mM Tris-Acetat

Orange G

Glycerin  
TRIS 1M, pH 7,5  
Orange G 0,1%  
H<sub>2</sub>O

TAE-Puffer

TRIS 2M  
EDTA 0,05M  
Eisessig 1M  
H<sub>2</sub>O

## 2.5. KIT-Systeme

EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit  
Pyro Gold Reagents

Qiagen, Hilden  
Biotage, Düsseldorf

## 2.6. Basenpaarstandard

100bp Leiter

Fermentas MBI, St. Leon-Roth

## 2.7. Primer

Nachfolgend findet sich eine Auflistung der Oligonukleotide, die zur Amplifizierung der regulatorischen Bereiche der Gene *CLDN1*, *MUC2*, *MUC6*, *MUC15*, *PAX5*, *IL17REL*, *H19*, *Snrpn*, *Igf2r*, *Meg3*, *Nanog*, *Oct4* und *Stra8* verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
hCLDN 1_F1Bio	5'-AGG GGT GAG ATA GTT AGT TAT AGT AAA-3'	59,7	27-mer
hCLDN1_R1	5'-CAT TAT CAA AAA AAC CTA ACC AAT ACC-3'	58,7°C	27-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
hMUC2_F1Bio	5'-TTT TGG GGT TAG GTT TGG AA-3'	68,1°C	20-mer
hMUC2_R1	5'-CCC TAT AAC CTA AAT ACC AAC ACA- 3'	65,2°C	24-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
hMUC6_F1	5'-TTG GGA ATG GGT GAT AAT GG-3'	69,3°C	20-mer
hMUC6_R1Bio	5'-ATC CAA CCC CTT AAT CAC CAC T-3	69,6°C	22-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
hMUC15_F1	5'-ATT GGG TAG ATT TTT TGT ATT TTA TTT GA-3'	57,5°C	29-mer
hMUC15_R1Bio	5'-TCC TAC ACT TCC TTT CAA AAC TTA T-3'	58,3°C	25-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
hPAX5_F1Bio	5'-AAT AGG GAG GGG AGG TTT GAG TT- 3'	71,2°C	23-mer
hPAX5_R1	5'-CTC CCC ACA TCA AAT TCC ATT CT-3'	72,2°C	23-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
hIL17REL_F1Bio	5'-GTT TTT GGA TGT TTT TTT TGG AAA TTT AGA-3'	59,5°C	30-mer
hIL17REL_R1	5'-CTC CAA ACT AAC CCT ACA ACT-3'	58,7°C	21-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mH19_3F1	5'-ATT TTG GGT TGA TAT TTA AGG TT G-3'	54,8°C	25-mer
mH19_3R1	5'-TAT AAA AAC ACC TAA CCT CCC TAC C-3'	59,7°C	25-mer
mH19_3F2Bio	5'-TGG GTT ATT TAA GGT TTG ATG-3'	55,9°C	24-mer
mH19_3R2	5'-TCC CTA CCC AAA AAA TCA CTT A-3'	54,7°C	22-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
mMeg3- IGM4_F1Bio	5'-ATT ATA AAA TGG TTG TAT GGT GTT-3'	52,5°C	24-mer
mMeg3- IGM4_R1	5'-TAC CAT AAC ATA TCC CAT ACC AAA-3'	55,9°C	24-mer
mMeg3- IGM4_R2Bio	5'-ACT ATA AAC CCA AAC TAC AAT TCA-3'	54,2°C	24-mer
mMeg3- IGM4_F2	5'-ATG GGA TTT GTT TAT GAT AAA TT-3'	50,0°C	23-mer
mMeg3- IGM5_R1Bio	5'-AAA TCC ACC CAA CTA CCC TTA ATA-3'	57,6°C	24-mer
mMeg3-	5'-GGG ATT TTT GAT TTT TTT GAG AGT-3'	54,2°C	24-mer

IGM5_F1			
mMeg3-IGM5_F2Bio	5'-GTG GAT TTG GTT TTA TGA ATG AAG-3'	55,9°C	24-mer
mMeg3-IGM5_R2	5'-CCC AAC CTA CTA ATC AAA AAT TTC-3'	55,9°C	24-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mlgf2r_OF	5'-TTA GTG GGG TAT TTT TAT TTG TAT GG -3'	56,9°C	26-mer
mlgf2r_IF	5'-GTG TGG TAT TTT TAT GTA TAG TTA GG -3'	56,9°C	26-mer
mlgf2r_OIRBio	5'-AAA TAT CCT AAA AAT ACA AAC TAC AC-3'	53,8°C	26-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mSnrpn_OF	5'-TAT GTA ATA TGA TAT AGT TTA GAA ATT AG-3'	54,0°C	29-mer
mSnrpn_OR	5'-AAT AAA CCC AAA TCT AAA ATA TTT TAA TC -3'	54,0°C	29-mer
mSnrpn_IFBio	5'-AAT TTG TGT GAT GTT TGT AAT TAT TTG G -3'	56,3°C	28-mer
mSnrpn_IR	5'-ATA AAA TAC ACT TTC ACT ACT AAA AT CC -3'	56,3°C	28-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
mNanog_BisR1_Bio	5'-TAC CCT ACC CAC CCC CTA TT-3'	59,4°C	20-mer
mNanog_BisF1	5'-GTG GAT TTT GTA GGT GGG ATT AA-3'	57,1°C	23-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
mOct4_BisR_Bio	5'-CCA CCC TCT AAC CTT AAC CTC T-3'	60,3°C	22-mer
mOct4_BisF	5'-GTA GGG GTG AGA GGA TTT TGA A-3'	58,4°C	22-mer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
mLrrc34_BisR	5'-ACA ATC TAC CCC TAC TCA CTC- 3'	61,0°C	24-mer
mLrrc34_BisF_Bio	5'-GGA AGT TTT TGT GGT TGT TAT GG-3'	57,1°C	23-mer



Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Tm	Länge
mStra8_BisR_Bio	5'-AAT CCT AAC ACC ACA TCA ATT -3'	57,6°C	24-mer
mStra8_BisF	5'-TTT TTT TTA AGG GGT TTT TGT TTG - 3'	52,5°C	24-mer
mStra8Intron2_RB	5'-CCA ATA ACC CTC ACA CAA ATT CAA - 3'	55,9°C	24-mer
mStra8Intron2_F	5'-TGG GTG TTT GTG AAT GTA TGT TT- 3'	55,3°C	23-mer

## 2.8. Primer für die Pyrosequenzierung

Für die Pyrosequenzierungsreaktionen wurden folgende Primer verwendet:

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
hCLDN1_S1	5'-GTT TAG TTT TTT TGT TAT TGG G-3'	44,8°C	22-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
hMUC2_S1	5'-AAA TCT AAT CAA ACT CCT TA-3'	47,8°C	20-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
hMUC6_S1	5'-GTT TAG ATT TTG TTT GGT TA-3'	49,1°C	20-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
hMUC15_S1	5'-AGT ATG AAT TTT AGG TAT ATT GAG-3'	45,6°C	24-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
hPAX5_S1	5'-AAA ATT CCA AAC ACC TT-3'	49,3°C	17-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
hIL17REL_S1	5'-ACA AAA AAT AAA AAC TAC TCT TC-3'	45,8°C	23-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
H19_3S1	5'-TTC AAA TAC TAA TAA TCT CC-3'	47,1°C	20-mer
H19_3S2	5'-AAA AAA ATC TAA TAA TTT AC-3'	40,9°C	20-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mlgf2r_Pyro1	5'-GGT ATT TTT ATG TAT AGT TAG GAT AG-3'	55,3°C	26-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mSnrpn_Pyro1	5'-ACA AAC CCA ACT AAC CTT C-3'	52,4°C	19-mer
mSnrpn_Pyro2	5'-TCC CAA ACA ATA ACT A-3'	41,5°C	16-mer
mSnrpn_Pyro3	5'-ACT CCC TCT CCT CTC TAC-3'	56,0°C	18-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mMeg3-IGM4_Pyro1	5'-CTT ATA CTC ACT ACA ATT CA-3'	49,1°C	20-mer
mMeg3-IGM4_Pyro2	5'-ATG GTT AGT TTG TGT ATT AG-3'	49,1°C	20-mer
mMeg3-IGM5_Pyro1	5'-TTT TGA TTT TTT TGA GAG TT-3'	45,0°C	20-mer
mMeg3-IGM5_Pyro2	5'-TTT CTA AAT TAT ACC TCA AT-3'	45,0°C	20-mer
mMeg3-IGM5_Pyro3	5'-CCT ACT AAT CAA AAA TTT CC-3'	49,1°C	20-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mNanog_Pyro1	5'-TGA ATT TAT AGG GTT GGT G-3'	50,2°C	19-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mOct4_Pyro1	5'-AAG GGT TGT TTT GTT TAG A-3'	48,0°C	19-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mLrrc34_BisPyro	5'-CTA CCC CTA CTC AAT CCT -3'	53,7°C	18-mer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm	Länge
mStra8_BisPyro	5'-TTT TTT TTT TTT ATA AGA GT -3'	40,9°C	20-mer
mStra8_Intron2Py	5'-TTT TAG AGT GTA TGG GGA G -3'	52,4°C	19-mer

## 2.9. Tiermaterial

Die in der Diplomarbeit verwendete und untersuchte DNA wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Engel, Institut für Humangenetik der Georg August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Die DNA wurde aus maGSCs und ESCs mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Stra8, 129/Sv, C57BL/6, FVB) extrahiert. Die Generierung der maGSC- und ESC-Linien ist in der Einleitung (1.4.3.) bzw. in Methoden (3.1.) beschrieben.

## 2.10. Datenbanken und Software

### 2.10.1. Verwendete Datenbanken und Internetadressen

Bezeichnung	Anwendung	Internetadresse
NCBI Homepage	Allgemeine Informationen und Links	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
PubMed	Literaturrecherche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
OMIM	Information über Gene und Erbkrankheiten	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM">www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM</a>
Ensembl	Information über die untersuchten Regionen	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">www.ensembl.org/index.html</a>
MWG	Bestellung von Oligos	<a href="http://www.ecom2.mwgdna.com/register/index.tcl">www.ecom2.mwgdna.com/register/index.tcl</a>
BiSearch	Primer Design, Search Tool	<a href="http://www.bisearch.enzim.hu/">www.bisearch.enzim.hu/</a>
CpG-island searcher	Informationen über CpG-Inseln	<a href="http://www.cpgislands.usc.edu">www.cpgislands.usc.edu</a>
Promotor 2.0 Prediction Server	Promotor Vorhersage Software	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/">www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/</a>
Proscan 1.7	Promotor Vorhersage Software	<a href="http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/">www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/</a>
Promotor Database	Promotor Vorhersage Software	<a href="http://www.rulai.cshl.edu/">www.rulai.cshl.edu/</a>

### 2.10.2. Verwendete Software

NanoDrop-1000 V.3.1.2

Pyrosequencing Assay Design Software der Firma Biotage

Pyro Q-CpG Software der Firma Biotage

SPSS, Version 19.0

### 3. Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv und Probensammlung

Die für diese Studie verwendeten Gewebeproben wurden durch Koloskopien gewonnen, die in der 1. Medizinischen Klinik- und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt wurden. Alle Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, haben nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Einverständniserklärung gegeben. Es wurden Biopsien von Kontrollindividuen ohne CED, von Patienten mit MC und von Patienten mit UC entnommen. Indikationen zur Durchführung dieser Untersuchung bei den Kontrollindividuen waren reine Vorsorgekoloskopien, vorgezogene Vorsorgekoloskopien bei positiver Familienanamnese für kolorektale Karzinome, Nachsorgekoloskopien nach einer Karzinombehandlung, Unregelmäßigkeiten im Stuhlgang, sowie Blutbeimengungen im Stuhl. Gewebeproben wurden dabei sowohl aus dem terminalen Ileum, als auch aus dem Colon entnommen. Bei Patienten mit M. Crohn wurden ebenfalls Gewebeproben aus dem terminalen Ileum und dem Colon entnommen, während bei Patienten mit C. ulcerosa ausschließlich Proben aus dem Colon entnommen wurden. Sofern eine Entzündung bei den chronisch kranken Patienten vorlag, wurden sowohl aus den entzündlich- veränderten Arealen als auch aus den nicht entzündeten Regionen Biopsien entnommen.

Die Gewebeproben wurden entweder bei -80°C eingefroren oder es wurde umgehend die DNA isoliert.

Proben	Status	Gewebe	Probenanzahl (n)
<b>M. Crohn- Patienten (CD)</b>	Entzündlich (I= Inflammatory)	Terminales Ileum (T.I.)	11
	Nicht-entzündlich (NI= noninflammatory)	Terminales Ileum (T.I.)	13
		Colon (C.)	8
	Entzündlich (I)	Colon (C.)	16
<b>C. ulcerosa- Patienten (UC)</b>	Nicht-entzündlich (NI)	Colon (C.)	16
	Entzündlich (I)	Colon (C.)	13
<b>Nicht-CED Patienten (Control)</b>	Nicht-entzündlich	Terminales Ileum (T.I.)	13
	Nicht-entzündlich	Colon (C.)	24

### **3.2. Die Extraktion genomischer DNA aus intestinalem Gewebe**

Die DNA wurde mit Hilfe der Aussalzmethode nach Miller isoliert. Dafür wurden die Gewebeproben zunächst mit 600µl SE- Puffer, 40µl 10% SDS und 10µl Proteinase K versetzt, kurz gevortext und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Proteine durch das Detergenz SDS denaturiert und durch die Proteinase K verdaut. Anschließend wurden die freigesetzten Proteinbestandteile durch die Zugabe von 270µl 6M NaCl gefällt und durch die anschließende Zentrifugation (10.000 rpm, 20min) präzipitiert. Die nun im Überstand befindliche DNA wurde zunächst in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 1000µl 96%igem Ethanol gefällt. Durch erneute Zentrifugation (14.000 rpm, 20 min) wurde die DNA pelletiert und der Überstand konnte verworfen werden. Nach einem Waschschrift mit 1000µl 70%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (14.000 rpm, 10min), konnte der Überstand verworfen werden und das DNA- Pellet mit Hilfe der SpeedVac unter ständiger Rotation getrocknet werden. Je nach Pelletgröße wurde die DNA in 100-200µl TE- Puffer 1h bei 37°C gelöst. Anschließend konnte mit Hilfe des Nanodrops (PeqLab Biotechnology, Erlangen) die Konzentration der DNA gemessen werden. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4°C.

### **3.3. Die Bisulfit- Behandlung genomischer DNA**

Diese Methodik wird zur Detektion von DNA-Methylierungen verwendet und basiert auf der chemische Modifikation nicht-methylierter Cytosine zu Uracil, während methylierte Cytosine unverändert aus der Reaktion hervorgehen. Die Bisulfitbehandlung der DNA wurde nach Anweisung des EpiTect Bisulfite Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Nachfolgend soll das Prinzip der Bisulfitbehandlung erläutert werden.

Ein Cytosin-Molekül kann über sein fünftes C-Atom ein Bisulfit-Ion binden, wodurch ein Cytosinsulphonat entsteht. Diese Reaktion ist relativ langsam und wird bei einem niedrigem pH-Wert katalysiert. In wässriger Lösung erfolgt anschließend durch die hydrolytische Abspaltung der NH<sub>2</sub>- Gruppe eine Desaminierung des Cytosinsulphonats, wodurch ein Uracil- SO<sub>3</sub>-Derivat entsteht, das durch eine anschließende Alkali-Behandlung zu Uracil desulphoniert wird. Diese sogenannte Cytosin- Konvertierung kann nur in einzelsträngiger DNA erfolgen, da sonst das C<sub>6</sub>- Kohlenstoffatom des Cytosinringes sterisch blockiert ist. Durch die Bisulfit-Behandlung sind die DNA- Stränge anschließend nicht mehr komplementär zueinander, weshalb eine nachfolgende Amplifikation durch eine Einzelstrang-PCR mit strangspezifischen Primern erreicht werden kann. Bei einer Amplifikation und Sequenzierung der Bisulfit-behandelten DNA werden alle Uracil- Moleküle als Thymin gelesen, während die 5-Methylcytosine weiterhin als Cytosin erkannt werden.

Da die Cytosin-Konvertierung erst durch hohe Konzentrationen von Bisulfitsalz, einem niedrigem pH- Wert, hohen Temperaturen und langen Reaktionszeiten erreicht wird, kann dies wiederum zu einer Degradation der DNA führen. Um den starken DNA-Verlust auszugleichen, muss eine relativ große Menge an Ausgangs-DNA eingesetzt werden (Schock et al, 2006).

### **3.4. Design der PCR- und Sequenzierungsprimer**

Die Sequenz des zu untersuchenden Gens (ca. 1000 bp vor dem ersten Exon) wurde aus der Datenbank Ensembl entnommen. Um die Promotorregion des Gens zu identifizieren, wurden verschiedene Promotorvorhersage-Programme (Promotor 2.0, Proscan, Promotor Database) verwendet. Zur Detektierung der CpG-Dichte wurde die Software „CpG Island searcher“ verwendet. Sowohl die PCR-Primer, als auch die Sequenzierprimer wurden mit Hilfe des Pyromark Assay Design 2.0 Software der Firma Qiagen designt. Abschließend wurden die Primer auf „single nucleotid polymorphismen“ (SNPs) und „Mismatches“ untersucht. Dafür wurden die Primer-Sequenzen in das ePCR Suchprogramm von BiSearch eingegeben.

### **3.5. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren, das in den 80er Jahren etabliert wurde, um eine exponentielle Amplifikation definierter DNA-Abschnitte zu ermöglichen. Ursprünglich für die Tumorforschung entwickelt, handelt es sich hierbei mittlerweile um eine molekular-genetische Standardmethode, weshalb an dieser Stelle nur kurz darauf eingegangen werden soll.

Die spezifische Amplifikation eines DNA-Abschnitts wird durch zwei Oligonucleotidprimer gewährleistet. Nach der Hitzedenaturierung binden sie an den komplementären DNA-Strängen und flankieren somit die zu vervielfältigende Sequenz. Die Primer liefern der DNA-Polymerase (Taq- Polymerase) eine freie 3'OH- Gruppe, wodurch dieses Enzym bei seiner optimalen Temperatur von in etwa 72°C durch Anhängen von Nucleotiden einen neuen Strang synthetisiert. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA, Annealing von den Primern und Elongation der DNA, steigt die DNA-Menge exponentiell an (Reineke, 2004).

Die durchgeführten PCR- Reaktionen wurden mit Hilfe der Fast Start Taq-Polymerase der Firma Roche durchgeführt und basieren auf folgendem Grundschemata:

10x Puffer	5 µl
dNTPs	1 µl
Forward Primer	2,5 µl
Reverse Primer	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	36,6 µl
DNA	2 µl
Σ	50 µl

Die PCR erfolgte im Thermocycler DNA Engine Tetrad 2 der Firma Bio-RAD. Die Amplifizierung der Matrize erfolgte unter folgenden Bedingungen:

### Programm 1

1.	95°C 4min	DNA-Denaturierung
2.	95°C 30sec	Matrizen-Denaturierung
3.	58°C 30sec	Primer-Annealing
4.	72°C 2min	Elongation
5.	Cycle to step 2	35 Zyklen
6.	72°C 7min	Elongation
7.	4°C forever	

Dieses Programm wurden für folgende Gene verwendet: *CLDN1*, *CLDN2*, *MUC6*, *MUC15*, *IL17REL*, *NOD2*, *CDH1*.

### Programm 2

1.	95°C 4min	DNA-Denaturierung
2.	95°C 30sec	Matrizen-Denaturierung
3.	56°C 30sec	Primer-Annealing
4.	72°C 2min	Elongation
5.	Cycle to step 2	34 Zyklen
6.	72°C 7min	Elongation
7.	4°C forever	

Dieses Programm wurde für folgende Gene verwendet: *MUC2*, *PAX5*.

### Programm 3

1.	96°C 5min	DNA-Denaturierung
2.	94°C 4min	Matrizen-Denaturierung
3.	55°C 2min	Primer-Annealing
4.	72°C 2min	Elongation
5.	Cycle to step 2	1 Zyklus
6.	94°C 1min	Matrizen-Denaturierung
7.	55°C 2min	Primer-Annealing
8.	72°C 2min	Elongation

9.	Cycle to step 6	34 Zyklen
10.	4°C forever	

Dieses Programm wurde für die erste Amplifikation bei der *Nested*PCR verwendet. Es wurden hierbei die DMRs von folgenden Genen amplifiziert: *Igf2r* und *Snrpn*.

#### Programm 4

1.	96°C 5 min	DNA-Denaturierung
2.	94°C 1 min	Matrizen-Denaturierung
3.	55°C 2 min	Annealing
4.	72°C 2 min	Elongation
5.	Cycle to step 2	34 Zyklen
6.	4°C forever	

Dieses Programm wurde für die zweite Amplifikation bei einer *Nested* PCR eingesetzt. Damit vervielfältigt wurden die DMRs von folgenden Genen: *Igf2r* und *Snrpn*.

#### Programm 5

1.	95°C 4 min	DNA-Denaturierung
2.	95°C 30 sec	Matrizen-Denaturierung
3.	55°C 30 sec	Annealing
4.	72°C 45 sec	Elongation
5.	Cycle to step 2	34 Zyklen
6.	72°C 7 min	Elongation
7.	4°C forever	

Dieses Programm wurde für die Amplifikation der regulatorischen Bereiche der Gene *Nanog*, *Oct4*, *Lrrc34* und *Stra8* (Promoter und Intron2) verwendet.



### Programm 6

1.	96°C 5 min	DNA-Denaturierung
2.	94°C 4 min	Matrizen-Denaturierung
3.	57°C 2 min	Annealing
4.	72°C 2 min	Elongation
5.	Cycle to step 2	1 Zyklus
6.	94°C 1 min	Matrizen-Denaturierung
7.	57°C 2 min	Annealing
8.	72°C 2 min	Elongation
9.	Cycle to Stepp 6	34 Zyklen
10.	4°C forever	

Dieses PCR-Programm wurde zur Amplifikation des Fragments 4.1. der DMR des Gens *Meg3* verwendet.

### Programm 7

1.	96°C 5 min	DNA-Denaturierung
2.	94°C 4 min	Matrizen-Denaturierung
3.	60°C 2 min	Annealing
4.	72°C 2 min	Elongation
5.	Cycle to Stepp 2	1 Zyklus
6.	94°C 1 min	Matrizen-Denaturierung
7.	60°C 2 min	Annealing
8.	72°C 2 min	Elongation
9.	Cycle to Stepp 6	34 Zyklen
10.	4°C forever	

Dieses PCR-Programm wurde zur Amplifikation der Fragmente 4.2., 5.1. und 5.2. der DMR des Gens *Meg3* verwendet.

### Programm 8

1.	94°C 4 min	DNA-Denaturierung
2.	57°C 2 min	Annealing
3.	72°C 2 min	Elongation

4.	Cycle to step 1	1 Zyklus
5.	94°C 1 min	Denaturierung
6.	57°C 2 min	Annealing
7.	72°C 2 min	Elongation
8.	Cycle to step 5	34 Zyklen
9.	4°C forever	

Dieses PCR-Programm wurde zur Amplifikation des Fragments 3 der Imprintingkontrollregion (ICR) des Gens *H19* verwendet.

Das Gelingen einer PCR wurde mit Hilfe einer horizontalen Gelelektrophorese kontrolliert. Den Gelen wurde Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde mit Orange G versetzt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größenbestimmung der PCR-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines 500bp-Leiter-Längenstandards. Die Gele wurden mit einer Video-Kamera fotografisch dokumentiert.

### **3.6. Die Pyrosequenzierung**

#### **3.6.1. Das Grundprinzip der Pyrosequenzierung**

Die Pyrosequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA ist eine Sequencing- by- synthesis-Methode, bei der unterschiedliche Enzyme zum Einsatz kommen und die quantitative Analyse von Methylierungsmustern ermöglicht. Dabei werden zunächst die verschiedenen Nucleotide nacheinander dem Reaktionsansatz hinzugegeben und die DNA-Polymerase verlängert dabei den zu synthetisierenden Strang, ausgehend von dem Sequenzierprimer. Der Einbau eines jeden Nucleotids ist verbunden mit der Abspaltung einer äquimolaren Menge von Pyrophosphat (PPi). Dieses Pyrophosphat wird in Anwesenheit von Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) durch das Enzym ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt, welches wiederum die nötige Energie für die luciferaseabhängige Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin liefert. Durch diese Reaktion kommt es zur Freisetzung von Licht, welches mit der eingebauten Nucleotidmenge, beziehungsweise mit der abgespalteten Pyrophosphatmenge in Relation steht. Dieses Licht wird durch eine Kamera detektiert und im Pyrogramm als Peak dargestellt. Als Substrat wird bei der Pyrosequenzierung alternativ zu dem Nucleotid dATP das Nucleotid dATPaS verwendet. Dieses Molekül kann genauso in die DNA eingebaut werden wie dATP, allerdings wird es nicht durch das Enzym Luciferase umgesetzt (Agah et al, 2004; Tost et al, 2006).

#### **3.6.2. Die Aufarbeitung der Amplifikate**

Wie bereits beschrieben, erfolgte die Amplifikation der Bisulfit-behandelten DNA mittels PCR. Die Besonderheit bei dieser PCR ist allerdings, dass einer der beiden eingesetzten PCR-Primer biotinyliert war. Diese Biotinylierung ist von essenzieller Bedeutung. Sie wird benötigt, um für die anschließende Pyrosequenzierungsreaktion einzelsträngige DNA-Moleküle der

PCR-Produkte isolieren zu können. Der biotinylierte Strang dient in der späteren Sequenzierungsreaktion als Template.

Der erste Schritt bei der Aufarbeitung des Amplifikats ist die Immobilisierung des PCR-Produkts und die anschließende Separierung des biotinylierten DNA-Strangs mit Hilfe von Streptavidin-Sepharose-Beads und der PyroMark Vacuum Prep Workstation der Firma Biotage. Dafür wurden jeweils 40µl Bindung Buffer, 40µl des jeweiligen PCR- Produkts und 5µl Streptavidin-Sepharose-Beads in die Wells einer 96-Well-Platte überführt und fünf Minuten auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immobilisierung wird durch die hohe Affinität zwischen Streptavidin und Biotin erreicht. Anschließend werden die immobilisierten Amplifikate mit dem Vacuum Prep Tool aufgenommen und zunächst in 70%igem Ethanol gewaschen, um sie auf die Separierung der Doppelstränge vorzubereiten. Die Trennung der Doppelstränge wird dadurch erreicht, dass die Amplifikate mit Hilfe des Vacuum Prep Tools in einen NaOH enthaltenden Denaturierungspuffer überführt werden. Abschließend werden die Einzelstränge in einem Waschpuffer gereinigt und in eine PCR-Platte, die pro Well 38,4µl Annealing Buffer und 1,6µl Sequenzierprimer enthält, entlassen. Das Annealing des Sequenzierprimers an die einzelsträngige Matrize wird durch eine zwei minütige Inkubation bei 80°C erreicht.

### **3.6.3. Die Auswertung der Pyrosequenzierung**

Nach Beendigung der Sequenzierungsreaktion werden die Ergebnisse als Pyrogramme dargestellt, wodurch der prozentuale Methylierungsgrad jeder einzelnen CpG-Site, sowie die Durchschnittsmethylierung der untersuchten Sequenz entnommen werden kann. Um die Qualität der Bisulfitbehandlung zu kontrollieren, wurden Cytosine, die nicht von einem Guanin gefolgt wurden, als interne Kontrolle verwendet. Da diese nicht-methylierten Cytosine nach einer Bisulfit-Behandlung in Form von Uracil vorliegen, werden sie anschließend durch die PCR zu Thymin umgewandelt. Dementsprechend sollten diese ursprünglich nicht-methylierten Cytosine nach der Sequenzierungsreaktion im Pyrogramm in Form von Thymin-Peaks angezeigt werden. Die Auswertung der Pyrosequenzierung wurde durch die Pyro Q-CpG Software der Firma Biotage ermöglicht.

### **3.7. Auswertung der Ergebnisse**

Die für das Projekt „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ generierten Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS, Version 19.0, ausgewertet. Im Zuge der Auswertung wurden die die Kontrollgruppen mit den erkrankten Gruppen verglichen. Auch innerhalb der erkrankten Gruppen fand ein Vergleich statt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U- Tests bestimmt. Zur Korrektur der Ergebnisse wurde ein Bonferroni-Test durchgeführt.

Um die Promotormethylierung der Pluripotenzmarkergene, der geprägten Gene und der miRNA-Gene zu ermitteln, wurden für die untersuchten Zelllinien mindest zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die für das Projekt „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ untersuchten Gene

#### 4.1.1. Das Claudin 1 (CLDN1)-Gen

Bei Claudinen handelt es sich um eine Familie von hochkonservierten Transmembranproteinen (Morita et al, 1999), die zusammen mit weiteren Proteinen die „Tight junctions“ bilden, „Tight junctions“ umgürteln die Epithelzellen und weisen sowohl eine „Gate“- als auch eine „Fence“- Funktion auf. Bis heute konnten insgesamt vierundzwanzig Mitglieder dieser Familie identifiziert werden. Dabei leitet sich der Name „Claudin“ von dem lateinischen „*claudere*: *schließen*“ ab und bezieht sich damit auf die ersten identifizierten Claudine- 1 und -4, die eine abdichtende Funktion haben. Es sind allerdings mittlerweile auch porenbildende Claudine, wie Claudin- 2 bekannt (Furuse et al, 1998). Die Zusammensetzung der Claudine ist entscheidend für den Grad der Permeabilität des Epithels. Je stärker die Expression von porenbildenden Claudinen, desto höher ist die Permeabilität des Epithels (Reyes et al, 2002).

Claudine haben ein Molekulargewicht von etwa 22-27 kDa und weisen vier Transmembrandomänen, eine intrazelluläre und zwei extrazelluläre Schleifen auf (Van Itallie et al, 2006). Sowohl der N- als auch der C- Terminus sind im Cytoplasma gelegen. Über das am C-Terminus befindliche PDZ-Bindemotiv werden die Claudine am Aktin-Zytoskelett der Zelle verankert (Itoh et al, 1999). Über die extrazellulären Schleifen können Claudine mit anderen Claudinen eine homo- oder heterophile Bindung eingehen (Angelow et al, 2008).

Das Protein Claudin-1 hat eine abdichtende Funktion und kann in Epithelien mit undurchlässigen „Tight- Junctions“, wie sie im Colon vorliegen, nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten Dhawan et al nachweisen, dass die Expression von *CLDN1* in humanen Colon-Karzinomen erhöht ist (Dhawan et al, 2005). Das *CLDN1*-Gen ist auf Chromosom 3q28-q29 lokalisiert (Halford et al, 2000).

Die Tatsache, dass durch Claudine auch die Expression von proinflammatorischen Cytokinen beeinflusst wird, macht sie als Ansatzpunkt für die CED-Forschung interessant.

Die zu analysierende Sequenz von *CLDN1* ( 3 CpGs):

GAAAYGTTGTTTATATGTTTTATTTGYGAYGA

Die bezüglich Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y (= C

#### 4.1.2. Die Mucin-Gene *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*

Das Darmepithel ist mit einer schützenden Schleimschicht, dem Mucus, überzogen. Der Mucus dient als physikalische Barriere und erleichtert die Darmpassage, indem er den Darminhalt befeuchtet und ferner das Epithel vor mechanischen Einflüssen schützt. Der Mucus besteht nicht nur aus Wasser, Kohlenhydraten, Lipiden und Salzen, sondern auch aus Glycoproteinen, die als Mucine bezeichnet werden.

Die Mucin-Genfamilie besteht aus 21 Mitgliedern. Die einzelnen Mucine können in zwei Gruppen eingeteilt werden: die membranständigen Mucine (wie beispielsweise *MUC1*) und die sezernierten Mucine, wie beispielsweise *MUC6* und *MUC15*. Die Mucin-Gene liegen im Genom geclustert vor. Die für die membranständigen Mucine kodierenden Gene liegen auf den Chromosomen 7q22 (*MUC3A*, *MUC3B*, *MUC11*, *MUC12* und *MUC17*), 3q2 (*MUC4*, *MUC13* und *MUC20*) und 1q21 (*MUC1* und *MUC9*) (Satsangi et al, 1996). Die für die sezernierten Mucine kodierenden Gene *MUC2*, *MUC5A*, *MUC5B*, *MUC6* und *MUC15* liegen alle auf dem Chromosom 11p15.5 (Pigny et al, 1996).

Die membranständigen Mucine werden von den Epithelzellen produziert und spielen eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung. Die sezernierten Mucine werden von den Becherzellen produziert und an die Oberfläche abgegeben, wo sie die Schleimschicht über dem Epithel bilden. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch ein lösliches Mucin, *MUC7*, bekannt ist. Es ist im Speichel nachweisbar und hat eine antibakterielle Funktion (Bobek et al., 2003).

