

**Gametische Prägung und Neurogenese:
Analyse der parental geprägten
Snurf/Snrpn-Region im Menschen und in
embryonalen Stammzellen der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Axel Schumacher
aus Kreuztal-Kredenbach

Köln, 2002

**Gametische Prägung und Neurogenese:
Analyse der parental geprägten
Snurf/Snrpn-Region im Menschen und in
embryonalen Stammzellen der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Axel Schumacher
aus Kreuztal-Kredenbach

Köln, 2002

Druck: Copy Team GmbH, Köln

Berichtersteller: Prof. Dr. Walter Doerfler
Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 05.Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	<i>Neurogenese embryonaler Stammzellen</i>	1
1.1.1	Embryonale Stammzellen.....	2
1.1.2	Neuronale Differenzierung von ES-Zellen.....	3
1.2	<i>Genomic Imprinting</i>	5
1.2.1	DNA-Methylierung in Vertebraten.....	5
1.2.2	Imprinting Definition.....	8
1.2.3	Gametische Prägung in Säugetieren.....	9
1.2.4	DNA-Methylierung und Gametische Prägung.....	10
1.2.5	Chromatin- und Domänen-Effekte bei der gametischen Prägung.....	11
1.2.6	Gametische Prägung in Tumoren und Wachstumsstörungen.....	12
1.2.7	Gametische Prägung und das Prader-Willi Syndrom.....	13
1.2.8	Gametische Prägung und das Angelman " <i>happy puppet</i> " Syndrom.....	16
1.2.9	Gametische Prägung in embryonalen Stammzellen.....	18
1.2.10	Imprinting-Theorie.....	19
1.3	<i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	20
2	<i>Material</i>	23
2.1	<i>Chemikalien</i>	23
2.2	<i>Radiochemikalien</i>	26
2.3	<i>Kits</i>	26
2.4	<i>Enzyme</i>	26
2.4.1	Restriktionsendonukleasen.....	26
2.4.2	Sonstige Enzyme.....	27
2.5	<i>Puffer und Lösungen</i>	27
2.6	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	30
2.7	<i>Plasmide und Vektoren</i>	32
2.8	<i>Mäuse</i>	32
2.9	<i>Computer-Software</i>	33
2.10	<i>Bakterien</i>	33
2.11	<i>ES-Zellen</i>	33

3	Methoden	35
3.1	ES-Zellkultur	35
3.1.1	Kultivierung der ES-Zellen.....	35
3.1.2	ES-Zell Differenzierung.....	36
3.1.3	Aufarbeitung embryonaler Feederzellen.....	38
3.1.4	Mitomycin C Behandlung der Feederzellen.....	39
3.1.5	LIF Produktion.....	40
3.1.6	Cresyl Violet Färbung.....	40
3.1.7	DNA-Extraktion aus Blut.....	41
3.1.8	DNA-Extraktion aus ES-Zellen.....	41
3.1.9	Ernte und Vermehrung einzelner ES-Zell Klone.....	42
3.1.10	Reverse Transcriptase (RT)-PCR Analyse.....	42
3.1.11	Immunochemische Markierung differenzierter ES Zellen.....	46
3.2	Bisulfit-Sequenzierung	46
3.2.1	Grundlagen.....	46
3.2.2	Durchführung.....	49
3.2.2.1	Wahl der Primer-Sequenzen.....	49
3.2.2.2	Bisulfit-Behandlung.....	50
3.2.2.3	Präparation der Bisulfit-Lösung.....	52
3.2.2.4	Desulphonierung.....	52
3.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	52
3.2.2.6	Klonierung der PCR-Produkte.....	54
3.2.2.7	Transformation (nach Hanahan, 1983).....	55
3.2.3	Selektion der ein Amplifikations-Fragment enthaltenden Klone	56
3.2.3.1	Aufbewahrung der Bakterien.....	57
3.2.3.2	Plasmid-Lysis-Test.....	58
3.2.3.3	Plasmid-Schnellpräparation durch Kochlyse.....	58
3.2.3.4	Reinigung kleiner Plasmidmengen zur Sequenzierung.....	59
3.2.3.5	Restriktionsanalyse der Plasmide.....	60
3.2.3.6	Sequenzierung der Amplifizierungsprodukte.....	60
3.2.3.7	In vitro – Methylierung von Plasmid-DNA.....	61
3.3	Isolierung der Maus-DNA aus Schwanzspitzen	61
3.4	Isolierung von Maus-DNA aus Organen (nach Gross-Bellard, 1973)	62

3.5	<i>Aufarbeitung und Restriktionsanalyse der Maus-DNA</i>	63
3.5.1	Restriktionsspaltung genomischer DNA.....	63
3.5.2	Ethanolpräzipitation.....	63
3.5.3	Agarose-Gelelektrophorese (nach McDonell <i>et al.</i> , 1977).....	64
3.6	<i>DNA-Transfer auf Nylonmembranen und Hybridisierung der DNA</i>	64
3.6.1	Transfer der genomischen DNA auf Nylonmembranen (Southern, 1975; Chomczynski, 1992; Koetsier <i>et al.</i> , 1993).....	64
3.6.2	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (nach Feinberg & Vogelstein, 1983).....	65
3.6.3	Szintillations-Spektrometrie (nach Haberer, 1966)	66
3.6.4	Hybridisierung von membrangebundener DNA mit $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Sonden (nach Wahl <i>et al.</i> , 1979).....	66
3.7	<i>Autoradiographie</i>	67
3.8	<i>Auswertung mittels eines Phospho-Imagers</i>	68
3.9	<i>Computer-gestützte Auswertung der Hybridisierungssignale</i>	68
4	<i>Ergebnisse</i>	71
4.1	<i>Staurosporin ist ein Aktivator der neuronalen Differenzierung in ES-Zellen der Maus</i>	71
4.1.1	Apoptotische Wirkung von STS in ES-Zellen.....	73
4.1.2	Analyse kritischer Parameter in der durch STS induzierten Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	78
4.1.2.1	Embryonale Zellaggregate.....	78
4.1.2.2	Einfluß der Serum Konzentration auf die EB-Aggregation.....	81
4.1.2.3	Einfluss von Medien-Zusätzen auf die Neurogenese.....	82
4.1.2.4	Gerichtete Induktion der neuronalen Entwicklung.....	87
4.1.3	Immunochemische Charakterisierung neuronaler Zellen.....	90
4.1.3.1	Neurofilamente- und Mikrotubulin-assoziierte Proteine Tau und MAP2.....	91
4.1.3.2	Expression des Kohlenhydrat Epitops HNK-1.....	95
4.1.3.3	Expression des gliaspezifischen Filaments GFAP.....	96
4.1.4	Charakterisierung neuronaler Zellen durch RT-PCR.....	99
4.1.5	STS induziert EGF/FGF-reaktive neuronale Vorläuferzellen und Neurosphären.....	101
4.1.6	RA inhibiert die in vitro Kardiogenese und die durch STS induzierte Differenzierung.....	105

4.2	Multivariate Charakterisierung der <i>SNURF/SNRPN</i> "Imprinting"-Region	110
4.2.1	Untersuchung des "Imprinting", Struktur und Evolution des "AS-SRO".	110
4.2.1.1	Methylierungsmuster gesunder Probanden in der AS-SRO-Region	112
4.2.1.2	Ergebnis einer gesunden Probandin in der AS-SRO-Region	113
4.2.1.3	Ergebnis eines gesunden Probanden in der AS-SRO-Region	115
4.2.1.4	Ergebnis des Prader-Willi Patienten in der AS-SRO-Region	115
4.2.1.5	Ergebnis des Angelman-Patienten in der AS-SRO-Region	117
4.2.1.6	Der CpG-Polymorphismus in der AS-SRO-Region	119
4.2.1.7	Evolutiver Ursprung des AS-SRO	120
4.2.1.8	Strukturanalyse des AS-SRO und homologe Motive in Maus	122
4.2.2	Untersuchung der repetitiven Sequenzen MER47A und L1ME in Mensch	127
4.2.2.1	Ergebnis einer gesunden Probandin	129
4.2.2.2	Ergebnis eines gesunden Probanden	131
4.2.2.3	Ergebnis eines Patienten mit Prader-Willi Syndrom	132
4.2.2.4	Ergebnis eines Patienten mit Angelman Syndrom	133
4.2.2.5	Vergleichende Statistik zur LINE-Region	134
4.2.3	Analyse von in vitro prämethylierter Plasmid-DNA	136
4.2.4	Analyse der neuronal-spezifischen "Imprinting"-Region auf Chromosom 7C in ES-Zellen der Maus	137
4.2.4.1	Analyse der <i>Snurf/Snrpn</i> -Region	137
4.2.4.2	Analyse der <i>Ndn</i> -Region	143
4.2.4.3	Analyse der <i>Magel2</i> -Region	146
4.2.4.4	Analyse der <i>MKRN3/Zfp127AS</i> -Region	147
4.2.4.5	Analyse der <i>GABA_A</i> -Rezeptor-Region centromerisch zum IC	150
4.2.4.6	Dynamik der gametischen Prägung in ES-Zellen während Staurosporin-induzierter neuronaler Entwicklung	151
4.2.5	Stabilität der gametischen Prägung auf Mauschromosom 7C	154
4.2.5.1	Stabilität des "Imprints" mit fortschreitenden ES-Zell Passagen	154
4.2.5.2	"Imprint"-Stabilität in SV40- und Adeno-transfizierten ES-Zelllinien	155
4.2.5.3	Methylierung der gametisch geprägten Region in Tumorgewebe	156
4.2.5.4	Klonale Stabilität der "Imprinting"-Muster in ES-Zellklonen	157
4.2.6	Expression der gametisch geprägten <i>Snurf/Snrpn</i> -Transkripte in ES-Zellen und ES-Zell abgeleiteten Neuronen	159
4.3	Evolution der "Imprinting"-Region	163

5	<i>Diskussion</i>	167
5.1	<i>Staurosporin als Aktivator der neuronalen Differenzierung</i>	167
5.1.1	Phänotypische Auswirkung der Staurosporin-Induktion.....	167
5.1.2	Mechanismen der Staurosporin-Induktion.....	169
5.2	<i>Gametische Prägung in embryonalen Stammzellen</i>	177
5.2.1	Das primäre Methylierungs-"Imprint" der <i>Snrpn</i> -Region wandert nach der Implantation in benachbarte Chromosomenbereiche.....	177
5.2.3	Expression und Methylierung der gametisch geprägten Gene während der Neurogenese.....	182
5.2.4	Epigenetische Stabilität der gametischen Prägung.....	185
5.3	<i>Theoretische Aspekte der epigenetischen Mechanismen in der Snurf/Snrpn-Region</i>	189
5.3.1	Epigenetik der IC-Elemente AS-SRO und PWS-SRO im Kontext der Imprinting-Theorie.....	189
5.3.2	Gametische Prägung im Säugetiergehirn und Evolution der <i>Snurf/Snrpn</i> -"Imprinting" Region.....	195
5.3.2.1	Der Ursprung des "Imprinting".....	195
5.3.2.2	Gametische Prägung im Gehirn.....	196
5.3.2.3	Defekte in der neuronalen Entwicklung in PWS- und AS-Patienten.....	199
5.3.2.4	Evolute Dynamik der IC-Region und das Modell der "Geschlechtsspezifischen Verhaltens-Selektion durch gametische Prägung".....	200
6.1	<i>Zusammenfassung (deutsch)</i>	207
6.2	<i>Abstract (english)</i>	209
7	<i>Literatur</i>	211
8	<i>Erklärung</i>	230
9	<i>Danksagung</i>	232
10	<i>Lebenslauf</i>	233

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	PWS-SRO	PWS - smallest region of deletion overlap
AS	Angelman Syndrom	RNA	Ribonukleinsäure
AS-SRO	Angelman-Synrome smallest region of deletion overlap	RNase A	Ribonuklease A
Bp	Basenpaare	SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
ca.	Circa	s.o.	siehe oben
Ci	Curie	s.u.	siehe unten
CTP	Cytosintriphosphat	Tab.	Tabelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TTP	Thymidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	UV	Ultraviolett
E.coli	Escherichia coli	V	Volt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	v/v	<i>volume / volume</i> , ml Volumen pro 100 ml Gesamtvolumen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen	w/v	<i>weight/volume</i> , [g] Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
et al.	und andere	U	Einheiten/Units
FCS	Fötales Kälberserum	u.a.	unter anderem
GTP	Guanosintriphosphat	U.p.M.	Umdrehungen pro Minute
kBp	Kilobasenpaare		
LB	Luria-Bertani		
M	Molar		
min	Minute		
mRNA	Boten-RNA/messenger-RNA		
MTase	DNA-Methyltransferase		
OD	Optische Dichte		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PBS	Phosphatgepufferte Saline		

Vorwort

The daily labwork:



Sketch: Oleg Yudin '2001
Color: Axel Schumacher

*"I don't want to achieve immortality through my work,
I want to achieve it through not dying."*

- Woody Allen -

1 Einleitung

Obwohl embryonale Stammzellen (ES) seit Beginn der 80er Jahre als Versuchsmodelle intensiv Verwendung finden, ist über die genomische Prägung (*Genomic Imprinting*) in diesen Zellen sehr wenig bekannt. Kürzlich zeigte eine Studie an klonierten Mäusen, daß inkorrekt geprägte Gene wahrscheinlich eine entscheidende Rolle an der Fehlbildung von Klonen zukommt (Humpherys *et al.*, 2001). Kern-Transfer Experimente wurden schon mehrfach angewandt, um lebende Klone verschiedener Spezies wie Schaf, Ziege, Schwein, Rind und Maus zu erzeugen; jedoch sterben in der Regel die Mehrzahl der Embryonen frühzeitig ab. Selbst jene Klone, welche die Geburt überleben, leiden häufig an respiratorischen Problemen, Herzfehlern und besitzen vergrößerte Plazenten und Geburtsgewichte (Wakayama & Yanagimachi, 1999; Ono *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß eine abnormale Regulierung von gametisch geprägten Genen sich direkt auf das fötale Wachstum auswirkt und Abnormalitäten in geklonten Nachkommen bewirken kann (Übersicht in Reik & Walter, 2001). Offensichtlich überleben jedoch mehr Klone, wenn sie nicht von somatischen Zellkernen, sondern von ES Zellkernen abstammen. Diese Resultate zeigen, daß ES Zell Nuklei offenbar weniger reprogrammiert werden müssen als die Zellkerne von vollständig differenzierten somatischen Zellen (Rideout *et al.*, 2000). Es erscheint also notwendig mehr über die epigenetischen Regulationsmechanismen im frühen Embryo und ES-Zellen zu erfahren. Diese Arbeit ist somit ein Schritt, die zu einem besseren Verständnis dieser Mechanismen dienen soll.

1.1 Neurogenese embryonaler Stammzellen

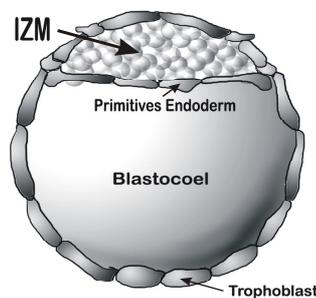
Bisherige Studien zur genomischen Prägung von ES-Zellen fokussierten vornehmlich auf die *H19/Igf2*-Region im Maus-Genom. Die homologe Region im menschlichen Genom wird mit dem Beckwith/Wiedemann Syndrom in Verbindung gebracht. Der zweite bekannte große "imprinted" Komplex in Maus und Mensch, welcher sich um das *Snrpn*-Gen auf Maus Chromosom 7C (Mensch: 15q11-q13) herum erstreckt, korreliert ursächlich mit den neurogenetischen Prader-Willi- und Angelman-Syndromen (Übersicht in Schumacher, 2001). Bis heute liegen jedoch kaum Kenntnisse vor, wie das *Imprint* diese Region in ihrer frühen embryonalen Entwicklung verändert. Diese Arbeit konzentriert sich daher im Wesentlichen auf die Untersuchung gameten-spezifischer Methylierung der PWS/AS-Region in Mensch und in ES-Zellen der Maus sowie aus diesen ES-Zellen entwickelter neuronaler Zellen.

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen lassen sich aus der inneren Zellmasse (IZM) von Preimplantations-Blastozysten gewinnen (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Blastozysten entsprechen dem 128-Zell-Stadium eines frühen Embryos (Abb. 1) und bestehen aus einer internen Zellanhäufung, der inneren Zellmasse mit dem anliegenden primitiven Endoderm und der äußeren Zellschicht, dem Trophoblast, welcher zur Implantation in der Uteruswand dient. Das primitive Endoderm entwickelt sich im Folgenden zum parietalen und visceralen Dottersack, welcher den wachsenden Embryo umgibt. Zeitgleich entwickelt sich aus der IZM der vollständige Embryo mit seinen Membranen (z.B. Amnion).

Abb.1: Organisation der frühen Blastozyste.

Die innere Zellmasse (IZM) befindet sich an einer Seite des Flüssigkeitgefüllten Blastocoels. Primitive Endodermzellen formen sich an der Basis der IZM, umgeben von einer Schicht aus Trophoblastzellen.



Nach der Übertragung von Blastozysten in eine Kulturschale verliert die äußere Schicht schnell an Stabilität und kollabiert. Undifferenzierte Zellen aus dem IZM formen daraufhin spontan kleine Aggregate, die weiter in einem undifferenzierten Zustand kultiviert werden können. Nach Reintegration in einen frühen Mausembryo können sich diese embryonalen Stammzellen (ES) in nahezu alle Zelltypen inklusive Keimbahngewebe entwickeln.

Im Gegensatz zu adulten Stammzellen sind ES-Zellen wahrscheinlich nicht auf spezifische Zelltypen determiniert. Sie werden häufig als totipotent charakterisiert, implizierend das diese Zellen jedes mögliche Gewebe bilden können. Vorteilhafter scheint es jedoch, die ES-Zellen als *pluripotent* zu beschreiben (aus dem griechischen für "viele Möglichkeiten"), da bisher keine Entwicklung zu Placenta-Gewebe nachgewiesen werden konnte. *In utero* verlieren die ES-Zellen ihre Totipotenz etwa zur Zeit der Implantation. Die wenigen Zellen des IZM werden nach der Implantation auch als Epiblast bezeichnet. Einige Stunden nach der Einnistung in den Uterus entwickelt der Epiblast eine Epithelschicht, von der man annimmt, daß sie die Fähigkeit der Epiblast-Zellen inhibiert, sich in alle Zelltypen zu differenzieren. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, pluripotente ES-Zellen nach der Einnistung zu gewinnen.

1.1.2 Neuronale Differenzierung von ES-Zellen

Neuronale Zellen können aus verschiedenen Quellen gewonnen werden, so auch aus frühen Embryonen. Während fötale Zellen seit längerer Zeit verwendet werden, um neuronale Vorläuferzellen zu isolieren (Bjorklund, 1999), wurde bis in die neunziger Jahre voll differenziertes, adultes Gewebe als nicht-erneuerbar betrachtet. Die Entdeckung von multipotenten neuronalen Vorläuferzellen in erwachsenem Gehirn änderte dieses Paradigma vollständig. Adulte neurale Stammzellen wurden erstmals aus der subventrikularen Zone (SVZ) des Vorderhirns gewonnen (Reynolds und Weiss, 1992). Später gelang es auch neurale Vorläufer aus dem Stammhirn, Septum, Striatum, Kortex und optischen Nerv zu isolieren (Weiss *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1999).

Die meisten neuronalen *in vitro* Studien nützen jedoch neurale Vorläuferzellen, die aus Neuroblastoma und anderen Tumorgeweben isoliert wurden (Bain & Gottlieb, 1998). Eines der nützlichsten Modell-Systeme der *in vitro* Neural-Differenzierung ist die P19 Karzinom-Zelllinie, welche aus einem künstlich erzeugten Maus-Tumor generiert wurde (McBurney & Rogers, 1982). Es wurden mehrere Protokolle entwickelt, in solchen Tumor-Zelllinien eine neurale Differenzierung zu induzieren (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982; Bain *et al.* 1994). Neuronale Zellen, die sich aus der P19 Zelllinie ableiten, sind stabil post-mitotisch und formen Axone, Dendriten, funktionale Synapsen und exprimieren verschiedene neuronale Gene, Neurotransmitter, Rezeptoren als auch charakteristische Zell-Oberflächen-Antigene (MacPherson *et al.*, 1997). Ein großer Nachteil der Neuroblastoma-Zelllinien liegt jedoch darin begründet, daß diese Zellen nicht die frühe neurale Entwicklung präsentieren und für Transplantations-Studien ungeeignet sind. Werden Neuronen aus diesen Zelllinien in einen Wirt injiziert, so zeigen sich viele Zellen als karzinogen und entwickeln Teratome und Teratokarzinome. Embryonale Stammzellen bieten eine mögliche Alternative, um diese Probleme zu umgehen. ES-Zellen sind leicht transformierbar und bieten ein ideales Modell, neurale Differenzierung *in vitro* zu studieren.

