

Veränderungen der DNA-Methylierung in Patienten mit AHCY-Defizienz

**DNA methylation changes in patients with AHCY
deficiency**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Antje Irina Fitzner
geb. am 02. April 1985 in Holzminden

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Epigenetik	3
2.2 Histonmodifikation	4
2.3 <i>Non-coding</i> RNA und RNA-Interferenz	6
2.4 DNA-Methylierung	8
2.4.1 Eigenschaften und Funktionen der DNA-Methylierung	8
2.4.2 DNA-Methyltransferasen	10
2.4.3 DNA-Methylierung während der embryonalen Reprogrammierung und Gametogenese	13
2.5 Genomische Prägung	16
2.5.1 Humane <i>imprinting</i> -Erkrankungen	19
2.6 Repetitive und transponierbare Elemente	21
2.7 S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase	25
2.8 AHCY-Defizienz	27
2.9 Zielsetzung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Colorimetrische Bestimmung der gesamtgenomischen DNA-Methylierung	30
3.2 Methylierungsanalyse ausgewählter DMRs mittels Bisulfit-Pyrosequen- zierung bei Patienten mit AHCY-Defizienz	31
3.2.1 Vergleichbarkeit von Proben unterschiedlicher Herkunft	32
3.2.2 Methylierungsstatus von DMRs bei Patienten mit AHCY- Defizienz	34
3.3 Bestätigung der Bisulfit-Pyrosequenzierungsergebnisse mittels High Re- solution Melting-Analyse	37
3.4 Genomweite Methylierungsanalyse bei Patienten mit AHCY-Defizienz	39

3.5	Bisulfit-Pyrosequenzierung bei <i>AHCY</i> -Knockdown-Zelllinien	47
3.6	Fibroblastenkultur mit <i>AHCY</i> -Defizienz	50
3.6.1	Methylierungsstatus ausgewählter Gene in Fibroblasten mit <i>AHCY</i> - Defizienz	52
3.6.2	<i>AHCY</i> -Expressionsanalyse mittels qPCR	53
3.6.3	Allelspezifität der <i>AHCY</i> -Transkripte (QUASEP-Analyse)	54
4	Diskussion	55
4.1	<i>AHCY</i> -Defizienz und andere Erkrankungen mit globalen DNA-Methylierungsstörungen	55
4.2	<i>AHCY</i> -Defizienz im Vergleich zu anderen Erkrankungen des Methioninstoffwechsels	58
4.3	<i>AHCY</i> -Defizienz führt zu stochastischen Hypermethylierungen geprägter Gene	62
4.4	Mögliche Ursachen der DNA-Hypermethylierung bei <i>AHCY</i> -Defizienz	65
4.5	Diät-induzierte Methylierungsveränderungen bei <i>AHCY</i> -Defizienz und anderen Erkrankungen	69
4.6	Zelllinien als Modell für die <i>AHCY</i> -Defizienz	69
4.7	Ausblick	71
5	Material und Methoden	73
5.1	Material	73
5.1.1	Patientenkollektiv und Kontrollen	73
5.1.2	HEK293- und HepG2-Zelllinien	74
5.1.3	Humane Fibroblasten	74
5.1.4	Geräte	75
5.1.5	Puffer und Medien	75
5.1.6	DNA-Standards	76
5.1.7	Kits	76
5.1.8	Enzyme	77
5.1.9	Primer/synthetische Oligonukleotide	77
5.1.9.1	Primer für QUASEP- und qPCR-Expressionsanalyse	77
5.1.9.2	Primer für Bisulfit-Pyrosequenzierung und HRM-Analyse	77
5.1.10	PCR-Programme	79
5.1.10.1	Programme für die Standard-PCR	79
5.1.10.2	Programme für die HRM-Analyse	79
5.1.11	Assays für die Bisulfit-Pyrosequenzierung	79
5.1.12	Chemikalien	80
5.1.13	Software	81

5.1.14	Material	82
5.2	Gelelektrophorese	83
5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	83
5.4	Bisulfitkonversion	83
5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	83
5.5.1	Standard-PCR	83
5.5.2	Quantitative Real time-PCR	84
5.5.2.1	Expressionsanalyse	84
5.5.2.2	High Resolution Melting-Analyse	85
5.6	Pyrosequenzierung	85
5.6.1	Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung	87
5.6.2	QUASEP-Analyse	87
5.7	Gesamtgenomische Methylierungsanalyse	88
5.8	Genomweite Methylierungsanalyse mit Array	88
5.9	Kultur von adhärent wachsenden Zellen	90
5.9.1	Auftauen der Zellen	90
5.9.2	Kultivieren der Zellen	90
5.9.3	Passagieren der Zellen	91
5.9.4	Kryokonservierung	91
5.10	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Zellkulturen	91
5.10.1	RNA-Isolierung aus Zellen	91
5.10.2	Isolierung genomischer DNA aus Zellen	92
5.11	cDNA-Synthese	92
6	Anhang	93
6.1	Informationen über das Gen <i>AHCY</i> (human)	93
6.1.1	<i>AHCY</i> -Transkripte (Ensembl)	93
6.1.2	<i>AHCY</i> -Sequenzen	93
6.1.2.1	Transkript CCDS54457.1	93
6.1.2.2	Transkript CCDS13233.1	94
	Literaturverzeichnis	96

Abbildungsverzeichnis

2.1	Relative Frequenz von Artikeln mit dem Suchbegriff „Epigenetik“ im Titel	4
2.2	Aufbau und Modifikationen von Histonproteinen	5
2.3	Mechanismus der RNA-Interferenz	7
2.4	Methylierung von Cytosin	9
2.5	Struktur von DNA-Methyltransferasen bei Säugern	10
2.6	Mechanismus der Cytosinmethylierung	12
2.7	DNA-Methylierung während der embryonalen Reprogrammierung und Gametogenese	14
2.8	Funktionsweise des <i>H19-Igf2</i> -Lokus	18
2.9	Transposition von DNA-Elementen	23
2.10	Proteinkodierende <i>AHCY</i> -Transkripte	25
2.11	Struktur des Enzyms <i>AHCY</i>	26
2.12	<i>AHCY</i> im Methioninstoffwechsel	27
2.13	Auswirkungen der <i>AHCY</i> -Defizienz auf den Methioninstoffwechsel	28
3.1	Verhältnisse der colorimetrisch bestimmten, gesamtgenomischen DNA-Methylierungen	31
3.2	Vergleich der Methylierungswerte der Kontrollproben für die Bisulfit-Pyrosequenzierung	33
3.3	Methylierungswerte von DMRs in Patienten mit <i>AHCY</i> -Defizienz	35
3.4	Methylierungswerte einzelner CpGs in der <i>MEST</i> -DMR	37
3.5	Vergleich der Methylierungswerte von Bisulfit-Pyrosequenzierung und HRM-Analyse	38
3.6	Vergleich der Methylierungswerte geprägter Gene bei Array und Bisulfit-Pyrosequenzierung	43
3.7	Methylierung neun ausgewählter DMRs in <i>AHCY</i> -Knockdown-Zelllinien	48
3.8	Morphologie von Fibroblasten mit <i>AHCY</i> -Defizienz	51
3.9	Vergleich des DNA-Methylierungsstatus in unterschiedlichen Geweben	52
3.10	Schmelzkurven der verwendeten Primer für die Expressions-qPCR	53
3.11	Relative <i>AHCY</i> -Expression in Patienten- und Kontrollfibroblasten	53

3.12 Allelspezifität der <i>AHCY</i> -Transkripte in Fibroblasten mit <i>AHCY</i> -Defizienz	54
5.1 Prinzip der quantitativen Real time-PCR	85
5.2 Prinzip der Pyrosequenzierung	86
5.3 Colorimetrische Bestimmung der gesamtgenomischen Methylierung . .	88
5.4 Prinzip des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip	89

Tabellenverzeichnis

2.1	Beispiele für Histonmodifikationen und deren Vorkommen	6
3.1	Colorimetrisch bestimmte, gesamtgenomische DNA-Methylierung . . .	30
3.2	Methylierungswerte der verwendeten Kontrollproben	33
3.3	Methylierungswerte von DMRs in Patienten mit AHCY-Defizienz	36
3.4	Vergleich der Methylierungswerte von Bisulfit-Pyrosequenzierung und HRM-Analyse	39
3.5	Kontrollproben für die Methylierungsanalyse mit Array	40
3.6	Mittlere genomweite Methylierungen aller analysierten CpGs pro Array- Probe	41
3.7	Anzahl der mittels Array detektierten hypo-/hypermethylierten CpGs . .	41
3.8	Vergleich von Methylierungsergebnissen von Bisulfit-Pyrosequenzierung und Array	42
3.9	Methylierung neun ausgewählter DMRs in AHCY-Knockdown-Zelllinien	49
3.10	Vergleich des DNA-Methylierungsstatus in unterschiedlichen Geweben	52
5.1	Patientenkollektiv	73
5.2	Humane Kontrollproben	74
6.1	Proteinkodierende AHCY-Transkripte	93

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μ	mikro (10^{-6})
®	Registered Trade Mark
3'-	drittes C-Atom der Desoxyribose
5'-	fünftes C-Atom der Desoxyribose
5caC	5-Carboxycytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ac	acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AHCY	S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase
AS	Aminosäuren
AS	Angelman-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BER	<i>base excision repair</i>
BHM	Betain-Homocystein-Methyltransferase
bp	Basenpaare
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CBS	Cystationin-β-Synthetase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin

dCTP	Cytosindiphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMR	<i>differentially methylated region</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
DNMT/Dnmt	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EC	<i>enzyme commission numbers</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
For	<i>forward</i>
G	Guanin
g	Gramm
gDMR	<i>germline</i> DMR
gDNA	genomische DNA
GNMT	Glycin-N-Methyltransferase
H	Histon
H	Wasserstoff
h	Stunde(n)
Hcy	Homocystein
Hhcy	Hyperhomocysteinämie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRM	High Resolution Melting
ICR	<i>imprinting control region</i>
inkl.	inklusive
kb	Kilobasen
KD	Knockdown
kDa	kiloDalton
Kontr.	Kontrollen
l	Liter
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	Molarität
m	milli (10^{-3})
m	Meter
MAT	Methioninadenosyltransferase
MBD	<i>methyl-CpG binding domain</i>

me	methyl
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
n	nano (10^{-9})
N-	Amino-Terminus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NGS	Next Generation Sequencing
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
Pat.	Patient
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	pH-Wert
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
PKZ	Primordiale Keimzelle(n)
PWS	Prader-Willi-Syndrom
qPCR	Quantitative Real time-PCR
QUASEP	Quantification of Allele-Specific Expression by Pyrosequencing
RefSeq	<i>reference sequence</i>
Rev	<i>reverse</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RQ	<i>relative quantification value</i>
rRNA	<i>ribosomalRNA</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAH	S-adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
sDMR	somatische DMR
Seq	Sequenzierung
SINE	<i>short interspersed nuclear elements</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
sog.	sogenannte
SRS	Silver-Russell-Syndrom
St.Abw.	Standardabweichung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase
TE	transponierbare Elemente
TE-	TRIS-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transferRNA</i>
TSS	<i>transcription start site</i>
U	<i>enzyme unit</i>
u.a.	unter anderem
Uni	<i>universal</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
x	fach
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase (AHCY)-Defizienz ist eine seltene autosomal rezessive Erbkrankheit, bei der Mutationen im *AHCY*-Gen die Funktionsfähigkeit des kodierten Enzyms beeinträchtigen. Diese Krankheit führt zu Symptomen wie Entwicklungsverzögerungen, mentaler Retardierung und Myopathie. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der AHCY-Defizienz auf die Methylierung der DNA in Blutproben und Fibroblasten von Patienten mit AHCY-Defizienz, sowie in HEK293- und HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown untersucht. Der gesamtgenomische Methylierungsstatus wurde mit Hilfe des MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek) bei drei Patienten-Blutproben festgestellt. In den Blutproben von sieben Patienten und Fibroblasten von einem Patienten wurde die Methylierung von DMRs sieben geprägter Gene (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) und zwei repetitiver Elemente (Alu, LINE1) mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung quantifiziert und durch High Resolution Melting-Analyse bestätigt. Zusätzlich wurde eine genomweite Methylierungsanalyse mit dem Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) für vier Patientenproben durchgeführt und die Expression von *AHCY* in Fibroblasten mittels Expressions-qPCR und QUASEP-Analyse untersucht.

Die Methylierungsanalysen ergaben eine Hypermethylierung der gesamtgenomischen DNA und stochastische Hypermethylierungen von DMRs geprägter Gene bei einigen Patienten. Die HEK293- und HepG2-Zelllinien wiesen dagegen hauptsächlich stochastische Hypomethylierungen an einigen DMRs geprägter Gene und LINE1-Elementen auf. Die genomweite Methylierungsarray-Analyse konnte die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung nicht bestätigen. Die Expressionsanalysen der AHCY-defizienten Fibroblasten zeigten eine verminderte Expression von *AHCY*, wobei beide Allele etwa gleich stark transkribiert wurden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die AHCY-Defizienz eine gute Modellerkrankung für die Untersuchung biologischer Konsequenzen von Methylierungsstörungen im Rahmen der Epigenetik-Forschung sein könnte. Sie ist unseres Wissens die erste monogene Erkrankung mit symptomaler DNA-Hypermethylierung beim Menschen.

1.1 Abstract

S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (AHCY) deficiency is a rare autosomal recessive disorder. Mutations in the gene *AHCY* impair the efficiency of the encoded enzyme which can lead to mental and developmental retardation and myopathy. The present study investigated the influence of AHCY deficiency on DNA methylation in blood samples and fibroblasts of patients with AHCY deficiency as well as HEK293 and HepG2 cell lines with knockdown of *AHCY*. Whole genome methylation status was quantified in three patient blood samples with the MethyFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek). Methylation status of DMRs of seven imprinted genes (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) and two repetitive elements (Alu, LINE1) was quantified in blood samples of seven patients and fibroblasts of one patient using bisulfite pyrosequencing and confirmed by high resolution melting analysis. For four blood samples, a genome wide methylation analysis was performed using the Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (Illumina). The expression of *AHCY* in fibroblasts was analysed with qPCR and QUASEP analysis.

The methylation analysis showed a hypermethylation of the whole genome and stochastic hypermethylation of imprinted gene DMRs in some patients. HEK293 and HepG2 knockdown cells mostly exhibited stochastic hypomethylation in some DMRs of imprinted genes and LINE1 elements. The genome-wide methylation array analysis could not confirm the results obtained by bisulfite pyrosequencing. The expression analysis indicated a reduced expression of *AHCY* in fibroblasts with both alleles transcribed at nearly equal levels.

These data indicate that AHCY deficiency may represent a good model disease for studying the biological consequences of multiple methylation errors in epigenetic research. To our knowledge, it is the first monogenic disease associated with DNA hypermethylation in humans.

2. Einleitung

2.1 Epigenetik

Die Genetik lässt sich derzeit in mehrere große Teilbereiche unterteilen. Neben der von Mendel begründeten klassischen Genetik, der Molekulargenetik, der Populationsgenetik und der Entwicklungsgenetik ist die Epigenetik der jüngste Zweig und befasst sich mit Eigenschaften von Zellen, die an Tochterzellen vererbt werden können, aber nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind. Es handelt sich dabei um vererbare Muster der Genregulation, die die Aktivität von Genen oder ganzen Chromosomen beeinflussen können, ohne dabei die Basenabfolge der DNA zu verändern. Der Begriff „Epigenetik“ (vom griechischen *epi*=dazu/außerdem und *genesis*=Ursprung) wurde erstmals 1942 von C. H. Waddington verwendet. Er umfasste mit diesem Begriff alle Untersuchungen, die biologische Entwicklungsprozesse beschreiben und neu entdeckte kausale Mechanismen mit bereits bekannten Mechanismen aus der experimentellen Embryologie in Zusammenhang bringen. Dabei schlug er zusätzlich den Begriff „Epigenotyp“ als Bezeichnung für den „Komplex von Entwicklungsprozessen“ vor, der zwischen Genotyp und Phänotyp liegt [1]. D. L. Nanney verwendete den Begriff „Epigenetik“ 1958 im Zusammenhang mit der stabilen Vererbung von Eigenschaften, wodurch Zellen mit demselben Genotyp verschiedene Phänotypen ausprägen und durch Zellteilung innerhalb einer bestimmten Umgebung vererben können. „Epigenetische Systeme“ sollten daher stabil und in gewissem Maße vorhersehbar sein, dennoch nicht so stabil wie „genetische Systeme“ und empfänglicher für extrinsische Einflüsse [2]. Nach der Entdeckung geprägter Gene in den 1990er Jahren wurde der Begriff „Epigenetik“ eine Zeit lang als Synonym für DNA-Methylierung verwendet und etwas später um Histonmodifikationen und *non-coding* RNAs erweitert [3]. Heute umfasst die Epigenetik alle meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind [4]. Zu epigenetischen Prozessen gehören unter anderem die genomische Prägung (vgl. 2.5), *gene silencing*, X-Inaktivierung, Positionseffekte und Reprogrammierung (vgl. 2.4.3). Die Epigenetik hat als vergleichsweise junges Forschungsfeld besonders in den 2000er Jahren rasante Fortschritte gemacht (vgl. Abb. 2.1) und die Wissenschaft der Biologie revolutioniert. Für die vorliegende

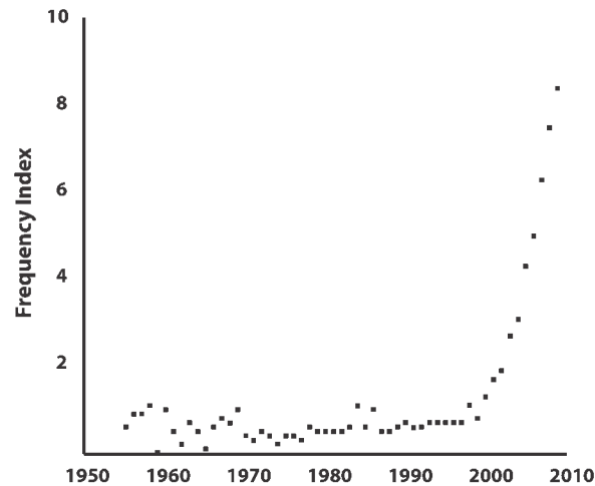


Abbildung 2.1: Relative Frequenz von Artikeln mit dem Suchbegriff „Epigenetik“ im Titel

Der *frequency index* des ISI Web of Knowledge ist die Anzahl an Titeln mit dem Suchbegriff „epigenetic“ geteilt durch die Anzahl an Titeln mit dem Suchbegriff „genetic“ multipliziert mit 100. Ein Index von 1 bedeutet ein „epigenetic“-Titel auf 100 „genetic“-Titel. [Aus [3]]

Arbeit sind vor allem die epigenetischen Mechanismen der DNA-Methylierung von Bedeutung, auf die daher im Folgenden am detailliertesten eingegangen wird.

2.2 Histonmodifikation

Histone sind basische, positiv geladene Proteine, die in eukaryotischen Genomen die DNA in Form von Nukleosomen organisieren und somit einen wichtigen Bestandteil des Chromatins bilden. Ein Oktamer besteht aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 [5]. Das Histon H1 bindet die DNA direkt neben dem Nukleosom und ist Teil der 30 nm-Faser. Ein Histon-Oktamer besteht aus einem globulären Zentrum und N-terminalen flexiblen Enden (*histone tails*), die aus dem Oktamer herausragen (vgl. Abb. 2.2 A). Für die Transkription und Replikation muss die DNA von den Histonen gelöst und diese durch Nukleosomenremodellierung verschoben werden [6]. Die Aminosäuren der *histone tails* können chemisch modifiziert werden, wodurch die Bindung der DNA an die Histone verstärkt oder geschwächt wird. Dies erlaubt eine Regulation der Transkription. Die Bezeichnung der Modifikation setzt sich aus der Nummer des Histons, der betroffenen Aminosäure und der Art der Modifikation zusammen (vgl. Tab. 2.1). Die häufigsten Modifikationen sind Acetylierung (an Lysin) und Methylierung (an Lysin und Arginin). Die Acetylierung wird durch Histon-Acetyltransferasen katalysiert, die Histon-Deacetylasen kehren den Prozess um. Die Acetylgruppe neutralisiert die positive Ladung des Lysins, wodurch die Wechselwirkung mit der DNA vermindert wird und sich die Chromatinstruktur öffnet, sodass die Bindung von Transkriptionsfak-

toren und somit die Transkription stattfinden können.

Die Histon-Methylierung kann sich sowohl begünstigend, als auch hemmend auf die Transkription auswirken. Ihre Wirkung hängt davon ab, welche Aminosäurereste betroffen sind und mit wievielen Methylgruppen sie modifiziert werden. Die Methylierung wird von Histon-Methyltransferasen erzeugt und von Histon-Demethylasen entfernt. Tabelle 2.1 zeigt Beispiele für häufige Histonmodifikationen durch Acetylierung und Methylierung und ihre Wirkung. Weitere Modifikationen sind Phosphorylierung, Ubiquitylierung, ADP-Ribosylierung, Sumoylierung, Carbonylierung, Glycosylierung, Biotinylierung und *cis-trans*-Isomerisierung an Prolinen (zusammengefasst in [7]).

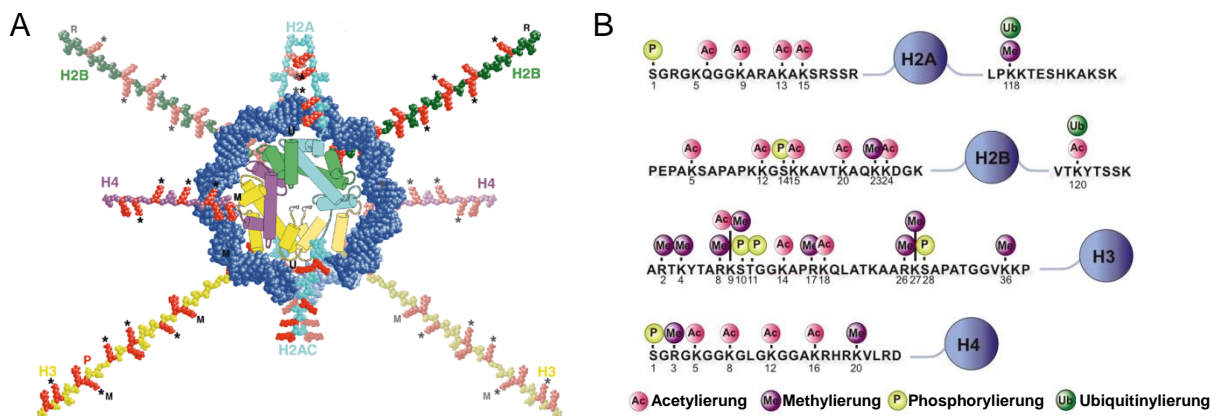


Abbildung 2.2: Aufbau und Modifikationen von Histonproteinen

A Ein Histon-Oktamer besteht aus je zwei Dimeren der Histonproteine H2A/H2B und H3/H4, deren N-terminale Enden aus dem Nukleosom herausragen. [Aus [8]] **B** Die Modifikationen der Aminosäurereste an den N-terminalen Enden der Histone ermöglichen eine reversible Regulierung der Bindung an die DNA und beeinflussen dadurch deren Transkription. [Bearbeitet nach [9]]

Die „Histon-code“-Hypothese besagt, dass Histonmodifikationen nicht nur einen direkten chemischen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben, sondern auch einen *code* bilden, der von Histon-*reader*-Proteinen gelesen werden kann. Dadurch dient die Kombination aller Modifikationen in einem Nukleosom als selektive Bindeplattform für regulatorische Proteine und beeinflusst weiterführende biologische Prozesse (zusammengefasst in [10]).

Histonmodifikation	Vorkommen
H3K9ac	aktiv transkribierte Promotoren
H3K14ac	aktiv transkribierte Promotoren
H3K4me1/2	aktive Enhancer
H3K4me2/3	aktiv transkribierte Promotoren
H3K9me3	Heterochromatin
H3K27me3	reprimierte Gene

Tabelle 2.1: Beispiele für Histonmodifikationen und deren Vorkommen

Die reversiblen Histonmodifikationen haben einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression [11–13]. ac=Acetylierung, H=Histon, K=Lysin, me=Methylierung

2.3 Non-coding RNA und RNA-Interferenz

Neben den schon lange bekannten mRNAs, die als Transkript von proteinkodierenden Genen entstehen und die Information für die Aminosäuresequenz eines Proteins vom Zellkern zu den Ribosomen transportieren, gibt es weitere RNAs, die nicht für Proteine kodieren, sondern bereits das Endprodukt der Expression darstellen und regulatorische Funktionen innehaben. Zu dieser Familie der *non-coding* RNAs (ncRNAs) gehören u.a. tRNAs, rRNAs, snoRNAs, miRNAs, piRNAs und siRNAs. ncRNAs machen beim Menschen ca. 98 % der durch Transkription gebildeten RNA aus und erfüllen vielfältige Aufgaben bei der Genregulation [14]. tRNAs (*t=transfer*) und rRNAs (*r=ribosomal*) sind wesentlich an den Mechanismen der Translation beteiligt [5]. snoRNAs (*sno=small nucleolar*) sind besonders an der Prozessierung und Modifikation von rRNA beteiligt und spielen auch eine Rolle bei der genomischen Prägung (vgl. 2.5) [15]. miRNAs (*mi=micro*) sind teilweise komplementär zu mRNA-Molekülen, meistens in deren 3'-UTR. Durch Bindung an diese mRNAs verhindern sie die Translation. Auf diese Weise können verschiedene Zelltypen die Expression von Genen über miRNA-Moleküle herunterregulieren [16]. piRNAs (*pi=Piwi-interacting*) bilden zusammen mit Piwi-Proteinen RNA-Protein-Komplexe, die besonders in Keimzellen wichtig für das *silencing* der Transkription von Transposons (vgl. 2.6) und anderen genetischen Elementen sind [17, 18]. siRNAs (*so=small interfering*) sind kurze, doppelsträngige RNAs, die einen wesentlichen Bestandteil der RNA-Interferenz (RNAi) darstellen. Sie führen zum Abbau von mRNA-Molekülen und haben damit eine regulatorische Funktion.

Die RNA-Interferenz ist ein Mechanismus zur posttranskriptionellen Regulation der Genregulation, der zum Abbau bereits transkribierter mRNA führt und damit die Translation in Proteinsequenzen verhindert. Dafür wird RNA gebildet, die zur abzubauenen mRNA (teilweise) komplementär ist. Diese liegt jedoch zunächst doppelsträngig oder

teilweise doppelsträngig vor (dsRNA). Sie dient als Vorläufermolekül für die etwa 21-22 Nukleotide langen siRNAs und wird durch Enzyme der Dicer-Familie gespalten, wobei ein zwei Nukleotide langer 3'-Überhang am 5'-Ende entsteht. Zusammen mit regulatorischen Proteinen bildet der zur Ziel-mRNA komplementäre Einzelstrang der siRNA den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Nach Bindung der mRNA wird diese endonukleolytisch abgebaut (vgl. Abb. 2.3). Hierbei stellen Proteine der Argonauten-Familie die katalytische Funktion bereit.

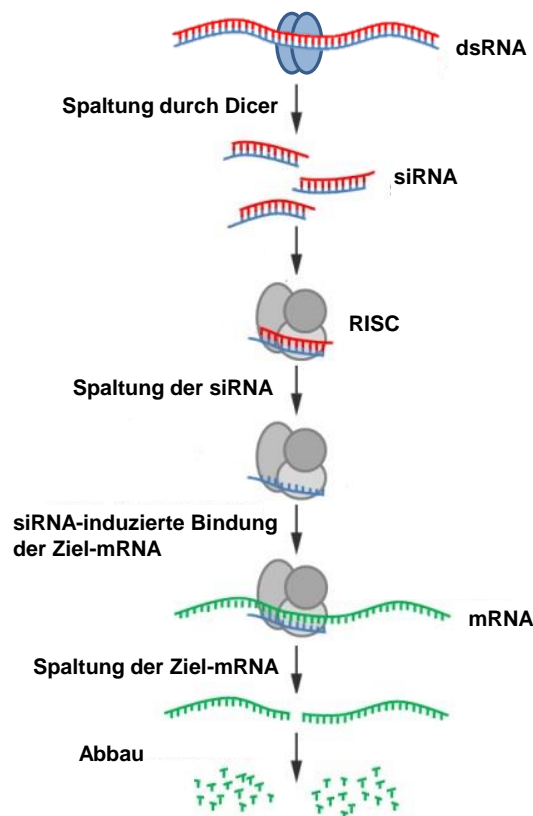


Abbildung 2.3: Mechanismus der RNA-Interferenz

Die doppelsträngige Vorläufer-RNA (dsRNA) wird von Dicer-Proteinen in siRNAs gespalten, die zusammen mit Argonauten- und anderen Proteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC) bilden. Nach Bindung der Ziel-mRNA wird diese gespalten und abgebaut. [Bearbeitet nach [19]]

Sowohl die Dicer- als auch die Argonautenproteine sind evolutionär stark konserviert und in fast allen eukaryotischen Genomen kodiert. Mutationen können zum Verlust von *RNA-silencing* führen. Vermutlich wurde dieser Mechanismus ursprünglich als Abwehrsystem gegen fremde Nucleinsäuren entwickelt, die durch Viren oder Parasiten in eine Wirtszelle eindringen können. Zusätzlich spielt er eine Rolle beim *silencing* transponierbarer Elemente (vgl. 2.6). RNAi wird heute außerdem als effiziente Technik in der Genetik verwendet, da man synthetische dsRNAs in Zellen einschleusen kann und

diese dann über den zelleigenen Mechanismus der RNAi die Expression von Zielgenen spezifisch unterdrücken (zusammengefasst in [5]).

2.4 DNA-Methylierung

2.4.1 Eigenschaften und Funktionen der DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung werden Methylgruppen durch DNA-Methyltransferasen kovalent mit dem C5-Atom von Cytosin verbunden. Da das Cytosin als Base der DNA erhalten bleibt, ist die DNA-Methylierung keine genetische Mutation, sondern eine epigenetische Modifizierung. Sie ist der bis heute am intensivsten erforschte epigenetische Regulationsmechanismus. 5-Methylcytosin (5mC) wird inzwischen auch oft als „fünfte Base der DNA“ bezeichnet.

Cytosine werden hauptsächlich im Rahmen von [5'-CG-3'/3'-GC-5']-Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG) auf beiden DNA-Strängen methyliert (vgl. Abb. 2.4 A), sodass sich die Methylgruppen in der großen Furche auf der Außenseite der DNA befinden, ohne die Basenpaarung zu behindern [20]. Im Menschen sind etwa 70 % aller CpGs methyliert [5]. CpG-arme Bereiche sind in der Regel intergenisch und hypermethyliert. Hypomethylierte CpG-reiche Bereiche, so genannte CpG-Inseln, finden sich hauptsächlich in regulatorischen Bereichen von rund 70 % aller annotierten humanen Gene [21–24]. CpG-Inseln sind meistens 0,5 kb bis 2 kb lang und haben einen GC-Gehalt von über 60 % [25]. Dabei sind sie nicht zu verwechseln mit der GC-Box etwa 60-100 bp vor Beginn eines Transkripts.

Das Cytosin-Guanin-Dinukleotid ist das einzige Dinukleotid, das in der DNA statistisch unterrepräsentiert ist (0,8 % des Genoms). Der Grund hierfür ist die Anfälligkeit von Cytosin für oxidative Deaminierung. Durch die Entfernung der Aminogruppe wird aus dem Cytosin ein Uracil, welches als Base zwar in der RNA, aber nicht in der DNA vorkommt. Es wird daher als Sequenzfehler erkannt und repariert. Betrifft die Deaminierung jedoch ein methyliertes Cytosin, so entsteht Thymin, welches nicht repariert wird und als Punktmutation verbleibt (vgl. 2.4 B) [16].

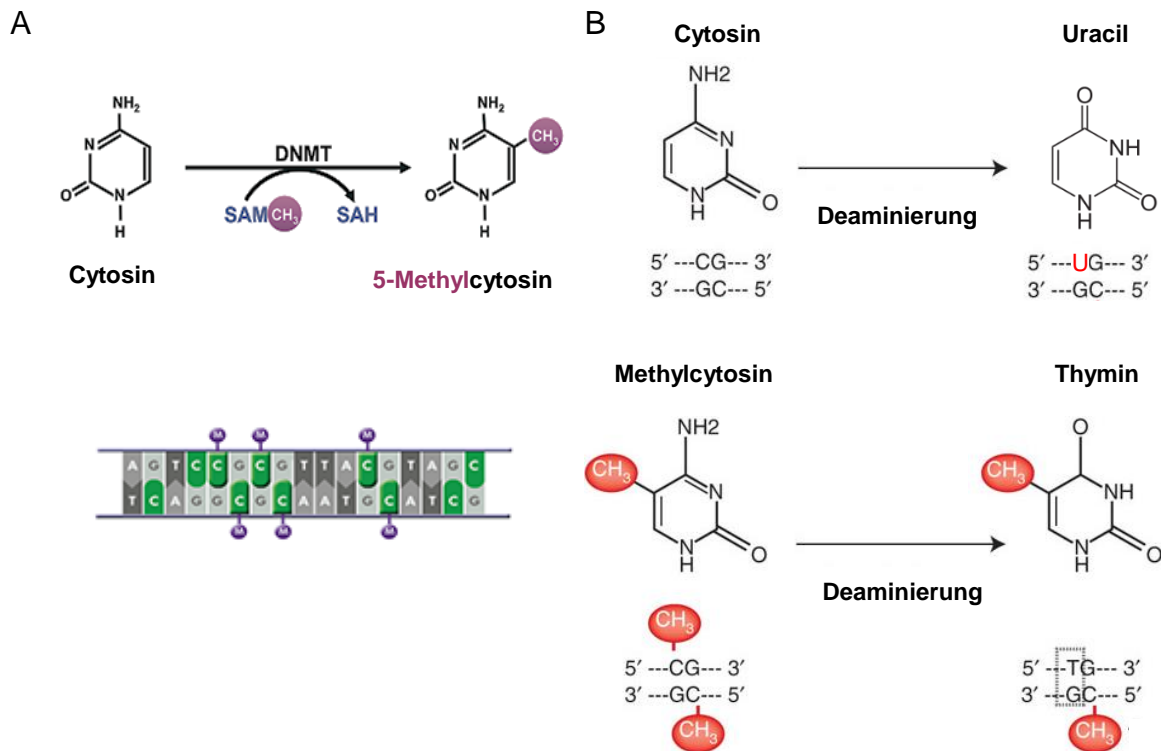


Abbildung 2.4: Methylierung von Cytosin

A Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe von SAM durch DNA-Methyltransferasen auf das C5-Atom von Cytosin übertragen. [Bearbeitet nach [26]] **B** Durch Deaminierung entsteht aus 5-Methylcytosin Thymin, was zu einer Punktmutation führt. [Bearbeitet nach [27]]

DNMT=DNA-Methyltransferase, SAH=S-adenosyl-L-Homocystein, SAM=S-Adenosylmethionin

Die DNA-Methylierung hat mehrere Funktionen innerhalb von einzelnen Zellen und in vielzelligen Organismen. Prokaryoten nutzen sie zur Unterscheidung der eigenen DNA von fremder DNA und zur Fehlerkorrektur bei der DNA-Neusynthese [28, 29]. Bei Eukaryoten ist die DNA-Methylierung ein wichtiger Ausgangspunkt zur Regulierung der Genexpression. Die Methylierung blockiert die Bindung von Transkriptionsfaktoren (z.B. an Promotoren) und führt damit zu einer Repression [30]. Methylierte DNA wird dabei von Proteinen mit Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) gebunden. Diese rekrutieren dann weitere Proteine, z.B. Histon-Deacetylasen und andere chromatinremodellierende Proteine, welche das Chromatin verdichten und zu Heterochromatin umformen. DNA-Methylierung führt also über mehrere Mechanismen zu einer Stilllegung von DNA-Abschnitten (zusammengefasst in [31]). Eine besondere Rolle spielt die reprimierende Wirkung bei der genomischen Prägung (vgl. 2.5) und beim *silencing* von transposablen Elementen (vgl. 2.6). Tumorzellen weisen meist eine geringere globale Methylierung auf als gesunde Zellen, zusätzlich sind oft einzelne Tumorsuppressorgene methyliert und damit stillgelegt [32, 33].

5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) entsteht durch die Oxidation von 5mC und bildet da-

mit eine weitere modifizierte Form von Cytosin. Seine genaue Funktion ist noch nicht weitreichend untersucht. Bekannt ist, dass es vor allem in primordialen Keimzellen (PKZ) vorkommt, in denen es eine Rolle bei der globalen Demethylierung der DNA spielt (vgl. 2.4.3). Dadurch hat es womöglich im Gegensatz zu 5mC eine aktivierende Funktion. Hohe Konzentrationen an 5hmC in Nervenzellen deuten auf eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem hin [34]. Außerdem ist es mit instabilen Nukleosomen assoziiert, die während der Zelldifferenzierung häufig repositioniert werden [35].

2.4.2 DNA-Methyltransferasen

DNA-Methyltransferasen katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM, vgl. 2.7) an das C5-Atom von Cytosin [36]. Es sind drei humane DNA-Methyltransferasen bekannt. DNMT1 erhält die bestehende Methylierung bei der Zellteilung, DNMT3A und DNMT3B katalysieren die *de novo*-Methylierung von CpGs im Rahmen der Zelldifferenzierung [37]. Strukturell bestehen die Enzyme aus einem N-terminalen regulierenden Bereich und einem C-terminalen katalytischen Bereich, die durch einen *linker* miteinander verbunden sind (vgl. Abb. 2.5).

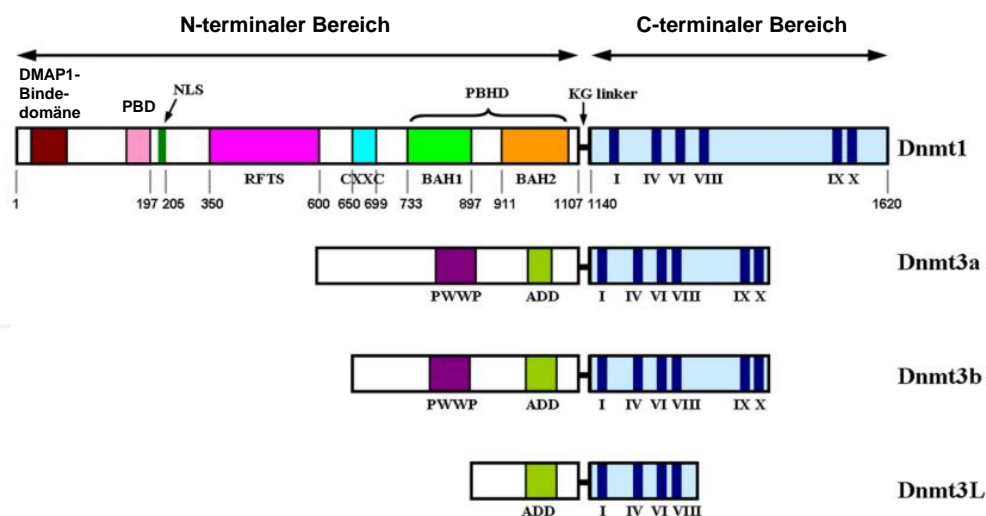


Abbildung 2.5: Struktur von DNA-Methyltransferasen bei Säugern

Alle DNA-Methyltransferasen bestehen aus einem N-terminalen Bereich mit Bindedomänen und einem C-terminalen katalytischen Bereich. Der N-terminale Bereich unterscheidet sich bei Dnmt1 von denen der Dnmt3-Familie durch Struktur und Länge. [Bearbeitet nach [37]]

ADD=ATRX–Dnmt3–Dnmt3L, BAH1/2=*bromo-associated homology*, CXXC=cysteinreiche Zn^{2+} -Bindedomäne, DMAP1=*DNA methyltransferase associated protein 1*, Dnmt=DNA-Methyltransferase, KG=Lysin/Glycin, NLS=*nuclear localization signal*, PBD=*proliferating cell nuclear antigen*-Bindedomäne, PBHD=*Polybromo homology*-Domäne, PWWP=konserviertes Pro-Trp-Trp-Pro-Motiv, RFTS=*replication foci targeting sequence*

Dnmt1 enthält folgende Domänen: Eine DMAP1-Bindedomäne (*DNA methyltransferase associated protein 1* ist ein DNA-Methyltransferase-assoziiierter Repressor), eine PCNA-Bindedomäne (*proliferating cell nuclear antigen*), mindestens 3 funktional unabhängige *nuclear localization signals* (NLS), eine RFTS-Domäne (*replication foci targeting sequence*), eine Replikationsfoci-Domäne (RFD), eine cysteinreiche Zn²⁺-Bindedomäne (CXXC), eine *Polybromo homology*-Domäne (PBHD), welche die *bromo-associated homology*-Domänen BAH1 und BAH2 enthält, und den KG-Linker (bestehend aus Lysin und Glycin), der N- und C-terminalen Bereich verbindet. Die katalytische Domäne beinhaltet eine SAM-Bindestelle, eine Cytosin-Bindestelle und eine hochvariable kleine Domäne, die sich bei verschiedenen Spezies stark unterscheidet. Zusätzlich existiert eine *target recognition domain*, die sich bei verschiedenen Methyltransferasen unterscheidet und dadurch die Substratspezifität ermöglicht. Der katalytische Bereich von Dnmt1 und Proteinen der Dnmt3-Familie sind sehr ähnlich, der N-terminale Bereich ist jedoch differentiell aufgebaut und beinhaltet nur zwei Domänen: eine cysteinreiche ADD-Domäne (*ATRX–Dnmt3–Dnmt3L*, auch *plant homeodomain* genannt), und eine PWWP-Domäne (konserviertes Pro-Trp-Trp-Pro-Motiv), welche bei Dnmt3L fehlt. Im Gegensatz zu Dnmt1 fehlen bei der Dnmt3-Familie die molekularen Interaktionen zwischen den N- und C-terminalen Bereichen (zusammengefasst in [37]). Es wird vermutet, dass sich Dnmt1 und Proteine der Dnmt3-Familie aus unterschiedlichen prokaryotischen Vorläufern entwickelt haben [38, 39].

Für die Methylierungsreaktion bindet eine DNA-Methyltransferase an eine CpG-Stelle der DNA und zusätzlich den Cofaktor SAM. Es entstehen spezifische Kontakte zwischen der Methyltransferase und den heterozyklischen Basen der DNA, außer am zu methylierenden Cytosin. Es folgt eine nukleophile Substitutionsreaktion. Diese Methylierungsreaktion kann in drei Schritte unterteilt werden: Das Cytosin wird aus der Doppelhelix herausgedreht, es bildet sich ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat und die Methylgruppe von SAM wird auf das Cytosin übertragen. Dabei forciert die negative Ladung des Cytosin-C5-Atoms dessen Alkylierung durch die Methylgruppe von SAM. Durch eine Proton-Eliminierung am Cytosin-C5-Atom und eine β -Eliminierung des Cysteinrestes im aktiven katalytischen Zentrum wird die kovalente DNA-Protein-Bindung gespalten (zusammengefasst in [37]).

Die Expression von Dnmt1 wird in der S-Phase durch zellzyklusabhängige Transkriptionsfaktoren aktiviert und ist daher in den meisten mitotischen Zellen detektierbar [40]. Es wird von NP95, einem PCNA, gebunden und zu Replikationsfoci rekrutiert, wo es die Methylierung hemimethylierter CpGs auf dem neu synthetisierten, nicht-methylierten Strang ergänzt [41–44]. In Mäusen kodiert der Dnmt1-Lokus zwei funktionell identische Isoformen: eine somatische Isoform (Dnmt1s) und eine oozytenspezifische Isoform (Dnmt1o) [45–48].

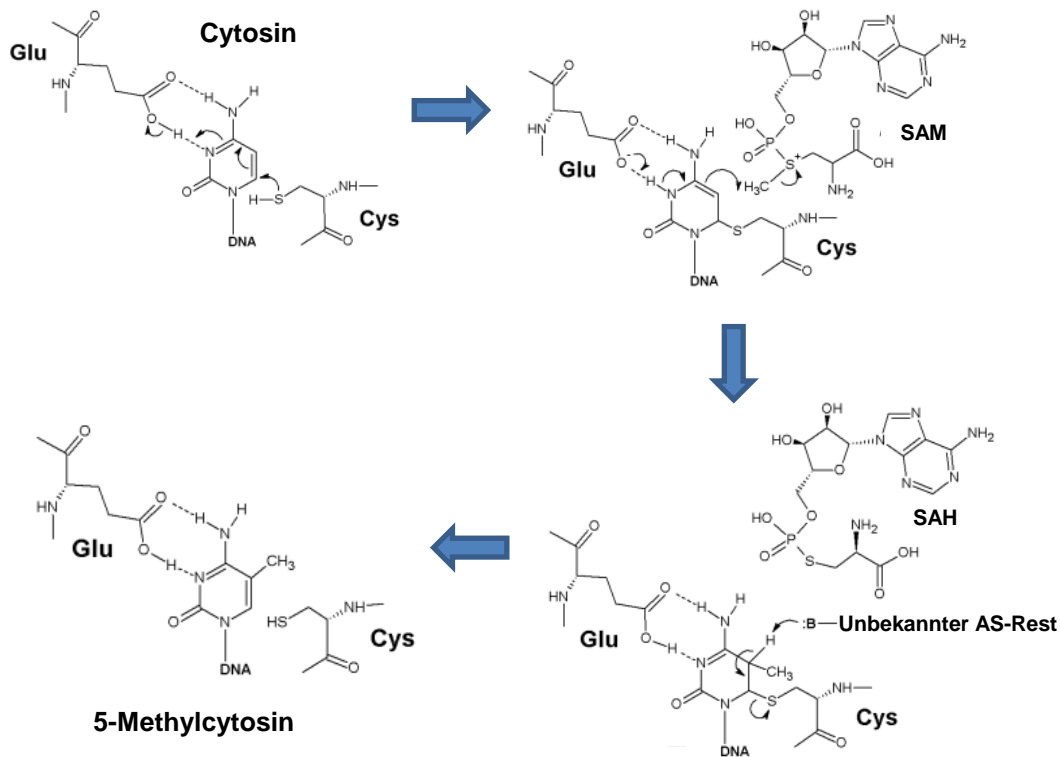


Abbildung 2.6: Mechanismus der Cytosinmethylierung

Die Cytosinmethylierung ist eine von DNA-Methyltransferasen katalysierte nukleophile Substitutionsreaktion, bei der eine Methylgruppe von SAM auf Cytosin übertragen wird. Das Cytosin wird aus der Doppelhelix herausgedreht, die negative Ladung des C5-Atoms forciert dessen Alkylierung. Durch eine Proton-Eliminierung am Cytosin-C5-Atom und eine β -Eliminierung des Cysteinrestes im aktiven katalytischen Zentrum wird die kovalente DNA-Protein-Bindung gespalten. [Bearbeitet nach [37]]

AS=Aminosäure, Cys=Cystein, Glu=Glutaminsäure, SAH=S-adenosyl-L-Homocystein, SAM=S-Adenosylmethionin

DNMT3A und DNMT3B agieren als *de novo*-DNA-Methyltransferasen [49]. DNMT3A etabliert die differentiellen DNA-Methylierungsmuster an *imprinting control regions* (ICR, vgl. 2.5) in männlichen und weiblichen Gameten und ist vor allem in Oozyten und frühen embryonalen Stadien detektierbar [50, 51]. Dnmt3b methyliert Mikrosatelliten-*repeats* [37]. Es wird in der Zygote aktiviert und im Blastozystenstadium am stärksten exprimiert, wobei seine Expression hier auf Epiblastenzellen beschränkt ist [52]. Der *de novo*-DNA-Methyltransferase DNMT3L fehlt die charakteristische N-terminale katalytische Domäne, dennoch ist sie wichtig für die Etablierung der ICR-Methylierung in Gameten, da sie als aktivierender Cofaktor von DNMT3A/B fungiert [53–57].