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die Promotormethylierung der für sezernierte Mucine kodierenden Gene *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* untersucht. Diese sezernierten Mucine haben alle eine protektive Funktion, indem sie das Epithel des Gastrointestinaltraktes beispielsweise vor pathogenen Mikroorganismen oder aber mechanischen Traumata schützen. Moehle et al konnten 2006 nachweisen, dass *MUC2* im Intestinaltrakt stark exprimiert wird. Ferner konnten sie durch Microarray-Analysen auch belegen, dass *MUC2* bei CED herunterreguliert ist. Dieselbe Studie konnte für *MUC6* bei CED-Patienten keine veränderte Expression beobachten. Dennoch wurde im Rahmen der Doktorarbeit die Methylierung des Promotors von *MUC6* getestet. Für *MUC15* konnte die Arbeitsgruppe um Huang feststellen, dass es in colorektalen Karzinomen stark exprimiert wird (Huang et al., 2009). Insbesondere *C. ulcerosa*-Patienten haben nach mehrjährigem Verlauf der Erkrankung eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an colorektalen Karzinomen zu erkranken.

Die zu analysierende Sequenz von *MUC2* (2 CpGs):

ACCCRCCATAAACCCCAAAACACCCRC

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit R (= G oder A, da reverse Sequenz untersucht) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

Die zu analysierende Sequenz von *MUC6* (5 CpGs):

TYGYGGYGTTYGTYGG

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y (= C oder T) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

Die zu analysierende Sequenz von *MUC15* (4 CpGs):

TTGAAYGGTTTTGGYGTATTTTTAAAYTTTGATGTGYG

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y (= C oder T) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

#### 4.1.3. Das *PAX5* -Gen

Die Gene der *PAX* (paired- box- genes)- Familie codieren für gewebespezifische Transkriptionsfaktoren, die für die frühe Entwicklung von Organismen eine wichtige Rolle spielen. Mutationen in diesen Genen führen zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen, die mit sogenannten Fehlbildungssyndromen assoziiert sind (Chi, 2002). Ferner konnte eine Fehlregulierung von *PAX*-Genen bei Krebserkrankungen festgestellt werden (Pasqualucci et al, 2001).

Charakteristisch für alle *PAX*-Proteine ist das Vorhandensein einer „Paired“-Domäne. Dabei handelt es sich um eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne, die aus 128 Aminosäuren (AS) besteht und zwei Homöobox-Subdomänen aufweist (Treisman et al, 1991). Diese Subdomänen setzen sich wiederum aus drei  $\alpha$ -Helices zusammen, wobei die dritte Helix als Erkennungssequenz fungiert und in der Promotorregion des Zielgens eine Bindung eingehen kann.

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten kann man die *PAX*-Gene in vier Gruppen einteilen, wobei *PAX5* zusammen mit *PAX2* und *PAX8* eine Klasse bildet. *PAX5* ist auf dem Chromosom 9p13.2 lokalisiert (Stapleton et al, 1993) und codiert für ein B-Zell spezifisches Aktivator-Protein, das als BSAP (**b**-cell- **s**pecific **a**ctivator **p**rotein) bezeichnet wird. BSAP ist in der Entwicklung von B-Zellen, die bei der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, involviert.

Es ist bekannt, dass bei einer vorherrschenden CED sämtliche Immunzellen in der intestinalen Lamina propia eine vermehrte Aktivität aufweisen. Die verstärkte Aktivität der CD4+- T-Zellen führt wiederum zur Stimulierung der B-Zellen, die wiederum eine verstärkte Produktion von Antikörpern aufweisen. Statt der mukosaprotektiven Immunglobuline A (IgA)

werden die komplementaktivierenden Immunglobuline G (IgG) gebildet. Eine Bindung von IgG an Epithelzellen des Colons konnte bei *C. ulcerosa* nachgewiesen werden. Auch bei M. Crohn Patienten konnte gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten Ablagerung von IgG und somit zu einer gesteigerten Komplementaktivierung in Endothelzellen der intestinalen Muscularis und Submucosa kommt. Interessanterweise kann die verstärkte B-Zell-Aktivierung auch im Blut der Patienten festgestellt werden (Schreiber, 1997, Norohna et al, 2009).

#### 4.1.4. Das *IL17REL*- Gen

Im Jahr 2010 ist es den Arbeitsgruppen um André Franke und Stefan Schreiber gelungen, eine proteinverändernde Mutation im auf Chromosom 22q13.33 lokalisierten Gen *IL17REL* mit *C. ulcerosa* zu assoziieren (Franke et al, 2010). Bei dieser Studie wurde das Erbgut von über 1000 *C. ulcerosa*- Patienten und 1700 Kontrollpersonen unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen genomweit auf Assoziationen mit SNPs untersucht.

Die genaue Funktion des Proteins *IL17REL*, das zur *IL17*- Rezeptor Familie zählt, ist bis heute noch nicht bekannt. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass *IL17REL* möglicherweise *IL17* binden kann, welches als proinflammatorisches Cytokin gegen pathogene Mikroorganismen fungiert. Durch die Bindung von *IL17* an *IL17REL* wird möglicherweise eine Kaskade ausgelöst, die in einer Degradation der extrazellulären Matrix des Pathogens resultiert (Franke et al, 2010).

Die zu analysierende Sequenz von *IL17REL* (3 CpGs):

ACAACTAAAACRAACRAAACACTCCCCCTCCCRA

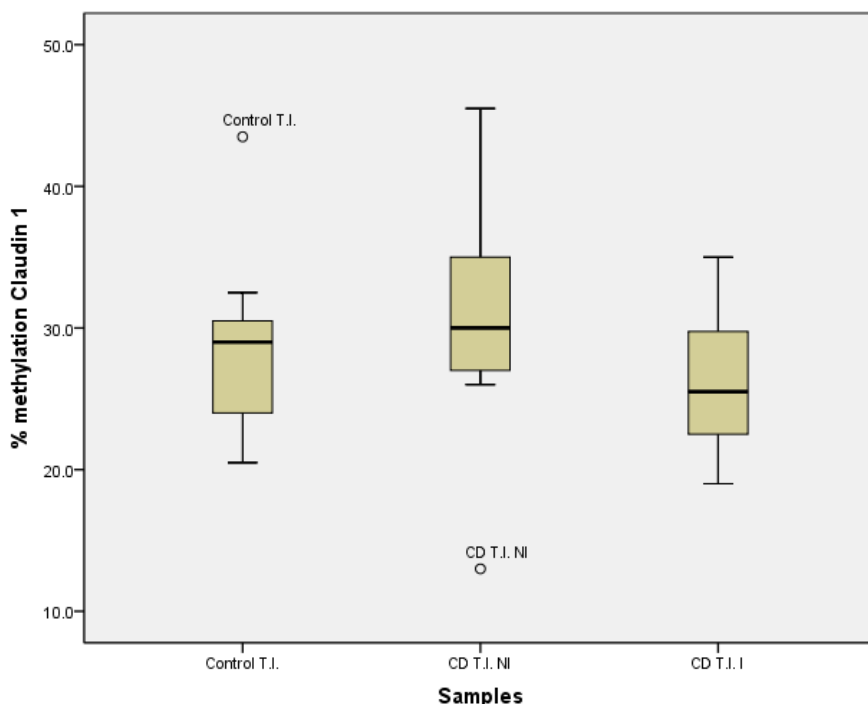
Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit R (= G oder A, da reverse Sequenz untersucht) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

## 4.2. Die Ergebnisse des Projekts „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden Biopsate von Kontrollpatienten und Patienten, die an CED leiden, gesammelt. Um zu überprüfen, ob es Methylierungs-Unterschiede für die Kandidatengene zwischen gesunden Patienten und CED-Patienten gibt, wurden sowohl entzündliche, als auch nicht-entzündliche Gewebeproben von den erkrankten Personen entnommen und den nicht-entzündlichen Proben der nicht an CED leidenden Kontrollpatienten gegenübergestellt. Um zu untersuchen, ob es im Zuge einer akuten Phase von CED zu epigenetischen Veränderungen kommt, wurden auch die Methylierungswerte der nicht-entzündlichen und entzündlichen Proben der CED-Patienten miteinander

verglichen. Für M. Crohn- Patienten wurden dementsprechend nicht-entzündliche und entzündliche Proben aus dem terminalen Ileum und Colon entnommen, während den C. ulcerosa- Patienten nur entzündliche- und nicht-entzündliche Biopsate aus dem Colon entnommen wurden. Bei den Kontrollpatienten wurden sowohl aus dem terminalen Ileum als auch aus dem Colon Biopsate gewonnen.

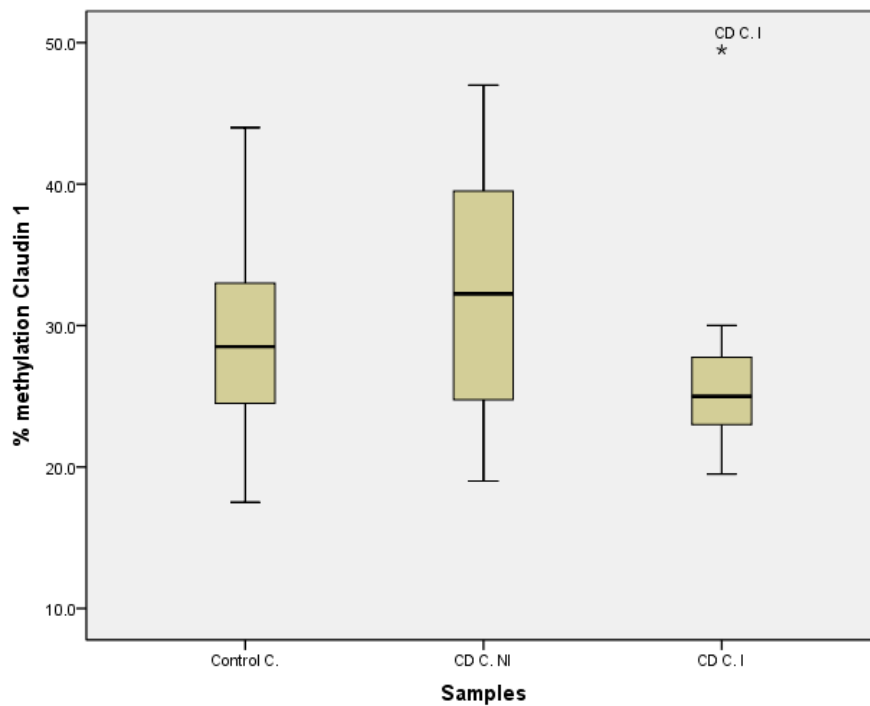
#### 4.2.1. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *CLDN1* bei M. Crohn-Patienten



**Abbildung 1: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *CLDN1* im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten** Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control T.I.), sowie der nicht-entzündlichen (CD T.I. NI) und entzündlichen (CD T.I. I) terminalen Ileum-Proben der M. Crohn- Patienten. Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

Im Abbildung 1 sind die für den Promotor des Gens *CLDN1* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem terminalen Ileum von den gesunden Kontrollpatienten (Control T.I.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des terminalen Ileums von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum not- inflamed = CD T.I. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum inflamed = CD T.I. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *CLDN1* beträgt bei den Kontrollen 29%, bei den nicht-entzündlichen Proben des terminalen Ileum der M. Crohn-Patienten 30% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn- Patienten 25,5%. Es konnte somit zwischen den drei Probengruppen kein signifikanter Unterschied in der *CLDN1*-Promotormethylierung festgestellt werden (siehe Anhang I).

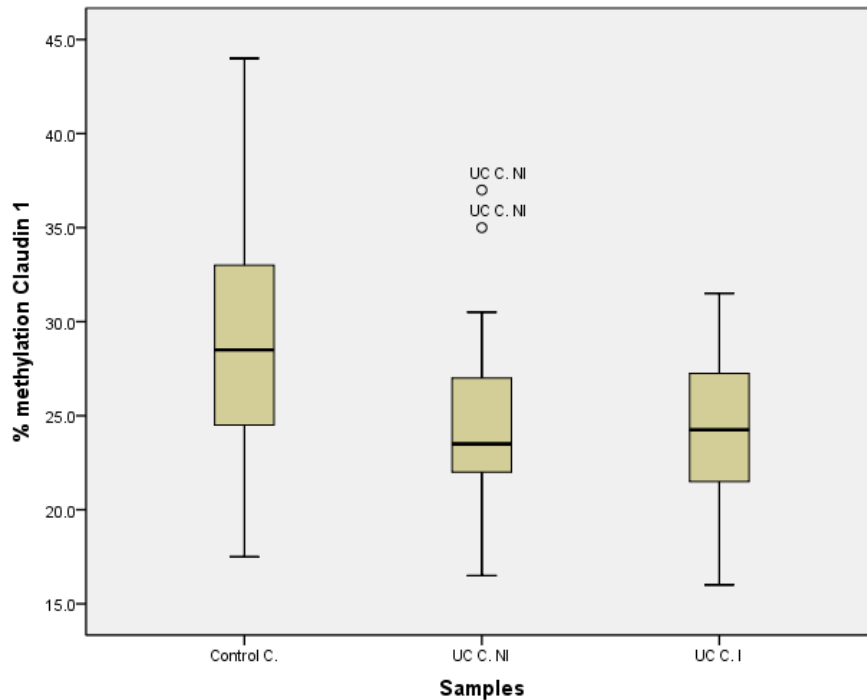




**Abbildung 2: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *CLDN1* im Colon von M. Crohn-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (CD C. NI) und entzündlichen (CD C. I) Colon-Proben der M. Crohn-Patienten. Sterne stellen extreme Ausreißer dar.

In Abbildung 2 sind die für den Promotor des Gens *CLDN1* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon not-inflamed = CD C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon inflamed = CD C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *CLDN1* beträgt bei den Kontrollen 28,5%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der M. Crohn-Patienten 32,25% und bei den entzündlichen Colon-Proben der M. Crohn-Patienten 25%. Somit konnte auch zwischen den Colon-Proben der drei Probengruppen kein signifikanter Unterschied in der Promotormethylierung von *CLDN1* festgestellt werden. Die statistischen Auswertungen sind dem Anhang I zu entnehmen.

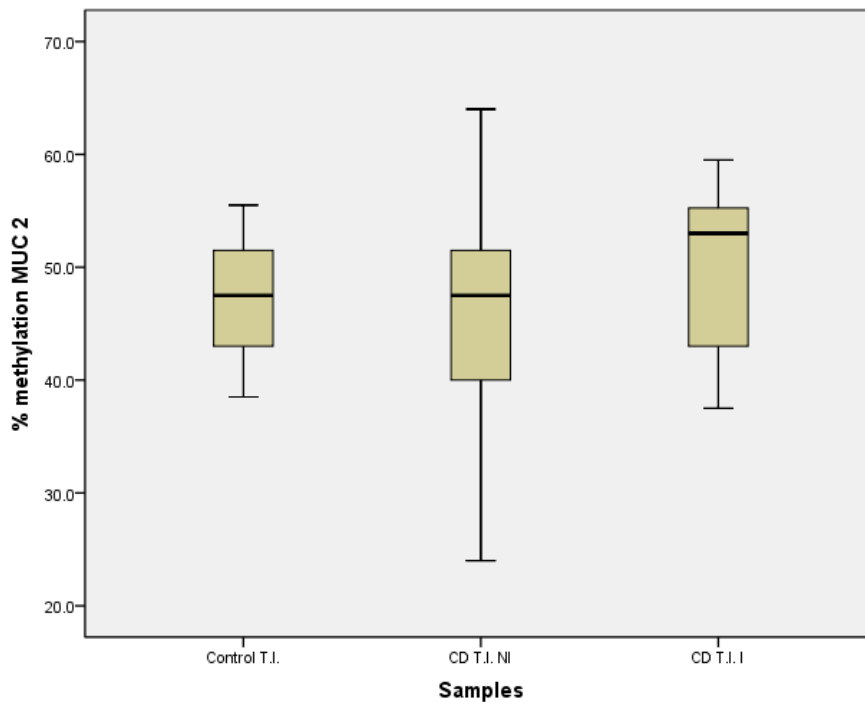
#### 4.2.2. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *CLDN1* bei *C. ulcerosa*-Patienten



**Abbildung 3: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *CLDN1* im Colon von *C. Ulcerosa*-Patienten**  
Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (UC C. NI) und entzündlichen (UC C. I) Colon-Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

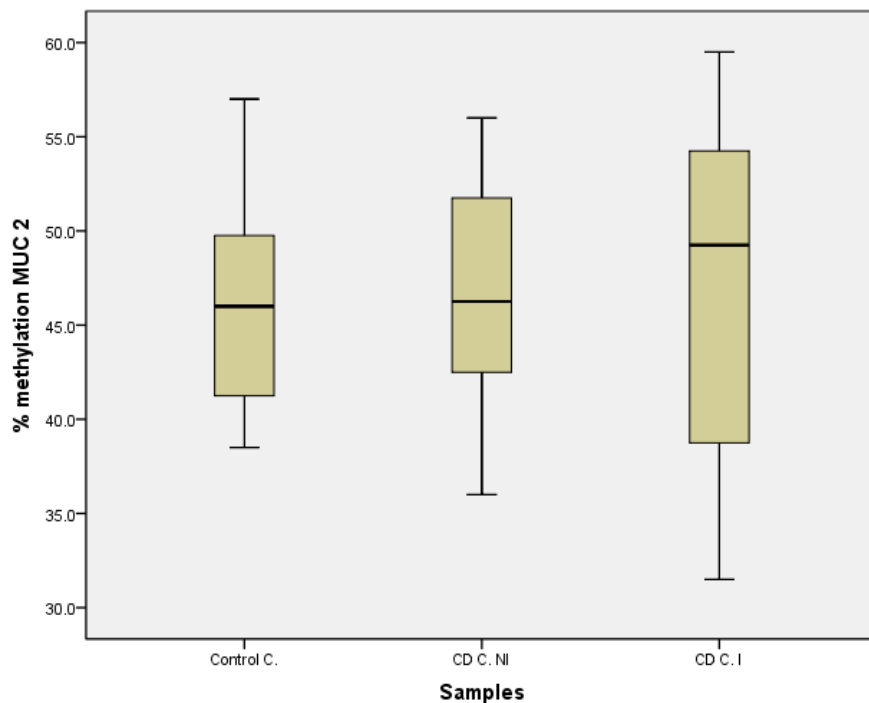
In Abbildung 3 sind die für den Promotor des Gens *CLDN1* gemessenen Methylierungsergebnisse in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon not- inflamed = UC C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon inflamed = UC C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *CLDN1* beträgt bei den Kontrollen 28,5%, bei den nicht-entzündlich veränderten Proben des Colons der *C. ulcerosa*-Patienten 23,5% und bei den entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten 24,25%. Somit konnte bezüglich der *CLDN1*-Promotermethylierung auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben und den nicht-entzündlichen und entzündlichen Proben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten festgestellt werden. Auch zwischen den nicht-entzündlichen und den entzündlich veränderten Proben von *C. ulcerosa*-Patienten ergab sich kein signifikanter Methylierungsunterschied (siehe Anhang I).

#### 4.2.3. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *MUC2* bei M. Crohn-Patienten



**Abbildung 4: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC2* im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten**  
Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control T.I.), sowie der nicht-entzündlichen (CD T.I. NI) und entzündlichen (CD T.I. I) terminalen Ileum-Proben der M. Crohn- Patienten.

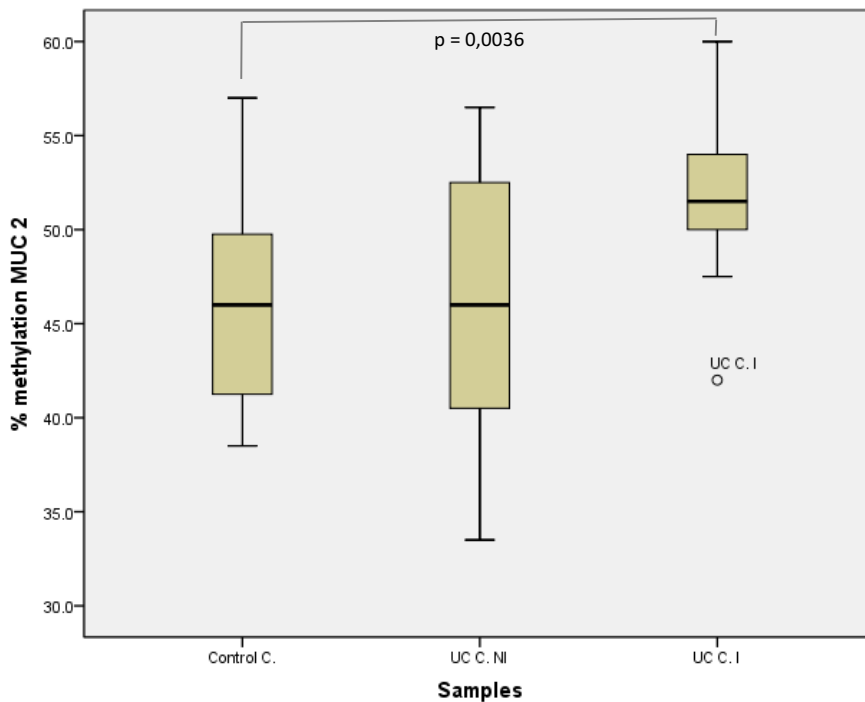
In Abbildung 4 sind die für den Promotor des Gens *MUC2* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem terminalen Ileum von den gesunden Kontrollpatienten (Control T.I.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des terminalen Ileums von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum not-inflamed = CD T.I. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum inflamed = CD T.I. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC2* beträgt bei den terminalen Ileum-Kontrollen 47,5%, bei den nicht-entzündlichen Proben des terminalen Ileum der der M. Crohn-Patienten 47,5% und bei den entzündlich veränderten Proben der M. Crohn-Patienten 53%. Somit konnte zwischen den drei Probengruppen kein signifikanter Unterschied in der Promotormethylierung von *MUC2* festgestellt werden (siehe Anhang I).



**Abbildung 5: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC2* im Colon von M. Crohn-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (CD C. NI) und entzündlichen (CD C. I) Colon-Proben der M. Crohn- Patienten.

In Abbildung 5 sind die für den Promotor des Gens *MUC2* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündliche Gewebeproben des Colons von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon not- inflamed = CD C. NI) und den entzündliche Gewebeproben aus dem Colon von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon inflamed = CD C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC2* beträgt bei den Colon-Kontrollen 46%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der M. Crohn-Patienten 46,25% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 49,25%. Somit ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in der *MUC2*-Methylierung zwischen den drei Probengruppen (siehe Anhang I).

#### 4.2.4. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *MUC2* bei *C. ulcerosa*-Patienten



**Abbildung 6: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC2* im Colon von *C. Ulcerosa*-Patienten**  
Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (UC C. NI) und entzündlichen (UC C. I) Colon-Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Zwischen den Kontrollproben und den entzündlichen Colonproben konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,0036$ ). Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 6 sind die für den Promotor des Gens *MUC2* gemessenen Methylierungsergebnisse in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon not- inflamed = UC C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon inflamed = UC C. I) dargestellt.. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC2* beträgt bei den Kontrollen und bei den nicht-entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten jeweils 46%. Somit kann beim Vergleich der Kontrollproben mit den nicht-entzündlichen Colon-Biopsate kein signifikanter Methylierungsunterschied festgestellt werden. Die mittlere Methylierung von *MUC2* bei den entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten ist im Vergleich zu den beiden anderen Probengruppen erhöht und beträgt 51,5%. Der Signifikanztest ergab einen signifikanten Unterschied nur beim Vergleich der entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten mit der Kontrollgruppe ( $p=0,0036$ ), nicht aber im Vergleich mit der Gruppe der nicht-entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Eine höhere Methylierung des Promotors geht einher mit der Herunterregulierung des Gens. Dementsprechend muss davon ausgegangen werden, dass bei einer erhöhten Krankheitsaktivität von *C. ulcerosa* eine geringere Menge an *MUC2* exprimiert wird.

#### 4.2.5. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *MUC6* bei M. Crohn-Patienten

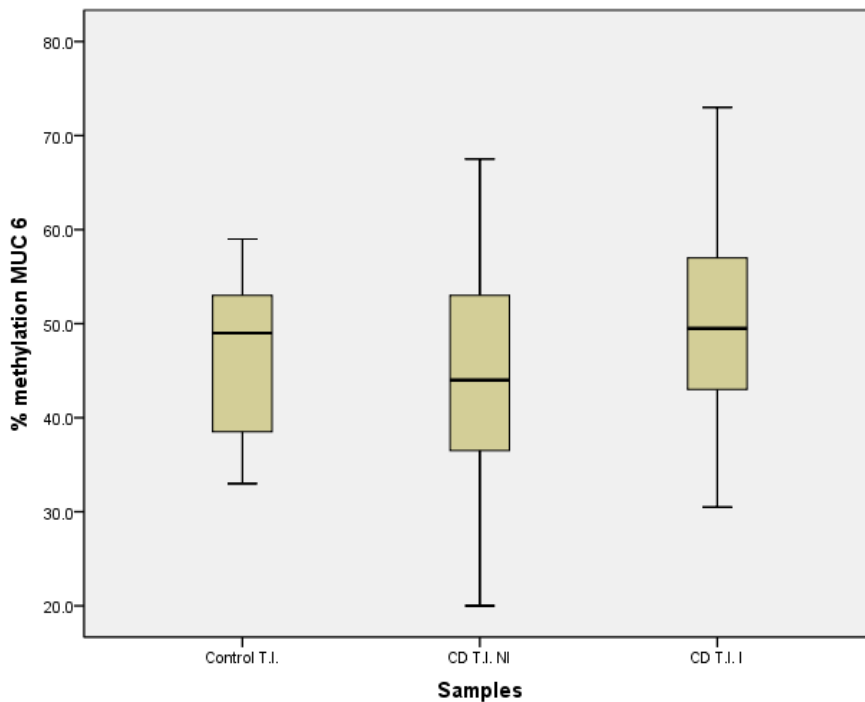
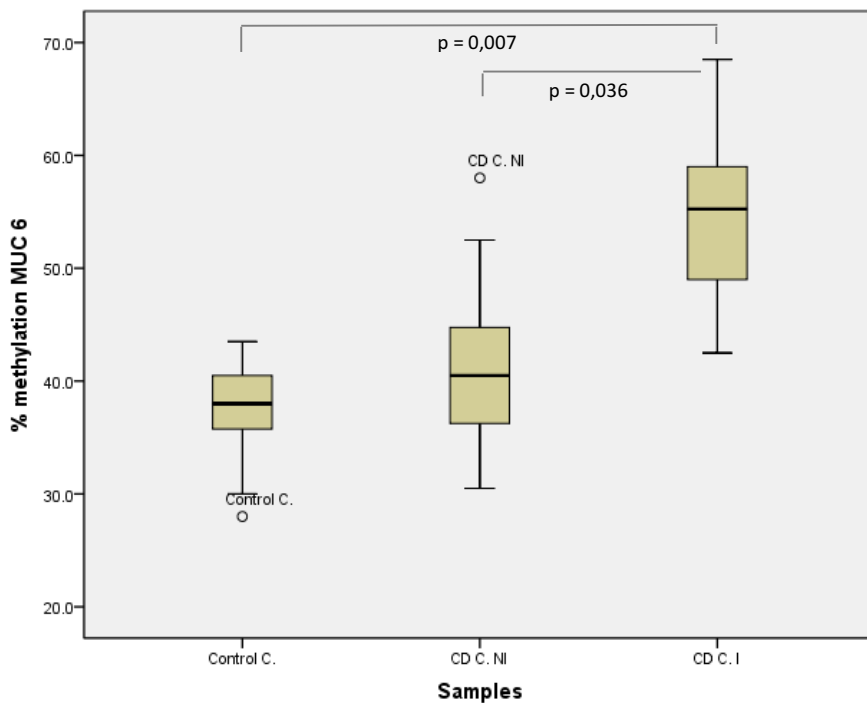


Abbildung 7: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC6* im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten. Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control T.I.), sowie der nicht-entzündlichen (CD T.I. NI) und entzündlichen (CD T.I. I) terminalen Ileum-Proben der M. Crohn-Patienten.

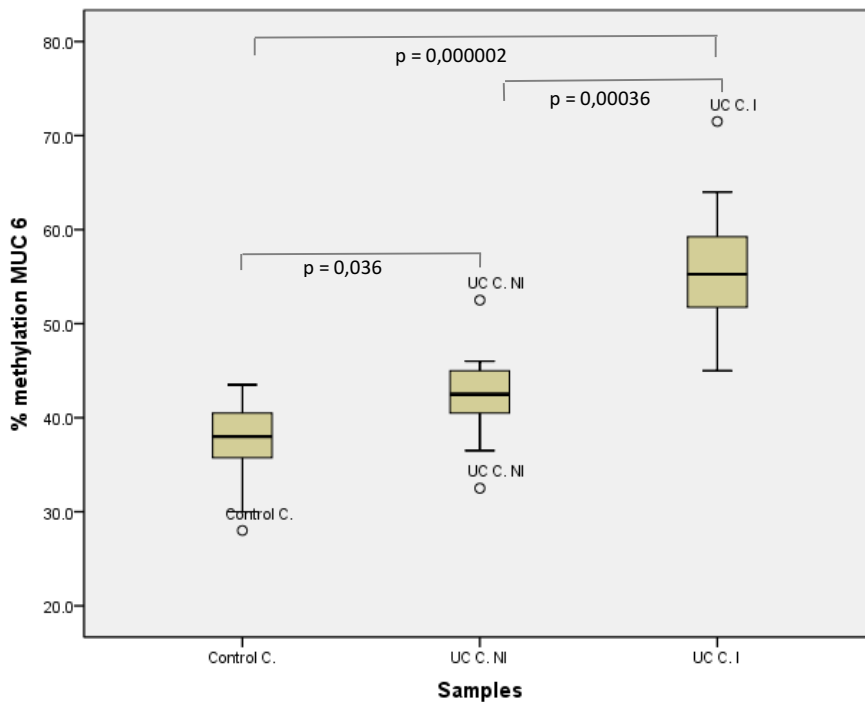
In Abbildung 7 sind die für den Promotor des Gens *MUC6* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem terminalen Ileum von den gesunden Kontrollpatienten (Control T.I.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des terminalen Ileums von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum not-inflamed = CD T.I. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum inflamed = CD T.I. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC6* beträgt bei den Kontrollen 49%, bei den nicht-entzündlichen Proben des terminalen Ileum der M. Crohn-Patienten 44% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 49,5%. Somit ergaben sich zwischen den drei Probengruppen keine signifikanten Unterschiede in der Promotormethylierung von *MUC6* (siehe Anhang I).



**Abbildung 8: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC6* im Colon von M. Crohn-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (CD C. NI) und entzündlichen (CD C. I) Colon-Proben der M. Crohn- Patienten. Die entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten weisen eine signifikant höhere Methylierung als die Kontrollen ( $p = 0,007$ ) und die nicht-entzündlichen Proben der M. Crohn- Patienten auf ( $p = 0,036$ ). Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 8 sind die für den Promotor des Gens *MUC6* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon not-inflamed = CD C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon inflamed = CD C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC6* beträgt bei den Kontrollen 38%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der Proben der M. Crohn-Patienten 40,5% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 55,25%. Dementsprechend weisen die entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten eine signifikant höhere Methylierung im Vergleich zu den Kontrollproben ( $p = 0,007$ ) und den nicht-entzündlichen Colonproben der M. Crohn-Patienten ( $p = 0,036$ ) auf. Eine erhöhte Methylierung geht einher mit einer Herunterregulierung des Gens. Es ist daher anzunehmen, dass bei zunehmender Krankheitsaktivität die Methylierung der *MUC6*-Promotorregion ansteigt und das Gen somit herunterreguliert wird.

#### 4.2.6. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *MUC6* bei *C. ulcerosa*-Patienten



**Abbildung 9: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC6* im Colon von *C. Ulcerosa*-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (UC C. NI) und entzündlichen (UC C. I) Colon-Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Die Methylierung ist in den entzündlichen Proben signifikant höher als in den Kontrollproben ( $p = 0,000002$ ) und als in den nicht-entzündlichen Proben ( $p = 0,00036$ ). Auch die nicht-entzündlichen Proben weisen eine signifikant höhere Methylierung als die Kontrollproben auf ( $p = 0,036$ ). Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 9 sind die für den Promotor des Gens *MUC6* gemessenen Methylierungsergebnisse in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon not-inflamed = UC C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon inflamed = UC C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC6* beträgt bei den Kontrollen 38%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der *C. ulcerosa*-Patienten 42,5% und bei den entzündlichen Proben der 54,75%. Somit ist die Promotormethylierung von *MUC6* in den nicht-entzündlichen Colonproben der *C. ulcerosa*-Patienten signifikant höher als in den Kontrollproben ( $p = 0,036$ ). Auch die entzündlichen Proben weisen eine signifikant höhere Methylierung auf sowohl im Vergleich mit den Kontrollproben ( $p = 0,000002$ ) als auch im Vergleich mit den nicht-entzündlichen Colonproben der *C. ulcerosa*-Patienten ( $p = 0,00036$ ). Dies bedeutet, dass auch hier eine Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der Methylierung von *MUC6* beobachtet werden kann: Je stärker die Krankheit fortschreitet, desto höher ist die Methylierung von *MUC6*. Da eine hohe Methylierung mit einer Herunterregulierung des Gens einhergeht, muss davon ausgegangen werden, dass das Gen bei akutem Verlauf schwächer exprimiert wird als in schubfreien Phasen.