Ein Schlüssel-Schritt, um in ES-Zellen eine Differenzierung zu induzieren, ist der Entzug von Faktoren, wie z.B. der *Leukaemia Inhibitory Factor*, LIF, welcher ES-Zellen in einem undifferenzierten Zustand arretiert. LIF wird an der Oberfläche von Fibroblastenzellen exprimiert, welche in der Regel als Bindungspartner für ES-Zellen dienen. Dieser Faktor und andere verwandte Cytokine wirken auf die zelluläre Transkriptions-Maschinerie durch Bindung an das Glycoprotein gp130, welches seinerseits den Transkriptions-Aktivator und Signal Vermittler STAT3 aktiviert. Zusätzlich zu der erhöhten Aktivität von STAT3 benötigen ES-Zellen die Expression des

Transkriptionsfaktors Oct-4, um eine pluripotente Charakteristik zu behalten (Übersicht in Duval *et al.*, 2000).

Der zweite essentielle Schritt um ES-Zellen effektiv zu differenzieren, besteht in der Formung von Zellaggregaten (Strübing *et al.*, 1995; Bain *et al.*, 1995). Es erwies sich als vorteilhaft die ES-Zellen in hängenden Tropfen zu kultivieren, da so Zell-Zell-Kontakte forciert und die Zellanzahl in einem Aggregat kontrolliert werden können. Ein auf dieser Technik basierendes Protokoll wurde auch für die hier vorgelegte Arbeit verwendet. Eine interessante Eigenschaft der Zellaggregation besteht zudem darin, daß die Zellen durch diese Methode vor apoptotischer Wirkung von Substanzen wie Retinsäure (*all-trans retinoic acid*, RA), die eine Differenzierung induzieren sollen, geschützt werden (Robertson, 1987). Nach einigen Tagen *in vitro* ähneln die Zellaggregate frühen Embryonen, da sie Strukturen, entsprechend dem Endoderm, Mesoderm und Ectoderm umgeben von einer Dottersack ähnlichen Schicht ausbilden. Daher werden diese Aggregate auch als *embryoid bodies* (EBs) bezeichnet.

ES-Zellen reagieren auf externe Stimuli (z.B. RA oder DMSO) ähnlich wie Neuroblastoma-Zelllinien. Diese Beobachtung, daß ES-Zellen viele wichtige Eigenschaften mit Zelllinien wie P19 teilen, führte zu der Entwicklung eines Differenzierungs-Protokolls, welches die Eigenschaft von RA nutzt, eine neuronale Differenzierung in ES-Zellen zu induzieren (Bain *et al.*, 1995). Werden mit 1 μ M RA behandelte "*embryoid bodies*" (EBs) auf adhäsive Zellkultur-Platten ausplattiert, so entwickeln sich aus bis zu 50% der EBs Zellen mit neuronaler oder glialer Morphologie. Andere Studien zeigten, daß neben *all-trans* RA auch *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) und die Kombination aus Insulin, Transferrin, Selen und Fibronectin (ITSFn Medium) eine neuronale Differenzierung induzieren kann (Okabe *et al.*, 1996; Brüstle *et al.*, 1997).

Ein Nachteil all dieser Methoden ist jedoch die ungenügende Effizienz der neuronalen Differenzierung im Bezug auf quantitative Analysen der Genexpression und Transplantationsstudien. Untersucht man die Transition von undifferenzierten Stammzellen über neurale Vorläufer zu Neuronen oder Gliazellen, so ist eine vollständige Differenzierung unabdingbar. Aus diesem Grund wurde eine neue Methode entwickelt, um ES-Zellen mit hoher Effizienz in neuronale Zellen zu differenzieren (diese Arbeit; Schumacher *et al.*, 2002).

1.2 Genomic Imprinting

1.2.1 DNA-Methylierung in Vertebraten

Ein wesentlicher Bestandteil der epigenetischen Regulierung im Säugetiergenom ist die DNA-Methylierung. Die DNA-Base Cytosin wird bei kovalenter Modifikation am Kohlenstoffatom fünf (C-5) des Pyrimidinringes durch eine Methyltransferase so verändert, daß die resultierende 5-Methylcytosin-Formation ganz besondere, für diese Base einzigartige Eigenschaften erhält. Im Gegensatz zu den in der Genetik häufig verwendeten Organismen *Drosophila*, *Saccharomyces*, *Caenorhabditis* ist die enzymatische Cytosin-Konversion zur Zeit die einzige bekannte epigenetische DNA-Modifikation in Vertebraten. Es wurde bewiesen, daß diese Cytosin-Modifikation eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung von Säugetieren spielt (Bird, 1992; Li *et al.*, 1992). Schon während der frühen Embryonalentwicklung eines Säugetiers werden Gameten-spezifische Methylierungsmuster auf bisher kaum verstandenen Mechanismen zu Zell-spezifischen, somatischen Methylierungsmustern (Razin & Cedar, 1993). Die Embryonalentwicklung geht während des 4- und 64-Zellstadiums mit einem stark reduzierten Methylierungsgrad einher. Etwa zur Zeit der Implantation wird das Genom dann, durch intensive *de novo* Methylierung remethyliert. Während der weiteren Entwicklung des Embryos können bestimmte Bereiche der DNA einer weiteren, gewebespezifischen Veränderung des Methylierungsmusters unterliegen (Bestor & Tycko, 1996; Turker & Bestor, 1997).

Die Cytosin-Methylierung findet vorwiegend symmetrisch an beiden DNA-Strängen des 5'-CpG-3'-Palindroms statt (Gruenbaum *et al.*, 1982; Bestor & Ingram, 1983; Simon *et al.*, 1983). Es wurde jedoch auch festgestellt, daß Pflanzen Cytosin-Basen in der Sequenz 5'-CpNpG-3' methylieren und Säugetierzellen die Fähigkeit besitzen, 5'-CpNpG-3'-Triplets in transfizierten Plasmiden zu modifizieren, wobei N jede der vier natürlich vorkommenden Hauptbasen sein kann (Gruenbaum *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1995). Die meisten Daten über die Distribution methylierter Cytosine kamen fast ausschließlich von Studien mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen (Bird & Southern, 1978) oder durch genomische Sequenzierung, einer Methode, die auch die Methylierung jeder einzelnen Cytosin-Base erfassen kann (Church & Gilbert, 1984; Saluz & Jost, 1989; Pfeifer *et al.*, 1989). Beide Methoden waren jedoch nicht ausreichend sensitiv, um geringe Methylierungs-Unterschiede zu quantifizieren. Mit der Entwicklung der genomischen Sequenzierung nach der Bisulfit-Methode (Frommer *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1994), die auch in dieser Arbeit angewendet wurde, konnten auch einzelne Methyl-Cytosine sensitiv erfaßt werden, die nicht Teil eines CpG-

Dinukleotids sind. Solche ungewöhnlichen Methylierungsmuster fand man unter anderem in Pilzen (Toth *et al.*, 1990; Selker *et al.*, 1993; Goyan *et al.*, 1994), Pflanzen (Meyer *et al.*, 1994) und Säugern (Tasheva & Roufa, 1994).

Das Auftreten des 5-mCytosins in CpG-Dinukleotiden bewirkte im Laufe der Vertebraten-Evolution eine etwa fünffache Verringerung der CpG-Sequenz im Genom (Subak-Sharpe *et al.*, 1964; Russel *et al.*, 1976; Schorderet & Gartler, 1992). Obwohl es gegenüber anderen Sequenzen unterrepräsentiert ist, entstehen dennoch etwa ein Drittel aller Punktmutationen in Krebs- und Keimbahnzellen an CpG-Dinukleotiden (Koeberl *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1992; Spruck *et al.*, 1993). Die Methylierung spielt möglicherweise eine Rolle bei der C → T respektive auf dem Gegenstrang G → A Transition (Rideout *et al.*, 1990; Sved & Bird, 1990). Die hydrolytische Desaminierung von Cytosin führt zu Uracil, welches relativ effizient durch die Uracil-Glycosylase erkannt und entfernt werden kann (Lindahl, 1982).

Die Rate der Desaminierung von 5m-Cytosin ist in doppelsträngiger DNA jedoch 2- bis 3-mal höher als die von Cytosin (Shen *et al.*, 1994) und führt zur Bildung von Thymin. Die resultierende G:T Fehlpaarung ist schwieriger zu reparieren als die G:U Fehlpaarung (Coulondre *et al.*, 1978). Des Weiteren zeigen Experimente an den *HpaII*- und *EcoRII*-Methyltransferasen, daß diese Enzyme eine der zur hydrolytischen Desaminierung bis zu 10.000-fachen C → U Transition katalysieren und anschließend eine Methylgruppe auf Uracil übertragen können und so Thymin erzeugen (Wyszynski *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995).

Da das zelluläre Reparatursystem eine Effizienz von nur etwa 90% besitzt (Brown & Jiricny, 1987; Wiebauer & Jiricny, 1990), kam es im Laufe der evolutiven Säugetier-Entwicklung somit zu einem bedeutenden Verlust an CpG-Dinukleotiden. Dennoch finden sich im Säugetiergenom Bereiche, die eine erhöhte GC-Dichte (~60-70 %) aufweisen und besonders reich an CpG-Segmenten sind (>30 CpG/500 nt). Solche in "CpG-reichen" Regionen liegende CpG-Dinukleotide sind gegenüber CpG-Motiven in "CpG-armen" Regionen mit einem GC-Gehalt von ~40 % seltener Ziel einer Methylierung. Sie besitzen zudem nur eine CpG-Dichte von einem Viertel der abhängig von der Basenkomposition erwarteten Frequenz (Matsuo *et al.*, 1993; Antequera & Bird, 1993). Diese ursprünglich als "*HpaII* tiny fragment (HTF) islands" definierten Segmente werden auch als "*CpG-Inseln*" bezeichnet, obwohl keine einheitlichen, auf alle diese Regionen zutreffende Attribute existieren. CpG-reiche Bereiche finden sich häufig 5'- assoziiert mit Promotern von "*housekeeping*"- und von gewebespezifisch exprimierten Genen (Larsen *et al.*, 1992) und reichen meist bis zum transkribierten Bereich des assoziierten Gens. Typischerweise besitzen sie eine Länge von 0.5 bis 2

kBb (Kilo-Basenpaare) und entsprechen somit in ihrer Gesamtheit annäherungsweise 1-2 % des menschlichen Genoms (Bird, 1986). CpG-Gruppierungen schwanken jedoch zwischen verschiedenen Arten; Fische besitzen sogenannte "GC-arme CpG-Inseln" mit niedrigem GC-Gehalt (Crosset *et al.*, 1991), aber auch die einzelnen Spezies der Säugetiere zeigen Unterschiede. Ein paarweiser Vergleich 23 orthologer Gene in Mensch und Maus zeigte, daß Mäuse fast immer geringer ausgeprägte oder gar keine CpG-reichen Regionen besaßen (Aissani & Bernardi, 1991^{a,b}; Matsuo *et al.*, 1993; Imoto *et al.*, 1994). Weitere Eigenschaften, die für die Funktion CpG-reicher Regionen notwendig sein könnten, sind hypoacetyliertes Chromatin, das Fehlen von Histon H1 und Nucleosomen (Tazi & Bird, 1990) sowie ihre vermehrte Lokalisation in R-Banden und eine ihrer Untergruppen, den T-Banden (Holmquist, 1992; Craig & Bickmore, 1994).

Das Interesse an der DNA-Methylierung wuchs mit der Erkenntnis, daß der Informationsgehalt der DNA durch diese Modifikation erhöht wird und vielerlei Funktionen entfalten kann. So verbindet man die veränderte Genexpression einiger Erbkrankheiten (Bates & Lehrach, 1994; Schuffenhauer *et al.*, 1995) und bei der Krebsentstehung mit der DNA-Methylierung (Baylin *et al.*, 1991). Einige der assoziierten Gene sind Ziel einer gametischen Prägung ("genomic Imprinting"; Hall, 1990; Efstradiadis, 1994) oder X-Inaktivierung (Migeon, 1994; Details siehe Diskussionsteil) und befinden sich häufig in einem reprimiertem Status, charakterisiert durch eine Methylierung der Promotor-Region (Bestor, 1995; Bird, 1995). Die codierenden Regionen vieler Gene sind unabhängig von ihrer Expression moderat bis hoch methyliert, ähnlich wie bei repetitiven Sequenzen, so zum Beispiel auch im Falle des Alu-Elements der Primaten (Schmid & Jelinek, 1982). Alu-Elemente sind CpG-reich und gewöhnlich hoch methyliert in weiblichen Gameten (Rubin *et al.*, 1994) und somatischen Geweben (Hellmann-Blumberg, 1993). Die Funktion der Methylierung wird dabei mit der gehemmten Transkription der Alu-Elemente in Verbindung gebracht (Kochanek *et al.*, 1993; Liu & Schmid, 1993). Weitere hypothetische Funktionen der DNA-Methylierung sind: Regulierung der Genexpression während der Embryonalentwicklung (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1995; Li *et al.*, 1992), Kontrolle der DNA-Replikation (Taylor, 1984; Kawame *et al.*, 1995), DNA-Reparatur (Clearer, 1995) und ein Schutzmechanismus des Säugergenoms gegen parasitäre Sequenzen (Doerfler, 1981; Bestor, 1990). Möglicherweise wirkte dieser Mechanismus durch Hemmung der Transkription ursprünglich als Verteidigung gegen exogene, virale Sequenzen (Doerfler, 1991). Dieser Abwehrmechanismus konnte sich eventuell weiter zur Repression repetitiver Sequenzen und Retrotransposons adaptieren, mit einer

weiteren Entwicklung bis zur Kontrolle der Genexpression (Übersicht bei Doerfler, 1983, 1989, 1993, 1995) und eventuell der gametischen Prägung (Barlow, 1993).

1.2.2 Imprinting Definition

"*Genomic Imprinting*" resultiert in der bevorzugten Expression eines Allels, abhängig davon, von welchem Elternteil das Allel stammt. Es wird mit einigen Krankheitssyndromen assoziiert, wie z.B. Prader-Labhardt-Willi-, Beckwith-Wiedeman- oder Angelman-Syndrom. Innerhalb der letzten Jahre wuchs das Interesse an dem *Imprinting*-Phänomen, als erkannt wurde, daß nicht alle Aspekte der Vererbung mit den Mendelschen Gesetzen adäquat erklärt werden konnten. "*Genomic Imprinting*" ist ein reversibler Prozeß in diploiden Säugetierzellen, bei dem gameten-spezifische Modifikationen in der Parentalgeneration zu funktionalen Unterschieden zwischen dem maternalen und dem paternalen Genom in den Nachfahren führen können. Das transkriptionell inaktive Allel wird gewöhnlich als das funktionell vom *Imprinting* betroffene Allel bezeichnet, obwohl nicht auszuschließen ist, daß in manchen Fällen das primäre *Imprint* von dem aktiven Allel getragen wird.

Weitere häufig verwendete Synonyme sind: *gametic*-, *parental*-, *chromosomal*-, *gene*-, *genetic-Imprinting* oder nur einfach *Imprinting*; ein auch in deutschsprachigen, populärwissenschaftlichen Artikeln (Miketta, 1998) in seiner englischen Form verwandter Begriff. Zur Zeit existiert noch kein gebräuchlicher deutschsprachiger Ausdruck, sicherlich weil Verwechslungen mit ähnlichen Begriffen, wie Verhaltens-, hormonelle- und molekulare- Prägung leicht möglich sind. Um Mißverständnisse mit anderen Ausdrücken zu vermeiden, schlage ich vor, zukünftig für deutschsprachige Abhandlungen "*Gametische Prägung*" als Bezeichnung zu verwenden. Um eine genaue Definition des *Imprinting*-Phänomens zu gewährleisten, ist es zudem unerlässlich, daß eine Unterscheidung eines gametisch geprägtem Allels mit anderen mono-allelisch exprimierten Genen gegeben ist. Für einige Zellen des Immunsystems und olfaktorischer Neuronen ist die mono-allelische Expression einiger Gene (Immunoglobuline, T-Zell-Rezeptoren, NK-Zell-Rezeptoren, Interleukin-2, olfaktorische Rezeptoren) ein notwendiger Mechanismus, um nur eine bestimmte Rezeptor-Art auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dieses Phänomen wird im Gegensatz zur gametischen Prägung als "Allel-Ausschluß" (*allelic exclusion*) bezeichnet. Konträr zu dem Mechanismus in gametisch geprägten Genen wird das zu inaktivierende parentale Allel zufallsmäßig ausgewählt.

1.2.3 Gametische Prägung in Säugetieren

Kern-Transfer-Experimente (McGrath & Solter, 1984) und die Untersuchung von Expressionsmustern verschiedener chromosomaler Regionen (Cattanach & Kirk, 1985) zeigen deutlich, daß die väterlich und mütterlich vererbten Gameten funktionell nicht identisch und die Präsenz beider für eine normale Entwicklung eines Säugetierorganismus notwendig sind. Schon die frühe Entwicklung des Maus-Embryos zum Blastocystenstadium benötigt beide Allele. Experimente ausgehend von androgenetischen (zwei paternale Allele) oder gynogenetischen (zwei maternale Allele) Eizellen zeigten, daß alle Embryos mit zunehmender Entwicklung absterben (Surani *et al.*, 1986; Latham & Solter, 1991). Die Entwicklung dieser Embryos weist einige Unterschiede auf. So fällt bei androgenetischen Embryos eine besonders schwache Entwicklung der inneren Zellmasse (IZM) auf, aus der sich später der gesamte Embryo und seine Anhangsorgane wie Nabelblase und Harnsack entwickeln, während die Entwicklung des Trophoblasten (Ernährungsgewebe und spätere Plazenta) phänotypisch normal verläuft. Eine exakt konträre Entwicklung der verschiedenen Zellmassen beobachtet man in gynogenetischen Embryos. Ob und im welchem Umfang schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung gametisch geprägte Gene exprimiert werden, ist aufgrund gegensätzlicher Ergebnisse mehrerer Untersuchungen noch unklar. Das für die frühe embryonale Entwicklung am besten untersuchte Gen, welches offensichtlich einer gametischen Prägung unterliegt, ist das *Igf2-Gen* (*Insulin-like growth factor II*). Es wird außer im *Choroid Plexus* des Gehirns (DeChiara *et al.*, 1991) gewöhnlich nur von dem väterlichen Allel exprimiert. Gen-Expressionsstudien an frühen Blastocystenstadien (Tag 3,5) in Mäusen zeigten keine Expression des *Igf2* (Lee *et al.*, 1990; Latham *et al.*, 1994) oder eine Expression beginnend vom Zeitpunkt des Blastocystenstadiums (Szabó & Mann, 1995^{a,b}). Andere Arbeiten (Rappolee *et al.*, 1992; Lighten *et al.*, 1997) deuten auf eine Expression in Maus und Mensch schon im Prä-Implantations-Embryo (<Tag 4,5) hin. Eine Expression der gametisch geprägten Gene *H19*, *Mash2*, *Xist* und *Igf2r* scheint schon vor der Implantation zu erfolgen, wechselt jedoch zwischen Tag 4,5 und Tag 7 nach der Befruchtung der Eizelle von bi-allelischer zu mono-allelischer Expression (Guillemot *et al.*, 1995; Tremblay *et al.*, 1995; Latham, 1996; Lerchner & Barlow, 1997). Wie diese Regulation funktioniert, ist zur Zeit nicht bekannt; jedoch scheint die Methylierung der DNA eine wichtige Rolle zu spielen (siehe nächster Abschnitt). Auch nach der embryonalen Entwicklung wirkt sich die gametische Prägung im Säugetiergenom aus. Ein Defekt im Imprinting-Prozess kann so zu verschiedenen Mißbildungen und Tumoren (Wilms-Tumor) oder auch Erbkrankheiten wie Prader-Willi- und Angelman-Syndrom führen.