Die Demethylierung des Genoms kann sowohl aktiv als auch passiv vonstattengehen. Passive Demethylierung während der Replikation kann durch den Ausschluss oder die

Repression von DNMT1 oder NP95 erreicht werden. Dies ermöglicht jedoch nur eine globale Demethylierung [25].

Eine indirekte, aktive DNA-Demethylierung könnte durch die Deaminierung von 5mC zu Thymin durch eine Deaminase erreicht werden. Diese führt zu einer T/G-Fehlpaarung, die von der Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) oder dem *methyl-CpG-binding domain protein 4* (MBD4) erkannt wird. Daraufhin wird das Thymin entfernt und die *base pair excision repair*-Maschinerie (BER) setzt ein unmethyliertes Cytosin ein [58]. Auch TET-Enzyme spielen eine Rolle bei der indirekten aktiven Demethylierung, da sie die Oxidation von 5mC zu 5hmC katalysieren, was dann wiederum die passive Demethylierung (vgl. 2.4.3) erleichtert (zusammengefasst in [25]).

Desweiteren existiert eine methylgruppenabspaltende DNA-Demethylase, deren Aktivität jedoch bisher nur *in vitro* nachgewiesen wurde [59].

2.4.3 DNA-Methylierung während der embryonalen Reprogrammierung und Gametogenese

Während der Embryonalentwicklung stehen die einzelnen Zellen im Embryo vor der Herausforderung, trotz identischer DNA-Sequenz unterschiedliche Genexpressionsmuster auszubilden und sich damit zu unterschiedlichen Zelltypen zu entwickeln. Zusätzlich müssen einmal festgelegte Informationen stabil an die Tochterzellen vererbt werden. Hierfür bilden epigenetische Mechanismen die Barrieren, die dafür sorgen, dass die Spezifizierung zu bestimmten Zelltypen für die Tochterzellen festgelegt bleibt. Für die sexuelle Reproduktion des fertig entwickelten Organismus ist es jedoch erforderlich, dass seine Keimzellen in einen totipotenten Zustand versetzt und die DNA-Methylierung geprägter Gene (vgl. 2.5) geschlechtsspezifisch festgelegt wird. Die epigenetischen somatischen Signaturen müssen in diesen Zellen entfernt und neu gesetzt werden (zusammengefasst in [25]).

In Säugern entstehen während der Embryonalentwicklung aus ektodermalen Vorläufern zunächst die primordialen Keimzellen (PKZ), welche dementsprechend bereits somatische Transkriptionsprofile, Chromatinmodifikationen und DNA-Methylierungsmuster aufweisen [60–64]. Diese Zellen wandern nun aus dem Dottersack in die Genitalleiste ein [25, 65] und bleiben währenddessen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert [66]. Dabei vollziehen sie eine epigenetische Reprogrammierung, bei der Pluripotentogene reexprimiert werden und die DNA-Methylierung fast vollständig entfernt wird (vgl. Abb. 2.7). Es ist nicht ganz geklärt, ob diese Demethylierung aktiv oder passiv vonstattengeht. Nach Untersuchungen in der Maus wird derzeit von einem Zwei-Schritt-Modell ausgegangen, bei dem zunächst eine passive Demethylierung stattfindet. Die *de novo*-Methyltransferasen Dnmt3a/b (vgl. 2.4.2) werden während der gesamten Reprogrammierung reprimiert [64, 67–70]. Die Methyltransferase Dnmt1 wird zwar expri-

miert, jedoch wird ihr essentieller Cofaktor Np95 reprimiert [64, 69, 70]. Die Demethylierung betrifft das ganze Genom inkl. Promotoren, CpG-Inseln, Introns, Exons und intergenische Regionen. Allerdings scheinen geprägte Gene, Promotoren von Genen, die für die Keimzellbildung und Meiose wichtig sind und CpG-Inseln des inaktivierten X-Chromosoms vor dieser Demethylierung geschützt zu sein oder langsamer demethyliert und erst in einem zweiten Schritt vollständig hypomethyliert zu werden [64]. Hierbei spielen womöglich aktive Mechanismen eine Rolle [64, 71–73].

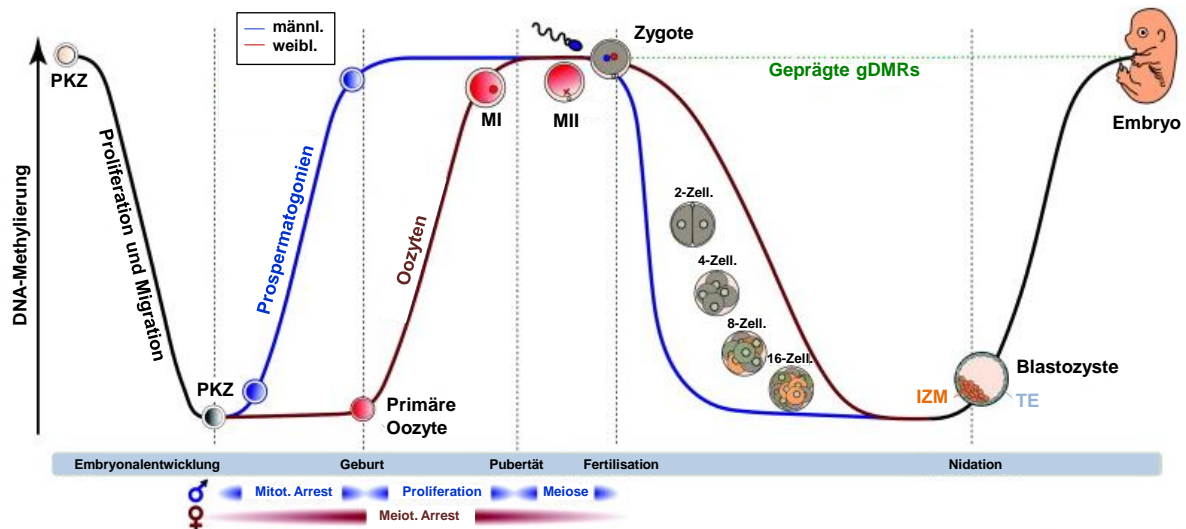


Abbildung 2.7: DNA-Methylierung während der embryonalen Reprogrammierung und Gametogenese

Die PKZ weisen nach ihrer Entstehung ein somatisches DNA-Methylierungsmuster auf. Während ihrer Migration in die Genitalleiste wird die DNA-Methylierung fast vollständig entfernt, anschließend werden die Methylierungsmuster geschlechtsspezifisch neu gesetzt. Nach der Befruchtung folgt eine erneute Demethylierung, bei der jedoch die Methylierung der geprägten Gene erhalten bleibt. Es folgt eine *de novo*-Hypermethylierung. [Bearbeitet nach [74]]

gDMRs=*germline differentially methylated region*, IZM=Innere Zellmasse, M=Meiose, männl.=männlich, Mitot.=Mitotischer, PKZ=Primordiale Keimzelle, TE=Trophectoderm, weibl.=weiblich, Zell.=Zellstadium

Auf die Demethylierung des gesamten Genoms folgt die Neusetzung der geschlechtsspezifischen DNA-Methylierungsmuster, welche in Prospermatogonien und Oozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet [75, 76]. Die Methylierung in Prospermatogonien ist bei der Geburt fertig etabliert und bleibt während der mitotischen und meiotischen Zellteilungen aufrecht erhalten [77, 78]. Dabei ist die DNA zu 80-90 % methyliert [63]. Die Remethylierung in Oozyten beginnt bei der Geburt während der Wachstumsphase der Oozyten, wobei die Zellen in der Prophase I der Meiose arretiert sind [79]. Nach der Remethylierung, wonach die DNA zu etwa 40 % methyliert ist, bleibt die Eizelle in der Meiose II arretiert [25].

Nach der Befruchtung erfolgt eine erneute Demethylierung, die sich jedoch von der Demethylierung in den PKZ dadurch unterscheidet, dass die Methylierungsmuster der geprägten Gene aufrechterhalten werden (vgl. Abb. 2.7). Dies erlaubt auch in späteren Gewebetypen eine *parent-of-origin*-spezifische Genexpression. Diese Demethylierung läuft bei den beiden parental Genomen unterschiedlich schnell ab [80–83].

Das paternale Genom wird aktiv demethyliert, die resultierende Hypomethylierung ist bereits vor der ersten Zellteilung vollendet [82, 84].

Das Enzym TET3 oxidiert 5mC zu 5hmC, was wiederum zur Umwandlung von 5hmC zu 5fC (5-Formylcytosin) und 5caC (5-Carboxylcytosin) führt. In der frühen Zygote ist TET3 spezifisch im paternalen Pronukleus lokalisiert [85]. 5hmC erleichtert die passive Demethylierung der DNA, da es von DNMT1 kaum als methyliertes Cytosin erkannt und somit die DNA-Methylierung an dieser Stelle nicht von DNMT1 aufrechterhalten wird [86]. Damit behalten nur einige Regionen der DNA ihr 5mC-Methylierungsmuster. Allerdings reicht dies nicht aus, damit bereits vor der ersten Furchungsteilung sämtliche betroffenen Cytosine unmodifiziert vorliegen [25]. Der Basenexzisionsreparatur-Signalweg (BER) könnte bei der Entfernung der hydroxylierten Methylgruppen eine Rolle spielen. Viele Komponenten dieses Signalweges sind spezifisch im paternalen Pronukleus lokalisiert [62, 84] und einige sind für die Demethylierung unerlässlich [87]. Die genaue Rolle des BER im Zusammenhang mit der DNA-Demethylierung des paternalen Genoms muss jedoch noch genauer untersucht werden. Die Carboxylgruppe von 5caC wird von der Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) abgespalten und somit eine abasische Stelle generiert, die von BER durch die Insertion von 2'-Desoxycytidin repariert wird. Somit entsteht Cytosin in einem unmodifizierten Zustand [88, 89]. TDG könnte daher auch eine Rolle bei der aktiven Demethylierung spielen, ebenso wie vielleicht andere glykosylierende Enzyme [25].

Das Genom im maternalen Pronukleus ist nicht von der Aktivität von TET3 betroffen, da es durch das Protein STELLA vor der Oxidation von 5mC geschützt wird [90–92]. Es interagiert mit der im maternalen Genom angereicherten Histonmodifikation H3K9me2 [93], was zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führt und dadurch die Bindung von TET3 verhindert [94]. STELLA ist zwar auch im paternalen Pronukleus vorhanden, seine Bindung ist dort aber nur schwach ausgeprägt [94]. Dort schützt es aber z.B. die zwei paternal geprägten Genloci *Rasgrf1* und *H19* (nicht jedoch die *Meg3-IG-DMR*) vor Demethylierung [91], da diese die Histonmodifikation H3K9me2 während der Spermatogenese beibehalten [94].

Die Demethylierung des maternalen Genoms erfolgt passiv durch die Entfernung von DNMT1 aus dem Kern [95, 96], wodurch die DNA-Methylierung über die Zellteilungen hinweg nicht aufrechterhalten wird. Da jedoch die Methylierung der geprägten Regionen aufrechterhalten werden muss, ist die oozytenspezifische Form DNMT1o transient im Kern vorhanden [95, 97, 98]. Die somatische Form DNMT1s ist erst wieder in den

Zellkernen der Blastozyste nachweisbar [25].

Die Notwendigkeit der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms ist noch nicht ganz verstanden. Bei Verlust von TET3 erfolgt dennoch eine normale Entwicklung [85]. In einigen Säugern folgt auf die aktive Demethylierung des paternalen Genoms eine sofortige *de novo*-Remethylierung noch vor der parallelen, passiven Demethylierung des maternalen und paternalen Genoms [99–101]. Eventuell ist die aktive Demethylierung nur ein Zusatzmechanismus, um die Reprogrammierung effizienter zu gestalten. Eine andere Hypothese geht davon aus, dass die Oozyte unterscheidende paternale Muster entfernen will, um jedem Embryo eine gleiche Entwicklung zu ermöglichen. Bei dieser *interest of the mother*-Hypothese sollen maternale Ressourcen gleichermaßen auf ihre Nachkommen verteilt werden, wofür jedoch paternale epigenetische Muster entfernt werden müssen, durch die ein spezieller Embryo bevorzugt werden würde (vgl. 2.5) [102].

Im Gegensatz zur Maus ist beim Menschen die Demethylierung bereits im 2-Zell-Stadium abgeschlossen, bei der Maus reicht sie bis zum Blastozystenstadium (vgl. Abb. 2.7). Es folgt eine *de novo*-Methylierung, die von den DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b katalysiert wird und zu einer genomweiten Hypermethylierung führt [103]. Dabei bleiben Regionen mit hoher CpG-Dichte (u.a. Promotoren und Enhancer) eher hypomethyliert, wohingegen Regionen mit niedriger CpG-Dichte hypermethyliert werden [104].

2.5 Genomische Prägung

Die genomische Prägung (engl. *genomic imprinting*) bezeichnet epigenetische Mechanismen, die zu einer uniparentalen Expression einzelner Allele sogenannter geprägter Gene führen [105]. Diese Prägung wird während der Entwicklung beibehalten, sodass eine Stilllegung des maternalen oder paternalen Allels und damit die ausschließliche Expression des anderen Allels an Tochterzellen vererbt werden. Im Menschen sind über 100 geprägte Gene bekannt [106], von denen die meisten in teilweise mehrere hundert Kilobasen umfassenden *clustern* organisiert sind [107, 108]. Diese weisen sog. *differentially methylated regions* (DMRs) auf, die sich auf den beiden parental Allelen durch differenzielle DNA-Methylierung und Histonmodifikationen unterscheiden [109–112], wobei die Unterschiede in der DNA-Methylierung bisher weitaus umfassender untersucht worden sind. Die meisten dieser DMRs agieren als *imprinting control regions* (ICRs), die wichtig für die Etablierung und Aufrechterhaltung der differenziellen DNA-Methylierung sind [112, 113]. Je nach Lage im Genom lassen sich diese ICRs in zwei Gruppen einteilen: ICRs in Genpromotoren und ICRs in intergenischen Regionen. Bei Promotor-ICRs ist das Genprodukt des unmethylierten Allels

meistens eine *non-coding* RNA (vgl. 2.3). Diese ncRNAs können proteinkodierende Gene in *cis* reprimieren und dadurch auch geprägte Gene beeinflussen [114, 115]. Promotor-ICRs sind immer maternal, intergenische ICRs paternal methyliert [112]. In den Keimzellen eines Organismus werden zunächst die *germline differentially methylated regions* (gDMRs) etabliert, also Regionen, die auf den parental Chromosomen unterschiedliche Methylierungsmuster aufweisen (vgl. 2.4.3). Diese DMRs werden auch während der Differenzierung beibehalten. Zusätzlich zu den gDMRs werden nach der Befruchtung somatische DMRs (sDMRs) etabliert. Ihre Methylierung ist abhängig von der differentiellen Methylierung der gDMRs, daher werden gDMRs und sDMRs auch als primäre und sekundäre DMRs bezeichnet. Die sDMRs befinden sich oft in Promotoren geprägter Gene innerhalb eines *imprinting clusters* und regulieren wahrscheinlich deren entwicklungs- oder gewebsspezifische allelische Expression (zusammengefasst in [112]).

Eines der best untersuchtesten *imprinting cluster* ist der *H19-Igf2*-Lokus [116]. *H19* kodiert für eine ncRNA (vgl. 2.3) [117, 118], IGF2 ist ein Hormon, das bei der Regulierung von Zellproliferation, -wachstum, -migration und -differenzierung eine Rolle spielt (zusammengefasst in [119]). Für die Funktionsweise dieses *clusters* werden zwei Modelle diskutiert: Das „Isolator-Modell“ und das „Chromatin-*loop*-Modell“ (vgl. Abb. 2.8). Grundlage für das Isolator-Modell sind Bindemotive für das CTCF-Zinkfingerprotein, welches dadurch an die unmethylierte ICR (auf dem maternalen Allel) binden kann. Dadurch unterdrückt es die Wirkung der stromabwärts von *H19* liegenden Enhancer und somit die Transkription des maternalen *Igf2*-Allels. *H19* kann hingegen transkribiert werden. Da die ICR auf dem paternalen Allel methyliert ist, kann CTCF hier nicht binden, wodurch die Transkription von *Igf2* möglich ist. Hier ist jedoch der Promotor von *H19* methyliert, sodass die paternale *H19*-Expression unterdrückt wird [120, 121]. Beim „Chromatin-*loop*-Modell“ agiert die maternal unmethylierte ICR mit der DMR1 von *Igf2*, wodurch ein *loop* entsteht, der durch die dreidimensionale Anordnung in einen repressiven Bereich des Zellkerns gebracht wird. Auf dem paternalen Allel agiert die ICR mit der DMR2 von *Igf2*. Dadurch wird die dreidimensionale Struktur so verändert, dass der *loop* in einem permissiven Bereich des Zellkerns positioniert wird [122].

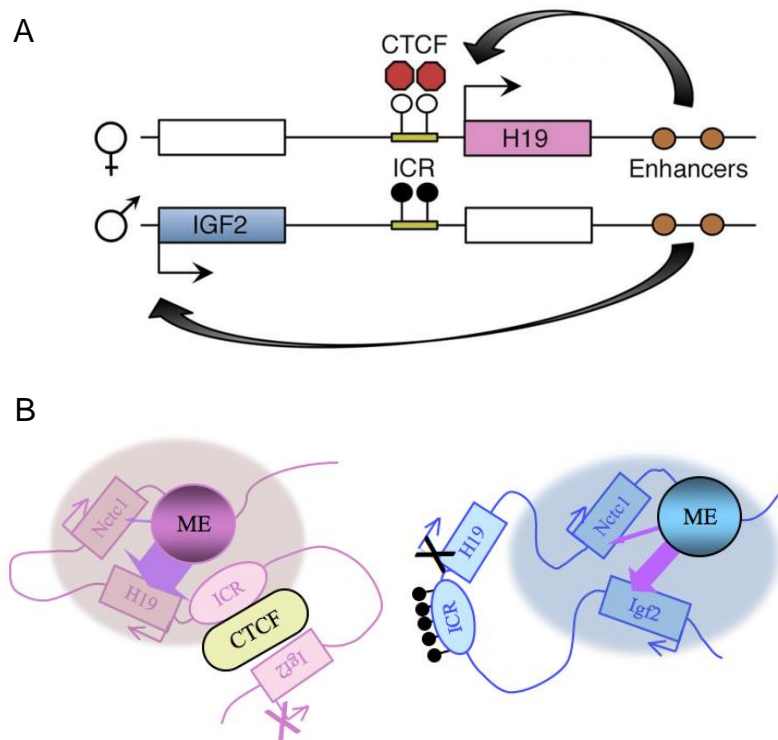


Abbildung 2.8: Funktionsweise des *H19-Igf2*-Lokus

A Isolator-Modell: CTCF bindet am unmethylierten maternalen Allel und unterdrückt die Enhancer-Wirkung auf *Igf2*, *H19* wird exprimiert. Am methylierten paternalen Allel kann CTCF nicht binden, *Igf2* wird exprimiert. Zusätzlich ist der *H19*-Promotor methyliert, *H19* wird nicht exprimiert. [Bearbeitet nach [123]] **B** Chromatin-loop-Modell: Die maternal unmethylierte ICR agiert mit DMR1 von *Igf2*, der entstehende *loop* liegt im repressiven Bereich des Zellkerns. Die paternal methylierte ICR agiert mit DMR2 von *Igf2*, der *loop* liegt im permissiven Zellkernbereich. [Bearbeitet nach [124]]

Geprägte Gene können auch außerhalb von *imprinting clustern* vorliegen. Hierbei liegt die ICR im Promotorbereich, wobei ihre unterschiedliche Methylierung direkt mit der Genaktivität gekoppelt ist. Zu diesen *singletons* gehören z.B. gewebsspezifisch geprägte Gene und Retrogene [112]. Eine gewebsspezifische Prägung ist durch die Verwendung alternativer Promotoren mit unterschiedlichen *imprinting*-Mustern möglich, wodurch geprägte Gene sowohl mono- als auch biallelisch exprimiert werden können [112]. DNA-Methylierung und Histonmodifikationsprofile an den Promotoren repräsentieren dabei die Expression der Transkripte [125, 126]. Differentielle Histonmodifikationsprofile sind wie die differentielle DNA-Methylierung charakteristisch für geprägte Gene. So sind die Histonmodifikationen H3K9me3 und H4K20me3 an der *transcription start site* (TSS) von geprägten Genen mit methylierten Promotoren häufiger anzutreffen als bei biallelisch unmethylierten (also nicht geprägten) Promotoren. Diese beiden Histonmodifikationen kommen auch verstärkt im Heterochromatin vor [12, 127–129]. Bei nicht-geprägten Genen sind eher die Modifikationen H3K4me3 (aktivierend) und H3K27me3 (reprimierend) vorhanden (vgl. 2.2). Desweiteren unterscheiden sich die

Histonmodifikationsprofile von gDMRs von sDMRs. Beispielsweise gibt es im *Gnas*-Lokus zwei gDMRs, jedoch fungiert nur die DMR im *Nespas*-Promotor wirklich als ICR. Nur sie weist das spezifische Histonmodifikationsprofil auf. Dieses und andere Beispiele unterstützen die Theorie, dass es sich bei diesem Histonmodifikationsprofil tatsächlich um epigenetische Marker für ICRs handelt [112, 130].

Genomische Prägung wurde bereits in Pflanzen und Insekten nachgewiesen [131, 132]. Bei höheren Säugetieren ist sie jedoch am weitesten verbreitet und weist dabei in Plazentatieren (Eutheria) die höchste Komplexität auf [133, 134]. Aus evolutionärer Sicht betrachtet stellt diese Form der Genregulation einige Risiken bereit. Eine biallelische Expression birgt die Möglichkeit, dass monoallelische nachteilige Mutationen durch das zweite Allel ausgeglichen werden können. Darauf wird bei genomischer Prägung verzichtet [135]. Zudem kann eine uniparentale diploide Vererbung eines Allels durch genomische Prägung zu fehlerhafter Genregulation führen, die schwerwiegende Auswirkungen auf den gesamten Organismus (vgl. 2.5.1) haben kann [136, 137]. Das bekannteste Modell, um die Verbreitung dieser nachteiligen Form der Genregulation zu erklären, ist die „genetische Konflikthypothese“ nach Moore und Haig. Demnach rivalisieren die beiden parentalen Genome im Embryo um die maternalen Ressourcen. Das väterliche Interesse besteht vor allem in der optimalen Versorgung und Wachstum des Embryos, auch wenn deren Ausmaße zum Nachteil der Mutter geraten. Die Mutter dagegen möchte bei allen ihren Nachkommen die gleichen Versorgungsmöglichkeiten bereitstellen [102, 138]. Es hat sich herausgestellt, dass viele paternal exprimierte Gene - besonders im Hinblick auf die Ausbildung der Plazenta - wachstumsfördernd sind. Maternal exprimierte Gene hingegen versuchen, dieses Wachstum zu unterdrücken und schaffen somit einen Ausgleich, der das Verhältnis zwischen embryonalem Wachstum und Ressourcenschonung der Mutter harmonisiert (zusammengefasst in [137, 139]).

Inzwischen geht man davon aus, dass sich die Genexpressionsregulierung durch *imprinting* in Säugetieren im Vergleich zu niederen Tieren besonders zur Stilllegung der deutlich häufiger im Genom vorkommenden Transposons (vgl. 2.6) durchgesetzt hat [140].

2.5.1 Humane *imprinting*-Erkrankungen

Bei aberranter genomischer Prägung kann es zu sog. *imprinting*-Erkrankungen kommen. Ursachen dafür sind z.B. uniparentale Disomie, Deletionen in geprägten Genen oder aberrante Methylierungen in ICRs. Je nachdem, ob dadurch das maternale oder paternale Allel fälschlicherweise aktiviert oder inaktiviert wird, bilden sich verschiedene Syndrome aus, die oft mit mentaler Retardierung und körperlichen Dysmorphien ein-

hergehen. Die bekanntesten humanen Beispiele sind zum einen das Angelman (AS)- und das Prader-Willi (PWS)-Syndrom, zum anderen das Beckwith-Wiedemann (BWS)- und das Silver-Russell (SRS)-Syndrom. AS und PWS sind neurogenetische Erkrankungen, die auf eine fehlerhafte Prägung der chromosomalen Region 15q11q13 zurückzuführen sind. Sie gehen mit Symptomen wie muskulärer Hypotonie, Kleinwuchs und Hypogonadismus (PWS) bzw. Wachstumsstörungen, Schielen und Epilepsie (AS) sowie Schlaf- und Sprachstörungen und mentaler Retardierung einher. Das AS wird durch eine Defizienz des *UBE3A*-Gens hervorgerufen, das im Gehirn vom maternalen Allel exprimiert wird. Die Ursache ist meistens eine Deletion auf dem maternalen Allel, in einigen Fällen eine Mutation des *UBE3A*-Gens und in seltenen Fällen eine paternale uniparentale Disomie 15. Umgekehrt liegt bei PWS-Patienten meistens eine paternale Deletion oder in seltenen Fällen eine maternale uniparentale Disomie 15 vor [141]. Die Region 15q11q13 beinhaltet eine Gruppe geprägter Gene, die entweder paternal oder maternal exprimiert werden. Zu den paternal exprimierten Genen gehören u.a. *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2*, *SNURF-SNRPN* und einige snoRNA-Gene, welche vermutlich bei der Modifizierung von mRNAs eine Rolle spielen [142–144]. Die Expression dieser Gene wird durch die *parent of origin*-spezifische Methylierung der Genpromotoren reguliert. Das komplexeste Gen ist *SNURF-SNRPN*, welches sowohl das *UBE3A*-Gen in antisense-Orientierung als auch viele sno-RNA-Gene umspannt und dessen Promotor mit der regulierenden ICR überlappt. Durch die Prägung von *SNURF-SNRPN* wird dadurch auch die Expression der umspannten Gene gesteuert (zusammengefasst in [141]). Über eine Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Promotors kann eine molekulargenetische Diagnose von AS/PWS erfolgen.

Beim BWS und beim SRS ist die chromosomale Region 11p15.5 betroffen. Neben den körperlichen Symptomen des BWS, wozu unter anderem Gigantismus, Makroglossie und faziale Dysmorphien zählen, weisen Betroffene zudem ein erhöhtes Risiko für Tumorentwicklungen im Kindesalter auf [145–147]. Das SRS äußert sich vor allem in Minderwuchs und charakteristischer Fazies [148, 149]. In der Region 11p15.5 liegen zwei Kontrollregionen (ICR1 und ICR2), die bei BWS (beide ICRs) und SRS (ICR1) eine Rolle spielen. Die ICR1 reguliert die Expression von *H19* und *IGF2*. Eine Hypermethylierung dieser Region führt in einigen Fällen von BWS zu einer biallelischen Expression von *IGF2*, welches normalerweise maternal geprägt ist. Die ICR2 reguliert die Expression der Gene *CDKN1C*, *KCNQ1* und *KCNQ1OT*. Sie ist in etwa der Hälfte der BWS-Patienten hypomethyliert, was zu einer verringerten Expression des Gens *CDKN1C* führt. Bei etwa 25-35 % der Betroffenen liegt eine segmentale paternale uniparentale Disomie der Region 11p15.5 oder eine Mutation im maternal exprimierten *CDKN1C*-Gen vor [147, 150–152]. Über 40 % der SRS-Patienten weisen dagegen eine Hypomethylierung der ICR1 auf dem paternalen Allel auf [153]. In einigen Fällen kann auch eine maternale uniparentale Disomie 7 zum SRS führen [154].

Die epigenetischen Mechanismen für die aufgeführten Syndrome sind in Mensch und Maus konserviert, sodass diese Krankheiten am Mausmodell erforscht und Therapieansätze entwickelt werden können [155]. *imprinting*-Störungen werden inzwischen auch im Zusammenhang mit komplexen Krankheiten und Krankheiten mit hoch variabler Ausprägung diskutiert, z.B. Autismus, Alzheimer, Diabetes (Typ 1 und 2) und Schizophrenie [156]. Außerdem finden sich Epimutationen auch in sowohl sporadischen als auch familiär vererbaren Krebsformen [157–159]. Aktuelle Studien erforschen zudem Gründe für ein erhöhtes Risiko für *imprinting*-Erkrankungen bei Kindern, die mit Hilfe von *in vitro*-Fertilisation oder intrazytoplasmatischer Spermieninjektion gezeugt wurden [160, 161].

2.6 Repetitive und transponierbare Elemente

Bei der DNA-Sequenz eines Genoms lassen sich zwei Gruppen von Sequenzabschnitten unterscheiden: *single copy*-DNA, deren Sequenz einmal im Genom vorkommt, und repetitive Elemente, deren Sequenzen mehrfach im Genom vorhanden sind. Die *single copy*-DNA beinhaltet fast alle proteinkodierenden DNA-Abschnitte. Bei mittelrepetitiver DNA liegen zwei bis hundert Sequenzkopien pro Genom vor. Das bekannteste Beispiel hierfür sind tRNA-Gene. Hochrepetitive DNA wird fast ausschließlich nicht transkribiert und besteht aus sich wiederholenden Sequenzabschnitten oft sehr kurzer Einheiten (Di- bis Pentanukleotide), die in bis zu zehntausend Kopien im Genom enthalten sind. Hierzu gehören z.B. *long terminal repeats* (LTRs), Satelliten-DNA, *short interspersed nuclear elements* (SINEs) und *long interspersed nuclear elements* (LINEs) [5].

Transposons sind repetitive Elemente, die etwa 45 % des Gesamtgenoms einer Säugerzelle ausmachen und die ihre Position im Genom über eine mobile Zwischenstufe verändern können [5]. Sie kodieren für Transposase-Enzyme, die ihre eigene kodierende DNA-Sequenz aus der DNA herausschneiden (*cut and paste*-Mechanismus) oder kopieren (*copy and paste*-Mechanismus) und an anderer Stelle im Genom wieder integrieren können (vgl. Abb. 2.9 A). Beim *cut and paste*-Mechanismus erkennt die Transposase ihre DNA-Sequenz durch flankierende, gegenläufig identische *repeats*, es entsteht eine mobile DNA-Zwischenstufe (DNA-Transposon). Im Gegensatz dazu wird beim *copy and paste*-Mechanismus die ursprüngliche DNA-Sequenz transkribiert, die entstehende mobile mRNA in cDNA umgeschrieben und diese wieder ins Genom integriert (Retrotransposon) (zusammengefasst in [162]). Bei der Integration eines Transposons entstehen kurze Duplikationen der Ziel-DNA (*target site duplication*), welche das integrierte Transposon zusätzlich flankieren [5]. Die Unterteilung von Retrotransposons in zwei Klassen richtet sich nach der An- bzw. Abwesenheit von flankierenden LTRs. Vollständige LTR-Retrotransposons enthalten kodierende Sequenzen

für die für die Transposition notwendigen Enzyme (Protease, reverse Transkriptase, Ribonuklease, Integrase). Nicht-LTR-Retrotransposons beinhalten keine reverse Transkriptase und sind daher in Bezug auf die Transposition nicht autonom [5, 163].

Das häufigste Nicht-LTR-Retrotransposon in Säugetieren ist LINE1, von dem etwa 500.000 verkürzte und bis zu 5000 vollständige Kopien über das menschliche Genom verteilt [164] und besonders in Gen-ärmeren Regionen zu finden sind [165]. Diese beinhalten einen Promotor am 5'-Ende und zwei *open reading frames* (ORFs), welche für Proteine mit DNA-Bindedomäne bzw. Endonuklease-/reverse Transkriptase- und Zinkfingerdomäne kodieren. Die 3'-UTR beinhaltet eine polyadenylierte Region (zusammengefasst in [162]). Das Poly-A-Signal der LINE1-RNA ist jedoch labil. Dadurch entstehen Fehler in der Spaltung der RNA, sodass diese erst am nächsten stromabwärts gelegenen Poly-A-Signal stattfindet. Dies hat mehrere Konsequenzen. Zum einen können sich LINE1-Elemente in Introns anderer Gene aufhalten, ohne den Transkriptionsprozess dieser Gene zu stören, wodurch ihre Ausbreitung erleichtert wird. Zum anderen können LINE1-Elemente bei der Transposition ihre 3'-flankierenden Sequenzen „mitnehmen“. Diese 3'-Transduktion tritt bei etwa 15-23 % der Retrotranspositionseignisse von LINE1-Elementen auf und wurde bereits in Zellkulturen demonstriert [162, 166–168]. Obwohl die Transduktion funktionaler Sequenzen noch nicht beschrieben wurde, haben diese Ereignisse womöglich das Potential, z.B. Exons, Promotoren und Enhancer zu verschieben und damit neue Gene zu schaffen [167]. So ist es wahrscheinlich, dass die Transduktion bei der LINE1-Retrotransposition die Diversität und die Größe des Genoms im Lauf der Evolution stark vergrößert hat. Tatsächlich sind alle Nicht-LTR-Retrotransposons einschließlich LINE1 evolutionär miteinander verwandt und bilden eine Element-Klasse, die mindestens 600 Millionen Jahre alt ist [169].

Alu-Elemente gehören zur Klasse der SINEs und machen mit ungefähr 1 Million Kopien etwa 10-12 % des menschlichen Genoms aus [162, 165]. Sie sind damit die häufigsten transponierbaren Elemente (TE) im menschlichen Genom. Die Alu-Elemente haben ihren Ursprung in Teilen des Ribosomkomplexes [170]. Sie sind etwa 300 bp lang und befinden sich vor allem in Introns, 3'-UTRs und intergenischen Regionen. Obwohl sie kein Protein kodieren, werden sie von der RNA-Polymerase-III in eine RNA mit Poly-A-Schwanz transkribiert [162, 165]. Die Sequenz der Alu-Elemente ist zweigeteilt, wobei 5' und 3'-Bereich homolog sind und der 3'-Bereich noch eine zusätzliche, 31 bp lange Insertion enthält [165]. Zusätzlich enthalten Alu-Elemente eine zentrale adenosinreiche Region und flankierende *direct repeats*. Der 5'-Bereich beinhaltet den Promotor. Die Sequenz von Alu-Elementen beinhaltet kein Terminationssignal für die RNA-Polymerase-III, sodass sich die Transkripte in die flankierenden Sequenzen erstrecken. Wahrscheinlich wird an der Integrationsstelle das Transkript am Poly-A-Schwanz geknickt, wodurch die Zielsequenz als Primer für die reverse Tran-

skription dient (vgl. Abb. 2.9 B) [171–173]. Auch *self-priming* wäre ein möglicher Mechanismus [174]. Humane Alu-Elemente haben im Allgemeinen keinen ORF und sind nur in Ausnahmefällen zur autonomen Retransposition fähig. Daher „leihen“ sie sich die für die Amplifikation notwendigen Faktoren (z.B. die reverse Transkriptase) von LINE-Elementen [175]. Der Poly-A-Schwanz stellt eine gemeinsame strukturelle Eigenschaft dar, mit der die LINE- und Alu-Elemente evolutionär im Wettbewerb um die gleiche enzymatische Maschinerie konkurrieren können [176]. So haben vermutlich die LINE-Elemente die reverse Transkriptase-Aktivität bereitgestellt, die zur Entstehung der SINE-Elemente geführt hat [165].

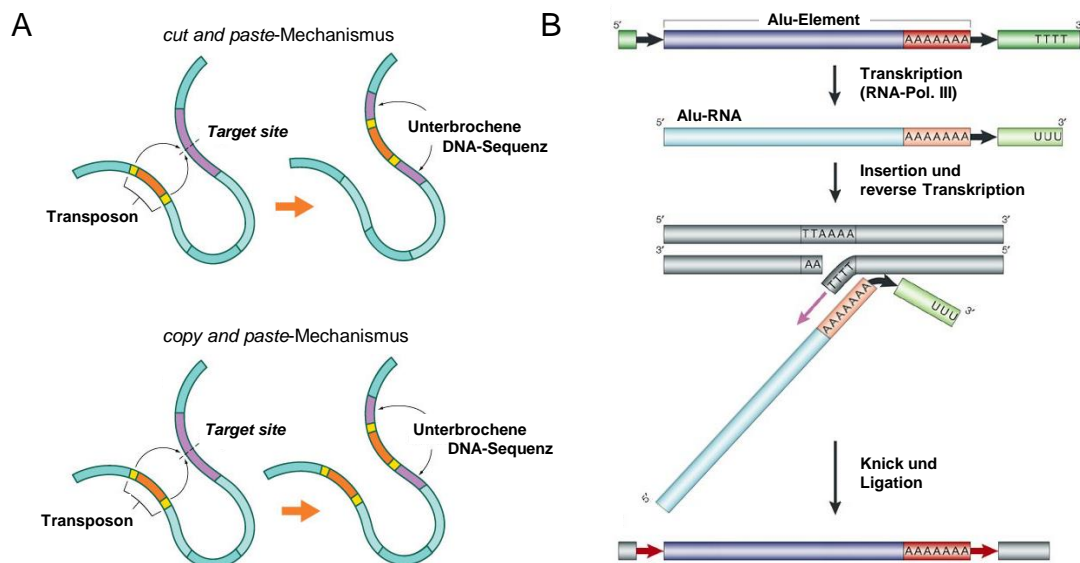


Abbildung 2.9: Transposition von DNA-Elementen

A Beim *cut and paste*-Mechanismus wird das Transposon aus der DNA ausgeschnitten und an anderer Stelle eingefügt, beim *copy and paste*-Mechanismus wird über eine RNA-Zwischenstufe eine Kopie des Transposons erstellt und an anderer Stelle eingefügt. [Bearbeitet nach [177]] **B** Alu-Elemente werden nach der Transkription vermutlich an der zum Poly-A-Schwanz komplementären Insertionsstelle geknickt, bevor die Ligation erfolgt. [Bearbeitet nach [165]]

Die (seltene) Insertion von TE in funktionale Genbereiche kann zu Störungen der Transkription oder Veränderungen der Genregulation führen. Die Insertion in einen Promotor kann diesen unterbrechen oder zusätzliche regulatorische Sequenzen einfügen, z.B. eine Bindestelle für Steroidhormonrezeptoren, die in manchen Alu-Familien enthalten ist [178]. Außerdem kann über die in den TE enthaltenen CpG-Stellen (vgl. 2.4) der Methylierungsstatus des Zielpromotors verändert werden. Desweiteren kann die Insertion den ORF verschieben oder das Spleißen des Zielgens stören [165]. Dies kann zu humanen Krankheiten führen, z.B. zu Fällen von Insulin-resistentem Typ II-Diabetes, Lesch-Nyhan-Syndrom, Hämophilie A und B und Muskeldystrophie. Außerdem kann die homologe Rekombination zwischen Elementen der gleichen Familie (z.B.

LINE1 oder Alu) sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen zu Chromosomenstörungen und Verlust der Heterozygotie führen. Verschiedene Krebsarten wurden damit schon in Verbindung gebracht, z.B. Fälle von Brustkrebs und akuter myeloischer Leukämie (zusammengefasst in [162, 165]).

Um die Aktivität der transponierbaren, oft als „parasitär“ oder „egoistisch“ bezeichneten Elemente einzuschränken und somit das „Wirtsgenom“ zu schützen, werden epigenetische *silencing*-Mechanismen eingesetzt, die die Chromatinumgebung eines Elements so verändern, dass das kodierte Potential der TE zur Replikation nicht mehr genutzt werden kann. Beispielsweise trägt die Modifizierung von Histonen (vgl. 2.2) zum *silencing* von TE bei. Nukleosomen, die mit TE assoziiert sind, sind oft mit H3K9-Methylierungen angereichert, welche die Transkription reprimieren und inaktives Chromatin kennzeichnen [179, 180]. Auch viele Proteine, die die Chromatinstruktur remodellieren oder kondensieren, spielen eine Rolle. Beispielsweise wurde in der Maus das Protein Lsh1 gefunden, welches eine chromatinremodellierende Funktion hat, und dessen Knockout dazu führt, dass die Transkription transponierbarer Elemente stark ansteigt, während die meisten anderen Gene nicht beeinflusst werden [181, 182]. Ein wichtiger Mechanismus beim TE-*silencing* ist die RNA-Interferenz (RNAi, vgl. 2.3). Viele TE kodieren für siRNAs [183, 184], deren Menge mit der Aktivität der TE korreliert ist [185, 186]. Diese können über RNAi zum Stilllegen der TE genutzt werden. Mutationen in Proteinen der Argonauten- oder Dicer-Familie können in vielen eukaryotischen Spezies zu einer Reaktivierung von TE führen [187].

Während der Reprogrammierung werden TE methyliert, um die Integrität des Genoms aufrechtzuerhalten [188]. Die Verringerung der Methylierung von TE ist in vielen Krebszellen zu finden. Die Expression verschiedener TE (u.a. Alu) steigt nach der genomweiten Demethylierung während der postzygotischen Reprogrammierung (vgl. 2.4.3) an, kehrt aber vor der genomweiten Remethylierung wieder auf einen Grundpegel zurück, was vermutlich den *silencing*-Mechanismen der Zelle zugeschrieben werden kann [104]. Das Methylierungsmuster an TE wird bei der Replikation an die Tochterzellen weitergegeben, sodass das *silencing* der TE vererbt werden kann. Untersuchungen in der Maus deuten darauf hin, dass diese Methylierung eventuell bei verschiedenen Stadien der Säugerentwicklung eine unterschiedlich große Rolle beim TE-*silencing* spielt [54]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass TE nicht nur parasitäre Eigenschaften haben, sondern anscheinend auch produktive Funktionen in ihren „Wirtsgenomen“ übernehmen. Nichtautonome TE sind besonders in heterochromatischen Regionen zu finden. Dort tragen sie womöglich zur Funktion des Heterochromatins bei, das Zentromere und Telomere flankiert. Sie sind bereits zum Werkzeug für genetische Regulationsprozesse geworden und spielen wichtige Rollen bei der Regulierung der Genexpression. Neuere Studien haben TE mit *imprinting* (vgl. 2.5) und X-Inaktivierung und mit der Regulation der Genexpression während der Entwicklung in Verbindung ge-

bracht (zusammengefasst in [187]). Dies ist jedoch noch ein sehr junges Forschungsfeld. Die genauen Mechanismen der Genregulation mittels TE und ihre weiteren Funktionen müssen noch genauer erforscht werden.

2.7 S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase

Das *AHCY*-Gen kodiert für das Enzym S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase (AHCY, auch S-Adenosylhomocysteinsynthase oder S-Adenosylhomocysteinase, EC 3.3.1.1). Es ist auf Chromosom 20q11.22 lokalisiert (34.280.268-343.11.802 *reverse strand*, Ensembl Version 77). Davon ausgehend können sechs verschiedene Transkripte entstehen (vgl. Anhang 6.1.1), wobei nur zwei davon proteinkodierend sind. Weitere zwei Transkripte werden alternativ gespleißt und beinhalten intronische Sequenzen. Zwei Transkripte sind prozessiert und beinhalten keinen *open reading frame* (ORF). Die proteinkodierenden Transkripte umfassen je 10 Exons (Abb 2.10), die entstehenden Protein-Isoformen bestehen aus 404 bzw. 432 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von ca. 47,6 kDa [189].