#### 4.2.7. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *MUC15* bei M. Crohn-Patienten

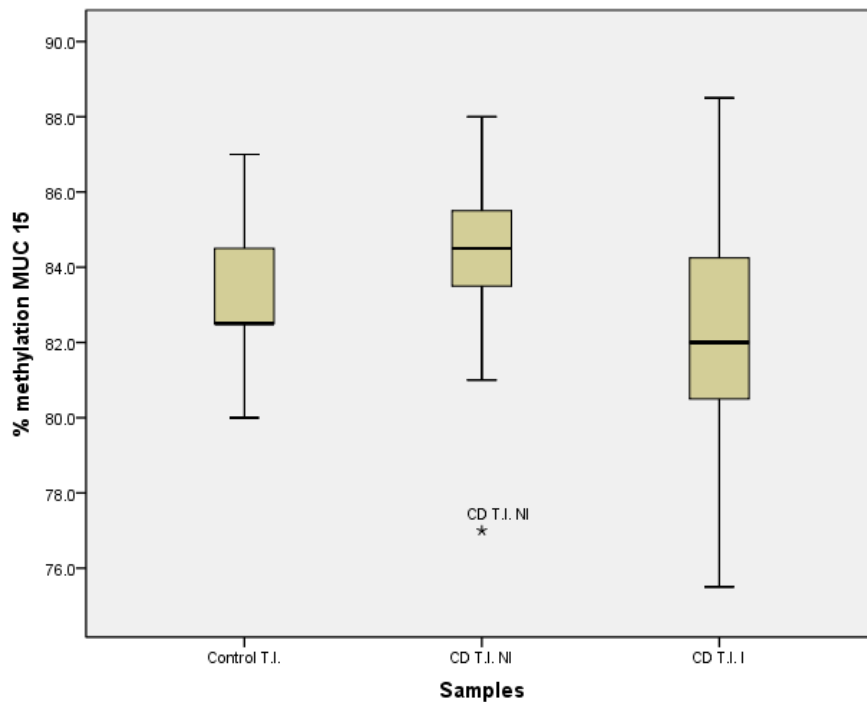
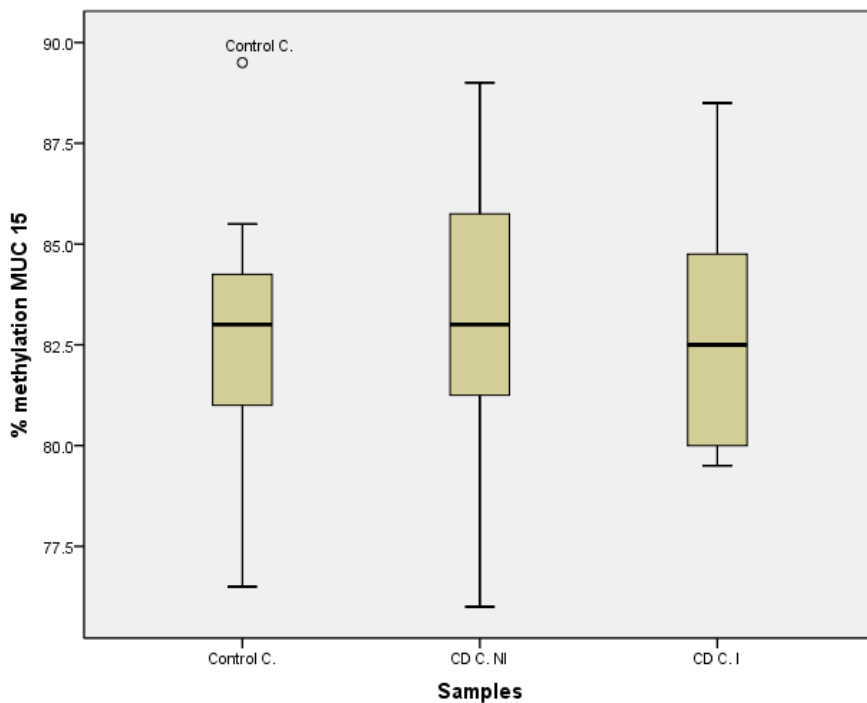


Abbildung 10: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC15* im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten. Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control T.I.), sowie der nicht-entzündlichen (CD T.I. NI) und entzündlichen (CD T.I. I) terminalen Ileum-Proben der M. Crohn-Patienten. Sterne stellen extreme Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 10 sind die für den Promotor des Gens *MUC15* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem terminalen Ileum von den gesunden Kontrollpatienten (Control T.I.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des terminalen Ileums von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum not-inflamed = CD T.I. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum inflamed = CD T.I. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC15* beträgt bei den Kontrollen 82,5%, bei den nicht-entzündlichen Proben des terminalen Ileum der M. Crohn-Patienten 84,5% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 82%. Somit ergaben sich beim Vergleich der Mediane der drei Probengruppen keine signifikanten Unterschiede in der *MUC15*-Promotormethylierung (siehe Anhang I).



**Abbildung 11: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC15* im Colon von M. Crohn-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (CD C. NI) und entzündlichen (CD C. I) Colon-Proben der M. Crohn- Patienten. Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 11 sind die für den Promotor des Gens *MUC15* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon not- inflamed = CD C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon inflamed = CD C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC15* beträgt bei den Kontrollproben 83%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der der M. Crohn-Patienten 83% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 82%. Somit konnte kein signifikanter Unterschied in der *MUC15*-Promotormethylierung zwischen den drei Probengruppen festgestellt werden (siehe Anhang I).

#### 4.2.8. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *MUC15* bei *C. ulcerosa*-Patienten

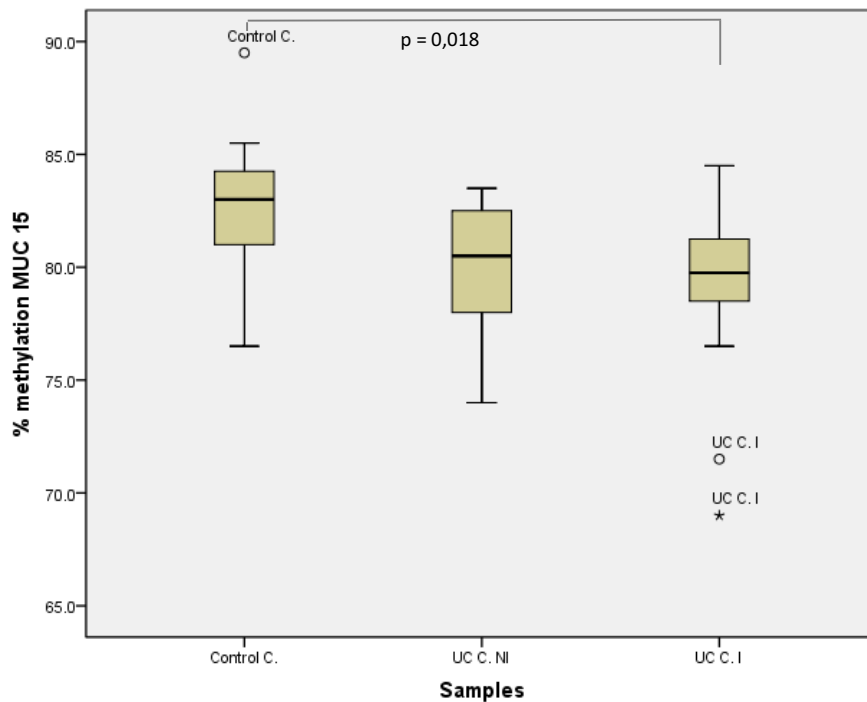


Abbildung 12: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *MUC15* im Colon von *C. Ulcerosa*-Patienten Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (UC C. NI) und entzündlichen (UC C. I) Colon-Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Die Methylierung ist in den entzündlichen *C. ulcerosa*-Proben signifikant niedriger als in den Kontrollproben ( $p = 0,018$ ). Kreise stellen Ausreißer-Werte und Sterne extreme Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 12 die für den Promotor des Gens *MUC15* gemessenen Methylierungsergebnisse in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon not- inflamed = UC C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon inflamed = UC C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *MUC15* beträgt bei den Kontrollproben 83%, bei den nicht- entzündlichen Proben des Colons der *C. ulcerosa*-Patienten 80.5% und bei den entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten 79,75%. Der Signifikanztest ergab für die entzündlichen Proben eine signifikant geringere *MUC15*-Methylierung im Vergleich zu den Kontrollproben ( $p = 0,018$ ). Weitere signifikante Methylierungsunterschiede wurden bei den Gruppenvergleichen nicht gefunden.

#### 4.2.9. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *PAX5* bei M. Crohn-Patienten

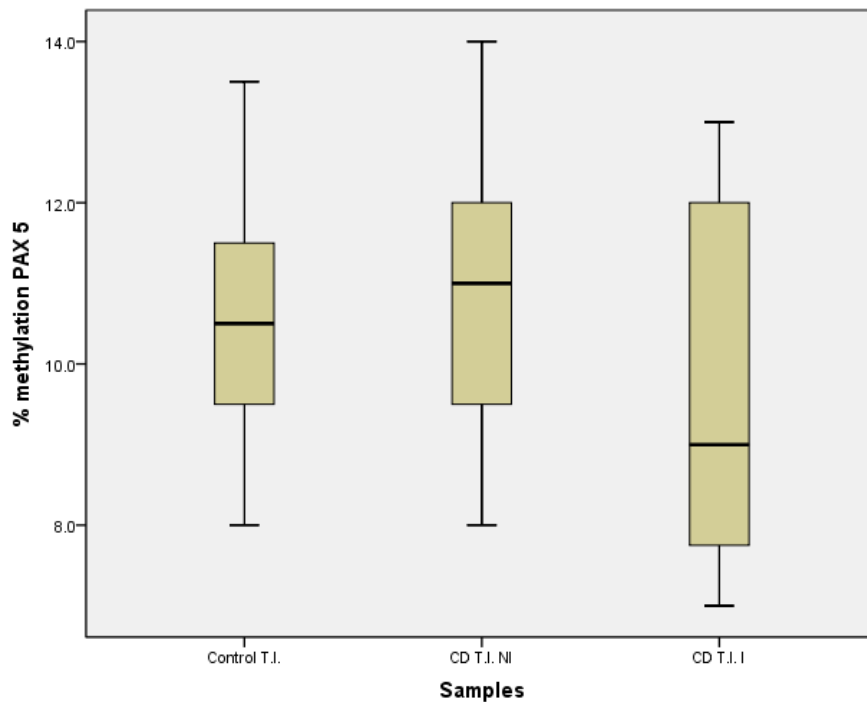
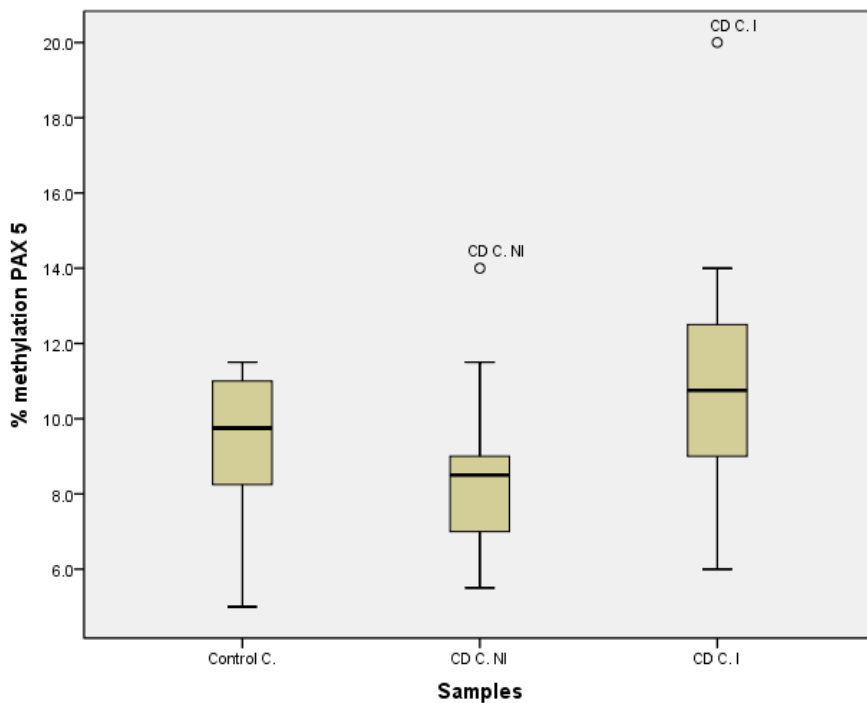


Abbildung 13: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *PAX5* im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control T.I.), sowie der nicht-entzündlichen (CD T.I. NI) und entzündlichen (CD T.I. I) terminalen Ileum-Proben der M. Crohn-Patienten

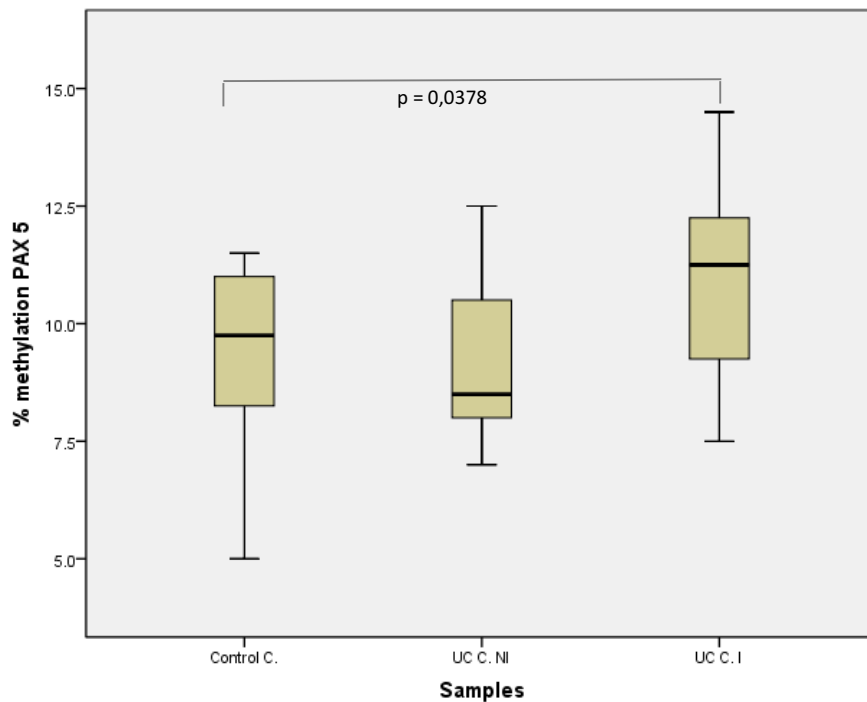
In Abbildung 13 sind die für den Promotor des Gens *PAX5* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem terminalen Ileum von den gesunden Kontrollpatienten (Control T.I.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des terminalen Ileums von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum not-inflamed = CD T.I. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum inflamed = CD T.I. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *PAX5* beträgt bei den Kontrollen 10,5%, bei den nicht-entzündlichen Proben des terminalen Ileum der M. Crohn-Patienten 11% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 9%. Der Signifikanztest ergab bei dem Vergleich der Mediane der drei Probengruppen keine signifikanten Unterschiede in der *PAX5*-Promotermethylierung (siehe Anhang I).



**Abbildung 14: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von PAX5 im Colon von M. Crohn-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.) sowie der nicht-entzündlichen (CD C. NI) und entzündlichen (CD C. I) Colon-Proben der M. Crohn- Patienten. Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 14 sind die für den Promotor des Gens *PAX5* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon not-inflamed = CD C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon inflamed = CD C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *PAX5* beträgt bei den Kontrollen 9,75%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der M. Crohn-Patienten 8,5% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 10,75%. Somit ergaben sich für die drei Probengruppen keine signifikanten Unterschiede in der *PAX5*-Promotormethylierung (siehe Anhang I).

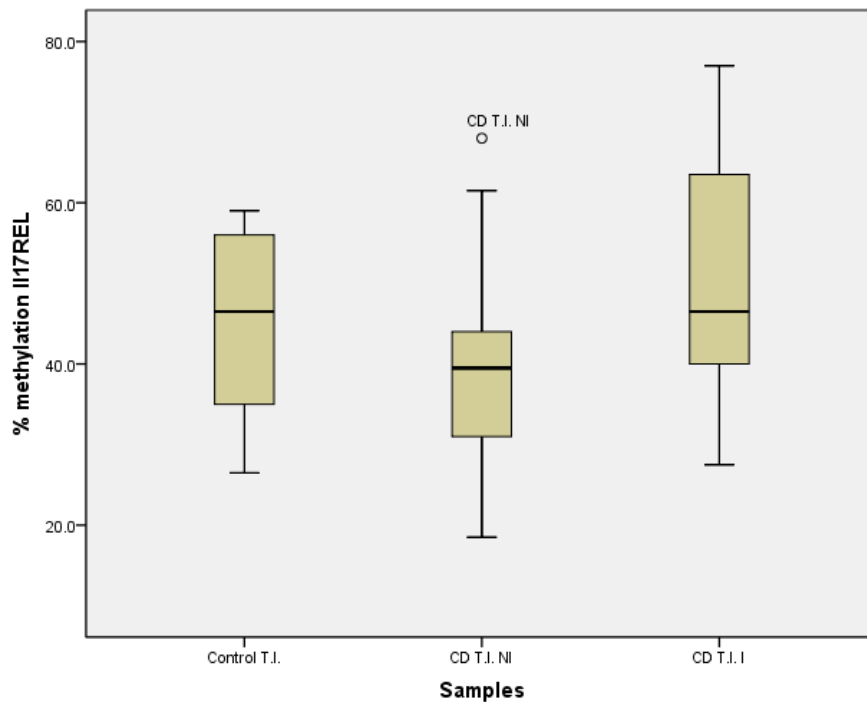
#### 4.2.10. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *PAX5* bei *C. ulcerosa*-Patienten



**Abbildung 15: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *PAX5* im Colon von *C. Ulcerosa*-Patienten**  
Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (UC C. NI) und entzündlichen (UC C. I) Colon-Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Die Methylierung ist in den entzündlichen *C. ulcerosa*-Proben signifikant höher als in den Kontrollproben ( $p = 0,0378$ ).

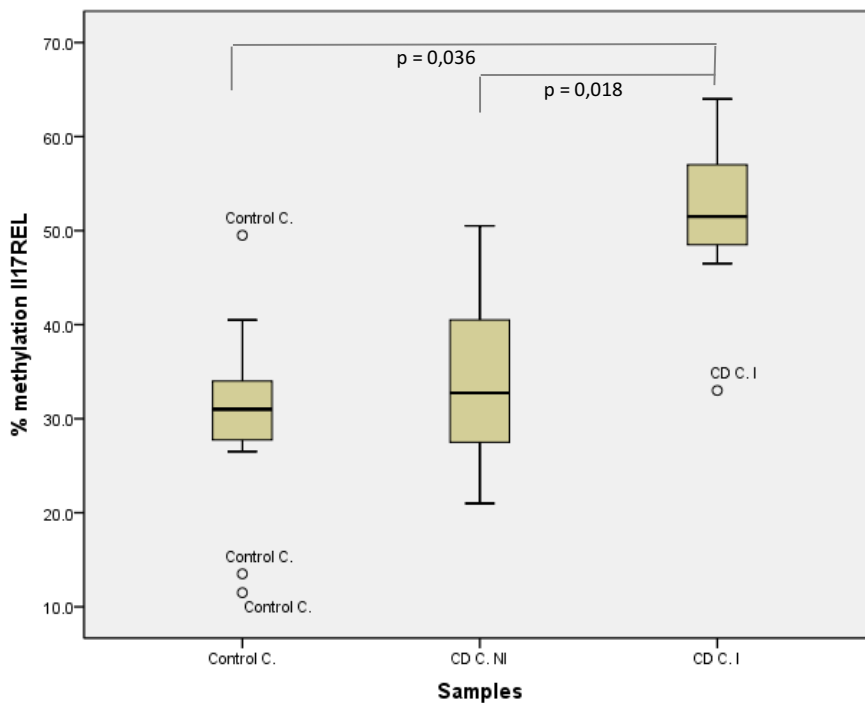
In der Abbildung 15 sind die für den Promotor des Gens *PAX5* gemessenen Methylierungsergebnisse in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon not- inflamed = UC C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon inflamed = UC C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *PAX5* beträgt bei den Kontrollproben 9,75%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der *C. ulcerosa*-Patienten 8,5% und bei den entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten 11,25%. Die *PAX5*-Methylierung ist somit in den entzündlich veränderten Colonproben signifikant höher als in den Kontrollproben ( $p = 0,0378$ ). ist. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bei einem akuten Krankheitsverlauf, die Expression von *PAX5* verändert ist. Da eine höhere Methylierung mit einer Herunterregulierung des Gens assoziiert werden kann, ist anzunehmen, dass die Expression von *PAX5* im entzündlichen Gewebe vermindert ist. Zwischen den nicht-entzündlichen und den entzündlich veränderten Proben von *C. ulcerosa*-Patienten konnte allerdings kein signifikanter *PAX5*-Methylierungsunterschied festgestellt werden.

#### 4.2.11. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *IL17REL* bei M. Crohn-Patienten



**Abbildung 16: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *IL17REL* im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten** Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control T.I.), sowie der nicht-entzündlichen (CD T.I. NI) und entzündlichen (CD T.I. I) terminalen Ileum-Proben der M. Crohn-Patienten. Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 16 sind die für den Promotor des Gens *IL17REL* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem terminalen Ileum von den gesunden Kontrollpatienten (Control T.I.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des terminalen Ileums von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum not-inflamed = CD T.I. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease terminal ileum inflamed = CD T.I. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *IL17REL* beträgt bei den Kontrollproben 46,5%, bei den nicht-entzündlichen Proben des terminalen Ileum der M. Crohn-Patienten 39,5% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 46,5%. Der Signifikanztest ergab zwischen den drei Probengruppen keine signifikanten *IL17REL*-Methylierungsunterschied (siehe Anhang I).



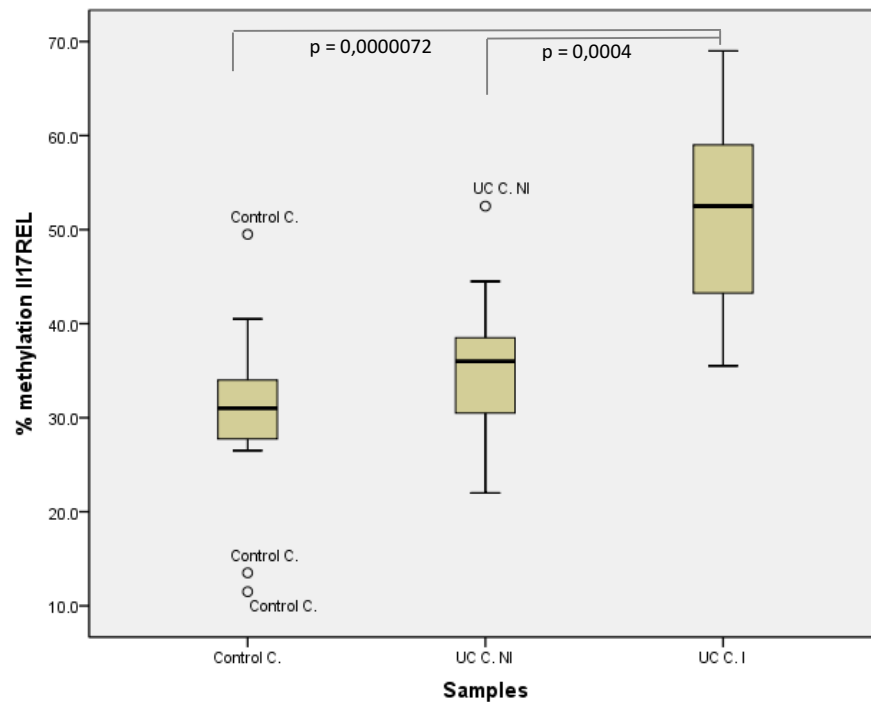
**Abbildung 17: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *IL17REL* von M. Crohn-Patienten**  
 Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (CD C. NI) und entzündlichen (CD C. I) Colon-Proben der M. Crohn- Patienten. Die Methylierung ist in den entzündlichen M. Crohn-Proben signifikant höher als in den Kontrollproben ( $p = 0,036$ ) und den nicht-entzündlichen Proben ( $p = 0,018$ ). Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In Abbildung 17 sind die für den Promotor des Gens *IL17REL* gemessenen Methylierungswerte in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon not- inflamed = CD C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von M. Crohn-Patienten (Crohn's Disease Colon inflamed = CD C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *IL17REL* beträgt bei den Kontrollproben 31%, bei den nicht- entzündlichen Proben des Colons der M. Crohn-Patienten 32,75% und bei den entzündlichen Proben der M. Crohn-Patienten 51,5%. Somit ist die Methylierung von *IL17REL* in den entzündlich veränderten Proben der M. Crohn-Patienten signifikant höher, sowohl im Vergleich zur Methylierung der Kontrollproben ( $p = 0,036$ ) als auch im Vergleich zur Methylierung der nicht-entzündlichen M. Crohn-Proben ( $p = 0,018$ ). Damit ergibt sich eine Korrelation zwischen dem Erkrankungsgrad und der Methylierung des *IL17REL*-Promotors: Je akuter die Erkrankung ist, desto höher ist die Methylierung des *IL17REL*- Promotors. Es ist anzunehmen, dass mit steigender Methylierung des Gens seine Expression abnimmt.

Zwischen den Kontrollproben und den nicht-entzündlichen Colonproben der M. Crohn-Patienten konnte kein signifikanter *IL17REL*-Methylierungsunterschied festgestellt werden.



#### 4.2.12. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung von *IL17REL* bei *C. ulcerosa*-Patienten



**Abbildung 18:** Ergebnisse der Methylierungsanalysen von *IL17REL* im Colon von *C. Ulcerosa*-Patienten. Dargestellt sind die Mediane der Kontrollproben (Control C.), sowie der nicht-entzündlichen (UC C. NI) und entzündlichen (UC C. I) Colon-Proben der *C. ulcerosa*-Patienten. Die Methylierung ist in den entzündlichen *C. ulcerosa*-Proben signifikant höher als in den Kontrollproben ( $p = 0,0000072$ ) und den nicht-entzündlichen Proben ( $p = 0,0004$ ). Kreise stellen Ausreißer-Werte dar.

In der Abbildung 18 sind die für den Promotor des Gens *IL17REL* gemessenen Methylierungsergebnisse in den Biopsaten aus dem Colon von den gesunden Kontrollpatienten (Control C.), den nicht-entzündlichen Gewebeproben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon not- inflamed = UC C. NI) und den entzündlichen Gewebeproben aus dem Colon von *C. ulcerosa*-Patienten (Ulcerative colitis Colon inflamed = UC C. I) dargestellt. Der Medianwert der Promotormethylierung von *IL17REL* beträgt bei den Kontrollen 31%, bei den nicht-entzündlichen Proben des Colons der *C. ulcerosa*-Patienten 36% und bei den entzündlichen Proben der *C. ulcerosa*-Patienten 52,5%. Somit ist die *IL17REL*-Methylierung in den entzündlich veränderten Colonproben signifikant höher, sowohl im Vergleich zu den Kontrollproben ( $p = 0,0000072$ ) als auch im Vergleich zu den nicht-entzündlichen Proben ( $p = 0,0004$ ). Zwischen den Kontrollproben und den nicht-entzündlichen Proben des Colons von *C. ulcerosa*-Patienten konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der *IL17REL*-Promotormethylierung festgestellt werden. Da eine höhere Methylierung einhergeht mit einer Herunterregulierung der Genexpression, muss auch bei den *C. ulcerosa*-Patienten davon ausgegangen werden, dass ein akuter Krankheitsschub eine Reduktion der *IL17REL*-Expression zur Folge hat.

### **4.3. Die für das Projekt „Vergleichende epigenetische Analyse von ESCs und maGSCs“ untersuchten Pluripotenzmarkergene, geprägten Gene und miRNA-Gene**

#### **4.3.1. Das Pluripotenzmarkergen *Oct4***

Das Gen *Oct4* codiert für den Transkriptionsfaktor „Octamer binding transcription factor 4“ und ist ein zentraler Pluripotenzregulator. *Oct4* wird spezifisch in totipotenten und pluripotenten Geweben exprimiert, wie in der unbefruchteten Eizelle, im Präimplantationsembryo, in pluripotenten Zellen des Prägastrulationsembryos und in primordialen Keimzellen (Adjaye et al., 1999). Es interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren, und bewirkt dadurch zum einen die Aktivierung ES-Zell-spezifischer Gene bzw. zum anderen die Repression Differenzierungs-induzierender Gene. *Oct4* ist somit für eine normale Embryonalentwicklung unabdingbar. Yeom et al. konnten anhand von Mausversuchen nachweisen, dass die Expression von *Oct4* im 4-bis 8-Zellstadium beginnt, nach der Gastrulation wieder herunter reguliert wird und letztendlich durch DNA-Methylierung abgeschaltet wird (Yeom et al., 1996). In adulten Lebewesen wird *Oct4* nur noch in den Keimzellen exprimiert. Eine Inaktivierung von *Oct4* führt zum Verlust der ES-Zellidentität und induziert eine trophoektodermale Differenzierung. Aktuell wird momentan recht viel über *Oct4* in den Medien berichtet, da es für die künstliche Reprogrammierung von somatischen Zellen in pluripotente Stammzellen verwendet wird. Bei den ersten erfolgreichen künstlichen Reprogrammierungsversuchen von Maus-Fibroblastenzellen wurde *Oct4* zusammen mit weiteren Pluripotenzgenen, wie z.B. *Sox2* mittels Retroviren in die Zellen eingeschleust (Wernig et al., 2007).

*Oct4* ist beim Menschen auf Chromosom 6 in der Bande p21.3 und bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert.

Die zu analysierende Sequenz von *Oct4* (4 CpGs):

YGTTTTTAATTTTYGTTTGGGAAGATATAGGTAGATAGYGTTYGTTT

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y(= C oder T)

#### **4.3.3. Das Pluripotenzmarkergen *Nanog***

*Nanog* ist ein Gen, das für einen Transkriptionsfaktor codiert und in embryonalen Stammzellen exprimiert wird. In diesen Zellen ist *Nanog* für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz notwendig, da es mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie *Oct4* und *Sox2* ebenfalls ESC-spezifische Gene aktiviert und zelldifferenzierungsinduzierende Gene reprimiert. Dieses Gen dessen Name an das mythische Land ewiger Jugend „*Tir Nan Og*“ erinnert, wurde von Dr. Ian Chambers aus der Maus isoliert (Chambers et al., 2003). Die Expression von *Nanog* kann auch nach der Implantation des Embryos nachgewiesen

werden, erst am Tag 8.5 der Embryonalentwicklung erfolgt eine Runterregulierung dieses Gens

(Hart et al., 2004). Mitsui et al. konnten nachweisen, dass *Nanog*-defiziente murine ES-Zellen ihre Pluripotenz verlieren und sich in extraembryonales Endoderm differenzieren (Mitsui et al., 2003). Eine Überexpression dieses Gens führt wiederum dazu, dass sich die Zellen auch in Abwesenheit des Leukaemia inhibitory factor (LIF) selbst erneuern können (Chambers et al., 2003). Beim Menschen ist dieses Gen auf dem Chromosom 12, bei der Maus auf dem Chromosom 6 lokalisiert (Mitsui et al., 2003). Die Region, die im Rahmen der Doktorarbeit untersucht wurde, befindet sich auf Chromosom 6. Methylierungsanalysen dieser Region zeigten einen Übergang von einem hypomethylierten zu einem hypermethylierten Zustand während der Differenzierung von ES-Zellen (Wernig et al., 2007).

Die zu analysierende Sequenz von *Nanog* (2 CpGs)

GGGYGTGGGTGTYGTTTG

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y (= C oder T) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

#### 4.3.4. Das potentielle Pluripotenzmarkergen *Lrrc34*

Die Arbeitsgruppe von Professor Dr. Wolfgang Engel führte genomweite Transkriptionsanalysen mittels Mikroarray-Technologie durch, um neue Pluripotenzmarkergene zu identifizieren. Dabei wurde festgestellt, dass im Zuge der Differenzierung von maGSC-Linien die Expression von *Lrrc34* herunterreguliert wird (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Wolfgang Engel). Dies wurde als Hinweis gedeutet, dass *Lrrc34* ein neues Pluripotenzmarkergen sein könnte. Um diese Annahme zu unterstützen, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung überprüft, ob der Promoter von *Lrrc34* während der Differenzierung von ESCs und maGSCs von einem hypomethylierten in einen hypermethylierten Zustand übergeht. *Lrrc34* steht für „leucine rich repeat containing 34“ und ist bei der Maus auf Chromosom 3 lokalisiert. Bisher ist über die Funktion dieses Gens noch nichts bekannt. Die Region des *Lrrc34*-Promoters, die im Rahmen der Doktorarbeit untersucht wurde, befindet sich auf dem Chromosom 3.