1.2.4 DNA-Methylierung und Gametische Prägung

Welche Faktoren bei der Regulierung des gametischen Prägung eine entscheidende Rolle spielen, ist zur Zeit nicht genau bekannt; indes läßt sich vermuten, daß die DNA-Methylierung eine essentielle Komponente ist. Es ist eine anerkannte Tatsache, daß die beiden gegensätzlichen Gameten DNA-Regionen besitzen, die unterschiedlich methyliert sind (Monk *et al.*, 1987; Sanford *et al.*, 1987; Howlett & Reik, 1991). Zudem kann durch CpG-Methylierung die Transkription beeinflußt werden; sie ist reversibel und bei somatischen Zellteilungen stabil. Es ist dagegen unklar, ob die DNA-Methylierung ein primärer oder sekundärer "Imprinting"-Vorgang ist.

Die Methylierungsmuster im Prä-Implantationsembryo scheinen durch ein Welle genomweiter Demethylierung ausgelöscht zu werden (Frank *et al.*, 1991; Kafri *et al.*, 1992), jedoch ist nicht auszuschließen, daß kleine Bereiche gametenspezifisch methyliert bleiben. Frühe Untersuchungen, über einen potentiellen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und einem funktionalem "Imprint", nutzten methylierungssensitive Restriktionsenzyme, die parentale Allele an RFLPs (*Restriction fragment length polymorphism*) erkennen. So konnte gezeigt werden, daß in Embryos und post-embryonalen Geweben das inaktive Allel, wie in den gametisch geprägten Genen *H19*, *Igf2r*, *SNRPN*, *Xist* und *U2af-bprs* gewöhnlich methyliert ist (Brandeis *et al.*, 1993; Ferguson-Smith *et al.*, 1993; Ariel *et al.*, 1995; Glenn *et al.*, 1996). Man fand jedoch auch ein gametisch geprägtes Gen (*KIP2*), in dem das transkriptionell ruhende Allel keine Hypermethylierung aufweist und mehrere CpG-Dinukleotide über die ganze Region des Gens auf beiden Allelen unmethyliert bleiben (Chung *et al.*, 1996). Eine abweichende Methylierung und damit verbunden eine funktional geänderte gametische Prägung in den parental Genen kann zu verschiedenen Krankheiten wie embryonales Rhabdomyosarkom, Wilms Tumor, Beckwith-Wiedeman-, Prader/Willi- oder Angelman-Syndrom führen (siehe unten).

Eine Korrelation der DNA-Methylierung mit dem Imprinting-Mechanismus zeigt sich dadurch, daß 5-Azacytidin (aza-C), ein kovalenter Inhibitor der DNA-Methyltransferase, in der Lage ist, ein funktionales "Imprint" verändern zu können (Riggs & Jones, 1983). So wurde beobachtet, daß aza-C in verschiedenen Tumorzelllinien die Expression von *H19* und die damit verbundene reziproke Abwärts-Regulation der *Igf2*-mRNA induzieren kann. Die Tatsache, daß allelspezifische DNA-Methylierung sich auf ein Imprint auswirkt, kann jedoch nicht zeigen, daß sie auch für die Etablierung einer gametischen Prägung nötig ist. Analysen der X-Chromosom-Inaktivierung konnten zeigen, daß eine weitreichende Methylierung der mit Chromatinstruktur-Änderungen einhergehenden Gen-Inaktivierung nachfolgt und somit

wahrscheinlich zumindest für die X-Inaktivierung kein Primär-Faktor ist (Lock *et al.*, 1987). Dem entgegengesetzt scheinen jedoch einige CpG-Dinukleotide der genomweiten Demethylierung zu entgehen. Das *H19* Gen ist gewöhnlich in Spermien stärker methyliert als in Oozyten (Zhang *et al.*, 1993; Bartolomei *et al.*, 1993), und zumindestens eine *HpaII*-Erkennungssequenz des väterliche vererbten *H19*-Allels scheint seine Methylierung über das Blastocystenstadium hinaus beizubehalten (Tremblay *et al.*, 1995). Eine ähnliche Beobachtung konnte bei einigen CpG-Dinukleotiden des *Igf2r*-Gens gemacht werden, die ihre maternale Methylierung behalten können (Stöger *et al.*, 1993). Welchen Teil des "Imprinting"-Prozesses die Methylierung einnimmt, müssen daher weitere Studien an Chromatin, Gameten-Methylierung und eventuell DNA-Protein-Wechselwirkungen zeigen.

1.2.5 Chromatin- und Domänen-Effekte bei der gametischen Prägung

Bisher existieren unter anderem experimentelle Daten zur Nuklease-Empfindlichkeit zu den gametisch geprägten Mausgenen *Igf2*, *H19* und *U2af1-rs1* aus Kern-Extrakten. Mit dieser Methode lassen sich Nuklease-hypersensitive Stellen und kleine Nukleosomenfreie Regionen identifizieren, die häufig mit *cis*-regulatorischen Sequenzen aktiver Gene assoziiert sind (Gross & Garrard, 1998). Alle paternal methylierte Allele in *U2af1-rs1* zeigten eine größere Sensitivität gegenüber Behandlung mit *DNaseI* und Endonuklease *MspI* (Feil *et al.*, 1997). Ähnliche Ergebnisse zeigten Arbeiten an den X-chromosomalen Genen *HPRT* und *PGK-1*, in denen die *DNaseI* und *MspI*-Sensitivität auf dem aktiven X-Chromosom am höchsten ist (Wolf & Migeon, 1985; Riley *et al.*, 1986). Ihre Empfindlichkeiten bezüglich einer Mikrooccus-Nuklease-Behandlung (*MNase*) sind nahezu identisch, was darauf hinweist, daß beide Gene möglicherweise eine ähnliche Nukleosomen-Struktur besitzen.

Eine andere Eigenschaft dieser hoch-exprimierten Bereiche ist, daß sie in der S-Phase des Zellzyklus früher repliziert werden (Holmquist *et al.*, 1987). Eine asynchrone Replikation wurde durch direkte cytogenetische Analysen in der Prader-Willi-Region (Izumikawa *et al.*, 1991) und durch FISH-Analysen an Interphase-Nuklei in der *Igf2-H19*-Region nachgewiesen (Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994). Interessanterweise scheinen diese chromosomalen Replikationsmuster die Beteiligung beider parentaler Allele zu benötigen (LaSalle & Lalande, 1995). Ein anderes Merkmal dieser Regionen ist die Hypoacetylierung des Kern-Histons H4 (Jeppesen & Turner, 1993; Jeppesen, 1997), ein Charakteristikum, welches möglicherweise zur Dekondensation des Chromatins führen kann (van Holde & Zlatanova, 1996).

Änderungen in der Chromatinstruktur können wiederum direkt die allelspezifische Expression einzelner gametisch geprägter Gene regulieren. Ein Beispiel ist die selektive Transkriptionskontrolle einer "Isolierregion" (ICR, *imprinting-control region*), die sich zwischen den Genen *Igf2* und *H19* befindet. Beide Gene teilen sich eine *Enhancer*-Region, die stromabwärts von *H19* liegt (siehe Abb. 2).

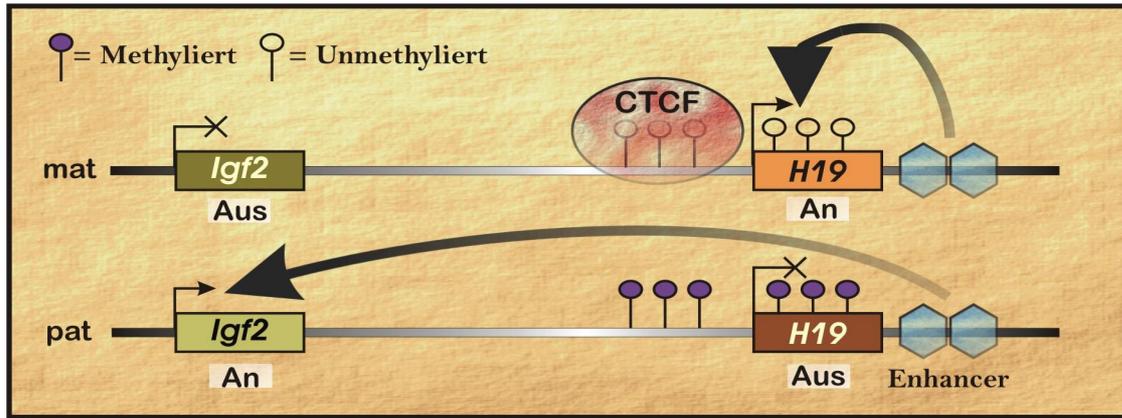


Abb. 2: Die ICR-Region, die eine Bindungsstelle für CTCF-Proteine besitzt, fungiert als Trennelement und wird durch DNA-Methylierung kontrolliert (Übersicht in Reik & Murrell, 2000). Das CTCF-Protein kann an das unmethylierte maternale ICR binden und verhindert somit, daß der Promotor des *Igf2*-Gens mit den Enhancern interagieren kann. Durch die Insulierung wird die Transkription des Gens unterbunden. Das paternale Allel ist hingegen methyliert und erlaubt keine Bindung des CTCF-Proteins, wodurch die Transkription des *Igf2*-Gens gewährleistet bleibt. Gleichzeitig wird das paternale *H19*-Gen durch die Methylierung der Promotorregion inaktiviert.

1.2.6 Gametische Prägung in Tumoren und Wachstumsstörungen

Erste Hinweise auf eine Rolle des "Imprinting"-Prozesses in der Entstehung von Krebs lieferten 1988 Daten von Wilkins, die zeigten, daß in Wilms-Tumoren ein charakteristischer Verlust des mütterlichen Allels von Chromosom 11 zu finden war (*loss of heterozygosity, LOH*). Auch in anderen embryonalen Tumoren konnte die besondere Beteiligung eines parental Allels nachgewiesen werden, so in Neuroblastomen (Caron *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1993) und Rhabdomyosarkomen (Scrabble *et al.*, 1989). Ähnliche Tumor-Formen scheinen nicht nur auf embryonales Gewebe beschränkt zu sein.

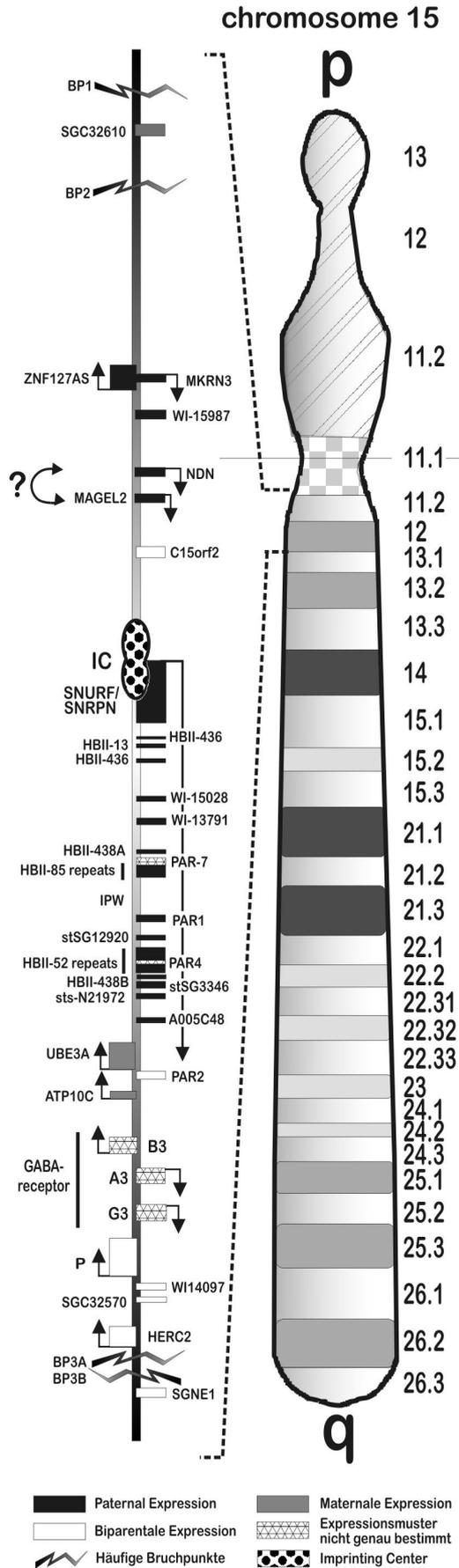
Die Entstehung von bestimmten Lungen-Tumoren wurde mit einer defekten epigenetischen Prägung des *Igf2*-Gens in Verbindung gebracht (Suzuki *et al.*, 1994). Neben der Tumor-Entstehung scheint auch an dem Auftauchen spezifischer Wachstumsstörungen ein defekter Imprinting-Mechanismus beteiligt zu sein. Die wohl bekannteste Wachstumsstörung ist das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS). Es wurde unabhängig voneinander von Beckwith (1963) und Wiedemann (1964) entdeckt und wird auch als EMG-Syndrom (*Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus-Syndrom*)

bezeichnet. In vielen BWS-Patienten finden sich neben Wilms-Tumoren auch Zucker-Stoffwechselstörungen, die offensichtlich durch eine Überproduktion von Insulin (*INS*) oder "Insulin-like growth factor 2" (*Igf2*)-Genen verursacht werden (Engström *et al.*, 1988). Zahlreiche Daten deuten darauf hin, daß viele dieser Störungen ihren Ursprung in der gametisch geprägten Chromosomenregion 11p15 innerhalb der *Igf2-H19*-Region haben (Ping *et al.*, 1989; Rechler & Nissley, 1990; Mannes *et al.*, 1994).

1.2.7 Gametische Prägung und das Prader-Willi Syndrom

Das Prader-(Labhart)-Willi Syndrom (PWS; MIM: 176270) war eines der ersten Syndrome, bei denen als Ursache ein Fehler im "Imprinting"-Mechanismus erkannt wurde. Es wurde als eigenständiges Syndrom zuerst 1956 von dem Endokrinologen A. Prader und seinen Kollegen A. Labhart und H. Willi von der Universitätskinderklinik Zürich beschrieben. Nichtsdestotrotz dauerte es bis in die 80-iger Jahre, bis eines der Mysterien, die dieser Krankheit unterliegen, gelöst werden konnte als man entdeckte, daß Deletionen in PWS ausschließlich das paternale Allel betrafen (Butler & Palmer, 1983). Die ersten Patienten die in der Literatur beschrieben wurden waren sechs Männer und drei Frauen, die sich durch Kleinwuchs, Adipositas und Imbezillität (angeborener Schwachsinn) auszeichneten (Prader *et al.*, 1956). Charakteristisch für PWS ist zudem eine anfänglich im frühen Säuglingsalter auffällige Muskelhypotonie, die sich darin äußert, daß die Kinder nahezu unbeweglich verharren und weder schreien noch saugen können (Übersicht in Holm *et al.*, 1993).

In den frühen Jahren nach der Entdeckung wurden PWS-Patienten gewöhnlich mit "Lebensschwäche" diagnostiziert und wenig war bekannt im Bezug auf die psychologischen und kognitiven Defekte, die mit dieser Krankheit assoziiert sind. Bis *dato* konnte jedoch eine lange Liste neurologischer Defekte diagnostiziert werden (Übersicht in Schumacher, 2001). Einer der wesentlichen Aspekte in PWS ist die milde bis moderate zurückgebliebene geistige Entwicklung der Patienten, die in IQs zwischen 40-105 resultiert (mit einem durchschnittlichen IQ von etwa 65). Obwohl für etwa 20-30% der PWS Patienten ein höherer IQ in den 80ern gemessen wurde, können sie sich nicht gemäß ihrer getesteten geistigen Ebenen verhalten. Zudem zeigen die meisten erkrankten Kinder Schlafstörungen, epileptische Anfälle, einen ungebremsten Appetit, sprachliche Artikulationsprobleme und problematische Verhaltensauffälligkeiten. Zu diesen gehören plötzlich auftretende Aggressionen und das Verstecken von persönlichen Gegenständen anderer Personen. PWS-Patienten sind teilweise depressiv, argumentativ, stur und zudem hypersensitiv gegenüber, als unfair empfundener, Behandlung.



Exzessives Nägelkauen und Hautzupfen führt häufig zu Entzündungen, Blutungen und Infektionen, insbesondere da viele PWS-Individuen eine extrem hohe Schmerzschwelle zu haben scheinen. Für Jahrzehnte lag die Ursache dieser Krankheit völlig im Dunkeln, bis gehäuft über Translokationen und kleine Deletionen auf Chromosom 15 bei PWS-Patienten berichtet wurde (Ledbetter *et al.*, 1981, 1982). Etwa 65-70% der PWS-Patienten besitzen eine während der Gametogenese entstandene Deletion des paternalen Chromosoms 15q11-q13 (Butler *et al.*, 1986; Nicholls *et al.*, 1989^b; Robinson & Lalande, 1995), während Patienten, denen das mütterliche Allel fehlt, ein anderes Krankheitsbild, das Angelman-Syndrom, entwickeln (s.u.). Die relativ konstanten Bruchpunkte (BP1-BP3a/b) der am häufigsten auftretenden Deletionen in PWS überspannen eine 4 Mb-Region und liegen innerhalb repetitiver Sequenzen, den sog. *END-repeats*, die von großen Duplikationen dieser Region herrühren (Abb. 3). Weitere Studien (Nicholls *et al.*, 1989^a, 1993; Mascari *et al.*, 1992) zeigten, daß etwa 20-25% der PWS-Patienten zwei normale Chromosomen besaßen, die jedoch beide mütterlichen Ursprungs waren (sog. Uniparentale Disomie, *UPD*).

Abb.3: Übersichtskarte des menschlichen Chromosoms 15. Die gametisch geprägte Region um 15q11-q13 ist vergrößert. Die vermeintliche Position der Gene (Rechtecke), neu identifizierter Transkripte und Referenzmarker, die häufigsten cytogenetischen Deletionen (Zickzacklinien) und der Imprinting Center (IC) sind vermerkt. Die Bruchpunktregionen (BP1-BP3a/b) repräsentieren duplizierte Bereiche mit einer Größe von etwa 400 kb.

Viele solcher Befunde lieferten die Grundlage zu der Annahme, daß das PWS-Syndrom der gametischen Prägung unterliegt und die vermutlichen PWS-Gene nur auf dem väterlichen, die AS-Gen(e) nur auf dem mütterlichen Chromosom aktiv sind. Des weiteren finden sich bei etwa 5% der Patienten andere chromosomale Abnormalitäten auf 15q11-13, die vornehmlich durch abnormale DNA-Methylierung und Genexpression charakterisiert sind (Hamabe *et al.*, 1991^{a,b}; Knoll *et al.*, 1993, Zackowski *et al.*, 1991; Horsthemke *et al.*, 1995; Glenn *et al.*, 1994; Sutcliffe *et al.*, 1994). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die erkrankten Individuen die Krankheit von einem Elternteil vererbt bekamen, die selbst einen Defekt im "Imprinting"-Prozess trugen (Buiting *et al.*, 1995; Horsthemke *et al.*, 1997).

Die kritische PWS-Region (siehe Übersichtskarten, Abb. 3 und 69) umspannt elf bisher bekannte Gene, die paternal exprimiert werden: *SNURF/SNRPN* (Özcelik *et al.*, 1992; Glenn *et al.*, 1993; Nakao *et al.*, 1994), *NDN* (Jay *et al.*, 1997), *MAGEL2* (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000), *MKRN3* (*ZFP127*; Özçelik *et al.*, 1992) und die snoRNAs *HBII-13*, *HBII-52*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII438A/B* und *HBII-85* (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus, mit dem diese Gene allelspezifisch exprimiert werden, ist unbekannt, jedoch scheinen Chromatin-Kondensierung (Ferguson-Smith *et al.*, 1993), zeitliche Replikations-Steuerung (Izuikawa *et al.*, 1991; Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994) und DNA-Methylierung (Driscoll *et al.*, 1992; Dittrich *et al.*, 1992, Buiting *et al.*, 1994) involviert zu sein. Die Struktur und die möglichen Rollen der einzelnen Gene bei der Entstehung von PWS werden im Ergebnisteil und in der Diskussion ausführlich behandelt.