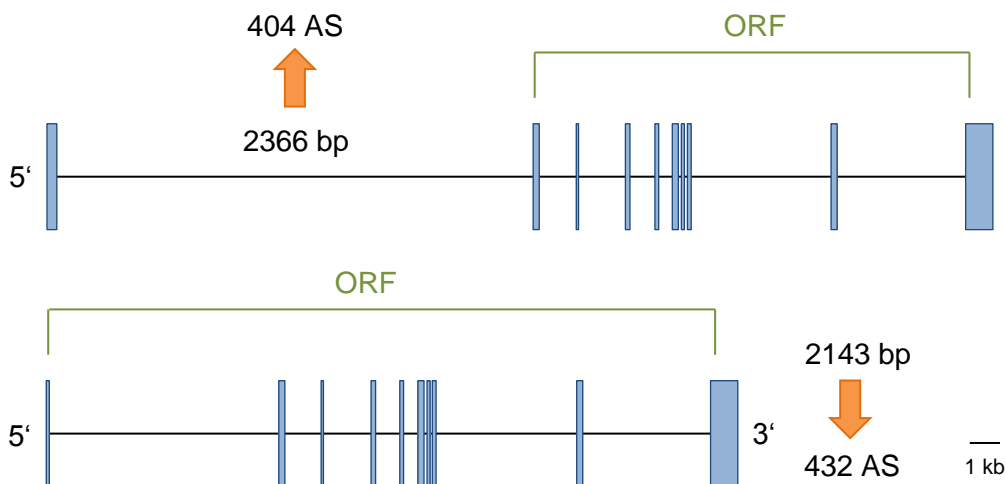
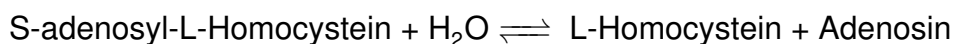


Abbildung 2.10: Proteinkodierende *AHCY*-Transkripte

Ausgehend vom *AHCY*-Gen entstehen zwei proteinkodierende Transkripte mit jeweils 10 Exons (blaue Kästen) und 2366 bzw. 2143 bp Länge. Daraus entstehen AHCY-Isoformen mit 404 bzw. 432 AS. AS=Aminosäuren, ORF=open reading frame

Das Enzym S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase katalysiert als einziges in eukaryotischen Zellen bekanntes Enzym [190] die reversible Hydrolyse von S-adenosyl-L-Homocystein (SAH) zu L-Homocystein und Adenosin [191] und nutzt dabei NAD^+ als Cofaktor:



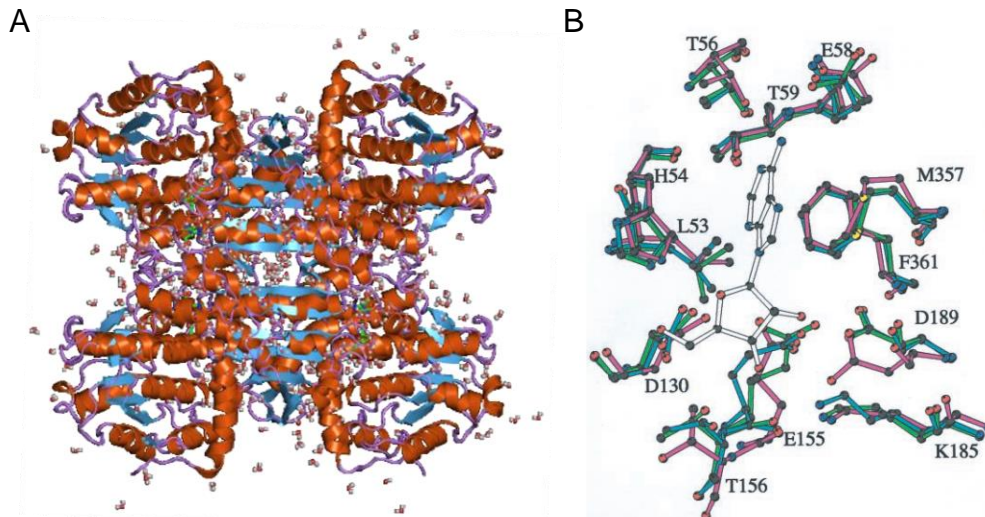


Abbildung 2.11: Struktur des Enzyms AHCY

Kristallstrukturanalyse der AHCY aus Rattenleber. **A** Das Enzym besteht aus 4 identischen Untereinheiten. [Aus [192]] **B** Detaillierte Darstellung der Substratbindestelle (zusammengesetzt aus 3 Kristallstrukturanalysen). Die Aminosäurereste sind mit Kürzel und Position beschriftet und farblich dargestellt, das gebundene Adenosin weiß. [Aus [195]]

Das Enzym funktioniert als Tetramer mit 4 identischen Untereinheiten (vgl. Abb. 2.11). Jede Untereinheit enthält eine katalytische Domäne, eine NAD⁺-Bindedomäne und eine kleine C-terminale Domäne. Sowohl die katalytische als auch die NAD⁺-Bindedomäne bilden eine ellipsoide Struktur, wobei die Tertiärstruktur der katalytischen Domäne vieler Methyltransferasen ähnelt. Der C-terminale Bereich befindet sich außerhalb dieser Kernstruktur und ragt in die nächste Untereinheit hinein. In Abwesenheit des Substrats SAH weist die Hydrolase eine offene Struktur auf und erfährt durch Substratbindung eine Konformationsänderung, die die SAH-Ribose an den Niacin-Bereich des NAD⁺ annähert [192, 193]. Es folgt eine Oxidation der Position 3' von Adenosin, gefolgt von einer α - β -Eliminierung von L-Homocystein. Das entstehende 3'-keto-4',5'-dehydro-5'-Deoxyadenosin reagiert mit Wasser zu 3'-keto-Adenosin, das dann mit Hilfe von NADH zu Adenosin reduziert wird [194]. Hierbei spielen besonders Lysin- und Asparaginsäurereste im katalytischen Zentrum eine wichtige Rolle [195].

Die katalytische Reaktion von AHCY ist Teil des Methioninstoffwechsels (vgl. Abb. 2.12), welcher die Bildung von S-Adenosylmethionin (SAM) als wichtigsten Methylgruppenspendor für Methylierungsreaktionen im eukaryotischen Organismus beinhaltet. Die Struktur der katalytischen Domäne legt nahe, dass sich SAH-Moleküle relativ frei zur AHCY und zu Methyltransferasen hin und davon weg bewegen können [192]. Da freies SAH auf SAM-abhängige Methyltransferasen eine stark inhibierende Wirkung hat, stellt der

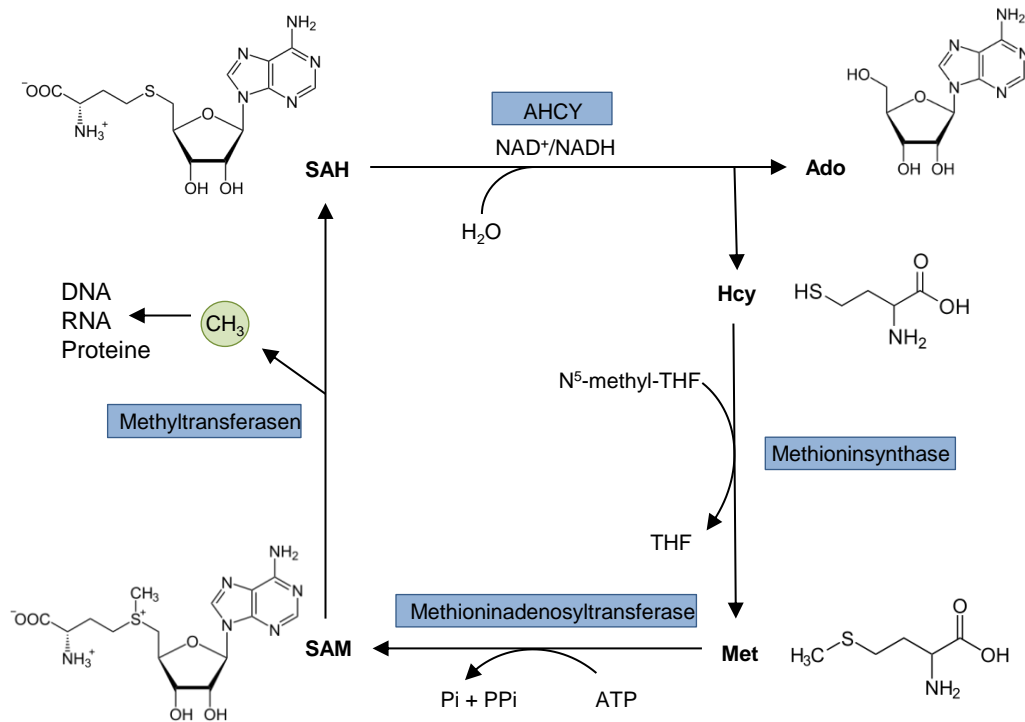


Abbildung 2.12: AHCY im Methioninstoffwechsel

AHCY katalysiert die Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein, welches über Methionin und SAM wieder zu SAH umgewandelt wird. Dieser Kreislauf ist die wichtigste Quelle für Methylgruppen, die von SAM-abhängigen Methyltransferasen zur Methylierung diverser Molekülgruppen verwendet werden. Ado=Adenosin, Hcy=Homocystein, Met=Methionin, SAH=S-adenosyl-L-Homocystein, SAM=S-Adenosylmethionin, THF=Tetrahydrofolsäure

Abbau von SAH durch AHCY einen wichtigen Faktor in der Regulierung der Methyltransferaseaktivität dar [192, 196–202]. Die Gruppe der SAM-abhängigen Methyltransferasen umfasst neben N-alpha- und *natural product*-Methyltransferasen auch Histon- und DNA-Methyltransferasen, deren korrekte Regulierung und Aktivität eine Grundvoraussetzung für die fehlerfreie epigenetische Methylierung darstellt.

2.8 AHCY-Defizienz

Die S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase (AHCY)-Defizienz ist eine seltene autosomal rezessive Erbkrankheit, die durch Mutationen im *AHCY*-Gen (vgl. 2.7) verursacht wird. Dadurch ist die Funktionsfähigkeit des entstehenden Enzyms stark beeinträchtigt. Seit der ersten Beschreibung eines Patienten in Kroatien 2004 [203] wurden acht Patienten mit dieser Krankheit entdeckt, die sich vor allem durch Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung und Myopathie auszeichnet [203–209].

Bei der Geburt sind Körpergröße und -gewicht normal. Je nach Schweregrad der Er-

krankung können Apnoe, Bradykardie und Hypotonie auftreten, sodass die Neugeborenen in diesem Fall künstlich beatmet und ernährt werden müssen [206, 207]. Bereits in den ersten Tagen nach der Geburt liefern deutlich erhöhte Methionin-, S-Adenosylmethionin (SAM)- und S-adenosyl-L-Homocystein (SAH)-Spiegel im Blut einen starken Hinweis auf das Vorliegen einer AHCY-Defizienz. Auch der Kreatinkinase-Spiegel ist erhöht [203–205, 209]. In den nächsten Monaten zeigen sich deutliche psychomotorische Entwicklungsverzögerungen, besonders Myopathie und eingeschränkte Bewegungsfähigkeit mit verringertem Muskeltonus [205, 207], dazu verringerte Sprachentwicklung und Aufmerksamkeitsstörungen [203, 204]. MRI-Untersuchungen des Gehirns können Auffälligkeiten aufweisen [203, 207], ebenso Untersuchungen von Leber und Herzfrequenz [207, 209]. Muskelzellen zeigen verringerte Mengen Fasern, Nervenzellen eine mangelnde Myelinisierung [204, 207]. Außerdem ist die DNA mancher Patienten global hypermethyliert [204, 209]. Die beschriebenen Patienten zeigen unterschiedliche Schweregrade in der Ausprägung der Symptome. In drei der acht beschriebenen Fällen führte die Krankheit innerhalb weniger Monate zum Tod [207, 208]. Die Lebenserwartung für schwächer betroffene Patienten ist unbekannt. Der älteste beschriebene Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits 26 Jahre alt [209], was zeigt, dass das Erwachsenenalter durchaus erreicht werden kann.

Das Enzym AHCY katalysiert den Abbau SAH zu L-Homocystein und Adenosin (vgl. 2.7). Ist seine Funktionsfähigkeit eingeschränkt, so führt dies zu der für die AHCY-Defizienz charakteristischen Anreicherung der Metaboliten SAM und SAH und einem verringerten SAM/SAH-Verhältnis (vgl. Abb. 2.13).

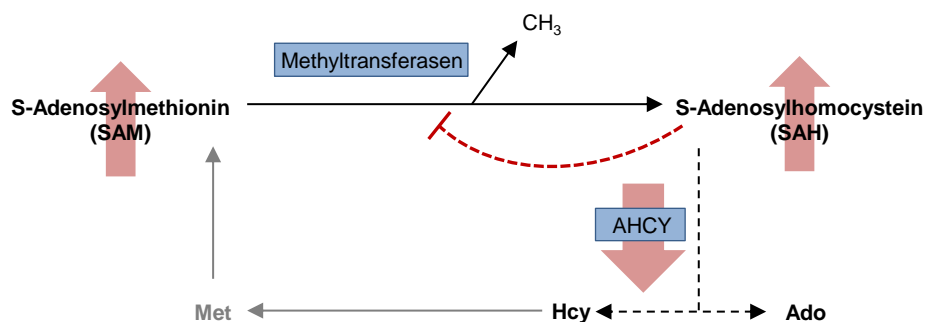


Abbildung 2.13: Auswirkungen der AHCY-Defizienz auf den Methioninstoffwechsel

Die verringerte Aktivität von AHCY führt zu einer Anreicherung der Metaboliten SAM und SAH, welches eine inhibierende Wirkung auf SAM-abhängige Methyltransferasen hat.

Ado=Adenosin , Hcy=Homocystein , Met=Methionin, SAH=S-adenosyl-L-Homocystein, SAM=S-Adenosylmethionin

Die AHCY-Defizienz kann nicht geheilt, aber mit einer methioninreduzierten Diät behandelt werden, bei der zusätzlich Kreatin und Phosphatidylcholin zugegeben wer-

den [204, 207]. Die psychomotorische Entwicklung verbessert sich daraufhin [204, 205, 209]. Körperkraft und Aufmerksamkeit, sowie der Muskeltonus können zunehmen [205]. Die Konzentrationen von Methionin, SAH und SAM im Blut werden gesenkt, bleiben jedoch weiterhin aberrant erhöht. Für zwei Patienten ist beschrieben, dass sich die Hypermethylierung der DNA durch die Diät nicht normalisierte, jedoch eine leichte Tendenz zur Verringerung aufwies [204].

2.9 Zielsetzung

Die S-adenosyl-L-Homocysteinhydrolase (AHCY)-Defizienz ist eine seltene autosomal rezessive Stoffwechselkrankheit, bei der der Funktionsverlust des Enzyms AHCY zu schweren körperlichen und geistigen Beeinträchtigungen führt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der AHCY-Defizienz auf die Methylierung der DNA betroffener Patienten analysiert werden. Eine globale DNA-Hypermethylierung konnte zuvor bereits in Leukozyten mehrerer Patienten nachgewiesen werden [204, 209]. Bei der detaillierten Untersuchung der DNA-Methylierung wurde der Schwerpunkt neben der gesamtgenomischen Analyse und der genomweiten Analyse mittels Array im Hinblick auf epigenetische Erkenntnisse vor allem auf die Analyse der Methylierung geprägter Gene mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung gelegt. Darüber hinaus sollten Fibroblastenzellen eines Patienten mit AHCY-Defizienz in Kultur genommen und zusammen mit *AHCY*-Knockdown-Zelllinien (HEK293 und HepG2) ebenso auf die Methylierung geprägter Gene hin untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Colorimetrische Bestimmung der gesamtgenomischen DNA-Methylierung

Barić *et al.* publizierten 2005 eine Veränderung der gesamtgenomischen DNA-Methylierung der Patienten A und B im Vergleich zu gleichaltrigen und nicht-gleichaltrigen Kontrollen. Dafür quantifizierten sie die Aufnahme von [³H]dCTP in die DNA von Leukozyten der Patienten, wobei die Menge der aufgenommenen Radioaktivität umgekehrt proportional zum Grad der DNA-Methylierung ist. Sie maßen eine Erhöhung des Methylierungsgrades, die jedoch im Lauf der diätischen Behandlung der Patienten eine Tendenz zur Verringerung zeigte [204]. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen und zu ergänzen, wurde der gesamtgenomische DNA-Methylierungsgrad der Patienten A, B und F mit dem MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit der Firma Epigentek gemessen (vgl. 5.7). Diese colorimetrische Methode ist wesentlich sensitiver als die bei Barić *et al.* verwendete Technik und kann sowohl für vergleichende relative als auch für quantitative Messungen herangezogen werden. Tabelle 3.1 beinhaltet die quantitativen Messergebnisse für die DNA-Methylierung der drei Patienten und drei Kontrollen (DNA der Proben K und zweimal H) sowie deren relative Verhältnisse. Abb. 3.1 zeigt die gemittelten Verhältnisse von Patienten zu Kontrollen der drei technischen Replikate.

Patient	DNA-Methylierung [%] * 10 ⁻³ (Verhältnis zu Kontrollen)		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
A	38,786 (4,24)	24,541 (6,65)	16,341 (5,89)
B	-	30,955 (8,39)	12,999 (4,69)
F	7,364 (0,81)	6,491 (1,76)	3,341 (1,21)
Kontrollen (n=3)	9,148	3,692	2,773

Tabelle 3.1: Colorimetrisch bestimmte, gesamtgenomische DNA-Methylierung

Quantitative Messung der DNA-Methylierung in Prozent, sowie die Verhältnisse der Messergebnisse der Patienten zu den gemittelten Kontrollen (n=3) von insgesamt drei Messungen (technische Replikate).

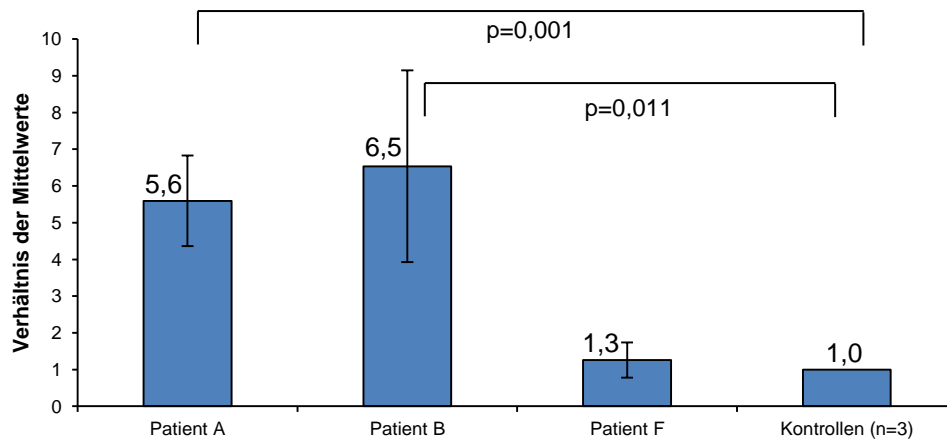


Abbildung 3.1: Verhältnisse der colorimetrisch bestimmten, gesamtgenomischen DNA-Methylierungen

Gemittelte Verhältnisse der DNA-Methylierungen von Patienten zu Kontrollen (n=3) aus drei technischen Replikaten. Patient A und B haben eine signifikant höhere Methylierung als die Kontrollen (A: $p=0,001$; B: $p=0,011$), Patient F weist einen normalen Methylierungsstatus auf.

Die Patienten A und B hatten signifikant höhere Methylierungswerte als die Kontrollen (Patient A $p=0,001$; Patient B $p=0,011$), wohingegen Patient F einen normalen gesamtgenomischen Methylierungsstatus aufwies. Die absoluten Messwerte entsprechen in ihrer Größenordnung den Beispielwerten des Kit-Herstellers.

3.2 Methylierungsanalyse ausgewählter DMRs mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bei Patienten mit AHCY-Defizienz

Geprägte Gene sind besonders interessante Kandidatengene für die Untersuchung von Methylierungsveränderungen der DNA, da ihre korrekte Methylierung für die gesunde Entwicklung eines Menschen essentiell ist. Eine fehlerhafte Methylierung kann zu Syndromen mit unterschiedlich schwerer geistiger und körperlicher Behinderung führen (vgl. 2.5.1). In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus von bis zu neun DMRs geprägter Gene (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) und repetitiver Elemente (Alu und LINE1) mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung in Patienten mit AHCY-Defizienz und gesunden Kontrollen analysiert. Die Bisulfit-Pyrosequenzierung (vgl. 5.6.1) ermöglicht die Methylierungsanalyse kurzer Sequenzabschnitte durch Ermittlung des Verhältnisses von Cytosin und Thymin an wenigen, ausgewählten CpGs in bisulfitkonvertierter DNA. Der Mittelwert der Methylierungswerte aller CpGs eines Pyrosequenzierungsassays (vgl. 5.1.11) ergibt den Methylierungsstatus der DMR. Dabei wurden die DMRs bei allen Proben in jeweils mindestens zwei technischen Repli-

katen analysiert und deren Ergebnisse zu einem Methylierungsstatus mit Standardabweichung gemittelt.

3.2.1 Vergleichbarkeit von Proben unterschiedlicher Herkunft

Die in dieser Arbeit verwendeten Patienten- und Kontrollproben stammen aus drei unterschiedlichen Instituten (vgl. 5.1.1). Um die Vergleichbarkeit der Proben in den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zu gewährleisten, wurden zunächst für die Kontrollproben – DNA aus Blutproben von Personen unterschiedlichen Alters, Herkunft und Geschlechts – Methylierungsanalysen mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung mit allen in dieser Arbeit verwendeten Assays (vgl. 5.1.11) durchgeführt. Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt und in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Bei der jahrelangen hausinternen Verwendung der Bisulfit-Pyrosequenzierungsassays zu routinediagnostischen Zwecken wurde festgestellt, dass Schwankungen der Messwerte eines Assays von etwa 10 % Methylierung den normalen Varianzbereich repräsentieren. Die Methylierungswerte jeder Kontrolle verglichen mit dem Mittelwert aller anderen Kontrollen (pro Gen) überschreiten diesen Bereich nicht (maximale Differenz ist 8,895 %). Somit kann der Methylierungsstatus jeder Kontrolle trotz der Unterschiede in Herkunft, Alter und Geschlecht als gleichwertig angesehen werden. Zudem entsprechen die Methylierungswerte der Kontrollen denen gesunder Probanden aus der hausinternen Routinediagnostik. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Methode auch für die Patientenproben unterschiedlicher Herkunft verlässliche Messwerte liefert. In den folgenden Bisulfit-Pyrosequenzierungen der Patientenproben wurden die Kontrollen als biologische Replikate gemischt verwendet und die Ergebnisse gemittelt. Sie werden im Folgenden nicht weiter aufgeschlüsselt.

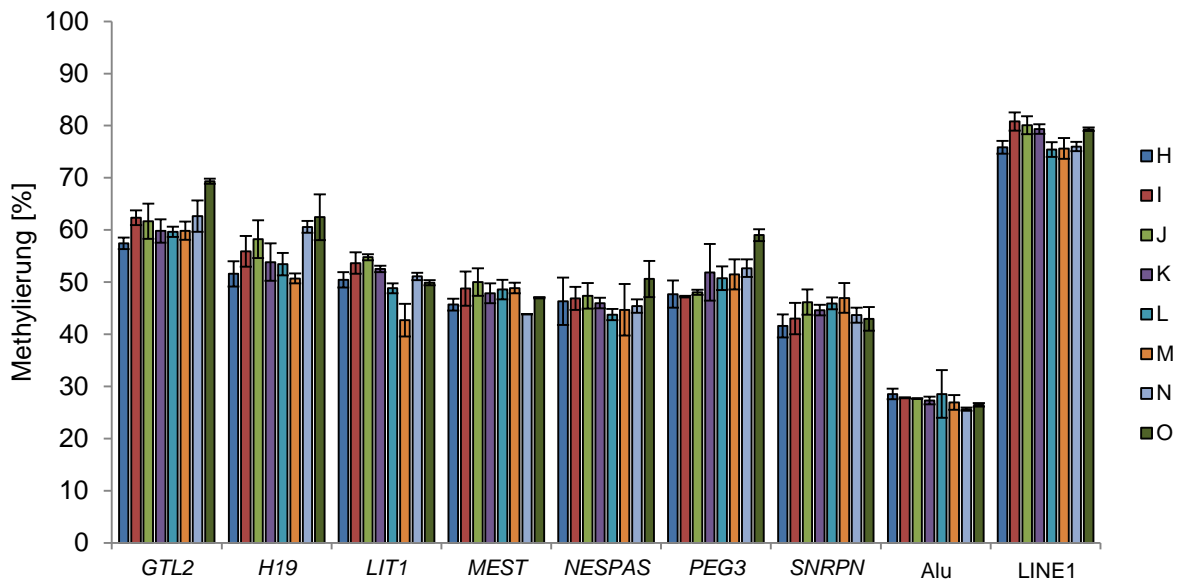


Abbildung 3.2: Vergleich der Methylierungswerte der Kontrollproben für die Bisulfit-Pyrosequenzierung

Die humanen Kontrollproben (H-O, vgl. 5.1.1) haben trotz unterschiedlichen Alters, Geschlechts und Herkunft gleichwertige Methylierungswerte, da die Schwankungen innerhalb der Messung eines Gens einen Wert von 10 % Methylierung nicht überschreiten.

Kontr.	<i>GTL2</i> (5 CpGs)	<i>H19</i> (3 CpGs)	<i>LIT</i> (2 CpGs)	<i>MEST</i> (5 CpGs)	<i>NESPAS</i> (4 CpGs)	<i>PEG3</i> (3 CpGs)	<i>SNRPN</i> (6 CpGs)	<i>Alu</i> (3 CpGs)	<i>LINE1</i> (3 CpGs)
H	57,42 ± 1,10	51,59 ± 2,42	50,44 ± 1,49	45,69 ± 1,13	46,35 ± 4,55	47,69 ± 2,62	41,60 ± 2,21	28,55 ± 1,00	75,83 ± 1,22
I	62,34 ± 1,39	55,91 ± 2,94	53,65 ± 2,06	48,76 ± 3,27	46,87 ± 2,21	47,21 ± 0,16	43,00 ± 3,02	27,81 ± 0,08	80,80 ± 1,75
J	61,69 ± 3,38	58,23 ± 3,6	54,77 ± 0,59	50,01 ± 2,62	47,38 ± 2,45	48,03 ± 0,49	46,17 ± 2,44	27,67 ± 0,08	80,07 ± 1,72
K	59,81 ± 2,22	53,83 ± 3,6	52,53 ± 0,59	47,87 ± 1,92	45,97 ± 1,00	51,87 ± 5,42	44,64 ± 1,00	27,29 ± 0,74	79,33 ± 0,92
L	59,64 ± 0,96	53,46 ± 2,14	48,83 ± 0,95	48,58 ± 1,86	43,77 ± 1,07	50,76 ± 2,28	45,92 ± 1,14	28,54 ± 4,57	75,45 ± 1,41
M	59,85 ± 1,75	50,71 ± 0,97	42,70 ± 3,13	48,86 ± 1,02	44,70 ± 4,97	51,46 ± 2,89	46,97 ± 2,86	26,91 ± 1,42	75,63 ± 1,98
N	62,65 ± 3,02	60,59 ± 1,13	51,09 ± 0,73	43,85 ± 0,05	45,44 ± 1,29	52,68 ± 1,67	43,68 ± 1,44	25,66 ± 0,32	75,99 ± 0,88
O	69,34 ± 0,47	62,47 ± 4,39	49,88 ± 0,5	47,03 ± 0,12	50,62 ± 3,46	59,01 ± 1,16	42,96 ± 2,25	26,46 ± 0,36	79,31 ± 0,33

Tabelle 3.2: Methylierungswerte der verwendeten Kontrollproben

Durch Bisulfit-Pyrosequenzierung ermittelte Methylierungswerte [%] der verwendeten humanen Kontrollproben (H-O, vgl. 5.1.1).

3.2.2 Methylierungsstatus von DMRs bei Patienten mit AHCY-Defizienz

Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde der Methylierungsstatus der DMRs sieben geprägter Gene (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) und zwei repetitiver Elemente (Alu und LINE1) in den Patienten A-G (vgl. 5.1.1) festgestellt. Dabei liegt eine Schwankung von 10 % Methylierung im normalen Varianzbereich (vgl. 3.2.1). Daher wurde eine moderat aberrante Methylierung als mindestens 10 % abweichend vom Mittelwert der Kontrollen definiert, was zudem etwas mehr als dem zweifachen Wert der Standardabweichungen der Kontrollen entspricht. Eine Abweichung von mindestens 20 % wurde als stark aberrante Hypo- bzw. Hypermethylierung angesehen. Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.3 und Tabelle 3.3 dargestellt. Aberrante Methylierungswerte wurden nur in den Patienten A, D und F beobachtet. Patient A wies moderat aberrante Hypermethylierungen bei *LIT1* und *PEG3* und stark aberrante Hypermethylierungen bei *MEST* und *H19* auf. Die Patienten D und F zeigten moderat aberrante Hypermethylierungen bei *MEST*, *PEG3* und *H19*. Patient F zeigte zusätzlich moderat aberrante Hypermethylierungen in den DMRs von *NESPAS*, *LIT1* und *SNRPN*. Bei den repetitiven Elementen Alu und LINE1 konnten keine aberranten Veränderungen der Methylierung beobachtet werden.

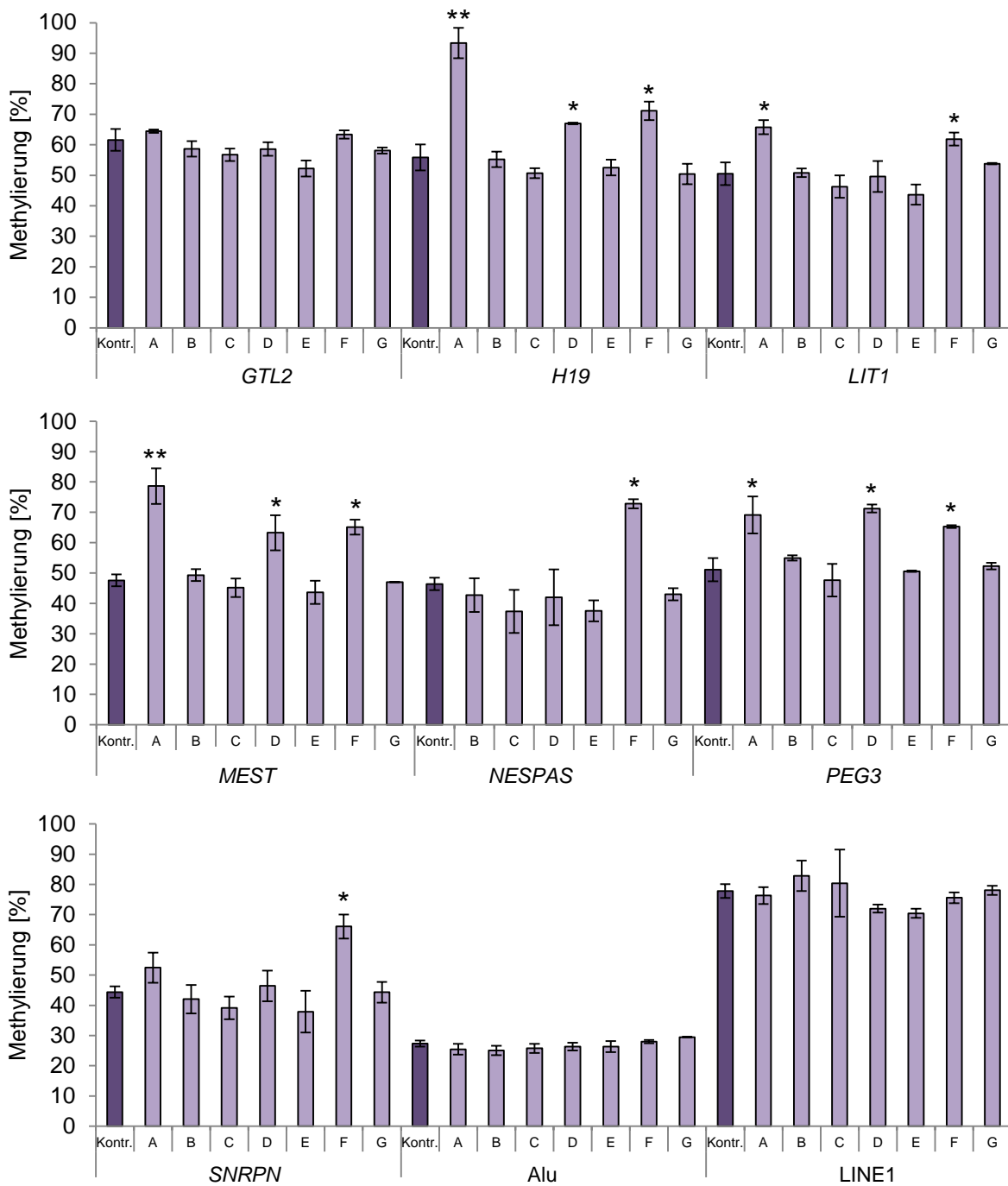


Abbildung 3.3: Methylierungswerte von DMRs in Patienten mit AHCY-Defizienz

Durch Bisulfit-Pyrosequenzierung ermittelte Methylierungswerte [%] von neun DMRs in allen Patientenproben. Abweichungen von über 10 % Methylierung zu den Kontrollen entsprechen einer moderat aberranten Methylierung (*), über 20 % Methylierung einer stark aberranten Methylierung (**). Die Werte für *NESPAS* bei Patient A konnten nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

Patient	<i>GTL2</i> (5 CpGs)	<i>H19</i> (3 CpGs)	<i>LIT</i> (2 CpGs)	<i>MEST</i> (5 CpGs)	<i>NESPAS</i> (4 CpGs)	<i>PEG3</i> (3 CpGs)	<i>SNRPN</i> (6 CpGs)	<i>Alu</i> (3 CpGs)	<i>LINE1</i> (3 CpGs)
A	64,47 ± 0,56	93,33 ± 4,99	65,76 ± 2,29	78,64 ± 5,86	-	69,11 ± 6,13	52,46 ± 5,01	25,45 ± 1,77	76,33 ± 2,79
B	58,68 ± 2,56	55,24 ± 2,55	50,81 ± 1,42	49,31 ± 1,95	42,71 ± 5,59	54,95 ± 0,85	42,03 ± 4,73	25,05 ± 1,54	82,84 ± 5,05
C	56,74 ± 2,03	50,69 ± 1,67	46,29 ± 3,67	45,16 ± 3,04	37,33 ± 7,12	47,61 ± 5,36	39,16 ± 3,76	25,75 ± 1,49	80,41 ± 11,13
D	58,57 ± 2,22	67,00 ± 0,24	49,60 ± 5,04	63,24 ± 5,79	41,98 ± 9,18	71,25 ± 1,32	46,43 ± 5,07	26,34 ± 1,27	71,98 ± 1,32
E	52,24 ± 2,61	52,53 ± 2,61	43,66 ± 3,28	43,62 ± 3,80	37,52 ± 3,44	50,57 ± 0,24	37,88 ± 6,89	26,34 ± 1,81	70,44 ± 1,50
F	63,36 ± 1,36	71,12 ± 3,01	61,87 ± 2,12	65,08 ± 2,46	72,80 ± 1,47	65,29 ± 0,42	66,08 ± 3,97	27,98 ± 0,53	75,60 ± 1,77
G	58,11 ± 0,98	50,38 ± 3,36	53,81 ± 0,24	46,99 ± 0,07	43,02 ± 2,00	52,29 ± 1,11	44,32 ± 3,46	29,49 ± 0,03	78,08 ± 1,51
Kontr. (n=8)	61,59 ± 3,57	55,85 ± 4,25	50,49 ± 3,72	47,58 ± 1,99	46,39 ± 2,07	51,09 ± 3,82	44,37 ± 1,87	27,36 ± 1,00	77,80 ± 2,27

Tabelle 3.3: Methylierungswerte von DMRs in Patienten mit AHCY-Defizienz

Durch Bisulfit-Pyrosequenzierung ermittelte Methylierungswerte [%] von neun DMRs aller Patientenproben. Abweichungen von über 10 % Methylierung zu den Kontrollen entsprechen einer leicht aberranten Methylierung (fett), über 20 % Methylierung einer stark aberranten Methylierung (fett und unterstrichen). Die Werte für *NESPAS* bei Patient A konnten nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

Um festzustellen, ob sich die Methylierungsveränderungen aus aberranten Werten einzelner CpGs ergeben, wurden die Methylierungswerte der einzelnen CpGs innerhalb eines Assays auf Abweichungen zu den restlichen CpGs desselben Assays untersucht. Dabei überschritt kein Messwert einer einzelnen CpG-Stelle die Grenze von 10 % Abweichung vom Mittelwert aller anderen CpGs desselben Assays (exemplarisch dargestellt für *MEST* in Abb. 3.4). Die entstehenden Mittelwerte können demnach als repräsentativ pro DMR und Patient angesehen werden.

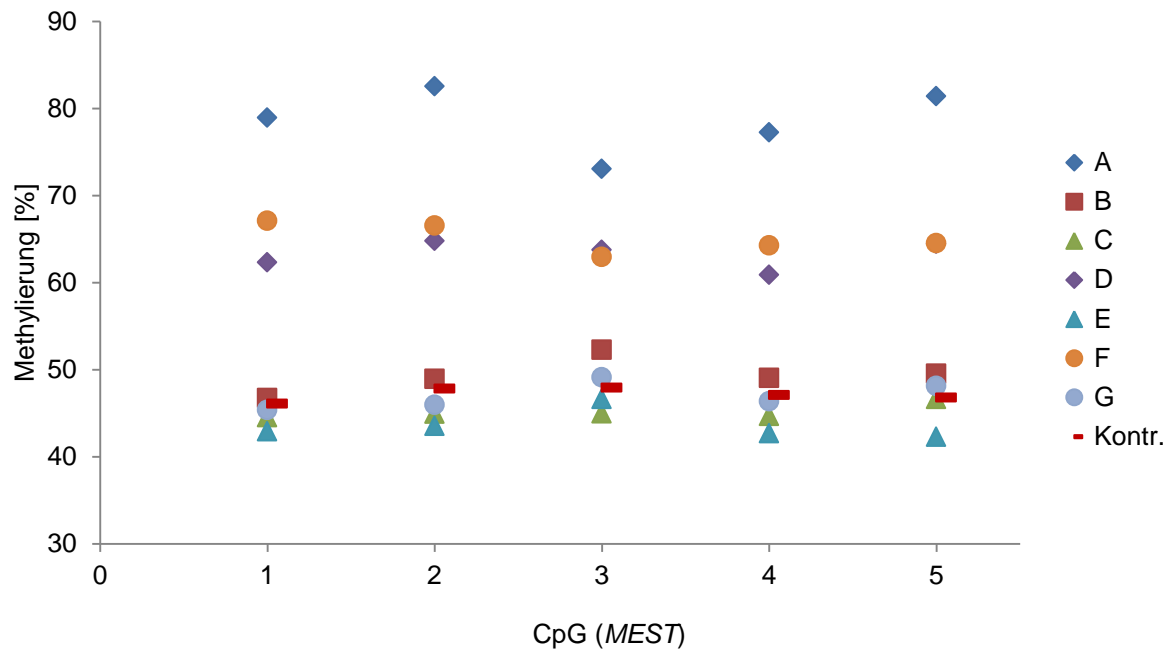


Abbildung 3.4: Methylierungswerte einzelner CpGs in der *MEST*-DMR

Methylierung [%] der einzelnen CpGs, gemessen in allen Patienten und Kontrollen. Die Schwankungen pro Patient liegen unter 10 %, somit können die für die DMRs erhaltenen Mittelwerte als repräsentativ angesehen werden.

3.3 Bestätigung der Bisulfit-Pyrosequenzierungsergebnisse mittels High Resolution Melting-Analyse

Um die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung (vgl. 3.2) zu bestätigen, wurde der Methylierungsstatus einiger von den Pyrosequenzierungsassays abgedeckten Sequenzabschnitte zusätzlich mittels High Resolution Melting (HRM)-Analyse (vgl. 5.5.2.2) ermittelt. Diese Analyse umfasst noch weitere stromauf- und -abwärts gelegene CpGs, bietet jedoch im Vergleich zur Bisulfit-Pyrosequenzierung keine basengenaue Auflösung, sondern liefert einen durchschnittlichen Methylierungswert über alle analysierten CpGs. Diese Methode ist nicht für alle mit Bisulfit-Pyrosequenzierung untersuchten Regionen geeignet. Die Schmelzkurven der Standard-DNA-Proben müssen einen gewissen Abstand (also Differenz der Ct-Werte) haben, damit im dazwischenliegenden „dynamischen Bereich“ die Kurven der zu analysierenden Proben gut verrechnet werden können. Dies ist z.B. für die repetitiven Elemente Alu und LINE1 nicht der Fall. Dennoch stellt die HRM-Analyse eine gut geeignete Kontrolle für den Methylierungsstatus der analysierten DMRs dar.

Mit der HRM-Analyse konnten unter Verwendung der gleichen PCR-Primer wie bei der Bisulfit-Pyrosequenzierung Methylierungswerte für die DMRs von *H19*, *LIT1*, *MEST*, *PEG3* und *SNRPN* für die Patienten A, B, und F sowie die Kontrollprobe H ermittelt werden (vgl. Abb. 3.5 und Tab. 3.4). Dabei wurde von jeder Probe die DNA mehrerer Bisulfitkonversionen (Replikate) gemessen. Die Mittelwerte der Messwerte beider Methoden pro DMR und Patient lagen innerhalb eines Methylierungsbereichs von 10 %, mit Ausnahme von *LIT1* bei den Patienten A und F und *PEG3* bei Patient B. Bei diesen beiden Genen bzw. DMRs waren die HRM-Analysen oft fehlerhaft, die verwendeten PCR-Primer sind möglicherweise nicht für die HRM-Analyse geeignet. Insgesamt bestätigte die HRM-Analyse die Tendenzen der Methylierungsveränderungen, die mit der Bisulfit-Pyrosequenzierung erkannt worden waren.

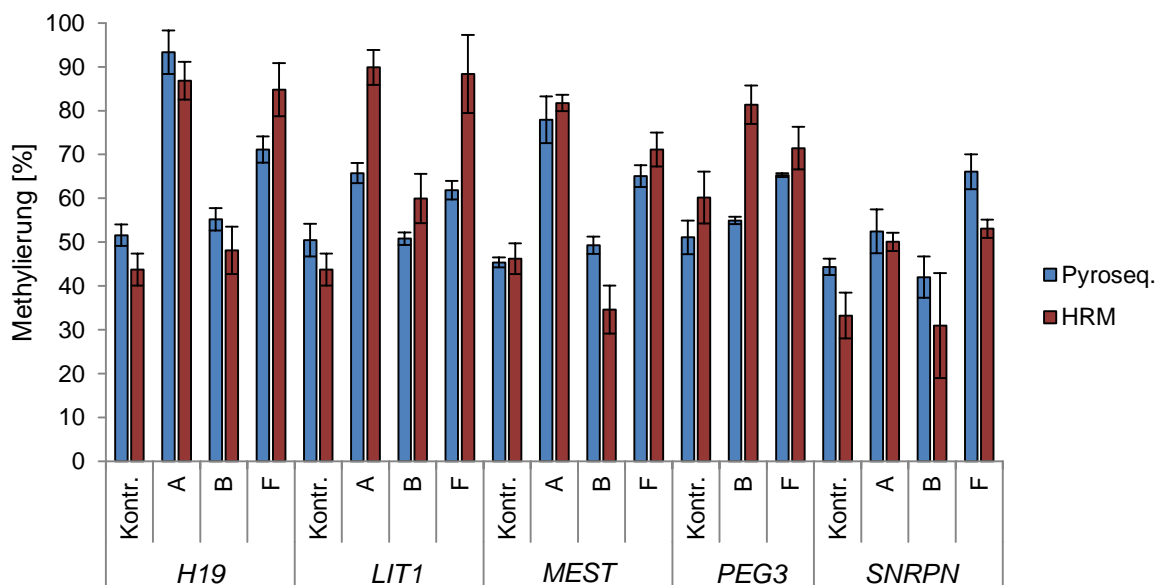


Abbildung 3.5: Vergleich der Methylierungswerte von Bisulfit-Pyrosequenzierung und HRM-Analyse

Methylierung [%] von fünf DMRs in drei Patienten (A, B, F) und einer Kontrollprobe (H, vgl. 5.1.1). Die Messwerte der HRM-Analyse bestätigen die Werte der Bisulfit-Pyrosequenzierung mit Ausnahme von *LIT1* (Pat. A und F) und *PEG3* (Pat. B). Die Werte für *PEG3* bei Pat. A konnten nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

Gen	Probe	Bisulfit-Pyrosequenzierung		HRM-Analyse	
		Methylierung [%]	Anzahl CpGs	Methylierung [%]	Anzahl CpGs
H19	Kontr. H	51,59 ± 2,42	3	43,74 ± 3,68	18
	Pat. A	93,33 ± 4,99		86,84 ± 4,31	
	Pat. B	55,24 ± 2,55		48,14 ± 5,38	
	Pat. F	71,12 ± 3,01		84,78 ± 6,05	
LIT1	Kontr. H	50,49 ± 3,72	2	43,74 ± 3,68	15
	Pat. A	65,76 ± 2,29		89,88 ± 3,99 (*)	
	Pat. B	50,81 ± 1,42		59,94 ± 5,63	
	Pat. F	61,87 ± 2,12		88,36 ± 8,92 (*)	
MEST	Kontr. H	45,38 ± 1,11	5	46,24 ± 3,49	23
	Pat. A	77,90 ± 5,33		81,76 ± 1,85	
	Pat. B	49,31 ± 1,95		34,62 ± 5,51	
	Pat. F	65,08 ± 2,46		71,12 ± 3,85	
PEG3	Kontr. H	51,09 ± 3,82	3	60,17 ± 5,90	14
	Pat. B	54,95 ± 0,85		81,34 ± 4,38 (*)	
	Pat. F	65,29 ± 0,42		71,44 ± 4,86	
SNRPN	Kontr. H	44,37 ± 1,87	6	33,26 ± 5,21	21
	Pat. A	52,46 ± 5,01		50,07 ± 2,07	
	Pat. B	42,03 ± 4,73		30,95 ± 11,96	
	Pat. F	66,08 ± 3,97		53,07 ± 2,07	

Tabelle 3.4: Vergleich der Methylierungswerte von Bisulfit-Pyrosequenzierung und HRM-Analyse
Methylierung [%] von fünf DMRs bei drei Patienten und einer Kontrollprobe. Die Mittelwerte der Messwerte beider Methoden pro DMR und Patient liegen innerhalb eines Methylierungsbereichs von 10 %, mit Ausnahme der drei mit (*) markierten Ergebnisse.

3.4 Genomweite Methylierungsanalyse bei Patienten mit AHCY-Defizienz

Die colorimetrische Methylierungsanalyse konnte die von Barić *et al.* (2005) gemessenen gesamtgenomischen Hypermethylierungen in den Patienten A und B bestätigen. Patient F jedoch zeigte keine Änderung der gesamtgenomischen Methylierung (vgl. 3.1). Die Bisulfit-Pyrosequenzierung von DMRs geprägter Gene zeigte nur in den Patienten A, D und F unterschiedliche Methylierungsveränderungen (vgl. 3.2.2). Um die Verteilung der Methylierungsveränderungen genauer zu untersuchen, wurde DNA der Patienten A, D, F und G mit dem Infinium® HumanMethylation450 BeadChip von Illumina in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Haaf, Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, analysiert (vgl. 5.8). Dieser Array deckt über 485.000 CpGs ab, die über das gesamte Genom verteilt sind. Dadurch werden 96 % aller CpG-Inseln einschließlich flankierender Regionen analysiert. Im Schnitt wird dabei der Methylierungsstatus von 17 CpGs pro Genregion (Promotor bis einschließlich 3'-UTR) gemessen, wobei 99 % der RefSeq-Gene eingeschlossen sind.