Die zu analysierende Sequenz von *Lrrc34* (2 CpGs)

CACAAAACTCRACCCACTACRAAT

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit R (= G oder A, da reverse Sequenz untersucht) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

#### 4.3.5. Das potentielle Pluripotenzmarkergen *Stra8*

*Stra8* („Stimulated by retinoic acid gene 8“) besteht aus neun Exons und codiert für ein Protein, das aus 393 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 45 kDa aufweist. Koubova et al. konnten 2006 nachweisen, dass das Gen *Stra8* für den Übergang von weiblichen und männlichen Keimzellen in die Meiose nötig ist. In embryonalen Ovarien wird *Stra8* kurz vor Beginn der Meiose exprimiert, während in Hoden die Expression nach der Geburt stattfindet. Ferner konnte gezeigt werden, dass Retinsäure die Expression dieses Gens induziert (Koubova et al., 2006).

Baltus et al. haben die Hypothese aufgestellt, dass *Stra8* zwei Funktionen haben könnte: zum einen beim Eintritt der Keimzellen in die Meiose und zum anderen im Pluripotenznetzwerk (Anderson et al., 2008). Über die genomweite Transkriptionsanalyse mittels Microarray-Technologie konnte die AG von Prof. Dr. Wolfgang Engel nachweisen, dass auch die Expression von *Stra8* im Zuge der Differenzierung von maGSC-Linien abnimmt und es sich daher bei *Stra8* möglicherweise ebenfalls um ein Pluripotenzgen handelt (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Wolfgang Engel). Um diese Annahme zu unterstützen, sollte im Rahmen der Doktorarbeit auch die Methylierung des Promotors und von Intron 2 dieses Gens vor und nach Differenzierung von ESCs und maGSCs untersucht werden.

*Stra8* ist beim Menschen auf Chromosom 7q31 lokalisiert und enthält 9 Exons (Miyamoto et al. 2002). Bei der Maus befindet sich dieses Gen auf Chromosom 6. Die Regionen, die im Rahmen der Doktorarbeit untersucht wurde, befindet sich auf dem Chromosom 6.

Die zu analysierende Sequenz von *Stra8* (3 CpGs)

GYGTTTTTAGTGTGTTAGTTTGATATGGTGGYGTTYGTAG

Die zu analysierende Sequenz von *Stra8* Intron 2 (4 CpGs)

GGTTAGTYGGATTTTTAGAGTGTGTATGTGTATYGTYGT

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y (= C oder T) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

#### 4.3.6. Das geprägte Gen *Igf2r*

*Igf2* ist ein paternal exprimiertes Gen, das für den Wachstumsfaktor „Insulin-like-growth-factor-2“ codiert und das embryonale Wachstum fördert. *Igf2r* ist ein maternal exprimiertes Gen, das für den sogenannten „Insulin-like-growth-factor-2-receptor“ codiert. Das Igf2r-Protein kontrolliert den Igf2-Spiegel und somit das embryonale Wachstum, in dem es Igf2 bindet und anschließend dessen lysosomalen Abbau vermittelt. Lau et al. konnten nachweisen, dass in Mäusen mit einem nichtfunktionalen, maternalen *Igf2r*-Allel ein erhöhter

Igf2-Spiegel vorhanden ist und diese Mäuse 25-30% größer sind als Wildtyp-Mäuse (Lau et al., 1994).

Im *Igf2r*-Gen können zwei DMRs unterschieden werden. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde eine Region innerhalb der 3,2-kb großen intronischen DMR2 untersucht. Diese Region beinhaltet 4 CpGs und ist auf Chromosom 17 lokalisiert. In Oocyten liegt die DMR2 komplett methyliert vor, während sie in Spermien vollständig demethyliert ist (Lucifero et al., 2002).

Die zu analysierende Sequenz von *Igf2r* ( 4CpGs)

```
YGTAAATTTTGTTTTTTTTTTYGTTTTTGTAAYGYGGTATTTTGGAGTTTGTTTTTTTGTA  
ACYTGTGGTATTTTGGAG
```

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit Y (= C oder T) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben

#### 4.3.7. Das geprägte Gen *H19*

Das *H19*-Gen wird maternal exprimiert und liegt paternal methyliert vor. Es ist wie *Igf2* beim Menschen auf Chromosom 11p15.5 und bei der Maus auf dem distalen Chromosom 7 lokalisiert, codiert für eine untranslatierte RNA und scheint eine Tumorsuppressor- Aktivität aufzuweisen. Der Verlust der *H19*-Expression könnte eine Rolle bei der Entstehung von Wilms-Tumoren spielen (Han et al., 1996).

*Igf2* und *H19* werden während der Entwicklung des Embryos coexprimiert und konkurrieren um denselben Enhancer. Die geprägte Expression beider Gene wird durch eine differenziell methylierte sogenannte „Imprinting Control Region“ (ICR) reguliert, eine Sequenz, die methyliert werden kann und damit die Expression anderer Genbereiche beeinflussen kann. Wie eine solche Region funktioniert, kann man anhand des sogenannten „Enhancer-Competition-Modells“ erklären (Bell und Felsenfeld, 2000).

Auf dem paternalen Allel liegt die ICR methyliert vor, so dass der Transkriptionsfaktor „*CCCTC-Binding Factor*“ (CTCF) dort nicht binden kann. Der Enhancer kann dadurch die *Igf2*-Expression aktivieren, während *H19* stillgelegt wird. Auf dem maternalen Allel ist es genau umgekehrt: die ICR ist hier unmethyliert, CTCF kann dementsprechend dort binden und die Enhancer-Wirkung auf das *Igf2*-Gen und damit die *Igf2*-Expression blockieren, während *H19* exprimiert wird (Bell und Felsenfeld, 2000).

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden zwei Regionen innerhalb der als ICR fungierenden 2 kb großen 5´-DMR des Gens untersucht. Diese Region befindet sich auf Chromosom 7.

Die zu analysierende Sequenz von *H19*-Segment 1 (1 CpG)

RACTCAAAACTACAAA

Die zu analysierende Sequenz von *H19*-Segment 2 (3 CpGs)

RCTTTCRTATTCTAATTAACRTTCA

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit R (= G oder A, da reverse Sequenz untersucht) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

#### 4.3.9. Das geprägte Gen *Snrpn*

Das *Snrpn*-Gen enthält zehn Exons und codiert für das Smn-Protein, das beim RNA-Splicing involviert ist. Die Expression von diesem Gen findet vor allem im Gehirn und im Herzen statt (Shemer et al., 1997). Es handelt sich hierbei um ein paternal exprimiertes Gen, das bei der Maus zentral auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist, einer Region, die der Prader-Willi/Angelman-Syndrom (PWS/AS) Region auf dem menschlichen Chromosom 15q11-q13 entspricht (Leff et al., 1992). Das PWS wird unter anderem durch eine paternale Deletion oder eine maternale UPD ausgelöst, während AS umgekehrt unter anderem durch eine maternale Deletion oder eine paternale UPD verursacht werden kann (Shemer et al., 1997). *Snrpn* weist zwei DMRs auf, wobei in der vorliegenden Arbeit eine Region in der 6 kb großen DMR1 untersucht wurde, die auf dem väterlichen Chromosom unmethyliert und auf dem mütterlichen Chromosom methyliert ist. Der untersuchte Bereich, in dem sich ein Teil des Promotors und der Transkriptionsstartpunkt befinden, ist 420 bp groß und auf Chromosom 7 lokalisiert.

Die zu analysierende Sequenz von *Snrpn* Segment 1 (2 CpGs)

CTCRCTCCATTACRTTACAAATCACTCCTC

Die zu analysierende Sequenz von *Snrpn* Segment 2 (2 CpGs)

CACATACRCACATTTTTACCRCAATACAAAATCATATCCCTTTAACCA/GAAATATCCTACCAA

Die zu analysierende Sequenz von *Snrpn* Segment 3 (7 CpGs)

RCTAATCTTACCRCAATAACTCAAATTTATCRCRCRATCCCTACRCATACRTCCCAAACAATAAC

Die bezüglich ihrer Methylierung untersuchten Cytosinmoleküle sind mit R (= G oder A, da reverse Sequenz untersucht) angegeben sowie fett und unterstrichen hervorgehoben.

#### 4.3.10. Das geprägte Gen *Meg3*

Das *Meg3*-Gen („maternally expressed gene 3“) enthält 8 Exons und ist bei der Maus auf dem distalen Ende des Chromosoms 12 lokalisiert, während es sich beim Menschen auf Chromosom 14q32 befindet. Die geprägte Expression von *Meg3*, wird durch eine differentiell methylierte Imprinting-Kontrollregion (intergenic DMR; IG-DMR) reguliert, die maternal hypomethyliert und paternal hypermethyliert ist (Takada et al., 2002). Das *Meg3*-Gen scheint als RNA-Molekül zu funktionieren, dessen genaue Rolle bis jetzt unklar ist. Man nimmt allerdings an, dass das Gen eine wichtige Funktion als Wachstumssuppressor hat. Epigenetische Veränderungen der IG-DMR sind beim Menschen mit dem sogenannten maternalen UPD14-Syndrom assoziiert (Kagami et al., 2008). Im Rahmen der Doktorarbeit wurde eine Region innerhalb der IG-DMR auf Chromosom 12 untersucht.

Die zu analysierende Sequenz von *Meg3* IgDMR4\_1 (1 CpG)

CRATATATAAA

Die zu analysierende Sequenz von *Meg3* IgDMR4\_2 (2 CpGs)

TYGATYGTGAATTGTAGTTTGGGTTTATAGT

Die zu analysierende Sequenz von *Meg3* IgDMR5\_1 (1 CpG)

YGGTTGTAATTTGAATTTATTA

Die zu analysierende Sequenz von *Meg3* IgDMR5\_2 (3 CpGs)

ACCRTATTAACCTACRTTTTCTACCCTCAATTTATACAAT

Die zu analysierende Sequenz von *Meg3* IgDMR5\_3 (1 CpG)

RTAAATCAAATAAAAATTATT

#### 4.3.11. Die miRNA-Gene *miR290* und *miR302*

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Publikationen über die Pluripotenz von Zellen mit ESC-Eigenschaften veröffentlicht wurden, sind bis heute die genauen Mechanismen, die die Pluripotenz kontrollieren nicht bekannt. Der Einfluss von MicroRNAs (miRNAs) könnte dabei eine tragende Rolle spielen.

Bei miRNAs handelt es sich um kurze nicht-codierende einzelsträngige RNA-Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Sie liegen im Genom häufig

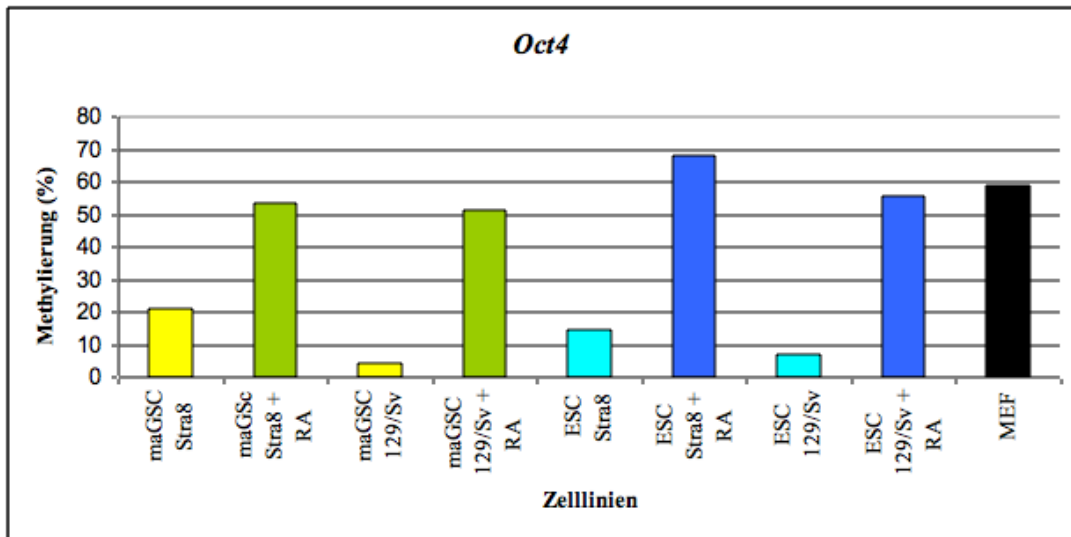
geclustert vor und man findet sie in Introns oder Exons von Genen, sowie auch zwischen den codierenden Bereichen. MiRNAs spielen bei zahlreichen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle, so auch bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen (Zovoilis et al, 2008). Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die Promotormethylierungen der *miR-290* und *miR-302*- Cluster untersucht. Das *miR-290* Cluster besteht aus den Mitgliedern *miR-290*, *miR-291*, *miR-292*, *miR-293*, *miR-294* und *miR-295*. Das *miRNA-302* Cluster besteht aus den Mitgliedern *miR-302a*, *miR-302b*, *miR-302c* und *miR-302d*. Diese miRNAs konnten ausschließlich in undifferenzierten pluripotenten Stammzellen, oder aber während der ersten Differenzierungsstadien dieser Zellen nachgewiesen werden. In Vorarbeiten konnte durch Zovoilis et al gezeigt werden, dass undifferenzierte maGSCs die *miR-290* und *miR-302*-Cluster exprimieren und dass die Expressionslevel dem der ESCs ähnlich sind. Im Zuge der Doktorarbeit wurde getestet, wie sich die Methylierungswerte für *Nanog*, *Oct4*, *mMir290* und *mMir302* bei ESCs und maGSCs im Zuge der Differenzierung verändern. Dabei wurde die Differenzierung nicht durch RA, sondern durch die zehn Tage lange Kultivierung der Zellen auf Gelatine ohne MEFs und LIF herbeigeführt.

#### **4.4. Die Methylierung der gesicherten und putativen Pluripotenzmarkergene**

##### **4.4.1. Methylierungsanalyse des *Oct4*-Promoters**

Um die Promotormethylierung des Pluripotenzmarkers *Oct4* zu ermitteln, wurden für die untersuchten Zelllinien jeweils zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 19 und Abb.20). Im undifferenzierten Zustand zeigten sowohl die vier maGSC-Zelllinien als auch die vier ESC-Zelllinien eine deutliche Hypomethylierung des *Oct4*-Promotors (Abb. 19). Die Methylierung betrug bei den nicht-transgenen maGSC- und ESC-Linien zwischen 4,5% bei maGSC 129/Sv und 14,5% bei ESC FVB. Die beiden *Stra8*-EGFP-transgenen Linien maGSC *Stra8* und ESC *Stra8* wiesen hingegen eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien leicht erhöhte Methylierungen mit 21% für maGSC *Stra8* und 14,5% bei ESC *Stra8*. In den als Kontrolle für differenzierte somatische Zellen dienenden Mausembryofibroblasten (MEF) wurde hingegen mit 59% Methylierung die erwartete Hypermethylierung beobachtet.

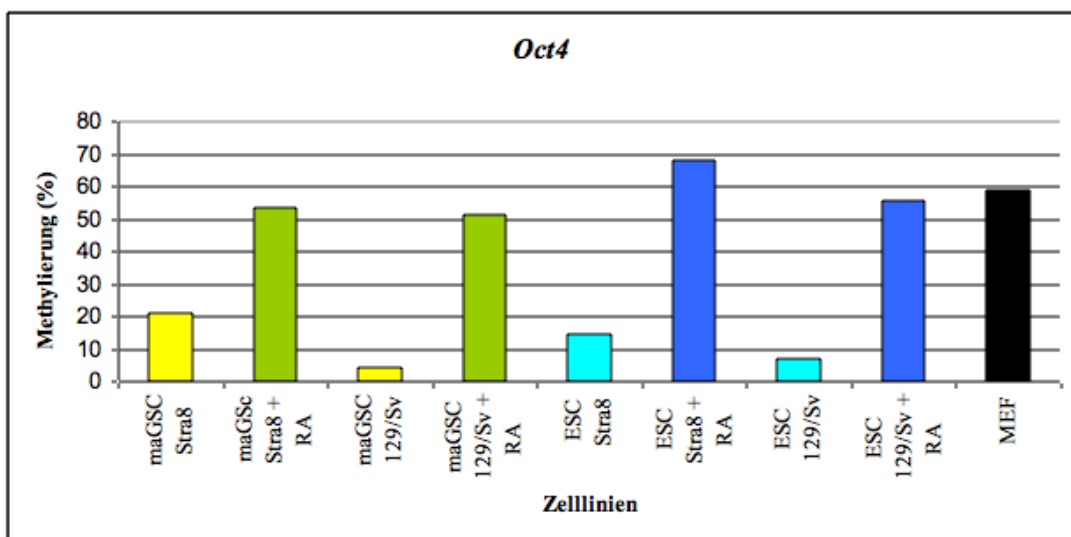




**Abbildung 19: Methylierung des *Oct4*-Promotors in undifferenzierten Zellen**

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach Differenzierung durch Zugabe von  $10^{-6}$ M Retinsäure war sowohl bei den zwei maGSC-Zelllinien, als auch bei den zwei ESC-Zelllinien ein deutlicher Anstieg der Methylierung zu erkennen (Abb. 20). Bei maGSC Stra8 stieg die Methylierung von 21% auf 53,5%, bei maGSC 129/Sv von 4,5% auf 51,5%, bei ESC Stra8 von 14,5% auf 68% und bei ESC 129/Sv von 7% auf 55,5% an. Die Zellen wiesen somit eine ähnliche Methylierung wie MEFs auf.



**Abbildung 20: Methylierung des *Oct4*-Promotors in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC und ESC-Linien**

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken), die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

#### 4.4.2. Methylierungsanalyse des *Nanog*-Promoters

Um die Promotormethylierung des Pluripotenzmarkers *Nanog* zu ermitteln, wurden für die untersuchten Zelllinien jeweils zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 21 und Abb. 22).

Im undifferenzierten Zustand zeigten sowohl die vier maGSC-Zelllinien als auch die vier ESC-Zelllinien eine deutliche Hypomethylierung des *Nanog*-Promotors. Die Methylierung betrug dabei zwischen 4,5% bei maGSC 129/Sv bzw. maGSC C57BL/6 und 20% bei maGSC Stra8. Bei den ESC-Zelllinien lag die Methylierung zwischen 7,5% bei ESC C57BL/6 und 14,5% bei ESC Stra8. Sowohl bei maGSC Stra8 als auch bei ESC Stra8 konnte mit 20% bzw. 14,5% im Vergleich zu den anderen Zelllinien wieder eine leicht erhöhte Methylierung festgestellt werden. In den als Kontrolle für differenzierte somatische Zellen dienenden Mausembryofibroblasten (MEF) wurde hingegen mit 56% Methylierung wieder die erwartete Hypermethylierung beobachtet (Abb.21).

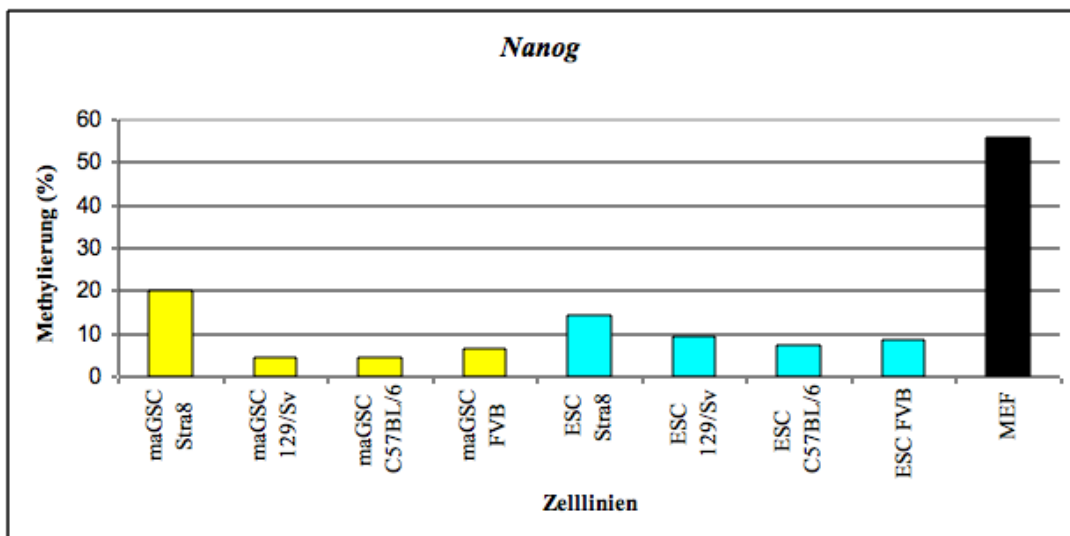


Abbildung 21: Methylierung des *NANOG*-Promoters in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die vier undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach Differenzierung durch Zugabe von 10-6M Retinsäure war auch hier wieder bei den zwei maGSC- und den zwei ESC-Zelllinien ein deutlicher Anstieg der Methylierung zu erkennen (Abb. 22). Bei maGSC Stra8 stieg die Methylierung von 20% auf 84%, bei maGSC 129/Sv von 4,5% auf 59%, bei ESC Stra8 von 14,5% auf 73% und bei ESC 129/Sv von 9,5% auf 56,5%. Die Methylierung der MEFs betrug 56% und war somit ähnlich hoch wie die Methylierung von ESC 129/Sv und maGSC 129/Sv nach der Differenzierung. Für die differenzierten maGSC Stra8 und ESC Stra8 wurde im Vergleich zu den MEFs eine etwas höhere Methylierung beobachtet.

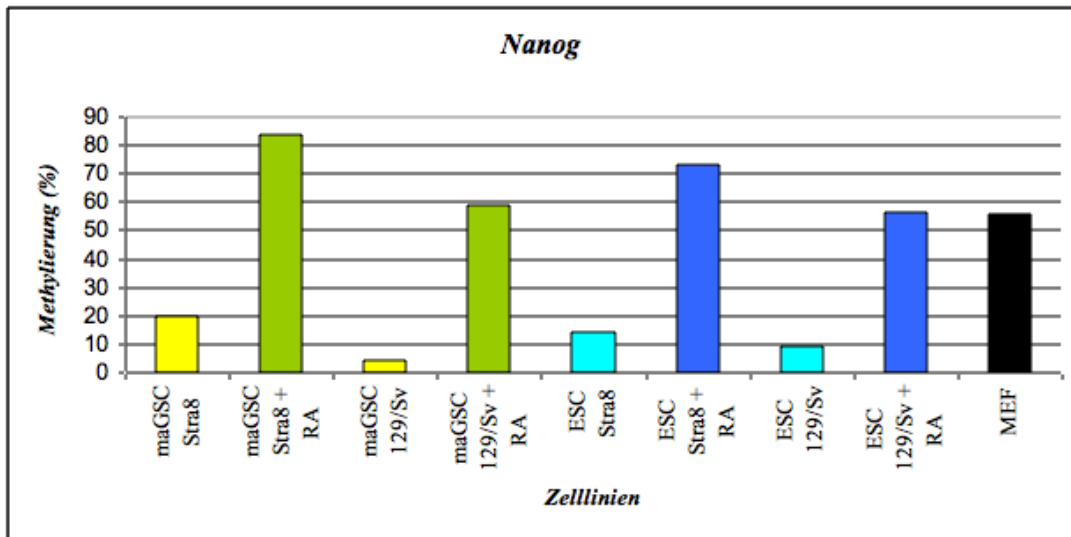


Abbildung 22: Methylierung des *Nanog*-Promotors in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken), die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

#### 4.4.3. Methylierungsanalyse des *Lrrc34*-Promotors

Um die Promotormethylierung des putativen Pluripotenzmarkers *Lrrc34* zu ermitteln, wurden für die untersuchten Zelllinien jeweils sechs unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 23 und Abb. 24). Für *Lrrc34* wurden keine MEFs untersucht. Im undifferenzierten Zustand zeigten alle maGSC- und alle ESC-Zelllinien eine deutliche Hypomethylierung des *Lrrc34*-Promotors. Die Methylierung betrug bei den maGSC-Zelllinien zwischen 6,1% bei maGSC C57BL/6 und 8% bei maGSC FVB. Bei den ESC-Zelllinien wurde eine Methylierung zwischen 6,6% bei ESC FVB und 18% bei ESC Stra8 festgestellt.

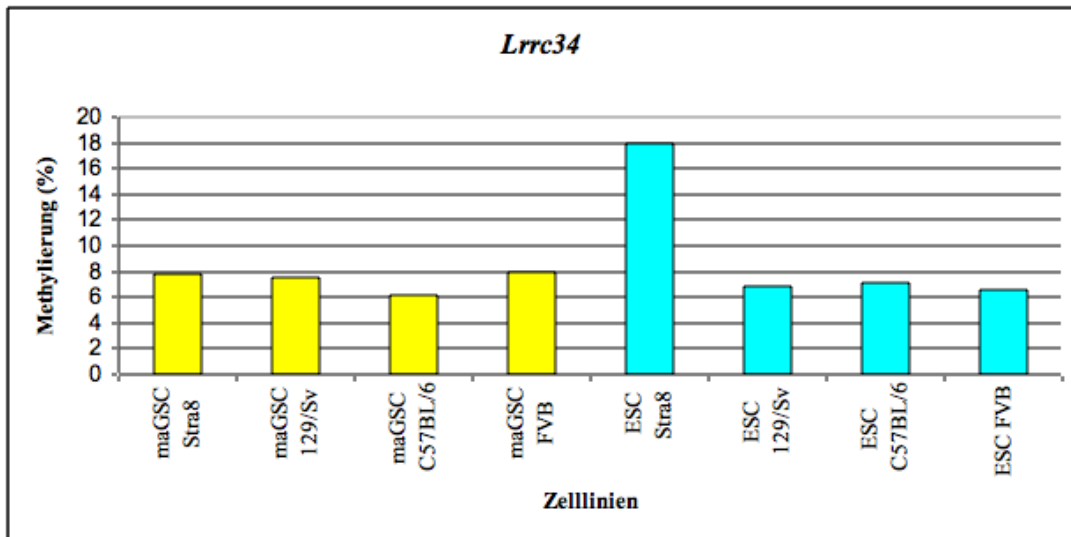


Abbildung 23: Methylierung des *Lrrc34*-Promotors in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken) und die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach der Differenzierung mit Hilfe von Retinsäure konnte man in drei der vier untersuchten Zelllinien auch beim Promotor von *Lrrc34* einen deutlichen Anstieg der Methylierung erkennen (Abb. 24). Bei maGSC Stra8 stieg die Methylierung von 7,8% auf 34,3%, bei maGSC 129/Sv von 7,5% auf 25,1% sowie bei ESC Stra8 von 18% auf 45,3% an. Bei ESC 129/Sv wurde im Zuge der Differenzierung allerdings nur eine leichte Erhöhung der Methylierung von 6,8% auf 14,3% beobachtet.

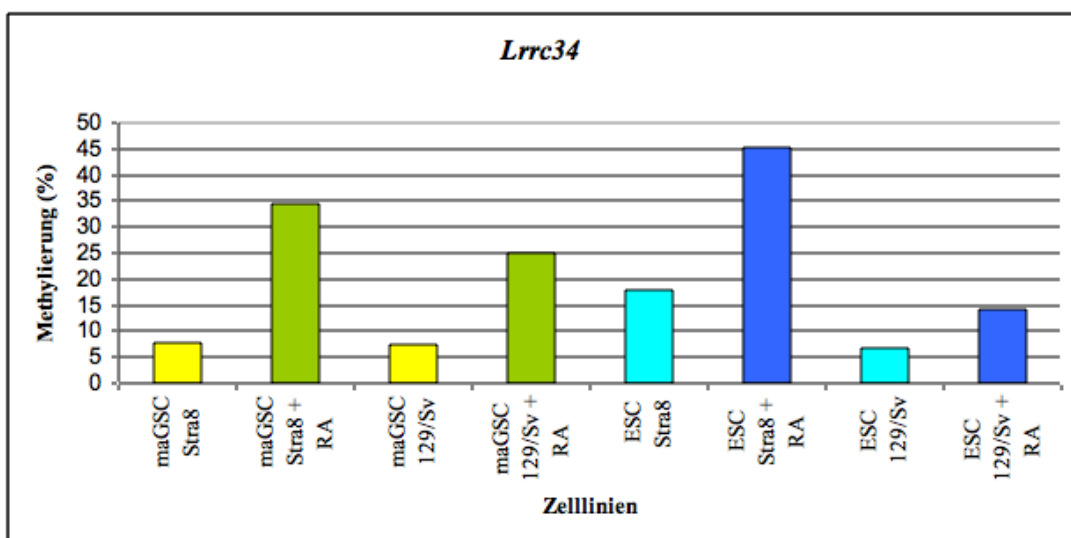


Abbildung 24: Methylierung des *LRRC34*-Promotors in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten MAGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

#### 4.4.4. Methylierungsanalyse des Gens *Stra8*

Für den Promoter und das Intron 2 von *Stra8* wurden für die untersuchten Zelllinien jeweils sechs bzw. vier unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 25 und Abb. 26). Für *Stra8* wurden keine MEFs untersucht.

Im undifferenzierten Zustand zeigten die einzelnen maGSC- und ESC-Zelllinien für den *Stra8*-Promoter recht unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 25). Auffällig ist, dass maGSC und ESC *Stra8* eine Hypermethylierung aufwiesen, mit 68% für maGSC *Stra8* und 54% für ESC *Stra8*. Für maGSC 129/Sv, maGSC FVB, ESC 129/Sv und ESC C57BL/6 konnte eine Methylierung zwischen 20% und 30% beobachtet werden. Einzig maGSC C57BL/6 und ESC FVB zeigten eine deutliche Hypomethylierung mit 13,2% für maGSC C57BL/6 und 13,8% für ESC FVB.

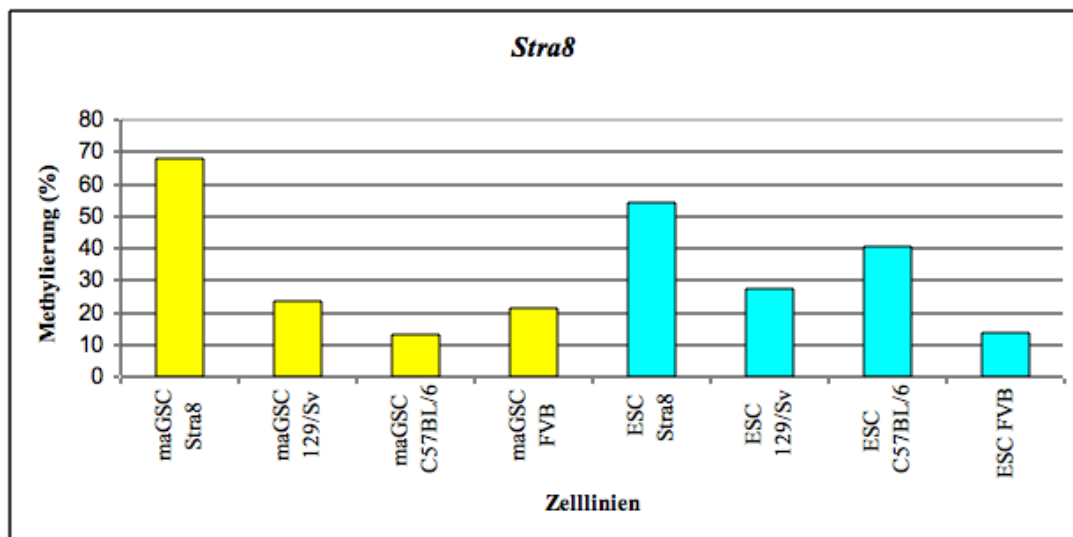
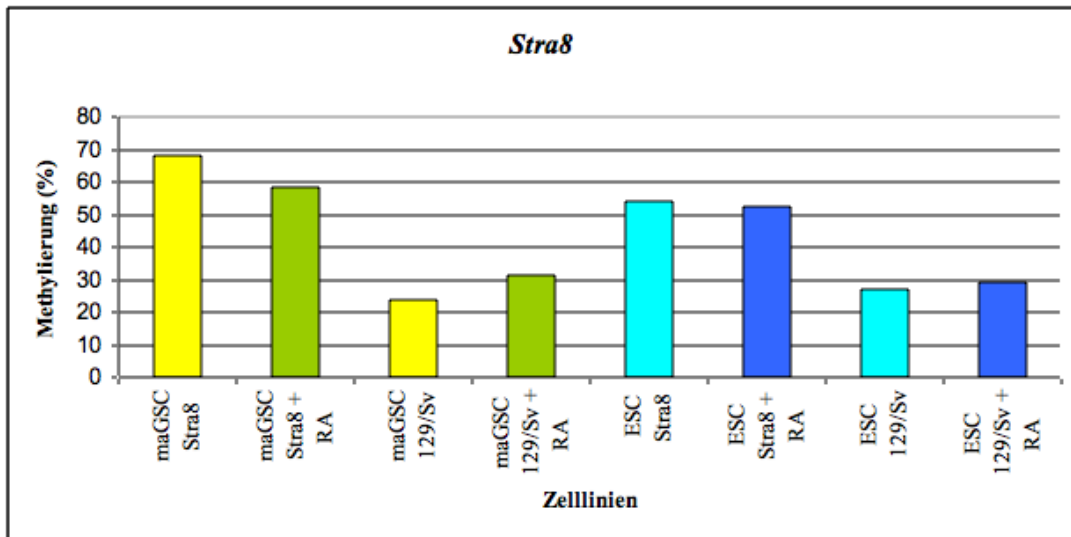


Abbildung 25: Methylierung des *STRA8*-Promoters in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken) und die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach Differenzierung mit Retinsäure konnte kein deutlicher Anstieg der Methylierung festgestellt werden (Abb. 26). Bei maGSC *Stra8* ging nach der Retinsäure-Behandlung die Methylierung auf 58,25% zurück. Ein leichter Methylierungsanstieg von 23,8% auf 31,3% konnte bei maGSC 129/Sv beobachtet werden. Sowohl bei ESC *Stra8*, als auch bei ESC 129/Sv fand keine signifikante Änderung der Methylierung statt.