Der weitaus größte Teil der CpG-Dinukleotide in der PWS-Region scheint maternal methyliert und paternal unmethyliert zu sein (Dittrich *et al.*, 1992, 1993; Zeschnigk *et al.*, 1997). Indes finden sich auch einzelne *HpaII*-Erkennungssequenzen, so auch im Intron 5 und 7 des *SNURF/SNRPN*-Genes, die auf dem paternalen, jedoch nicht auf dem maternalen Chromosom methyliert sind (Glenn *et al.*, 1993^b, Buiting *et al.*, 1994) und einige biparental methylierte Sequenzen (Schumacher *et al.*, 1998; diese Arbeit). Einige Prader-Willi-Patienten zeigen eine von diesem Muster abweichende Methylierung, besitzen jedoch anscheinend normale Chromosomen biparentalen Ursprungs (Glenn *et al.*, 1993^a; Reis *et al.*, 1994^a; Buiting *et al.*, 1994). Man fand ein maternales Methylierungs-Imprint auf dem paternalen Chromosom oder ein paternales auf dem maternalen Chromosom. Es zeigte sich, daß diese Patienten kleine Mikrodeletionen besaßen, lokalisiert in einem Abschnitt der DNA, welcher daraufhin als

"Imprinting-Zentrum" bezeichnet wurde (Abb.2; Details siehe Ergebnisteil). Da die Methylierung in 15q11-13 mit der Expression reziprok zu korrelieren scheint, könnten die betroffenen PWS-Gen(e) oder die ganze PWS-Region durch Methylierung oder einen bisher unbekanntem Mechanismus kontrolliert werden.

1.2.8 Gametische Prägung und das Angelman "*happy puppet*" Syndrom

Das Angelman-Syndrom (AS, MIM: 105830) wurde zuerst 1965 von dem englischen Kinderarzt Harry Angelman beschrieben (Angelman, 1965). Nach anfänglichem Interesse lag sein Artikel bis Anfang der achtziger Jahre nahezu vergessen und nur einige faszinierende Entwicklungen, die zum Verständnis der Krankheit beitrugen führten zu einer erneuten Aufmerksamkeit. Angelman beschrieb drei Kinder mit stark ausgeprägtem Schwachsinn, einer Hypopigmentierung, Störung der Bewegungsfunktionen und anderen Charakteristika, wie einem ungewöhnlich glücklichen, der Situation nicht angepaßten Erscheinungsbild. Im Jahre 1991 schrieb Angelman über seine Entdeckung: "*...when on holiday in Italy I happened to see an oil painting in the Castelvecchio museum in Verona called...a boy with a puppet. The boy's laughing face and the fact that my patients exhibited jerky movements gave me the idea of writing an article about the three children with a title of Puppet Children*". So erklärt es sich, daß AS auch als *happy puppet syndrome* bekannt wurde. In der Tat ist das plötzlich auftretende Lachen der AS-Kinder eines der prominentesten Charakteristika dieser Krankheit.

AS ist im frühen Kindesalter schwer zu diagnostizieren, daher schwanken auch die Angaben über die Häufigkeit dieses Syndroms zwischen 1:12000 (Kyllerman, 1995) über 1:16000 in West-Berlin (Reis *et al.*, 1994^b) bis zu weit über 1: 20000 (Clayton-Smith *et al.*, 1992). Es wurde vielfach diskutiert, ob mögliche frühere Veröffentlichungen zu Angelman-Patienten existieren, die irrtümlich als Down-Syndrom diagnostiziert wurden, da insbesondere atypische Fälle mit milderem Phänotyp bekannt sind (Boyd *et al.*, 1988; Bottani *et al.*, 1994).

Die Angelman-Patienten sind dadurch charakterisiert, daß sie nie lernen, sich sprachlich zu artikulieren (meist weniger als sechs erlernte Worte). Sie neigen zu epileptischen Anfällen, Brachycephalie (Kopfumfang meist <50 cm), Hyperaktivität, außerdem weisen sie ein atypisches EEG und unverkennbar phänotypische Gesichtsformen auf, hervorgerufen durch tiefliegende Augen, weitem Mund und weit auseinanderstehenden Zähnen (Williams & Frias, 1982; Baraitser *et al.*, 1987; Robb *et al.*, 1989; Zori *et al.*, 1992; Clayton-Smith *et al.*, 1993). Weiterhin zeigen sich die

Patienten geistig stark retardiert, besitzen häufig eine seltsam anmutende Faszination für Wasser und sind interessanterweise häufig linkshändig. Ende der neunziger Jahre wurden jedoch auch AS-Patienten beschrieben, die kaum die beschriebenen Merkmale aufwiesen (Gillesen-Kaesbach *et al.*, 1999). Diese Patienten sind durch Fettleibigkeit, Muskelhypotonie, einer mäßig mentalen Retardierung und der Fähigkeit zu sprechen charakterisiert. Dieser vergleichsweise milde Phänotyp kann möglicherweise durch einen unvollständigen Imprintingdefekt oder durch einen zellulären Mosaicismus erklärt werden.

Die Genetik von AS ist ungewöhnlich komplex. Im Gegensatz zum Prader-Willi-Syndrom fehlt Angelman-Patienten meist ein Teil des maternalen Chromosoms 15q11-q13 (Ji *et al.*, 1999). Etwa zwei Drittel der Patienten haben *de novo* Deletionen (Kaplan *et al.*, 1987; Magenis *et al.*, 1987), die immer das mütterliche Allel betreffen (Knoll *et al.*, 1989), während beim PWS (~25% maternale UPD) nur 1-3% der beobachteten Fälle aus einer paternalen UPD (zwei väterliche Chromosomen) resultieren. Diese Diskrepanz läßt sich durch die sogenannte "disomic rescue" des maternalen Chromosoms während einer potentiellen Trisomie 15 und des vornehmlichen meiotischen, maternalen Ursprungs nicht voneinander getrennter Chromosomen erklären (Cassidy *et al.*, 1992). Weitere 4-7% der Angelman-Patienten scheinen einen Defekt im "Imprinting"-Prozess zu besitzen, der dadurch gekennzeichnet ist, daß das maternale Chromosom das Methylierungsmuster des paternalen Allels angenommen hat (Saitoh *et al.*, 1996). Ein Teil dieser Patienten (~10-15 %) besitzen Deletionen die den AS-SRO, den zentromerische Teil des Imprinting-Centers, betreffen (AS-SRO, **A**ngelman **s**yndrome **s**mallest **r**egion of **d**eletion **o**verlap; siehe Karte zum IC-Element Abbildung 31). Der AS-SRO scheint mit dem weiter telomerisch liegenden PWS-SRO ein einziges, in zwei unterschiedlichen Richtungen wirkendes Imprinting-Center (IC) zu bilden, welches durch Deletion die Fähigkeit verlieren könnte, in der weiblichen Keimbahn den Wechsel des paternalen Imprints zum maternalen zu vollziehen (Dittrich *et al.*, 1996), d.h. das Angelman-Syndrom könnte durch das Fehlen der Expression maternaler, das Prader-Willi Syndrom durch das Fehlen der Expression paternaler Gene hervorgerufen werden.

Die restlichen 10-20% der von diesem Syndrom betroffenen Personen scheinen Mutationen in einzelnen Genen auf 15q11-13 zu besitzen. Die für AS kritische Region ist zur Zeit auf etwa 600 kb eingegrenzt und umfaßt die zwei bekannte Sense-Transkripte UBE3A (E6-AP) und ATP10C (siehe Übersichtskarte, Abb. 3). Auf dem Antisense-Strang erstreckt sich das SNRPN-Gen über mehrere hundert kb bis in diese Region (Runte *et al.*, 2001). Das UBE3A-Gen codiert für eine Ubiquitin-Protein Ligase,

welche Ubiquitin innerhalb des sog. "Ubiquitin-proteasome proteolytic pathway" zu Protein-Substraten transportiert. Ein Verlust dieser Enzym-Funktion durch Mutationen in der codierenden Region des Gens wurde in Patienten nachgewiesen (Hochstrasser, 1996; Kishino *et al.*, 1997). Das Imprint des Gens und damit seine uniparentale, spezifische Expression des maternalen Allels konnte jedoch nur in Gehirngewebe (insbesondere Hippocampus- und Purkinje-Neuronen) nachgewiesen werden (Albrecht *et al.*, 1997; Vu & Hoffman, 1997; Rougeulle *et al.*, 1997). Das zweite, maternal exprimierte Gen ATP10C codiert für eine ATPase, die möglicherweise für die asymmetrische Verteilung von Phospholipiden an Membranen sorgt (Meguro *et al.*, 2001). Weiter telomerisch zur UBE3A-Region liegt das P-Gen, welches mit einem Tyrosin-positiven (Typ II)-oculocutanen Albinismus korreliert und somit wahrscheinlich die Ursache für die Hypopigmentation in einigen Angelman-Patienten ist (Ramsay *et al.*, 1992). Das P-Gen wird vorwiegend in den, das schwarz-braune Pigment Eumelanin produzierenden Melanozyten exprimiert (Nicholls, 1993). Daten zur Methylierung in der Angelman-Region liegen zur Zeit nicht vor. Eine genaue Beschreibung der an AS beteiligten Gene findet sich in den Ergebnissen und in der Diskussion.

1.2.9 Gametische Prägung in embryonalen Stammzellen

Die Kultur und Manipulierung von embryonalen Stammzellen kann die Entwicklung der entstehenden Embryos beeinflussen. So wurden deutliche Effekte in der Kultur und bei Kern-Transfer Experimenten von Zellen des Schafs und Kalbs beobachtet. Häufig entwickeln sich Nachkommen, die eine erhöhte Mortalität aufweisen und wesentlich größer als ihre Artgenossen sind (so z.B. beim sog. *large calf syndrome*; Übersicht in Walker *et al.*, 1996). Ähnliche Effekte sind auch für Transferexperimente mit Maus-ES-Zellen beobachtet worden. Es zeigte sich, daß lang andauerndes Kultivieren und hohe ES-Zell Passagen zu der Geburt von Mäusen mit erhöhter Größe und vermehrten Gewicht, Polydactyli sowie häufigem postnatalem Tod führen können (Nagy *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997). Man nimmt an, daß neben anderen Faktoren (Mediumzusätze, Genominstabilität) die beobachteten Effekte durch die Akkumulation epigenetischer Änderungen in den ES-Zellen, insbesondere in *imprinted* Genen verursacht wird.

Ein Kandidat für diese epigenetischen Veränderungen ist sicherlich die DNA-Methylierung, da gerade zu der Zeit, zu der ES-Zellen aus dem frühen Embryo erhalten werden, das Säugetiergenom einer umfangreichen Veränderung der

Methylierungsmuster unterliegt (Übersicht in Reik & Walter, 2001). Im Gegensatz zu nicht-geprägten Genen besitzen parental geprägte Gene, wie *Igf2r*, *H19*, *U2af1-rs1* oder *Snrpn* bereits beträchtliche Mengen an methylierten Sequenzen während des Blastocystenstadiums, die direkt von den parentalen Gameten abgeleitet sind (Übersicht in Dean *et al.*, 1997). Da bisher nur wenig über diese frühen Methylierungsmuster bekannt sind, wurde ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Analyse dieser embryonalen Muster in der bisher kaum untersuchten *Snurf/Snrpn*-Region gesetzt. Es ist bekannt, daß die gametisch geprägten Gene in den ES-Zellen leicht einer epigenetischen Mutation unterliegen können, die jeweils auch bis in die fötalen Stadien beibehalten werden (Dean *et al.*, 1997; Humpherys *et al.*, 2001). Diese Daten deuten darauf hin, daß der Nukleus undifferenzierter Zellen wesentlich anfälliger für epigenetische Änderungen ist und auch weniger Reprogrammierung bedarf als der Nukleus einer differenzierten somatischen Zelle.

1.2.10 Imprinting-Theorie

Mehrere Theorien zur evolutiven Entwicklung und Funktion der gametischen Prägung werden zur Zeit diskutiert. Beide Teile dieser Arbeit könnten eventuell zu einem besseren Verständnis der Imprinting-Theorie beitragen. Die am häufigsten diskutierte Theorie ist die "*genetic conflict hypothesis*" (Moore & Haig, 1991; Moore, 1991, 1992). Diese Theorie vereinigt das Phänomen von autosomalem "Imprinting" und X-Chromosom-Inaktivierung und beschreibt die Entstehung des "Imprints" als ein Rennen der unterschiedlichen "Bedürfnisse" von maternal und paternal abstammenden Genen (Details siehe Diskussionsteil). Eine andere Theorie besagt, daß parentales Imprinting die Möglichkeit parthenogenetischer Reproduktion verhindert (Solter, 1988), indem es Fitness der anderen (sexuell gezeugten) Embryos mit dem gametisch geprägtem Allel erhöht. In weiteren Hypothesen wird die besondere Rolle der Säugetier-Plazenta hervorgehoben. Hall (1990) schlug vor, eine mögliche Funktion der gametischen Prägung liege darin, das Wachstum der Plazenta zu regulieren, während Varmuza und Mann (1994) vorschlugen, daß ein Imprinting-Mechanismus die Plazenta vor möglichen Trophoblast-Tumoren schützen könnte, indem die für die Trophoblasten-Entwicklung benötigten Gene in den Oocyten inaktiviert werden.

Die Theorie der "*Dominance modification*" (Sapienza, 1989) besagt, daß die gametische Prägung nur ein Nebeneffekt anderer Funktionen der *imprinted* Regionen ist, da sonst ein "Imprint" alleine selektiv nicht über viele Generationen erhalten werden könnte. Die "*Host defense hypothesis*" (Barlow, 1993) richtet die Aufmerksamkeit

vielmehr auf die DNA-Methylierung. Diese Theorie befürwortet, daß die ursprüngliche Funktion von gametisch geprägten Loci die fremde DNA inaktivieren. Nach diesem Modell wurden einige Gene im Verlauf der Evolution Ziel einer Modifikation durch Methyltransferasen, weil diese Gene "imprinted boxes" enthielten, die aus Fremd-DNA bestanden. Die parental-spezifische Expression wäre demnach eine Konsequenz aus der vornehmlich in der maternalen Keimbahn stattfindenden DNA-Methylierung.

Andere Autoren erklären den "Imprinting"-Effekt einfach mit Gen-Regulation, liefern damit aber weniger eine neue Theorie des "Imprinting"-Phänomens als vielmehr eine Beschreibung des "Imprinting"-Vorgangs. Weiterhin erklärt eine alleinige Funktion der gametischen Prägung als Gen-Regulator nicht, warum die meisten Lebewesen auf einen "Imprinting"-Mechanismus verzichten können. Eine genauere Erklärung zur "Imprinting"-Theorie im Kontext der Daten dieser Arbeit findet sich im Diskussionsteil.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit besteht darin, ein etwas besseres Verständnis von Imprinting-Mechanismen zu erlangen, die im Säugetierorganismus die allelspezifische Expression gehirnspezifischer Gene bedingen. Als umfangreichster Komplex dieser gametisch geprägter Gene gilt eine Imprinting-Domäne um das *SNURF/SNRPN* Gen auf dem menschlichen Chromosom 15q11-q13. Um die einzelnen epigenetischen Mechanismen verstehen zu können, die in dieser Region involviert sind, sollten daher einige Methylierungsmuster in Kernbereichen dieser Imprinting-Region ermittelt werden. Wie werden die Gene methyliert und wie verhält sich die Methylierung in repetitiven Sequenzen oder in Bereichen der snoRNAs Transkripte? Ein besonderes Augenmerk galt dem zentralen, funktionalen Element der gametisch geprägten Region, dem "Imprinting Center", das intensiv in PWS- und AS-Patienten untersucht werden sollte. Da genaue Analysen im menschlichen Genom nur begrenzt möglich sind, sollte das System auch auf das Mausmodell, d.h. der homologen Region auf Mausechromosom 7C ausgedehnt werden. Hier sollte es möglich sein, neben den allgemeinen Methylierungsmustern Unterschiede im genetischen Hintergrund als auch dynamische Prozesse der Epigenetik zu untersuchen. So sollte analysiert werden, ob und wie sich "Imprinting"-Muster während der neuronalen Entwicklung verändern. Um diese Untersuchungen zu gewährleisten, sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, embryonale Stammzellen der Maus effizient in neuronale Zellen differenzieren zu lassen. Die Entwicklung einer solchen Methode könnte allgemein für

verschiedene Disziplinen der Neurowissenschaften von Vorteil sein und die Analyse unzähliger neuronaler Mechanismen und Krankheiten erleichtern. Bisherige Techniken vermögen es nicht, ES-Zellen im ausreichenden Maße in Neuronen und Glia umzuwandeln. Kernpunkt des erarbeiteten Protokolls ist die Formung von EBs in der Gegenwart von Staurosporine (STS), einem pleiotrophen Protein-Kinase Inhibitor, der in Neuroblastoma-Zelllinien den Auswuchs von Neuriten initiieren kann (Rasouly *et al.*, 1992; Sano *et al.*, 1994; Lombet *et al.*, 2001). Unter dem Einfluß von STS entwickeln sich Maus ES-Zellen zu EGF-reaktiven neuronalen- und glialen Vorläuferzellen, die sich weiter zu Neuronen, Astrozyten und sogenannten Neurosphären (*neurospheres*, NSP) differenzieren lassen (Schumacher *et al.* 2002). Die klonal abgeleiteten Sphären enthalten offenbar multipotente Zellen, die viele klassische Charakteristika von ZNS Stammzellen besitzen. NSP-Zellen lassen sich *in vitro* weitervermehrten und produzieren in der Gegenwart von STS weitere neuronale Zelltypen und sekundäre Neurosphären.

Ein weiterer Schwerpunkt meiner Arbeit sollte in der Bestimmung von Methylierungsmustern und der Expression gametisch geprägter Gene in embryonalen Stammzellen *per se* liegen, da bisher nur wenig über die epigenetischen Prozesse in diesen Zellen bekannt ist. Die Analyse dieser Muster scheint sowohl für das Verständnis der natürlichen Entwicklung von Säugetierorganismen essentiell zu sein als auch für die Optimierung vorhandener Klonierungstechniken. Weiterhin könnten die Daten dazu genutzt werden, die Präparation und Kultivierung embryonaler Stammzellen zu verbessern. Um etwas über die Stabilität der ermittelten "Imprinting"-Muster zu erfahren, wurden die ES-Zellen daher zudem klonal vermehrt und über viele Passagen kultiviert. Die ermittelten Daten sollten auch im Rahmen der Untersuchung von "Imprinting"-Theorien Verwendung finden. Da fast keine Kenntnisse zur evolutiven Entwicklung der *SNRPN*-Region existieren, sollten Experimente durchgeführt werden, die Aufschluß über evolutive Mechanismen in verschiedenen Spezies ermöglichen könnten. Eine neue Hypothese zur evolutiven Entwicklung des Säugetiergehirns im Rahmen der ermittelten Daten und existierenden Arbeiten wird vorgestellt.

Einleitung

Notizen:

2 Material

2.1 Chemikalien

Acetyl-CoA	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Acrylamid / Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland
Ammoniumoxodipersulfat ($\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin (Binotal [®])	Grünenthal, Stolberg
Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
B27	Gibco, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Yeast Extract	Difco, Detroit, MI, USA
Bisulfit (Na_2HSO_3 65,2%)	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R-250	Boehringer, Ingelheim
Cresyl Violet	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate	Promega, Madison, WI, USA
Dextransulfat, Na-Salz	Biomol, Hamburg
Dimethylformamid	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	BioTech Trade & Service GmbH, St. Leon-Rot
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Material

Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenantridium-bromid)	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fibronektin	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
G5	Gibco, Karlsruhe
Glucose	Schwarz, Mannheim
Glycerin	J.T.Baker Chemicals, Deventer, Niederlande
Harnstoff (CH ₄ N ₂ O)	Boehringer, Ingelheim
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Hex-aminocobalt (III)-chlorid	Sigma, Deisenhofen
Hexanukleotide d(N) ₆	Boehringer, Mannheim
Hydrochinon (C ₆ H ₆ O ₂)	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	BioTech Trade & Service GmbH, St. Leon-Rot
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Heringsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Laminin	Gibco, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
LMP Agarose	Bio Rad, Richmond, CA, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Manganchlorid (MnCl ₂ · 4 H ₂ O)	Merck, Darmstadt

2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs SG, Schweiz
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Glücksklee, München
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
N ₂	Gibco, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA
Orange G	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Phenol	J.T.Baker Chemicals, Deventer, Niederlande
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Putrescin	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Schwarz, Mannheim
S-Adenosylmethionin	New England Biolabs, Schwalbach/Ts.
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sephadex G-50 (medium)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Stickstoff	Linde, Höllkriegelsreuth
TEMED	Merck, Darmstadt
α -Tocopherol	Sigma, Deisenhofen
Transferrin	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypan Blau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate)	Sigma, Deisenhofen
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indyol- α -D-galactopyranosid)	BioTech Trade & Service GmbH, St. Leon-Rot

2.2 Radiochemikalien

Desoxyribonukleosid-5'-[α - 32 P]-triphosphate, spezifische Aktivität >3000Ci/mM

Amersham Biosciences

2.3 Kits

GeneClean II Kit

Bio 101, Inc., Vista, CA, USA

Genomed JETquick

GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen

Midi/Mini-Plasmid Extraktions Kit

Qiagen, Hilden

RNeasy

Qiagen, Hilden

2.4 Enzyme

Alle hier aufgeführten Enzyme wurden, falls nicht gesondert vermerkt, gemäß der vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen und mit den dazu gelieferten Puffern verwendet.