Obwohl die Bisulfit-Pyrosequenzierung keine Methylierungsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Kontrollen zeigte, wurden aus dem Kollektiv der Kontrollproben Kon-

trollen passend zu Alter und Geschlecht der Patienten ausgewählt, um die Qualität der Auswertung methodenübergreifend zu gewährleisten. Zusätzlich wurden Proben der AG Haaf mitanalysiert (vgl. Tabelle 3.5), wobei sämtliche Kontrollen als technische Unikate gemessen wurden.

Patient	passende Kontrolle	weitere Kontrollen (Würzburg)
A (m, Duplikat)	J (m, Unikat)	W1 (m, Unikat)
D (w, Unikat)	I (w, Unikat)	W2 (w, Unikat), W3 (w, Unikat)
F (w, Duplikat)	I (w, Unikat)	W2 (w, Unikat), W3 (w, Unikat)
G (w, Duplikat)	I (w, Unikat)	W2 (w, Unikat), W3 (w, Unikat)

Tabelle 3.5: Kontrollproben für die Methylierungsanalyse mit Array

Die Proben A, D, F, G, I und J stammen aus Mainz. Zusätzlich wurden die Proben W1-W3 aus Würzburg dem Array hinzugefügt. Die Kontrollen wurden passend zu Alter und Geschlecht der Patientenproben ausgewählt.

m=männlich, w=weiblich

Beim Vergleich der Patientenwerte mit den Kontrollwerten (beide Gruppen *gepoolt*) mit dem Software-Paket MethLAB konnte die AG Haaf keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen. Da die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung jedoch auf eine zufällige Verteilung von Methylierungsveränderungen hinweisen, mussten die Ergebnisse neben dem 2-Gruppenvergleich auch individuell pro Patient analysiert werden. Hierfür wurden die Werte jedes Patienten nur mit den passenden Kontrollen verglichen. Die Berechnungen wurden von Johanna Mazur im Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt und die normalisierten Methylierungswerte mit dem R-Paket *limma* statistisch ausgewertet. Mathematisch interessant sind nach dieser Auswertung die CpGs mit einem adjustierten p-Wert < 0,05. Diese fanden sich jedoch nur für Patient D, welcher als einziger der Patienten aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden DNA-Menge als Unikat gemessen worden war. Die betreffenden CpG-Stellen sind zudem weit über das Genom verteilt und lassen sich keiner Gengruppe zuordnen. Die Ergebnisse der Arrayauswertung liefern demnach keine Bestätigung für die mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung gefundenen, stark auffälligen Methylierungsveränderungen.

Um die Unstimmigkeiten zwischen Bisulfit-Pyrosequenzierung und Array zu ergründen und besonders die geprägten Gene im Detail zu analysieren, wurden die Rohdaten (Methylierungswerte jeder einzelnen gemessenen CpG-Stelle in Prozent) noch einmal „von Hand“ verglichen und ausgewertet. Bei den genomweiten Mittelwerten zeigten sich keine auffälligen Abweichungen der Patientenwerte im Vergleich zu den Kontrollen (vgl. Tab. 3.6).

Probe	mittlere Methylierung [%]
Pat. A	50,14 ± 0,02
Kontr. J+W1	50,41 ± 0,35
Pat. D	51,10
Pat. F	50,29 ± 0,40
Pat.G	50,31 ± 0,08
Kontr. I+W2+W3	50,51 ± 0,26

Tabelle 3.6: Mittlere genomweite Methylierungen aller analysierten CpGs pro Array-Probe

Genomweite Methylierung [%], gemittelt über alle analysierten CpGs pro Patient bzw. Kontrollgruppe.

Um einzelne auffällige CpGs zu ermitteln, wurden zunächst die Patientenduplikate für jede CpG gemittelt und die passenden Kontrollen zusammengefasst (Mittelwert ± St.Abw.). Die Patientenwerte wurden als auffällig angesehen, sobald sie eine Differenz zur Kontrolle mit St.Abw. von 10 % Methylierung überschritten. Dabei fanden sich für Patient A vierundfünfzig auffällige CpGs, für Patient F dreizehn CpGs und für Patient G neunzehn CpGs (vgl. Tab. 3.7). Da Patient D nur als Unikat gemessen worden war, wurde der einzige Messwert jeder CpG mit den passenden Kontrollen inkl. St.Abw. verglichen. Bei den anderen Patienten betrug die St.Abw. der einzelnen CpGs im Mittel ± 1,31, was für eine hohe Messgenauigkeit spricht.

CpGs	Differenz	Patient A	Patient D	Patient F	Patient G
hypermethyliert	über 10 %	14	654	6	6
	über 20 %	1	15	0	2
hypomethyliert	über 10 %	37	721	4	9
	über 20 %	2	32	3	2

Tabelle 3.7: Anzahl der mittels Array detektierten hypo-/hypermethylierten CpGs

Anzahl der CpGs mit auffälliger Methylierungsveränderung (Hypo-/Hypermethylierung) in Patienten mit AH CY-Defizienz. Als auffällig angesehen werden Patientenwerte mit einer Differenz zum Kontrollwert + SA von über 10 % Methylierung.

Bei den Patienten A, F und G waren nur wenige CpGs auffällig. Die betroffenen RefSeq-Gene waren über alle Autosomen verteilt (Ausnahme: Chromosom 13 beinhaltete keine auffälligen CpGs). Kein Gen war mehrfach betroffen. Zudem lag keine der auffälligen CpGs in den mit Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierten geprägten Genen. Patient D zeigte hingegen über 1400 auffällige CpGs auf allen Chromosomen. Auch hier waren die mit Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierten geprägten Gene nicht betroffen. Da die DNA von Patient D nur im Unikat gemessen wurde, sind die Ergebnisse für diese Probe trotz hoher Messgenauigkeit des Arrays mit großer Vorsicht zu betrachten. Um die Unstimmigkeiten für die CpGs der geprägten Gene genauer zu untersuchen, wurden die Methylierungswerte für alle CpGs dieser Gene separat betrachtet.

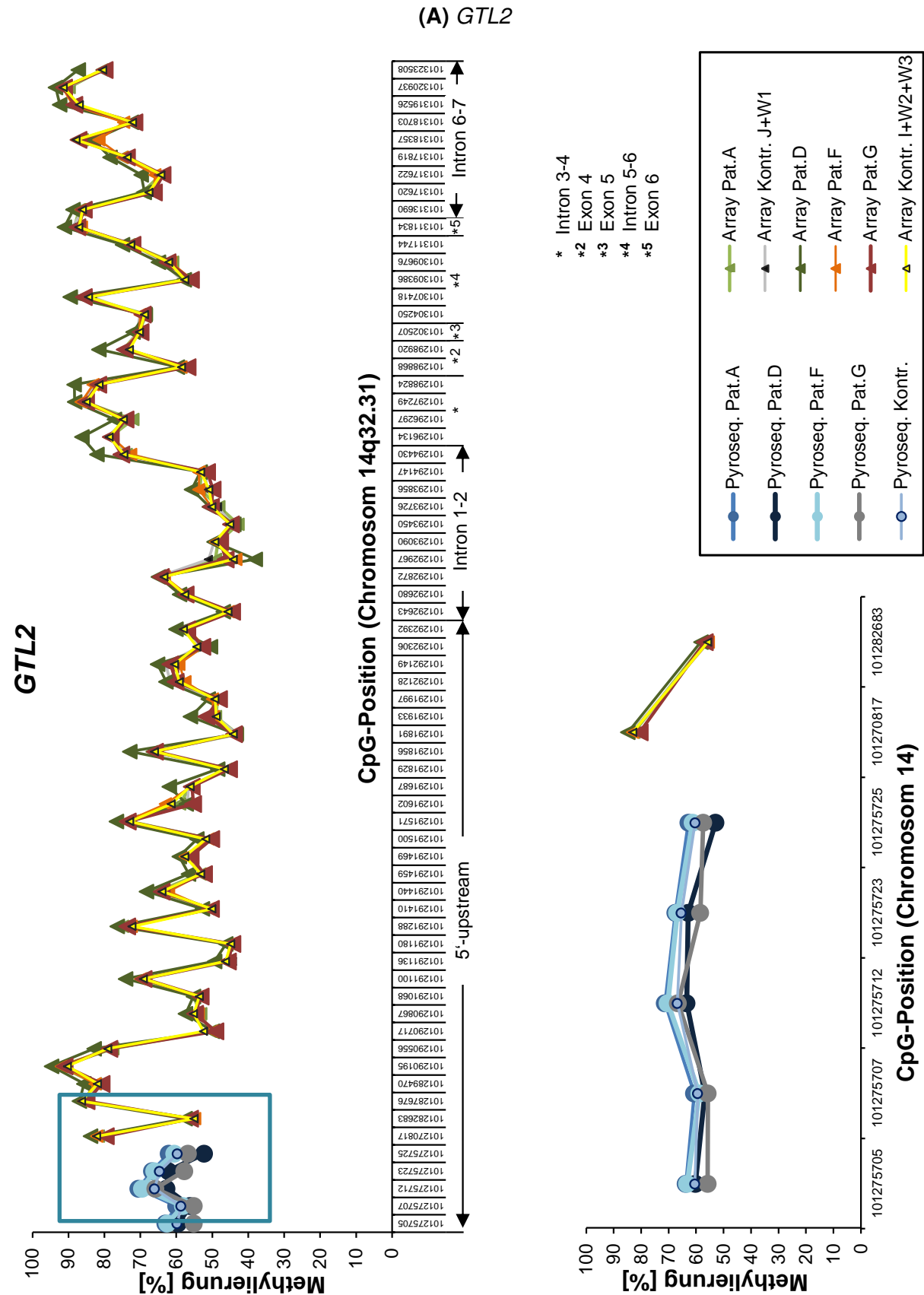
Dabei fiel auf, dass die analysierten CpG-Stellen in Bisulfit-Pyrosequenzierung und Array nicht bzw. nur teilweise deckungsgleich sind und der Array hauptsächlich CpGs innerhalb der kodierenden Regionen von Genen abdeckt (vgl. Abb. 3.6). Lediglich fünf CpGs (den Genen *MEST*, *LIT1* und *PEG3* zugeordnet) wurden mit beiden Methoden analysiert. Die Messwerte bestätigten sich gegenseitig jedoch nicht, die Differenz lag bei vielen Patienten pro CpG zum Teil sogar weit über 10 % (vgl. Tab. 3.8). Auch die Mittelwerte aller CpGs pro analysierter DMR im Array ergaben keine Auffälligkeiten.

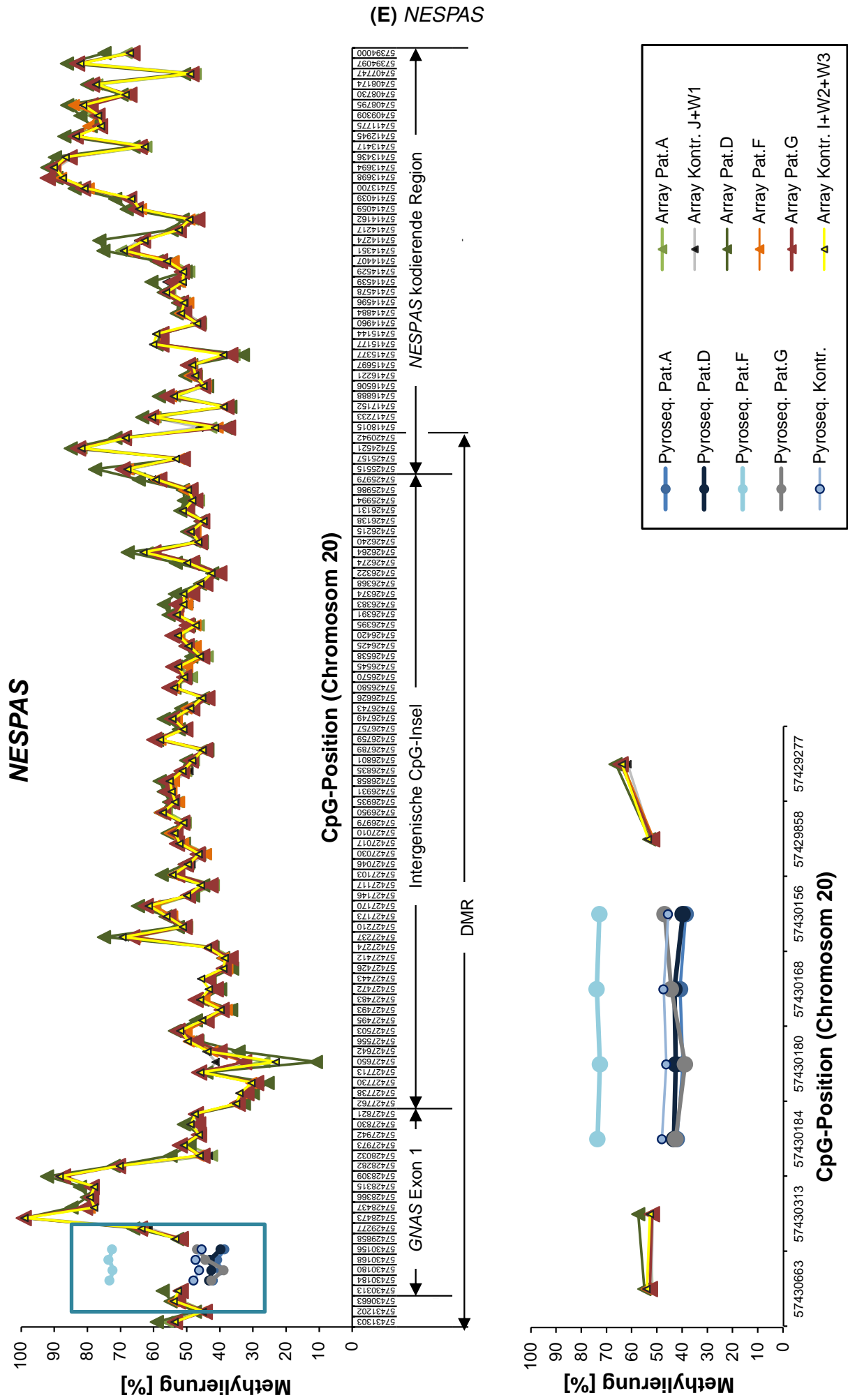
Gen	<i>MEST</i> (Chr. 7)				<i>LIT1</i> (Chr. 11)		<i>PEG3</i> (Chr. 19)			
	130132259		130132265		2721243		57352018		57352021	
Methode	Pyroseq.	Array	Pyroseq.	Array	Pyroseq.	Array	Pyroseq.	Array	Pyroseq.	Array
Pat.A	77,24	49,37	81,42	45,55	64,12	51,65	69,63	58,57	74,85	47,46
Pat.D	60,89	50,04	64,46	43,68	45,37	54,57	69,49	58,14	82,06	48,95
Pat.F	64,28	49,46	64,53	44,65	57,89	52,52	68,48	54,69	69,53	48,00
Pat.G	46,39	50,20	48,13	44,32	51,17	54,12	51,04	57,68	56,10	49,55
Kontr. Pyro	47,40	-	47,21	-	47,30	-	51,63	-	54,78	-
Kontr. J+W1	-	47,87	-	45,09	-	54,32	-	57,46	-	49,83
Kontr. I+W2+W3	-	50,44	-	46,67	-	53,98	-	58,42	-	48,20

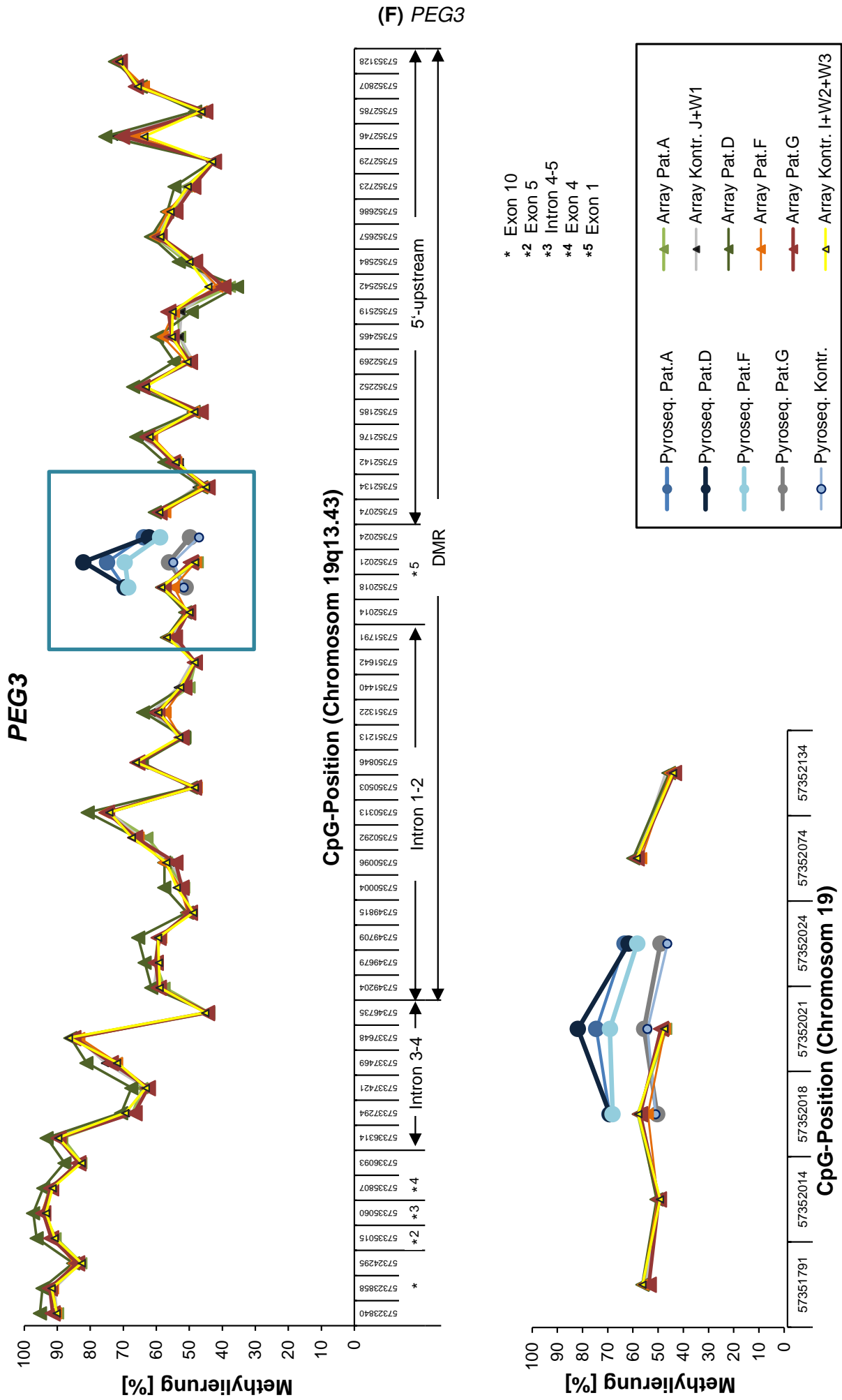
Tabelle 3.8: Vergleich von Methylierungsergebnissen von Bisulfit-Pyrosequenzierung und Array
Methylierungswerte [%] der mit beiden Methoden analysierten CpGs. In der Bisulfit-Pyrosequenzierung als auffällig erachtete Werte (vgl. 3.2.2) sind fett dargestellt. Die Werte der Array-Analyse bestätigen diese Auffälligkeiten nicht.

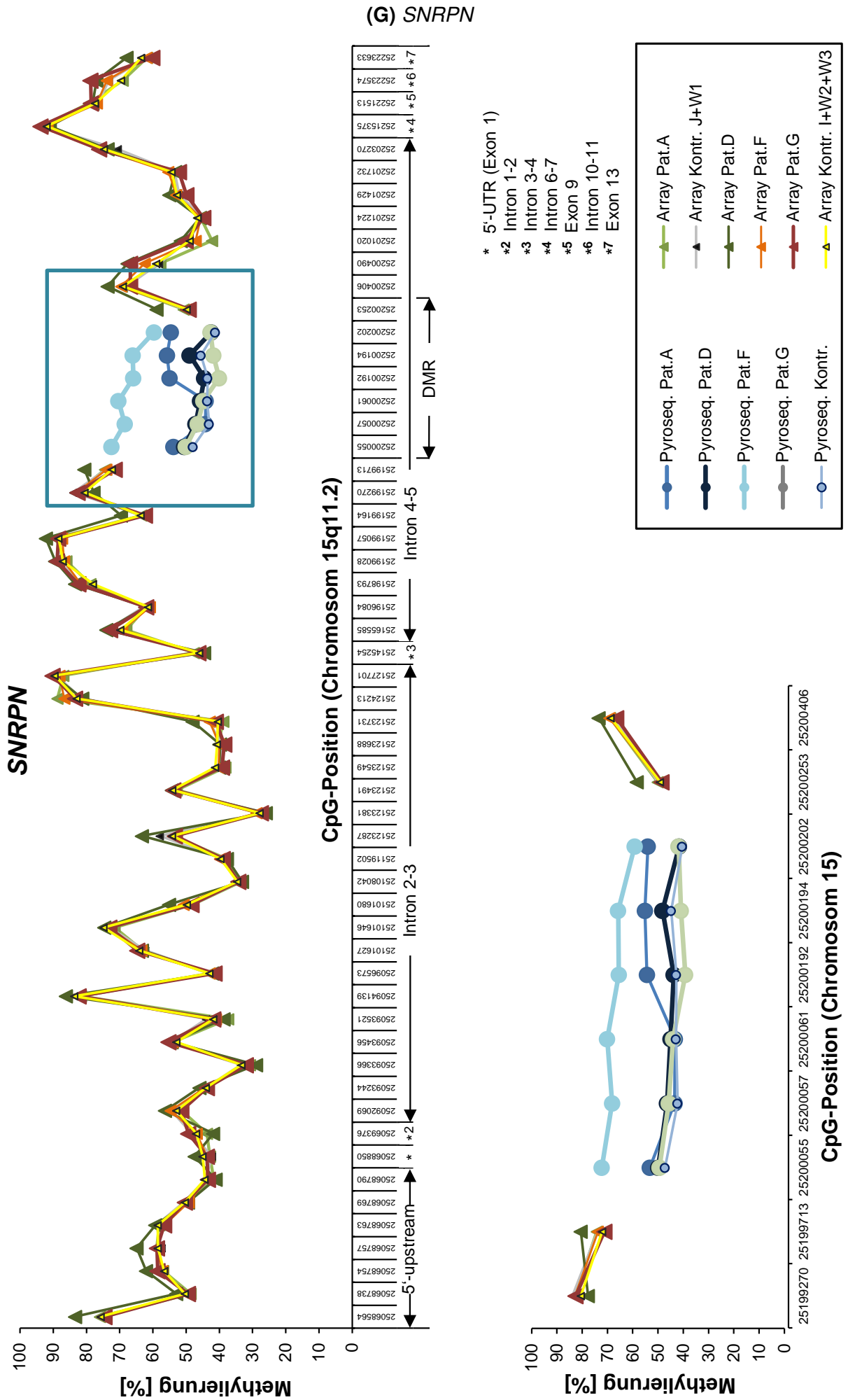
Abbildung 3.6: Vergleich der Methylierungswerte geprägter Gene bei Array und Bisulfit-Pyrosequenzierung

(A)-(G) Aufgetragen sind die Methylierungswerte [%] der einzelnen analysierten CpGs gegen ihre Position im Genom. Die mit Bisulfit-Pyrosequenzierung analysierten Regionen sind zusätzlich vergrößert dargestellt.









3.5 Bisulfit-Pyrosequenzierung bei *AHCY*-Knockdown-Zelllinien

HEK293- und HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown (KD) wurden im Vorfeld dieser Arbeit hergestellt und die DNA mehrerer Klone und Passagen isoliert (vgl. 5.1.2). Um die Auswirkungen der *AHCY*-Defizienz auf die DNA-Methylierung dieser Zelllinien zu untersuchen und damit festzustellen, inwieweit sie als Modellsysteme für die *AHCY*-Defizienz geeignet sind, wurde mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung der Methylierungsstatus der DMRs sieben geprägter Gene (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) und zwei repetitiver Elemente (Alu und LINE1) in HEK293- und HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown (KD) gemessen. Mehrere Passagen von HEK293- und HepG2-Zelllinien ohne KD dienten als Kontrollen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt und in Tabelle 3.9 aufgelistet. Für diese Zelllinien und für Zelllinien im Allgemeinen lagen zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit keine hausinternen Referenzwerte für den normalen Varianzbereich von durch Bisulfit-Pyrosequenzierung ermittelten Messwerten vor. Daher wurde analog humaner Blutproben eine Schwankung von 10 % Methylierung als normaler Varianzbereich angesehen (vgl. 3.2.1). Eine Abweichung von über 10 % zum Mittelwert der Kontrollen wurde als moderat aberrante Methylierung definiert. Dies entspricht zudem etwas mehr als dem zweifachen Wert der berechneten Standardabweichungen pro Zelllinie, sodass dieser Ansatz für die Definition von aberranter Methylierung zu rechtfertigen ist. Eine Abweichung von mindestens 20 % wurde als stark aberrante Hypo- bzw. Hypermethylierung eingestuft.

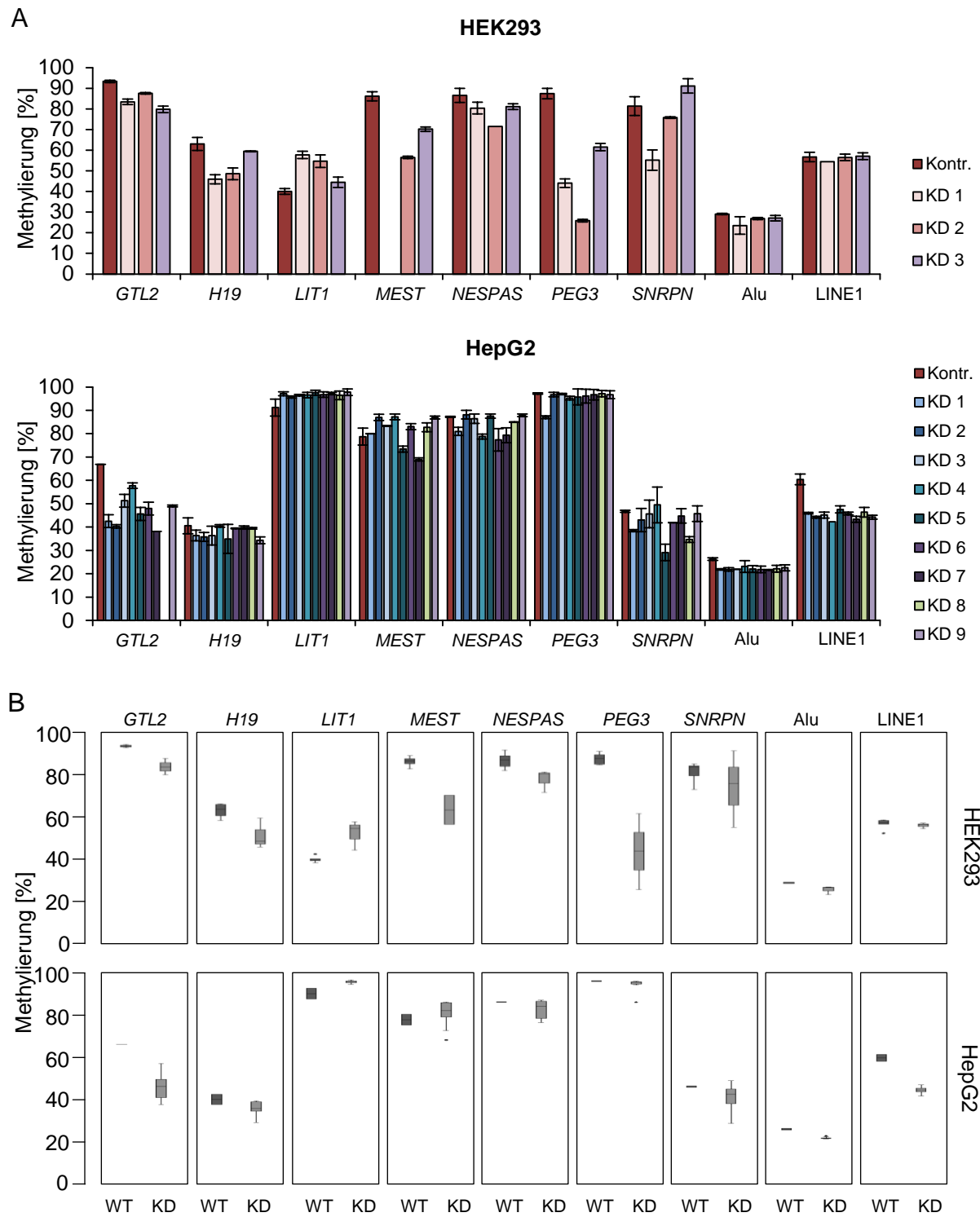


Abbildung 3.7: Methylierung neun ausgewählter DMRs in *AHCY*-Knockdown-Zelllinien

Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung gemessene Methylierungswerte [%] von DMRs sieben geprägter Gene und zwei repetitiver Elemente in HEK293- und HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown (KD). Verschiedene Passagen von HEK293- und HepG2-Wildtyp-Zelllinien (WT) dienten als Kontrollen (Kontr.). **A** Methylierungswerte jeder einzelnen KD-Probe im Vergleich zu den gemittelten Kontrollen. **B** Boxplots der gemittelten Methylierungswerte pro Gen und Zelltyp.

Zelltyp	Zelllinie	<i>GTL2</i>	<i>H19</i>	<i>LIT1</i>	<i>MEST</i>	<i>NESPAS</i>	<i>PEG3</i>	<i>SNRPN</i>	Alu	LINE1
HEK293	Kontr. (n=6)	93,34 ± 0,55	63,04 ± 3,17	40,02 ± 1,39	86,10 ± 2,16	86,54 ± 3,46	87,42 ± 2,49	81,38 ± 4,58	29,06 ± 0,31	56,70 ± 2,27
	KD 1	83,43 ± 1,37	45,91 ± 2,26	57,68 ± 1,79	-	80,36 ± 2,85	44,02 ± 2,09	55,16 ± 4,93	23,51 ± 4,27	54,49
	KD 2	87,55 ± 0,44	48,57 ± 2,88	54,68 ± 3,07	56,50 ± 0,54	71,52	25,87 ± 0,58	75,77 ± 0,34	26,87 ± 0,45	56,51 ± 1,53
	KD 3	79,80 ± 1,58	59,47 ± 0,20	44,41 ± 2,53	70,17 ± 1,12	81,08 ± 1,37	61,51 ± 1,74	91,12 ± 3,45	27,08 ± 1,30	57,05 ± 1,67
HepG2	Kontr. (n=2)	66,85	40,55 ± 3,42	91,18 ± 3,65	78,73 ± 3,63	87,18 ± 0,18	97,21 ± 0,29	46,71 ± 0,47	26,28 ± 0,57	60,41 ± 2,31
	KD 1	42,49 ± 2,75	36,36 ± 2,29	97,11 ± 0,86	80,01 ± 0,04	80,96 ± 1,72	87,07 ± 0,62	38,45 ± 0,43	21,85 ± 0,31	45,95 ± 0,33
	KD 2	40,31 ± 0,72	35,82 ± 1,90	95,66 ± 0,46	87,00 ± 1,36	88,11 ± 1,84	96,75 ± 0,95	43,03 ± 4,97	21,83 ± 0,73	44,24 ± 0,38
	KD 3	51,28 ± 2,74	36,31 ± 4,05	96,48 ± 0,31	83,32 ± 0,19	86,38 ± 2,01	96,97 ± 0,27	45,58 ± 5,93	21,94 ± 0,00	45,12 ± 1,27
	KD 4	57,73 ± 1,16	40,46 ± 0,55	96,55 ± 1,15	87,19 ± 1,27	78,77 ± 1,10	95,30 ± 0,79	49,49 ± 7,66	23,09 ± 2,53	42,24
	KD 5	45,64 ± 2,80	34,91 ± 6,18	97,58 ± 1,06	73,44 ± 1,28	87,55 ± 0,86	95,74 ± 3,42	29,11 ± 3,54	22,05 ± 1,46	47,51 ± 1,51
	KD 6	47,92 ± 2,77	39,42 ± 0,19	96,75 ± 1,18	83,02 ± 1,31	77,33 ± 4,81	96,10 ± 2,97	41,90 ± 0,04	21,84 ± 1,36	45,74 ± 0,62
	KD 7	38,10 ± 0,01	39,78 ± 0,68	97,20 ± 0,54	69,00 ± 0,66	79,37 ± 3,19	96,74 ± 2,24	44,76 ± 3,05	21,64 ± 0,17	43,32 ± 1,24
	KD 8	-	39,44 ± 0,37	96,45 ± 1,86	82,70 ± 1,93	84,99 ± 0,10	97,13 ± 1,31	34,62 ± 1,23	22,14 ± 1,40	46,36 ± 2,04
	KD 9	49,03 ± 0,38	34,30 ± 1,42	97,80 ± 1,38	86,93 ± 0,59	87,90 ± 0,59	96,66 ± 1,67	45,71 ± 3,31	22,55 ± 1,30	44,23 ± 0,82

Tabelle 3.9: Methylierung neun ausgewählter DMRs in *AHCY*-Knockdown-Zelllinien

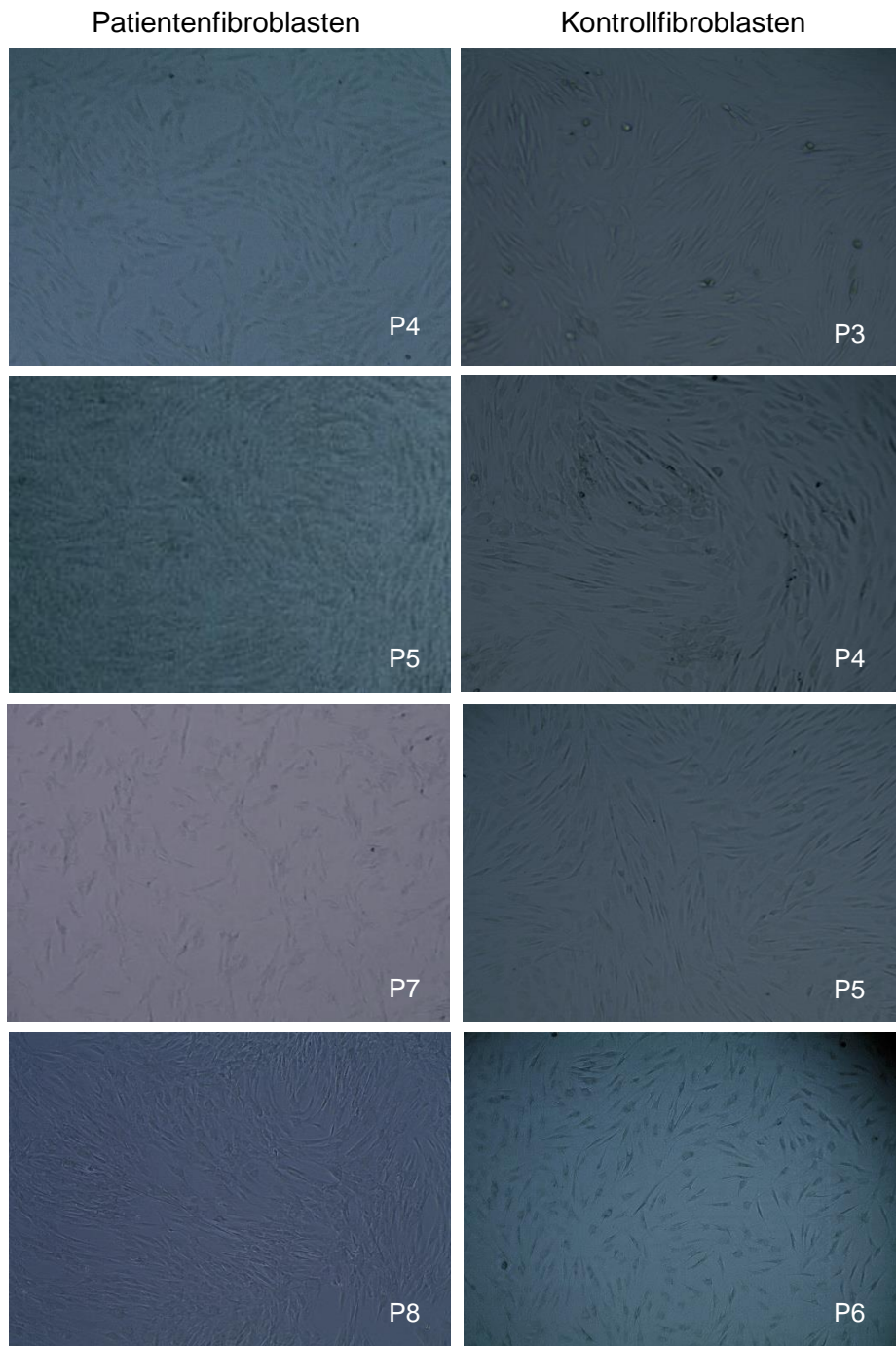
DMR-Methylierungsstatus [%] von sieben geprägten Genen und zwei repetitiven Elementen in HEK293- und HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown (KD). Verschiedene Passagen von Wildtyp-Zelllinien dienen als Kontrollen (Kontr.). Manche Proben konnten nur einmal gemessen werden und haben daher keine Standardabweichung. Ein Methylierungsunterschied von mind. 10 % (fett) wurde als moderat aberrant und von mind. 20 % (fett und unterstrichen) als stark aberrant Hypo- bzw. Hypermethylierung eingestuft.

In den HEK293-KD-Zelllinien war jede analysierte DMR eines geprägten Gens in mindestens einer Zelllinie moderat oder stark aberrant hypomethyliert. Die einzige Ausnahme bildete die DMR von *LIT1*, welche in zwei Zelllinien moderat aberrant hypermethyliert war. Die DMRs von *H19* und *MEST* waren in zwei, die DMRs von *GTL2*, *NESPAS* und *SNRPN* in einer Zelllinie aberrant hypomethyliert. Die DMRs von *MEST* und *SNRPN* waren dabei in jeweils einer Zelllinie moderat und in einer anderen stark aberrant hypomethyliert, die DMRs von *GTL2*, *H19* und *LIT1* waren moderat aberrant hypomethyliert. Die DMR von *PEG3* war in jeder der drei analysierten Zelllinien stark aberrant hypomethyliert. Die Methylierungswerte für Alu und LINE1 waren unauffällig. In den HepG2-KD-Zelllinien war die DMR von LINE1 in allen Zelllinien moderat aberrant hypomethyliert. Die DMRs von *SNRPN* und *GTL2* waren in je zwei Zelllinien und die DMR von *PEG3* in einer Zelllinie moderat aberrant hypomethyliert. Zusätzlich fand

sich in fünf Zelllinien eine stark aberrante Hypomethylierung der DMR von *GTL2*. Die HEK293-KD-Zelllinien zeigten deutlich stärkere Methylierungsveränderungen als die HepG2-KD-Zelllinien. Zwei der drei HEK293-Zelllinien zeigten aberrante Methylierungswerte für vier DMRs, die dritte für drei DMRs. Bei den HepG2-Zelllinien waren bei sieben Klonen nur zwei, bei zwei Klonen drei Methylierungswerte auffällig.

3.6 Fibroblastenkultur mit AHCY-Defizienz

Zusätzlich zur reinen DNA lagen für diese Arbeit auch Fibroblastenzellen aus einer Hautbiopsie von Patient G vor (vgl. 5.1.3). Sowohl diese Zellen als auch Kontrollfibroblasten ließen sich unter gleichen Bedingungen kultivieren (vgl. 5.9). Beide Zelllinien zeigten keine Unterschiede in der Morphologie und ließen sich immer am selben Tag passagieren (Abb. 3.8). Jede kultivierte Passage wurde teilweise in flüssigem Stickstoff eingefroren, sodass genug Zellmaterial für Expressionsanalysen und DNA-Sequenzierungen vorhanden war.

**Abbildung 3.8: Morphologie von Fibroblasten mit AHCY-Defizienz**

Die Morphologie verschiedener Passagen (P) von Fibroblasten aus Patient G zeigt keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten ohne AHCY-Defizienz. Vergrößerung ca. 100x.

3.6.1 Methylierungsstatus ausgewählter Gene in Fibroblasten mit AHCY-Defizienz

Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung (vgl. 5.6.1) wurde der Methylierungsstatus von DMRs sieben geprägter Gene (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) und zwei repetitiver Elemente (Alu, LINE1) in isolierter DNA von Fibroblasten aus Patient G analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 und Tabelle 3.10 im Vergleich zu den ermittelten Methylierungswerten der Blutprobe von Patient G (vgl. 3.2.2) dargestellt. Die Werte decken sich sehr gut, sodass kein Methylierungsunterschied der analysierten Gene in Blut und Fibroblasten erkennbar ist. Die Methylierungswerte für *H19* konnten nur für die Blutprobe zweifelsfrei bestimmt werden (vgl. 3.2.2), nicht jedoch für die Fibroblasten.

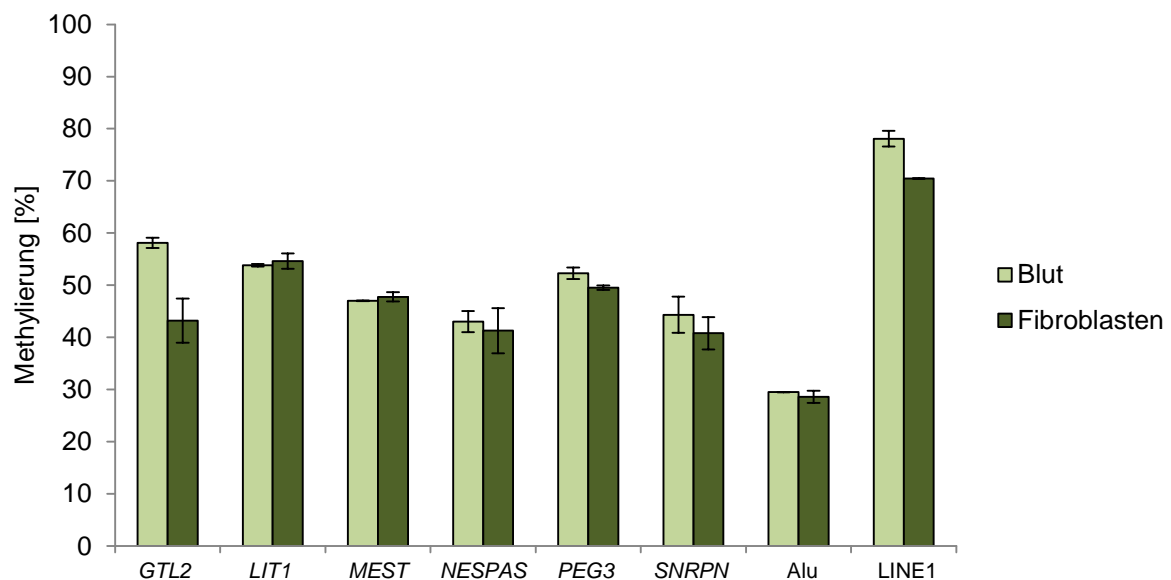


Abbildung 3.9: Vergleich des DNA-Methylierungsstatus in unterschiedlichen Geweben

Methylierung [%] von DMRs geprägter Gene und repetitiver Elemente in Blut- und Fibroblasten-DNA von Patient G.

Probe	<i>GTL2</i>	<i>LIT1</i>	<i>MEST</i>	<i>NESPAS</i>	<i>PEG3</i>	<i>SNRPN</i>	Alu	LINE1
Blut	58,11 ± 0,98	53,81 ± 0,24	46,99 ± 0,07	43,02 ± 2,00	52,29 ± 1,11	44,32 ± 3,46	29,49 ± 0,03	78,08 ± 1,51
Fibroblasten	43,19 ± 4,25	54,6 ± 1,48	47,77 ± 0,88	41,27 ± 4,35	49,52 ± 0,45	40,8 ± 3,09	28,59 ± 1,16	70,45 ± 0,08

Tabelle 3.10: Vergleich des DNA-Methylierungsstatus in unterschiedlichen Geweben

Methylierungswerte [%] von DMRs geprägter Gene und repetitiver Elemente in Blut- und Fibroblasten-DNA von Patient G.

3.6.2 *AHCY*-Expressionsanalyse mittels qPCR

Um zu untersuchen, ob sich die *AHCY*-Expression in Zellen mit *AHCY*-Defizienz verändert, wurde aus Patienten- und Kontrollfibroblasten (Passage 2 bzw. 6) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und das Mengenverhältnis der *AHCY*-Transkripte mittels qPCR gemessen (vgl. 5.5.2.1). Zur Normalisierung dienten die Gene *TBP* und *RNN18S*. Abb. 3.10 zeigt die Schmelzkurven der verwendeten Primer, deren Verläufe die Eignung der Primer verifizieren (vgl. Abb. 5.1).

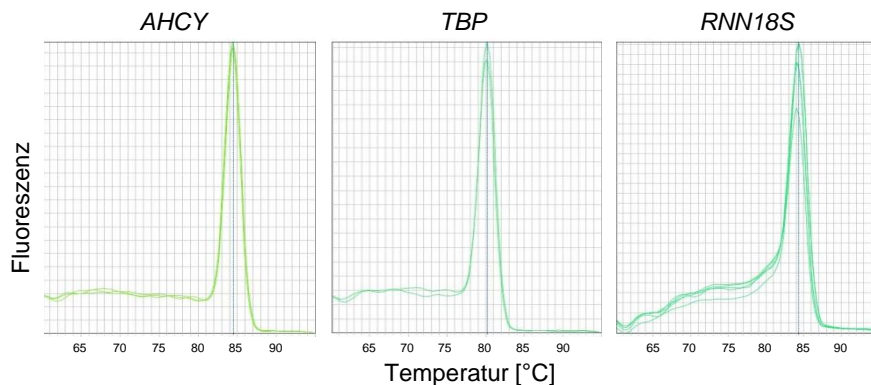


Abbildung 3.10: Schmelzkurven der verwendeten Primer für die Expressions-qPCR

Alle Schmelzkurven bestätigen eine hohe Qualität der verwendeten Primer.