**Abbildung 26: Methylierung des STRA8-Promoters in jeweils undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien**

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Die undifferenzierten Zelllinien zeigten auch beim zweiten Intron des Gens *Stra8* keine Hypomethylierung (Abb. 27). Alle maGSC-Zelllinien wiesen eine Methylierung von über 50% auf. Die höchste Methylierung war dabei bei maGSC FVB mit 76% zu beobachten. Bei den ESC-Zelllinien wurde bei ESC Stra8 und ESC FVB eine Methylierung von unter 50% beobachtet, während ESC 129/Sv und ESC C57BL/6 mit 65,5% und 90,5% moderat bis deutlich hypermethyliert waren.

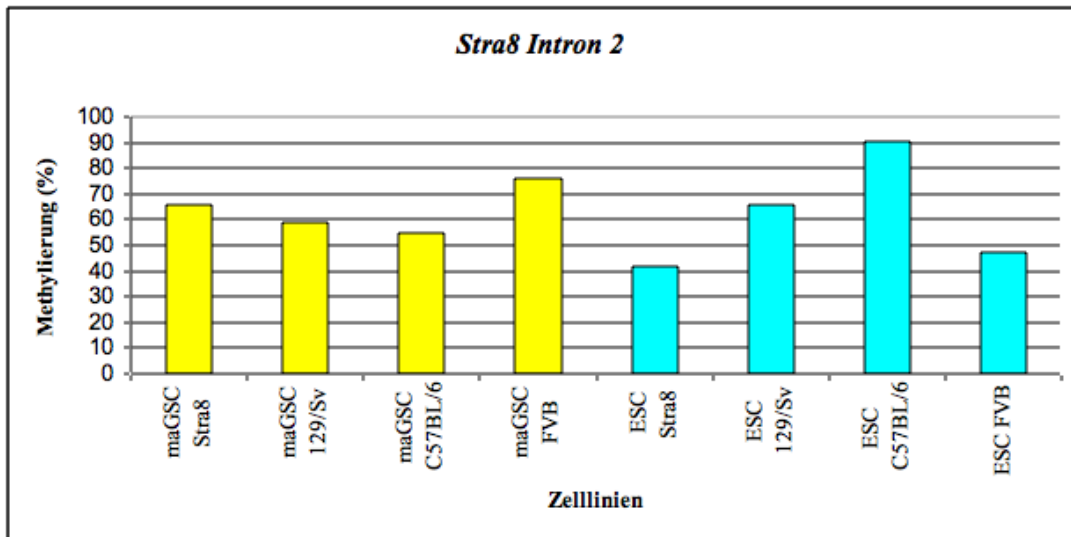


Abbildung 27: Methylierung des *STRA8*-Introns 2 in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken) und die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach der Differenzierung der Zelllinien konnte sowohl bei den maGSC- als auch bei den ESC-Zelllinien keine deutlichen Unterschiede beobachtet werden (Abb. 28). Bei maGSC Stra8 war wieder ein leichtes Absinken der Methylierung von 65,5% auf 47% zu verzeichnen. Bei maGSC 129/Sv konnte ein leichter Anstieg von 59% auf 71,5% beobachtet werden. Auch bei ESC Stra8 und ESC 129/Sv erfolgte ein eher leichter Anstieg der Methylierung von 42% auf 66,4% bzw. von 65,5% auf 68,8%.

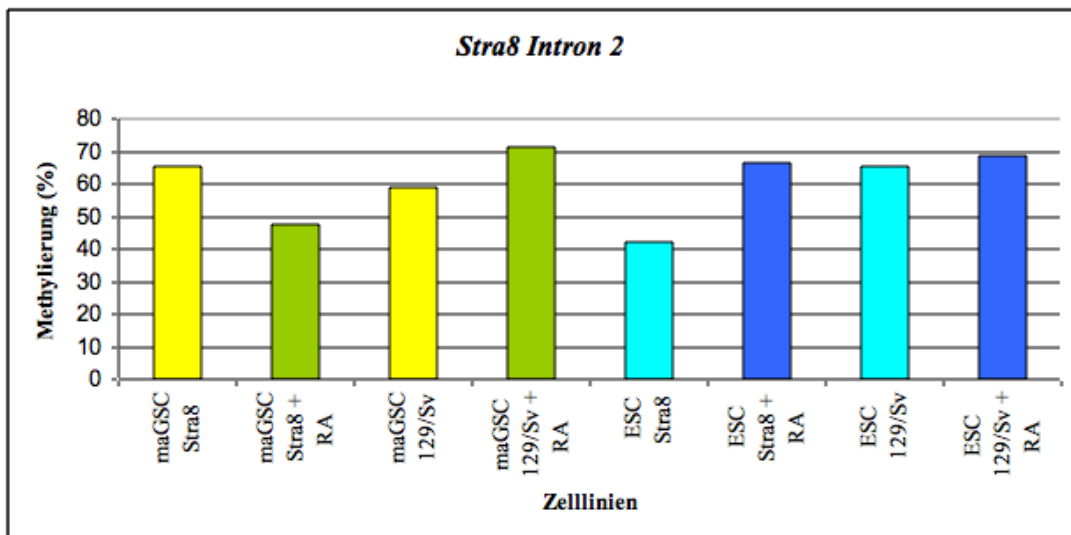


Abbildung 28: Methylierung des *STRA8*-Introns 2 in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten MAGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

## 4.5. Methylierung der paternal geprägten Gene

### 4.5.1. Methylierungsanalyse des Gens *Meg3*

Für die IG-DMR von *Meg3* wurden für die untersuchten Zelllinien fünf unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 29 und Abb. 30).

Im undifferenzierten Zustand zeigten die beiden Zelllinien maGSC C57BL/6 und maGSC FVB eine starke Hypomethylierung mit 6,4% Methylierung für maGSC C57BL/6 und 8,4% Methylierung für maGSC FVB (Abb. 29). Die Methylierung von maGSC Stra8 und maGSC129/Sv war hier allerdings mit 37,8% und 41,8% Methylierung deutlich höher. In diesen Zelllinien war somit nur eine moderate Hypomethylierung zu erkennen. Die vier ESC-Zelllinien wiesen ebenfalls eine moderate Hypomethylierung mit Werten zwischen 21% (ESC 129/Sv) und 39,8% (ESC C57BL/6) auf, während für die MEFs eine höhere, annähernd somatische Methylierung von 64,8% gefunden wurde.

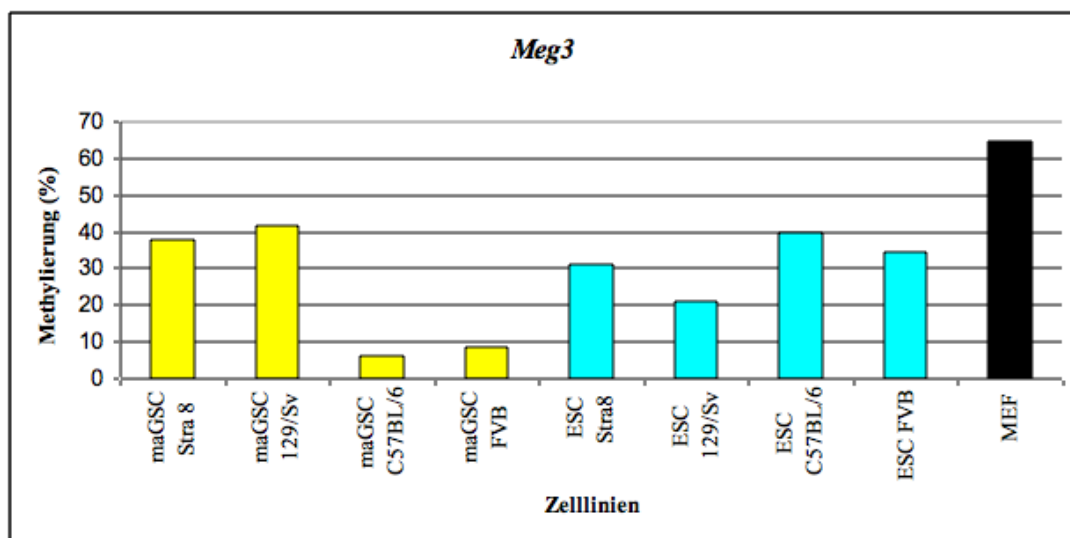


Abbildung 29: Methylierung des *MEG3*-IG-DMR in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Die Differenzierung durch Zugabe von Retinsäure führte sowohl bei den maGSC- als auch bei den ESC-Zelllinien zu einem Anstieg der Methylierung zu einem annähernd somatischen Methylierungsmuster. Bei maGSC Stra8 wurde ein Anstieg von 37,8% auf 65,25% beobachtet, bei maGSC 129/Sv von 41,8% auf 57%, bei ESC Stra8 von 31,2% auf 63,4% und bei ESC 129/Sv von 21% auf 51%. Diese Werte sind mit dem Methylierungsmuster der somatischen MEFs (64,8%) vergleichbar.



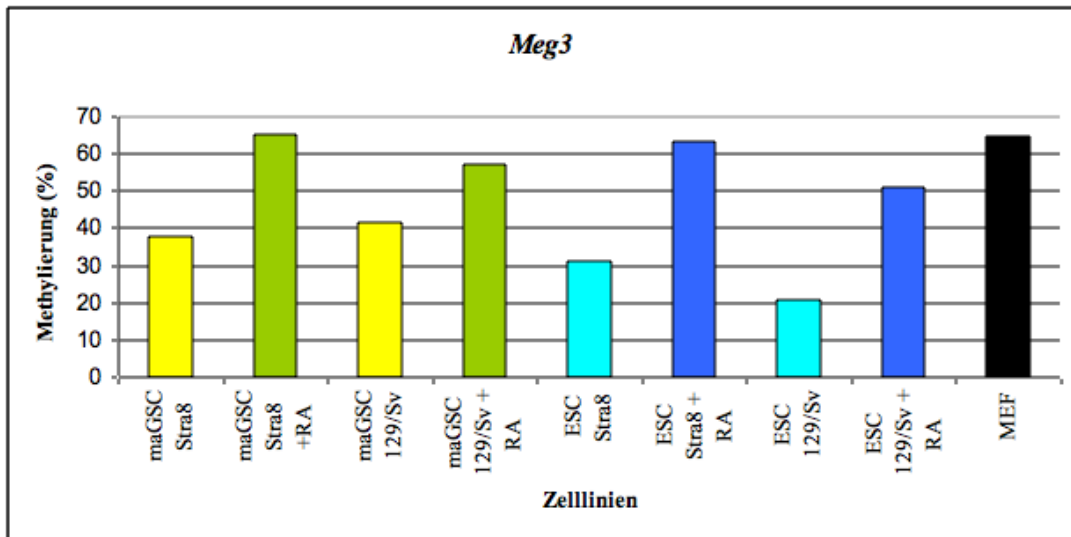


Abbildung 30: Methylierung der *MEG3*-IG-DMR in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken), die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

#### 4.5.2. Methylierungsanalyse des Gens *H19*

Für die ICR von *H19* wurden für die untersuchten Zelllinien zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 26 und Abb. 27).

Im undifferenzierten Zustand zeigte maGSC 129/Sv mit 11% Methylierung eine starke Hypomethylierung (Abb. 31). Die Zelllinien maGSC Stra8, maGSC C57BL/6 und maGSC FVB wiesen hingegen mit 41%, 34,5% und 31,5% Methylierung eine moderate Hypomethylierung auf. Für die vier ESC-Zelllinien und die MEFs wurde ein somatisches Muster mit Methylierungswerten zwischen 42,5% (ESC Stra8) und 63% (ESC FVB) beobachtet. Auch für die MEFs wurde eine eher somatische Methylierung von 66% festgestellt.

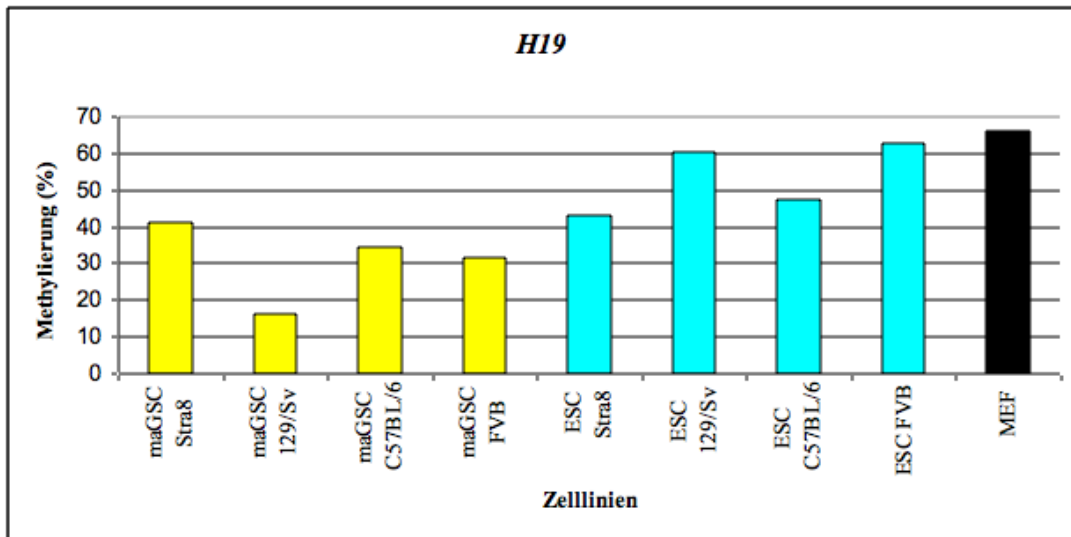


Abbildung 31: Methylierung der *H19*-ICR in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach der Differenzierung mit Hilfe von Retinsäure fand man bei den maGSC-Zelllinien einen Anstieg der Methylierung von 41% auf 62,5% für maGSC Stra8 bzw. von 16,5% auf 34% für maGSC 129/Sv, so dass bei beiden maGSCs ein annähernd somatisches Methylierungsmuster vorlag (Abb. 32). Bei den ESC-Zelllinien wurde nur bei ESC Stra8 ein leichter Anstieg der Methylierung von 43% auf 57% beobachtet. Bei ESC 129/Sv wurde ein moderater Rückgang der Methylierung von 60,5% auf 42,5% festgestellt.

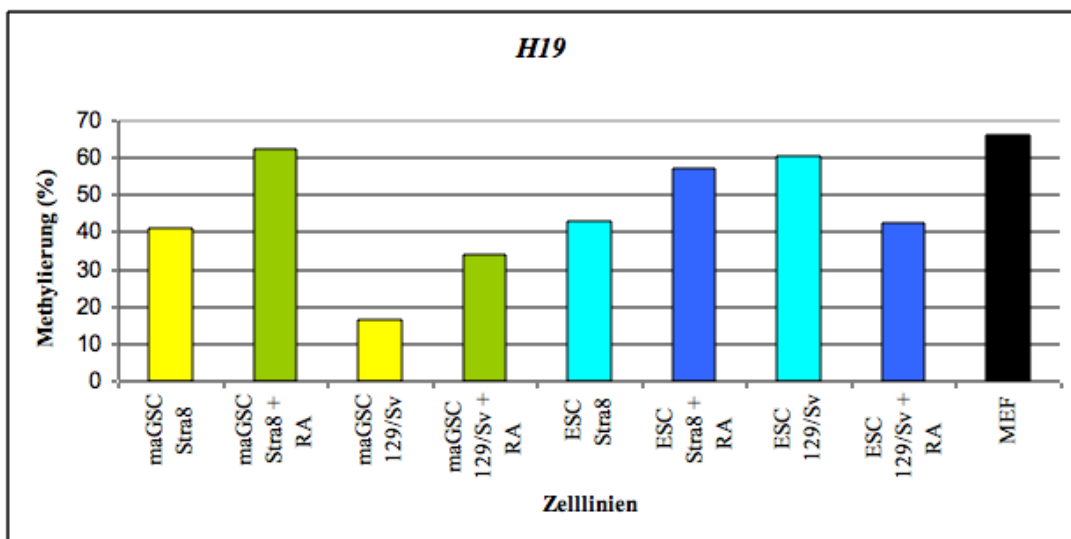


Abbildung 32: Methylierung der *H19*-ICR in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten MAGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken), die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

## 4.6. Methylierung der maternal methylierten Gene

### 4.6.1. Methylierungsanalyse des Gens *Igf2r*

Für die DMR von *Igf2r* wurden für die untersuchten Zelllinien zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 33 und Abb. 34).

Im undifferenzierten Zustand wiesen alle maGSC-Zelllinien eine starke (maGSC 129/Sv, maGSC C57BL/6 und maGSC FVB) bis moderate (maGSC Stra8) Hypomethylierung auf. Die geringste Methylierung wurde bei maGSC 129/Sv mit 7% gefunden, während maGSC Stra8 mit 29% Methylierung eher moderat hypomethyliert war (Abb. 33). Bei den ESC-Zelllinien war die Methylierung deutlich höher. Der höchste Methylierungswert wurde bei ESC FVB mit 58% beobachtet, während der niedrigste Wert bei ESC Stra8 mit 19% zu finden war. ESC 129/Sv und ESC C57BL/6 zeigten eine Methylierung von 41% bzw. 39% auf. In den MEFs lag die erwartete somatische Methylierung von 39% vor.

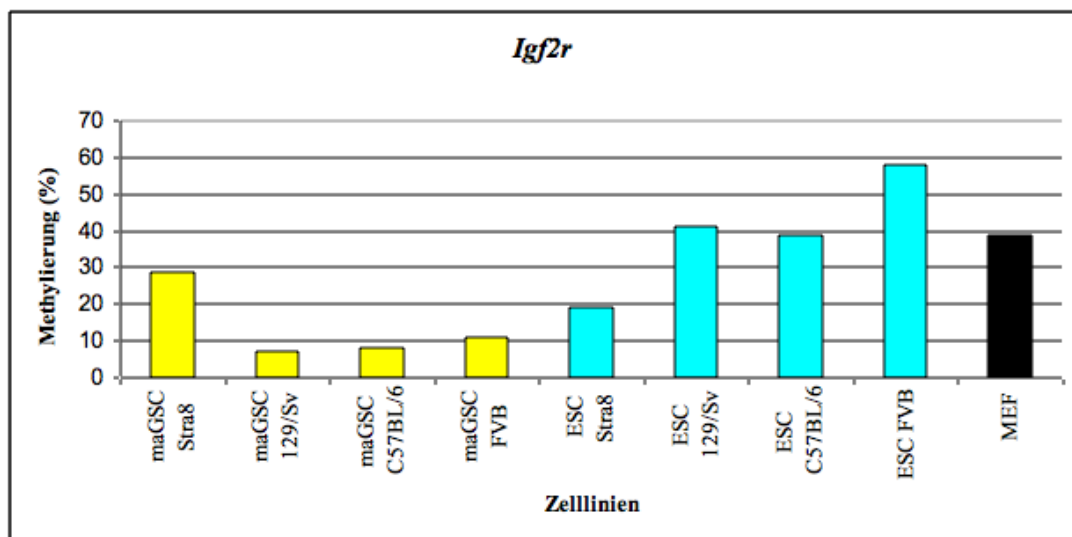


Abbildung 33: Methylierung der *IGF2R*-DMR in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach der Differenzierung konnte bei fast allen Zelllinien ein Anstieg der Methylierung festgestellt werden (Abb. 34). Eine Ausnahme bildete hier erneut ESC 129/Sv. Hier sank die Methylierung von 41% auf 24% ab. Bei ESC Stra8 stieg die Methylierung von 19% auf 34%, bei maGSC Stra8 von 29% auf 41% und bei maGSC 129/Sv von 7% auf 13% an. Bei maGSC Stra8 und ESC Stra8 war die prozentuale Methylierung nach der Differenzierung mit Retinsäure somit ähnlich hoch wie die in MEFs beobachtete Methylierung (39%).

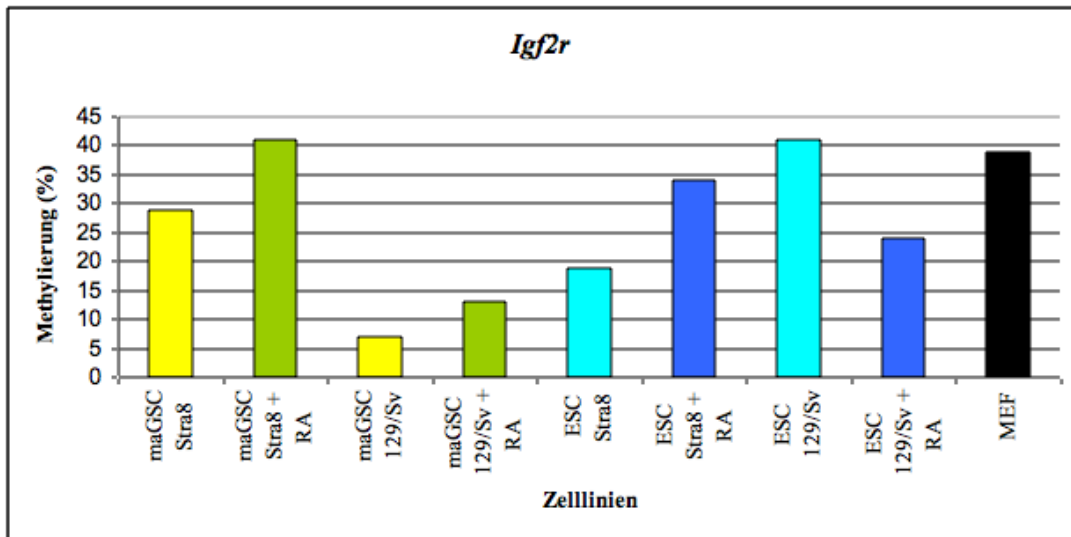


Abbildung 34: Methylierung der *IGF2R*-DMR in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken), die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

#### 4.6.2. Methylierungsanalyse des Gens *Snrpn*

Für die DMR von *Snrpn* wurden für die untersuchten Zelllinien drei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 35 und Abb. 36).

Im undifferenzierten Zustand zeigte maGSC Stra8 eine moderate Hypomethylierung von 31,6%. Bei den anderen drei maGSC-Zelllinien wurde eine starke Hypomethylierung beobachtet, mit 7% bei maGSC 129/Sv, 4,3% bei maGSC C57BL/6 und 11,6% bei maGSC FVB. Bei den ESC-Zelllinien konnte wie in den MEFs eine höhere Methylierung mit annähernd somatischen Methylierungsmustern festgestellt werden (25% bei ESC Stra8, 41,3% bei ESC 129/Sv, 37,3% bei ESC C57BL/6, 32% bei ESC FVB und 33,6% bei den MEFs).

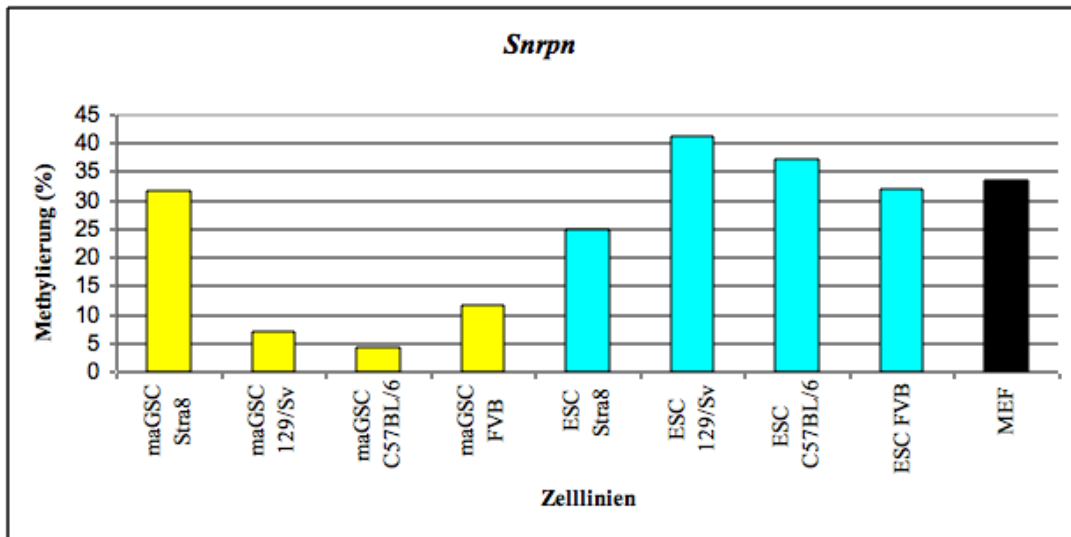


Abbildung 35: Methylierung der *SNRPN*-DMR in undifferenzierten Zellen

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die vier undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die vier undifferenzierten ESC-Linie (blaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Nach Differenzierung mit Retinsäure konnte nur bei maGSC 129/Sv ein leichter Methylierungsanstieg von 7% auf 14,4% festgestellt werden (Abb. 36). Bei maGSC Stra8 wurde ein leichter Rückgang der Methylierung von 31,6% auf 25,4% beobachtet. Bei ESC 129/Sv ging die Methylierung ebenfalls von 41,3% auf 22% zurück. Bei ESC Stra8 wurde keine signifikante Änderung der Methylierung gefunden.

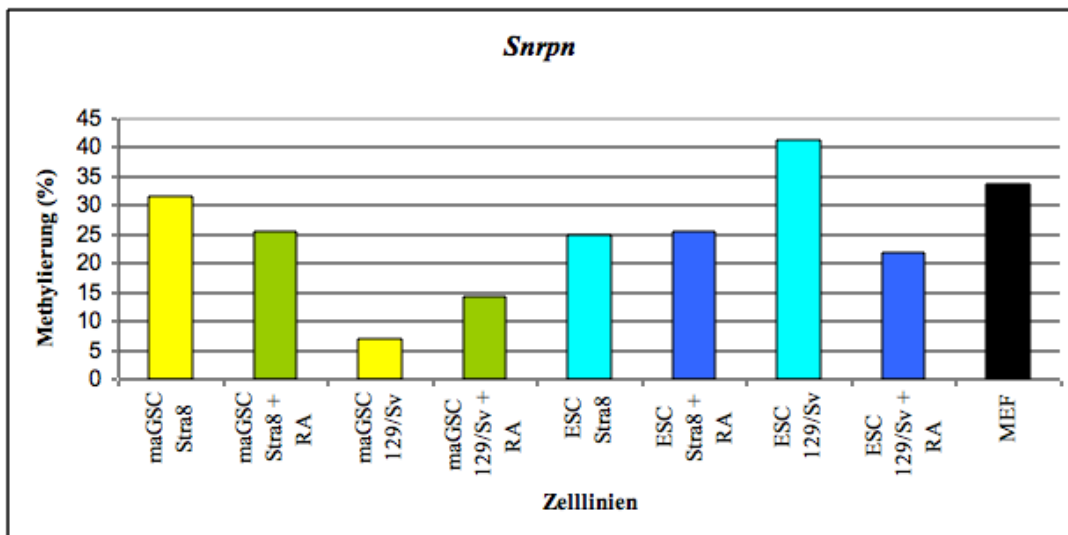


Abbildung 36: Methylierung der *SNRPN*-DMR in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten MAGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken), die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) und die MEFs (schwarzer Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

#### 4.7. Methylierungsanalyse der Pluripotenz- assoziierten miRNAs in maGSCs und ESCs im Vergleich zu der Expression von Pluripotenzmarkergenen

Für den Promotor von *Nanog* und *Oct4* wurden für die untersuchten Zelllinien zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 37 und Abb. 38).

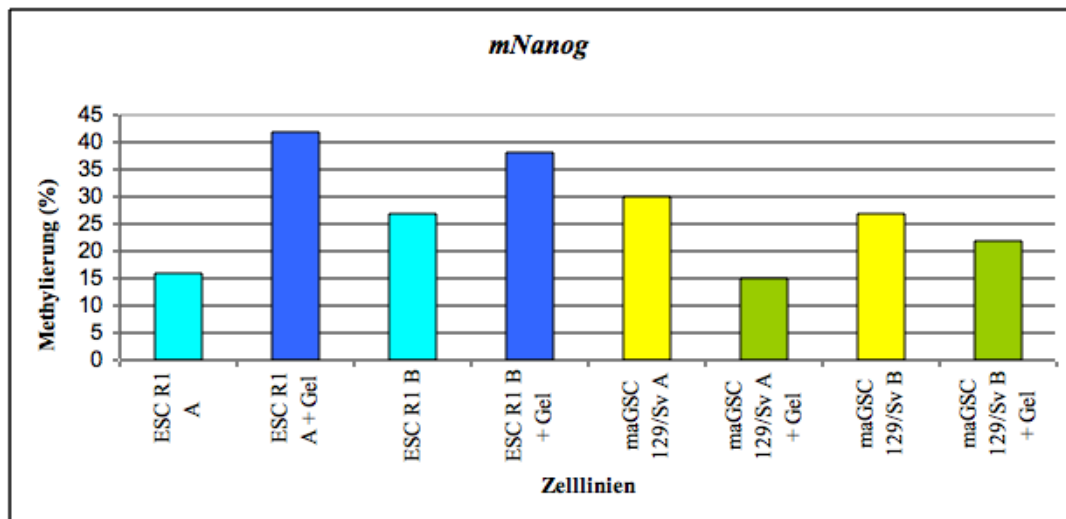
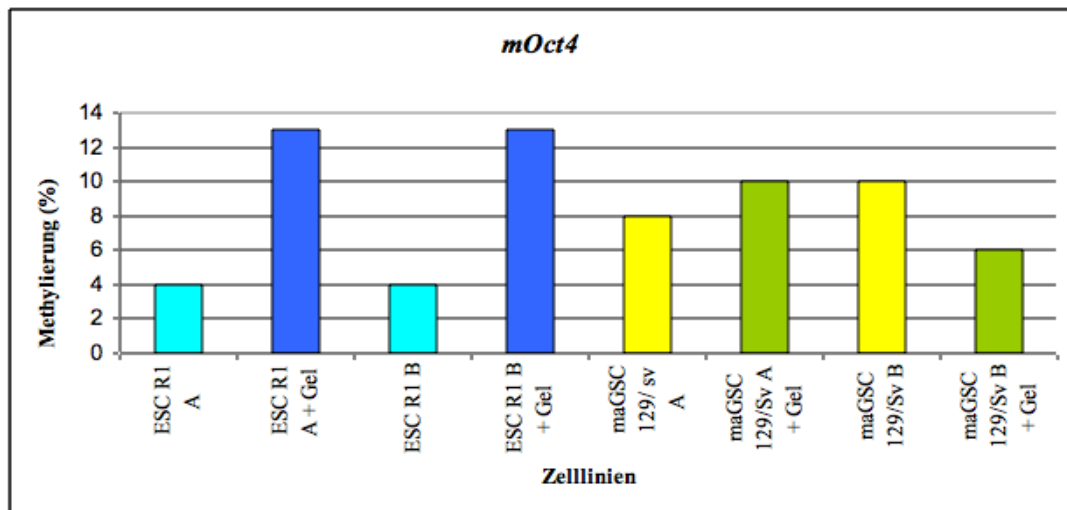


Abbildung 37: Methylierung des *NANOG*-Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Die Ausgangsmethylierung des *Nanog*- Promotors (Abb. 37) ist in allen getesteten Zelllinien gering, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieses Pluripotenzmarkergen exprimiert wird. Bei den ESCs beläuft sich die Methylierung auf 16% für ESC R1 A und auf 27% für ESC R1 B. Die maGSCs zeigen etwas höhere Ausgangsmethylierung mit 30% für maGSC 129/Sv A und 27% für maGSC 129/Sv B. Die Differenzierung der Zellen wurde durch eine 10d lange Kultivierung der Zellen auf Gelatine ohne MEFs und LIF herbeigeführt. Bei den ESCs konnte dabei wie erwartet ein Anstieg der Methylierung beobachtet werden: ESC R1 A zeigt einen Anstieg von 16% auf 42% und ESC R1 B von 27% auf 38%. Der Anstieg der Methylierung ist gleichzusetzen mit der Herunterregulierung dieses Gens. Bei den maGSCs sieht es allerdings genau umgekehrt aus: die Methylierung steigt während der Differenzierung nicht. Trotz Differenzierungsbedingungen sinkt die Methylierung bei maGSC 129/Sv A von 30% auf 15% und bei maGSC 129/Sv B von 27% auf 22%. Es findet hier also keine Herunterregulierung der Genexpression statt. Anders formuliert: maGSCs sind in der Lage unter bestimmten Differenzierungsbedingungen ihre Pluripotenz aufrechtzuerhalten.