2.4.1 Restriktionsendonukleasen

BamHI (aus *Bac. Amyloliquefaciens* H)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

HhaI (aus *Haemophilus haemolyticus*)

Boehringer, Mannheim

HindIII (aus *Haemophilus Influenzae* Rd)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

HpaII (aus *Haemophilus parainfluenzae*)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

MspI (aus *Moraxella species*)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

PstI (aus *Providencia stuarti*)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

PvuII (aus *Proteus vulgaris*)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

XbaI (aus *Xanthomonas badrii*)

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

2.4.2 Sonstige Enzyme

Chloramphenicol-acetyltransferase	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Deoxyribonuklease I	Sigma, Deisenhofen
HhaI Methyltransferase	New England Biolabs, MA, USA
HpaII Methyltransferase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Klenow Polymerase	Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim
Lysozym	Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Pwo-Polymerase	Boehringer, Mannheim
RNase A	Serva, Heidelberg
RNasin (Rekombinant)	Promega, Madison, WI, USA
SssI (CpG) Methyltransferase	New England Biolabs, MA, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, MA, USA
Taq-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA

2.5 Puffer und Lösungen

Agarplatten	1% Bacto-Tryptone 0.5% Bacto-yeast-extract 0.5% NaCl 1.25% Bacto-Agar
Bradford Reagenz	0.01% Coomassie Brilliant Blue G-50 4.7% Ethanol 8.7% Phosphorsäure
Chloroform (für DNA Extraktion)	Chloroform und Isoamylalkohol, gemischt im Verhältnis 24:1
Depurinisierungslösung für Agarosegele	0.25 M HCl

Material

Hybridisierungslösung	2x SSC 1% SDS 0.5% Milchpulver 0.5 mg/ml Heringsspermien-DNA 10% Dextransulfat
LB-Medium	1% Bacto-Tryptone 0.5% Bacto-Yeast-Extract 0.5% NaCl
Lysis-Puffer (für Plasmid-Präparation)	10µg/ml RNase A 100µg/ml Lysozym
Lysis-Puffer (für Plasmid-Schnelltest)	50nM NaOH 5mM EDTA 0.05% SDS 7% Ficoll 400 1 mg/ml Orange G
Milchpulvermix (10x)	5% Magermilchpulver 10% SDS
Oligo-Labeling-Puffer (5x)	250 mM Tris-HCl, pH 7.5 25 mM MgCl ₂ 25 mM DTT 1 mM Hepes, pH 7.0 250 µg/ml Hexanukleotide
Phenol, pH 7.5	Zugabe von 0.1% 8-Hydroxychinolin, dann Äquilibrierung für 15 min. mit 0.5 M Tris-HCl pH 8.0, gefolgt durch zweifache Äquilibrierung für 15 min. mit 0.1 M Tris-HCl pH 8.0
Prähybridisierungslösung	2x SSC 1% SDS 0.5% Magermilchpulver 0.5 mg/ml Heringsspermien-DNA
Proteinase K-Lösung	100 mM Tris-HCl, pH 8.5 5 mM EDTA 0.5% SDS 200 mM NaCl 500 µg/ml Proteinase K (frisch aus einer Stamm-Lösung [10 mg/ml] in H ₂ O)
RNase A-Lösung	10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 15mM NaCl erhitzt für 15 min bei 100°C

S1-Lösung (zur DNA Aufreinigung aus Blut)	0.32 M Saccharose 10 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgCl ₂ 1% [v/v] Triton X-100
Saccharoselösung	10% bzw. 40% in TE 1 M NaCl
SOB-Medium	2% Bacto-Tryptone 0.5% Bacto-Yeast Extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	2% Bacto-Tryptone 0.5% Bacto-Yeast Extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
SSC (1x)	150 mM NaCl 15 mM Na-Citrat mit 1 M Citronensäure auf pH 7.0 eingestellt
STET Lösung	50 mM EDTA, pH 8.0 8 % Saccharose 0.5% Triton X-100 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Stopplösung für Restriktionsenzyme (10x)	50 mM EDTA, pH 8.0 0.5% SDS 70% Glycerin 0.05% Bromphenolblau 0.05% Xylencyanol FF
TAE (50x, pH 8.0)	242 g Tris/ 1 l 100 mM EDTA, pH 8.0 85.5 ml/l Essigsäure
TBE (10x, pH 8.0)	100 mM Tris-HCl, pH 8.0 40mM EDTA, pH 8.0 89 mM Borsäure
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
TEN (Matrixpuffer für Sephadex G-50)	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA 100 mM NaCl

Material

Transferlösung (für Southern-Blot)	0.4 NaOH
Waschlösung I "Wash I" (Southern-Hybridisierung)	2x SSC 0.1% SDS
Waschlösung II "Wash II" (Southern-Hybridisierung)	0.1% SSC 0.1% SDS
2xYT	16 g Bacto-Tryptone 10 g Bacto-Yeast Extract 5 g NaCl auf 1 l auffüllen
2 YT-Agar (mit Ampicillin)	16 g Bacto-Tryptone 10 g Bacto-Yeast Extract 16 g Bacto-Agar 5 g NaCl auf 1 l auffüllen Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin

2.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abi-Prism 377 DNA-Sequencer	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA
Analysewaage	Sartorius, Leichlingen
Szintillationszähler (β-Counter) LS 6000 IC	Beckman, München
Blotting Papier GB 001-003	Schleicher & Schuell, Dassel
Brutschränke	Heraeus, Düsseldorf
Digital-Kamera Fuji HC-3002	Fuji, Japan
Digital-pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Einmal-Kanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Einmal-Plastikschraubröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner, Solingen
Einmal-Probenreaktionsgefäße 1.5 ml und 2.0 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Brand, Berlin
Einmal-Spritzen:	
• Discardit II	Becton Dickinson, Heidelberg
• Norm-Ject	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen

Filter-Pipettenspitzen (10-, 20- und 100 µl)	Fa. Kleef, Bonn
Feinwaage	Sartorius, Leichlingen
Glas-Kapillaren	Brand, Berlin
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Hybridisierungsröhren	Bachofer, Reutlingen
Membranporenfilter (0.2 µm)	Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
Mikro-Pipetten (2-20, 20-200 und 200-1000 µl)	Gilson, Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich
MilliQ/SuperQ Wasser-Reinigungsanlage	Millipore, Bedford, MA, USA
Nylonmembranen (Qiabrane Nylon plus)	Qiagen, Hilden
Nylonmembranen <i>Gene Dcreen Plus</i>	NEN, Boston, MA, USA
Nylonmembranen <i>S&S Supercharge</i>	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm "M"	American Can Company, Greenwich, CT, USA
<i>PCR-Cycler:</i>	
• DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA
• DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA
Peristaltische Pumpe	Stahlprodukter, Uppsala, Schweden
Petrischalen	Greiner, Solingen
Phosphor-Imager BAS 1000 und Imaging Plate BAS-III (20x40 cm)	Fuji, Tokio, Japan
Photometer	Pharmacia, Freiburg
Pipette (0.5 - 10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettierpumpe	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Röntgenfilme (X-OMAT AR und BIO-MAX MR)	Kodak, Rochester, NY, USA
Röntgenfilmkassetten zur Autoradiographie mit Verstärkerfolien Dr. Goos Suprema	Faust, Köln
Scheren, Pinzetten und Sezierbesteck	Aesculap, Tuttlingen

Material

Sonifizierer B-12	Branson sonic power, Danbury, CO, USA
Spannungsgeber (Gelelektrophorese):	
• Vokam [®]	Shandon Southern, USA
• ECPS 3000/150	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Speed Vac Concentrator	Savant Instruments, Hicksville, NY, USA
Szintillations-Zähler LS 1801	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad GFL	Fastnacht, Bonn
Zellulosepapier (ungebleicht)	Papierfabrik Hedwigthal
Zentrifugen:	
• Biofuge A	(Heraeus, Düsseldorf)
• Biofuge Pico	(Heraeus, Düsseldorf)
• Labofuge GL	(Heraeus, Düsseldorf)
• Medifuge 13000	(Heraeus, Düsseldorf)

2.7 Plasmide und Vektoren

p71.13.6	Geschenk von Michael Zeschning Enthält das 6.6 kbp HindIII-Fragment des Phagenklons λ 71.13 (Dittrich <i>et al.</i> , 1993)
pAd2 E2AL-CAT	Geschenk von Paul Koetsier (Ursprung: K.-D. Langner (Langner <i>et al.</i> , 1986))
pGEM [®] -T Vector	Promega, Madison, WI, USA
pT7Blue [®] -Vector	Novagen, Madison, WI USA

2.8 Mäuse

129	Charles River, Sulzfeld
[BxD] _{F1} -Hybridmäuse	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6	Charles River, Sulzfeld
DBA/2	Charles River, Sulzfeld
Balb/c	Charles River, Sulzfeld

2.9 Computer-Software

Clone Manager 4	Sci-ed Software, Durham, NC, USA
Cybertech CS-1 Image Software	Cybertech, Deutschland
BlastN	NCBI, USA
DNAClub	Autor: Xiongfong Chen, USA
Photograb 300-Z	Fuji, Japan
TINA - Version 2.09f	Raytest, Straubenhardt

2.10 Bakterien

XL1-Blue MRF' <i>Δ(mrcA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZΔM15Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene, Heidelberg
DH5-α	Geschenk, R. Birkenbiehl/Köln

2.11 ES-Zellen

Bruce 4	Geschenk L. Conforti/Rom; F. Koentgen/AUS
IB10	Geschenk A.Egert/Rom; K. Rajewsky/Köln
RW4	Geschenk T. Möroy/Essen
C57BL/6-A-08	Geschenk J. Hertz/St. Francisco
C57BL/6-S-07	Geschenk J. Hertz/St. Francisco

Material

Notizen:

3 Methoden

3.1 ES-Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der ES-Zellen

Für diese Arbeit fanden insgesamt drei verschiedene Maus ES-Zelllinien ihre Verwendung. Zelllinie IB10 (Geschenk K. Rajewsky, Köln) stammt aus einer 129/ola Mauslinie ab und gilt als sehr robust. Zellen aus 129er Linien lassen sich gewöhnlich am einfachsten kultivieren und transfizieren, weswegen diese Linien am häufigsten in der Forschung eingesetzt werden. Die Zellen teilen sich etwa alle 24 Stunden und sind besonders für einen Keimbahntransfer geeignet. Zelllinie RW4 stammt von einer anderen 129er Unterlinie, 129/sv ab. Mäuse dieses Stammes wurden parallel gezüchtet, um Vergleichsdaten aus der DNA dieser Tiere zu gewinnen. Zelllinie Bruce4 (Geschenk L. Conforti, Rom; F. Koentgen, Nedlands/Australien) stammt hingegen von C57BL/6 Mäusen ab. Bruce4 Zellen sind aufgrund ihres genetischen Hintergrundes schwieriger zu manipulieren, so daß sie z.B. einer schwächeren Trypsinisierung bedürfen. Experimente, die einer Sequenzierung bedurften, wurden in der Regel mit den Zellen der IB10 Linie durchgeführt, da die meisten Vergleichssequenzen in Datenbanken der 129er Linie entstammen.

Alle ES-Zelllinien wurden in einem speziellen **ES-DMEM-Medium** kultiviert und vermehrt:

Reagenz	Anmerkungen
500 ml DMEM	High Glucose without Na-Pyruvat; Gibco # 41965-039 Alternativ: KnockOut™ Medium; Gibco #10829-018
15% FCS	FCS sollte auf Plattierungseffizienz und Toxizität getestet sein !
1 mM Natriumpyruvat	6 ml, 100x (Gibco)
100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin	6 ml, 100x (Gibco)
2 mM L-Glutamin	6 ml, 100x (Gibco)
Nicht-essentielle Aminosäuren	6 ml, 100x (Gibco)
0.6 ml β-Mercaptoethanol [0.1 M]	in PBS
1 ml LIF	Aus Überstand von Lif-transfizierten CHO Zellen (s.u.)

Bei der Kultivierung ist darauf zu achten, daß die ES Zellen nicht ihre Pluripotenz verlieren. Dies kann durch unsachgemäße Behandlung während der Kultivierung leicht

geschehen, wenn keine Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Solche Zellen beginnen sich zu differenzieren und verlieren ihre Eigenschaft, eine Keimbahntransmission zu vollziehen. Um die Pluripotenz der Zellen zu bewahren, wurden die Kulturen mit *Leucocyte Inhibiting Factor* (LIF) versetzt und zusätzlich zur Vermehrung auf Mitomycin C behandelten Feederzellen kultiviert, die auf ihrer Oberfläche LIF exprimieren. Die ES Zellen wuchsen auf 10 cm Zellkulturplatten bei 37°C in einem sterilen Zellkulturschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit (>95%) und 10% CO₂. Die jeweils erste Passage einer Zelllinie wurde einmalig nach Transfer in das neue Labor mit zusätzlichen Antibiotika (Puromycin, Gentamicin) und Fungiziden (Fungizone[®], Anti-PPLO[®]) behandelt, um eine reine, Bakterien und Mycoplasmen-freie Zellkultur zu gewährleisten.

Die Zellen wuchsen maximal 2-3 Tage in Kultur, so daß eine kritische Zelldichte (~1000 Zellen pro Zellkolonie) nicht überschritten wurde. Die ES Zellen wurden für eine Passage einmal mit MT-PBS gewaschen, mit je 3 ml 1x Trypsinlösung für 2 min bei 37°C trypsinisiert anschließend mit 7 ml DMEM versetzt und letztendlich durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 2000 U/min geerntet. Es folgte eine gründliche Resuspension in DMEM, da gewährleistet sein musste, daß keine ES Zellen aneinander festhafteten. Der Grund für diesen Resuspensionsschritt ist, daß größere ES Zellklumpen spontan differenzieren können und damit ihre Pluripotenz verlieren. Alle ES Zellen (jeweils mind. 10⁶ – 5x10⁶ Zellen) wurden in DMEM mit 12,5% DMSO für spätere Verwendungen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 ES-Zell Differenzierung

Bevor die ES Zellen einer neurotrophen Induzierung zugefügt wurden, wurden die Zellen zweimal auf Gelatine-beschichteten Zellkulturplatten in Standard-DMEM vermehrt. Dieser Schritt dient der Verringerung der LIF-produzierenden Feederzellen in der Kultur und gewährleistet somit eine effektive Differenzierung. **Induktionsphase I:** Am Tag 0 wurden die ES Zellen vorsichtig, unter milden Bedingungen trypsinisiert und in ES-DMEM resuspendiert. Das ES-Medium wurde zuvor mit 20 nM Staurosporin versetzt und die FCS-Konzentration von 15% auf 20% erhöht. (STS sollte von nun an durchgängig, in allen Medien vorhanden sein). Etwa 500-1000 Zellen wurden jeweils in 20 µl Tropfen aufgenommen und auf die Unterseite eines Deckels einer mit PBS gefüllten Petrischale transferiert (siehe Abb. 4). Je nach Maßstab des Experiment konnten so mit Hilfe einer Multipipette 100 bis 2000 Zellaggregate produziert werden. Die undifferenzierten ES Zellen verblieben nun für 3 Tage (maximal 4 Tage) in den

hängenden Tropfen, wo sie zu festen Zellansammlungen, sog. *embryoid bodies* (EBs) aggregierten (abgewandeltes Protokoll nach Strübing *et al.*, 1995).

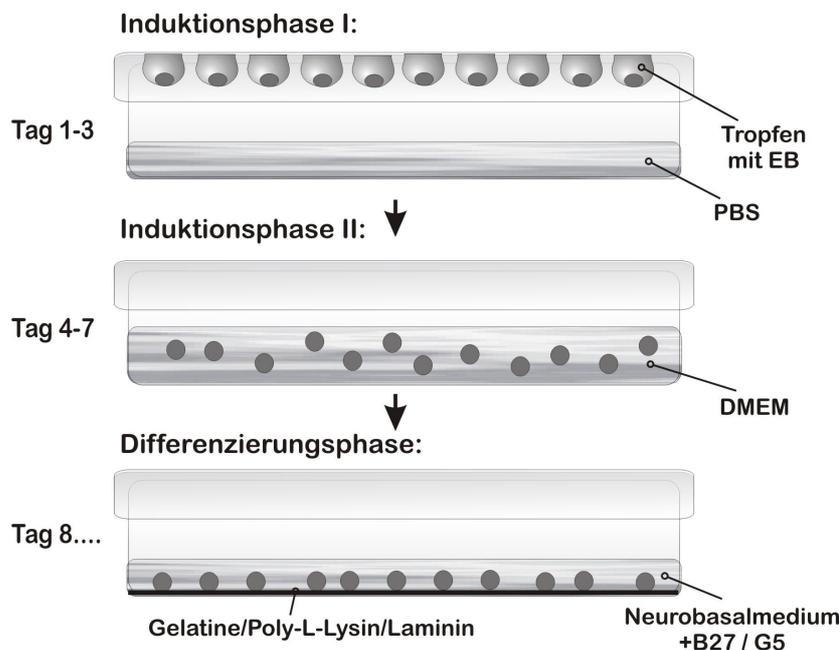
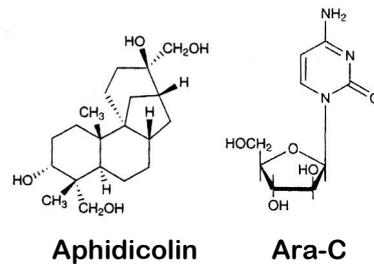


Abb. 4: Die Differenzierung der ES Zellen geschah in drei Phasen, für die jeweils eine neue Medium-Komposition verwendet wurde. Ein wesentlicher Schritt des Protokolls ist die Bildung von *embryoid bodies* in hängenden Tropfen (nach Strübing *et al.*, 1995).

Induktionsphase II: Nach Ablauf der Aggregation wurden die EBs in ES-DMEM mit 20% FCS transferiert und in einer nicht-adhesiven Petrischale als schwebende Teilchen kultiviert. Die EBs dieser Kulturen wurden alle 24 Stunden sedimentiert und in frisches Medium mit verringerter FCS-Konzentration überführt (20%→10%→5%→3%). Optional: Um eine Apoptose zu verhindern und gleichzeitig die Differenzierung zu fördern, zeigte sich die Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure als vorteilhaft.

Differenzierungsphase: Nach Ablauf von 4 Tagen in Suspension wurden die EBs auf beschichtete Zellkulturplatten in Neurobasalmedium plus 25 μM Glutaminsäure und 1% FCS ausplattiert. Als Matrix wurde 0,1%ige Gelatine (in PBS), Kollagen (in H_2O), Fibronectin, Laminin oder Poly-L-Lysin verwendet. Als ideales Substrat gilt entweder eine Kombination dieser Adhensionsfaktoren (sog. MATRIGEL) oder reines Laminin, welches aufgrund hoher Kosten jedoch nicht für größere Maßstäbe geeignet scheint. Als wirksame und kostengünstige Alternative erwies es sich daher, die Zellkulturplatten mit einer primären Schicht aus 0,1% Gelatine (hier in H_2O !) zu bedecken (Wasser sollte verdunsten) und anschließend eine zweite Schicht aus 5 $\mu\text{g/ml}$ Poly-L-Lysin (in H_2O)

hinzuzufügen. Um die ES Zellen einer gerichteten Differenzierung zuzuführen, wurde das Differenzierungsmedium entweder mit 1x G5- (für Gliazellen) oder 1x B27 Supplement (für Neuronen) versetzt. Um reine neuronale Kulturen zu erhalten (z.B. für spätere DNA-Extraktion), wurde nach 6-10 Tagen pro Zellkulturschale entweder 4 $\mu\text{g/ml}$ des Zellzyklus Regulators Aphidicolin oder 2 $\mu\text{g/ml}$ Cytosin β -D-Arabinofuranosid (Ara-C) hinzugefügt.