Die ermittelten RQ-Werte wurden für die Kontrollen gleich 1 gesetzt und durch die Werte der Patientenfibroblasten geteilt. Die so berechneten Verhältnisse wurden von zwei technischen Replikaten gemittelt. Die Kontrollfibroblasten zeigten hierbei eine fast achtfach ($7,85 \pm 1,21$) so starke *AHCY*-Expression wie die Patientenfibroblasten (vgl. Abb. 3.11). Die Expression ist demnach in den Patientenfibroblasten herunterreguliert.

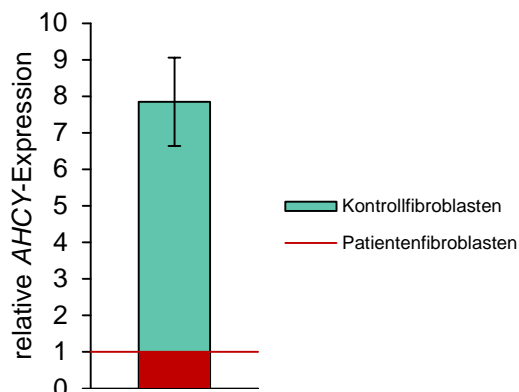


Abbildung 3.11: Relative *AHCY*-Expression in Patienten- und Kontrollfibroblasten

Die Berechnung des Verhältnisses der *AHCY*-Expression von Kontroll- zu Patientenfibroblasten ergab eine $7,85 \pm 1,21$ so starke Expression in den Kontrollfibroblasten.

3.6.3 Allelspezifität der *AHCY*-Transkripte (QUASEP-Analyse)

Die QUASEP-Analyse (Quantification of Allele-Specific Expression by Pyrosequencing, vgl. 5.6.2) ist eine Methode zur allelspezifischen Unterscheidung der Transkripte eines Kandidatengens. Voraussetzung hierfür ist eine bekannte Sequenzvariante zwischen den zu untersuchenden Allelen.

Um die Allelspezifität der *AHCY*-Transkripte in Patientenfibroblasten mit *AHCY*-Defizienz (vgl. 5.1.3) zu analysieren, wurde aus den Fibroblasten RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben (vgl. 5.10.1 und 5.11). In der anschließenden Pyrosequenzierung (vgl. 5.6) wurde die bekannte Mutation c.428A>G zur Unterscheidung der allelspezifischen Transkripte per SNP-Analyse analysiert, sodass das Verhältnis von G (Mutation) zu A das Mengenverhältnis der Transkripte beider Allele widerspiegelt.

Die Pyrosequenzierung wurde mit zwei technischen Replikaten durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Das Verhältnis G/A betrug 0,64 (vgl. Abb. 3.12). Das Allel mit der Mutation c.982 T>G wird demnach 20 % stärker exprimiert als das Allel mit der Mutation c.428A>G.

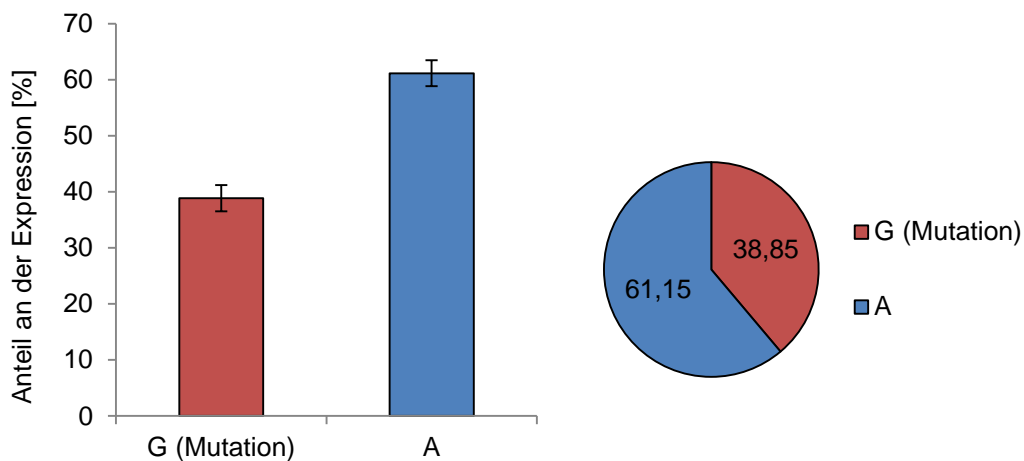


Abbildung 3.12: Allelspezifität der *AHCY*-Transkripte in Fibroblasten mit *AHCY*-Defizienz

Mit QUASEP-Analyse ermittelte Anteile beider *AHCY*-Allele an der Expression von *AHCY* in Fibroblasten. Das Verhältnis G/A beträgt 0,64.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals stochastische DNA-Methylierungsveränderungen in Patienten mit AHCY-Defizienz und *AHCY*-Knockdown-Zelllinien festgestellt, die sowohl die gesamtgenomische DNA-Methylierung, als auch den Methylierungsstatus einzelner DMRs geprägter Gene betrafen. Diese Ergebnisse sollen nun im Vergleich zu bereits bekannten Störungen des Methioninstoffwechsels und der DNA-Methylierung eingeordnet und interpretiert werden.

4.1 AHCY-Defizienz und andere Erkrankungen mit globalen DNA-Methylierungsstörungen

Eine Auswirkung der AHCY-Defizienz auf die globale DNA-Methylierung wurde bereits von Barić *et al.* für zwei Patienten beschrieben. Dabei wurde der Methylierungsstatus durch Quantifizierung der Aufnahme von [³H]dCTP in die DNA von Leukozyten der Patienten gemessen und globale DNA-Hypermethylierungen festgestellt [204]. Bei der für diese Arbeit durchgeführten Analysen der globalen DNA-Methylierung von Blutproben dreier Patienten mit AHCY-Defizienz mit dem MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek) zeigten die Blutproben derselben beiden Patienten signifikante globale DNA-Hypermethylierungen unterschiedlichen Ausmaßes. Somit konnten die Messungen von Barić *et al.* bestätigt und genauer quantifiziert werden. Die dritte analysierte Probe zeigte keine Veränderung der DNA-Methylierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen (vgl. 3.1). Demnach ist eine Veränderung der globalen DNA-Methylierung kein notwendiges, sondern ein stochastisch auftretendes Symptom der monogen verursachten AHCY-Defizienz.

Globale Methylierungsveränderungen der DNA wurden bereits für andere monogene Erkrankungen beschrieben, die wie die AHCY-Defizienz zu schweren körperlichen und geistigen Symptomen führen. Oft sind die Produkte der betroffenen Gene direkt an der DNA-Methylierung beteiligt. Ein bekanntes Beispiel ist das autosomal rezessive ICF-Syndrom (*immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies*), bei dem in den Patienten neben den im Namen enthaltenen Gesichtsanomalien und Immundefizienz globale DNA-Hypomethylierungen festgestellt werden konnten. In den meisten

Fällen wird das ICF-Syndrom durch Mutationen im Gen für die DNA-Methyltransferase DNMT3B verursacht, durch deren Mangel die DNA-Hypomethylierung erklärt werden kann [210]. Dominante Mutationen in *DNMT3A* können zum Tatton-Brown-Rahman-Syndrom führen, welches übermäßiges Wachstum und mentale Retardierung mit sich bringt. Die Mutationen in funktionellen Domänen des Proteins verändern wahrscheinlich seine Histonbindungsaktivität und stören dadurch die *de novo*-Methylierung der DNA [211]. Je nach Mutation kann dies zu einer globalen DNA-Hypomethylierung führen [212]. Beim SLE-Syndrom (systemischer Lupus erythematoses) zeigt sich eine globale DNA-Hypomethylierung in CD4(+) T-Zellen ohne Veränderung der Transkription von *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B* [213–215]. Das betroffene Gen *IFIH1* kodiert einen Rezeptor für virale RNA, der den Typ 1-Interferon-Signalweg aktiviert (zusammengefasst in [216]). Das Hutchinson-Gilford-Syndrom und das Werner-Syndrom sind durch Progerie gekennzeichnet und werden oft durch Mutationen in den Genen *LMNA* bzw. *WRN* hervorgerufen [217–219]. Array-basierte Analysen der globalen DNA-Methylierung zeigten Unterschiede zwischen Patientenproben mit und ohne kausale Mutation in diesen Genen [220]. Auch bei einer familiären Form der Parkinson-Krankheit wurde eine DNA-Hypomethylierung festgestellt, da das betroffene Protein alpha-Synuclein im Cytoplasma mit DNMT1 einen Komplex bildet und es dadurch zu einer aberranten Lokalisation von DNMT1 kommt, welche die DNA-Methylierung im Gehirn behindert [221, 222].

Es sei erwähnt, dass monogene Erkrankungen, bei denen die betroffenen Gene bzw. ihre Produkte die DNA-Methylierung direkt regulieren, seltener vorkommen als solche, die auf Mutationen in Chromatin-Modifikatoren zurückzuführen sind. So finden sich weitaus mehr Syndrome, bei denen histonmodifizierende Enzyme betroffen sind, wie z.B. das Rubinstein-Taybi-Syndrom oder das Kabuki-Syndrom (zusammengefasst in [223]). Generell ist dies aber auch darauf zurückzuführen, dass viele Proteine bekannt sind, die an Histonmodifikationen beteiligt sind, wohingegen deutlich weniger Proteine die DNA-Methylierungs bzw. -Demethylierungsprozesse regulieren.

Interessanterweise sind bei allen recherchierten monogenen Erkrankungen globale DNA-Hypomethylierungen beobachtet worden. DNA-Hypermethylierungen traten höchstens lokal und parallel zu einer globalen Hypomethylierung auf und betrafen begrenzte Chromosomenabschnitte oder bestimmte Gene [210, 212]. Die AHCY-Defizienz ist daher unseres Wissens die erste beschriebene monogene Erkrankung, die stochastisch mit einer globalen DNA-Hypermethylierung, jedoch nicht mit einer globalen DNA-Hypomethylierung einhergeht. Die Prävalenz dieser Begleiterscheinung wird sich durch Analysen weiterer Patienten in Zukunft genauer einschätzen lassen.

Globale DNA-Hypermethylierungen werden dagegen häufig bei komplexen Erkran-

kungen gefunden, beispielsweise bei diversen Formen von Krebs. Generell ist das DNA-Methylierungsprofil gesunder Zellen durch genspezifische Hypomethylierung und globale Hypermethylierung charakterisiert, wohingegen Krebszellen das reverse Profil zeigen (z.B. [224, 225]). In Krebszellen sind vor allem CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen hypermethyliert, um deren Expression zu unterdrücken [188].

Beispiele für Krebsformen mit DNA-Hypermethylierungen sind der papilläre Schilddrüsenkrebs, follikuläre Adenome und Karzinome [226]. Akute lymphoblastische Leukämie bei Kindern ist eine hoch aggressive Form der Leukämie, die oft durch starke Hypermethylierungen in CpG-Inseln von Promotoren charakterisiert ist und auch einen Trend zu globaler Hypermethylierung zeigt [225]. In Fällen von Lungenkrebs war die globale Hypermethylierung signifikant mit einer schlechteren Prognose in fortgeschrittenen Stadien assoziiert [227].

Globale DNA-Hypermethylierungen wurden auch in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gemessen. Hierbei waren sowohl die 5mC- als auch die 5hmC-Konzentration in bestimmten Gehirnarealen erhöht [228]. Auch karzinogene Metalle (z.B. Nickel, Arsen, Kadmium) können die DNA-Methylierung verändern und sowohl hyper- als auch hypomethylierende Prozesse induzieren [224]. Eine Studie von Männern, die chronisch ionisierender Strahlung ausgesetzt waren, ergab, dass diese eine signifikant höhere Anzahl hypermethylierter Spermatozoen hatten [229]. Robinson *et al.* maßen eine globale Hypermethylierung in hypoxischen Fibroblasten [230]. Auch bei Plazentagewebe und adulten Leukozyten von Patienten mit Down-Syndrom konnten globale DNA-Hypermethylierungen gemessen werden. Vermutlich finden dabei früh in der Entwicklung globale epigenetische Veränderungen statt, welche zum Phänotyp beitragen [231].

Globale DNA-Hypermethylierungen sind demnach eine heutzutage bekannte geradezu gängige Begleiterscheinung diverser komplexer Krankheitsformen, die sowohl den körperlichen als auch den geistigen Zustand der Patienten negativ beeinflussen. Die AHCY-Defizienz stellt daher eine monogene Erkrankung mit globalen DNA-Methylierungsveränderungen analog zu komplexen Erkrankungen dar. Möglicherweise ist dies im Zusammenhang mit der Komplexität und Bedeutung des betroffenen Methioninstoffwechsels zu erklären, der für unzählige Stoffwechselprozesse und -reaktionen eine Rolle spielt.

Daher soll im nächsten Abschnitt der Einfluss der AHCY-Defizienz auf Metaboliten dieses Stoffwechselwegs genauer diskutiert werden. Zudem erfolgt ein Vergleich mit anderen Krankheiten, die den Methioninstoffwechsel betreffen und ähnliche Symptome hervorrufen können.

4.2 AHCY-Defizienz im Vergleich zu anderen Erkrankungen des Methioninstoffwechsels

Das Enzym AHCY ist Bestandteil des Methioninstoffwechsels, welcher in allen Zelltypen von Säugetieren zu finden ist. Er ist ein essentieller Ausgangspunkt für Transmethylierungsreaktionen und somit auch für die Methylierung der DNA [232–234]. Da die AHCY-Defizienz eine sehr seltene Krankheit ist und der Zusammenhang zwischen einem AHCY-Mangel und Veränderungen der DNA-Methylierung bisher zwar beschrieben, aber noch nicht zufriedenstellend erklärt werden konnte, ist es sinnvoll, die AHCY-Defizienz mit anderen Krankheiten des Methioninstoffwechsels zu vergleichen und sich bei Erklärungsversuchen an deren Auswirkungen und bisher publizierten Ergebnissen bezüglich DNA-Methylierungsveränderungen zu orientieren.

Im Methioninstoffwechsel (vgl. Abb 2.12) überträgt zunächst die Methioninadenosyltransferase (MAT, EC 2.5.1.6) eine Adenosylgruppe von ATP auf Methionin, wodurch S-Adenosylmethionin (SAM) entsteht. Dieses wird anschließend zu S-adenosyl-L-Homocystein (SAH) demethyliert. Dieser Schritt wird von diversen Methyltransferasen katalysiert und die freigewordene Methylgruppe auf andere Moleküle übertragen. Im nächsten Schritt wird SAH durch AHCY zu Adenosin und Homocystein (Hcy) hydrolysiert. Hcy kann von der Folat/Vitamin B12-abhängigen Methioninsynthese (EC 2.1.1.13) und in Leber und Niere von der Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHM, EC 2.1.1.5) zu Methionin remethyliert werden. Alternativ lässt es sich über den irreversiblen Pyridoxalphosphat-abhängigen Transsulfurierungsweg von der Cystathionin- β -Synthetase (CBS, EC 4.2.1.22) permanent aus dem Methioninstoffwechsel entfernen. Adenosin kann durch die Adenosindeaminase (EC 3.5.4.4) oder die Adenosinkinase (EC 2.7.1.20) entfernt werden.

Störungen von CBS und MAT können zu einer Hypermethioninämie führen. Abhängig von der jeweiligen Mutation kann sie autosomal dominant oder rezessiv vererbt werden (zusammengefasst in [235]). Diese Krankheit kann zu neurologischen Symptomen wie psychomotorischer Entwicklungsverzögerung und verminderter Intelligenz führen, zu Tremor, Dystonie, Nystagmus, erhöhten Sehnenreflexen, Sprachschwierigkeiten und Lernschwierigkeiten [234–238]. Wie bei der AHCY-Defizienz - bei der eine Hypermethioninämie bei den Patienten A, B und E (vgl. 5.1.1) festgestellt wurde [203, 204, 209] - sind auch bei der MATI/III-Defizienz mit Mutationen in *MAT1A* Demyelinisierung und Myelopathie beschrieben worden [239–241]. Bei den meisten beschriebenen Patienten mit MATI/III-Defizienz war die Methioninkonzentration im Blut erhöht, die Hcy-Konzentration aber unauffällig. Allerdings war die Konzentration von SAM verringert [234, 242]. Anscheinend haben Patienten mit schwerer Enzymdefizienz und stark erhöhten Plasma-Methioninkonzentrationen ein höheres Risiko, klinische

Symptome zu entwickeln, aber auch Patienten mit nachgewiesenem kompletten Enzymverlust können vollkommen asymptomatisch und ohne neurologische Auffälligkeiten sein [234]. In diesen Fällen dient womöglich die Aktivität der Isoform MAT II (kodiert von *MAT2A*) als kompensierender Schutz [235]. Die Menge an SAM unterscheidet sich jedoch zwischen Patienten mit und ohne neurologische Symptomen kaum [242].

Störungen der Glycin-N-Methyltransferase (GNMT, EC 2.1.1.20) können zu erhöhten Konzentrationen von Aminosäuren, Cystathionin und Betain im Blut und ebenfalls zu Hypermethioninämie führen. Auch die Konzentration von SAM im Blut ist erhöht (10-20fach), die Konzentration von SAH jedoch nicht. Zwei der drei beschriebenen Patienten sind Geschwister, die beide dieselben autosomal rezessiven Mutationen geerbt haben (zusammengefasst in [235]). Die GNMT scheint die einzige Methyltransferase zu sein, die den Methioninmetabolismus regulieren kann [243].

Mehr noch als die Hypermethioninämie hat die Hyperhomocysteinämie (HHcy) - welche auch bei Patient A (vgl. 5.1.1) gefunden wurde [203] - ähnliche Auswirkungen wie die AHCY-Defizienz. Die Hydrolyse von SAH zu Homocystein und Adenosin durch AHCY ist reversibel und das Enzym präferiert die Herstellung von SAH [244]. Eine HHcy führt daher zu einer Konzentrationssteigerung von SAH.

Stark erhöhte Hcy-Mengen im Blut sind ein Risikofaktor für cardio-vaskuläre Krankheiten und Alzheimer [245, 246]. Zudem sind sie mit Herzkrankheiten, Darmkrebs, Geburtsfehlern und neuropsychiatrischen Krankheiten assoziiert [247–253] und werden auch als Risikofaktor für Schizophrenie diskutiert [254, 255]. Ernährung mit chronischem Mangel an Folat, Vitamin B12, Vitamin B6, Methionin oder Cholin können zu einer HHcy führen (zusammengefasst in [256]). Die Hauptursache für genetisch bedingte HHcy sind Mutationen im Gen *MTHFR*, welches die Methylentetrahydrofolatreduktase (EC 1.5.1.20) kodiert, die an der Remethylierung von Hcy zu Methionin beteiligt ist. Patienten zeigen u.a. motorische Defizite, Entwicklungsverzögerung, Thrombosen, mentale Retardierung und Hypotonie (zusammengefasst in [257]).

Gleichzeitig zur SAH-Akkumulation wurde bei der HHcy eine Verringerung der SAM-Konzentration beobachtet. Das Verhältnis von SAM zu SAH wurde schon mehrfach als metabolischer Indikator für den zellulären Methylierungsstatus vorgeschlagen, da die meisten Methyltransferasen (u.a. alle humanen DNA-Methyltransferasen) in Säugern SAM als einzige Quelle für zu übertragende Methylgruppen nutzen (zusammengefasst in [258]). Daher weist ein verringertes Verhältnis SAM/SAH auf eine eingeschränkte bzw. verringerte Fähigkeit der Zelle zu Methylierungsreaktionen hin [259, 260, 260]. Da die meisten SAM-abhängigen Methyltransferasen SAH mit einer höheren Affinität binden als SAM, fungiert SAH zudem als potenter Inhibitor für diese Enzyme [196–199]. Eine zügige Entfernung von SAH ist demnach eine Voraussetzung für effiziente Trans-

methylierungsreaktionen einer Zelle [200–202]. Dies kann bei gesunden Zellen durch Bindung an intrazelluläre Proteine, Hydrolyse durch AHCY und (begrenzten) Transport ins Blut geschehen (zusammengefasst in [256]). Da SAH bei der AHCY-Defizienz sehr stark akkumuliert, wäre aufgrund seiner Methyltransferase-inhibierenden Wirkung eine DNA-Hypomethylierung als naheliegende Konsequenz zu erwarten. Tatsächlich wurden DNA-Hypomethylierungen bei der HHcy beobachtet, z.B. in glatten Muskelzellen, peripheren weißen Blutkörperchen und atherosklerotischen Läsionen [202, 261–264]. Störungen des Enzyms MTHFR führten in verschiedenen Geweben zu HHcy, globaler DNA-Hypomethylierung, verringerter SAM-Konzentration und erhöhter SAH-Konzentration [257]. Zudem war die Hcy-Konzentration im Blut positiv mit der SAH-Konzentration und negativ mit der globalen DNA-Methylierung in Lymphozyten korreliert [202, 262]. Auch die Methylierung von Membranproteinen war in HHcy-Patienten beeinträchtigt [265]. *MTHFR*-Knockout-Mäuse hatten bis zu 10fach erhöhte Hcy-Mengen im Blut und globale DNA-Hypomethylierungen. Sowohl die heterozygoten als auch die homozygoten Knockout-Mäuse wiesen entweder signifikant niedrigere SAM-Konzentrationen oder signifikant erhöhte SAH-Mengen als die Kontrollen oder auch eine Kombination aus beiden Veränderungen auf. Die heterozygoten Mäuse hatten einen unauffälligen Phänotyp, wohingegen die homozygoten Mäuse Entwicklungsverzögerungen und pathologische Veränderungen im Kleinhirn zeigten [257]. In Modell-Ratten für Hepatokarzinogenese führte eine Diät ohne Methylendonoren (Cholin, Folat, Methionin und Vitamin B12) zu einer verringerten SAM-Konzentration und globaler DNA-Hypomethylierung in der Leber [260, 266–268]. In einer anderen Studie zeigten männliche Ratten nach einer methyldarmen Diät eine reduzierte SAM-Konzentration und erhöhte SAH-Werte [269]. Mäuse, denen das Enzym CBS fehlt, wiesen stark erhöhte Hcy-Konzentrationen im Blut und sowohl erhöhte SAH-Konzentrationen als auch eine globale DNA-Hypomethylierung auf [270–272]. Weitere *in vivo*-Studien an Nagetieren zeigten, dass methyldarme Diäten zu schnellem Fettaufbau in der Leber, verstärkter Lipidperoxidation, nekrotischem und apoptotischem Zelltod, verstärkter Zellproliferation, Abbau intrazellulärer Vorräte von Methylgruppendonoren, einem Ungleichgewicht im Deoxynukleotid-Vorrat der Zelle aufgrund von Uracil-Einbindung in die DNA, DNA-Strangbrüche und genomweiten und genspezifischen Hypomethylierungen führen können [273–277].

Interessanterweise werden Adenosin-Analoga als antivirale Mittel gezielt zur Inhibition von AHCY eingesetzt. Da virale Transmethylasen durch SAH leichter inhibiert werden als zelleigene Enzyme, kann dadurch die Methylierung des 5'-Endes viraler mRNA unterdrückt werden [278]. Generell fungiert SAH als Stimulator für die RNA-Synthese und hemmt gleichzeitig deren Methylierung [279].

Trotz all dieser Beobachtungen von DNA-Hypomethylierungen kann die HHcy Hinweise darauf geben, warum Veränderungen der DNA-Methylierung bei Patienten mit AHCY-Defizienz nicht zu der erwarteten Hypomethylierung führen. Bei den aufgeführ-

ten Fällen ist nicht klar, ob die Hypomethylierung auf die Inhibierung der Methyltransferasen durch SAH zurückzuführen ist, oder ob nicht vielmehr der Mangel des Substrates SAM die Transmethylierungsreaktionen eingeschränkt hat [280]. Auch eine Kombination aus beiden Faktoren wurde mehrfach in Betracht gezogen [235, 281–284]. Nur bei mit einer methioninreichen Diät gefütterten *ApoE*-Knockout-Mäusen waren sowohl die Werte für SAH als auch für SAM erhöht und die analysierte DNA war hypomethyliert [280]. Zudem sind die Auswirkungen erhöhter Hcy-Mengen nicht verlässlich vorhersehbar bzw. gewebsspezifisch, vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Methylierungsausgangszustände verschiedener Gewebe [270]. Die durch Infusion erhöhte Konzentration an Hcy im Blut von Ratten führte zwar in verschiedenen Geweben zu einer erhöhten Konzentration von SAH, in Erythrocyten waren die Konzentrationen beider Substanzen jedoch unverändert, wie auch bei Probanden mit experimentell hervorgerufener akuter HHcy [285]. In den Experimenten von Wang *et al.* hielt eine erhöhte Hcy-Konzentration das Zellwachstum an und erhöhte die intrazellulären SAH-Konzentrationen in Endothelzellen, aber nicht in vaskulären glatten Muskelzellen. Möglicherweise wird Hcy schneller durch die Membran in Endothelzellen transportiert [286]. Esse *et al.* induzierten HHcy in Ratten durch methioninreiche bzw. Vitamin B-arme Diäten oder einer Kombination aus beiden Diäten. Die methioninreiche Diät alleine hatte keinen Effekt auf die Konzentrationen von SAM und SAH. Die Vitamin B-Defizienz senkte das SAM/SAH-Verhältnis in Leber und Herz. Die globale Protein-Arginin-Methylierung war gewebsspezifisch gestört, ebenso die Histonargininmethylierung im Gehirn [287]. Kim *et al.* untersuchten Sprague-Dawley-Ratten mit moderater Folat-Defizienz. Niedrigere SAM- und erhöhte SAH-Konzentrationen gab es in der Leber, die DNA-Methylierung in der Leber war jedoch unauffällig. Im Darm waren sowohl die Werte für SAM und SAH als auch die DNA-Methylierung normal, was mit anderen Studien übereinstimmte [288–291]. Auch in *MTHFR*-Knockout-Mäusen fanden sich erhöhte Hcy-Werte im Blut und erhöhte SAH-Werte in der Leber, was die hepatische DNA-Methylierung jedoch nicht veränderte [257]. CBS-Knockout-Mäuse mit HHcy zeigten erhöhte SAH-Konzentrationen in Leber, Nieren und Gehirn, Veränderungen der SAM-Konzentration und der DNA-Methylierung variierten jedoch in verschiedenen Geweben. In der Niere waren die Werte für SAM erhöht, die DNA aber hypomethyliert, im Gehirn war beides unauffällig [270]. Weder Folat- noch Vitamin B12-Mangel führte in den von Chen *et al.* untersuchten Mäusen zu einer Veränderung der DNA-Methylierung in allen untersuchten vaskulären Geweben [257]. Kinoshita *et al.* fanden globale Hcy-abhängige Veränderungen der DNA-Methylierung – sowohl Hypo- als auch Hypermethylierungen einzelner CpGs – in Patienten mit Schizophrenie [292]. In einer Studie von Pogribny *et al.* an Ratten führte eine langanhaltende Diät ohne *one-carbon*-Einheiten, die essentiell für den Tetrahydrofolatstoffwechsel sind, zu einer globalen DNA-Hypermethylierung im Gehirn [293].

Vermutlich werden in verschiedenen Geweben unterschiedliche Schutzmechanismen verwendet, um die Auswirkungen von Enzymdefizienzen auf den Methioninstoffwechsel zu verringern. Beispielsweise können Leber und Nieren von *MTHFR*-Knockout-Mäusen auch Betain als Methyl donor für die Synthese von Methionin/SAM verwenden und so dessen Mangel mildern, da sie das Enzym BHM exprimieren, welches im Gehirn nicht vorkommt [294]. Auch GNMT wird vor allem in der Leber exprimiert und seine Expression wird bei einer methionininduzierten HHcy stark hochreguliert [287].

Insgesamt zeigen die aufgeführten Beispiele, dass eine Veränderung der Konzentrationen von SAM und SAH nicht zwingend zu einer Veränderung der DNA-Methylierung führen muss, was erklären könnte, warum in der vorliegenden Arbeit nicht bei allen Patienten Methylierungsveränderungen beobachtet werden konnten. Zudem scheinen potentielle Auswirkungen von SAM und SAH-Veränderungen auf die DNA-Methylierung sowohl Hypo- als auch Hypermethylierungen zu beinhalten und zudem gewebspezifisch aufzutreten. Von den AHCY-defizienten Patienten mit auffälligen Methylierungsveränderungen der DNA lagen für diese Arbeit ausschließlich Blutproben vor. Es wäre daher von Interesse, weitere Gewebeproben auf aberrante DNA-Methylierung hin zu untersuchen.

4.3 AHCY-Defizienz führt zu stochastischen Hypermethylierungen geprägter Gene

Die genomweite Methylierungsanalyse von DNA AHCY-defizienter Patienten hat ergeben, dass die AHCY-Defizienz zu einer stochastischen DNA-Hypermethylierung führen kann. Da geprägte Gene aufgrund ihrer strengen Regulation durch DNA-Methylierung (vgl. 2.5) besonders interessante Gene bei der Untersuchung von aberranten Methylierungsmustern sind, wurden die DMRs von sieben geprägten Genen (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*) und zwei repetitiven Elementen (Alu, LINE1) in der DNA von sieben Patienten mit AHCY-Defizienz mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht und die Ergebnisse mittels HRM-Analyse bestätigt. Bei drei Patienten waren jeweils drei bis sechs DMRs geprägter Gene hypermethyliert (vgl. 3.2.2). Dabei waren die analysierten CpG-Stellen innerhalb derselben DMR gleichmäßig betroffen. Die stochastische Hypermethylierung bezieht sich folglich – zumindest bei geprägten DNA-Abschnitten – nicht auf einzelne CpG-Stellen, sondern auf zusammenhängende geprägte Bereiche. Der Methylierungsstatus von CpG-Inseln wird schon lange als ein Marker für die Methylierung der gesamten gDNA verwendet [295, 296]. Diese Herangehensweise ist bei der AHCY-Defizienz nicht sinnvoll: Der gesamtgenomische Me-

thylierungsstatus war bei den Patienten A und B erhöht, nicht jedoch bei Patient F. Gleichzeitig wurden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung hypermethylierte DMRs bei den Patienten A und F, nicht jedoch bei Patient B gefunden. Eine aberrante Methylierung geprägter DMRs könnte an der Ursache für die schlechte mentale und körperliche Entwicklung der Patienten beteiligt sein. Für Methylierungsstörungen bei einigen geprägten Genen ist ein Zusammenhang mit syndromalen Entwicklungsstörungen bekannt (vgl. 2.5.1).

Veränderungen der genomischen Prägung wurden in CBS-Knockout-Mäusen mit HHcy (vgl. 4.2) als gewebsspezifisch beschrieben: In der Leber fand sich ein Verlust der Prägung von *Igf2*. Die DMR von *H19* war in der Leber hypomethyliert, in Gehirn und Aorta dagegen hypermethyliert [297, 298]. Gewebsspezifische Unterschiede der DNA-Methylierungsveränderungen können auch bei Patienten mit AHCY-Defizienz nicht ausgeschlossen werden.

Die Methylierung von LINE1 gilt als repräsentativ für die gesamtgenomische Methylierung [299] und die Bisulfit-Pyrosequenzierung von LINE1 wurde schon erfolgreich an Geweben und Blutproben durchgeführt [300]. Die Bisulfit-Pyrosequenzierungsergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch für LINE1 (und Alu) bei keinem der untersuchten Patienten einen auffälligen Methylierungsstatus im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Methylierung von LINE1 kann bei der AHCY-Defizienz demnach nicht als Indikator für die gesamtgenomische Methylierung herangezogen werden. Generell ist dieser Ansatz bei kranken Zellen nicht ausreichend, denn schon bei Krankheiten wie papillärem Schilddrüsenkrebs, follikulären Adenomen und Karzinomen wurden globale DNA-Hypermethylierungen entdeckt, bei denen keine Korrelation mit der LINE1-Methylierung bestand [226]. Wichtig ist auch, Patientenproben bei einer Studie zur AHCY-Defizienz nicht zu *poolen*, da dadurch die stochastischen Veränderungen einzelner Proben nicht mehr erkannt werden könnten. Jeder Patient muss einzeln mit Kontrollproben verglichen werden. Die Kontrollen wiederum dürfen *gepoolt* werden. Stochastische Effekte bedeuten auch, dass die Methylierung einzelner DMRs bzw. Bereiche der DNA nicht zu diagnostischen Zwecken für die AHCY-Defizienz herangezogen werden können. Möglicherweise gibt es eine bei allen Patienten betroffene Region, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden wurde. Daher bleibt die Sanger-Sequenzierung des Gens *AHCY* das Mittel der Wahl, um eine AHCY-Defizienz mit Sicherheit festzustellen.

Um neben den DMRs geprägter Gene weitere betroffene Bereiche des Genoms von AHCY-defizienten Patienten zu identifizieren, wurde eine genomweite Array-Methylierungsanalyse mit dem Infinium[®] HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) durchgeführt. Die Messwerte bestätigten die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung trotz hoher Messgenauigkeit jedoch nicht (vgl. 3.4). Bei detaillierter Analyse fiel auf, dass die analysierten CpG-Stellen in Pyrosequenzierung und Array nicht bzw. nur teilwei-

se deckungsgleich sind und der Array hauptsächlich CpGs innerhalb der kodierenden Regionen der untersuchten geprägten Gene abdeckt. Aufgrund der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Bisulfit-Pyrosequenzierung und des Arrays wurde als dritte Methode die HRM-Analyse herangezogen, welche die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung bestätigte. Daher ist die Validität der Infinium-Arraymethode im Rahmen dieser Arbeit in Frage zu stellen. Mit dieser Methode erzielte Ergebnisse sind generell mit Vorsicht zu betrachten, da fast 14 % der Infinium-Sonden potentiell durch Polymorphismen beeinflusst sein können [301], wobei über 4 % der Sonden direkt an der zu messenden CpG-Stelle einen SNP beinhalten [302]. Chen *et al.* kritisierten zusätzlich, dass nur ein Drittel der Sonden, die auf Cytosine außerhalb von CpG-Stellen zielen, korrekt *gemapped* werden konnten. Zudem waren 6 % der Sonden kreuzreaktiv und hybridisierten nicht mit der richtigen Zielsequenz [301].

Es wäre jedoch generell von Interesse, auch Cytosine außerhalb von DMRs und bekannten regulatorischen Sequenzen zu untersuchen, da sie die Aufrechterhaltung differentieller Chromatinstrukturen für die Transkriptionsregulation beeinflussen können. Jiang *et al.* und White *et al.* fanden durch die Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen heraus, dass die Demethylierung bei Ratten mit HHcy bevorzugt CCGG-Sequenzen statt CpG-Inseln betrifft [303, 304]. Untersuchungen von Kinoshita *et al.* ergaben Hcy-abhängige Hypo- und Hypermethylierungen von CpG-Stellen in peripheren Leukozyten von Patienten mit Schizophrenie in allen Genbereichen, wobei nur etwas mehr als die Hälfte der betroffenen CpGs in CpG-Inseln und deren flankierenden Regionen zu finden war [292].

Eine weitere Methode, um größere DNA-Sequenzabschnitte auf Methylierung der einzelnen CpGs zu untersuchen, wäre das Bisulfite Amplicon Sequencing, bei dem bisulfitekonvertierte DNA mittels Next Generation Sequencing (NGS) analysiert wird. Mit dieser Methode könnten z.B. die flankierenden Bereiche von DMRs noch in die Messung miteinbezogen und die Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung nochmals bestätigt werden. Diese Methode wurde hausintern etabliert, konnte jedoch aus Zeitgründen nicht mehr innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden. Auch die genomweite Bisulfit-Sequenzierung wäre eine gute Möglichkeit zur weitergehenden Methylierungsanalyse, da mit ihr theoretisch alle CpG-Stellen im Genom untersucht werden können. Der Nachteil dieser Methode ist ein zufälliger Verlust vieler DNA-Fragmente während der Bisulfitekonversion nach der Ligation der NGS-Adaptorsequenzen, sodass in der Praxis nicht alle CpGs analysiert werden können. Derzeit gibt es neue Ansätze, um diesen Verlust zu minimieren, indem die Bisulfitekonversion vor der Ligation der NGS-Adaptersequenzen durchgeführt wird [305], die hohen Kosten und die Notwendigkeit einer komplizierten bioinformatischen Auswertung bleiben jedoch bestehen. Daher böte diese Methode die Möglichkeit, neben den geprägten Genen weitere „Kandidatenregionen“ im Genom zu finden, deren Methylierungsmuster durch die AHCY-

Defizienz verändert sein könnten. Diese Regionen müssten anschließend mit anderen Methoden (z.B. Bisulfit-Pyrosequenzierung oder Bisulfite Amplicon Sequencing) bestätigt werden.

4.4 Mögliche Ursachen der DNA-Hypermethylierung bei AHCY-Defizienz

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AHCY-Defizienz in Blutproben zu stochastischen Veränderungen der globalen DNA-Hypermethylierung und der Hypermethylierung von DMRs geprägter Gene führt. Der Vergleich dieser Krankheit mit anderen Krankheiten des Methioninstoffwechsels, bei denen die Konzentrationen der Metaboliten SAM und SAH verändert sind (vgl. 4.2), liefert Anhaltspunkte für Erklärungsansätze dieses Phänomens. Zu beachten ist bei der AHCY-Defizienz, dass die Menge der akkumulierten Metaboliten SAM und SAH um ein Vielfaches höher ist als bei allen recherchierten Studien über Störungen des Methioninmetabolismus. In diesen Studien waren die Mengen an SAH meist um das 2-10fache erhöht, bei den Patienten mit AHCY-Defizienz sind sie dagegen bis zu 200fach erhöht (vgl. 5.1.1). Fu *et al.* postulierten bereits im Jahr 2000, dass akkumuliertes SAH in Erythrozyten auf verstärkte intrazelluläre Methylierungsreaktionen hinweisen könnte [285]. Jiang *et al.* fütterten Ratten mit methioninarmen und methioninreichen Diäten, um HHcy mit unterschiedlichen Ausmaßen zu induzieren, und fanden heraus, dass sich der stärkste Effekt auf die DNA-Methylierung und andere Faktoren bei der methioninarmen Gruppe zeigte. Eine Verstärkung der induzierten HHcy schwächte den Effekt auf die DNA-Methylierung ab [303]. Hcy inhibierte in klinisch relevanten Konzentrationen Wachstum und Transkription von *cyclin A* in embryonalen Zellen, in denen außerdem SAH akkumulierte [286], in überphysiologischen Konzentrationen förderte es jedoch Proliferation und *cyclin A*-Transkription in glatten Muskelzellen [306]. Die Umkehrung eines (möglicherweise zelltypspezifischen) Effektes durch Konzentrationssteigerung eines Metaboliten ist demnach eine realistische Begebenheit und wäre eine plausible Erklärung für die DNA-Hypermethylierung in Patienten mit AHCY-Defizienz. Zudem führt die AHCY-Defizienz nicht zu einem Mangel an SAM, sondern zu einem Überschuss, bei dem SAM bis zu 30fach angereichert wird (vgl. 5.1.1). Es kann spekuliert werden, dass der Überschuss von SAM als Substrat von Methyltransferasen zu einer verstärkten Aktivität von DNA-Methyltransferasen führt, was eine DNA-Hypermethylierung erklären würde. Es muss zudem berücksichtigt werden, dass nicht alle Methyltransferasen gleich effizient von SAH inhibiert werden. In Säugern wurden bereits über 60 Methyltransferasen identifiziert, wobei ihre Anzahl vermutlich noch viel höher ist [232, 307]. Die Effizienz der Inhibierung durch SAH unterscheidet sich signifikant zwischen den

verschiedenen Methyltransferasen und ist von der SAH-Konzentration, dem Verhältnis SAM/SAH und anderen Faktoren abhängig [196, 308]. Barić diskutierte aufgrund der klinischen Symptomatik bereits zwei Kandidaten für eine starke Inhibierung bei AHCY-Defizienz: Die Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase synthetisiert Phosphatidylcholin, welches für Muskel, Leber und Myelin wichtig ist, die Protein-Arginin-N-Methyltransferase methyliert das Myelin-Basische Protein, welches für den Aufbau von Myelin essentiell ist (zusammengefasst in [235]). Eine 100fache Erhöhung der SAH-Menge verringerte die Aktivität dieser Methyltransferase um 90 % [235, 309]. Bei einer Studie zu HHcy mit gesteigerter SAH-Konzentration war jedoch die Aktivität von DNMT1 nur um 30 % reduziert [310]. Eine weitere Studie ergab, dass eine SAH-Akkumulation in humanen Endothelzellen einen stärkeren Effekt auf Argininreste in Proteinen als auf die DNA hatte [311]. Eine Hypermethylierung mehrerer methyltransferaseabhängigen Methylgruppenakzeptoren trotz der vermuteten verminderten Methylierungsfähigkeit der Zelle wurde auch als Teil des pathogenen Potentials der GNMT-Defizienz (vgl. 4.2) vorgeschlagen [235]. Insgesamt ergeben sich damit deutliche Hinweise darauf, dass eine stochastische DNA-Hypermethylierung mit der Akkumulation von SAM und SAH plausibel in Verbindung gebracht werden kann. *In vitro*-Studien mit verschiedenen Methyltransferasen und SAM/SAH-Konzentrationen könnten darüber Aufschluss geben. Die gemessenen SAM/SAH-Konzentrationen der analysierten Patienten (vgl. 5.1.1) zeigen jedoch keine Korrelation mit der gemessenen DNA-Methylierung, ebensowenig wie mit dem Schweregrad der Symptome. Welche Faktoren bei diesen komplexen Zusammenhängen wichtige Rollen spielen, muss noch erforscht werden.

Neben den unterschiedlichen Studien mit Ergebnissen zu DNA-Methylierungsveränderungen sind zwei Studien von Jiang *et al.* besonders interessant. Darin wurden durch entsprechende Diäten HHcy in Sprague-Dawley-Ratten und Hypermethioninämie in *ApoE*-Knockout-Mäusen induziert, die SAH-Menge im Blut der Tiere war daraufhin um das 2-6fache erhöht. Jiang *et al.* untersuchten die DNA-Methylierung durch Analyse der repetitiven B1-Elemente und stellten eine Hypomethylierung fest. Sie postulierten daraufhin, dass sich ein Großteil der gesamtgenomischen Hypomethylierung durch den Verlust der Methylierung an diesen Elementen erklären ließe, da die repetitiven B1-Elemente etwa 45 % des Genoms umfassen und viele CpG-Methylierungen beinhalten, die in postnatalen somatischen Geweben gefunden wurden [280, 303]. Die repetitiven B1-Elemente der Nagetiere sind mit den Alu-Elementen der Primaten verwandt [312]. Die Alu-Elemente wiesen bei den analysierten AHCY-Patienten jedoch keine Veränderung der Methylierung auf, ebensowenig wie die LINE1-Elemente (vgl. 3.2.2). Dies erklärt noch nicht die gemessenen Hypermethylierungen mancher AHCY-defizienten Patienten, könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, warum in keiner

Messung in der vorliegenden Arbeit eine globale Hypomethylierung der Patientenproben festgestellt werden konnte.

Die aberrante Hypermethylierung von DMRs geprägter Gene und des gesamten Genoms lässt die Frage aufkommen, wann es in der Entwicklung der Zellen zu der Hypermethylierung kommen könnte. Generell sind gerade proliferierende Zellen anfällig für hypermethylierende Ereignisse, da sie aufgrund der hemimethylierten Stränge während der Replikation eine geringe gesamtgenomische DNA-Methylierung aufweisen [313]. Dass die Methylierungsmuster der Gameten mit den mutierten *AHCY*-Allelen bereits vor der Befruchtung aberrant sind, ist prinzipiell nicht auszuschließen. In den späten Stadien der Gametogenese findet die genomische Prägung statt (vgl. 2.4.3): Bereits zu diesem Zeitpunkt könnten Fehler auftreten, die zu einer Hypermethylierung führen. In diesem Fall wäre eine Hyperaktivität von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine mögliche Erklärung. Nach der Befruchtung findet in der Zygote unter Beteiligung der TET-Enzyme eine Demethylierung des Genoms statt, von der die untersuchten gDMRs der geprägten Gene jedoch unberührt bleiben. Sollte hierbei ein Fehler auftreten, wären daher nicht die gDMRs, wohl aber das restliche Genom betroffen. Eine genomweite Hypermethylierung wäre die Folge. Nach dem Blastozystenstadium steigt die gesamtgenomische Methylierung wieder an, wobei eine hierbei entstehende Hypermethylierung wieder am ehesten auf die erhöhte Aktivität der DNMTs zurückzuführen wäre.

Über einen TET-Protein-vermittelten Effekt kann nur spekuliert werden, da die TET-vermittelte Demethylierung des Genoms noch ein sehr junges Forschungsfeld ist. Takumi *et al.* fütterten Mäuse mit einer methioninreduzierten Diät und beobachteten gesteigerte Expressionen von *Tet*, *Dnmt1* und *Dnmt3a* ohne eine parallele Reduktion von 5mC [314]. Auch eine Kombination aus aberranter TET- und DNMT-Regulation wäre bei der *AHCY*-Defizienz als Erklärung möglich. Die Expression ebenso wie die Methylierung der *TET*-Gene - ebenso wie die der DNMTs - könnten in einem Mausmodell mit rezessiven *AHCY*-Mutationen in der frühen Embryonalentwicklung oder in reprogrammierten Zellen von Patienten mit *AHCY*-Defizienz untersucht werden, um Aufschlüsse über eine Beteiligung von TET-Proteinen an der Hypermethylierung der DNA zu geben. Bereits aus Untersuchungen an Krebsgewebe ist bekannt, dass die Methyltransferaseaktivität trotz genomweiter Hypomethylierung erhöht sein kann (zusammengefasst in [303]). Eine Hyperaktivität von DNMTs wurde auch bereits im Zusammenhang mit HHcy beschrieben. Bei Ratten führten erhöhten Hcy-Konzentrationen zu einer erhöhten Aktivität von *Dnmt3a* und *Dnmt3b* [303]. Auch in einer Studie von Christman *et al.* waren globale und genspezifische DNA-Hypomethylierungen von einer Steigerung der DNA-Methyltransferaseaktivität begleitet [276, 277]. Hiltunen *et al.* untersuchten die DNA-Methylierung bei atherosklerotischen Läsionen und fanden auch hier eine Kom-

bination aus DNA-Hypomethylierung und hochregulierter DNMT1 [315]. Hcy veränderte die Genexpression in Schaumzellen durch Unterdrückung der Histondeacetylase- und Steigerung der DNMT1-Aktivität [316]. Jiang *et al.* fanden zusätzlich zu einer Steigerung der DNMT-Aktivität eine Abnahme des *methyl-CpG binding domain protein 2* (MBD2), welches methylierte DNA binden und die Expression von Genen unterdrücken kann [303]. In Endothelzellen reduzierte eine HHcy die Bindung des *methyl CpG binding protein 2* (MECP2) und förderte die Bindung von acetyliertem H3 und H4 im Promotor des *cyclin A*-Gens. Interessanterweise zeigte diese Studie eine Reduktion der DNMT1-Aktivität von ungefähr 30 %, die Aktivität von DNMT3 war jedoch nicht beeinträchtigt [310].