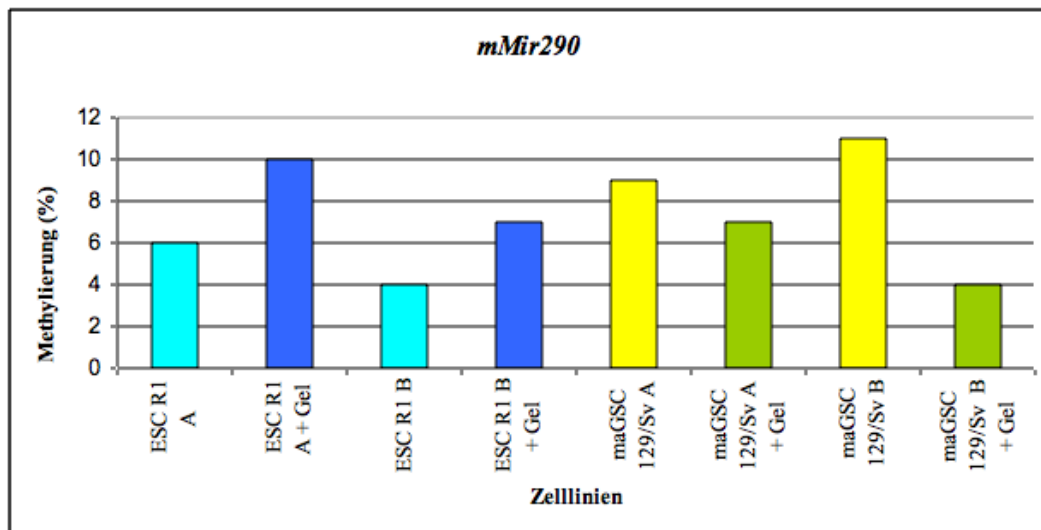


**Abbildung 38:** Methylierung des *OCT4*-Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Die Analyse der Promotormethylierung von *Oct4* (Abb. 38) liefert ein ähnliches Bild ab: die undifferenzierten ESCs und maGSCs zeigen für dieses Gen eine starke Hypomethylierung. Bei den ESCs beträgt der Wert jeweils 4%, bei den maGSCs 10% und 8%. Im Zuge der Differenzierung steigt die Promotormethylierung von *Oct4* bei den ESCs auf jeweils 13% an, während auch hier wieder die maGSCs zumindest für maGSC 129/Sv B einen Rückgang der Methylierung von 10% auf 6% aufweisen. Für die Zelllinie maGSC 129/Sv A erkennt man einen nicht signifikanten Anstieg von 8% auf 10%. Auch bei diesem Pluripotenzmarkergen kann man also erkennen, dass maGSC unter bestimmten Differenzierungsbedingungen in der Lage sind ihre Pluripotenz aufrecht zu erhalten.

Für den Promotor von *miR290* und *miR302* wurden für die untersuchten Zelllinien zwei unabhängige Experimente im undifferenzierten und differenzierten Zustand durchgeführt und anschließend der Mittelwert der gemessenen prozentualen Methylierung ermittelt (Abb. 39 und Abb. 40).



**Abbildung 39: Methylierung des *MIR290*-Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien**

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Wie bei den Pluripotenzmarkergenen *Nanog* und *Oct4*, zeigen auch hier die undifferenzierten ESCs und maGSCs eine starke Hypomethylierung des *miR-290*-Promotors auf (Abb. 39). Im Zuge der Differenzierung steigt bei den ESCs die Promotormethylierung von 6% bei ESC R1 A auf 10% und von 4% bei ESC R1 B auf 7%. Im Gegensatz dazu zeigen die maGSCs einen leichten Rückgang der Methylierung. Dementsprechend muss davon ausgegangen werden, dass maGSCs unter bestimmten Differenzierungsbedingungen in der Lage sind die Expression von Pluripotenz-assoziierten miRNAs aufrecht zu erhalten.



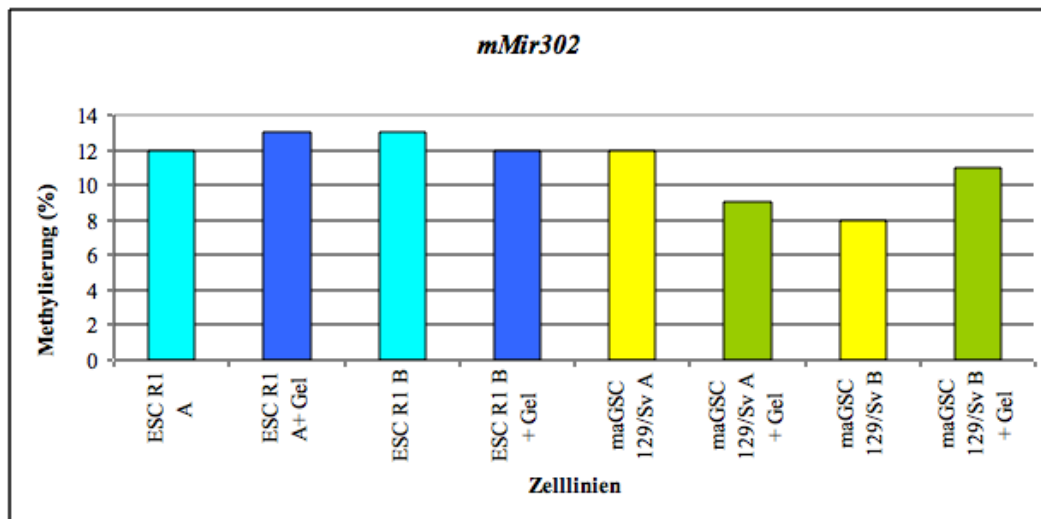


Abbildung 40: Methylierung des *MIR302*-Promoters in jeweils zwei undifferenzierten und differenzierten maGSC- und ESC-Linien

Die gemessene mittlere prozentuale Methylierung für die beiden undifferenzierten maGSC-Linien (gelbe Balken), die beiden differenzierten maGSC-Linien (grüne Balken), die beiden undifferenzierten ESC-Linien (blaue Balken) und die beiden differenzierten ESC-Linien (dunkelblaue Balken) ist auf der Y-Achse angegeben.

Für die Promotormethylierung des *miR-302*- Clusters zeigen die undifferenzierten ESCs und maGSCS eine starke Hypomethylierung (Abb. 40). Die Einleitung der Differenzierung führt bei den ESCs und maGSCs zu einer mehr oder weniger unveränderten Methylierung bis hin zu einer leicht verminderten Methylierung. So kann zum einen bei ESC R1 A ein minimaler Anstieg der Methylierung von 12% auf 13% festgestellt werden, während bei ESC R1 B eine Verminderung der Methylierung von 13% auf 12% zu verzeichnen ist. Bei maGSC 129/Sv A ist im Zuge der Differenzierung ein Rückgang der Methylierung von 12% auf 9% zu erkennen, während bei maGSC 129/Sv B ein Anstieg von 8% auf 11% vorliegt. Da bekannt ist, dass das *miR-302*- Cluster im Zuge der ersten Differenzierungsstadien hochreguliert wird, war hier auch keine große Veränderung der Methylierung zu erwarten.

Zusammenfassend kann hier also gesagt werden, dass im Allgemeinen die Promotormethylierungen von *miR-290* und *miR-302* den Methylierungen der Pluripotenzmarker *Nanog* und *Oct4* ähneln, da die ESCs und die maGSCs im undifferenzierten Zustand eine Hypomethylierung dieser Promotoren aufweisen. Eine geringe Methylierung bedeutet gleichzeitig, dass diese Gene exprimiert werden. Während der Differenzierung (10d Kultivierung auf Gelatine ohne MEFs und LIF) können maGSCs länger die Expression von *Oct4*, *Nanog* und dem *miR-290*- Cluster aufrechterhalten, als ESCs, was gleichbedeutend ist mit der Tatsache, dass sie in der Lage sind ihre Pluripotenz länger aufrecht zu erhalten. Die Promotormethylierung des *miR-302*- Clusters bleibt bei maGSCs und ESCs auch während der Differenzierung gering, da die Mitglieder dieses Clusters zumindest in ESCs während der ersten Differenzierungsstadien hochreguliert werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. *Diskussion zum Projekt: „Epigenetische Analyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“*

#### 5.1.1. Das Immunsystem und Autoimmunerkrankungen

Das Immunsystem ist ein biologisches Abwehrsystem, das körperfremde Stoffe und Pathogene eliminiert. Es kann in angeborene und adaptive Abwehrmechanismen unterteilt werden, wobei die Interaktion dieser beiden funktionellen Einheiten für die Aufrechterhaltung der Gesundheit essentiell ist.

Die angeborenen Abwehrmechanismen wirken unspezifisch, was so viel bedeutet, dass sie nicht zwischen den infektiösen Partikeln unterscheiden. Die erste Verteidigungslinie besteht dabei aus der Haut, den Schleimhäuten, den inneren Oberflächengeweben und deren Sekreten. Sie grenzen den Organismus nach außen hin ab und stellen somit eine mechanische Barriere dar. Die zweite Verteidigungslinie besteht aus phagocytotischen Zellen wie Makrophagen und bakterizid wirkenden Proteinen wie Interferonen und Komplementproteinen, die die ein-dringenden Partikel und Pathogene unschädlich machen. Auch allgemeine Abwehrreaktionen, wie Husten, Niesen, Erbrechen und Fieber werden zu den unspezifischen Abwehr-mechanismen gezählt.

Das erworbene Immunsystem ist die dritte Verteidigungslinie des Körpers und wird auch als spezifisches Immunsystem bezeichnet, da es in der Lage ist bestimmte molekulare Merkmale, sogenannte Antigene, zu erkennen. Oberflächenmoleküle von Bakterien, Pilze und Viren, sowie Oberflächenstrukturen von Pollen, Nahrungsmitteln oder Gewebetransplantaten können als Antigene fungieren. B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) sind in der Lage solche Antigene mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren zu erkennen und zu binden. Erfolgt die Bindung zwischen Antigen und Antigenrezeptor auf der Zelloberfläche einer B-Zelle, so beginnt diese daraufhin zu proliferieren und Immunglobuline zu sezernieren, die wiederum gegen das Antigen spezifisch sind.

Interessanterweise ist das Immunsystem in der Lage, zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Diese Fähigkeit wird als Selbsttoleranz bezeichnet und durch MHC (Major Histocompatibility Complex; Hauptgewebeverträglichkeits-komplex)-Proteine ermöglicht. Diese Proteine fungieren als körpereigene Antigene und sind auf der Oberfläche jeder Körperzelle nachweisbar. Ihre Anwesenheit markiert die Zellen als körper-zugehörig und schützt sie somit vor dem Angriff durch T-Zellen. Damit T-Zellen allerdings die körpereigenen MHC-Proteine erkennen können, müssen die sich im Thymus entwickelnden T-Zellen mit MHC-Proteinen in Kontakt treten. Ist die Bindung der T-Zellen

an MHC zu stark, kommt es zu einer zu starken Aktivierung der T-Zelle und sie geht zugrunde. Ist die die T-Zelle nicht in der Lage MHC-Proteine zu erkennen, geht sie ebenfalls zugrunde. Dementsprechend reifen also nur die T-Zellen aus, die eine gewisse Affinität für die körpereigenen MHC-Moleküle haben (Purves et al, 2006).

Bei Autoimmunerkrankungen handelt es sich um autoaggressive Erkrankungen, bei denen sich die Immunreaktion gegen körpereigene Strukturen richtet. Dies kommt möglicherweise dadurch zustande, dass es zu einer nur unzureichenden Auslese von T-Zellen im Thymus kommt oder aber bestimmte MHC-Moleküle eine ähnliche Struktur zu körperfremden Proteinen aufweisen (Atassi und Casali, 2008; Ring und Lakkis, 1999). In beiden Fällen kommt es dann zu einer Aktivierung der T-Zellen, die nun das körpereigene Gewebe als fremde Struktur wahrnehmen und angreifen. Neben diesen sogenannten autoreaktiven T-Zellen, sind auch Autoantikörper typisch für autoaggressive Erkrankungen. Ohne adäquate Behandlung resultiert der permanente Angriff des Immunsystems in fortwährenden Entzündungen, die letztendlich zur Zerstörung des jeweiligen Gewebes führen (Cho und Gregersen, 2011).

Mittlerweile sind über 80 Autoimmunerkrankungen bekannt, die man in organspezifische und systemische Autoimmunerkrankungen einteilen kann. Bei organspezifischen Erkrankungen werden Gewebestrukturen eines bestimmten Organs angegriffen, während systemische Erkrankungen dadurch gekennzeichnet sind, dass bei unterschiedlichen Individuen unterschiedliche Organe betroffen sind. Es wird geschätzt, dass etwa 5% der Weltbevölkerung unter Autoimmunerkrankungen leiden, wobei Frauen im reproduktiven Alter häufiger betroffen sind als Männer. Die Tatsache, dass solche Erkrankungen vorwiegend in entwickelten Ländern auftreten, lässt den Schluss nahe, dass zum einen der genetische Hintergrund der verschiedenen ethnischen Gruppen und zum anderen bestimmte Umweltfaktoren eine tragende Rolle spielen (Javierre et al, 2011). Tatsächlich konnten für unterschiedliche Erkrankungen bestimmte Kandidatengene identifiziert werden, die an der Entstehung von bestimmten Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Zwillingsstudien haben allerdings gezeigt, dass die Gene nicht die alleinige Ursache von solchen Erkrankungen sind: Bei monozygoten Zwillingen, bei denen ein Zwilling eine Autoimmunerkrankung aufweist, liegt die Wahrscheinlichkeit, dass der zweite Zwilling ebenfalls erkrankt, nur bei 5-75% (Nance, 1978). Gourley und Miller (2007) schlugen vor, dass epigenetische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen und die Interaktion zwischen genetischen und Umweltfaktoren näher betrachtet werden sollte. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Histonacetyltransferase-Knockout-Mäuse ebenfalls ein Autoimmun-Syndrom entwickeln. Ferner konnten Ballestar et al. (2011) nachweisen, dass bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder dem systemischen Lupus erythematodes eine abweichende DNA-Methylierung in Kandidatengenen auftritt. Meistens konnte eine Hypomethylierung festgestellt werden, die bekannterweise mit einer stärkeren Expression von Genen einhergeht.

M. Crohn und C. ulcerosa sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die ebenfalls zu den Autoimmunerkrankungen gezählt werden. Laut dem Bundesministerium für Bildung und Forschung wird geschätzt, dass allein in Deutschland in etwa 300.000 Menschen davon betroffen sind. Die Ursachen und die Entstehung von CED sind vielseitig und bis heute nicht

vollständig geklärt. Neben Umwelteinflüssen, Ernährungs- und Hygienegewohnheiten sowie einer Barrierestörung werden auch genetische Faktoren diskutiert. Bis heute ist allerdings die genaue Ursache von CED nicht bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde nun die Rolle der Epigenetik in CED näher betrachtet. Dafür wurden im Zuge von Koloskopien gewonnene Gewebebiopsien aus dem terminalen Ileum und Colon von betroffenen Patienten und Kontrollindividuen gesammelt. Durch Extraktion der DNA aus diesen Proben war es dann möglich, die Promotormethylierung von Kandidatengenen (*MUC2*, *MUC6*, *MUC15*, *PAX5*, *CLDN* und *IL17REL*) zu untersuchen. Die erhaltenen Ergebnisse werden nun nachfolgend diskutiert.

### **5.1.2. Das *CLDN1*-Gen: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED**

„Tight junctions“ (TJs) verbinden benachbarte Epithelzellen, wodurch das Gewebe versiegelt wird und Lecks verhindert werden. Es handelt sich dabei um Stränge aus Membranproteinen, die die Epithelzellen umgürteln und somit die Diffusion von Wasser und Soluten zwischen den Zellzwischenräumen verhindern, was als „Gate-Funktion“ bezeichnet wird (Purves et al, 2006). Ferner verhindern „Tight junctions“ die Diffusion von Membrankomponenten wie Rezeptoren, Kanäle und Carriern innerhalb der Plasmamembran und sind somit für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität entscheidend. Diese Funktion wird als „Fence Funktion“ bezeichnet (Mandel et al, 1993).

Die in der deutschen Literatur auch Schlussleisten genannten „Tight junctions“ bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen. Dazu zählen auch die Claudine (Findley et al, 2009), die entweder eine abdichtende und somit permeabilitätserniedrigende Wirkung aufweisen (Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-5), oder aber eine porenbildende Funktion (Claudin-2,) besitzen und somit die Permeabilität eines Epithels erhöhen können. Dementsprechend spielen gerade Claudine eine kritische Rolle bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion, weshalb in den letzten Jahren verstärkt ihre Rolle in CED untersucht wurde. So konnte gezeigt werden, dass die Dysfunktion der epithelialen Barriere nicht nur auf die multiplen Ulcera und Erosionen zurückzuführen ist. Vielmehr kommt es bei CED-Patienten auch zu Veränderungen in den „Tight junctions“ wie beispielsweise eine Reduktion der „Tight junctions“-Stränge oder aber komplette Abbrüche innerhalb der „Tight junctions“ (Schulzke et al, 2009; Zeissig et al, ).

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die Promotormethylierung von *CLDN1* untersucht. Wie bereits erwähnt, ist *CLDN1* ein abdichtendes Protein, dessen besondere Bedeutung durch *Claudin-1*-defiziente Mäuse verdeutlicht wird. Diese Mäuse weisen einen massiven Wasserverlust über die Haut auf und sterben nur wenige Stunden nach ihrer Geburt (Furuse et al, 2002). In einer Studie von Oshima et al im Jahr 2008 war die Expression von *CLDN1* in rektalen Mucosa-Biopsien von *C. ulcerosa*-Patienten vergleichbar mit der Expression in Kontrollindividuen. Auch die in der vorliegenden Dissertation durchgeführte Methylierungsanalyse der Promotorregion von *CLDN1* konnte keine Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Personen aufzeigen. Möglicherweise unterliegt dieses Gen keinen epigenetischen Veränderungen. Dennoch wäre es interessant, auf weitere epigenetische Veränderungen wie zum Beispiel Histonmodifikationen auf Chromatinebene zu untersuchen.

### 5.1.3. Mucin-Gene: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED

Das Darmepithel ist mit einer schützenden Schleimschicht, dem Mucus, überzogen, der als physikalische Barriere dient und somit das Epithel vor mechanischen Einflüssen schützt. Ferner erleichtert der Mucus die Darmpassage, indem er den Darminhalt befeuchtet. Dass bei CED eine Barrierefunktionsstörung vorliegt, ist bekannt. So konnte die Arbeitsgruppe um Pullan et al im Jahr 1994 nachweisen, dass die Mucusschicht bei *C. ulcerosa*-Patienten dünner als bei Kontrollindividuen ist. Die Abnahme dieser Schicht ist durch die verringerte Anzahl an Goblet-Zellen zu erklären und resultiert in einer verminderten Schutzfunktion der Mukosa. Dadurch wird es den Bakterien erleichtert, in die Darmwand einzudringen. Ferner kommt es dadurch auch zu einem verstärkten Kontakt zwischen den intestinalen Immunzellen und den Bakterien im Darmlumen. Dieser permanente Kontakt resultiert schlussendlich in einer überschießenden Aktivierung des Immunsystems. Umgekehrt ist bei *M. Crohn*-Patienten keine veränderte Schichtdicke des Mucus festzustellen. Auch die Anzahl der Becherzellen weicht nicht von der in Kontrollindividuen ab.

Ferner konnte gezeigt werden, dass in CED die Mucine biochemische Veränderungen aufweisen. Clamp et al. konnten bereits 1981 zeigen, dass die Länge der Oligosaccharidketten in CED verkürzt ist. Auch eine reduzierte Sulphatierung und gesteigerte Sialysierung konnten festgestellt werden. Die dadurch entstehende Abschwächung der negativen Ladung der Oberfläche resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit des Schleimes gegenüber bakteriellen Glucosidasen. Die geringe O-Glykosylierung der Peptidketten der Mucine führt wiederum zu einer verminderten Viskosität des Schleims.

In einer weiteren Studie wurden die Expressionsprofile von Mucin-Genen in DNA-Microarray-Analysen bestimmt (Moehle et al, 2006). Diese Studie zeigte, dass eine koordiniert geringere Expression der Mucine *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC12*, *MUC13*, *MUC17* und *MUC20* in nicht entzündlichen Colon- und Ileum-Proben von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten nachweisbar ist. Anschließend durchgeführte Real-time-PCR-Analysen konnten diese Ergebnisse bestätigen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Methylierungsanalyse der jeweiligen Promotorregion der Gene *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Promotormethylierung von *MUC2* in entzündlichen Colon-Biopsaten von *C. ulcerosa*-Patienten signifikant höher als in nicht-entzündlichen Colon-Biopsaten von *C. ulcerosa*-Patienten und Kontroll-Biopsaten ist. Der Methylierungswert des *MUC2*-Promotors steigt somit mit zunehmender Krankheitsaktivität. Die erhöhte Methylierung lässt darauf schließen, dass das Gen in Krankheitsphasen eine geringere Aktivität aufweist. Es ist daher eine geringere Menge an *MUC2*-Protein zu erwarten ist, was die Ergebnisse der Arbeit von Moehle et al. (2006) stützt. Vermutlich führt eine geringere *MUC2*-Proteinmenge zu einer Abschwächung und Verschlechterung der mukosalen Barrierefunktion, was wiederum die Arbeit von Pullan et al. (1994) stützen würde.

Zudem konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass bei CED-Patienten die Promotormethylierung von *MUC6* signifikant verändert ist. Dieser Befund steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Jahr 2006 von Moehle et al., die keine

Unterschiede im mRNA-Level von *MUC6* zwischen Geweben von CED-Patienten und Kontrollindividuen nachweisen konnten. Die entzündlichen Colon-Biopsate von M. Crohn-Patienten wiesen eine deutlich höhere Methylierung der *MUC6*-Promotorregion als die nicht-entzündlichen Gewebeproben von M. Crohn-Patienten und die Gewebeproben der Nicht-CED Patienten auf. Interessanterweise gleichen sich die Methylierungsergebnisse der Biopsate der Kontrollindividuen und der nicht-entzündlichen Biopsate der M. Crohn-Patienten. Auch bei der C.-ulcerosa- Gruppe konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden: Die Methylierung der Promotorregion von *MUC6* ist in entzündlichen Proben von Colitis ulcerosa-Patienten deutlich höher als in den Proben der Kontrollindividuen und in den nicht-entzündlichen Proben von C. ulcerosa-Patienten. Hier konnte zudem noch gezeigt werden, dass auch in nicht-entzündlich veränderten Arealen der Methylierungslevel bereits signifikant höher als in Proben von Nicht-CED Patienten ist. Diese Ergebnisse zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der CED-Erkrankung und dem Methylierungswert von *MUC6*. Durch die höhere Promotormethylierung liegt vermutlich eine verringerte *MUC6*-Proteinmenge vor, was vermutlich die schützende Funktion der Mukosa beeinträchtigt und somit zu einer Herabsetzung der Barrierefunktion gegen Keime führt. Zusätzlich scheint es eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der C. ulcerosa-Erkrankung und dem Methylierungsanstieg im *MUC6*-Promotor zu geben: Die geringste Methylierung für *MUC6* konnte in der Kontrollgruppe festgestellt werden, eine signifikant höhere Methylierung fand sich in nicht-entzündlichen Proben von C. ulcerosa-Patienten und die höchste Methylierung wurde in entzündlich veränderten Proben von C. ulcerosa-Patienten gemessen.

In den entzündlichen Gewebeproben von C. ulcerosa-Patienten konnte überdies eine Abnahme in der *MUC15*-Promotormethylierung nachgewiesen werden. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass die geringere Methylierung des Promotors zu einer höheren Expression des Gens führt. Dies könnte erwartungsgemäß in einer höheren Proteinkonzentration von *MUC15* resultieren. Eine zu hohe Protein-Expression könnte ebenfalls zu einer gestörten Barrierefunktion der Mukosa führen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Arbeitsgruppe um Huang et al. (2009) eine *MUC15*-Überexpression in colorektalen Tumoren feststellen konnte. Gerade C. ulcerosa-Patienten haben eine bekanntlich höhere Wahrscheinlichkeit, nach zehnjährigem Verlauf der Erkrankung an einem solchen Tumor zu erkranken.

#### **5.1.4. Das *PAX5*-Gen: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED**

*PAX5* kodiert für ein B-Zell spezifisches Aktivator-Protein, das BSAP (B-cell- specific activator protein), das in die Entwicklung von für die Immunantwort wichtigen B- Zellen involviert ist. Es ist bekannt, dass B-Zellen eine verstärkte Aktivität bei einer vorherrschenden CED aufweisen (Defendenti et al., 2011). Dementsprechend wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Promotormethylierung von *PAX5* untersucht. Es wurde dabei festgestellt, dass sowohl bei den terminalen Ileum-Proben als auch bei den Colonproben keine Unterschiede zwischen M. Crohn-Patienten und Kontrollindividuen bestehen. Bei den entzündlichen Colonproben von C. ulcerosa-Patienten konnte im Vergleich zu den nicht-entzündlichen Proben und den Proben aus Kontrollindividuen gezeigt werden, dass eine leicht, aber signifikant erhöhte Methylierung von *PAX5* vorliegt.

Dementsprechend wäre eine leicht verminderte Expression von *PAX5* zu erwarten. Dies wiederum könnte einen Einfluss auf die B- Zell-Entwicklung haben und in einer inadäquaten Immunantwort auf pathogene Keime resultieren.

#### **5.1.5. Das *IL17REL*-Gen: Die Korrelation der Methylierungsergebnisse mit CED**

Eine genomweite Assoziationsstudie konnte eine Mutation im *IL17REL*-Gen als Risikofaktor für *C. ulcerosa* identifizieren (Franke et al, 2010). Die genaue Funktion von *IL17REL* ist bis heute nicht bekannt, allerdings wird wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu *IL17RE* davon ausgegangen, dass es ebenfalls Interleukin 17 (IL17) bindet. IL17 fungiert als proinflammatorisches Cytokin und bewirkt schlussendlich die Zerstörung von eindringenden pathogenen Mikroorganismen. Eine Mutation im *IL17REL*-Gen führt vermutlich zu einer gestörten Funktion von IL17REL.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Promotormethylierung von *IL17REL* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwischen den nicht-entzündlichen und entzündlichen Proben aus dem terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten und den Proben aus Kontrollindividuen keine Methylierungsunterschiede bestehen. Beim Vergleich der entzündlich veränderten Colonproben der M. Crohn-Patienten mit der Kontrollgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass die *IL17REL*-Methylierung in den entzündlich veränderten Proben deutlich erhöht war. Auch der Vergleich der entzündlich veränderten mit den nicht-entzündlichen Proben der M. Crohn-Gruppe ergab eine signifikant erhöhte Methylierung von *IL17REL* in entzündeten Bereichen. Bei den *C. ulcerosa*-Proben wurden ähnliche Ergebnisse erhalten: In den entzündlichen Colon-Proben konnte eine deutlich höhere *IL17REL*-Methylierung als bei den Proben aus Kontrollindividuen und bei den nicht-entzündlichen Proben von *C. ulcerosa*-Patienten festgestellt werden. Die erhöhte Methylierung von *IL17REL* führt vermutlich zu einer geringeren Expression dieses Gens, wodurch auch eine geringe Menge an IL17REL-Protein zu erwarten wäre. Zusammenfassend würde das bedeuten, dass zum einen durch die Mutation die Funktion von IL17REL beeinträchtigt ist und zum anderen durch die hohe Methylierung die Expression von *IL17REL* zusätzlich verringert wäre. Dies könnte dazu führen, dass letztendlich IL17 nicht an IL17REL binden kann und somit das Signal zur Zerstörung von pathogenen Mikroorganismen ausbleibt.

#### **5.1.6. Ausblick**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa führen zu schweren Entzündungen des Dün- und Dickdarms. Dabei wird, wie bereits erwähnt, angenommen, dass CED durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Umwelteinflüsse mit immunologischen, genetischen und epigenetischen Faktoren verursacht werden.

Ziel dieser Studie war es, die epigenetischen Veränderungen von Kandidatengenen näher zu bestimmen und nachzuweisen. Um diese Erkrankungen besser zu verstehen und daraus neue Therapieansätze zu entwickeln, können auch weitere technologische Ansätze verwendet werden. Nachfolgend sollen diese technischen Möglichkeiten kurz vorgestellt werden.

Der auf Bead Array Technologie basierende Illumina Infinium Assay erlaubt z.B. eine genomweite quantitative Methylierungsanalyse. Mit dem Infinium Methylation 27k Bead Chip werden mehr als 27.000 CpGs abgefragt, die Promoterregionen von etwa 14.000 Genen repräsentieren. Der Infinium Methylierungs-Assay beruht auf dem Prinzip, dass methyliertes und unmethyliertes Cytosin nach Bisulfit-Behandlung einen SNP (Single Nucleotide Polymorphism) darstellen. Der Chip enthält für jedes CpG zwei verschiedene Sonden, eine für das nicht konvertierte und eine für das konvertierte Cytosin. Nach der Proben-Hybridisierung erfolgt eine Single Base Extension mit unterschiedlich markierten ddNTPs. Die Methylierung eines CpGs wird dann durch Messung der von dem methylierten bzw. unmethylierten Allel emittierten Fluoreszenzintensitäten quantifiziert.

Zudem wäre es interessant, Histonmodifikationen wie z.B. die Trimethylierung von Lysin 4 im Histon H3 (H3K4, aktivierende Chromatin-Modifikation) und die H3K27-Trimethylierung (reprimierende Chromatin-Modifikation) der in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene in den Gewebeproben mit Hilfe der Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) und real-time PCR zu untersuchen. ChIP ist eine Methode zur Analyse der Assoziation von Proteinen mit spezifischen genomischen Regionen in intakten Zellen. Sie wird verwendet, um Veränderungen in epigenetischen Signaturen, der Chromatinstruktur und der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an bestimmten genomischen Positionen nachzuweisen. Eine Anreicherung von spezifischen Sequenzen zeigt, dass diese Sequenzen in vivo mit dem entsprechenden Protein bzw. Histonmodifikationen assoziiert sind.

Eine ebenfalls für weitere Untersuchungen geeignete Methode ist die Chromatin IP-Sequenzierung (ChIP-Seq). Diese Methode verbindet die ChIP mit Hochdurchsatzverfahren zur massiv parallelen Sequenzierung, um Protein-DNA-Interaktionen oder epigenetische Chromatin-Modifikationen auf genomweiter Ebene mit hoher Auflösung zu bestimmen. Dabei werden an die immunpräzipitierte DNA Oligonukleotid-Adapter gebunden und nach Größenselektion mit Hilfe eines Next Generation Sequencing-Geräts sequenziert.

Mittelfristig könnte zudem als weiterer Aspekt der Einfluss von Umweltfaktoren (z.B. Ernährung, Rauchen, Medikation) auf die epigenetischen Profile analysiert werden. Zudem könnten neue CED-Kandidatengene in CED-Mausmodellen validiert werden. Langfristig könnten erste epigenetische Therapieansätze ebenfalls im Mausmodell begonnen werden und mittels genspezifischer Analysen der validierten Kandidatengene überprüft werden.



## **5.2. Die Bedeutung embryonaler Stammzellen in der Medizin und die dahinter stehende Problematik**

Das früheste Embryonalstadium ist die Zygote. Spätere Stadien stellen die aus 8-16 Zellen bestehende Morula und die aus ca. 200 Zellen bestehende Blastocyste dar. Aus der inneren Zellmasse der Blastocyste entwickelt sich der Embryo, während sich aus den äußeren Zellen die Plazenta entwickelt. ESCs werden aus der inneren Zellmasse der Blastocyste gewonnen. Thomson et al. konnten im Jahre 1998 nachweisen, dass sich ESCs in vitro kultivieren lassen, ohne dass sie sich differenzieren. ESCs sind dafür bekannt, pluripotent zu sein; sie können mit Hilfe von bestimmten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in unterschiedliche Zelltypen ausdifferenziert werden. Diesem Aspekt kommt im Rahmen der Medizin natürlich eine besondere Bedeutung zu.

Die embryonale Stammzellforschung verfolgt zwei Ziele. Zum einen möchte man die Frage beantworten, wie und unter welchen Bedingungen sich Zellen zu spezifischen Zelltypen entwickeln. Dies könnte zur Klärung der spezifischen Prozesse der frühen Embryonalentwicklung führen und auch gleichzeitig die Grundlage sein, um herauszufinden, welche Abweichungen davon zu krankhaften Veränderungen führen. Ein weiteres Ziel der Stammzellforschung ist natürlich, Stammzellen zu nutzen um Erkrankungen zu heilen (Brewer, 2006).

Humane embryonale Stammzellen können auf unterschiedliche Art und Weise gewonnen werden. Zum einen ist es möglich, diese Zellen aus abgetriebenen Embryonen und Föten zu erhalten, zum anderen können sie auch aus Embryonen gewonnen werden, die durch künstliche Befruchtung erzeugt wurden, allerdings für eine Schwangerschaft nicht mehr benötigt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, diese Zellen durch therapeutisches Klonen zu gewinnen, bei dem das Erbgut einer somatischen Zelle eines Patienten in eine entkernte Eizelle transferiert wird. Durch die Übertragung des Erbguts in diese Eizelle wird der Zellkern reprogrammiert, wobei daraus wiederum totipotente Zellen

entstehen, die sich analog zu einer befruchteten Eizelle zur Blastocyste entwickeln. Die Entnahme der inneren Zellmasse und ihre Kultivierung führen zur Ausdifferenzierung von spezialisierten Zellen, die wiederum in den Patienten transplantiert werden können (Purves et al., 2006). Diese Methode hat den Vorteil, dass eine Abstoßungsreaktion nicht zu erwarten wäre. Ferner könnte man auf diese Weise auch Stammzellen von schwerkranken Patienten entnehmen und den Entstehungsmechanismus der Erkrankung erforschen.