3.1.3 Aufarbeitung embryonaler Feederzellen

Um die ES Zellen in einem pluripotenten Stadium zu behalten, wurden sie auf embryonalen *feeder* Zellen (EF) vermehrt. Die EF Zellen wurden aus 13-14 Tage alten Mausembryos gewonnen. Zu diesem Zweck wurden männliche Mäuse (129/pSV2neo/Q (Quadrupel Resistenz); Geschenk K. Rajewsky, Köln), die eine homozygote Resistenz gegen u.a. Neomycin trugen, mit weiblichen C57BL/6 Mäusen gekreuzt.

An Tag 13 (oder 14) der Trächtigkeit einer Maus wurde der Uterus entfernt und ausgiebig in sterilen MT-PBS (4 mal) gewaschen. Danach wurde die Uteruswand mit sterilen Pinzetten geöffnet, so daß die Embryonen freigesetzt wurden. Nach Entfernung der Leber und des Herzens wurden die Embryonen in frisches MT-PBS überführt. Danach wurden die Köpfe abgetrennt und die Reste der Mausembryos in ein kleines Volumen MT-PBS transferiert und zerkleinert. Es folgte ein Transfer der Gewebe in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml einer 1x Trypsin/EDTA Lösung und kleinen Glaskügelchen (4-5 mm, sterilisiert). Das Gemisch wurde dann für 30 min bei 37°C gerührt und anschließend mit 50 ml EF-Medium versetzt.

EF-Medium:

Reagenz	Anmerkungen
500 ml DMEM	High Glucose without Na-Pyruvat; Gibco # 41965-096
10% FCS	Cytogen
1 mM Natriumpyruvat	6 ml, 100x (Gibco)
100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin	6 ml, 100x (Gibco)
2 mM L-Glutamin	6 ml, 100x (Gibco)

Das entstandene Gemisch wurde zusammen mit den Glaskügelchen abzentrifugiert und in neuen Medium resuspendiert (~700 ml für 15 Embryonen; entspricht ca. 2×10^8 EF-Zellen). Das Gemisch wurde dann durch ein feines, goldbeschichtetes Metallsieb gegeben, um die Zellen von den Glaskügelchen zu trennen. Anschließend wurden jeweils 2×10^6 Zellen auf 10 cm Zellkulturplatten ausplattiert und in EF-Medium vermehrt. Eine Platte wurde mit 1 mg/ml G418 versetzt, um zu überprüfen, ob die EF-Zellen eine Neomycin-Resistenz trugen. Der Rest der Zellen wurde dann für eine spätere Verwendung in EF-Medium mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert (jeweils $\sim 5 \times 10^6$ Zellen/ 2 ml Kryobehälter).

3.1.4 Mitomycin C Behandlung der Feederzellen

Die EF Zellen müssen, bevor sie mit ES Zellen in Berührung kommen, mitotisch inaktiviert werden. Daher wurden die frisch aufgetauten EF Kulturen mit 10 µg/ml des Zellgiftes Mitomycin C (MMC) behandelt. Jeweils eine konfluente Platte ($\sim 5 \times 10^6$ Zellen) wurde einmal in MT-PBS gewaschen und mit 4 ml EF-Medium + 40 µl MMC (100x Lösung in 15% DMSO) versetzt. Die Zellen wurden nun für 2-6 Stunden in einem Inkubator bei 37°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in MT-PBS, bevor die EF-Zellen trypsinisiert werden konnten (s.o.). Den abgerundeten Zellen wurde 7 ml EF-Medium hinzugegeben und das Gemisch mit ~ 2000 U/min abzentrifugiert. Die mitotisch inaktiven EF-Zellen wurden abschließend auf Gelatine-beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert.

3.1.5 LIF Produktion

Das 20 kDa Glycoprotein *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF) ist essentiell, um embryonale Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand zu behalten. Gewonnen wurde es aus pLIFD-transfizierten CHO Zellen (Ursprung: Genetics Institute Cambridge Massachusetts; freundlicherweise Überlassen von A. Egert/K. Rajewsky; Köln). Die LIF-CHO Zellen wurden in α -DMEM (mit L-Glutamin, ohne Ribonucleotide und Desoxyribonucleotide; Gibco #22561-021) mit 10% FCS für drei Tage expandiert und anschließend mit 0.1 μ M Methotrexate (MTX) versetzt. MTX selektioniert auf LIF produzierende Zellen und verbleibt für 4 Tage im Wachstumsmedium. Für die LIF Ernte wurde das MTX-Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte ein zweistündiges Wachstum der CHO Zellen in Standard-DMEM ohne MTX. Danach wurden die Zellen 1:2 passagiert und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde der Überstand abgenommen, durch ein 0.2 μ m Sieb gefiltert und bei -80°C für eine weitere Verwendung eingefroren.

3.1.6 Cresyl Violet Färbung

Die Färbung von Zellen mit dem kationischen Cresyl Violet dient der Identifizierung von Nissl Körpern, die ein kennzeichnendes Merkmal differenzierter Neuronen darstellen. Cresyl Violet ist nicht in reinem Wasser löslich und muss daher in einer moderat depolarisierten Lösung, so z.B. Ethanol (für Waschschrte) oder angesäuertem Wasser gelöst werden. Die Färbelösung wurde daher wie folgt angemischt:

1 g	Cresyl Violet
10 ml	Glycerin
0.5 ml	Natriumacetat [1M]
1 ml	Essigsäure
90 ml	MT-PBS

Differenzierte ES Zellen wurden für 20-30 min mit der Färbelösung überschichtet und anschließend 5x mit MT-PBS gewaschen. Es folgten mehrere Waschschrte mit aufsteigenden Konzentrationen an Ethanol. (3x für 10 min mit 70%igem Ethanol, gefolgt von 1x für 2 Stunden mit 80%igem Ethanol und abschließend 1 Stunde mit 95%igem Ethanol plus 1% Essigsäure auf einem Schüttler). Die gefärbten Zellen wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop photographiert.

3.1.7 DNA-Extraktion aus Blut

Jeweils 16 ml Blut wurde bei 3000 U/min für 15 min bei Raumtemperatur in einem 50 ml Reagenzbehälter abzentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abgenommen und das verbliebene Zellpellet mit Lösung S1 auf 50 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde sorgfältig gelöst und für 30 min auf Eis gekühlt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 min bei Raumtemperatur. Etwa 40 ml des Überstandes wurden abgenommen und das restliche Gemisch erneut mit Lösung S1 auf 50 ml aufgefüllt. Nach Resuspension verblieb die Lösung für 20 min auf Eis und wurde abschließend ein drittes Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 6 ml Proteinase K-Lösung versetzt. Die Zellen wurden dann für 16-20 Stunden unter ständigem Schwenken auf einem Schüttler verdaut. Die genomische DNA wurde danach mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion (s.u.) extrahiert.

Lösung S1:	0.32 M	Saccharose
	10 mM	Tris, pH 7.5
	5 mM	MgCl ₂
	1 % [v/v]	Triton X-100
	x ml	H ₂ O

3.1.8 DNA-Extraktion aus ES-Zellen

Um genomische DNA aus ES Zellen zu gewinnen, wurde eine Methode (nach Torres & Kühn, 1997) ohne Phenol/Chloroform verwendet.

Für eine 10 cm Platte: Die ES Zellen wurden bis maximal 5×10^6 Zellen auf unbeschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Feederzellen oder Gelatine wurden nicht verwendet, da beide für eine DNA Präparation von Nachteil sind. Die Zellen wurden 1x in MT-PBS gewaschen, in 3 ml Trypsinlösung dissoziiert und in 7 ml DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml Reaktionsgefäßen für 5 min mit 2000 U/min sedimentiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die ES Zellen in ein 15 ml Polypropylen-Gefäß überführt und in 5 ml Lysis Puffer A resuspendiert (siehe Materialien). Die Zellen wurden dann unter stetigem Schwenken auf einem Rotor bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Das Zellysat wurde dann mit 5 ml Isopropanol vermischt, bis ein deutliches Präzipitat sichtbar wurde. Die genomische DNA wurde anschließend mittels einer Mikro-Glaskapillare, die an den Enden durch Schmelzen auf einer Bunsenbrenner-Flamme verschlossen wurde, aufgespult. Da einige Salze, die bei einer späteren Restriktionsanalyse der DNA unerwünscht sind, in Isopropanol weniger

löslich sind als in anderen Alkoholen (z.B. Ethanol) und daher mit der DNA präzipitieren können, wurde die gewonnene DNA kurz in 70%igem Ethanol gewaschen und abschließend an der Luft für 15-30 Minuten getrocknet. Für eine spätere Verwendung wurden abschließend die Glaskapillaren mit der anheftenden DNA in 1,5 ml Eppendorf Gefäße mit 1 ml TE überführt.

3.1.9 Ernte und Vermehrung einzelner ES-Zell Klone

Um einzelne, klonal abgeleitete ES-Zelllinien zu erhalten wurden, die ES-Zellen nach einer sorgfältigen Trypsinisierung (s.o.) auf Feederzellen ausplattiert. Die Zelldichte der ES Zellen wurde so gewählt, daß nur wenige Zellen (maximal ~ 10 Zellen/cm²) anwachsen konnten. Die entstandenen Kulturen wurden für mindestens 10 Tage kultiviert. Das Nährmedium (ES-DMEM) wurde parallel alle 2 Tage gewechselt. (Aus den Einzelzellen sollten zu diesem Zeitpunkt Kolonien herangewachsen sein, die deutlich mit bloßem Auge zu beobachten sind). Diese klonalen Kolonien umfassten etwa 3000-5000 ES Zellen und wuchsen teilweise in die Höhe. Es wurde darauf geachtet, daß der Rand der zu isolierenden Kolonien glatt war, um eine Ernte von bereits differenzierten ES Zellen auszuschließen. Die ES Kolonien wurden nun mit MT-PBS gewaschen und mit 12-15 ml MT-PBS (20- max. 25°C) überdeckt. Mit Hilfe eines sterilen Skalpells wurden einzelne Klone abgetrennt, mit einer 200 μ l Pipette aufgenommen und schließlich in 48-Loch (*48-well plates*, Nunc) Platten transferiert. Die Klone wurden dann mit je 50 μ l Trypsinlösung überschichtet und durch Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Es folgte die Zugabe von 150 μ l ES-DMEM/Klon mit anschließendem Transfer der Zellösung in 24er Zellkulturplatten (*24 well plates*), die zuvor mit MMC behandelten Feederzellen beschichtet wurden. Die ES-Klone wurden jeweils so weitervermehrt (*24 well* \rightarrow *12 well* \rightarrow *6 well*), daß nach etwa 14 Tagen die Zellen für weitere Experiment auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert werden konnten.

3.1.10 Reverse Transcriptase (RT)-PCR Analyse

ES-Zellen: Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA entweder aus ES-Zell-Kulturen oder aus *embryoid bodies* mit Hilfe des *Rneasy-RNA Isolation Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Mausgewebe: Alle Mausgewebe wurden frisch präpariert und vor der Überführung in einen Rneasy-Lysis Puffer in einem Mörser unter flüssigen Stickstoff pulverisiert. Die aufgearbeitete RNA wurde nun mit je 20U/ μ g RNA des RNase Inhibitors RNasin[®] behandelt, so daß eine vorzeitige

Degradation der RNA vermieden werden konnte. Um zu gewährleisten, daß keine genomische DNA in den Reaktionen vor einer PCR überführt wurde, wurden alle Proben mit einer RNase-freien DNase I behandelt:

1. Ansätze mit jeweils 5 µg RNA wurden wie folgt angemischt:

RNA in Nuclease freien H ₂ O	x µl
10x DNase Puffer	1 µl
4 U/µg DNase I (Sigma)	2 µl
Nuclease freies H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen:	10 µl

2. Inkubation der Ansätze für 30 min bei 37°C.
3. Terminierung der DNase Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA [25 mM] und anschließender 45 minütiger Erhitzung auf 68°C

Jeweils 5 µg der aufgereinigten ES- und Gewebe-RNAs wurden dann mit *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT, Promega) zu cDNA umgeschrieben:

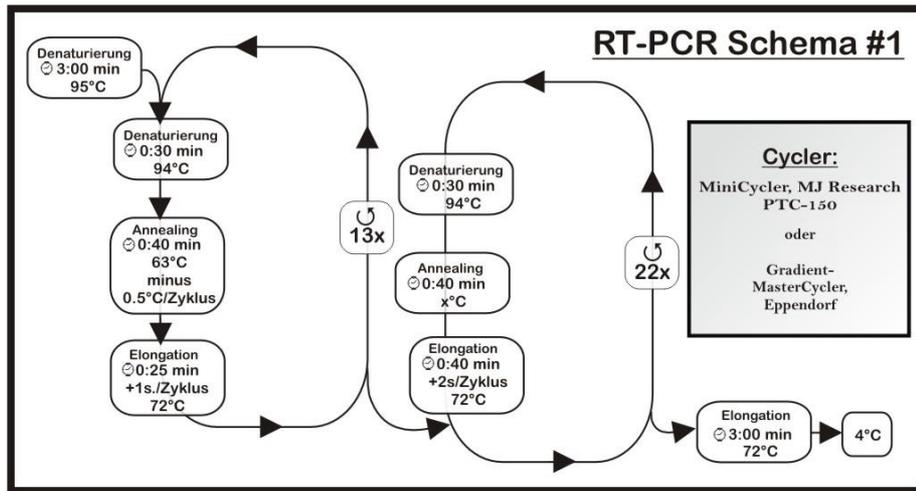
Je Ansatz:

RNA in Nuclease freien H ₂ O	x µl
5x M-MLV Reaktions-Puffer	1 µl
Mix dNTPs, je 10mM	5 µl
Random Primer (3 µg/µl, Gibco)	3 µl
rRNasin [®]	25 Units
Nuclease freies H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen:	20 µl

Alle Ansätze wurden für 5 min auf 70 °C erhitzt, sofort auf Eis transferiert und anschließend mit 200 Einheiten M-MVL Reverser Transcriptase versetzt. Die Proben wurden sodann jeweils (parallel zu einer Negativ-Kontrolle ohne Reverse Transcriptase) für 30 min bei 42°C und danach für 60 min bei 37°C in einem Thermalcycler inkubiert. Um inhibierende Reaktionen während der anschließenden Polymerase Kettenreaktion (PCR) zu verhindern wurde die RNA in den Proben durch Zugabe kleiner Mengen RNase H (~10 µg/Ansatz) zerstört. Die Lagerung der cDNAs erfolgte bei -20°C.

Methoden

Die generierten cDNAs wurden nach zwei möglichen PCR Protokollen in einem Volumen von 50 μ l amplifiziert:

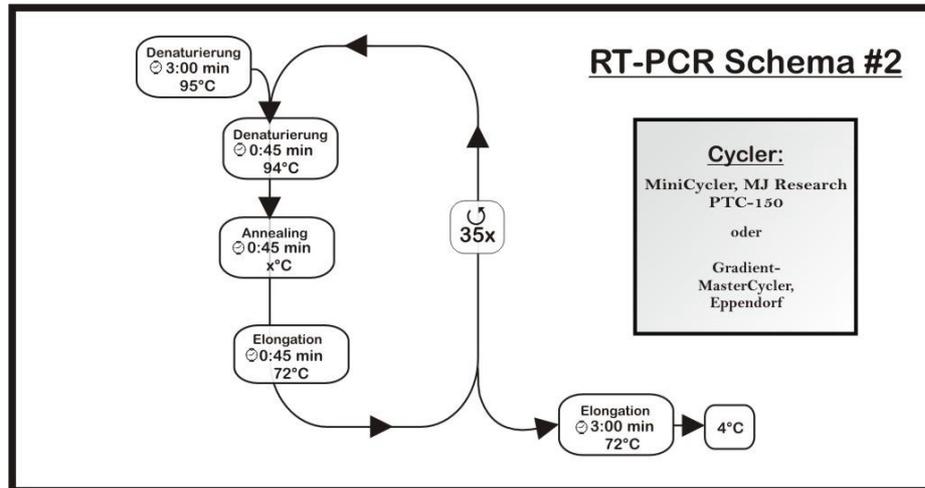


Alle neuen Primer wurden aus Datenbankbeständen mit Hilfe des Programms: *DNAClub* (von Xiongfong Chen, USA) ermittelt. Folgende Transkripte wurden nach Protokoll 1 amplifiziert:

Primer	Primer-Sequenzen	Annealing Temperatur
Synaptophysin (Syn)	F: 5' -GCCTGTCTCCTTGAACACGAAC-3'	55°C
	R: 5' -TACCGAGAACAACAAAGGGC-3'	
68 kDa Neurofilament (NFL)	F: 5' -CCAGGAAGAGCAGACAGAGGT-3'	54°C
	R: 5' -GTTGGGAATAGGGCTCAATCT-3'	
SmN	F: 5' -TGTTGACAACGGCTATTGTG-3'	55°C
	R: 5' -TTGCAGGATACATCTCATCATCCT-3'	
Snurf Exon 1-3	F: 5' -GAGATGCCAGACGCTTGGTTCTG-3'	53°C
	R: 5' -CCTTGAATTCCACCACCTTGAAG-3'	
Pck-1	F: 5' -CATTGCCTGGATGAAGTTTGAT-3'	53°C
	R: 5' -CAGGTATTTGCCGAAGTTGTA-3'	
Snrpn U1-3	F: 5' -AAAGGAGCCTGACACATCCA-3'	55°C
	R: 5' -CCTTGAATTCCACCACCTTG-3'	
Snrpn U2-U3	F: 5' -GGTCCTGCTGAGCCAAAGAT-3'	55°C
	R: 5' -TGGTGTCTCAGCTAAGAATGCC-3'	
Gabrb3	F: 5' -ATTGGCGATACCAGGAATTCAGC-3'	50°C
	R: 5' -GTACAGCCAGTAACTAAGTTGA-3'	

Tab. 1: RT-Primersequenzen

Einige Transkripte wurden durch ein einfacheres Standardprotokoll amplifiziert:



Folgende Transkripte wurden nach Protokoll 2 amplifiziert:

Primer	Primer-Sequenzen	Annealing Temperatur
(+)-Kontrolle β-Tubulin	F: 5' -GGAACATAGCCGTAAACTGC-3'	58°C
	R: 5' -TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'	
Ndn	F: 5' -TCTGCGGGAGGCTAATCTTGCT-3'	55°C
	R: 5' -TCTTGCTCAGGTCTGCGTTGCT-3'	
Magel2	F: 5' -TTTGCTGGCATCCTATTTAGAG-3'	55°C
	R: 5' -TTGCGTCCTTGTATTCTAACTC-3'	
Frat3-RN	F: 5' -CTGGCGATTGTGATGGAGGG-3'	55°C
	R: 5' -GAAGTCCTGCTGACAGCCTG-3'	
Atp55-ps1	F: 5' -CCTCGATTGGCCACATTTTG-3'	55°C
	R: 5' -CCAACAATGCCACGTTTGCC-3'	
MKRN3	F: 5' -GGCTACTGAGGCAATCTTTAT-3'	58°C
	R: 5' -ACATCAAGCCAAACAGGATAAAA-3'	
(Plasmid)-Kontrolle	T7: 5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'	55°C
	SP6: 5' -TTAGGTGACACTATAGAATACTCA-3'	

Tab. 2: RT-Primersequenzen

3.1.11 Immunochemische Markierung differenzierter ES Zellen

Zu markierende ES-Zellen wurden entweder direkt auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert oder auf kleine, Laminin-beschichtete Glasplättchen überführt. Nach Differenzierung mit 20 nM STS (frühestens an Tag 12 der Differenzierungsphase s.o.) wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen für 30 min. (bei RT) mit 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (PBS; pH 7.4) fixiert. Die Zellen wurden danach in MT-PBS gewaschen und es folgte eine 10 minütige Permeabilisierung in 0.1% Triton X-100 in MT-PBS. Die differenzierten ES-Zellen wurden dann bei Raumtemperatur jeweils für 45 min mit den folgenden primären Antikörpern in Blockierungspuffer (BP; 5 % FCS in PBS) markiert.