Die genannten Beispiele zeigen, dass Veränderungen im Methioninstoffwechsel zahlreiche Auswirkungen auf Faktoren haben können, die bei der DNA-Methylierung eine Rolle spielen. Diese können als Kompensationsmechanismus interpretiert werden, um genomische Methylierungsmuster trotz mangelnder Substrate für Methyltransferasen oder deren Inhibierung aufrechtzuerhalten [303, 317]. Jiang *et al.* ordneten diesem Kompensationsmechanismus eine weitere interessante Beobachtung zu: Die reduzierte Expression von *AHCY* bei Ratten mit induzierter HHcy [303]. Auch in den Fibroblasten des Patienten G (vgl. 5.1.1) konnte eine verringerte Expression von *AHCY* festgestellt werden (vgl. 3.6.1). Dies führt zu einem möglichen Modell, bei dem die Mutationen in *AHCY* zunächst zu der bereits nachgewiesenen Reduktion der *AHCY*-Aktivität führen (vgl. 2.7). Diese Veränderung führt in der Zelle möglicherweise zu den gleichen Signalen, die bei der HHcy die Expression von *AHCY* herunterregulieren. Dieser „Teufelskreis“ wäre zudem eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die übermäßig starke Akkumulation von SAH und SAM bei der *AHCY*-Defizienz, da dadurch der negative Effekt der *AHCY*-Defizienz auf die Aktivität von *AHCY* noch zusätzlich verstärkt würde. Eine andere, vielleicht näherliegende Möglichkeit wäre eine Reduktion der Methylierung der *AHCY*-mRNA aufgrund des allgemein reduzierten RNA-Methylierungspotentials der Zelle (vgl. 4.2), sodass *AHCY* zwar exprimiert, aber nur in geringen Mengen translatiert würde. Dieser Effekt könnte auch bei den eben genannten Signalen enthalten sein. Expressionsstudien von Proteinen wie DNMTs und TETs, RNA-Untersuchungen und Analysen möglicher Veränderungen von Histonmodifikationen, sowie Enhancer- und Transkriptionsfaktoren-betreffende Methylierungsveränderungen in den Fibroblasten mit *AHCY*-Defizienz könnten in naher Zukunft weiterführende Argumente für oder gegen die genannten Vermutungen liefern und Ansatzpunkte für weitere Modellvorschläge aufdecken.

4.5 Diät-induzierte Methylierungsveränderungen bei AHCY-Defizienz und anderen Erkrankungen

Der Zustand von Patienten mit Störungen des Methioninmetabolismus durch GNMT-Defizienz, CBS-Defizienz und MAT-Defizienz (vgl. 4.2) lässt sich durch Diäten mit Methioninrestriktion bzw. -zugabe verbessern (zusammengefasst in [235]). Barić *et al.* konnten zudem während der Therapie der Patienten A und B (vgl. 5.1.1) mit einer methioninarmen und kreatin- und phosphatidylcholinreichen Diät, die die Mengen von akkumuliertem SAH reduzierte, eine leichte Tendenz zur Verringerung der aberranten Hypermethylierung beobachten [204]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Methylierungsveränderungen der DNA bei AHCY-Defizienz dynamisch und eventuell reversibel sind. Bei einer Methylen-Defizienz wurde die Aufhebung aberranter DNA-Methylierung bereits gezeigt: Pogribny *et al.* fütterten Ratten 9-36 Wochen lang mit einer methylen-defizienten und anschließend wieder mit einer normal methylenhaltigen Diät. Die methylen-defiziente Diät führte zu einer niedrigeren Konzentration von SAM, einem niedrigeren SAM/SAH-Verhältnis und globaler DNA-Hypomethylierung. Die Zugabe des methylenhaltigen Futters konnte die Ausgangskonzentration von SAM wiederherstellen. Die DNA-Methylierung normalisierte sich jedoch nur in der Gruppe, die die methylen-defiziente Diät neun Wochen lang erhalten hatte. Bei längerer Diät konnte die DNA-Hypomethylierung nicht wieder aufgehoben werden [266]. Möglicherweise verändert sich der aberrante Methylierungsstatus einzelner CpGs, Bereiche von Genen oder des gesamten Genoms dynamisch und zumindest teilweise reversibel während des gesamten Lebens des Patienten. Es wäre äußerst interessant, Proben derselben Patienten mit einer im Rahmen dieser Arbeit gemessenen DNA-Hypermethylierung nach einer symptomverbessernden Diät zu analysieren, um eventuelle Methylierungsveränderungen festzustellen.

4.6 Zelllinien als Modell für die AHCY-Defizienz

Zelllinien liefern ein vergleichsweise leicht zu handhabendes Modell zur Simulation und Erforschung humaner genetischer Krankheiten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden HEK293- und HepG2-Zelllinien mit AHCY-Knockdown auf Veränderungen der DNA-Methylierung hin untersucht, um eine in diesem Punkt mögliche Vergleichbarkeit mit AHCY-defizienten Patienten zu erschließen. Eine Anreicherung der Metaboliten SAM und SAH in den Zelllinien wurde im Vorfeld bestätigt. Zusätzlich konnten von einem Patienten mit AHCY-Defizienz während dieser Arbeit erstmals Fibroblasten in den USA entnommen und dort sowie in Mainz kultiviert werden. Ihre DNA-Methylierungswerte der analysierten DMRs entsprachen den Werten der Blutprobe

des Patienten, welche jedoch unauffällig waren (vgl. 3.6.1).

Bisherige Studien haben gezeigt, dass sich HEK293- und HepG2-Zellen bezüglich ihrer AHCY-Aktivität deutlich unterscheiden. HepG2-Zellen zeigen eine 3mal so hohe AHCY-Aktivität wie HEK293-Zellen [318]. Das SAM/SAH-Verhältnis variiert generell in verschiedenen Glioblastom- und Hepatom-Zelllinien stark, wobei die Konzentration von SAM vergleichbar bleibt [258]. Dabei sind SAM/SAH-Verhältniswerte von 5 bis 80 mit physiologischen Zellfunktionen vereinbar (zusammengefasst in [318]). HEK293-Zellen beinhalten - verglichen mit anderen Zelllinien - bereits im Wildtyp-Zustand hohe intrazelluläre SAH-Konzentrationen und ein niedriges SAM/SAH-Verhältnis (ungefähr 7) [318], wohingegen HepG2-Zellen ein hohes SAM/SAH-Verhältnis von >50 aufweisen [200, 318, 319]. Die DNA von HepG2- und HEK293-Zelllinien ist unter physiologischen Bedingungen vergleichbar stark methyliert [258].

Hermes *et al.* untersuchten HEK293-Zellen, die AHCY stabil überexprimieren. Dabei blieb die SAM-Konzentration unverändert. Eine 2-10fache Überexpression resultierte in einer verminderten SAH-Konzentration und erhöhter Adenosin-Konzentration. Eine 16fache Überexpression erhöhte sowohl die Adenosin- als auch die SAH-Konzentration und veränderte die Zellmorphologie. Die globale DNA-Methylierung blieb unverändert. Eine 2-5fach gesteigerte AHCY-Aktivität konnte von den Zellen toleriert werden, stärkere Aktivitäten führten zu adenosininduzierter Apoptose. Gleichzeitig führte eine erhöhte AHCY-Aktivität zu keiner Veränderung der Transmethylierungsaktivität der Zelle [320]. Die Inhibierung von AHCY in HepG2-Zellen führte zur intrazellulären Akkumulation von SAH (das SAM/SAH-Verhältnis sank bei Hermes *et al.* auf <2 [200]), einer Reduktion der mRNA-Methylierung und einer Verringerung der Protein-Arginin-Methylierung [200, 321]. Die globale DNA-Methylierung blieb unverändert [200, 258]. Bezüglich der Unterschiede in der Regulation des Methioninmetabolismus zwischen den beiden Zelllinien sei noch als Beispiel erwähnt, dass das Enzym GNMT (vgl. 4.2) in HepG2-Zellen eine antiproliferierende Wirkung zeigt, wohingegen HEK293-Zellen resistent gegen dessen cytotoxische Wirkung sind [322]. Unterschiede in der Regulation des Methioninstoffwechsels müssen demnach bei der experimentellen Nutzung der verschiedenen Zelllinien als Modelle für die AHCY-Defizienz berücksichtigt werden.

Die Messungen der DNA-Methylierung von neun DMRs (*GTL2*, *H19*, *LIT1*, *MEST*, *NESPAS*, *PEG3*, *SNRPN*, Alu, LINE1) mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung ergaben sowohl in HEK293- als auch in HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown moderat bis stark aberrante Hypomethylierungen verschiedener DMRs im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Dabei zeigte jede HEK293-Zelllinie Aberrationen in drei bis fünf, jede HepG2-Zelllinie dagegen in zwei bis drei DMRs. Bei letzteren war dabei immer die DMR von LINE1 moderat aberrant hypomethyliert, zudem wies die DMR von *GTL2* mit nur einer Ausnahme moderat bis stark aberrante Hypomethylierungen auf. Somit weisen sowohl

HEK293- als auch HepG2-Zellen mit *AHCY*-Knockdown ebenso wie die analysierten Patienten mit *AHCY*-Defizienz stochastische Methylierungsveränderungen auf. Allerdings sind dies bei den Patienten ausschließlich Hyper-, bei den Zelllinien hauptsächlich Hypomethylierungen. LINE1 war bei den Patienten unauffällig, bei den HepG2-Zelllinien immer betroffen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass beide Zelllinien trotz Beeinflussbarkeit bezüglich der SAM- und SAH-Anreicherung im Hinblick auf die DNA-Methylierung nicht mit *AHCY*-defizienten Patienten vergleichbar sind. Neben den oben genannten physiologischen Unterschieden bezüglich der Metaboliten des Methioninstoffwechsels zwischen den einzelnen Zelllinien führen Unterschiede in der Knockdown-Effizienz zu unterschiedlich starken Veränderungen des SAM/SAH-Verhältnisses. Dadurch eröffnen sie die Möglichkeit, unterschiedlich starke Anreicherungen der Metaboliten analog der Patientenwerte zu simulieren. Dementsprechend muss eine Zelllinie für einen Vergleich allerdings sorgsam ausgewählt werden. Keine der untersuchten HepG2-Zelllinien wies eine Steigerung der SAH-Konzentration von mehr als das ungefähr 18fache auf (persönliche Mitteilung von Dr. Oliver Vugrek (vgl. 5.1.2); für die HEK293-Zelllinien lagen keine Informationen vor). Möglicherweise hat auch das Knockdown-Konstrukt selbst weitere Effekte als nur die Reprimierung der *AHCY*-Produktion. Zudem führen die unterschiedlichen Mutationen der Patienten zu einer unterschiedlich starken Beeinträchtigung des Enzyms *AHCY*, was bei Experimenten mit dem gleichen Knockdown-Konstrukt nicht berücksichtigt wird. Die erst kürzlich geglückte Gewinnung und Kultivierung von Fibroblasten eines Patienten mit *AHCY*-Defizienz eröffnen neue und wohl bessere Möglichkeiten, diese Krankheit im Labor zu modellieren und zu erforschen, sodass die Knockdown-Experimente von Modell-Zelllinien aufgrund des Aufwands und der mit ihnen verbundenen Interpretationsprobleme in Zukunft eine eher ergänzende Rolle einnehmen können.

4.7 Ausblick

Die geschätzte Anzahl von Patienten mit *AHCY*-Defizienz ist deutlich höher als die Anzahl bereits beschriebener Patienten [235]. Zudem hat die *AHCY*-Defizienz das Potential, eine Modellkrankheit für die humane Epigenomforschung darzustellen. Um weitere Patienten zu finden, könnte die Analyse der *AHCY*-Sequenz in Routinediagnostiken aufgenommen werden. Barić schlug bereits vor, Patienten mit unerklärlichen neurologischen Symptomen, möglicher MAT I/III-Defizienz, erhöhten Werten von Aminotransferasen und Hepatomegalie, unerklärlicher Myopathie und erhöhten Kreatinkinasewerten routinemäßig auf *AHCY*-Defizienz zu untersuchen [235]. Ein weiterer Vorschlag wäre die Aufnahme von *AHCY* ins Kingsmore-Panel, einem NGS-Test für Mutationen, die ursächlich für seltene, rezessive Krankheiten, geistige Behinderung

und verwandte Störungen sein können und bereits hausintern zu diagnostischen Zwecken zum Einsatz kommt. *AHCY*-Mutationen werden zudem in naher Zukunft auch im Rahmen der Exom-Sequenzierung als Routinediagnostik erfasst werden können. In manchen Ländern kommt diese Methode bereits zu routinediagnostischen Zwecken zum Einsatz. Generell bieten Sequenzierungen bisulfatkonvertierter DNA mittels NGS gute Möglichkeiten für weiterführende Analysen, um neben den geprägten Genen weitere betroffene Genregionen zu identifizieren, deren Methylierungsmuster durch die *AHCY*-Defizienz verändert sein könnte.

Von bereits erfassten *AHCY*-defizienten Patienten lagen für bisherige DNA-Untersuchungen ausschließlich Blutproben vor, erst kürzlich konnten Fibroblasten eines Patienten kultiviert werden. Es wäre von großem Interesse, verschiedene Gewebetypen der Patienten auf mögliche Veränderungen der DNA-Methylierung sowie der Akkumulation der Metaboliten SAM und SAH hin zu untersuchen. Weiterhin besteht der Verdacht, dass sich diese Veränderungen durch Therapie mit methioninreduzierten Diäten mildern lassen könnten. Für eine Bestätigung wären Proben derselben Patienten vor Diätbeginn und nach mehreren zeitlichen Abständen mit paralleler Beobachtung der Symptomveränderungen nötig. Derartige Untersuchungen wären auch für andere ähnliche genetische Krankheiten, die zu Veränderungen des Methioninmetabolismus führen, interessant. Ebenso könnten in diesem Rahmen Expressionsstudien von *AHCY* und weiterer Proteine wie z.B. DNMTs durchgeführt und verglichen werden.

Bisher gibt es noch kein Mausmodell mit spezifischer Veränderung der *AHCY*-Sequenz. Eine gezielte Einführung der in Patienten gefundenen Mutationen in Mäuse und auch Zellkulturen würde eine gute Vergleichbarkeit mit der realen Symptomatik der Patienten mit sich bringen. Im Mausmodell könnte der Einfluss dieser Mutationen auf die Embryonalentwicklung untersucht werden und Hinweise auf die zeitliche Entstehung der aberranten DNA-Methylierungsmuster geben. Zellkulturen mit patientenspezifischen Mutationen könnten die *AHCY*-Defizienz besser modellieren als die bisherigen Zellkulturen mit einem allgemeinen *AHCY*-Knockdown. Die Reprogrammierung der bereits gewonnenen Fibroblasten und anderer Zellen von Patienten mit *AHCY*-Defizienz zu induzierten pluripotenten Stammzellen könnte die Möglichkeit bieten, weitere Gewebetypen nachzuzüchten und somit auch sensible Gewebe wie z.B. Gehirn- und Nervenzellen auf Einflüsse der *AHCY*-Defizienz hin zu untersuchen. Diese Zellen würden die größtmögliche Vergleichbarkeit mit den Patienten bieten. In Modellen ließen sich auch gut Expressionsstudien durchführen und der Einfluss der genannten Diäten simulieren. Weitere genetische Analysen könnten Aufschluss bezüglich einer möglichen Allelspezifität der Methylierungsveränderungen geben und Cytosine außerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Regionen in Methylierungsanalysen miteinbeziehen. Desweiteren wären biochemische Analysen der unterschiedlichen Grade an Inhibierung von Methyltransferasen durch SAH aufschlussreich.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Patientenkollektiv und Kontrollen

Das Patientenkollektiv umfasste sieben Personen aus Kroatien (Patienten A-D und F) bzw. den USA (Patienten E und G) mit bekannten Mutationen im *AHCY*-Gen. Informationen über die Patienten sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Die DNA wurde in den Arbeitsgruppen von S. H. Mudd (Laboratory of Molecular Biology, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD 20892, USA) und N. R. M. Buist (Departments of Pediatrics and Medical Genetics, Oregon Health and Science University, Portland, OR 97225, USA) aus Blut isoliert und teilweise in TE-Puffer gelöst, teilweise lyophilisiert verschickt. Nach Ankunft wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt. Die DNA der Kontrollpersonen (vgl. Tab. 5.2) wurde den Patientenproben entsprechend verarbeitet und aufbewahrt.

Patient (Geschl.)	Alter bei Blutentnahme	Alter bei Diät-Beginn	Mutationen	Steig. SAH-Konz.	Steig. SAM-Konz.	Beschreibende Publikationen
A (m)	1 Jahr	>1 Jahr	c.428A>G; p.Y143C (pat) c.336G>A; p.W112X (mat)	150x	30x	Barić <i>et al.</i> 2004 und 2005 [203, 204]
B (m)	neonatal	<0,5 Jahre		5x	1,6x	Barić <i>et al.</i> 2005 [204]
C (m)	neonatal	<0,5 Jahre		6,5x	1,8x	Ćuk <i>et al.</i> 2007 (Poster) [205]
D (w)	1 Monat	<0,5 Jahre		-	-	unveröffentlicht
E (m)	26 Jahre	5 Monate	c.428A>G; p.Y143C (pat) c.266C>T; p.A89V (<i>de novo</i>)	55x	-	Buist <i>et al.</i> 2006 [209]
F (w)	14 Tage	-	c.145C>T; p.R49C (pat) c.257A>G; p.D86G (mat)	-	-	Vugrek <i>et al.</i> 2009 [208]
G (w)	>1,5 Jahre	-	c.T982G; p.Tyr328Asp (pat) c.A428G; p.Tyr143Cys (mat)	200x	-	unveröffentlicht

Tabelle 5.1: Patientenkollektiv

Untersuchte Patienten mit *AHCY*-Defizienz. Die Patienten A-D sind Geschwister. Patient F verstarb im Alter von drei Monaten.

Geschl.=Geschlecht, Konz.=Konzentration (im Blut), m=männlich, mat=maternal, pat=paternal, Steig.=Steigerung, w=weiblich, -=hierfür lagen keine Daten vor

Kontrolle (Geschlecht)	Alter bei Blut- entnahme	Herkunft	Bemerkung
H (m)	45 Jahre	Deutschland	hausintern
I (w)	neonatal	Deutschland	hausintern
J (m)	neonatal	Deutschland	hausintern
K (m)	23 Jahre	Deutschland	hausintern
L (w)	-	USA	Mutter von Patient G, Probe erhalten von der AG Mudd
M (m)	-	USA	Vater von Patient G, Probe erhalten von der AG Mudd
N (-)	-	Kroatien	Probe erhalten von der AG Vugrek (vgl. 5.1.2)
O (-)	-	Kroatien	Probe erhalten von der AG Vugrek (vgl. 5.1.2)

Tabelle 5.2: Humane Kontrollproben

Verwendete humane Kontrollblutproben mit Informationen - soweit vorhanden - über Geschlecht, Herkunft und Alter bei Blutentnahme.

5.1.2 HEK293- und HepG2-Zelllinien

HEK293- und HepG2-Zelllinien mit *AHCY*-Knockdown und Kontroll-Zelllinien ohne Knockdown wurden in der AG von Dr. Oliver Vugrek (Ruđer Bošković Institute, Division of Molecular Medicine, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia) generiert und kultiviert. Die DNA wurde nach Isolation aus den Zellen in TE-Puffer gelöst, auf Trockeneis verschickt und nach Ankunft bei -20 °C gelagert.

5.1.3 Humane Fibroblasten

Humane Fibroblasten des Patienten G (vgl. 5.1.1) wurden in der AG von S. H. Mudd (Laboratory of Molecular Biology, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD 20892, USA) aus einer Hautbiopsie kultiviert, als Pellet (Passage 1) auf Trockeneis verschickt und nach ihrer Ankunft in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden bis einschließlich Passage 8 kultiviert (vgl. 5.9).

Humane Kontrollfibroblasten (Passagen 3 und 4) stammen aus der AG von Dr. Oliver Vugrek (Ruđer Bošković Institute, Division of Molecular Medicine, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia) und wurden parallel zu den Patientenfibroblasten bis einschließlich Passage 6 kultiviert.

5.1.4 Geräte

Gelkammern und Kämme	Peqlab, Erlangen
iScan-System	Illumina, Eindhoven (Holland)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop EVOS XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mikrotiterplattenlesegerät Safire	Tecan, Crailsheim
Pyrosequenzierer PyroMark Q96 ID	Qiagen, Hilden
qPCR-Thermocycler C1000 Thermal Cycler mit CFX96 Real-Time System	Bio-Rad, München
qPCR-Thermocycler StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Schüttler vortex-genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Spannungsgerät peqPOWER E300	Peqlab, Erlangen
Spektrometer NanoDrop ND-2000	Peqlab, Erlangen
Thermocycler DNA Engine Tetrad 2	Bio-Rad, München
Thermocycler peqstar	Peqlab, Erlangen
Transilluminator Gel iX Imager	Intas, Göttingen
Vacuum Prep Worktable	Biotage, Uppsala (Schweden)
Waage 770-12	Kern, Balingen
Waage CP2202S-OCE	Sartorius, Göttingen
Wasserbad VWB 26	VWR, Darmstadt
Werkbank HS18	Kendro Laboratory Products, Hanau
Zell-Inkubator CO2 Incubators CB 210	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

5.1.5 Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden – sofern nicht anders beschrieben – mit Reinstwasser hergestellt.

DNA-Ladepuffer	20 % Glycerine 0,01 % Orange G powder 10 mM TRIS pH 7,5
Pyro-Denaturierungspuffer	200 mM NaOH
Pyro-Waschpuffer	10mM TRIS pH wird mit Essigsäure auf 7,6 eingestellt
TAE-Puffer	40 mM TRIS 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH wird mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt
Zellmedium	10 % FBS 50.000 U Penicillin-Streptomycin in DMEM
Zell-Gefriermedium	10 % DMSO in FBS

Fertig gekaufte Puffer und Medien sind bei 5.1.12 aufgeführt.

5.1.6 DNA-Standards

GeneRuler 100 bp DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

5.1.7 Kits

EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit	Epigentek, Farmingdale (USA)
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript® III First-Strand Synthesis Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

5.1.8 Enzyme

DNA-Polymerase FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack Roche, Mannheim

DNase I Agilent Technologies, Waldbronn

Proteinkinase K PerkinElmer, Rodgau

5.1.9 Primer/synthetische Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt.

5.1.9.1 Primer für QUASEP- und qPCR-Expressionsanalyse

Gen	Primer	Sequenz 5'-3'	bridging	Produktlänge [bp]
<i>AHCY</i>	For Rev* Seq	ATTCCGGTGTATGCCTGGAAG GATGCCTCGGATGCCTGG CTCATCCACACCAAGT	Exon 3-4 Exon 4-5	161
<i>TBP</i>	QuantiTect Primer Assay, HS_TBP_1_SG (Qiagen, Hilden)			
<i>RNN18S</i>	QuantiTect Primer Assay, HS_RNN18S_1_SG (Qiagen, Hilden)			

*biotinyliert

5.1.9.2 Primer für Bisulfit-Pyrosequenzierung und HRM-Analyse

Gen	Primer	Sequenz 5'-3'	Produktlänge [bp]	Lokalisation
Alu	Linker For Rev Uni* Seq	GGGACACCGCTGATCGTATA- TTTTTATTAATAAATAAATAAATTAGT CCAAACTAAAATACAATAA GGGACACCGCTGATCGTATA AATAACTAAAATTACAAAC	-	viele Amplikons
<i>GTL2</i>	For Rev* Seq	AGGGTTAGGAAGTTTAGTAGGTTA ACTACTCCTTAAACAAAAAACACATAAT GTAGTAAATTAAGTGATTAGAGA	150	Chr. 14: 101275645- 101275795

<i>H19</i>	Out For Out Rev In For* In Rev Seq	TTTTTGGTAGGTATAGAGTT AAACCATAACACTAAAACCC TGGGTATTTTTGGAGGTTTTTTTT ATAAATATCCTATTCCCAAATAA ATATATAAACCTACACTACC	216	Chr.11: 1999845- 2000061
LINE1	For Rev* Seq	TTTTGAGTTAGGTGTGGGATA CTCACTAAAAAATACCAAACAA GTTAGGTGTGGGATATAGTT	-	viele Amplikons
<i>LIT1</i>	For Rev* Seq	AATTAGTAGGTGGGGGG CTAAAAAACTCCCTAAAAATC GGGGGTAGTYGGAG	122	Chr. 11: 2721175- 2721297
<i>MEST</i>	For* Rev Seq	TYGTTGTTGGTTAGTTTTGTAYGGTT CCCAAAAACAACCCCAACTC AAAACAACCCCAACTC	216	Chr. 7: 130132069- 130132285
<i>NESPAS</i>	For* Rev Seq	GATGAAGGGGTGGTTAGTA CCAAAAATACCTTCTTAACCTTAA TAACTAAAACTCTCAAAT	229	Chr. 20 58854960- 58855189
<i>PEG3</i>	For Rev* Seq	GGTGTAAGAAGTTTGGGTAGTTG CTCACCTCACCTCAATACTAC TGTTTATTTTGGGTTGGT	153	Chr. 19: 57351944- 57352097
<i>SNRPN</i>	For* Rev Seq1 Seq2	AGGGAGTTGGGATTTTTGTATT CCCAAACCTATCTCTTAAAAAAAAC ACACAACCTAACCTTACCC CCAACCTACCTCTAC	237	Chr. 15 25200012- 25200249

*biotinyliert

Lokalisation entsprechend Ensembl Vers. 76

5.1.10 PCR-Programme

5.1.10.1 Programme für die Standard-PCR

<i>Alu</i>	96 °C 5 min, 40x (96 °C 45 s, 43 °C 30 s, 72 °C 60 s), 72 °C 10 min, 4 °C
<i>GTL2</i>	96 °C 5 min, 40x (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 7 min, 4 °C
<i>H19</i> (Out)	96 °C 4 min, 35x (95 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 10 min, 4 °C
<i>H19</i> (In)	96 °C 4 min, 33x (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 10 min, 4 °C
<i>LINE1</i>	95 °C 5 min, 40x (95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min, 4 °C
<i>LIT1</i>	95 °C 5 min, 40x (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 10 min, 4 °C
<i>MEST</i>	96 °C 5 min, 40x (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 7 min, 4 °C
<i>NESPAS</i>	96 °C 5 min, 37x (95 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 7 min, 4 °C
<i>PEG3</i>	96 °C 5 min, 38x (95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 10 min, 4 °C
<i>SNRPN</i>	96 °C 5 min, 35x (95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s), 72 °C 7 min, 4 °C

5.1.10.2 Programme für die HRM-Analyse

95 °C 2 min, 45x (95 °C 10 s, (*) °C 30 s, 72 °C 15 s), 95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 65 °C 10 s mit schrittweiser Erhöhung um 0,2 °C bis 90 °C.

(*) *MEST* 58 °C, *H19* 56 °C, *LIT1* 58 °C, *PEG3* 60 °C, *SNRPN* 58 °C

5.1.11 Assays für die Bisulfit-Pyrosequenzierung

Gen	<i>sequence to analyze</i>	Anzahl CpGs
<i>Alu</i>	RTCRTCRCACCA	3
<i>GTL2</i>	ATYGYGGGTAATGGYGAATYGYGGGTTAT	5
<i>H19</i>	RCCRCRCRACCAC	3
<i>LINE1</i>	TYGATTTTTTAGGT	1
<i>LIT1</i>	YGTGTGTGTAG	2
<i>MEST</i>	RAACACRAACACACAATCCTCCRCTCRCCTACRCC	5
<i>PEG3</i>	GGYGTGTGTGGGTGT	3
<i>SNRPN</i> (1)	RCTCCATCRCRTCAC	3
<i>SNRPN</i> (2)	RACRCRCARACRTACTT	3

5.1.12 Chemikalien

Agarose StarPure AGAROSE Low EEO Standard > 1Kb	Starlab, Hamburg
Annealing buffer	Qiagen, Hilden
β -Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Waltham (USA)
Binding buffer	Qiagen, Hilden
Cell Lysis Solution	Qiagen, Hilden
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA - Dinatriumsalt - Dihydrate	Applichem, Darmstadt
Elution Buffer	Qiagen, Hilden
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1 %	Carl Roth, Karlsruhe
FBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
HPLC-Wasser	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Orange G (powder)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, (USA)
Precision Melt Supermix	Bio-Rad, München
Protein Precipitation Solution	Qiagen, Hilden
PyroMark Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR® Green	Qiagen, Hilden
Reinstwasser	Braun, Melsungen
Streptavidin-Sepharose-Beads	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
TRIS (PUFFERAN®)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Waltham (USA)

5.1.13 Software

EVOS XL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Intas Capture	Intas, Göttingen
Nanodrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Precision Melt Analysis 1.2	Bio-Rad, München
PyroMark CpG Software 1.0.11	Qiagen, Hilden
PyroMark ID 1.0	Biotage, Uppsala (Schweden)
StepOne Software 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
XFluor 4.50	Tecan, Crailsheim

5.1.14 Material

Falcons	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gefrierbehälter CoolCell LX Container	Biocision, Larkspur (USA)
Infinium [®] HumanMethylation450 Bead-Chip	Illumina, Eindhoven (Holland)
Kartusche PyroMark Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden
Klebefolien Adhesive Sealing Sheets für Pyrosequenzierung	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kryoröhrchens	Thermo Fisher Scientific
Pipettboy accu-jet pro	Braun, Melsungen
Pipetten 0,2-1000 µl	HTL, Warschau (Polen)
Pipetten 5 ml Cellstar	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen mit Filter	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen ohne Filter	Starlab, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Kisker, Steinfurt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarsted, Nümbrecht
Einweg-Skalpelle	Feather, Osaka (Japan)
96 Well-Platten	4titude Ltd., Berlin
96 Well-Platten PyroMark Q96 Plate Low für Pyrosequenzierung	Qiagen, Hilden
96 Well-Platten für qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zellkulturflaschen 40 ml Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen

5.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese, wobei je nach erwarteter Fragmentgröße 1,5-2 prozentige Agarosegele mit 0,25 % Ethidiumbromidlösung (Roth) in 1x TAE-Laufpuffer verwendet wurden. Die Proben wurden mit 1/6 Vol DNA-Ladepuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 80-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden entsprechende DNA-Standards (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Anschließend wurden die Gele im Gel iX Imager (Intas) mit der Software Intas Capture unter UV-Licht fotografiert.

5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde mit dem NanoDrop ND-2000 (Peglab) photometrisch bestimmt und durch die Software Nanodrop 2000/2000c ausgegeben.

5.4 Bisulfitkonversion

Bei der Bisulfitkonversion von DNA wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, nicht jedoch methyliertes Cytosin. Diese Behandlung führt damit zur Übersetzung einer epigenetischen Information in einen Primärsequenzunterschied und erlaubt damit eine Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen mittels DNA-Sequenzierung.

Die Bisulfitkonversion wurde mit Hilfe des EpiTect Bisulfite Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers (Stand: September 2009) durchgeführt. Dabei wurden zu Beginn, wenn möglich, 500 ng DNA eingesetzt. War dafür nicht genug DNA vorhanden, so wurden zumindest 90 ng (oder mehr) verwendet. Die bisulfitkonvertierte DNA wurde in insgesamt 40 µl Elution Buffer (Qiagen) eluiert und bei -20 °C gelagert.

5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5.5.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, [323]) zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte wurde standardisiert in 50 µl-Ansätzen und 0,2 ml-Reaktionsgefäßen (Kisker) durchgeführt. Ein Ansatz enthielt jeweils 0,2 µM forward und reverse Primer (Sigma-Aldrich), 200 µM dNTPs, 1x PCR-Puffer (2mM MgCl₂) und 2 U FastStart Taq-Polymerase (Ro-

che) in Wasser. Die Cyclers-Programme mit den Amplifikationsbedingungen sind in Abschnitt 5.1.10 aufgelistet. Als *template* wurden jeweils 20-25 ng DNA eingesetzt. Durchgeführt wurden die PCRs in Thermocyclern von Peqlab und Bio-Rad. Zur Qualitätskontrolle wurden anschließend 4 µl des PCR-Produktes elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 5.2).

5.5.2 Quantitative Real time-PCR

Die qPCR (quantitative Real time-Polymerase-Kettenreaktion) basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (vgl. 5.5.1), ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der DNA-Produkte durch Fluoreszenzmessung interkalierender Farbstoffe während des DNA-Syntheseschritts [324]. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur entstehenden DNA-Menge. Zur Analyse wird im linearen Bereich der exponentiell verlaufenden Messkurven ein Schwellenwert (*threshold*) festgelegt und für jede Probe die Anzahl der Zyklen betrachtet, die bis zum Überschreiten des Schwellenwertes benötigt werden (Ct-Werte) (vgl. Abb. 5.1 A). Zusätzlich zu den Amplifikationszyklen kann das qPCR-Programm um eine Schmelzkurvenanalyse erweitert werden. Dabei wird die Temperatur in Schritten von 0,5 °C von der Annealing-Temperatur bis 95 °C erhöht, bis schließlich alle PCR-Produkte einzelsträngig bzw. denaturiert vorliegen. Mit Hilfe dieser Schmelzkurven können Primer auf ihre Qualität hin überprüft werden. Bei spezifischen Primern entsteht ein einzelner Peak zwischen 75 und 85 °C, alle weiteren Peaks bei niedrigeren Temperaturen würden auf die Bildung von Primerdimeren oder unspezifische Bindungen hinweisen. Ein Beispiel für optimale Schmelzkurven ist in Abb. 5.1 B dargestellt.

Mit Ausnahme der HRM-Analyse (vgl. 5.5.2.2) wurden die qPCR-Messungen in 96 Well-Platten im StepOnePlus-Gerät (Life Technologies) durchgeführt und mit der StepOne Software 2.3 analysiert. Ein 25 µl-Ansatz pro Well beinhaltete 12,5 µl QuantiTect SYBR® Green (Qiagen), 0,4 µM forward und reverse Primer (Sigma-Aldrich) und DNA in HPLC-Wasser. Jede Probe wurde als Triplet aufgetragen.

5.5.2.1 Expressionsanalyse

Für die quantitative Expressionsanalyse mittels qPCR wurden pro Well 25 ng cDNA (vgl. 5.11) eingesetzt. Zur Etablierung der Primer wurde im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Für die Normalisierung wurden zusätzlich Ansätze mit QuantiTect Primern (Qiagen) für die Gene *TBP* und *RNN18S* analysiert. Die Normalisierung selbst wurde von der StepOne Software 2.3 durchgeführt und das Ergebnis als *relative quantification value* (RQ-Wert) ausgegeben, welcher für die Kontrollfibroblasten gleich 1 gesetzt wurde.

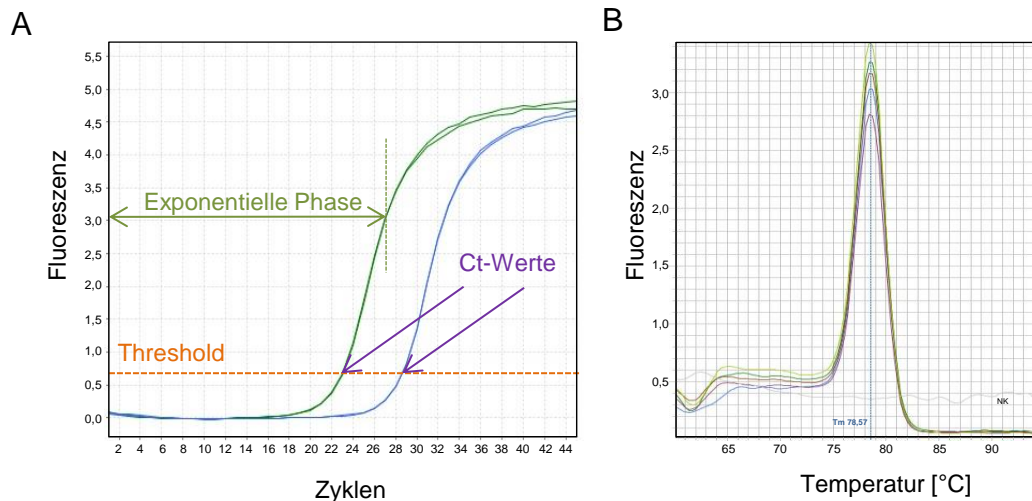


Abbildung 5.1: Prinzip der quantitativen Real time-PCR

Die Interkalierung eines Farbstoffes in doppelsträngige DNA während des Syntheseschritts der qPCR liefert ein quantitativ verwertbares Fluoreszenzsignal. **A** Im linearen Bereich der exponentiellen Messkurven wird ein Schwellenwert (*threshold*) festgelegt, dessen Überschreitung während einer Messung den Ct-Wert ergibt, mit dessen Hilfe die Proben verglichen werden. **B** Schmelzkurven zur Primeretabelle zeigen bei spezifischen Primern einen einzelnen hohen Peak an.

5.5.2.2 High Resolution Melting-Analyse

Bei der High Resolution Melting (HRM)-Analyse werden die Schmelzkurven in der qPCR zur Bestimmung des Methylierungsgrades eines bisulfitkonvertierten DNA-Abschnitts (vgl. 5.4) genutzt. Je nach Methylierungsgrad ändert sich das Schmelzprofil eines Amplikons während der Temperatursteigerung. Durch die parallele Messung von Standards mit bekannter Methylierung kann die Methylierung von Proben berechnet werden. Ein 15 μ l-Ansatz pro Well enthielt 7,5 μ l Precision Melt Supermix (Bio-Rad), 0,4 mM forward und reverse Primer und 25 ng bisulfitkonvertierte DNA (vgl. 5.4) in Reinstwasser. Die Messung wurde im C1000 Thermal Cycler mit CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) durchgeführt und mit der Software Precision Melt Analysis 1.2 ausgewertet. Für jede Probe wurden mindestens 2 bisulfitkonvertierte DNA-Replikate analysiert. Die Standards enthielten bisulfitkonvertierte DNA mit 0 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Ausgangs-Methylierung (hergestellt durch Mischen von 0 % und 100 % methylierter DNA) und wurden in Duplikaten gemessen.

5.6 Pyrosequenzierung

Bei der Pyrosequenzierung wird der Einbau eines komplementären Nukleotids während der Strangsynthese auf einem einzelsträngigen DNA-Template mit bekannter Sequenz über eine Enzymkaskade als Lichtsignal detektierbar gemacht. Durch den von

der DNA-Polymerase katalysierten Einbau wird Pyrophosphat freigesetzt, welches von der ATP-Sulfurylase zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt wird. Dieses dient der Luziferase als Cofaktor bei der Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin, dessen Zerfall zu Biolumineszenz führt (vgl. Abb. 5.2). Die Stärke dieses Lichtsignals ist proportional zur umgesetzten ATP-Menge und dadurch wiederum zur Anzahl der eingebauten Nukleotide [325].

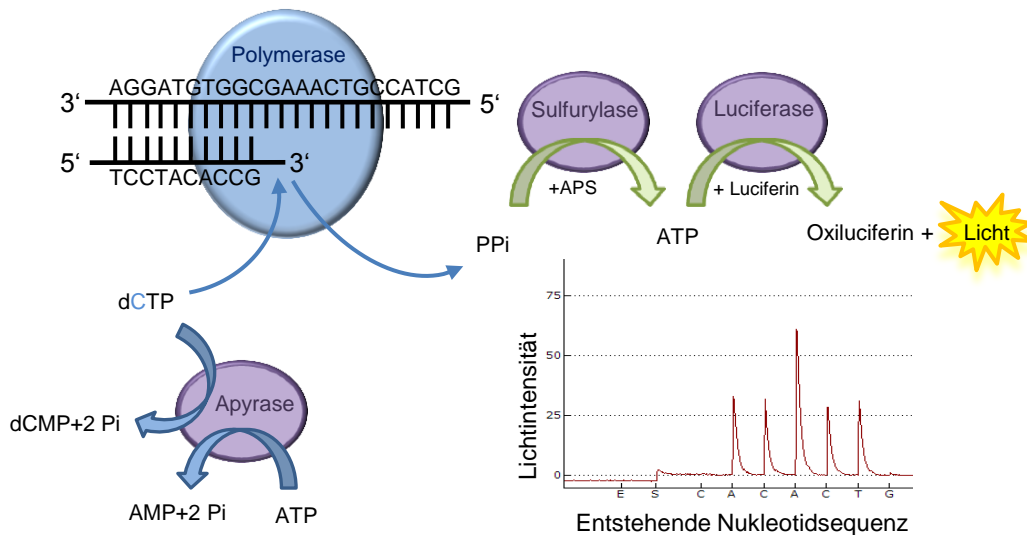


Abbildung 5.2: Prinzip der Pyrosequenzierung

Durch den Polymerase-katalysierten Einbau eines dNTPs entstehendes Pyrophosphat wird durch die Sulfurylase zu ATP umgewandelt, welches die Luziferase zur Oxidation von Luziferin benötigt. Dabei entsteht ein detektierbares Lichtsignal, dessen Intensität gemessen wird. Die Apyrase hydrolysiert laufend nicht benötigte dNTPs.

AMP=Adenosinmonophosphat, APS=Adenosine-5-Phosphosulfat, ATP=Adenosintriphosphat, dCMP=Cytosinmonophosphat, Pi=Phosphat, PPI=Pyrophosphat

Für die Pyrosequenzierung wurden die mit einem biotinylierten und einem nicht-biotinylierten Primer hergestellten PCR-Produkte (vgl. 5.5.1) in einer 96 Well-Platte (4titude) mit 40 µl Binding buffer (Qiagen) und 1,5 µl Streptavidin Sepharose beads (GE Healthcare) versetzt, mit einer Klebefolie (Thermo Fischer Scientific) versiegelt und 5 min auf Stufe 2-3 des Schüttlers (Scientific Industries) geschüttelt. Währenddessen wurden in einer 96 Well-Pyro-Platte (Qiagen) 40 µl Annealing buffer (Qiagen) und 2 µl Pyro-Sequenzierprimer (10 µM) entsprechend der Probenverteilung der 96 Well-Platte gemischt und in das Vacuum Prep Worktable (Biotage) gestellt. Die Klebefolie wurde von der Platte entfernt und die Proben mit Hilfe des Vacuum Prep Worktable nach Angaben des Herstellers mit 70 % Ethanol, Pyro-Denaturierungspuffer und Pyro-Waschpuffer aufgereinigt. Während dieser Aufreinigung wurden die nicht-biotinylierten DNA-Stränge entfernt, die DNA lag am Ende einzelsträngig und an die Sepharose beads gebunden vor. Die Proben wurden auf die Pyro-Platte überführt und 2 min bei

80 °C denaturiert. Nach Befüllen der Kartusche mit Nukleotiden, Enzym und Substrat (PyroMark Gold Q96 Reagents, Qiagen) unter Verwendung filterfreier Pipettenspitzen (Starlab) und Abkühlen der Pyro-Platte auf RT wurde die Messung im PyroMark Q96 ID (Qiagen) durchgeführt.

5.6.1 Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung

Für die Methylierungsanalyse einzelner CpGs mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung wurden die gewünschten Bereiche bisulfitkonvertierter DNA (vgl. 5.4) mittels PCR (vgl. 5.5.1) mit einem biotinylierten und einem nicht-biotinylierten Primer amplifiziert und 40 µl PCR-Produkt wie oben beschrieben aufgereinigt und gemessen. Der Methylierungsgrad einer CpG-Stelle wurde mit Hilfe der PyroMark CpG Software 1.0.11 als das prozentuale Verhältnis von Cytosin zu Thymin an dieser Stelle ausgegeben. Für die Qualitätsbewertung der Messungen wurden die Analyseparameter der Assays auf folgende Einstellung gesetzt:

Allowed percentage for passed/check quality: 14;

Required peak height for passed/check quality: 0;

Include These Checks In Quality Assessment: High pre-sequencing signal, low signal-to-noise ratio, wide peaks, possible dispensation error.

Grundsätzlich wurden für jede Probe mindestens 2 PCR-Replikate gemessen und deren Methylierungs-Mittelwerte zusammengerechnet.

5.6.2 QUASEP-Analyse

Die QUASEP-Analyse (Quantification of Allele-Specific Expression by Pyrosequencing) dient der allelspezifischen Unterscheidung der Expression ausgewählter Gene mit Hilfe einer SNP-Analyse durch Pyrosequenzierung und wurde erstmal 2005 von Schaart *et al.* [326] beschrieben. Voraussetzung ist eine bekannte Sequenzvariante in den transkribierten Abschnitten der zu untersuchenden Allele (z.B. mittels Sanger-Sequenzierung detektiert). Mittels PCR (vgl. 5.5.1) und *exon bridging*-Primern wird der Bereich um diese Variante von einem cDNA-Template amplifiziert. Die *sequence to analyze* der Pyrosequenzierung enthält die möglichen Basenabfolgen an dieser Position, sodass die Transkriptmenge (in Prozent) allelspezifisch bestimmt werden kann. Für die QUASEP-Analyse wurden die gewünschten Bereiche eines cDNA-Templates (vgl. 5.11) mittels PCR (vgl. 5.5.1) amplifiziert und 42 µl PCR-Produkt wie oben beschrieben aufgereinigt und gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software PyroMark ID 1.0 (Biotage).