Sowohl beim therapeutischen Klonen, als auch bei der Gewinnung embryonaler Stammzellen aus „überzähligen Embryonen“ werden Embryonen zerstört, was natürlich ein großes ethisches Problem darstellt und auch der Grund dafür ist, dass diese Methoden in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz untersagt sind. Ausschließlich die Gewinnung dieser Stammzellen aus abgetriebenen Föten ist unter bestimmten Bedingungen zugelassen (Brewer, 2006). Die Verwendung von embryonalen Stammzellen zu therapeutischen Zwecken birgt allerdings auch noch ein weiteres Problem. Die ausdifferenzierten Zellen und der Empfänger sind - sofern kein therapeutisches Klonen stattgefunden hat - genetisch verschieden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass durch das Immunsystem des Empfängers eine Abstoßungsreaktion hervorgerufen wird. Ideal für eine Zellersatztherapie wäre also die Möglichkeit, adulte Stammzellen eines Patienten zu entnehmen, diese dann in den benötigten Zelltyp zu differenzieren und dann wieder in den Patienten zu transplantieren.

### **5.2.1. Adulte Stammzellen als Hoffnungsträger der Medizin**

Die auch gewebespezifische Stammzellen genannten adulten Stammzellen können einzelne Gewebe- und Organsysteme bilden und sind ebenfalls dadurch gekennzeichnet, dass sie sich selbst erneuern können.

Die Fähigkeit von Zellen zur Selbsterneuerung ist in der Natur unterschiedlich stark ausgeprägt. Während bei Säugetieren nur bestimmte Gewebe wie das Darmepithel oder die Haut permanent regeneriert werden, können bei niederen Tieren wie Planarien und Amphibien sogar ganze Körperteile nachwachsen. Adulte Stammzellen können zugrundegegangene Zellen ersetzen. Da die adulten Stammzellen dennoch ein eingeschränktes Differenzierungspotential aufweisen, werden diese als multipotente Zellen bezeichnet (Bartram et al., 2006).

Adulte Stammzellen werden bereits in der Medizin eingesetzt, da sie isoliert werden können und auf andere Individuen übertragen werden können. Dies geschieht zum Beispiel bei der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark zur Heilung von Bluterkrankungen. Der Vorteil adulter Stammzellen liegt darin, dass sie den Patienten entnommen werden können, ohne dass ethische Bedenken vorherrschen und spätere Abstoßungsreaktionen zu erwarten wären. Der Einsatz dieser Zellen würde allerdings nur dann einen Sinn ergeben, wenn sie zur Heilung von Erkrankungen eingesetzt würden, die nicht einen genetischen Hintergrund aufweisen. Ferner muss in Betracht gezogen werden, dass auch adulte Stammzellen im Laufe der Zeit altern und somit möglicherweise alterungsbedingten Schäden aufweisen (Bartram et al., 2006).

### **5.2.2. Spermatogoniale Stammzellen und ihre Bedeutung in der medizinischen Forschung**

Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) sind für die kontinuierliche Spermienbildung im männlichen Organismus verantwortlich. Sie sind in der Peripherie der Tubuli seminiferi lokalisiert und durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung gekennzeichnet.

Es konnte bereits mehrmals gezeigt werden, dass murine SSCs zu multipotenten ES-ähnlichen Zellen differenziert werden können. Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung, da diese Zellen in der regenerativen Medizin eine wichtige Rolle spielen können (Kanatsu-Shinohara et al., 2004, Guan et al., 2006, Seandel et al., 2007 und Izadyar et al., 2008).

SSCs haben im Vergleich zu den restlichen Stammzellen einen deutlichen Vorteil: Da die DNA in Keimbahnzellen konserviert vorliegt, sollten keine oder zumindest weniger alterungsbedingte Schäden als in anderen Stammzellen vorliegen. Dementsprechend sind SSCs in den Focus der medizinischen Forschung gerückt. Wenn es gelingen würde, humane adulte Keimbahnstammzellen zu isolieren und diese ebenfalls so zu kultivieren, dass sie die Eigenschaften von humanen ES-Zellen annehmen, wären sie eine geeignete Alternative für humane ES-Zellen.

Auf den ersten Blick scheinen ESCs und aus SSCs hervorgegangene ES-Zell-ähnliche Zellen (maGSCs) einander sehr ähnlich zu sein. Beide Zelltypen unterschieden sich kaum in ihrer Morphologie, können multizelluläre Kolonien bilden und Pluripotenzmarker-Gene exprimieren wie zum Beispiel *Oct4*. Durch den Entzug von dem Wachstumsfaktor LIF differenzieren sich beide Zelltypen in die Derivate von Ento-, Ecto- und Mesoderm. Eine weitere Gemeinsamkeit ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Chimären nach ihrer Injektion in Blastocysten. Ferner bilden beide Zelltypen nach ihrer subkutanen Injektion in Mäusen Teratome (Guan et al., 2006).

### **5.2.3. Die Generierung spermatogonialer Stammzellen**

Die Generierung spermatogonialer Stammzellen wurde in der Literatur bereits mehrmals beschrieben.

Kanatsu-Shinohara et al. ist es erstmals im Jahre 2004 gelungen, SSCs aus Testes neonataler Mäuse zu isolieren (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). In Testes neugeborener Mäuse sind nur frühe Spermatogonien und somit auch SSCs vorzufinden, weshalb auf diese Weise bereits eine Anreicherung dieser nur in einem geringen Prozentsatz vorhandenen Zellen erreicht wurde. Die isolierten Zellen wurden unter ES-Zell-Kulturbedingungen und mit GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) kultiviert. GDNF wird in vivo von Sertolizellen produziert, ist als wichtiger Wachstumsfaktor bekannt und bewirkt sowohl die Proliferation als auch die Selbsterneuerung von SSCs. Durch diese Kultivierung war es möglich, ES-Zell-ähnliche Zelllinien zu generieren. Diese auch mGSC (multipotent germline stem cells) genannten ES-Zell-ähnlichen Zellen wurden näher auf pluripotente Kriterien untersucht. Es

konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Zellen *in vitro* zu Derivaten der drei Keimblätter differenzieren können. Die subkutane Injektion dieser mGSCs in Mäuse führte nach vier Wochen zur Teratom-Bildung. Ein Teratom (gr. *teras*, *teratos* = Schreckensbild, Ungeheuer; -om = Geschwulst) ist ein Keimzelltumor, der aus Anteilen der drei Keimblätter besteht. Die Injektion der mGSCs in Blastocysten brachte Chimären hervor (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

Im Jahre 2006 ist es erstmals Forschern aus Göttingen gelungen, SSCs aus dem Hoden adulter Mäuse zu isolieren (Guan et al., 2006). Dies ist insofern von großer Bedeutung, da der Einsatz von adulten Stammzellen im menschlichen System wahrscheinlicher ist. Guan et al. generierten eine transgene Maus, die in einem Fusionskonstrukt, EGFP unter der Kontrolle des *Stra8*-Promotors exprimiert. Die Expression von *Stra8* ist auf prämeiotische Stadien der Spermatogenese beschränkt, so dass aus dem Hoden dieser transgenen Mäuse über die EGFP-Expression die Keimzellen der prämeiotischen Stadien mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) isoliert bzw. angereichert werden konnten. Die anschließend Kultivierung dieser Zellen unter Standardbedingungen für ES-Zellen führte dazu, dass sie sich zu ESC-ähnlichen Zellen entwickelten und dementsprechend „multipotent adult germline stem cells“ (maGSCs) genannt wurden. Diese maGSCs konnten *in vitro* zu allen möglichen Zelltypen ausdifferenziert werden, darunter auch Kardiomyocyten, Skelettmuskelzellen, Nervenzellen und Bauchspeicheldrüsenzellen. Ferner exprimieren diese Zellen Pluripotenzmarkergene und brachten nach der Injektion in Blastocysten ebenfalls Chimären hervor (Guan et al., 2006). Diese Ergebnisse konnte im Jahre 2007 durch Seandel et al. bestätigt werden (Seandel et al., 2007).

Später wurde eine weitere Arbeit veröffentlicht, in welcher die Generierung von pluripotenten Zelllinien aus SSCs beschrieben ist. Die Arbeitsgruppe um Fariborz Izadyar veröffentlichte im Jahre 2008 eine Arbeit, in welcher die Generierung von pluripotenten Zelllinien aus SSCs beschrieben wurde (Izadyar et al., 2008). Zur Isolierung von SSCs wurde zunächst eine transgene Maus generiert, die EGFP unter der Kontrolle des Keimbahn-spezifischen *Oct4*-Promotors exprimiert. Anschließend konnte aus der testikulären Suspension von neugeborenen Mäusen 4-10% EGFP<sup>+</sup>-Zellen und aus adulten Mäusen 0,01-0,05% EGFP<sup>+</sup>-Zellen angereichert werden. In Kultur verloren die Zellen zunächst innerhalb weniger Tage die EGFP-Expression. Erst nach einer drei bis vier Wochen langen Kultivierung unter ES-Zellbedingungen erlangten sie wieder die EGFP-Expression, was für eine Reprogrammierung und somit für eine neu erworbene Pluripotenz dieser Zellen spricht. Neben der *Oct4*-abhängigen EGFP-Expression wurde auch noch die Expression eines weiteren Gens zur Isolierung von SSCs verwendet: das *c-Kit*-Gen. *c-Kit* wird auch als Stammzellfaktor-Rezeptor bezeichnet und codiert für einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der von seinem Liganden SCF (Stammzellfaktor) aktiviert werden kann (De Miguel et al., 2002). Dieser Rezeptor ist in der Zellmembran verschiedener Körperzellen lokalisiert, spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen und ist dementsprechend auch in die Spermatogenese involviert. *c-Kit* kann im postnatalen Testis als Marker für die Differenzierung von TypA-Spermatogonien verwendet werden (Schrans-Stassen et al., 1999).

Izadyar et al. konnten nur aus EGFP<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>-Zellen pluripotente Zelllinien generieren. Diese Zelllinien erfüllen alle Kriterien für die Pluripotenz, konnten allerdings keine Teratome bilden (Izadyar et al., 2008). Die mGC-Zellkolonien (multipotent germ cells) exprimierten die Pluripotenzmarkergene *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Dppa5*, *Rex1*, *eRas* und *Crypto*. Dennoch ist die Expression dieser Gene in mGCs 1000 bis 5000 mal geringer als in ESCs. Auch eine Expression von Onkogenen (*p53*, *Eras*, *Bak*, *Int2* und *c-myc*) konnte nachgewiesen werden, die allerdings ebenfalls deutlich geringer als in ESCs ist. Ferner wurden auch noch die Methylierungsmuster von geprägten Genen in mGCs vor und nach der Kultivierung untersucht und mit den Methylierungsmustern von ESCs verglichen. Interessanterweise veränderten sich die Methylierungsmuster der DMRs in den getesteten mGCs nicht. Die mGCs zeigten zu 100% ein androgenetisches Methylierungsmuster, während die ESCs nur ein partielles androgenetisches Imprintingmuster zeigten. Um die Funktionalität der isolierten Zellen zu untersuchen, wurde ein SSC-Transplantations-Assay durchgeführt. EGFP<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>-Populationen konnten nach der Transplantation in Testes keine Spermatogenese neu initiieren, während EGFP<sup>+</sup>/c-Kit<sup>-</sup>-Populationen dazu in der Lage waren. Aus diesen Zellpopulationen konnten allerdings keine pluripotenten Zelllinien generiert werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es innerhalb der Spermatogonien verschiedene Zellpopulationen oder aber unterschiedliche Entwicklungsstadien dieser Stammzellen gibt (Izadyar et al., 2008).

Die von Izadyar et al. (2008) generierten Zelllinien scheinen im Allgemeinen mehr Keimzelleigenschaften (87% Übereinstimmung) als ES-Zelleigenschaften (65% Übereinstimmung) aufzuweisen. Dafür spricht vor allem die Tatsache, dass das Expressionsniveau von Keimzell-spezifischen Genen (*Vasa*, *Plzf*, *Gfra1*, *Dazl*) recht hoch war, während die Expression von Pluripotenzmarkergenen (*Oct4*, *Nanog*, *Dppa5*, *Sox2*, *Crypto*) gering war. Ferner sprachen diese Zellen mehr auf GDNF als auf LIF an. GDNF spielt eine essentielle Rolle bei der Selbsterneuerung von männlichen Keimzellen, während LIF für die Selbsterneuerung von ESCs essentiell ist. Auch das androgenetische Methylierungsmuster der geprägten Gene zeigt die immer noch bestehende Ähnlichkeit mit männlichen Keimzellen (Izadyar et al., 2008).

### **5.3. Vergleichende Methylierungsanalyse von ESC- und maGSC-Zelllinien**

#### **5.3.1. Die Methylierungsanalysen der gesicherten bzw. putativen Pluripotenzmarkergene**

Für die gesicherten bzw. putativen Pluripotenzmarkergene *Nanog*, *Oct4*, *Lrrc34* und *Stra8* wurde die Methylierung der Promotoren untersucht. Bei *Stra8* wurde zusätzlich noch eine putative regulatorische Region im zweiten Intron analysiert.

Im undifferenzierten Zustand zeigten alle maGSC-Zelllinien und ESC-Zelllinien für die Gene *Nanog*, *Oct4* und *Lrrc34* wie erwartet eine deutliche Hypomethylierung (< 20%). Eine niedrige Methylierung korreliert mit einer hohen Aktivität der Promotoren, was wiederum für eine ausgeprägte Pluripotenz spricht.

Eine Zelldifferenzierung geht einher mit dem Verlust der Pluripotenz, was wiederum bedeutet, dass die Methylierung ansteigen sollte. Dies konnte sowohl bei den maGSC- als auch bei den ESC-Zelllinien beobachtet werden. Nach der zwanzig Tage langen Induktion mit Retinsäure wurde die Promotormethylierung der Pluripotenzgene *Nanog*, *Oct4* und *Lrrc34* erneut getestet. Auch hier waren die Ergebnisse wie erwartet: Es war ein deutlicher Anstieg der Methylierung zu verzeichnen. In allen Zelllinien steigt die Methylierung auf Werte zwischen 40% und 75%. Diese Werte sind mit dem ermittelten Wert von 60% für die bereits differenzierten embryonalen Mausfibroblasten vergleichbar.

*Oct4* und *Nanog* spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Zellen (Nichols et al., 1998, Mitsui et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass beide Gene in pluripotenten Zellen wie ES-Zellen und iPS-Zellen exprimiert werden und während der Differenzierung dieser Zellen runterreguliert werden (Nichols et al., 1998; Mitsui et al., 2003; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Die Runterregulation von beiden Genen ist im Allgemeinen mit einem Übergang ihrer Promotoren von einem hypomethylierten zu einem hypermethylierten Zustand assoziiert (Farthing et al., 2008). Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde, dass die *Oct4*- und *Nanog*-Promotoren in undifferenzierten maGSCs und ESCs stark hypomethyliert sind und in differenzierten maGSCs und ESCs runterreguliert werden, also hypermethyliert sind, stimmen somit sehr gut mit den Literaturbefunden überein

und unterstreichen die Pluripotenz von maGSCs (Guan et al., 2006; Seandel et al., 2007; Izadyar et al., 2008).

Die Annahme, dass *Lrrc34* und *Stra8* möglicherweise neue Pluripotenzgene darstellen, basiert auf Experimenten der AG von Prof. Dr. Engel, die mittels Microarray-Expressionsanalyse eine Herunterregulation von beiden Genen im Zuge der Differenzierung von ESCs und maGSCs festgestellt haben. Dementsprechend wurde für die beiden Gene erwartet, dass ähnlich wie bei *Oct4* und *Nanog* die untersuchten regulatorischen Regionen in undifferenzierten Zellen eine Hypomethylierung und in differenzierten Zellen eine Hypermethylierung aufweisen. Die Tatsache, dass die Promotermethylierung des putativen Pluripotenzgens *Lrrc34* in undifferenzierten und differenzierten maGSCs und ESCs sehr stark der Promotermethylierung von *Oct4* und *Nanog* ähnelt, unterstützt somit die Annahme, dass es sich bei *Lrrc34* tatsächlich um ein neues Pluripotenzgen handelt. Die Ergebnisse für *Stra8* sprechen hingegen nicht dafür, dass es sich bei diesem Gen um ein Pluripotenzmarkergen handelt. Im undifferenzierten Zustand konnte sowohl für die maGSC- als auch für die ESC-Zelllinien mit Werten zwischen 23,8% und 68% keine Hypomethylierung festgestellt werden. Die Induktion der Zelldifferenzierung mit Retinsäure führte auch nicht zum erwarteten Anstieg der Methylierung. Bei maGSC *Stra8* konnte sogar ein Rückgang der Methylierung von 68% auf 61,5% festgestellt werden. Bei ESC *Stra8* blieb die Methylierung unverändert. Allein maGSC 129/Sv zeigt im undifferenzierten Zustand eine Methylierung von 23,8% und nach der Differenzierung einen Anstieg auf etwa 42%. Da diese Werte nicht mit den Erwartungen übereinstimmten, wurde entschieden, zusätzlich noch die Methylierung in einer putativen regulatorischen Region im zweiten Intron zu untersuchen. Allerdings konnten auch hier nicht die gewünschten Ergebnisse erzielt werden. Im undifferenzierten Zustand zeigte keine Zelllinie eine Hypomethylierung (alle Werte lagen über 40% Methylierung). Die Induktion mit Retinsäure führte ebenfalls nicht zu einem Anstieg der Methylierung. Bei maGSC *Stra8* sank sogar die Methylierung von 65,5% auf 57%. Bei den anderen Zelllinien kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Methylierung während der Differenzierung mit Retinsäure.

In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass im Intron 2 nicht die ursprünglich vorgesehene putative regulatorische Region untersucht werden konnte, da die CpG-Dichte in diesem Bereich das Design eines geeigneten Bisulfit-Pyrosequencing-Assays unmöglich machte. Die stattdessen untersuchte Region im Intron 2 liegt ca. 200bp von der ursprünglich vorgesehenen Region entfernt. Da in einem Abstand von 200bp durchaus unterschiedliche Methylierungsmuster vorliegen können, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die ursprünglich vorgesehene Region die für ein Pluripotenzgen erwarteten Methylierungsmuster aufweist. Um dies zu überprüfen, könnte eine klassische Bisulfit-Sequenzierung dieser Region durchgeführt werden.

### **5.3.2. Die Methylierungsanalysen der geprägten Gene**

Im Rahmen von Vorarbeiten wurden die differentiell methylierten Regionen der vier geprägten Gene *H19*, *Meg3*, *Igf2r* und *Snrpn* untersucht. Es konnte dabei generell festgestellt werden, dass in den maGSCs eine geringere Methylierung als in den ESCs

vorlag. Dabei wiesen die paternal methylierten Gene eher eine moderate Hypomethylierung auf, während die maternal methylierten Gene eine starke Hypomethylierung zeigten. Diese Ergebnisse stimmen mit den bereits veröffentlichten Daten über die mGSCs von Kanatsu-Shinohara et al. überein (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Kanatsu-Shinohara et al. untersuchten die Methylierung der DMRs von drei paternal methylierten (*H19*, *Meg3*, *Rasgrf1*) und zwei maternal methylierten (*Igf2r*, *Peg10*) Genen. Dabei wurde wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die DMRs in ESCs generell stärker methyliert sind als in mGSCs. So waren *H19*, *Meg3* und *Rasgrf1* in mGSCs in unterschiedlichem Ausmaß methyliert, während *Igf2r* und *Peg10* nur selten methyliert waren. Die neuere Studie von Izadyar beobachtete hingegen komplett androgenetische Imprintingmuster in von SSCs abstammenden ES-Zell-ähnlichen Zellen und nur partiell androgenetische Muster in ESCs (Izadyar et al., 2008). In ES-Zell-ähnlichen Zellen konnten Izadyar et al. eine starke Hypermethylierung von *Rasgrf1* und *Meg3* und eine starke Hypomethylierung von *Igf2r* und *Peg10* nachweisen, während sie in ESCs für *Meg3* und *Igf2r* ein somatisches Imprintingmuster, für *Rasgrf1* und *Peg10* jedoch eine starke Hypomethylierung feststellen konnten (Izadyar et al., 2008). In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass sich die maGSCs und auch andere aus SSCs hervorgegangene ES-Zell-ähnlichen Zellen von den primordialen Keimzellen (PGCs) ableiten.

Die PGCs stammen von Epiblastenzellen ab. Sie migrieren 8,5 Tage nach der Befruchtung in Richtung Genitalleiste, die sie am Tag 10,5-11,5 nach der Befruchtung (days post coitum, dpc) auch erreichen. Zu diesem Zeitpunkt tragen die PGCs noch die epigenetischen Markierungen, die zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 dpc entfernt werden

(Hajkova et al., 2002, Yamazaki et al., 2003). Anschließend erfolgt die erneute Etablierung der Methylierungsimprints. Dies geschieht in der männlichen Keimbahn zu einem früheren Zeitpunkt als in der weiblichen Keimbahn. Die de novo-Methylierung findet in der männlichen Keimbahn zwischen 15,5 und 18,5 dpc statt (Coffigny et al., 1999). Da alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten maGSCs für die geprägten Gene eine geringere Methylierung als die untersuchten ESCs aufweisen, kann man davon ausgehen, dass maGSCs von Keimzellen abstammen, deren Methylierungsimprints bereits entfernt wurden und die bereits mit der Etablierung von neuen paternalen Methylierungsimprints begonnen haben.

Ferner konnte beobachtet werden, dass die Zelllinie maGSC Stra8 generell eine höhere Methylierung zeigte als die anderen hier untersuchten maGSCs und die von Kanatsu-Shinohara et al. (2004) generierten mGSCs. Dies gilt sowohl für die maternal als auch für die paternal geprägten Gene. Der Methylierungsstatus von maGSC Stra8 ist mit dem von ESC Stra8 vergleichbar. Interessanterweise weisen beide Zelllinien denselben gemischten genetischen Hintergrund FVB/C57BL6/129Sv auf. Ferner sind diese Zelllinien transgen für ROSA26 und Stra8-EGFP. Es kann darüber spekuliert werden, dass der gemischte genetische Hintergrund und /oder das Vorhandensein der beiden Transgene förderlich für die Reprogrammierung von SSCs und die Etablierung von maGSCs mit balancierten somatischen Imprintingmustern ist.



Es wurden zwei paternal (*Meg3* und *H19*) und zwei maternal (*Igf2r* und *Snrpn*) geprägte (methylierte) Gene untersucht. Maternal geprägte Gene sind in Oocyten vollständig methyliert und in Spermien demethyliert. Paternal geprägte Gene sind in Spermien vollständig methyliert und in Oocyten demethyliert. In diploiden somatischen Zellen beträgt die Methylierung dementsprechend 50%, da jeweils ein paternales und ein maternales Allel vorhanden sind (Lucifero et al., 2002).

Die untersuchten maGSCs-Zelllinien stammen wie bereits erwähnt von PGCs ab. Es handelt sich hierbei immer noch um diploide Zellen, da noch keine Reifeteilung stattgefunden hat. Durch die Induktion der Differenzierung mittels Retinsäure sollten somatische Zellen entstehen, die entsprechend sowohl für die paternal, als auch für die maternal geprägten Gene möglichst somatische Imprintingmuster aufweisen. Die ESCs sollten idealerweise sowohl vor als auch nach der Retinsäurebehandlung ein somatisches Methylierungsmuster aufweisen.

Für die paternal methylierten Gene *Meg3* und *H19* konnte im Laufe der Differenzierung bei den maGSCs auch tatsächlich ein Anstieg der Methylierung zu einem somatischen Imprintingmuster festgestellt werden. Bei maGSC Stra8 stieg die Methylierung im *Meg3*-Locus auf 65,25% und für maGSC 129/Sv auf 57% an. Auch bei den ESCs konnte nach der Differenzierung ein somatisches *Meg3*-Imprintingmuster festgestellt werden (63,4% bei ESC Stra8 und 51% ESC 129/Sv). Bei *H19* konnte man ebenfalls für maGSC Stra8 einen Anstieg der Methylierung auf 57% feststellen. Für maGSC 129/Sv war allerdings nur ein Methylierungsanstieg auf 34% zu erkennen. Zudem war auffällig, dass bei ESC 129/Sv ein Rückgang der Methylierung auf 42,5% vorlag.

Bei dem maternal geprägten Gen *Igf2r* konnte vor der Differenzierung eine starke Hypomethylierung der maGSCs festgestellt werden. Im Zuge der Differenzierung wurde ein Anstieg der Methylierung beobachtet, der zu einer moderaten Hypomethylierung sowohl in maGSC Stra8 (41%) als auch in maGSC 129/Sv (13%) führte. Bei ESC 129/Sv wurde allerdings für *Igf2r* ähnlich wie bei *H19* ein Rückgang der Methylierung gefunden, so dass mit 24% eine moderate Hypomethylierung nachweisbar war.

Bei *Snrpn* konnte ein minimaler Anstieg der Methylierung von 7% auf 14% nur bei maGSC 129/Sv beobachtet werden. In ESC Stra8 blieb die Methylierung unverändert, während bei maGSC Stra8 und ESC 129/Sv ein Rückgang der Methylierung feststellbar war.

In diesem Zusammenhang wurde eine weitere Studie veröffentlicht, die den Methylierungsstatus verschiedener geprägter Gene (*Igf2r*, *p57Kip2*, *Lit1*, *Snrpn*, *H19* und *Igf2*) in ebenfalls von PGCs abstammenden embryonalen Keimzelllinien (EGCs) und ESCs vor und nach der Differenzierung analysierte (Shovlin et al., 2007). Untersucht wurden dabei zwei männliche und zwei weibliche EG-Zelllinien, sowie eine ES-Zelllinie. Um die Differenzierung herbeizuführen, wurden die Zellen in Abwesenheit von LIF kultiviert. Innerhalb von zwei Tagen entwickelten sich Zellverbände. Derartige Zellverbände werden auch als „Embryoid-Körper“ (embryoid bodies, EB) bezeichnet. Nach weiterer Kultivierung

wurde anschließend mittels Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen die Derivate der drei Keimblättern überprüft, ob auch tatsächlich eine Differenzierung stattgefunden hat. Anschließend wurde die Methylierungsanalyse durchgeführt. Unter den vier getesteten EG-Zelllinien konnte für *Igf2r*, *Lit1* und *Snrpn* nur bei der männlichen Zelllinie 2M ein Anstieg der Methylierung zu einem somatischen Methylierungsmuster nachgewiesen werden. Allerdings zeigten alle differenzierten Zelllinien, ebenso wie die ES-Zelllinie einen Methylierungsanstieg für *H19*.

Zusammengefasst belegen diese Daten, dass die Differenzierung zumindest bei einigen maGSC- und EG-Zelllinien zu einer Etablierung von somatischen Methylierungsmustern und somit zu einem balancierten Imprinting führt.

### **5.3.3. Der Methylierungsstatus der Pluripotenz-assoziierten miRNA-Gene bei murinen ESCs und maGSCa**

Bei MicroRNAs (miRNAs) handelt es sich um einzelsträngige, etwa 22 Nucleotide lange nichtkodierende RNA-Moleküle, die bei der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielen. Es wird geschätzt, dass etwa 30% des menschlichen Genoms durch miRNAs reguliert werden. Es ist bekannt, dass miRNA-Gene im Genom geclustert vorliegen und entweder in Introns oder Exons von Genen oder aber auch zwischen den codierenden Bereichen lokalisiert sind. Die Transkription der miRNAs erfolgt in der Regel durch die RNA-Polymerase II. Dadurch entstehen bis zu mehrere Kilobasen lange primäre RNAs (priRNA), die bereits im Zellkern durch die RNase Drosha zu pre-miRNAs gespalten werden. Ein pre-miRNA ist in der Regel um 70 Nucleotide lang und wird mit Hilfe des Enzyms Exportin-5 in das Cytosol transloziert, wo sie wiederum durch das Enzym Dicer zu einem etwa 21 Nucleotide langen Zwischenprodukt prozessiert wird. Durch die Inkorporierung von diesem Zwischenprodukt in den RISC (RNA induced Silencing Complex) entsteht die mature miRNA, die wiederum den RISC zur komplementären Ziel-mRNA leitet. Die miRNA bindet an die mRNA und der Grad der Komplementarität entscheidet, ob die mRNA degradiert wird oder ob es zu einer Inhibierung der Translation kommt. In eukaryotischen Zellen ist die Komplementarität meistens nicht perfekt, wodurch eine miRNA bis zu hunderte mRNAs regulieren kann.

Es ist bekannt, dass miRNAs bei diversen biologischen Prozessen wie beispielsweise der Embryonalentwicklung und der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Auch bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und bei der Differenzierung von Zellen sind sie wichtige Regulatoren. Gerade die *miRNA-290* und *-302*-Cluster scheinen Pluripotenz-assoziierte miRNAs darzustellen.

Das *miR-290*-Cluster wird in murinen ESCs stark exprimiert, während sie bei der Differenzierung dieser Zellen wieder herunterreguliert werden. Die Göttinger Arbeitsgruppe konnte in der Studie von Zovoilis et al. zeigen, dass das *miR-302*-Cluster während der ersten Differenzierungsstadien von ESCs hochreguliert wird (Zovoilis et al., 2008). Ferner konnten diese Studie nachweisen, dass auch maGSCs diese miRNA-Cluster exprimieren und ähnliche Expressionslevel wie ESCs aufweisen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Methylierungsstatus der Promotoren des *miR-290*-Genclusters und des *miR-302*-Genclusters in undifferenzierten und differenzierten ESCs und maGSCs untersucht und mit der Promotormethylierung der Pluripotenzmarkergene *Nanog* und *Oct4* verglichen. Dabei wurde die Differenzierung in diesem Fall nicht durch RA erreicht sondern durch die Kultivierung dieser Zellen auf Gelatine (10d, in Abwesenheit von LIF und MEFs). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Promotoren der miRNAs ebenso wie die Promotoren der Pluripotenzmarkergene *Oct4* und *Nanog* in undifferenzierten ESCs und maGSCs eine starke Hypomethylierung aufweisen, wobei maGSCs im Vergleich zu ESCs eine etwas höhere Methylierung aufweisen. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Gene in undifferenzierten ESCs und maGSCs exprimiert werden. Nach der zehn Tage langen Kultivierung dieser Zellen auf Gelatine, wurden die Promotormethylierung erneut gemessen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass bei ESCs die Promotormethylierung von *Oct4*, *Nanog* und *miR-290* wie erwartet ansteigt, wodurch die Expression dieser Gene herunterreguliert wird. Die Promotormethylierung von *miR-302* stieg allerdings nicht an, was allerdings zu erwarten war, da die Gene dieses Clusters im Zuge der ersten Differenzierungsstadien hochreguliert werden. Folglich leiten die ESCs bereits an Tag 10 der Differenzierung die Herunterregulierung von Pluripotenz-assoziierten Genen ein, während maGSCs unter diesen Kultivierungsbedingungen in der Lage sind, ihre Pluripotenz länger aufrecht zu erhalten. Diese Ergebnisse konnten durch die Göttinger Arbeitsgruppe mittels qRT-PCR bestätigt werden: In ESCs findet nach der in vitro Differenzierung eine sehr frühe Herunterregulierung von *miR-290* und *Oct4* statt, während in maGSCs keine verminderte Expression festgestellt werden konnte.

Auch wenn sich ESCs und maGSCs im undifferenzierten Zustand nicht signifikant unterschieden, zeigen sie unter Differenzierungsbedingungen nicht nur bei der DNA-Methylierung von geprägten Genen Unterschiede (Zechner,...,Wolf et al., 2009). Die hier produzierten Ergebnisse zeigen, dass in maGSCs der Reprogrammierungsprozess zu einem ESC-ähnlichen Zustand nicht alle Keimzell-Eigenschaften dieser Zellen entfernt. Diese bemerkenswerten Eigenschaften von maGSCs könnten unter anderem auf das *miR-290*-Expressionsmuster während der Differenzierung zuführen sein, da der spezifische Expressionslevel natürlich einen Einfluss auf das Differenzierungspotential dieser Zellen hat. Zovoilis et al. konnten bereits nachweisen, dass die anhaltende Expression des *miR-290*-Clusters mit höheren *Oct4*-Leveln korreliert. Dementsprechend zeigen maGSCs trotz Differenzierungsbedingungen eine Aufrechterhaltung der *Oct4*-Expression. Interessanterweise führt eine künstlich erzeugte abnorm hohe Expression des *miR-290*-Clusters auch in ESCs zu einem Ausbleiben der Differenzierung. Überdies zeigen maGSCs trotz ihrer Reprogrammierung in einen ESC-ähnlichen Zustand im Vergleich zu ESCs auch deutlich höhere Expressionslevel von Keimzellmarkergenen, wie *Dppa-3*. Trotz Reprogrammierung sind also maGSCs in der Lage, die Expression von Keimzellmarkern aufrecht zu erhalten. Zudem wurde beobachtet, dass es eine Korrelation zwischen dem *miR-302*-Level und der Expression von Keimzellmarkern gibt (Zovoilis,...,Wolf et al., 2010). Je höher die Expression des *miR-302*-Clusters ist, desto geringer ist die Expression von Keimzellmarkergenen wie *Dppa-3* oder *Stra8*. Auch bei ESCs kann dies beobachtet werden: Obwohl die Expression des *miR-302*-Clusters in differenzierten ESCs bereits hoch und die Expression von *Dppa-3* entsprechend niedrig ist, führt eine weitere Steigerung der

Expression des *miR-302*-Clusters zu einem noch stärkeren Absinken des *Dppa-3*-Levels (Zovoilis,...,Wolf et al, 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz Reprogrammierung der maGSCs in einen ESC-ähnlichen Zustand der Keimzell-Hintergrund dieser Zellen noch nachgewiesen werden kann.