Antikörper	Markierung	Herstellung	Herkunft
anti-NF-200 1:100 in BP	<i>High-molecular Neurofilament (200 kDa)</i>	Monoklonal/Maus	T. Mack, Köln
anti-GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	nd	S. Arnhold, Köln
anti-Tau 1:200 in BP	<i>Microtubule-associated protein Tau</i>	Polyklonal	T. Mack, Köln
anti-HNK1	<i>HNK-1 Carbohydrate-Epitope</i>	nd	S. Arnhold, Köln
anti-MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>	nd	S. Arnhold, Köln

Die Zellen wurden anschließend dreimal mit MT-PBS gewaschen und dann mit 400 μ l der sekundären Antikörper für weitere 45 min inkubiert (Goat anti-Rabbit-TR, 1:200; bzw. Goat anti-Mouse-TR, 1:200). Nach Entfernung des zweiten Antikörpers wurden die Zellen erneut dreimal in MT-PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd für eine weitere Verwendung im Dunkeln gelagert.

3.2 Bisulfit-Sequenzierung

3.2.1 Grundlagen

Seit der Entdeckung des 5-Methyl-Cytosins (5m-Cytosin) vor genau 50 Jahren (Hotchkiss, 1948) wurden mehrere Methoden zur Untersuchung und Sequenzierung dieser modifizierten DNA-Base entwickelt. Die wohl am häufigsten genutzte Methode beruht auf der Analyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen (Southern, 1975), welche zwischen Cytosin und 5m-Cytosin unterscheiden können. Aus dieser Methode entwickelte sich ein quantitativer Test zur Bestimmung der DNA-Methylierung unter Nutzung der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR). In dieser Methode wird nach Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen die noch nicht-geschnittene, intakte DNA amplifiziert, auf einem Gel aufgetrennt und anschließend densitometrisch

quantifiziert (Singer-Sam *et al.*, 1990). Andere Methoden der DNA-Sequenzierung, ursprünglich entwickelt von Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert, 1980) nutzen eine chemische Spaltung zur Analyse. Diese Methode wird in modifizierter Form, mit Hilfe einer PCR (Saluz & Jost, 1986) beziehungsweise einer Ligations-gebundenen Polymerase-Kettenreaktion, "LMPCR" (Mueller & Wold, 1989; Pfeifer *et al.*, 1989) noch heute in vielen Labors zur Sequenzierung der DNA eingesetzt. Alle diese Methoden der chemischen Trennung benötigen jedoch viele Ziel-Moleküle um ein Sequenz-Profil erstellen zu können. Folglich sind diese Methoden nicht geeignet um die Methylierung bestimmter Abschnitte des Genoms in einer kleineren Zahl von Zellen zu studieren. Ein großer Fortschritt für die Untersuchung an einzelnen 5m-Cytosinen brachte die Entwicklung der selektiven Basen-Konversion der DNA durch Bisulfit.

Basis dieser Methode ist die Eigenschaft des Bisulfits, effizient Cytosin-Reste in Uracil zu verwandeln, während 5-Methyl-Cytosin unverändert bleibt (Hayatsu *et al.*, 1970; Wang *et al.*, 1980). Bei der anschließenden Amplifikation mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden alle Uracil-Moleküle als Thymin gelesen, während die 5m-Cytosine weiterhin als Cytosin erkannt werden.

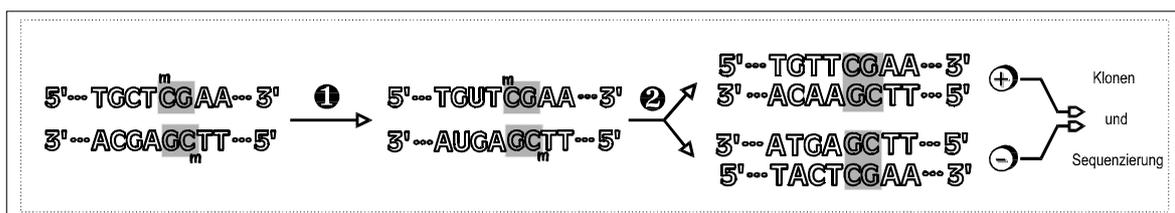


Abb. 5: Schematisches Diagramm der Bisulfit-Methode der genomischen Sequenzierung. Die Konversion von Cytosin zu Uracil produziert nicht Basen-komplementäre DNA (z.B. G≠U). Die DNA kann anschließend durch Wahl separater Primer strand-spezifisch amplifiziert und sequenziert werden. 1: Bisulfit-Konversion; 2: PCR-Amplifikation; Methyl-Cytosin-Reste sind in der Sequenz durch ^mC dargestellt; + = Plus (Sense)-Strang; - = Minus (Antisense)-Strang.

Ein Cytosin-Molekül kann über sein C5-Atom Addukte mit zahlreichen Substanzen, inklusive dem Bisulfit-Ion bilden. Diese relativ langsame Reaktion mit Natrium-Bisulfit ($12 \cdot \text{NaHSO}_3 \cdot 3 \text{Na}_2\text{SO}_3$) wird bei niedrigem pH katalysiert. Diese Reaktion ist hochgradig Einzelstrang-spezifisch, so daß sie auch zur Unterscheidung zwischen Einzel- oder Doppelsträngiger DNA-Regionen Verwendung finden kann (Shapiro *et al.*, 1973). In wässriger Lösung wird das Cytosin-Bisulfit-Addukt unter Abspaltung der NH_2 -Gruppe zum Uracil- SO_3 -Derivat desaminiert. Bei der anschließenden Alkali-Behandlung wird dieses Zwischenprodukt zu Uracil desulphoniert.

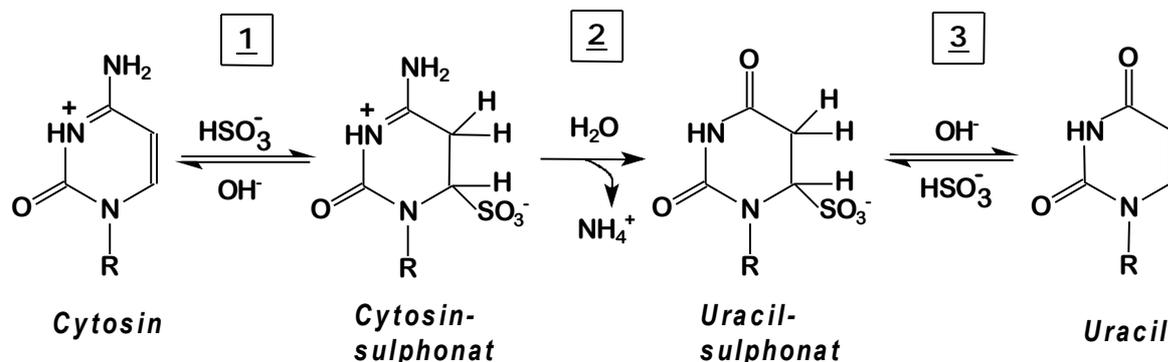


Abb. 6: Chemischer Ablauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil. Schritt 1: Sulphonierung; Schritt 2: Hydrolytische Desaminierung; Schritt 3: Alkali-Desulphonierung.

Für eine erfolgreiche Cytosin-Konversion sind mehrere Parameter von Bedeutung. Die meisten Protokolle weisen auf eine stringente Denaturierung der Ziel-DNA hin, andere auf die frische Präparation der Bisulfit-Lösung, intensive Entsalzung und vollständige Desulphonierung durch stringent alkalische Konditionen (Feil *et al.*, 1994; Reeben & Prydz, 1994; Martin *et al.*, 1995; Raizis *et al.*, 1995). Für diese Arbeit wurde ein neues Protokoll entwickelt, welches diese Parameter möglichst effizient ausnutzt (Abgeleitet nach Zeschnigk *et al.*, 1997).

3.2.2 Durchführung

Für die untersuchte Region ASSRO auf dem menschlichen Chromosoms 15 wurde eine klassische Methode (nach Zeschnigk *et al.*, 1997) , für die anderen Regionen die neue Vorgehensweise (s.u.) angewandt. Dieses Protokoll liefert eine Identifizierung bestimmter 5-Methylcytosine in spezifischen DNA-Strängen individueller Chromosomen.

3.2.2.1 Wahl der Primer-Sequenzen

Die Primer für die Amplifikation der zuvor Bisulfit-behandelten DNA wurden soweit wie möglich nach folgenden Kriterien erstellt:

- ◆ Die Länge sollte zwischen 30 und 36 Nukleotiden liegen, um eine adäquate Hybridisierung der A/T-reichen Bisulfit-DNA zu gewährleisten.
- ◆ Um eine ausgewogene Hybridisierung über den gesamten konvertierten Bindungsbereich zu garantieren, sollte die gesamte Primer-Sequenz eine möglichst gleichmäßige Cytosin-Verteilung besitzen.
- ◆ Wenn möglich sollten keine CpG-Dinukleotide enthalten sein. Ist dies nicht zu umgehen, sollten an dieser Stelle eine C/T respektive eine A/G-Mischung bei der Primer-Synthese verwandt werden.
- ◆ Die Sequenzen sollten wenig interne oder zwischen den Primer-Paaren liegende komplementäre Sequenzen besitzen.
- ◆ Die Enden sollten C oder G enthalten, um die Bindung der Primer zu festigen.
- ◆ Die Primer sollten eine relativ hohe und annähernd gleiche Schmelztemperatur besitzen.

Um eine ausreichende Menge Amplifikations-Produkt zu erzielen, wurde für jede untersuchte Region ein innerhalb des ersten Primerpaares liegendes Oligonukleotid-Primerpaar entworfen, mit der eine zweite "nested" Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt wurde. Für beide DNA-Stränge Plus (Sense) und Minus (Antisense) wurden Primer entworfen. Die resultierenden Nukleotidsequenzen sind in Tab.vv dargestellt:

Tabelle 3: Bisulfit Primer-Sequenzen

Region	DNA-Strang	Amplifikation	Nukleotid-Sequenz
Y48.5	Plus:	1.PCR	A: 5'-TAAATGGGTA TGATTTAGTG GTAATAATTT GAGG-3' B: 5'-AACCTTTTAT CTCCTCCAAT CCCACAATCA-3'
		2.PCR	A: 5'-GTTAGATTGT TGAGATTTTT TTTGGTTTTT G-3' B: 5'-TAAACTTTAA ACCCCTCTTC TCCT-3'
	Minus:	1.PCR	A: 5'-CAAATAAATA TAACCTACTA ACAATAATCT AA-3' B: 5'-AGTTTTTTTAT TTTTTTTAGT TTTATAATTA-3'
		2.PCR	A: 5'-ACCAAATCTA TTCAAATCT TCTTAATCTC TA-3' B: 5'-TGAATTTTAG GTTTTTTTTT TTTT-3'
AS-SRO	Plus:	1.PCR	A: 5'-GATTTAATTG TATAATTTAA TTATTTTTTT AT-3' B: 5'-CCTCCAACAC ATACTCTTTC AATCATTATC TAC-3'
		2.PCR	A: 5'-ATTTTTTTAT TTTTGGATA TAGTTTTTTT TT-3' B: 5'-CTACTTAAAA AAATACTTCA CCTAAATAAC TC-3'
	Minus:	1.PCR	A: 5'-ATTTAACTAC ATAATTTAAT TATTTCCCC-3' B: 5'-GTATATATTT TTTTAATTAT TATTTATTG G-3'
		2.PCR	A: 5'-ATTTCCCCAT TTTTAAATA CAATCTTTTC TC-3' B: 5'-TATTATTTAT TTGGAAGGGT ATTTTATTG GG-3'
LINES	Plus:	1.PCR	A: 5'-GGAGTTATTT TTTAATAAAT TTATTATAAG-3' B: 5'-CATCATAATT TAACAAAAAA TAAAAAATAC C-3'
		2.PCR	A: 5'-GTAAATGAAA AATGTTTTTA GTATATTTAA TG-3' B: 5'-CATAAAAAAA AATATTAATA AATTAATCTA CATCC-3'
	Minus:	1.PCR	A: 5'-CCTCCTAATA AACCTACTAT AAATTAATAA C-3' B: 5'-GTTTTTTGAG TATAATATAA TATAGGAGGG-3'
		2.PCR	A: 5'-CACTATAAAT AAAAAATACT TTTAATACAC C-3' B: 5'-GTATAAAGGA AAATATTGAT GAATTAGTTT G-3'

3.2.2.2 Bisulfit-Behandlung

Genomische DNA, isoliert aus Lymphozyten von Prader-Willi u. Angelman-Patienten (zur Verfügung gestellt von Prof. B. Horsthemke, Universitäts-Klinikum Essen), zwei gesunden Probanden und Maus-DNA, wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bam*HI oder *Pst*I (je 4U/ μ g) vorgespalten um kleinere DNA-Fragmente zu erhalten. (Die Zielsequenz darf in diesem Fall keine dieser Schnittstellen enthalten). Für jede Reaktion wurden 5 μ g in einem Volumen von 50 μ l gemäß den Herstellerangaben gespalten. Danach folgte die Denaturierung der DNA durch Zugabe von 6 μ l 3M NaOH (0.36 M Endkonzentration) und 10 M Harnstoff gefolgt von einer Inkubation für 15 Minuten bei 50°C.

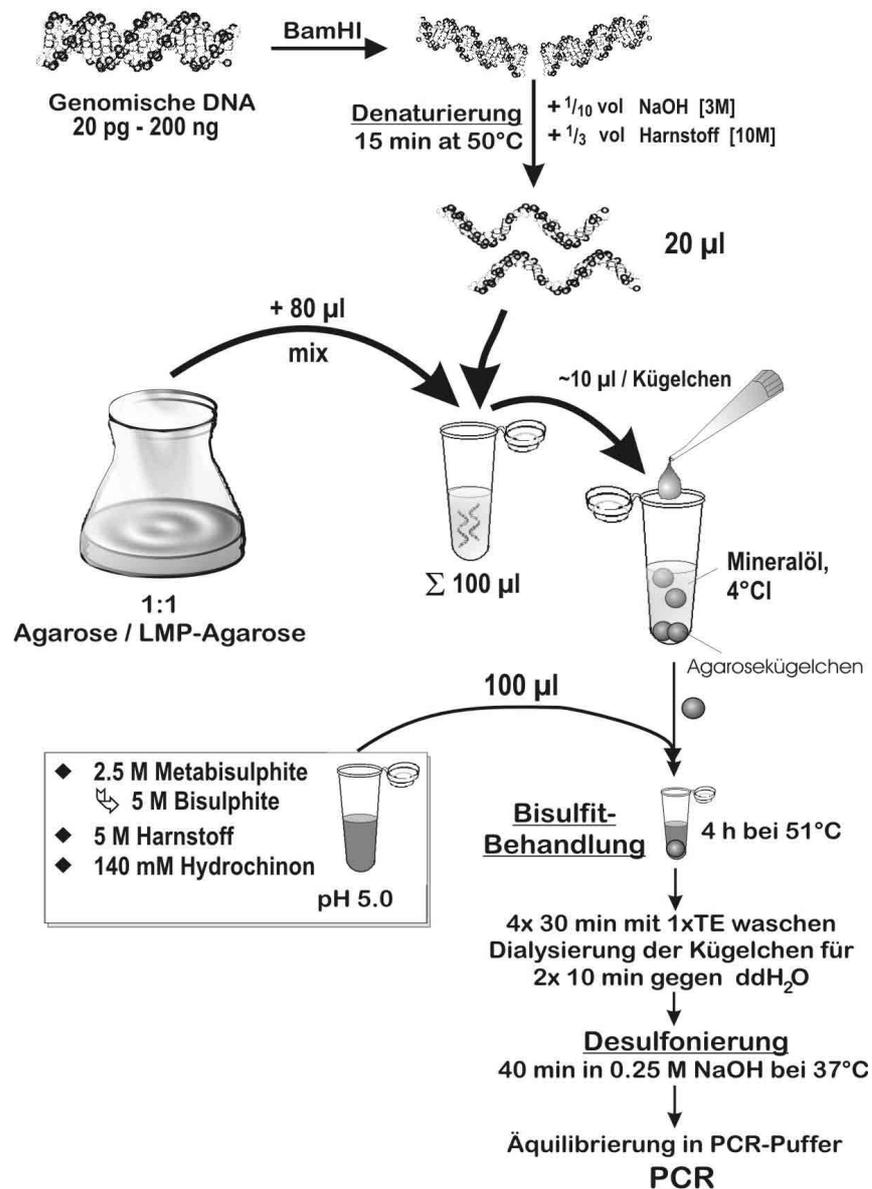


Abb. 7: Neues Bisulfitprotokoll mit intensiver Denaturierung durch Harnstoff. Kleine Agarosekügelchen arretieren die DNA während der Bisulfit-Behandlung als Einzelstränge.

Während dieser Inkubation wurde die Bisulfit-Lösung präpariert (siehe nächster Abschnitt). Eine vollständige Trennung der DNA-Stränge wurde durch Aufkochen der Proben in einem Wasserbad gefördert. Die noch heiße Lösung wurde mit 0,8 % Agarose gemischt (siehe Abb. gg). In diesem Zustand darf die Agarose nicht erneut aufgekocht werden! Jeweils 10 µl der noch flüssigen Agarose/DNA Mischung wurde vorsichtig in eiskaltes Mineralöl überführt, wodurch sich kleine Agarosekügelchen bilden, die im Anschluss in die Bisulfitlösung gegeben wurden. Nach Abkühlung auf Eis wurden jeweils 1 ml der frisch angesetzten Bisulfit-Lösung zu den DNA-Proben gegeben, mit Mineralöl überschichtet und bei 51°C im Wasserbad für 4 Stunden erhitzt.

3.2.2.3 Präparation der Bisulfit-Lösung

4.1g Metabisulfit (3.1 M; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5^*$) wurde in einem verschließbaren 50 ml Reaktionsröhrchen zu 8 ml entgastem[♦], deionisiertem Wasser gegeben, mit N_2 begast und anschließend bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gelöst. Um diesen Lösungsvorgang zu verbessern und oxidative Prozesse durch nicht vollständig entfernten Sauerstoff zu verhindern, wurde die Bisulfit-Lösung mit 250 μl frisch präparierter Hydrochinonlösung (140mM) versetzt. Dieses α,β -ungesättigte Di-Keton wird durch Oxidation in das nahezu energetisch gleichwertige *p*-Benzochinon überführt und wirkt somit als Inhibitor der Bisulfit-Oxidation. Es folgte die Zugabe von 5 M Harnstoff. Durch Zugabe von 300 μl , frisch angesetzter 10M NaOH wurde die Bisulfit-Lösung anschließend auf pH 5.0 justiert.

* Festes Metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) zerfällt in wässriger Lösung zu $12 \cdot \text{NaHSO}_3 \cdot 3 \text{Na}_2\text{SO}_3$.

♦ Um nicht-spezifische Nebenreaktionen, die zur Oxidation des Bisulfits führen können zu verhindern, muss im Wasser gelöstes O_2 gründlich entfernt werden.

3.2.2.4 Desulphonierung

Nach Entfernung des Mineralöls wurden die Agarosekügelchen 4x für 30 min in 1x TE gewaschen und anschließend zweimal für 10 min in H_2O dialysiert. Die Kügelchen wurden anschließend in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß unter H_2O vereinigt. Es wurde 0.25 M NaOH zugegeben und diese Proben für 40 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Agarosekügelchen konnten anschließend direkt in einer PCR Reaktion beigefügt werden. Durch Erhitzen der Agarose wird die DNA freigesetzt und kann amplifiziert werden.

3.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Analyse mit Bisulfit behandelte DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion existieren mehrere mögliche Einsatzgebiete. Eine Anwendung war die Identifizierung von ungewöhnlicher Cytosin-Methylierung der Tumor-Supressor-Gene in Tumor-Gewebe von Krebs-Patienten (Herman *et al.*, 1996), die Entdeckung von Mutationen in GC-reicher DNA (Guldberg *et al.*, 1998) oder die Diagnostik von Erbkrankheiten wie das Prader-Willi- oder Angelman-Syndrom (Kubota *et al.*, 1997; Zeschnigk *et al.*, 1997^b). Wie auch in dieser Arbeit, so wurde die PCR dazu eingesetzt, um ein genaues, DNA-Strang spezifisches Methylierungs-Muster eines bestimmten Chromosomenabschnittes zu bestimmen; so zum Beispiel die Identifizierung des

Methylierungs-Musters des menschlichen pS2- oder des Ornithin Decarboxylase-Gens in Tumor-Zelllinien (Martin *et al.*, 1995; Myöhänen *et al.*, 1994). Für alle in dieser Arbeit untersuchten Regionen wurden zwei aufeinanderfolgende Reaktionen durchgeführt, um eine ausreichende Menge Amplifikations-Produkt für die Klonierung zu erhalten. Üblicherweise liefert eine einmalige Polymerase-Kettenreaktion kein oder nur eine geringe Menge Produkt, möglicherweise durch Degradierung vieler DNA-Moleküle während der Bisulfit-Reaktion und durch die reduzierte Komplexität der Cytosin-Konvertierten DNA.