5.7 Gesamtgenomische Methylierungsanalyse

Die gesamtgenomische Methylierungsanalyse wurde mit dem MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip dieser colorimetrischen Untersuchung beruht auf der Bindung von Antikörpern an 5-Methylcytosin (5mC) und einer anschließenden Farbreaktion, die spektrometrisch gemessen wird. Dafür wurden 200 ng genomische DNA pro Well eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Safire und der Software XFluor 4.50 (Tecan) 3/10/12/14 min nach Zugabe der StopSolution (Kit). Die Messung mit dem höchsten Wert wurde für die Auswertung weiterverwendet.

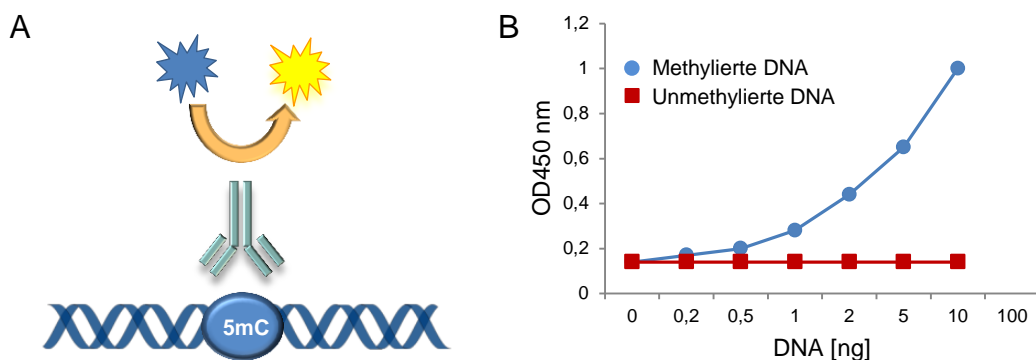


Abbildung 5.3: Colorimetrische Bestimmung der gesamtgenomischen Methylierung

A Durch die Bindung von spezifischen Antikörpern an 5-Methylcytosin (5mC) und eine darüber mögliche Farbreaktion kann die gesamtgenomische Methylierung quantitativ gemessen werden. **B** Das Lichtsignal steigt dabei exponentiell mit der Menge der methylierten DNA.

5.8 Genomweite Methylierungsanalyse mit Array

Die quantitative genomweite Methylierungsanalyse einzelner CpGs wurde mit Hilfe des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip in Kombination mit dem iScan-System (Illumina) durchgeführt. Dieser Array deckt 99 % der RefSeq-Gene ab, wobei 96 % aller CpG-Inseln einschließlich flankierender Regionen (insgesamt über 485.000 CpGs) analysiert werden - im Schnitt 17 CpGs pro Genregion (Promotor bis einschließlich 3'-UTR). Der Vorteil dieses Arrays ist sowohl die geringe benötigte Probenmenge von 500 ng DNA, als auch die Möglichkeit, 96 Proben gleichzeitig im Hochdurchsatzverfahren zu analysieren. Das methodische Prinzip ist in Abb. 5.4 dargestellt.

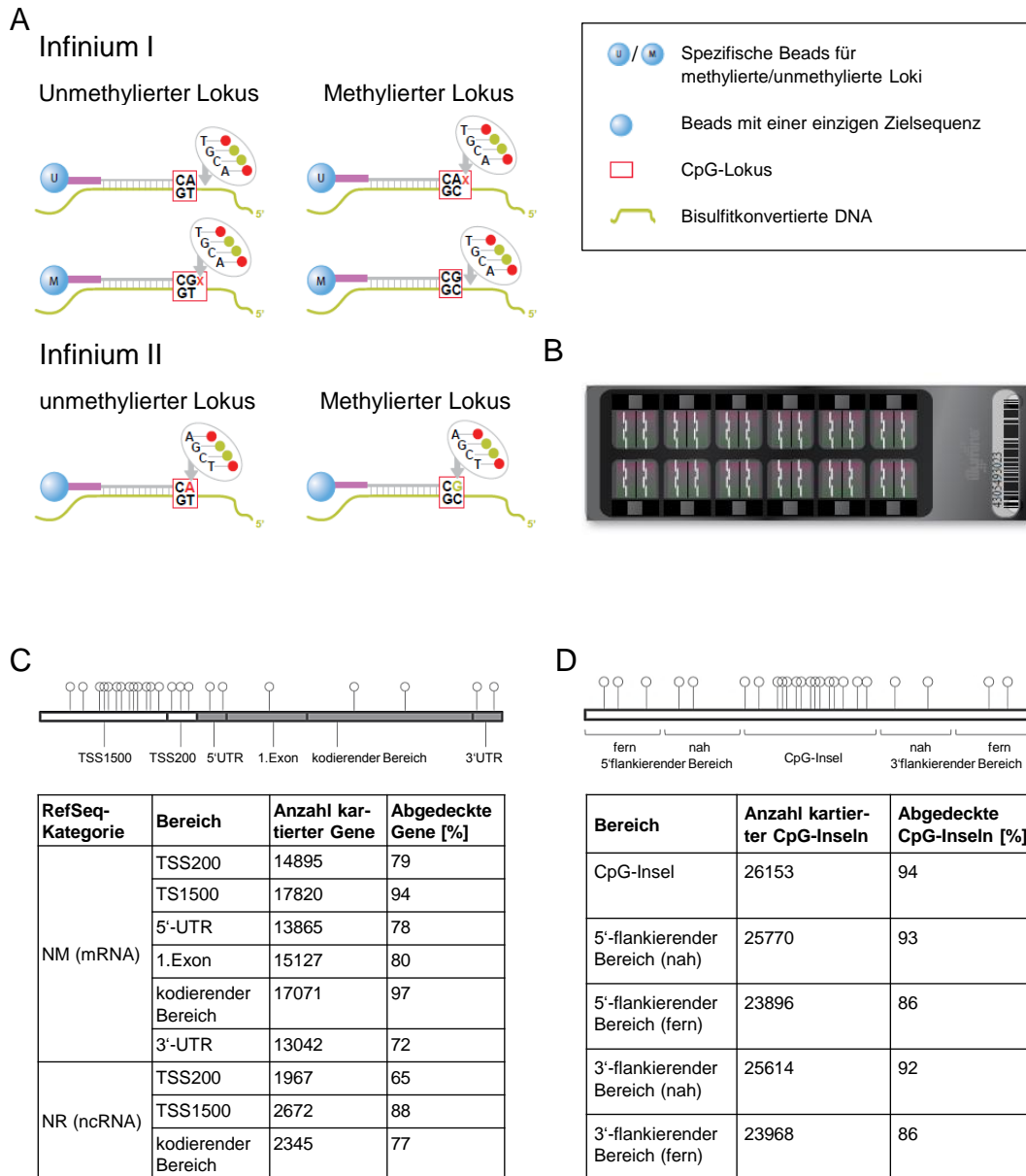


Abbildung 5.4: Prinzip des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip

A Der Infinium I-Assay enthält *beads* mit zwei unterschiedlichen Zielsequenzen pro CpG-Lokus, die entweder zum methylierten oder unmethylierten CpG-Lokus komplementär sind. Der Infinium II-Assay enthält nur eine Zielsequenz, die Base des CpG-Lokus wird durch Neusynthese analysiert. **B** Infinium® HumanMethylation450 BeadChip. **C, D** Der Array deckt sowohl die CpGs innerhalb kodierender Regionen als auch innerhalb von 200 bp (TSS200) bzw. 1500 bp (TSS1500) Entfernung zu einer *transcription start site* (TSS) ab, außerdem CpG-Inseln und deren flankierenden Bereiche. Jeder Kreis entspricht einer CpG-Stelle. [Bearbeitet nach „Technical Note: Epigenetic Analysis“ und „Data Sheet: Epigenetics“ von Illumina (2014)]

NM=mRNA-Identifikator, NR=ncRNA-Identifikator

Die bisulfitkonvertierte DNA (vgl. 5.4) wird an *beads* mit gekoppelten, für CpG-Inseln zielspezifischen DNA-Sequenzen hybridisiert. Hierbei werden zwei Assays miteinander kombiniert. Der Infinium I-Assay beinhaltet zwei Arten von *beads* pro CpG-Lokus,

wobei die letzte Base am 3'-Ende entweder zu Cytosin (ursprünglich methyliert) oder Thymin (ursprünglich unmethyliert) komplementär ist. Der Infinium II-Assay enthält Beads mit einer Zielsequenz pro CpG-Lokus, wobei die letzte Base per komplementärer Neusynthese analysiert und so der Methylierungszustand der Ausgangs-DNA rekonstruiert wird.

Die Analyse der Proben wurde in Unikaten und Duplikaten durchgeführt, wobei jeweils 2 µg DNA eingesetzt wurden. Die der Messung vorausgehende Bisulfitkonversion sowie die Messung selbst wurden in der AG von Prof. Dr. Thomas Haaf am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg durchgeführt.

5.9 Kultur von adhärent wachsenden Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (Kendro Laboratory Products) durchgeführt. Die Fibroblastenkulturen wurden in einem Zell-Inkubator (Binder) bei 37 °C, 5 % CO₂ und maximal einstellbarer Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Arbeitsgeräte und Materialien wurden vor dem Einsatz desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Die Werkbank wurde vor jeder Benutzung mindestens 20 min lang mit UV-Licht bestrahlt. Medien, PBS und Trypsin wurden bei 4 °C aufbewahrt und vor jeder Benutzung im Wasserbad (VWR) auf 37 °C erwärmt. Das Pipettieren erfolgte mit 5 ml-Pipetten (Greiner Bio-One) und dem accu-jet pro (Braun).

5.9.1 Auftauen der Zellen

Beide verwendeten Fibroblastenzelllinien (vgl. 5.1.3) wurden separat in Kryoröhrchen auf Trockeneis geliefert. Die Röhrchen wurden bei RT aufgetaut und die Zellen mit 0,5 ml Zellmedium versetzt. Nach Resuspendieren durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt. Das Röhrchen wurde noch einmal mit 1 ml Medium „gespült“ um die möglicherweise noch verbliebenen Zellen nicht zu verlieren. Weitere 2 ml Medium wurden der Kulturflasche zugegeben und die Zellen (nun Passage 1) durch vorsichtiges Schwenken auf dem Flaschenboden verteilt, um anschließend für 24-48 h im Inkubator zu verbleiben, bevor das Nährmedium gewechselt wurde (vgl. 5.9.2).

5.9.2 Kultivieren der Zellen

Die Kultivierung einer Zellpassage dauerte abhängig vom Zellwachstum 4-6 Tage. Nach 2 Tagen wurde das Zellmedium erneuert. Dafür wurde das vorhandene Medium bis auf 0,5 ml mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Nach Zugabe von 3,5 ml neuem Medium und vorsichtigem Schwenken der Flasche wurden die Zellen erneut in-

kubiert. Das Wachstum wurde nun täglich mit einem Mikroskop (Carl Zeiss) kontrolliert und die Zellen fotografiert (Mikroskop mit Fotosoftware von Life Technologies/Thermo Fischer Scientific). Beim Erreichen einer Zelldichte von etwa 80-90 % (je nach Kultur nach weiteren 1-3 Tagen) wurden die Zellen passagiert (vgl. 5.9.3).

5.9.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen einer zu 80-90 % bewachsenen Kulturflasche wurden zunächst mit PBS gewaschen. Dafür wurde das Zellmedium mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden 4 ml PBS zugegeben, mehrmals mit der Pipette vorsichtig über die Zellen gespült und wieder abgezogen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin (0,05 % in EDTA, Life Technologies) wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde dabei etwa jede Minute unter einem Mikroskop (Carl Zeiss) kontrolliert. Sobald sich die Zellverbände gelöst hatten, wurde die Zellsuspension mit 7 ml frischem Zellmedium versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Hiervon wurden jeweils 3,5 ml in zwei neue Kulturflaschen überführt und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Die weitere Kultivierung erfolgte analog 5.9.2.

5.9.4 Kryokonservierung

Sobald zwei Kulturflaschen einer Zellpassage zeitgleich zu etwa 80-90 % bewachsen waren, wurden die Zellen einer Flasche weiter passagiert (vgl. 5.9.3), die Zellen der anderen Flasche kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen analog 5.9.3 trypsinisiert und dadurch vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 4 ml frischem Zellmedium versetzt, in ein 15 ml-Falcon überführt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt und 1 ml Gefriermedium zugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen resuspendiert, in ein Kryoröhrchen (Thermo Fischer Scientific) überführt und in einem CoolCell LX Container (Biocision) bei -80 °C eingefroren. Nach 24-48 h wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

5.10 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Zellkulturen

5.10.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die RNA-Isolierung wurde zunächst der Inhalt einer Zellkulturflasche der Passage 2 (Patientenfibroblasten) bzw. Passage 6 (Kontrollfibroblasten, vgl. 5.1.3) mit Trypsin behandelt und in einem Falcon pelletiert (vgl. 5.9.4). Die RNA wurde mit Hilfe des

Rneasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers (Stand: 6/2012) isoliert, wobei dem RLT-Puffer die optional angegebene Menge β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde. Das Resultat waren 60 μ l Eluat, wovon zur Qualitätskontrolle 3 μ l für eine Gelelektrophorese (vgl. 5.2) und 1 μ l für die Konzentrationsbestimmung (vgl. 5.3) eingesetzt wurden. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

5.10.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Für die Isolierung genomischer DNA wurden die Zellen zunächst analog 5.9.4 pelletiert, in 500 μ l PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt. Weitere 500 μ l PBS wurden dazugegeben und die Zellen bei 2000 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Probe für 5 s gevortext und mit 500 μ l Cell Lysis Solution (Qiagen) versetzt. Nach 10 s Vortexen wurde die Probe 1 h lang bei 55 °C mit 0,6 U Proteinase K (PerkinElmer) verdaut und anschließend wieder 5 s gevortext. Danach wurden 170 μ l Protein Precipitation Solution (Qiagen) zugegeben, 25-30 s gevortext und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet verworfen. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol (100 %), fünfzigfachem Invertieren und anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit und RT. Der Überstand wurde verworfen, die DNA an der Luft getrocknet und in 20 μ l Elution Buffer (Qiagen) gelöst.

5.11 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese von RNA aus Zellen (vgl. 5.10.1) wurden 978 ng RNA zunächst mit 43 U Dnase I (Agilent Technologies) für 15 min bei 37 °C und anschließend 5 min bei 75 °C in einem Thermocycler (PepqLab) verdaut. Die anschließende cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des SuperScript[®] III First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers (Stand: Rev.3.0) durchgeführt und die fertige cDNA bei -20 °C gelagert.

6. Anhang

6.1 Informationen über das Gen *AHCY* (human)

6.1.1 *AHCY*-Transkripte (Ensembl)

Transkript-name	Transkript-ID	Länge [bp]	Biotyp	CCDS	RefSeq
AHCY-006	ENST00000538132	2366	proteinkodierend	CCDS54457	NM_001161766 NP_001155238
AHCY-002	ENST00000217426	2143	proteinkodierend	CCDS13233	NM_000687 NP_000678
AHCY-004	ENST00000468908	675	proz. Transkript	-	-
AHCY-005	ENST00000473516	488	proz. Transkript	-	-
AHCY-001	ENST00000480653	2211	verbl. Intron	-	-
AHCY-007	ENST00000606061	1170	verbl. Intron	-	-

Tabelle 6.1: Proteinkodierende *AHCY*-Transkripte

CCDS=Consensus Coding Sequence; ID=Identifikator, NM=mRNA-Identifikator, NP=Protein-Identifikator, proz.=prozessiertes; RefSeq=Reference Sequence; verbl.Intron=mit verbleibender intronischer Sequenz

Quelle: Ensembl Version 77

6.1.2 *AHCY*-Sequenzen

6.1.2.1 Transkript CCDS54457.1

cDNA-Sequenz (1215 Nukleotide):

```
ATG CCG GGC CTG ATG CGT ATG CGG GAG CGG TAC TCG GCC TCC AAG CCA
CTG AAG GGC GCC CGC ATC GCT GGC TGC CTG CAC ATG ACC GTG GAG ACG
GCC GTC CTC ATT GAG ACC CTC GTC ACC CTG GGT GCT GAG GTG CAG TGG
TCC AGC TGC AAC ATC TTC TCC ACC CAG GAC CAT GCG GCG GCT GCC ATT
GCC AAG GCT GGC ATT CCG GTG TAT GCC TGG AAG GGC GAA ACG GAC GAG
GAG TAC CTG TGG TGC ATT GAG CAG ACC CTG TAC TTC AGG ACG GGC CCC
TCA ACA TGA TTC TGG ACG ACG GGG GCG ACC TCA CCA ACC TCA TCC ACA
```

CCA AGT ACC CGC AGC TTC TGC CAG GCA TCC GAG GCA TCT CTG AGG AGA
 CCA CGA CTG GGG TCC ACA ACC TCT ACA AGA TGA TGG CCA ATG GGA TCC
 TCA AGG TGC CTG CCA TCA ATG TCA ATG ACT CCG TCA CCA AGA GCA AGT
 TTG ACA ACC TCT ATG GCT GCC GGG AGT CCC TCA TAG ATG GCA TCA AGC
 GGG CCA CAG ATG TGA TGA TTG CCG GCA AGG TAG CGG TGG TAG CAG GCT
 ATG GTG ATG TGG GCA AGG GCT GTG CCC AGG CCC TGC GGG GTT TCG GAG
 CCC GCG TCA TCA TCA CCG AGA TTG ACC CCA TCA ACG CAC TGC AGG CTG
 CCA TGG AGG GCT ATG AGG TGA CCA CCA TGG ATG AGG CCT GTC AGG AGG
 GCA ACA TCT TTG TCA CCA CCA CAG GCT GTA TTG ACA TCA TCC TTG GCC
 GGC ACT TTG AGC AGA TGA AGG ATG ATG CCA TTG TGT GTA ACA TTG GAC
 ACT TTG ACG TGG AGA TCG ATG TCA AGT GGC TCA ACG AGA ACG CCG TGG
 AGA AGG TGA ACA TCA AGC CGC AGG TGG ACC GGT ATC GGT TGA AGA ATG
 GGC GCC GCA TCA TCC TGC TGG CCG AGG GTC GGC TGG TCA ACC TGG GTT
 GTG CCA TGG GCC ACC CCA GCT TCG TGA TGA GTA ACT CCT TCA CCA ACC
 AGG TGA TGG CGC AGA TCG AGC TGT GGA CCC ATC CAG ACA AGT ACC CCG
 TTG GGG TTC ATT TCC TGC CCA AGA AGC TGG ATG AGG CAG TGG CTG AAG
 CCC ACC TGG GCA AGC TGA ATG TGA AGT TGA CCA AGC TAA CTG AGA AGC
 AAG CCC AGT ACC TGG GCA TGT CCT GTG ATG GCC CCT TCA AGC CGG ATC
 ACT ACC GCT ACT GA

Aminosäuresequenz (404 AS):

MPGL MRMR ERYA ASKP LKGA RIAG CLHM TVET AVLI ETLV TLGA EVQW SSCN
 IFST QDHA AAAI AKAG IPVY AWKG ETDE EYLW CIEQ TLYF KDGP LNMI LDDG
 GDLT NLIH TKYP QLLP GIRG ISEE TTTG VHNL YKMM ANGI LKVP AINV NDSV
 TSKK FDNL YGCR ESLI DGIK RATD VMIA GKVA VVAG YGDV GKGC AQAL RGFG
 ARVI ITEI DPIN ALQA AMEG YEVT TMDE ACQE GNIF VTTT GCID IILG RHFE
 QMKD DAIV CNIG HFDV EIDV KWLN ENAV EKVN IKPQ VDRY RLKN GRRV IL-
 LA EGRL VNLG CAMG HPSF VMSN SFTN QVMA QIEL WTHP DKYP VGVH FLPK
 KLDE AVAE AHLG KLVN KLTK LTEK QAQY LGMS CDGP FKPD HYRY

6.1.2.2 Transkript CCDS13233.1

cDNA-Sequenz (1299 Nukleotide):

ATG TCT GAC AAA CTG CCC TAC AAA GTC GCC GAC ATC GGC CTG GCT GCC
 TGG GGA CGC AAG GCC CTG GAC ATT GCT GAG AAC GAG ATG CCG GGC CTG
 ATG CGT ATG CGG GAG CGG TAC TCG GCC TCC AAG CCA CTG AAG GGC GCC
 CGC ATC GCT GGC TGC CTG CAC ATG ACC GTG GAG ACG GCC GTC CTC ATT
 GAG ACC CTC GTC ACC CTG GGT GCT GAG GTG CAG TGG TCC AGC TGC AAC

ATC TTC TCC ACC CAG GAC CAT GCG GCG GCT GCC ATT GCC AAG GCT GGC
ATT CCG GTG TAT GCC TGG AAG GGC GAA ACG GAC GAG GAG TAC CTG TGG
TGC ATT GAG CAG ACC CTG TAC TTC AAG GAC GGG CCC CTC AAC ATG ATT
CTG GAC GAC GGG GGC GAC CTC ACC AAC CTC ATC CAC ACC AAG TAC CCG
CAG CTT CTG CCA GGC ATC CGA GGC ATC TCT GAG GAG ACC ACG ACT GGG
GTC CAC AAC CTC TAC AAG ATG ATG GCC AAT GGG ATC CTC AAG GTG CCT
GCC ATC AAT GTC AAT GAC TCC GTC ACC AAG AGC AAG TTT GAC AAC CTC
TAT GGC TGC CGG GAG TCC CTC ATA GAT GGC ATC AAG CGG GCC ACA GAT
GTG ATG ATT GCC GGC AAG GTA GCG GTG GTA GCA GGC TAT GGT GAT GTG
GGC AAG GGC TGT GCC CAG GCC CTG CGG GGT TTC GGA GCC CGC GTC ATC
ATC ACC GAG ATT GAC CCC ATC AAC GCA CTG CAG GCT GCC ATG GAG GGC
TAT GAG GTG ACC ACC ATG GAT GAG GCC TGT CAG GAG GGC AAC ATC TTT
GTC ACC ACC ACA GGC TGT ATT GAC ATC ATC CTT GGC CGG CAC TTT GAG
CAG ATG AAG GAT GAT GCC ATT GTG TGT AAC ATT GGA CAC TTT GAC GTG
GAG ATC GAT GTC AAG TGG CTC AAC GAG AAC GCC GTG GAG AAG GTG AAC
ATC AAG CCG CAG GTG GAC CGG TAT CGG TTG AAG AAT GGG CGC CGC ATC
ATC CTG CTG GCC GAG GGT CGG CTG GTC AAC CTG GGT TGT GCC ATG GGC
CAC CCC AGC TTC GTG ATG AGT AAC TCC TTC ACC AAC CAG GTG ATG GCG
CAG ATC GAG CTG TGG ACC CAT CCA GAC AAG TAC CCC GTT GGG GTT CAT
TTC CTG CCC AAG AAG CTG GAT GAG GCA GTG GCT GAA GCC CAC CTG GGC
AAG CTG AAT GTG AAG TTG ACC AAG CTA ACT GAG AAG CAA GCC CAG TAC
CTG GGC ATG TCC TGT GAT GGC CCC TTC AAG CCG GAT CAC TAC CGC TAC
TGA

Aminosäuresequenz (432 AS):

MSDK LPYK VADI GLAA WGRK ALDI AENE MPGL MRMR ERYS ASKP LKGA RIAG
CLHM TVET AVLI ETLV TLGA EVQW SSCN IFST QDHA AAI AKAG IPVY AWKG
ETDE EYLW CIEQ TLYF KDGP LNMI LDDG GDLT NLIH TKYP QLLP GIRG ISEE
TTTG VHNL YKMM ANGI LKVP AINV NDSV TSKS FDNL YGCR ESLI DGIK RATD
VMIA GKVA VVAG YGDV GKGC AQAL RGFG ARVI ITEI DPIN ALQA AMEG YEVT
TMDE ACQE GNIF VTTT GCID IILG RHFE QMKD DAIV CNIG HFDV EIDV KWLN
ENAV EKNV IKPQ VDRY RLKN GRR ILLA EGRL VNLG CAMG HPSF VMSN SFTN
QVMA QIEL WTHP DKYP VGVH FLPK KLDE AVAE AHLG KLVN KLTK LTEK QAQY
LGMS CDGP FKPD HYRY

Literaturverzeichnis

- [1] C. H. Waddington. *The epigenotype (1942)*. Int J Epidemiol, 41(1):10–13, Feb 2012.
- [2] D. L. Nanney. *Epigenetic control systems*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 44(7):712–717, Jul 1958.
- [3] D. Haig. *Commentary: The epidemiology of epigenetics*. Int J Epidemiol, 41(1):13–16, Feb 2012.
- [4] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones. *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 429(6990):457–463, Mai 2004.
- [5] Graw. *Genetik*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2006. Kapitel 9; 4. Auflage.
- [6] R. T. Kamakaka, S. Biggins. *Histone variants: deviants?* Genes Dev., 19(3):295–310, Feb 2005.
- [7] Tost. *Epigenetics*. Caister Academic Press, Norfolk UK, 2008. Kapitel 4.
- [8] A. P. Wolffe, J. J. Hayes. *Chromatin disruption and modification*. Nucleic Acids Res., 27(3):711–720, Feb 1999.
- [9] S. Kato, K. Inoue, M. Youn. *Emergence of the osteo-epigenome in bone biology*. IBMS BoneKEy, (7):314–324, Sep 2010.
- [10] T. Jenuwein, C. D. Allis. *Translating the histone code*. Science, 293(5532):1074–1080, Aug 2001.
- [11] E. V. Benevolenskaya. *Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation*. Biochem. Cell Biol., 85(4):435–443, Aug 2007.
- [12] A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, K. Zhao. *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 129(4):823–837, Mai 2007.

- [13] C. M. Koch, R. M. Andrews, P. Flicek, S. C. Dillon, U. Karaoz, G. K. Clelland, S. Wilcox, D. M. Beare, J. C. Fowler, P. Couttet, K. D. James, G. C. Lefebvre, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, P. Dhami, C. F. Langford, Z. Weng, E. Birney, N. P. Carter, D. Vetric, I. Dunham. *The landscape of histone modifications across 1genome in five human cell lines*. *Genome Res.*, 17(6):691–707, Jun 2007.
- [14] J. S. Mattick. *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. *EMBO Rep.*, 2(11):986–991, Nov 2001.
- [15] M. Girardot, J. Cavaille, R. Feil. *Small regulatory RNAs controlled by genomic imprinting and their contribution to human disease*. *Epigenetics*, 7(12):1341–1348, Dez 2012.
- [16] Knippers. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 2006. 9.Auflage, Kapitel 15.
- [17] A. A. Aravin, R. Sachidanandam, D. Bourc'his, C. Schaefer, D. Pezic, K. F. Toth, T. Bestor, G. J. Hannon. *A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice*. *Mol. Cell*, 31(6):785–799, Sep 2008.
- [18] M. C. Siomi, K. Sato, D. Pezic, A. A. Aravin. *PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(4):246–258, Apr 2011.
- [19] N. S. Petrova, M. A. Zenkova, E. L. Chernolovskaya, 2013. *Structure - Functions Relations in Small Interfering RNAs, Practical Applications in Biomedical Engineering*, Dr. Adriano Andrade (Ed.), ISBN: 978-953-51-0924-2, InTech, DOI: 10.5772/53945. <http://www.intechopen.com/books/practical-applications-in-biomedical-engineering/structure-functions-relations-in-small-interfering-rnas>.
- [20] A. Read, D. Donnai. *Angewandte Humangenetik*. Verlag Walter de Gruyter, 2008.
- [21] Y. Gruenbaum, R. Stein, H. Cedar, A. Razin. *Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA*. *FEBS Lett.*, 124(1):67–71, Feb 1981.
- [22] A. Bird, M. Taggart, M. Frommer, O. J. Miller, D. Macleod. *A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA*. *Cell*, 40(1):91–99, Jan 1985.
- [23] D. Takai, P. A. Jones. *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(6):3740–3745, März 2002.
- [24] S. Saxonov, P. Berg, D. L. Brutlag. *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(5):1412–1417, Jan 2006.

- [25] D. M. Messerschmidt, B. B. Knowles, D. Solter. *DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos*. *Genes Dev.*, 28(8):812–828, Apr 2014.
- [26] S. Zakhari. *Alcohol metabolism and epigenetics changes*. *Alcohol Res*, 35(1):6–16, 2013.
- [27] J. J. Day, J. D. Sweatt. *DNA methylation and memory formation*. *Nat. Neurosci.*, 13(11):1319–1323, Nov 2010.
- [28] A. Pingoud. *Restriktionsenzyme: Struktur, Funktion und Evolution*. Verlag Ferdinand Schoeningh GmbH, Paderborn, 2004.
- [29] D. Ganten. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer-Verlag, 2008. Sektion 1.
- [30] M. K. Choy, M. Movassagh, H. G. Goh, M. R. Bennett, T. A. Down, R. S. Foo. *Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated*. *BMC Genomics*, 11:519, 2010.
- [31] W. Doerfler, P. Boehm. *DNA Methylation: Basic Mechanisms: Basic Mechanisms*. Springer Science and Business Media, 2006.
- [32] J.M. Craig, N.C. (editor) Wong. *Epigenetics: A Reference Manual*. Caister Academic Press, 2011. ISBN 978-1-904455-88-2.
- [33] S. Gonzalo. *Epigenetic alterations in aging*. *J. Appl. Physiol.*, 109(2):586–597, Aug 2010.
- [34] D. Globisch, M. Munzel, M. Muller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Bruckl, M. Biel, T. Carell. *Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates*. *PLoS ONE*, 5(12):e15367, 2010.
- [35] V. B. Teif, D. A. Beshnova, Y. Vainshtein, C. Marth, J. P. Mallm, T. Hofer, K. Rippe. *Nucleosome repositioning links DNA (de)methylation and differential CTCF binding during stem cell development*. *Genome Res.*, 24(8):1285–1295, Aug 2014.
- [36] T. Chen, E. Li. *Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases*. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 60:55–89, 2004.
- [37] A. Yu. Ryazanova, L. A. Abrosimova, T. S. Oretskaya, E. A. Kubareva. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. CC BY 3.0 license, 2012. ISBN 978-953-51-0881-8.

- [38] S. Xie, Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. W. He, K. Okumura, E. Li. *Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family*. *Gene*, 236(1):87–95, Aug 1999.
- [39] X. Cao, N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. L. Phillips, S. Kaeppler, S. E. Jacobsen. *Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(9):4979–4984, Apr 2000.
- [40] S. Kishikawa, T. Murata, H. Ugai, T. Yamazaki, K. K. Yokoyama. *Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner*. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, (3):307–308, 2003.
- [41] H. Leonhardt, A. W. Page, H. U. Weier, T. H. Bestor. *A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei*. *Cell*, 71(5):865–873, Nov 1992.
- [42] J. Arand, D. Spieler, T. Karius, M. R. Branco, D. Meilinger, A. Meissner, T. Jenwein, G. Xu, H. Leonhardt, V. Wolf, J. Walter. *In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases*. *PLoS Genet.*, 8(6):e1002750, Jun 2012.
- [43] M. Bostick, J. K. Kim, P. O. Esteve, A. Clark, S. Pradhan, S. E. Jacobsen. *UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells*. *Science*, 317(5845):1760–1764, Sep 2007.
- [44] J. Sharif, M. Muto, S. Takebayashi, I. Suetake, A. Iwamatsu, T. A. Endo, J. Shinga, Y. Mizutani-Koseki, T. Toyoda, K. Okamura, S. Tajima, K. Mitsuya, M. Okano, H. Koseki. *The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA*. *Nature*, 450(7171):908–912, Dez 2007.
- [45] J. Rouleau, G. Tanigawa, M. Szyf. *The mouse DNA methyltransferase 5'-region. A unique housekeeping gene promoter*. *J. Biol. Chem.*, 267(11):7368–7377, Apr 1992.
- [46] F. Gaudet, D. Talbot, H. Leonhardt, R. Jaenisch. *A short DNA methyltransferase isoform restores methylation in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 273(49):32725–32729, Dez 1998.
- [47] C. Mertineit, J. A. Yoder, T. Taketo, D. W. Laird, J. M. Trasler, T. H. Bestor. *Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells*. *Development*, 125(5):889–897, März 1998.
- [48] F. Ding, J. R. Chaillet. *In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(23):14861–14866, Nov 2002.

- [49] M. Okano, S. Xie, E. Li. *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat. Genet., 19(3):219–220, Jul 1998.
- [50] M. Kaneda, M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li, H. Sasaki. *Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting*. Nature, 429(6994):900–903, Jun 2004.
- [51] Y. Kato, M. Kaneda, K. Hata, K. Kumaki, M. Hisano, Y. Kohara, M. Okano, E. Li, M. Nozaki, H. Sasaki. *Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse*. Hum. Mol. Genet., 16(19):2272–2280, Okt 2007.
- [52] D. Watanabe, I. Suetake, T. Tada, S. Tajima. *Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis*. Mech. Dev., 118(1-2):187–190, Okt 2002.
- [53] D. Bourc'his, G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman, T. H. Bestor. *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. Science, 294(5551):2536–2539, Dez 2001.
- [54] D. Bourc'his, T. H. Bestor. *Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L*. Nature, 431(7004):96–99, Sep 2004.
- [55] F. Chedin, M. R. Lieber, C. L. Hsieh. *The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99(26):16916–16921, Dez 2002.
- [56] H. Gowher, K. Liebert, A. Hermann, G. Xu, A. Jeltsch. *Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L*. J. Biol. Chem., 280(14):13341–13348, Apr 2005.
- [57] D. Jia, R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch, X. Cheng. *Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation*. Nature, 449(7159):248–251, Sep 2007.
- [58] H. D. Morgan, W. Dean, H. A. Coker, W. Reik, S. K. Petersen-Mahrt. *Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming*. J. Biol. Chem., 279(50):52353–52360, Dez 2004.
- [59] N. Cervoni, S. Bhattacharya, M. Szyf. *DNA demethylase is a processive enzyme*. J. Biol. Chem., 274(13):8363–8366, März 1999.

- [60] Y. Ohinata, B. Payer, D. O'Carroll, K. Ancelin, Y. Ono, M. Sano, S. C. Barton, T. Obukhanych, M. Nussenzweig, A. Tarakhovsky, M. Saitou, M. A. Surani. *Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice*. *Nature*, 436(7048):207–213, Jul 2005.
- [61] D. M. Maatouk, L. D. Kellam, M. R. Mann, H. Lei, E. Li, M. S. Bartolomei, J. L. Resnick. *DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages*. *Development*, 133(17):3411–3418, Sep 2006.
- [62] P. Hajkova. *Epigenetic reprogramming—taking a lesson from the embryo*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22(3):342–350, Jun 2010.
- [63] C. Popp, W. Dean, S. Feng, S. J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen, W. Reik. *Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency*. *Nature*, 463(7284):1101–1105, Feb 2010.
- [64] S. Seisenberger, S. Andrews, F. Krueger, J. Arand, J. Walter, F. Santos, C. Popp, B. Thienpont, W. Dean, W. Reik. *The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells*. *Mol. Cell*, 48(6):849–862, Dez 2012.
- [65] C.P. Hickman, Roberts L.S., Larson A., l'Anson H., Eisenhour D.J. *Zoologie*. Pearson Studium, Hallbergmoos, Deutschland, 2008. 13. Auflage, Kapitel 7.
- [66] Y. Seki, M. Yamaji, Y. Yabuta, M. Sano, M. Shigeta, Y. Matsui, Y. Saga, M. Tachibana, Y. Shinkai, M. Saitou. *Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice*. *Development*, 134(14):2627–2638, Jul 2007.
- [67] Y. Seki, K. Hayashi, K. Itoh, M. Mizugaki, M. Saitou, Y. Matsui. *Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice*. *Dev. Biol.*, 278(2):440–458, Feb 2005.
- [68] Y. Yabuta, K. Kurimoto, Y. Ohinata, Y. Seki, M. Saitou. *Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling*. *Biol. Reprod.*, 75(5):705–716, Nov 2006.
- [69] K. Kurimoto, Y. Yabuta, Y. Ohinata, M. Shigeta, K. Yamanaka, M. Saitou. *Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice*. *Genes Dev.*, 22(12):1617–1635, Jun 2008.

- [70] S. Kagiwada, K. Kurimoto, T. Hirota, M. Yamaji, M. Saitou. *Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice*. EMBO J., 32(3):340–353, Feb 2013.
- [71] S. Guibert, M. Weber. *Epigenetics: Erase for a new start*. Nature, 492(7429):363–364, Dez 2012.
- [72] J. A. Hackett, R. Sengupta, J. J. Zylitz, K. Murakami, C. Lee, T. A. Down, M. A. Surani. *Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine*. Science, 339(6118):448–452, Jan 2013.
- [73] S. Yamaguchi, K. Hong, R. Liu, A. Inoue, L. Shen, K. Zhang, Y. Zhang. *Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming*. Cell Res., 23(3):329–339, März 2013.
- [74] S. A. Smallwood, G. Kelsey. *De novo DNA methylation: a germ cell perspective*. Trends Genet., 28(1):33–42, Jan 2012.
- [75] H. Sasaki, Y. Matsui. *Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond*. Nat. Rev. Genet., 9(2):129–140, Feb 2008.
- [76] M. Saitou, M. Yamaji. *Primordial germ cells in mice*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4(11), Nov 2012.
- [77] T. L. Davis, G. J. Yang, J. R. McCarrey, M. S. Bartolomei. *The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development*. Hum. Mol. Genet., 9(19):2885–2894, Nov 2000.
- [78] A. Henckel, K. Nakabayashi, L. A. Sanz, R. Feil, K. Hata, P. Arnaud. *Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals*. Hum. Mol. Genet., 18(18):3375–3383, Sep 2009.
- [79] S. K. Kota, R. Feil. *Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis*. Dev. Cell, 19(5):675–686, Nov 2010.
- [80] W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf. *Demethylation of the zygotic paternal genome*. Nature, 403(6769):501–502, Feb 2000.
- [81] J. Oswald, S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, J. Walter. *Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote*. Curr. Biol., 10(8):475–478, Apr 2000.
- [82] F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean. *Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo*. Dev. Biol., 241(1):172–182, Jan 2002.

- [83] F. Santos, W. Dean. *Epigenetic reprogramming during early development in mammals*. *Reproduction*, 127(6):643–651, Jun 2004.
- [84] M. Wossidlo, J. Arand, V. Sebastiano, K. Lepikhov, M. Boiani, R. Reinhardt, H. Scholer, J. Walter. *Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes*. *EMBO J.*, 29(11):1877–1888, Jun 2010.
- [85] T. P. Gu, F. Guo, H. Yang, H. P. Wu, G. F. Xu, W. Liu, Z. G. Xie, L. Shi, X. He, S. G. Jin, K. Iqbal, Y. G. Shi, Z. Deng, P. E. Szabo, G. P. Pfeifer, J. Li, G. L. Xu. *The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes*. *Nature*, 477(7366):606–610, Sep 2011.
- [86] H. Hashimoto, Y. Liu, A. K. Upadhyay, Y. Chang, S. B. Howerton, P. M. Vertino, X. Zhang, X. Cheng. *Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation*. *Nucleic Acids Res.*, 40(11):4841–4849, Jun 2012.
- [87] Y. Okada, K. Yamagata, K. Hong, T. Wakayama, Y. Zhang. *A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation*. *Nature*, 463(7280):554–558, Jan 2010.
- [88] Y. F. He, B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. Zhang, C. He, G. L. Xu. *Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA*. *Science*, 333(6047):1303–1307, Sep 2011.
- [89] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Muller, C. Hagemeyer, M. Truss, T. Carell. *Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(26):6516–6520, Jun 2012.
- [90] B. Payer, M. Saitou, S. C. Barton, R. Thresher, J. P. Dixon, D. Zahn, W. H. Colledge, M. B. Carlton, T. Nakano, M. A. Surani. *Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice*. *Curr. Biol.*, 13(23):2110–2117, Dez 2003.
- [91] T. Nakamura, Y. Arai, H. Umehara, M. Masuhara, T. Kimura, H. Taniguchi, T. Sekimoto, M. Ikawa, Y. Yoneda, M. Okabe, S. Tanaka, K. Shiota, T. Nakano. *PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis*. *Nat. Cell Biol.*, 9(1):64–71, Jan 2007.
- [92] M. Wossidlo, T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik, J. Walter. *5-Hydroxymethylcytosine in the*

- mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.* Nat Commun, 2:241, 2011.
- [93] F. Santos, A. H. Peters, A. P. Otte, W. Reik, W. Dean. *Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos.* Dev. Biol., 280(1):225–236, Apr 2005.
- [94] T. Nakamura, Y. J. Liu, H. Nakashima, H. Umehara, K. Inoue, S. Matoba, M. Tachibana, A. Ogura, Y. Shinkai, T. Nakano. *PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos.* Nature, 486(7403):415–419, Jun 2012.
- [95] C. Y. Howell, T. H. Bestor, F. Ding, K. E. Latham, C. Mertineit, J. M. Trasler, J. R. Chaillet. *Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene.* Cell, 104(6):829–838, März 2001.
- [96] R. Hirasawa, H. Chiba, M. Kaneda, S. Tajima, E. Li, R. Jaenisch, H. Sasaki. *Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development.* Genes Dev., 22(12):1607–1616, Jun 2008.
- [97] L. L. Carlson, A. W. Page, T. H. Bestor. *Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting.* Genes Dev., 6(12B):2536–2541, Dez 1992.
- [98] S. Ratnam, C. Mertineit, F. Ding, C. Y. Howell, H. J. Clarke, T. H. Bestor, J. R. Chaillet, J. M. Trasler. *Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development.* Dev. Biol., 245(2):304–314, Mai 2002.
- [99] H. Fulka, M. Mrazek, O. Tepla, J. Fulka. *DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos.* Reproduction, 128(6):703–708, Dez 2004.
- [100] J. S. Park, Y. S. Jeong, S. T. Shin, K. K. Lee, Y. K. Kang. *Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes.* Dev. Dyn., 236(9):2523–2533, Sep 2007.
- [101] H. Abdalla, Y. Yoshizawa, S. Hochi. *Active demethylation of paternal genome in mammalian zygotes.* J. Reprod. Dev., 55(4):356–360, Aug 2009.
- [102] T. Moore, D. Haig. *Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war.* Trends Genet., 7(2):45–49, Feb 1991.

- [103] T. Chen, Y. Ueda, J. E. Dodge, Z. Wang, E. Li. *Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b*. Mol. Cell. Biol., 23(16):5594–5605, Aug 2003.
- [104] H. Guo, P. Zhu, L. Yan, R. Li, B. Hu, Y. Lian, J. Yan, X. Ren, S. Lin, J. Li, X. Jin, X. Shi, P. Liu, X. Wang, W. Wang, Y. Wei, X. Li, F. Guo, X. Wu, X. Fan, J. Yong, L. Wen, S. X. Xie, F. Tang, J. Qiao. *The DNA methylation landscape of human early embryos*. Nature, 511(7511):606–610, Jul 2014.
- [105] A. C. Ferguson-Smith, M. A. Surani. *Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes*. Science, 293(5532), 2001.
- [106] imprinted gene database, Stand 17.2.2015. <http://www.geneimprint.com>.
- [107] M. J. O'Neill. *The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals*. Hum. Mol. Genet., 14(1):113–120, Apr 2005.
- [108] L.-B. Wan, M. S. Bartolomei. *Regulation of Imprinting in Clusters: Noncoding RNAs Versus Insulators: Long-Range Control of Gene Expression* (ed. V. van Heyningen und R. E. Hill). Elsevier Publishing New York, NY, USA, 61:207–223, 2008.
- [109] A. Razin, H. Cedar. *DNA methylation and genomic imprinting*. Cell, 77(4):473–476, Mai 1994.
- [110] E. U. Selker. *DNA methylation and chromatin structure: a view from below*. Trends Biochem. Sci., 15(3):103–107, März 1990.
- [111] H. H. Ng, A. Bird. *DNA methylation and chromatin modification*. Curr. Opin. Genet. Dev., 9(2):158–163, Apr 1999.
- [112] A.C. Ferguson-Smith, J.M. Greally, R.A. Martienssen. *Epigenomics*. Springer Science and Business Media, 2008.
- [113] L. Spahn, D. P. Barlow. *An ICE pattern crystallizes*. Nat. Genet., 35(1):11–12, Sep 2003.
- [114] D. Mancini-Dinardo, S. J. Steele, J. M. LeVorse, R. S. Ingram, S. M. Tilghman. *Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes*. Genes Dev., 20(10):1268–1282, Mai 2006.
- [115] F. Sleutels, R. Zwart, D. P. Barlow. *The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes*. Nature, 415(6873):810–813, Feb 2002.