#### **5.4. Zum Potential von maGSCs: ihre *in vitro* Differenzierung zu haploiden Keimzellen**

Um das Potential von maGSCs in der Stammzellforschung noch stärker zu verdeutlichen, sollte auch noch erwähnt werden, dass maGSCs *in vitro* zu haploiden Keimzellen differenziert werden können.

Es wurden bereits verschiedene Strategien verwendet, um aus pluripotenten Stammzellen männliche Gameten zu differenzieren. So konnten Toyooka et al im Jahr 2003 aus murinen ESCs primordiale Keimzellen generieren, die nach Kultivierung und anschließender Transplantation in Tubuli seminiferi Spermien-ähnliche Zellen hervorbrachten. Die Injektion dieser Spermien-ähnlichen Zellen in Oocyten führte zur Entwicklung von Blastocysten. Nayernia et al. (2006) zeigten, dass aus ESCs SSCs etabliert werden können, die wiederum zu haploiden Gameten differenziert werden können. Die intracytoplasmatische Injektion dieser Gameten in Oocyten führte sogar zur Entwicklung von lebensfähigen Mäusen, die allerdings Wachstumsstörungen und abnormale Methylierungsimprints aufwiesen.

Die Arbeitsgruppe um Nolte et al zeigte, dass auch aus maGSCs haploide Keimzellen generiert werden können (Nolte,..., Wolf et al., 2010). Dafür wurden SSC-Zelllinien verwendet, die aus *Stra8-EGFP/ROSA26-LacZ*-Mäusen aufgrund morphologischer Kriterien isoliert wurden bzw.. Diese doppelt transgenen Zelllinien wurden anschließend zusätzlich mit dem postmeiotischen *Prm1-DsRed*-Konstrukt transfiziert. Die transfizierten Zelllinien wurden dann auf Gelatine ohne LIF kultiviert und anschließend mit Retinsäure induziert. Nach 24h bis 7d konnten *DsRed*-exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen hatten demzufolge die Meiose durchlaufen und waren somit haploid.

Während der Differenzierung der maGSCs zu haploiden Keimzellen wurden die Methylierungsmuster von geprägten Genen mittels klassischer Bisulfit-Sequenzierung in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Zechner getestet (Nolte,..., Wolf et al., 2010). Die Gene *H19*, *Igf2r* und *Snrpn* zeigten nach RA-Induktion zunächst eine Abnahme der Methylierung und stark hypomethylierte ICRs, was auf eine korrekte Entfernung der Methylierungsimprints im Rahmen einer Keimbahnreprogrammierung dieser Zellen hinweist. Die im Zuge der weiteren Differenzierung entstandenen haploiden Zellen aus dem Überstand wiesen weiterhin eine starke Hypomethylierung der ICRs von *Igf2r* und *Snrpn* auf, was dem typischen Methylierungsmuster dieser beiden ICRs in reifen Spermien entspricht. In der *H19*-ICR war hingegen in den haploiden Zellen aus dem Überstand eine für die männliche Gametogenese typische Reetablierung der Methylierung zu beobachten. Dabei wurde allerdings nicht die für Spermien typische vollständige Methylierung der *H19*-ICR sondern nur Methylierungswerte von rund 40% reetabliert. Dieser Befund spricht dafür, dass nur einige aber nicht alle Methylierungsimprints der *H19*-ICR während der Differenzierung zu haploiden Keimzellen korrekt etabliert wurden.

## **5.5. Perspektiven der Stammzellforschung**

Die Transplantationsmedizin hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, so dass Organ- und Gewebetransplantationen mittlerweile zu Routineverfahren geworden sind. Der Mangel an Spenderorganen und -geweben, die damit verbundenen langen Wartezeiten und die möglichen Abstoßungsreaktionen stellen dabei allerdings immer wiederkehrende Probleme dar.

Die neuen Entwicklungen aus der Stammzellforschung könnten dazu führen, dass genau diese Probleme umschifft werden, denn die Option, pluripotente und gewebespezifische Stammzellen *in vitro* zu vermehren und zu differenzieren, könnte es ermöglichen, die unterschiedlichsten Gewebe in größerer Zahl zu erzeugen. Die Stammzellforschung gilt somit als potentielle Schlüsseltechnologie der regenerativen Medizin.

Shinya Yamanaka gelang dabei im Jahr 2006 der Durchbruch. Er schleuste mit Hilfe eines veränderten Virus die Gene *c-Myc*, *Klf-4*, *Oct-4* und *Sox-2* in murine Hautzellen und versetzte sie auf diese Art und Weise in den pluripotenten Status (Takahashi et al, 2006). Diese nunmehr pluripotenten Stammzellen, auch induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) genannt, sind also aus einer nicht-pluripotenten somatischen Zelle hervorgegangen. Für diese Entdeckung erhielt Shinya Yamanaka im Jahr 2012 den Nobelpreis für Medizin.

Mittlerweile können die oben genannten Gene auch mittels miRNA oder aber chemische Substanzen aktiviert werden. Im Jahr 2007 gelang es schließlich, humane iPS-Zellen herzustellen (Park et al, 2008). Auch wenn die Herstellung dieser pluripotenten Zellen als simpel erscheint, so muss man dennoch darauf hinweisen, dass von 100 somatischen Zellen lediglich 1 Zelle zu einer iPS-Zelle umgewandelt werden kann. Hier herrscht also nach wie vor Optimierungsbedarf.

iPS-Zellen ähneln in ihren Eigenschaften sehr stark den natürlichen embryonalen Stammzellen: Beide Zellarten können in nahezu alle Zelltypen differenziert werden und können sich unbegrenzt selbst erneuern.

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist es zur Herstellung von iPS-Zellen nicht nötig, Embryonen zu zerstören, weshalb häufig davon ausgegangen wird, dass die ethische Problematik umgangen werden kann. Wenn iPS-Zellen auch weniger ethische Probleme als embryonale Stammzellen mit sich bringen, so muss man allerdings auch beachten, dass man aus iPS-Zellen auch Keimbahnzellen züchten kann (Cyranoski, 2008), was durchaus auch ein ethisches Problem darstellt. Auf diese Art und Weise könnten Mensch-Mensch-Chimären hergestellt werden oder aber auch Klonierungen durchgeführt werden. Eine Reglementierung ist hier also unerlässlich.

Was verspricht man sich also von iPS-Zellen?

Durch die Reprogrammierung sind Wissenschaftler mittlerweile in der Lage, iPS-Zellen von an z.B. Parkinson erkrankten Patienten herzustellen (Wernig et al, 2008). Diese iPS-Zellen können dann wiederum zu erkrankten Neuronen differenziert werden, wodurch die ohnehin unmögliche direkte Untersuchung am Gehirn von Patienten umgangen wird. An diesen Neuronen können Forscher das zelluläre Krankheitsmodell besser erforschen und somit verstehen, um dann geeignete Wirkstoffe zu entwickeln, die an diesen Zellen getestet werden.

Natürlich sind die iPS-Zellen auch sehr interessant für die Transplantationsmedizin und die regenerative Medizin. Lange Wartezeiten, Abstoßungsreaktionen und eine Übertragung von Krankheiten könnten durch iPS-Zellen verhindert werden.

Dennoch muss ganz klar an dieser Stelle gesagt werden, dass das klinische Potential zum gegenwärtigen Zeitpunkt gering ist. Eine Reprogrammierung von Zellen bedeutet auch gleichzeitig eine grundlegende Veränderung einer Zelle und es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sich das Epigenom von iPS-Zellen vom Epigenom vom ESCs unterscheiden und dass iPS-Zellen anfälliger für Mutationen sind (Weissbein et al., 2014).

### **5.5.1. Stammzelltherapie und Morbus Crohn**

Bei therapierefraktären Morbus Crohn-Verläufen, bei denen mit Kortikosteroiden, Mesalazin, Immunsuppressiva und anti-TNF- $\alpha$ -Antagonisten nicht zu einer Remission führen gibt es nur noch eine Option, die übrig bleibt: eine Hochdosis-Chemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation. Dieses Verfahren wurde mittlerweile bei insgesamt 13 Patienten durchgeführt. Dabei bekommen die Morbus Crohn-Patienten zunächst Zytostatika, die das Immunsystem unterdrücken sollen. Nach einigen Tagen werden hämatopoetische Stammzellen filtriert und vorübergehend eingefroren. Die Patienten erhalten nach zwei Monaten eine Hochdosis-Chemotherapie, bei der das Immunsystem zerstört wird. Als letzter Schritt steht die Transplantation der eigenen Stammzellen an. Eine Erhaltungstherapie ist zur Vermeidung von Rezidiven dennoch gegeben. Bei Colitis ulcerosa zeigte sich dieser Ansatz allerdings als wenig wirksam. Hier bleibt eine Colektomie als letzte Behandlungsoption (Martinez-Monitel et al, 2014).

## 6. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der Epigenetik bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (CD) und Colitis ulcerosa (UC) untersucht. Dabei wurde die Promotormethylierung von verschiedenen Kandidatengen analysiert, die in die Immunantwort oder die intestinale Barrierefunktion involviert sind. Die entzündlichen Colon-Proben der CD-Patienten zeigten für *IL17REL* im Vergleich zu den nicht-entzündlichen Proben der CD-Patienten und den Kontrollproben sowie für *MUC6* nur im Vergleich zu den Kontrollproben eine signifikant höhere Methylierung. Die entzündlichen Colon-Proben der UC-Patienten wiesen für *MUC6* und *IL17REL* eine signifikant höhere Methylierung als die nicht-entzündlichen Proben der UC-Patienten und die Kontrollproben auf. Die Methylierung von *MUC6* war auch in den nicht-entzündlichen Proben der UC-Patienten im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant erhöht. *MUC2* und *PAX5* zeigten in den entzündlichen Proben der UC-Patienten im Vergleich zu den Kontrollproben eine signifikant höhere Methylierung, *MUC15* hingegen eine signifikant niedrigere Methylierung. Diese Befunde unterstützen Literaturdaten, dass die Pathogenese von CED mit Veränderungen der DNA-Methylierung und Genregulation assoziiert ist. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden murine multipotente adulte Keimbahnstammzellen (maGSCs) und männliche ESCs von verschiedenen Maus-Stämmen vergleichend bezüglich der Methylierung von gesicherten (*Oct4* und *Nanog*) und putativen (*Lrrc34* und *Stra8*) Pluripotenzmarkergenen, von Pluripotenz-assoziierten miRNA-Genen (*miR290*-Cluster, *miR302*-Cluster) sowie von vier geprägten Genen (*Meg3*, *H19*, *Igf2r* und *Snrpn*) untersucht, um die Pluripotenz von murinen maGSCs und den Status von *Lrrc34* und *Stra8* als Pluripotenzgene zu untermauern. ESCs und maGSCs waren sich bezüglich der Methylierung sehr ähnlich und wiesen eine für pluripotente Zellen typische starke Hypomethylierung von *Oct4*, *Nanog*, *Lrrc34*, *miR290* und *miR302* im undifferenzierten Zustand sowie einen deutlichen Anstieg der *Oct4*-, *Nanog*- und *Lrrc34*-Methylierung nach Differenzierung mit Retinsäure auf. Die geprägten Gene waren in undifferenzierten maGSCs generell etwas niedriger methyliert als in undifferenzierten ESCs. Nach Differenzierung der maGSCs mit Retinsäure zeigten drei der vier geprägten Gene (*Meg3*, *H19* und *Igf2r*) eine Erhöhung der Methylierung auf annähernd somatische Methylierungsmuster. Bei einer Differenzierung von ESCs und maGSCs auf Gelatine stieg die Methylierung von *Oct4*, *Nanog*, *miR-290* und *miR-302* in ESCs an, während sie bei maGSCs zurückging oder unverändert blieb. Diese Befunde unterstützen die Pluripotenz und das Potenzial von maGSCs für die regenerative Medizin sowie den Status von *Lrrc34* als ein neues Pluripotenzgen.

## 7. Anhang: Statistik Auswertungen

Statistiken

		% methylation Claudin 1	% methylation MUC 6	% methylation II17REL	% methylation PAX 5	% methylation MUC 2	% methylation MUC 15
N	Gültig	138	138	138	138	138	138
	Fehlend	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		28.493	44.069	38.975	9.884	47.065	82.192
Median		27.000	41.500	35.000	9.750	47.500	82.500
Standardabweichung		7.1580	10.0930	12.8997	2.1608	6.6793	3.3486
Varianz		51.237	101.869	166.403	4.669	44.613	11.213
Schiefe		.708	.684	.598	.739	-.360	-.704
Standardfehler der Schiefe		.206	.206	.206	.206	.206	.206
Perzentile	25	23.375	36.875	29.500	8.500	41.500	80.375
	50	27.000	41.500	35.000	9.750	47.500	82.500
	75	31.625	52.125	49.125	11.125	51.500	84.500



Ränge

Samples	N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
% methylation Claudin 1	Control C.	24	17.52	420.50
	CD C. I	8	13.44	107.50
	Gesamt	32		
% methylation MUC 6	Control C.	24	12.56	301.50
	CD C. I	8	28.31	226.50
	Gesamt	32		
% methylation Il17REL	Control C.	24	12.96	311.00
	CD C. I	8	27.13	217.00
	Gesamt	32		
% methylation PAX 5	Control C.	24	15.50	372.00
	CD C. I	8	19.50	156.00
	Gesamt	32		
% methylation MUC 2	Control C.	24	15.83	380.00
	CD C. I	8	18.50	148.00
	Gesamt	32		
% methylation MUC 15	Control C.	24	16.52	396.50
	CD C. I	8	16.44	131.50
	Gesamt	32		

Statistik für Test<sup>b</sup>

	% methylation Claudin 1	% methylation MUC 6	% methylation Il17REL	% methylation PAX 5	% methylation MUC 2	% methylation MUC 15
Mann-Whitney-U	71.500	1.500	11.000	72.000	80.000	95.500
Wilcoxon-W	107.500	301.500	311.000	372.000	380.000	131.500
Z	-1.068	-4.117	-3.704	-1.050	-.698	-.022
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.286	.000	.000	.294	.485	.983
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	.293 <sup>a</sup>	.00000038028 9591 <sup>a</sup>	.00003574722 1509 <sup>a</sup>	.313 <sup>a</sup>	.508 <sup>a</sup>	.983 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Samples

#### Ränge

Samples	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
% methylation Claudin 1	CD C. NI	13.94	223.00
	CD C. I	9.63	77.00
	Gesamt	24	
% methylation MUC 6	CD C. NI	9.38	150.00
	CD C. I	18.75	150.00
	Gesamt	24	
% methylation Il17REL	CD C. NI	9.06	145.00
	CD C. I	19.38	155.00
	Gesamt	24	

% methylation PAX 5	CD C. NI	16	10.88	174.00
	CD C. I	8	15.75	126.00
	Gesamt	24		
% methylation MUC 2	CD C. NI	16	12.28	196.50
	CD C. I	8	12.94	103.50
	Gesamt	24		
% methylation MUC 15	CD C. NI	16	13.03	208.50
	CD C. I	8	11.44	91.50
	Gesamt	24		

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	% methylation Claudin 1	% methylation MUC 6	% methylation II17REL	% methylation PAX 5	% methylation MUC 2	% methylation MUC 15
Mann-Whitney-U	41.000	14.000	9.000	38.000	60.500	55.500
Wilcoxon-W	77.000	150.000	145.000	174.000	196.500	91.500
Z	-1.410	-3.065	-3.370	-1.601	-.215	-.522
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.159	.002	.001	.109	.830	.601
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	.172 <sup>a</sup>	.00125905712 1219 <sup>a</sup>	.00026105720 0080 <sup>a</sup>	.120 <sup>a</sup>	.834 <sup>a</sup>	.610 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Samples

Ränge

Samples	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
% methylation Claudin 1	Control C.	23.79	571.00
	UC C. I	15.56	249.00
	Gesamt	40	
% methylation MUC 6	Control C.	12.50	300.00
	UC C. I	32.50	520.00
	Gesamt	40	
% methylation II17REL	Control C.	12.85	308.50
	UC C. I	31.97	511.50
	Gesamt	40	
% methylation PAX 5	Control C.	17.04	409.00
	UC C. I	25.69	411.00
	Gesamt	40	
% methylation MUC 2	Control C.	14.90	357.50
	UC C. I	28.91	462.50
	Gesamt	40	
% methylation MUC 15	Control C.	25.29	607.00
	UC C. I	13.31	213.00
	Gesamt	40	

Statistik für Test<sup>b</sup>

	% methylation Claudin 1	% methylation MUC 6	% methylation II17REL	% methylation PAX 5	% methylation MUC 2	% methylation MUC 15
Mann-Whitney-U	113.000	.000	8.500	109.000	57.500	77.000
Wilcoxon-W	249.000	300.000	308.500	409.000	357.500	213.000
Z	-2.183	-5.304	-5.070	-2.300	-3.717	-3.182
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.029	.000	.000	.021	.000	.001
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	.029 <sup>a</sup>	.000000000031821 <sup>a</sup>	.000000002131989 <sup>a</sup>	.021 <sup>a</sup>	.000088604515264 <sup>a</sup>	.001 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Samples

Ränge

Samples	N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
% methylation Claudin 1	UC C. NI	13	15.88	206.50
	UC C. I	16	14.28	228.50
	Gesamt	29		
% methylation MUC 6	UC C. NI	13	7.50	97.50
	UC C. I	16	21.09	337.50
	Gesamt	29		
% methylation Il17REL	UC C. NI	13	8.42	109.50
	UC C. I	16	20.34	325.50
	Gesamt	29		
% methylation PAX 5	UC C. NI	13	11.08	144.00
	UC C. I	16	18.19	291.00
	Gesamt	29		
% methylation MUC 2	UC C. NI	13	11.46	149.00
	UC C. I	16	17.88	286.00
	Gesamt	29		
% methylation MUC 15	UC C. NI	13	16.15	210.00
	UC C. I	16	14.06	225.00
	Gesamt	29		

Statistik für Test<sup>b</sup>

	% methylation Claudin 1	% methylation MUC 6	% methylation II17REL	% methylation PAX 5	% methylation MUC 2	% methylation MUC 15
Mann-Whitney-U	92.500	6.500	18.500	53.000	58.000	89.000
Wilcoxon-W	228.500	97.500	109.500	144.000	149.000	225.000
Z	-.506	-4.279	-3.751	-2.244	-2.019	-.660
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.613	.000	.000	.025	.043	.509
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	.619 <sup>a</sup>	.00000088412 2291 <sup>a</sup>	.00004621012 5072 <sup>a</sup>	.025 <sup>a</sup>	.045 <sup>a</sup>	.531 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Samples

## 8. Literatur

**Adcock IM.** HDAC inhibitors as anti- inflammatory agents. *Br J Pharmacol.* 2007; 150(7): 829-831.

**Adjaye J, Bolton V, Monk M.** Developmental expression of specific genes detected in high-quality cDNA libraries from single human preimplantation embryos. *Gene* 1999; Vol. 237(2): 373-383.

**Agah A, Agahjan M, Mashayekhi F et al.** A multi-enzyme model for pyrosequencing. *Nucleic Acids Research* 2004; 32 (21): e166.

**Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL et al.** Stra8 and its inducer, retinoic acid regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2008; 105: 14976-14980.

**Angelow, S. et al.** Biology of claudins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; 295: F876- F876

**Atassi MZ, Casali P.** Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity.* 2008; 41: 123-132.

**Avasthi S, Srivastava R, Singh A, Srivastava M.** Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical Update* 2008; 3 (1): 22-30.

**Bartram CR, Brüstle O, Friedrich B et al.** Stammzellforschung in Deutschland- Möglichkeiten und Perspektiven. *Stellungnahme der DFG* 2006.

**Bell AC und Felsenfeld G.** Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 2000; 405: 482-485.

**Blum HE.** Stammzellen- Grundlagen und therapeutische Perspektiven. *Praxis* 2007; 96: 539- 543.



**Buselmaier, W. und Tariverdian, G. (2006).** Humangenetik für Biologen. Springer-Verlag, Heidelberg/Berlin/Stuttgart

**Brewe, M. (2006).** Embryonenschutz und Stammzellgesetz. Rechtliche Aspekte der Forschung mit embryonalen Stammzellen. Springer-Verlag, Heidelberg/Berlin/Stuttgart

**Bobek LA, Situ H.** MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(2): 643-52.

**Campbell NA, Reece JB.** Biologie. Spektrum- Verlag 2003, 6. Auflage

**Chambers I, Colby D, Robertson M et al.** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113(5): 643-55.

**Chi N und Epstein JA.** Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends in Genetics*. 2002. Vol 18(1):41-47.

**Cho JH und Gregersen PK.** Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N engl J Med*. 2011; 365 (17): 1612- 1623.

**Clamp JR et al.** Study of the carbohydrate content of mucus glycoproteins from normal and diseased colons. *Clin Sci* 1981;61. 229-234.

**Coffigny H, Bourgeois C, Ricoul M et al.** Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis. *Cytogenet. Cell Genet*. 1999; 87 (3-4): 175-81.

**Craig JM.** Heterochromatin- many flavours, common themes. *BioEssays* 2005; 27(1): 17-28.

**Crohn B, Ginzburg L und Oppenheimer GD.** Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *Jama* 1932; 99 (16): 1323- 1329.

**Defendenti C, Sarzi-Puttini P, Grosso S et al.** Lymphocyte intestinal homing in inflammatory bowel disease. *BMC Immunology* 2001; 12:71.

**De Miguel MP, Cheng L, Holland EC.** Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial pathway germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *National Acad Sciences* 2002; Vol. 99 No. 16: 10458-10463.

**Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al.** Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest.* 2005; 115 (7): 1765-76.

**Fiocchi C.** Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182–205.

**Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (2000).** Die innere Medizin. Schattauer- Verlag, Stuttgart, 10. Auflage.

**Gourley M, Miller FW.** Mechanisms of disease: environmental factors in the pathogenesis of rheumatic disease. *Nat Clin. Pract. Rheumatol* 2007; 3: 172-180.

**Halford S, Spencer P, Greenwood J et al.** Assignment of Claudin.1 (CLDN1) to human chromosome 3q28 -> q29 with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; Voll.88, No.3-4.

**Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH et al.** Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000; 120(4): 841- 847.

**Davis TL, Transler JM, Moss SB et al.** Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* 1999; 58: 18-28.

**TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS.** The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during mal germ cell development. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 19: 2885-2894.

**Du T und Zamore PD.** microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645- 4652.

**Ehrlich M.** DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21 (35): 5400-13.

**Esteller M.** The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006; 27(6): 1121-1125.

**Farthing CR, Ficiz G, Ng RK et al.** Global Mapping of DNA Methylation in Mouse Promotors Reveals Epigenetic Reprogramming of Pluripotency Genes. *PLoS Genetics* 2008; 4, 1-17.

**Findley MK, Koval M.** Regulation and roles for claudin- family tight junction proteins. *IUBMB Life* 2009; Issue 4: 431-437.

**Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M.** Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Hormone Research in paediatrics* 2006; 65(3).

**Fransz PF and de Jong JH.** Chromatin dynamics in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2002; 5 (6): 560-567.

**Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S.** Claudin-1 and Claudin-2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *JCB* 2002; Vol 141 no.7, 1539- 1550.

**Ganesan A, Nolan SJ, Crabb SJ, Packham G.** Epigenetic therapy: Histone Acetylation, DNA Methylation and anti- cancer drug discovery. *Current Cancer Drug Targets* 2009; 9: 963- 981.

**Gardiner- Garden M, Frommer M.** CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* 1987; 196 (2): 261- 82.

## **Gitter**

**Guan K, Nayernia K, Maier LS et al.** Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199- 1203.

**Haaf T (2003).** Geschlechterkonflikt im frühen Embryo: Elternspezifische Reprogrammierung des väterlichen und mütterlichen Erbguts nach der Befruchtung. *Deutsches Ärzteblatt* 100, Ausgabe 36.

**Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T et al.** Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells . *Mech. Dev.* 2002; 117 (1-2): 15-23.

**Han DKM, Khaing ZZ, Pollock RA et al.** H19, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* 1996; 97: 1276-1285.

**Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L.** Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Developmental Dynamics* 2004; Vol. 230, Issue 1; 187-198.

**Holliday R.** Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006; 1(2): 76-80.

**Huang L.** Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J Cell Physiol.* 2006; 209(3): 611-616.

**Huang J, Che M, Huang Y et al.** Overexpression of MUC15 activates signal- regulated kinase 1/2 and promotes the oncogenic potential of human colon cancers. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1452-1458.

**Itoh M, Furuse M, Morita K et al.** Direct binding of three tight junctions- associated magkus, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the CooH termini of claudins. *JCB* 1999. Vol. 147. No. 6; 1351-1363.

**Izadyar F, Pau F, Marh J et al.** Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. *Reproduction* 2008; 135: 771-784.

**Javierre BM, Hernando H, Ballestar E.** Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med.* 2011; 12 (67): 535- 545.

**Jones PA.** Overview of cancer epigenetics. *Semin. Hematol.* 2005; 42 (3) 3-8.

**Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** *Histologie.* Springer-Verlag 2005, Auflage 6.

**Kagami M, Sekita Y, Nishimura G et al.** Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet* 2008; 40(2): 237-42.

**Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J et al.** Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119: 1001-1012.

**Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S.** Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66 (4): 596- 612.

**Koubova J, Menke DB, Zhou Q et al.** Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Sci U S A* 2006; 103(8): 2474-9.

**Lau M, Stewart C, Liu Z et al.** Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev.* 1994; 8: 2953-2963.

**Leff SE, Brennan CI, Reed ML et al.** Maternal imprinting of the mouse *Snrpn* gene and conserved linkage homology with the human Prader-Willi syndrome region. *Nat. Genet.* 1992; 2: 259-264.

**Li J, Pu M, Hirasawa R et al.** Synergistic Function of DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Methylation of Oct4 and Nanog. *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27 (24): 8748-8759.

**Li J, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP.** Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 2004; 84 (6), 952-60.

**Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ et al.** Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 2002; 79: 530-538.

**Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM.** Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum. Reprod. Update* 2004; 10 (1), 3-18.

**Mandel LJ, Bacallo R, Zampighi G.** Uncoupling of the molecular "fence" and paracellular "gate" functions in epithelial tight junctions. *Nature* 1993; 361: 552-555.

**Mathew CG, Lewis CM.** Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. Human Molecular Genetics 2004; 13(1): 161- 168.

**Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H et al.** The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 2003; Voll 113(%):631-642.

**Miyamoto T, Sengoku K, Takuma N et al.** Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, Stra8, stimulated by retinoic acid gene 8. J. Assisted Reprod. Genet. 2002; 19: 531-535.

**Mutschler E, Schaible HG, Vaupel P (2007).** Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

**Moehle C, Ackermann N, Langmann T et al.** Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. J Mol Med 2006; 84: 1055-1066.

**Momma M, Steder- Neukamm U, Wedemeyer J et al.** Allergische Erkrankungen und Reaktionen auf Nahrungsmittel bei Patienten mit chronisch- entzündlichen Darmerkrankungen. Thieme eJournals 2010; 35(6): 301-309.

**Morita K, Sasaki H, Tsukita S.** Endothelia Claudin, J Cell Biol. 1999; 147 (1): 185-194.

**Nance WE.** Twin research. 1978; Part C: Clinical studies (Alan R Liss, New York).

**Nayernia K, Li M, Engel W.** Spermatogonial Stem Cells. Methods of Molecular Biology 2004; 253: 105- 120.

**Nell S, Suerbaum S, Josenhans.** The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. Nat Rev Microbiology 2010; 8: 564- 577.

**Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K et al.** Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo on the POU transcription factor Oct4. Cell 1998; 95: 379-391.

**Niwa, H.** How is pluripotency determined and maintained? Development 2007; 134: 635–646.

**Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313–317.

**Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99 (3): 247-57.

**Orholm M, Munkholm P, Langholz E et al.** Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324 (2): 84-88.

**Oshima T, Miwa H, Joh T.** Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Dec;23 Suppl 2:S146-50.

**Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T et al.** Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412(6844):341-6.

**Pullan RD et al.** Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 1994; 35:353-359.

**Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC.** *Biologie.* 2006; Elsevier München.

**Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill A. et al.** Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 1996; 38: 340-352.

**Rakyan VK, Chong S, Champ ME et al.** Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc. Natl, Acad. Sci. U S A* 2003; 100(5): 2538-43.

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

**Reik W and Walter J.** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2: 21-32.

**Reineke, A. (2004).** *Gentechnik.* Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

**Ring GH, Lakkis FG.** Breakdown of self- tolerance and the pathogenesis of autoimmunity. *Semin Nephrol.* 1999; 19 (1): 25-33.

**Reyes JL, Lamas M, Martin D et al.** The renal segmental distribution of claudines changes with development. *Kidney International* 2002; 62, 476-487.

**Rubin DT und Hanauer SB.** Smoking and inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000; 12(8): 855- 862.

**Seandel M, James D, Shmelkov SV et al.** Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 2007; 449: 346-350.

**Satsangi J, Parkes M, Louis E et al.** Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3,7 and 12.

**Schock G, Träger T, Peist R.** Inhibition bei Bisulfit- Konvertierung verhindert Fragmentierung der DNA. *Biospektrum* 2006; 396-397.

**Schrans- Stassen B, Van de Kant HJG, de Rooij D et al.** Differential Expression of c-Kit in Mouse Undifferentiated and Differentiating Type A Spermatogonia. *Endocrinology* 1999; Vol. 140 Issue 12.

**Shovlin TC, Durcova-Hills G, Surani A et al.** Heterogeneity in imprinted methylation patterns of pluripotent embryonic germ cells derived from premeiotic mouse germ cells. *Dev. Biol.* 2007; 313: 674-681.

**Franke A, Balshun T, Sina C et al.** Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet.* 2010 Apr; 42(2):292-4.

**Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M et al.** Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; Vol. 1165: 294-300.

**Shemer R, Birger Y, Riggs A et al.** Structure of the imprinted mouse *Snrpn* gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; Vol.94: 10267-10272.

**Shivananda S, Lennard- Jones J, Logan R et al.** Incidence of inflammatory bowel disease across Europe : is there a difference between north and south ? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC- IBD). *Gut* 1996; 39: 690- 697.



**Stapleton P, Weith A, Urbanek P et al.** Chromosomal localization of seven Pax genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature Genet* 1993; 3: 292-298.

**Takada S, Paulsen M, Tevendale M et al.** Epigenetic analysis of the dlx-1-Gtl2 imprinted domain on mouse chromosome 12: implications for imprinting control from comparison with Igf2-H19. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 77-86.

**Tegelenbosch, R.A., de Rooij, D.G. (1993).** A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res.* 290(2): 193-200.

**Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.

**Tost J, El abdalaoui H, Gut IG.** Serial pyrosequencing for quantitative DNA methylation analysis. *BioTechniques* 2006; 40 (6): 721-726.

**Treisman J, Harris E, Wilson D, Desplan C.** The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 1991; Vol.5, 594-604.

**Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus- Myrhed B.** Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29: 990- 996.

**Van Itallie C, Anderson J.** Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology* 2006. Vol. 68: 403-429.

**Vermeire S, Peeters M, Vlietinck R et al.** Anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: A study in IBD families. *Inflammatory Bowel Diseases* 2001; 7(1): 8-15.

**Wernig M, Meissner A, Foreman R et al.** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448: 318-324.

**Yamazaki Y, Mann MRW, Lee SS et al.** Reprogramming of primordial germ cells begins before their migration into the genital ridge making primordial germ cells inadequate nuclear

donors for reproductive cloning. Proceedings of the National Acad. Sci. USA 2003; 100: 12207-12212.

**Yeom YI, Fuhrman G, Ovitt CE et al.** Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development 1996; 122: 881-894.

**Zeissig S, Bürgel N, Günzel D et al.** Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. Gut 2007; 56: 61-72.

**Zovoilis A, Nolte J, Drusebheimer N et al.** Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles. Mol Hum Reprod. 2008; 14(9):521-9.

**Noronha AM, Liang Y, Hetzel JT et al.** Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease. J Leukoc Biol. 2009 Oct;86(4):1007-16. Epub 2009 Jul 9.

## **9. Danksagung**

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Weiterhin versichere ich, wörtlich übernommene Ausführungen anderer Autoren oder dem Sinne nach anderen Veröffentlichungen entnommene Stellen entsprechend gekennzeichnet und die Quellen zitiert zu haben.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Marieke Tesmer-Wolf)



## **11. Lebenslauf**