- [116] K. L. Arney. *H19 and Igf2—enhancing the confusion?* Trends Genet., 19(1):17–23, Jan 2003.
- [117] C. I. Brannan, E. C. Dees, R. S. Ingram, S. M. Tilghman. *The product of the H19 gene may function as an RNA.* Mol. Cell. Biol., 10(1):28–36, Jan 1990.
- [118] S. Ayesh, I. Matouk, T. Schneider, P. Ohana, M. Laster, W. Al-Sharef, N. De-Groot, A. Hochberg. *Possible physiological role of H19 RNA.* Mol. Carcinog., 35(2):63–74, Okt 2002.
- [119] D. Bergman, M. Halje, M. Nordin, W. Engstrom. *Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review.* Gerontology, 59(3):240–249, 2013.
- [120] A. C. Bell, G. Felsenfeld. *Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene.* Nature, 405(6785):482–485, Mai 2000.
- [121] A. T. Hark, C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. LeVorse, S. M. Tilghman. *CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus.* Nature, 405(6785):486–489, Mai 2000.
- [122] A. Murrell, S. Heeson, W. Reik. *Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops.* Nat. Genet., 36(8):889–893, Aug 2004.
- [123] V. Kameswaran, K. H. Kaestner. *The Missing Inc(RNA) between the pancreatic beta-cell and diabetes.* Front Genet, 5:200, 2014.
- [124] K. Pfeifer, C. Gebert, B. Eun, M. Sampley, B. Pelham-Webb, M. Van Winkle, C. Yoon: *Molecular genetics of an imprinted gene cluster on mouse distal chromosome 7*, 2013. Annual Report of the Division of Intramural Research, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, MD 20892-2425 (USA).
- [125] T. Li, T. H. Vu, G. A. Ulaner, Y. Yang, J. F. Hu, A. R. Hoffman. *Activating and silencing histone modifications form independent allelic switch regions in the imprinted Gnas gene.* Hum. Mol. Genet., 13(7):741–750, Apr 2004.
- [126] A. Sakamoto, J. Liu, A. Greene, M. Chen, L. S. Weinstein. *Tissue-specific imprinting of the G protein Gsalpha is associated with tissue-specific differences in histone methylation.* Hum. Mol. Genet., 13(8):819–828, Apr 2004.
- [127] T. S. Mikkelsen, M. Ku, D. B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T. K. Kim, R. P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch,

- C. Nusbaum, E. S. Lander, B. E. Bernstein. *Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells*. *Nature*, 448(7153):553–560, Aug 2007.
- [128] G. Schotta, M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, T. Jenuwein. *A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin*. *Genes Dev.*, 18(11):1251–1262, Jun 2004.
- [129] T. Kouzarides. *Chromatin modifications and their function*. *Cell*, 128(4):693–705, Feb 2007.
- [130] C. M. Williamson, M. D. Turner, S. T. Ball, W. T. Nottingham, P. Glenister, M. Fray, Z. Tymowska-Lalanne, A. Plagge, N. Powles-Glover, G. Kelsey, M. Maconochie, J. Peters. *Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster*. *Nat. Genet.*, 38(3):350–355, März 2006.
- [131] V. Lloyd. *Parental imprinting in Drosophila*. *Genetica*, 109(1-2):35–44, 2000.
- [132] O. Garnier, S. Laouelle-Duprat, C. Spillane. *Genomic imprinting in plants*. *Epigenetics*, 3(1):14–20, 2008.
- [133] S. Suzuki, M. B. Renfree, A. J. Pask, G. Shaw, S. Kobayashi, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, F. Ishino. *Genomic imprinting of IGF2, p57(KIP2) and PEG1/MEST in a marsupial, the tammar wallaby*. *Mech. Dev.*, 122(2):213–222, Feb 2005.
- [134] E. Ager, S. Suzuki, A. Pask, G. Shaw, F. Ishino, M. B. Renfree. *Insulin is imprinted in the placenta of the marsupial, Macropus eugenii*. *Dev. Biol.*, 309(2):317–328, Sep 2007.
- [135] J. F. Wilkins, D. Haig. *What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression*. *Nat. Rev. Genet.*, 4(5):359–368, Mai 2003.
- [136] N. Engel, J. L. Thorvaldsen, M. S. Bartolomei. *CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus*. *Hum. Mol. Genet.*, 15(19):2945–2954, Okt 2006.
- [137] M. B. Renfree, T. A. Hore, G. Shaw, J. A. Graves, A. J. Pask. *Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10:241–262, 2009.
- [138] D. Haig. *Genetic conflicts in human pregnancy*. *Q Rev Biol*, 68(4):495–532, Dez 1993.

- [139] P. M. Coan, G. J. Burton, A. C. Ferguson-Smith. *Imprinted genes in the placenta—a review*. Placenta, 26 Suppl A:10–20, Apr 2005.
- [140] A. J. Pask, A. T. Papefuss, E. I. Ager, K. A. McColl, T. P. Speed, M. B. Renfree. *Analysis of the platypus genome suggests a transposon origin for mammalian imprinting*. Genome Biol., 10(1):R1, 2009.
- [141] K. Buiting. *Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 154C(3):365–376, Aug 2010.
- [142] J. Cavaille, K. Buiting, M. Kieffmann, M. Lalande, C. I. Brannan, B. Horsthemke, J. P. Bachellerie, J. Brosius, A. Huttenhofer. *Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(26):14311–14316, Dez 2000.
- [143] S. Kishore, S. Stamm. *The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C*. Science, 311(5758):230–232, Jan 2006.
- [144] P. S. Bazeley, V. Shepelev, Z. Talebizadeh, M. G. Butler, L. Fedorova, V. Filatov, A. Fedorov. *snoTARGET shows that human orphan snoRNA targets locate close to alternative splice junctions*. Gene, 408(1-2):172–179, Jan 2008.
- [145] J. B. Beckwith: *Extreme cytomegaly of the adrenal fetal cortex, omphalocele, hyperplasia of kidneys and pancreas, and leydig-cell hyperplasia: Another syndrome?*, 1963. Western Society for Pediatric Research (abstract), Los Angeles.
- [146] H. R. Wiedemann. *Complexe malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie. Un syndrome nouveau?* Journal de genetique humaine, 13:223–232, Sep 1964.
- [147] Shuman C. und Beckwith J. B. Weksberg, R. *Beckwith-Wiedemann syndrome*. European Journal of Human Genetics, 18(1):8–14, 2009.
- [148] A. Russell. *A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples)*. Proc. R. Soc. Med., 47(12):1040–1044, Dez 1954.
- [149] T. Eggermann, K. Eggermann, N. Schonherr. *Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome*. Trends Genet., 24(4):195–204, Apr 2008.
- [150] J. Blik, S. M. Maas, J. M. Ruijter, R. C. Hennekam, M. Alders, A. Westerveld, M. M. Mannens. *Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS*. Hum. Mol. Genet., 10(5):467–476, März 2001.

- [151] N. Diaz-Meyer, C. D. Day, K. Khatod, E. R. Maher, W. Cooper, W. Reik, C. Junien, G. Graham, E. Algar, V. M. Der Kaloustian, M. J. Higgins. *Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome*. J. Med. Genet., 40(11):797–801, Nov 2003.
- [152] W. N. Cooper, A. Luharia, G. A. Evans, H. Raza, A. C. Haire, R. Grundy, S. C. Bowdin, A. Riccio, G. Sebastio, J. Blied, P. N. Schofield, W. Reik, F. Macdonald, E. R. Maher. *Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome*. Eur. J. Hum. Genet., 13(9):1025–1032, Sep 2005.
- [153] G. Binder, M. Begemann, T. Eggermann, K. Kannenberg. *Silver-Russell syndrome*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 25(1):153–160, Feb 2011.
- [154] D. Kotzot, S. Schmitt, F. Bernasconi, W. P. Robinson, I. W. Lurie, H. Ilyina, K. Mehes, B. C. Hamel, B. J. Otten, M. Hergersberg. *Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation*. Hum. Mol. Genet., 4(4):583–587, Apr 1995.
- [155] J. Peters. *The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view*. Nat. Rev. Genet., 15(8):517–530, Aug 2014.
- [156] I. M. Morison, J. P. Ramsay, H. G. Spencer. *A census of mammalian imprinting*. Trends Genet., 21(8):457–465, Aug 2005.
- [157] O. Ogawa, M. R. Eccles, J. Szeto, L. A. McNoe, K. Yun, M. A. Maw, P. J. Smith, A. E. Reeve. *Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour*. Nature, 362(6422):749–751, Apr 1993.
- [158] S. Rainier, L. A. Johnson, C. J. Dobry, A. J. Ping, P. E. Grundy, A. P. Feinberg. *Relaxation of imprinted genes in human cancer*. Nature, 362(6422):747–749, Apr 1993.
- [159] W. Reik, J. Walter. *Genomic imprinting: parental influence on the genome*. Nat. Rev. Genet., 2(1):21–32, Jan 2001.
- [160] J. P. Vermeiden, R. E. Bernardus. *Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection?* Fertil. Steril., 99(3):642–651, März 2013.
- [161] L. N. Odom, J. Segars. *Imprinting disorders and assisted reproductive technology*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 17(6):517–522, Dez 2010.
- [162] H. H. Kazazian. *Genetics. L1 retrotransposons shape the mammalian genome*. Science, 289(5482):1152–1153, Aug 2000.

- [163] T. Wicker, F. Sabot, A. Hua-Van, J. L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel, A. H. Schulman. *A unified classification system for eukaryotic transposable elements*. *Nat. Rev. Genet.*, 8(12):973–982, Dez 2007.
- [164] A. F. Smit. *Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9(6):657–663, Dez 1999.
- [165] M. A. Batzer, P. L. Deininger. *Alu repeats and human genomic diversity*. *Nat. Rev. Genet.*, 3(5):370–379, Mai 2002.
- [166] J. V. Moran, R. J. DeBerardinis, H. H. Kazazian. *Exon shuffling by L1 retrotransposition*. *Science*, 283(5407):1530–1534, März 1999.
- [167] J. L. Goodier, E. M. Ostertag, H. H. Kazazian. *Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition*. *Hum. Mol. Genet.*, 9(4):653–657, März 2000.
- [168] O. K. Pickeral, W. Makalowski, M. S. Boguski, J. D. Boeke. *Frequent human genomic DNA transduction driven by LINE-1 retrotransposition*. *Genome Res.*, 10(4):411–415, Apr 2000.
- [169] H. S. Malik, W. D. Burke, T. H. Eickbush. *The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements*. *Mol. Biol. Evol.*, 16(6):793–805, Jun 1999.
- [170] E. Ullu, C. Tschudi. *Alu sequences are processed 7SL RNA genes*. *Nature*, 312(5990):171–172, 1984.
- [171] Q. Feng, J. V. Moran, H. H. Kazazian, J. D. Boeke. *Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition*. *Cell*, 87(5):905–916, Nov 1996.
- [172] J. V. Moran, S. E. Holmes, T. P. Naas, R. J. DeBerardinis, J. D. Boeke, H. H. Kazazian. *High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells*. *Cell*, 87(5):917–927, Nov 1996.
- [173] D. D. Luan, M. H. Korman, J. L. Jakubczak, T. H. Eickbush. *Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition*. *Cell*, 72(4):595–605, Feb 1993.
- [174] M. R. Shen, J. Brosius, P. L. Deininger. *BC1 RNA, the transcript from a master gene for ID element amplification, is able to prime its own reverse transcription*. *Nucleic Acids Res.*, 25(8):1641–1648, Apr 1997.

- [175] S. L. Mathias, A. F. Scott, H. H. Kazazian, J. D. Boeke, A. Gabriel. *Reverse transcriptase encoded by a human transposable element*. *Science*, 254(5039):1808–1810, Dez 1991.
- [176] J. D. Boeke. *LINEs and Alus—the polyA connection*. *Nat. Genet.*, 16(1):6–7, Mai 1997.
- [177] Lauren Solomon, Broad Communications, 2015
broad institute. transposons_720x720_v2.jpg;
<https://www.broadinstitute.org/education/glossary/transposable-elements>.
- [178] J. Norris, D. Fan, C. Aleman, J. R. Marks, P. A. Futreal, R. W. Wiseman, J. D. Iglehart, P. L. Deininger, D. P. McDonnell. *Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers*. *J. Biol. Chem.*, 270(39):22777–22782, Sep 1995.
- [179] A. V. Gendrel, Z. Lippman, C. Yordan, V. Colot, R. A. Martienssen. *Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1*. *Science*, 297(5588):1871–1873, Sep 2002.
- [180] J. H. Martens, R. J. O’Sullivan, U. Braunschweig, S. Opravil, M. Radolf, P. Steinlein, T. Jenuwein. *The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome*. *EMBO J.*, 24(4):800–812, Feb 2005.
- [181] Q. Yan, E. Cho, S. Lockett, K. Muegge. *Association of Lsh, a regulator of DNA methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin*. *Mol. Cell. Biol.*, 23(23):8416–8428, Dez 2003.
- [182] J. Huang, T. Fan, Q. Yan, H. Zhu, S. Fox, H. J. Issaq, L. Best, L. Gangi, D. Munroe, K. Muegge. *Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements*. *Nucleic Acids Res.*, 32(17):5019–5028, 2004.
- [183] T. Watanabe, A. Takeda, T. Tsukiyama, K. Mise, T. Okuno, H. Sasaki, N. Minami, H. Imai. *Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes*. *Genes Dev.*, 20(13):1732–1743, Jul 2006.
- [184] N. Yang, H. H. Kazazian. *L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(9):763–771, Sep 2006.
- [185] T. Sijen, R. H. Plasterk. *Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi*. *Nature*, 426(6964):310–314, Nov 2003.

- [186] Z. Lippman, B. May, C. Yordan, T. Singer, R. Martienssen. *Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification*. PLoS Biol., 1(3):E67, Dez 2003.
- [187] R. K. Slotkin, R. Martienssen. *Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome*. Nat. Rev. Genet., 8(4):272–285, Apr 2007.
- [188] K. D. Robertson, A. P. Wolffe. *DNA methylation in health and disease*. Nat. Rev. Genet., 1(1):11–19, Okt 2000.
- [189] D. E. Coulter-Karis, M. S. Hershfield. *Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine hydrolase*. Ann. Hum. Genet., 53(Pt 2):169–175, Mai 1989.
- [190] Y. Hu, X. Yang, D. H. Yin, J. Mahadevan, K. Kuczera, R. L. Schowen, R. T. Borchardt. *Computational characterization of substrate binding and catalysis in S-adenosylhomocysteine hydrolase*. Biochemistry, 40(50):15143–15152, Dez 2001.
- [191] G. De La Haba, G. L. Cantoni. *The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine*. J. Biol. Chem., 234(3):603–608, März 1959.
- [192] Y. Hu, J. Komoto, Y. Huang, T. Gomi, H. Ogawa, Y. Takata, M. Fujioka, F. Takusagawa. *Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver*. Biochemistry, 38(26):8323–8333, Jun 1999.
- [193] D. Yin, X. Yang, Y. Hu, K. Kuczera, R. L. Schowen, R. T. Borchardt, T. C. Squier. *Substrate binding stabilizes S-adenosylhomocysteine hydrolase in a closed conformation*. Biochemistry, 39(32):9811–9818, Aug 2000.
- [194] J. L. Palmer, R. H. Abeles. *The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase*. J. Biol. Chem., 254(4):1217–1226, Feb 1979.
- [195] Y. Takata, T. Yamada, Y. Huang, J. Komoto, T. Gomi, H. Ogawa, M. Fujioka, F. Takusagawa. *Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase. Site-directed mutagenesis of Asp-130, Lys-185, Asp-189, and Asn-190*. J. Biol. Chem., 277(25):22670–22676, Jun 2002.
- [196] S. Clarke, K. Banneld: S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Homocysteine in Health and Disease (Carmel, R. and Jacobsen, D. W., eds.), pp.63-78, 2001. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

- [197] J. A. Duerre, M. Briske-Anderson. *Effect of adenosine metabolites on methyltransferase reactions in isolated rat livers*. Biochim. Biophys. Acta, 678(2):275–282, Dez 1981.
- [198] N. M. Kredich, M. S. Hershfield. *S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76(5):2450–2454, Mai 1979.
- [199] R. Cox, C. Prescott, C. C. Irving. *The effect of S-adenosylhomocysteine on DNA methylation in isolated rat liver nuclei*. Biochim. Biophys. Acta, 474(4):493–499, Feb 1977.
- [200] M. Hermes, H. Osswald, J. Mattar, D. Kloor. *Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells*. Exp. Cell Res., 294(2):325–334, Apr 2004.
- [201] K. Kramer, E. O. Harrington, Q. Lu, R. Bellas, J. Newton, K. L. Sheahan, S. Rounds. *Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase activity modulates endothelial cell apoptosis*. Mol. Biol. Cell, 14(3):848–857, März 2003.
- [202] P. Yi, S. Melnyk, M. Pogribna, I. P. Pogribny, R. J. Hine, S. J. James. *Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation*. J. Biol. Chem., 275(38):29318–29323, Sep 2000.
- [203] I. Barić, K. Fumić, B. Glenn, M. Cuk, A. Schulze, J. D. Finkelstein, S. J. James, V. Mejaski-Bosnjak, L. Pazanin, I. P. Pogribny, M. Rados, V. Sarnavka, M. Scukanec-Spoljar, R. H. Allen, S. Stabler, L. Uzelac, O. Vugrek, C. Wagner, S. Zeisel, S. H. Mudd. *S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101(12):4234–4239, März 2004.
- [204] I. Barić, M. Cuk, K. Fumić, O. Vugrek, R. H. Allen, B. Glenn, M. Maradin, L. Pazanin, I. Pogribny, M. Rados, V. Sarnavka, A. Schulze, S. Stabler, C. Wagner, S. H. Zeisel, S. H. Mudd. *S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy*. J. Inherit. Metab. Dis., 28(6):885–902, 2005.
- [205] M. Cuk, M. Lovric, K. Fumić, S.H. Mudd, O. Vugrek, V. Sarnavka, I. Barić. *The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: Further evidence of congenital myopathy*. 6th Conference on Homocysteine Metabolism World Congress on Hyperhomocysteinemia, Saarbruecken, 2007.

- [206] T. Honzik, M. Magner, J. Krijt, J. Sokolova, O. Vugrek, R. Belužić, I. Barić, H. Hanšikova, M. Elleder, K. Vesela, L. Bauerova, N. Ondruškova, P. Ješina, J. Zeman, V. Kožich. *Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency*. *Mol. Genet. Metab.*, 107(3):611–613, Nov 2012.
- [207] R. Grubbs, O. Vugrek, J. Deisch, C. Wagner, S. Stabler, R. Allen, I. Barić, M. Rados, S. H. Mudd. *S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes*. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 33(6):705–713, Dez 2010.
- [208] O. Vugrek, R. Belužić, N. Nakić, S. H. Mudd. *S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome*. *Hum. Mutat.*, 30(4):E555–565, Apr 2009.
- [209] N. R. Buist, B. Glenn, O. Vugrek, C. Wagner, S. Stabler, R. H. Allen, I. Pogribny, A. Schulze, S. H. Zeisel, I. Barić, S. H. Mudd. *S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man*. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 29(4):538–545, Aug 2006.
- [210] R. S. Hansen, C. Wijmenga, P. Luo, A. M. Stanek, T. K. Canfield, C. M. Weemaes, S. M. Gartler. *The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(25):14412–14417, Dez 1999.
- [211] K. Tatton-Brown, S. Seal, E. Ruark, J. Harmer, E. Ramsay, S. Del Vecchio Duarte, A. Zachariou, S. Hanks, E. O'Brien, L. Aksglaede, D. Baralle, T. Dabir, B. Gerner, D. Goudie, T. Homfray, A. Kumar, D. T. Pilz, A. Selicorni, I. K. Temple, L. Van Maldergem, N. Yachelevich, R. van Montfort, N. Rahman. *Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability*. *Nat. Genet.*, 46(4):385–388, Apr 2014.
- [212] O. El-Maarri, M. S. Kareta, T. Mikeska, T. Becker, A. Diaz-Lacava, J. Junen, N. Nusgen, F. Behne, T. Wienker, A. Waha, J. Oldenburg, F. Chedin. *A systematic search for DNA methyltransferase polymorphisms reveals a rare DNMT3L variant associated with subtelomeric hypomethylation*. *Hum. Mol. Genet.*, 18(10):1755–1768, Mai 2009.
- [213] E. Balada, J. Ordi-Ros, S. Serrano-Acedo, L. Martinez-Lostao, M. Rosa-Leyva, M. Vilardell-Tarres. *Transcript levels of DNA methyltransferases DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus*. *Immunology*, 124(3):339–347, Jul 2008.

- [214] Z. Wu, X. Mei, D. Zhao, Y. Sun, J. Song, W. Pan, W. Shi. *DNA methylation modulates HERV-E expression in CD4+ T cells from systemic lupus erythematosus patients*. *J. Dermatol. Sci.*, 77(2):110–116, Feb 2015.
- [215] R. Aggarwal, A. L. Sestak, A. D'Sousa, S. P. Dillon, B. Namjou, R. H. Scofield. *Complete complement deficiency in a large cohort of familial systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 19(1):52–57, Jan 2010.
- [216] G. I. Rice, Y. del Toro Duany, E. M. Jenkinson, G. M. Forte, B. H. Anderson, G. Ariaudo, B. Bader-Meunier, E. M. Baildam, R. Battini, M. W. Beresford, M. Casarano, M. Chouchane, R. Cimaz, A. E. Collins, N. J. Cordeiro, R. C. Dale, J. E. Davidson, L. De Waele, I. Desguerre, L. Faivre, E. Fazzi, B. Isidor, L. Lagae, A. R. Latchman, P. Lebon, C. Li, J. H. Livingston, C. M. Lourenco, M. M. Mancardi, A. Masurel-Paulet, I. B. McInnes, M. P. Menezes, C. Mignot, J. O'Sullivan, S. Orcesi, P. P. Picco, E. Riva, R. A. Robinson, D. Rodriguez, E. Salvatici, C. Scott, M. Szybowska, J. L. Tolmie, A. Vanderver, C. Vanhulle, J. P. Vieira, K. Webb, R. N. Whitney, S. G. Williams, L. A. Wolfe, S. M. Zuberi, S. Hur, Y. J. Crow. *Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling*. *Nat. Genet.*, 46(5):503–509, Mai 2014.
- [217] C. E. Yu, J. Oshima, Y. H. Fu, E. M. Wijsman, F. Hisama, R. Alisch, S. Matthews, J. Nakura, T. Miki, S. Ouais, G. M. Martin, J. Mulligan, G. D. Schellenberg. *Positional cloning of the Werner's syndrome gene*. *Science*, 272(5259):258–262, Apr 1996.
- [218] M. Eriksson, W. T. Brown, L. B. Gordon, M. W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. R. Erdos, C. M. Robbins, T. Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A. B. Csoka, M. Boehnke, T. W. Glover, F. S. Collins. *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. *Nature*, 423(6937):293–298, Mai 2003.
- [219] A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C. L. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, N. Levy. *Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria*. *Science*, 300(5628):2055, Jun 2003.
- [220] H. Heyn, S. Moran, M. Esteller. *Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome*. *Epigenetics*, 8(1):28–33, Jan 2013.
- [221] P. Desplats, B. Spencer, E. Coffee, P. Patel, S. Michael, C. Patrick, A. Adame, E. Rockenstein, E. Masliah. *Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the*

- nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases.* J. Biol. Chem., 286(11):9031–9037, März 2011.
- [222] F. Coppede. *Genetics and epigenetics of Parkinson's disease.* ScientificWorld-Journal, 2012:489830, 2012.
- [223] O. Ammerpohl, S. Bens, R. Siebert. *Der Ueber-Code der DNA: epigenetische Mechanismen und deren Bedeutung fuer die Entstehung von Krankheiten.* J Lab Med, 37(6):317–328, 2013.
- [224] J. Brocato, M. Costa. *Basic mechanics of DNA methylation and the unique landscape of the DNA methylome in metal-induced carcinogenesis.* Crit. Rev. Toxicol., 43(6):493–514, Jul 2013.
- [225] D. J. Stumpel, P. Schneider, E. H. van Roon, R. Pieters, R. W. Stam. *Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia.* Eur. J. Cancer, 49(1):175–184, Jan 2013.
- [226] S. Keelawat, P. S. Thorner, S. Shuangshoti, A. Bychkov, N. Kitkumthorn, P. Rattananyong, W. Boonyayothin, U. Poumsuk, P. Ruangvejvorachai, A. Mutirangura. *Detection of global hypermethylation in well-differentiated thyroid neoplasms by immunohistochemical (5-methylcytidine) analysis.* J. Endocrinol. Invest., März 2015.
- [227] A. Moran, T. Fernandez-Marcelo, J. Carro, C. De Juan, I. Pascua, J. Head, A. Gomez, F. Hernando, A. J. Torres, M. Benito, P. Iniesta. *Methylation profiling in non-small cell lung cancer: clinical implications.* Int. J. Oncol., 40(3):739–746, März 2012.
- [228] N. Coppieters, B. V. Dieriks, C. Lill, R. L. Faull, M. A. Curtis, M. Dragunow. *Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain.* Neurobiol. Aging, 35(6):1334–1344, Jun 2014.
- [229] D. Kumar, S. R. Salian, G. Kalthur, S. Uppangala, S. Kumari, S. Challapalli, S. G. Chandraguthi, H. Krishnamurthy, N. Jain, P. Kumar, S. K. Adiga. *Semen abnormalities, sperm DNA damage and global hypermethylation in health workers occupationally exposed to ionizing radiation.* PLoS ONE, 8(7):e69927, 2013.
- [230] C. M. Robinson, R. Neary, A. Levendale, C. J. Watson, J. A. Baugh. *Hypoxia-induced DNA hypermethylation in human pulmonary fibroblasts is associated with Thy-1 promoter methylation and the development of a pro-fibrotic phenotype.* Respir. Res., 13:74, 2012.

- [231] S. Jin, Y. K. Lee, Y. C. Lim, Z. Zheng, X. M. Lin, D. P. Ng, J. D. Holbrook, H. Y. Law, K. Y. Kwek, G. S. Yeo, C. Ding. *Global DNA hypermethylation in down syndrome placenta*. PLoS Genet., 9(6):e1003515, Jun 2013.
- [232] J. T. Brosnan, M. E. Brosnan. *The sulfur-containing amino acids: an overview*. J. Nutr., 136(6 Suppl):1636S–1640S, Jun 2006.
- [233] J. D. Finkelstein. *Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism*. J. Nutr., 136(6 Suppl):1750S–1754S, Jun 2006.
- [234] S. H. Mudd, H. L. Levy, J. P. Kraus: Disorders of transsulfuration., 2001. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., eds; Childs B., Kinzler K. W., Vogelstein B., assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2007-2056.
- [235] I. Barić. *Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine*. J. Inherit. Metab. Dis., 32(4):459–471, Aug 2009.
- [236] M. E. Chamberlin, T. Ubagai, S. H. Mudd, J. Thomas, V. Y. Pao, T. K. Nguyen, H. L. Levy, C. Greene, C. Freehauf, J. Y. Chou. *Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations*. Am. J. Hum. Genet., 66(2):347–355, Feb 2000.
- [237] S. H. Mudd, H. L. Levy, A. Tangerman, C. Boujet, N. Buist, A. Davidson-Mundt, L. Hudgins, K. Oyanagi, M. Nagao, W. G. Wilson. *Isolated persistent hypermethioninemia*. Am. J. Hum. Genet., 57(4):882–892, Okt 1995.
- [238] R. Surtees, J. Leonard, S. Austin. *Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway*. Lancet, 338(8782-8783):1550–1554, 1991.
- [239] N. E. Braverman, S. H. Mudd, P. B. Barker, M. G. Pomper. *Characteristic MR imaging changes in severe hypermethioninemic states*. AJNR Am J Neuroradiol, 26(10):2705–2706, 2005.
- [240] M. E. Chamberlin, T. Ubagai, S. H. Mudd, W. G. Wilson, J. V. Leonard, J. Y. Chou. *Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency*. J. Clin. Invest., 98(4):1021–1027, Aug 1996.
- [241] H. Tada, J. Takanashi, A. J. Barkovich, S. Yamamoto, Y. Kohno. *Reversible white matter lesion in methionine adenosyltransferase I/III deficiency*. AJNR Am J Neuroradiol, 25(10):1843–1845, 2004.

- [242] S. H. Mudd, D. J. Jenden, A. Capdevila, M. Roch, H. L. Levy, C. Wagner. *Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline*. Metab. Clin. Exp., 49(12):1542–1547, Dez 2000.
- [243] E. J. Yeo, C. Wagner. *Tissue distribution of glycine N-methyltransferase, a major folate-binding protein of liver*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91(1):210–214, Jan 1994.
- [244] J. D. Finkelstein. *The metabolism of homocysteine: pathways and regulation*. Eur. J. Pediatr., 157 Suppl 2:S40–44, Apr 1998.
- [245] M. Medina, J. L. Urdiales, M. I. Amores-Sanchez. *Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions*. Eur. J. Biochem., 268(14):3871–3882, Jul 2001.
- [246] H. J. Blom, Y. Smulders. *Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects*. J. Inherit. Metab. Dis., 34(1):75–81, Feb 2011.
- [247] A. Splaver, G. A. Lamas, C. H. Hennekens. *Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials*. Am. Heart J., 148(1):34–40, Jul 2004.
- [248] No authors listed. *Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis*. JAMA, 288(16):2015–2022, 2002.
- [249] A. J. Levine, K. D. Siegmund, C. M. Ervin, A. Diep, E. R. Lee, H. D. Frankl, R. W. Haile. *The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 9(7):657–663, Jul 2000.
- [250] T. K. Eskes. *Neural tube defects, vitamins and homocysteine*. Eur. J. Pediatr., 157 Suppl 2:S139–141, Apr 1998.
- [251] S. J. James, M. Pogribna, I. P. Pogribny, S. Melnyk, R. J. Hine, J. B. Gibson, P. Yi, D. L. Tafoya, D. H. Swenson, V. L. Wilson, D. W. Gaylor. *Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome*. Am. J. Clin. Nutr., 70(4):495–501, Okt 1999.
- [252] T. Arinami, N. Yamada, K. Yamakawa-Kobayashi, H. Hamaguchi, M. Toru. *Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression*. Am. J. Med. Genet., 74(5):526–528, Sep 1997.

- [253] T. Bottiglieri. *Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders*. Nutr. Rev., 54(12):382–390, Dez 1996.
- [254] A. S. Brown, T. Bottiglieri, C. A. Schaefer, C. P. Quesenberry, L. Liu, M. Bresnahan, E. S. Susser. *Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia*. Arch. Gen. Psychiatry, 64(1):31–39, Jan 2007.
- [255] J. W. Muntjewerff, R. S. Kahn, H. J. Blom, M. den Heijer. *Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis*. Mol. Psychiatry, 11(2):143–149, Feb 2006.
- [256] S. J. James, S. Melnyk, M. Pogribna, I. P. Pogribny, M. A. Caudill. *Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology*. J. Nutr., 132(8 Suppl):2361S–2366S, Aug 2002.
- [257] Z. Chen, A. C. Karaplis, S. L. Ackerman, I. P. Pogribny, S. Melnyk, S. Lussier-Cacan, M. F. Chen, A. Pai, S. W. John, R. S. Smith, T. Bottiglieri, P. Bagley, J. Selhub, M. A. Rudnicki, S. J. James, R. Rozen. *Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition*. Hum. Mol. Genet., 10(5):433–443, März 2001.
- [258] M. Hermes, H. Geisler, H. Osswald, R. Riehle, D. Kloor. *Alterations in S-adenosylhomocysteine metabolism decrease O6-methylguanine DNA methyltransferase gene expression without affecting promoter methylation*. Biochem. Pharmacol., 75(11):2100–2111, Jun 2008.
- [259] N. C. Chen, F. Yang, L. M. Capecchi, Z. Gu, A. I. Schafer, W. Durante, X. F. Yang, H. Wang. *Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues*. FASEB J., 24(8):2804–2817, Aug 2010.
- [260] M. Balaghi, C. Wagner. *DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 193(3):1184–1190, Jun 1993.
- [261] J. Strakova, S. Gupta, W. D. Kruger, R. N. Dilger, K. Tryon, L. Li, T. A. Garrow. *Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase in rats causes hyperhomocysteinemia and reduces liver cystathionine beta-synthase activity and methylation capacity*. Nutr Res, 31(7):563–571, Jul 2011.
- [262] R. Castro, I. Rivera, E. A. Struys, E. E. Jansen, P. Ravasco, M. E. Camilo, H. J. Blom, C. Jakobs, I. Tavares de Almeida. *Increased homocysteine and*

- S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease.* Clin. Chem., 49(8):1292–1296, Aug 2003.
- [263] J. G. Zhang, J. X. Liu, Z. H. Li, L. Z. Wang, Y. D. Jiang, S. R. Wang. *Dysfunction of endothelial NO system originated from homocysteine-induced aberrant methylation pattern in promoter region of DDAH2 gene.* Chin. Med. J., 120(23):2132–2137, Dez 2007.
- [264] D. Ingrosso, A. Cimmino, A. F. Perna, L. Masella, N. G. De Santo, M. L. De Bonis, M. Vacca, M. D'Esposito, M. D'Urso, P. Galletti, V. Zappia. *Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia.* Lancet, 361(9370):1693–1699, Mai 2003.
- [265] A. F. Perna, D. Ingrosso, V. Zappia, P. Galletti, G. Capasso, N. G. De Santo. *Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure. Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine.* J. Clin. Invest., 91(6):2497–2503, Jun 1993.
- [266] I. P. Pogribny, S. A. Ross, C. Wise, M. Pogribna, E. A. Jones, V. P. Tryndyak, S. J. James, Y. P. Dragan, L. A. Poirier. *Irreversible global DNA hypomethylation as a key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency.* Mutat. Res., 593(1-2):80–87, Jan 2006.
- [267] I. P. Pogribny, A. G. Basnakian, B. J. Miller, N. G. Lopatina, L. A. Poirier, S. J. James. *Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats.* Cancer Res., 55(9):1894–1901, Mai 1995.
- [268] C. J. McNeil, J. H. Beattie, M. J. Gordon, L. P. Pirie, S. J. Duthie. *Differential effects of nutritional folic acid deficiency and moderate hyperhomocysteinemia on aortic plaque formation and genome-wide DNA methylation in vascular tissue from ApoE^{-/-} mice.* Clin Epigenetics, 2(2):361–368, Aug 2011.
- [269] N. Shivapurkar, L. A. Poirier. *Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks.* Carcinogenesis, 4(8):1051–1057, Aug 1983.
- [270] S. F. Choumenkovitch, J. Selhub, P. J. Bagley, N. Maeda, M. R. Nadeau, D. E. Smith, S. W. Choi. *In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific.* J. Nutr., 132(8):2157–2160, Aug 2002.

- [271] S. Dayal, T. Bottiglieri, E. Arning, N. Maeda, M. R. Malinow, C. D. Sigmund, D. D. Heistad, F. M. Faraci, S. R. Lentz. *Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice*. *Circ. Res.*, 88(11):1203–1209, Jun 2001.
- [272] M. A. Caudill, J. C. Wang, S. Melnyk, I. P. Pogribny, S. Jernigan, M. D. Collins, J. Santos-Guzman, M. E. Swendseid, E. A. Cogger, S. J. James. *Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice*. *J. Nutr.*, 131(11):2811–2818, Nov 2001.
- [273] A. K. Ghoshal, E. Farber. *Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: a new perspective*. *Lab. Invest.*, 68(3):255–260, März 1993.
- [274] E. Wainfan, L. A. Poirier. *Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression*. *Cancer Res.*, 52(7 Suppl):2071s–2077s, Apr 1992.
- [275] S. J. James, I. P. Pogribny, M. Pogribna, B. J. Miller, S. Jernigan, S. Melnyk. *Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis*. *J. Nutr.*, 133(11 Suppl 1):3740S–3747S, Nov 2003.
- [276] J. K. Christman, G. Sheikhnejad, M. Dizik, S. Abileah, E. Wainfan. *Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency*. *Carcinogenesis*, 14(4):551–557, Apr 1993.
- [277] I. P. Pogribny, B. J. Miller, S. J. James. *Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat*. *Cancer Lett.*, 115(1):31–38, Mai 1997.
- [278] S. Liu, M. S. Wolfe, R. T. Borchardt. *Rational approaches to the design of antiviral agents based on S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as a molecular target*. *Antiviral Res.*, 19(3):247–265, Sep 1992.
- [279] Y. Furuichi. *Pretranscriptional capping in the biosynthesis of cytoplasmic polyhedrosis virus mRNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75(3):1086–1090, März 1978.
- [280] Y. Jiang, H. Zhang, T. Sun, J. Wang, W. Sun, H. Gong, B. Yang, Y. Shi, J. Wei. *The comprehensive effects of hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia on pathogenesis of atherosclerosis and DNA hypomethylation in ApoE^{-/-} mice*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 44(10):866–875, Okt 2012.

- [281] Y. H. Chien, S. C. Chiang, A. Huang, W. L. Hwu. *Spectrum of hypermethioninemia in neonatal screening*. Early Hum. Dev., 81(6):529–533, Jun 2005.
- [282] M. Linnebank, F. Lagler, A. C. Muntau, W. Roschinger, B. Olgemoller, B. Fowler, H. G. Koch. *Methionine adenosyltransferase (MAT) I/III deficiency with concurrent hyperhomocysteinaemia: two novel cases*. J. Inherit. Metab. Dis., 28(6):1167–1168, 2005.
- [283] A. Prudova, Z. Bauman, A. Braun, V. Vitvitsky, S. C. Lu, R. Banerjee. *S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103(17):6489–6494, Apr 2006.
- [284] S. P. Stabler, C. Steegborn, M. C. Wahl, J. Oliveriusova, J. P. Kraus, R. H. Allen, C. Wagner, S. H. Mudd. *Elevated plasma total homocysteine in severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency*. Metab. Clin. Exp., 51(8):981–988, Aug 2002.
- [285] W. Fu, N. P. Dudman, M. A. Perry, K. Young, X. L. Wang. *Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 271(1):47–53, Apr 2000.
- [286] H. Wang, M. Yoshizumi, K. Lai, J. C. Tsai, M. A. Perrella, E. Haber, M. E. Lee. *Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine*. J. Biol. Chem., 272(40):25380–25385, Okt 1997.
- [287] R. Esse, C. Florindo, A. Imbard, M. S. Rocha, A. S. de Vriese, Y. M. Smulders, T. Teerlink, I. Tavares de Almeida, R. Castro, H. J. Blom. *Global protein and histone arginine methylation are affected in a tissue-specific manner in a rat model of diet-induced hyperhomocysteinemia*. Biochim. Biophys. Acta, 1832(10):1708–1714, Okt 2013.
- [288] Y. I. Kim, J. K. Christman, J. C. Fleet, M. L. Cravo, R. N. Salomon, D. Smith, J. Ordovas, J. Selhub, J. B. Mason. *Moderate folate deficiency does not cause global hypomethylation of hepatic and colonic DNA or c-myc-specific hypomethylation of colonic DNA in rats*. Am. J. Clin. Nutr., 61(5):1083–1090, Mai 1995.
- [289] C. D. Davis, E. O. Uthus. *Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one-carbon metabolism in rats*. J. Nutr., 133(9):2907–2914, Sep 2003.
- [290] K. J. Sohn, J. M. Stempak, S. Reid, S. Shirwadkar, J. B. Mason, Y. I. Kim. *The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon*. Carcinogenesis, 24(1):81–90, Jan 2003.

- [291] S. W. Choi, S. Friso, G. G. Dolnikowski, P. J. Bagley, A. N. Edmondson, D. E. Smith, J. B. Mason. *Biochemical and molecular aberrations in the rat colon due to folate depletion are age-specific*. J. Nutr., 133(4):1206–1212, Apr 2003.
- [292] M. Kinoshita, S. Numata, A. Tajima, S. Shimodera, I. Imoto, T. Ohmori. *Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia*. Epigenetics, 8(6):584–590, Jun 2013.
- [293] I. P. Pogribny, A. R. Karpf, S. R. James, S. Melnyk, T. Han, V. P. Tryndyak. *Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet*. Brain Res., 1237:25–34, Okt 2008.
- [294] M. P. McKeever, D. G. Weir, A. Molloy, J. M. Scott. *Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat*. Clin. Sci., 81(4):551–556, Okt 1991.
- [295] E. T. Prak, H. H. Kazazian. *Mobile elements and the human genome*. Nat. Rev. Genet., 1(2):134–144, Nov 2000.
- [296] T. Brown. *Introduction to Genetics: A Molecular Approach*. Garland Science, 2011.
- [297] A. M. Devlin, T. Bottiglieri, F. E. Domann, S. R. Lentz. *Tissue-specific changes in H19 methylation and expression in mice with hyperhomocysteinemia*. J. Biol. Chem., 280(27):25506–25511, Jul 2005.
- [298] M. B. Glier, Y. F. Ngai, D. C. Sulistyoningrum, R. E. Aleliunas, T. Bottiglieri, A. M. Devlin. *Tissue-specific relationship of S-adenosylhomocysteine with allele-specific H19/Igf2 methylation and imprinting in mice with hyperhomocysteinemia*. Epigenetics, 8(1):44–53, Jan 2013.
- [299] A. S. Yang, M. R. Estecio, K. Doshi, Y. Kondo, E. H. Tajara, J. P. Issa. *A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements*. Nucleic Acids Res., 32(3):e38, 2004.
- [300] N. Irahara, K. Noshō, Y. Baba, K. Shima, N. I. Lindeman, A. Hazra, E. S. Scherhammer, D. J. Hunter, C. S. Fuchs, S. Ogino. *Precision of pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation in colon cancer, normal colonic mucosa, and peripheral blood cells*. J Mol Diagn, 12(2):177–183, März 2010.
- [301] Y. A. Chen, M. Lemire, S. Choufani, D. T. Butcher, D. Grafodatskaya, B. W. Zanke, S. Gallinger, T. J. Hudson, R. Weksberg. *Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray*. Epigenetics, 8(2):203–209, Feb 2013.

- [302] M. E. Price, A. M. Cotton, L. L. Lam, P. Farre, E. Emberly, C. J. Brown, W. P. Robinson, M. S. Kobor. *Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array.* Epigenetics Chromatin, 6(1):4, 2013.
- [303] Y. Jiang, T. Sun, J. Xiong, J. Cao, G. Li, S. Wang. *Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats.* Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), 39(9):657–667, Sep 2007.
- [304] G. P. White, P. M. Watt, B. J. Holt, P. G. Holt. *Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells.* J. Immunol., 168(6):2820–2827, März 2002.
- [305] Application Note: Epigenetics. Whole-genome bisulfite sequencing - efficient nanogram-scale library preparation, sequencing, and analysis of DNA methylation (Illumina), 2014.
- [306] J. C. Tsai, H. Wang, M. A. Perrella, M. Yoshizumi, N. E. Sibinga, L. C. Tan, E. Haber, T. H. Chang, R. Schlegel, M. E. Lee. *Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells.* J. Clin. Invest., 97(1):146–153, Jan 1996.
- [307] J. E. Katz, M. Dlakić, S. Clarke. *Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames.* Mol. Cell Proteomics, 2(8):525–540, Aug 2003.
- [308] G. L. Cantoni, H. H. Richards, P. K. Chiang: Inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation., 1979. In: Usdin E., Borchardt R. T., Creveling C. R., eds. Transmethylation. New York: Elsevier/North Holland, 155 bis 164.
- [309] S. K. Ghosh, W. K. Paik, S. Kim. *Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme.* J. Biol. Chem., 263(35):19024–19033, Dez 1988.
- [310] M. D. Jamaluddin, I. Chen, F. Yang, X. Jiang, M. Jan, X. Liu, A. I. Schafer, W. Durante, X. Yang, H. Wang. *Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene.* Blood, 110(10):3648–3655, Nov 2007.
- [311] R. Esse, M. S. Rocha, M. Barroso, C. Florindo, T. Teerlink, R. M. Kok, Y. M. Smulders, I. Rivera, P. Leandro, P. Koolwijk, R. Castro, H. J. Blom, I. T.

- de Almeida. *Protein arginine methylation is more prone to inhibition by S-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells*. PLoS ONE, 8(2):e55483, 2013.
- [312] J. O. Kriegs, G. Churakov, J. Jurka, J. Brosius, J. Schmitz. *Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates*. Trends Genet., 23(4):158–161, Apr 2007.
- [313] J. L. Counts, J. I. Goodman. *Hypomethylation of DNA: an epigenetic mechanism involved in tumor promotion*. Mol. Carcinog., 11(4):185–188, Dez 1994.
- [314] S. Takumi, K. Okamura, H. Yanagisawa, T. Sano, Y. Kobayashi, K. Nohara. *The effect of a methyl-deficient diet on the global DNA methylation and the DNA methylation regulatory pathways*. J Appl Toxicol, Feb 2015.
- [315] M. O. Hiltunen, M. P. Turunen, T. P. Hakkinen, J. Rutanen, M. Hedman, K. Mäkinen, A. M. Turunen, K. Aalto-Setälä, S. Ylä-Herttuala. *DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions*. Vasc Med, 7(1):5–11, Feb 2002.
- [316] Y. Jiang, J. Jiang, J. Xiong, J. Cao, N. Li, G. Li, S. Wang. *Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes*. J. Exp. Biol., 211(Pt 6):911–920, März 2008.
- [317] P. J. Lee, L. L. Washer, D. J. Law, C. R. Boland, I. L. Horon, A. P. Feinberg. *Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93(19):10366–10370, Sep 1996.
- [318] M. Hermes, S. von Hippel, H. Osswald, D. Kloor. *S-adenosylhomocysteine metabolism in different cell lines: effect of hypoxia and cell density*. Cell. Physiol. Biochem., 15(5):233–244, 2005.
- [319] M. Hermes, H. Osswald, D. Kloor. *Adenosine metabolism and its effect on methylation potential in cultured cells: methodological considerations*. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand), 52 Suppl:L874–881, 2006.
- [320] M. Hermes, H. Osswald, R. Riehle, C. Piesch, D. Kloor. *S-Adenosylhomocysteine hydrolase overexpression in HEK-293 cells: effect on intracellular adenosine levels, cell viability, and DNA methylation*. Cell. Physiol. Biochem., 22(1-4):223–236, 2008.
- [321] M. I. Jackson, J. Cao, H. Zeng, E. Uthus, G. F. Combs. *S-adenosylmethionine-dependent protein methylation is required for expression of selenoprotein P*

- and gluconeogenic enzymes in HepG2 human hepatocytes.* J. Biol. Chem., 287(43):36455–36464, Okt 2012.
- [322] S. DebRoy, I. I. Kramarenko, S. Ghose, N. V. Oleinik, S. A. Krupenko, N. I. Krupenko. *A novel tumor suppressor function of glycine N-methyltransferase is independent of its catalytic activity but requires nuclear localization.* PLoS ONE, 8(7):e70062, 2013.
- [323] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 239(4839):487–491, Jan 1988.
- [324] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson. *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology (N.Y.), 11(9):1026–1030, Sep 1993.
- [325] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen, P. Nyren. *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release.* Anal. Biochem., 242(1):84–89, Nov 1996.
- [326] J. G. Schaart, L. Mehli, H. J. Schouten. *Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using Pyrosequencing.* Plant J., 41(3):493–500, Feb 2005.

Danksagung

Lebenslauf

Antje Irina Fitzner

Geboren am: 02.04.1985

Geburtsort: Holzminden/Niedersachsen

Staatsangehörigkeit: deutsch

- | | |
|---------------------|--|
| 07/2011 bis 02/2015 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Mainz |
| 10/2008 bis 03/2011 | Studium der Molekular- und Zellbiologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen (Master) |
| 04/2005 bis 09/2008 | Studium der Molekularbiologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Bachelor) |
| 09/1995 bis 07/2004 | Robert-Bosch-Gymnasium Wendlingen (Abitur) |