Für die Amplifikation der Zielsequenzen wurden 200-1000 ng der Bisulfit-behandelten DNA (in Agarosekügelchen, äquibriert in PCR Puffer) in einem Gesamtvolumen von 100 μ l in einer Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Diese erste Reaktion wurde mit den äußeren Primerpaaren durchgeführt. Eine Standard-PCR wurde wie folgt angesetzt:

- 1 Agarosekügelchen
- 10 μ l 10x Puffer
- 6.8 μ l [25 mM] MgCl₂ (\rightarrow 1.7 mM)
- 2 μ l [10 μ M] dNTP's (\rightarrow 200 μ M)
- 2 μ l (1 μ g/Primer) Primer-Mix
- 1 μ l Taq-Polymerase (2.5 U; Promega)
- 73.2 μ l ddH₂O

Um eine vollständige Denaturierung der DNA und Lösung der Agarose zu Beginn der ersten PCR zu gewährleisten, wurden die Proben zuerst für 3 Minuten im Thermal-Zykler auf 95°C erhitzt. Die Amplifikation wurde dann in 38 sich wiederholenden Zyklen durchgeführt:

- 38x:**
- 1 Minute Denaturierung bei 94°C
 - 1 Minute Primer-Bindung bei 51°C
 - 1:30 Minute Kettenverlängerung bei 72°C

Nach Beendigung der PCR wurde die DNA bei 4°C gelagert. Die Amplifikation wurde durch Auftrennung von 10 μ l des Produktes auf einem 2%igen Agarosegel getestet. (Gewöhnlich konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine DNA-Banden beobachtet werden). Es folgte eine Reamplifikation der Ziel-Sequenzen mit den internen "nested" Primern mit Einsatz von 5 bis 9 μ l des Produktes aus der ersten PCR. Eine erneute der Amplifikation vorangestellten Denaturierung war nicht notwendig. Der Programmverlauf dieser zweiten Polymerase-Kettenreaktion entsprach dem der ersten Reaktion, jedoch wurden nur 35 Zyklen durchlaufen. Zum abschließendem Test der Amplifikation wurden 5-10 μ l der PCR-Produkte auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt.

3.2.2.6 Klonierung der PCR-Produkte

Zu den aus der zweiten PCR-Reaktion stammenden Proben wurde $\frac{1}{10}$ Volumen 6 M Ammoniumacetat und vierfaches Volumen eiskaltes EtOH (100%) gegeben und der Ansatz anschließend bei 13000 U.p.M. (12000 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit 70%igem Ethanol in einem weiteren fünfminütigen Zentrifugationsschritt gewaschen, luftgetrocknet, in 20 μ l TE-Puffer resuspendiert und auf einem 2%igem TAE-Agarosegel (LMP-Agarose) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach kurzer Färbung der DNA mit einer frischen Ethidiumbromid-Lösung wurde die unter UV-Licht sichtbare DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, und das resultierende Gel-Stück in einen 1.5 ml Reaktionsgefäß auf einer Feinwaage gewogen. Um das anschließende Schmelzen der Agarose (15 Minuten bei 50°C im Wasserbad) zu erleichtern und die DNA freizusetzen, wurde die dreifache Menge (relativ zum Gelgewicht) Natriumiodid (NaI) zugegeben. Die DNA wurde dann mit einer Silika-Matrix aus der Lösung isoliert (Protokoll siehe vorstehenden Abschnitt zur Desulphonierung) und in 20 μ l ddH₂O eluiert. Jeweils 3-5 μ l der Bisulfit-DNA wurde in einer folgenden Ligation in einen T-Überhang-Vektor eingesetzt.

In dieser Arbeit fanden zwei unterschiedliche Vektoren Verwendung. Der lineare Vektor pT7Blue[®] (Novagen) basiert auf einem zirkulären pUC19-, der Vektor pGEM[®]-T (Promega) auf dem zirkulären pGEM[®]-5Zf(+)-Plasmid mit an ihren 3'-Enden addierten terminalen Thymidinen. Diese an den Insertionsstellen gelegenen 3'-T-Überhänge erleichtern die Ligation eines PCR-Produktes in das Plasmid, indem sie die Rezirkularisierung des Vektors verhindern und einen kompatiblen Überhang für die PCR-Fragmente darstellen. Viele hitzestabile Polymerasen, wie auch die verwendete Taq-Polymerase (Promega), erzeugen sequenz-unabhängig 3'-A-Nukleotid-Überhänge an ihren Reaktionsprodukten (Clark, 1988; Marchuk *et al.*, 1990) und lassen sich daher effizient in diese Vektoren ligieren. Die Insertionsstelle, in der die DNA-Fragmente kloniert wurden, enthalten die α -Peptid codierende Region des Enzyms β -Galactosidase. Eine Insertion inaktiviert das α -Peptid und erlaubt die Identifizierung rekombinanter Klone durch eine Blau/Weiß-Selektion auf Indikator-Platten. Für eine Standard-Ligationsreaktion wurden jeweils 50 ng (0.03 pmol) des Vektors in einem Gesamtvolumen von 10 μ l eingesetzt:

Standard	<ul style="list-style-type: none"> • 1 μl 10x Ligations-Puffer
Ligationsansatz:	<p>(pT7Blue: 200 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl₂) (pGEM-T: 300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0.5 μl DTT • 0.5 μl 10 mM ATP • 1 μl 50 ng/μl T-Vektor • 1 μl T4 DNA Ligase (3 Weiss Units/μl) • 3-5 μl Amplifikations-Produkt • <u>1-3 μl</u> dH₂O • <u>10 μl</u>

Die Ligationsreaktion wurde entweder für 16 Stunden bei 16°C oder für 40-50 Stunden bei 4°C im Wasserbad durchgeführt. In der anschließenden Transformation wurde jeweils der gesamte Ligationsansatz eingesetzt.

3.2.2.7 Transformation (nach Hanahan, 1983)

Die Fähigkeit, DNA durch Transformation effizient in Bakterien einzuschleusen, ist ein Schlüssel-Faktor für viele Prozeduren, wie das Erstellen von Phagen-Bibliotheken oder das Klonieren von großen DNA Fragmenten oder PCR-Produkten. Fast jeder Escherichia Coli (E.coli)-Stamm, so auch der in dieser Arbeit verwendeter restriktions-negative *XL1-Blue MRF⁻*-Stamm, ist in der Lage, mit Plasmiden transformiert zu werden. Um eine größtmögliche Transformations-Effizienz zu erreichen, ist die sorgfältige Wahl mehrerer Faktoren essentiell. Man fand, daß E.coli-Zellen besonders gut in ihrer logarithmischen Wachstumsphase und bei niedrigen Temperaturen (0-5°C) Plasmid-DNA aufnehmen können (Cosloy & Oishi, 1973). Die Fähigkeit der Zellen lineare DNA aufzunehmen, ist jedoch begrenzt und gegenüber zirkulärer DNA um einen Faktor von etwa 10^3 - 10^4 geringer (Hoekstra *et al.*, 1980). Ein anschließender Hitzeschock (42°C) erleichtert die Transformation. Durch andere Faktoren wie organische Lösungsmittel (DMSO, Nonidet-P40), milde Detergentien (z.B. PEG 8000) oder den Zusatz von Metall-Ionen wird der Vorgang stimuliert (Kushner, 1978). Viele dieser Faktoren wurden von Hanahan (1983) untersucht und daraus die für eine erfolgreiche Transformation optimalen Bedingungen abgeleitet. Dieses Protokoll bietet den Vorteil großer Zeitersparnis, jedoch können meist nicht so hohe Transformationsraten (definiert als Transformanden/ μ g Plasmid-DNA) im Vergleich zu

später entwickelten Methoden erzielt werden (10^3 - $10^5/\mu\text{g}$). Die in dieser Arbeit angewendete Methode richtet sich im wesentlichen nach diesen Bedingungen.

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurde eine Kolonie von einer frischen E.coli-Plattenkultur (*XL1BlueMRF*-Zellen) mit Hilfe einer sterilisierten Glas-Mikropipette entnommen und in 100 ml LB-Medium über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Übernacht-Kultur wurde in einen Erlenmeyerkolben in 50 ml SOB-Medium überführt und erneut bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0.35 (ungefähre Zelldichte $4\text{-}7 \times 10^7$ Zellen/ml) inkubiert. Die E.coli-Kultur wurde anschließend in einen 50 ml Polypropylen-Zentrifugen-Behälter gegeben und 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 4°C mit 750 g (2000 U.p.M.) für 12 Minuten sedimentiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Mediums durch Abklopfen der Behälter auf Papier-Tüchern wurden die Zellen in 15 ml TFB-Medium resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis aufbewahrt. Die XL1-Blue-Zellen wurden erneut wie im obigen Schritt zentrifugiert, das Medium entfernt und anschließend durch Resuspension in 4 ml TFB-Medium zu $\frac{1}{12}$ des Ausgangsvolumens konzentriert. Die Zell-Kultur wurde dann mit 140 μl (3.5% v/v) DnD-Lösung (DMSO + DTT) versetzt, mehrmals sorgfältig geschwenkt und auf Eis inkubiert. Nach Ablauf von 10 Minuten wurde ein weiteres Aliquot von 140 μl DnD hinzugegeben und für weitere 10 Minuten auf Eis aufbewahrt. Jeweils 200 μl der Kultur wurden anschließend in 15 ml-Polypropylen-Röhrchen aliquotiert, die Hälfte des vorher präparierten Ligationsansatzes (5 μl) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Hitzeschock-Behandlung der E.coli-Zellen durch einen Transfer in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad. Nach 90 Sekunden wurden die Zellen zum Abkühlen auf Eis gegeben. Zur Vermehrung der Zellen wurde nun 800-1000 μl SOC-Mediums zu den Proben pipettiert und diese dann für 60-70 Minuten auf 37°C in einem Inkubator moderat geschwenkt. Fraktionen von je 50, 200 und 400 μl wurden anschließend auf LB-Agarplatten (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) ausplattiert und für 14-20 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Selektion der ein Amplifikations-Fragment enthaltenden Klone

Die LB-Agarplatten, auf denen die Bakterien ausplattiert wurden, enthielten neben dem Selektionsfaktor Ampicillin zusätzlich 5 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) und 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brom-chlor-indolyl- β -galactosid (X-Gal) und ermöglichen somit die Identifikation positiver Klone durch Blau/Weiß-Selektion. Das synthetische Lactose-Derivat IPTG wird von den E.coli-Zellen aufgenommen, bindet dort an den Lac-Repressor und bewirkt

dessen Dissoziation vom Operator. In dessen Folge wird die Produktion der β -Galactosidase durch Aktivierung des Lac-Operons induziert. Der β -Galactosidase fehlen jedoch etwa 30 Aminosäuren, die dadurch ihre Enzymaktivität verliert. Diese Funktion kann durch das von den transformierten Vektoren produzierte α -Peptid komplementiert werden. Die funktionsfähige β -Galactosidase hydrolysiert die von der Zelle aufgenommene, farblose chromogene Substanz X-Gal zu einem Indolderivat, das durch Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert wird. Wurde in den jeweiligen Polylinker (*multiple purpose cloning site*) des T-Vektors das Amplifikation-Produkt erfolgreich inseriert, so blieben die Kolonien weiß. Die positiven, weißen Kolonien wurden mit Hilfe einer sterilen Glas-Mikropipette in 5 ml 2YT-Medium enthaltende Glasröhrchen gegeben und für 12-18 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Gewöhnlich enthalten jedoch nicht alle weiße Kolonien das gesuchte DNA-Fragment. Es ist auch möglich, daß Primer-Dimere in den T-Vektor ligieren, multiple Amplifizierungs-Produkte in den Vektor kloniert werden oder die DNA umgruppiert wird. Aus diesen Gründen wurden die Plasmide auf die Präsenz eines Amplifizierungs-Produktes untersucht. Dies geschah entweder mittels ein Lysis-Testes (s.u.) oder durch Aufreinigung der Plasmide (siehe unter 3.1.7) mit anschließender Spaltung durch geeignete Restriktionsenzyme und Identifikation positiver Plasmide durch Auftrennung auf einem Agarosegel. Von allen als positiv identifizierten Klonen wurden Glycerol-Vorräte angelegt, um bei Bedarf erneute Plasmid-Präparationen durchführen zu können.

3.2.3.1 Aufbewahrung der Bakterien

Jeweils 1.5 ml der nach der Blau/Weiß-Selektion präparierten Übernacht-Kulturen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für eine längerfristige Aufbewahrung mit sterilem Glycerin (87%) gemischt. In dieser 20%igen Glycerin-Lösung wurden die Klone bei -80°C aufbewahrt und nach Bedarf bei Raumtemperatur langsam aufgetaut.

3.2.3.2 Plasmid-Lysis-Test

Teile der sedimentierten Bakterien der Übernacht-Kulturen wurden mit Hilfe von sterilisierten Zahnstochern in 0.5 ml Reaktionsbehälter überführt. Den Proben wurden dann 10 μ l eines Ficoll/Orange G-Lysis-Puffers (Ficoll ist ein künstliches Copolymerisat aus Saccharose und Epichlorhydrin) zugegeben und auf einem Vortexer gründlich gemischt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert und

anschließend 5 Minuten mit 13000 U.p.M. (12000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde als nächstes auf einem TAE-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde so präpariert, daß beide Seiten in Kontakt mit dem Puffer standen, dessen Oberfläche jedoch nicht mit dem TAE-Puffer benetzt war. Die Plasmid-Proben wurden dann mit etwas TAE-Puffer versehen, so daß sie nach Einfüllen in die Gel-Taschen diese gerade bis zum Rand füllten. Die Proben wurden dann bei 60 Volt für etwa 10 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben befanden sich dann etwa 0.5 cm im Gel. Die Gel-Kammer wurde nun mit Puffer aufgefüllt, so daß auch die Oberfläche ausreichend mit Puffer bedeckt war. Die weitere Auftrennung der Proben erfolgte dann mit 100-120 Volt, bis der Orange G-Marker etwa bis zu der Hälfte des Gel gewandert war. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Anhand der Photographie konnte man mehrere Banden identifizieren, eine niedrige (weit aufgetrennte), die der RNA entsprach; darüber eine Plasmidbande und am oberen Rand des Gels eine weitere Bande mit genomischer, bakterieller DNA. Anhand einer Probe mit bekanntem Insert konnte im Vergleich zu den Plasmid-Banden die Kolonien identifiziert werden, die die gleiche Größe besitzen und daher aller Wahrscheinlichkeit nach das gesuchte DNA-Fragment tragen. Die als positiv identifizierten Plasmide wurden anschließend mittels einer Plasmid-Präparation (Kochlyse oder Genomed-Kit-Präparation, siehe nächster Abschnitt) aus den entsprechenden Kulturen isoliert.

3.2.3.3 Plasmid-Schnellpräparation durch Kochlyse (nach Holmes & Quigley, 1981)

Die XL1-Blue Übernachtskulturen wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 Sekunden mit 8000 U.p.M. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Bakterien-Sediment in 420 µl STET-Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend mit 25 µl frischer LysozymbLösung und 1 µl einer RNaseH-Lösung (10mg/ml) versetzt, für 3-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 90 Sekunden im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Nach zehnmütiger Zentrifugation (13000 U.p.M.) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA durch Zugabe von 28 µl 3 M Natrium-Acetats (pH 5.2) und 420 µl Isopropanol präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließend für 15 Minuten bei 13000 U.p.M. zentrifugiert, der Überstand verworfen und in einem weiteren fünfminütigen Zentrifugationsschritt in 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend an der Luft getrocknet und in 30 µl dH₂O resuspendiert.

3.2.3.4 Reinigung kleiner Plasmidmengen zur Sequenzierung

Um eine adäquate Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente zu gewährleisten, ist es notwendig, die DNA in einem höheren Reinheitsgrad zu verwenden, welcher mittels oben beschriebenen Kochlyse-Protokolls nicht erreicht werden kann. Daher wurden manche der Plasmide mit Hilfe des *Genomed Mini Kits* präpariert. Diese Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien (Birnbolm & Doly, 1979), grober Entfernung der Proteine und chromosomaler DNA mit einer Kaliumacetatlösung und anschließender Feintrennung in einer Genomed-Säule. Diese Säulen enthalten eine modifizierte Silika-Matrix, die auf dem Verfahren eines Anionenaustauschers basiert. Die Protein-Reste, RNA und andere Verunreinigungen werden durch einen salzhaltigen Puffer entfernt, während die Plasmid-DNA in der Säule zurückbehalten wird. Die DNA kann anschließend mit Wasser eluiert werden.

Zur Vorbereitung wurden 1.5 ml der XL1-Blue MRF'-Übernacht-Kultur in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 8000 U.p.M. (7400 x g) für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Medium wurde sorgfältig durch Ausklopfen auf Papier-Tüchern entfernt. Die Bakterien wurden in 210 µl Puffer G1 resuspendiert und so lange auf einem Vortexer vermischt, bis eine homogene Suspension erhalten wurde. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 210 µl der Lösung G2 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde durch 280 µl Puffer G3 neutralisiert für 10 Minuten (13000 U.p.M.) zentrifugiert und der Überstand in eine Silika-Säule überführt. Die Säule wurde erneut für eine Minute bei höchstmöglicher Geschwindigkeit zentrifugiert, der Durchfluß verworfen und mit 700 µl Waschpuffer G4 aufgefüllt. Nach zweimaligem Waschen durch erneute Zentrifugation konnte die Plasmid-DNA mit 50 µl auf 70°C temperiertem sterilen Wasser eluiert werden.

Durch spalten der Plasmide mit einem geeigneten Restriktionsenzym (s.u.) und nachfolgender Auftrennung auf einem Agarosegel wurde die Präsenz eines klonierten DNA-Fragmentes und die Konzentration des Plasmids überprüft. 1–5 µl DNA eines positiven Klons wurden anschließend in einer Sequenzierung verwendet.

3.2.3.5 Restriktionsanalyse der Plasmide

Etwa $\frac{1}{10}$ einer jeweiligen Plasmidpräparation durch Kochlyse oder durch Aufreinigung in Genomed-Säulen wurde mit dem Restriktionsenzym *PvuII* (12 U/ μ l) 1 Stunde bei 37°C gespalten und auf einem 1.5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. *PvuII* schneidet ein etwa 370 Basenpaar großes Fragment aus den verwendeten T-Vector-Plasmiden, welches auch die Klonierungsstelle der Amplifizierungs-Produkte enthält. Positive Klone konnten somit nach Gel-Färbung durch EtBr unter UV-Licht durch deutliche DNA-Banden von 700-1000 Bp identifiziert werden. Je nach Intensität der DNA-Banden wurden ungefähr je $\frac{1}{3}$ (200-500 ng) der ungeschnittenen Plasmide, die das gesuchte DNA-Fragment enthielten, in einer Sequenzierung eingesetzt.

3.2.3.6 Sequenzierung der Amplifizierungsprodukte

Die Sequenzierung der ein Amplifizierungs-Produkt tragenden Plasmide erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchs-Amplifizierung. Zur Vorbereitung dieser Amplifizierung müssen die Plasmide einzelsträngig sein, um adäquat Primer binden zu können. Um eine vollständige Denaturierung der Plasmide zu gewährleisten, wurden die DNA-Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M NaOH versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese DNA wurde anschließend durch Zugabe von Ammonium-Acetat [6 M] im Verhältnis 1:1 und 100%igem Ethanol (Verhältnis 4:1), dreistündiger Inkubation bei -80°C und Zentrifugation (10 Minuten, 13000 U.p.M.) präzipitiert. Nach Waschen der Sedimente in 70%igem Ethanol (5 Minuten, 13000 U.p.M.) und anschließender Lufttrocknung wurde die nun einzelsträngige DNA in 10 μ l dH₂O eluiert. Jeweils 3-5 μ l dieser DNA-Lösung wurde mit je 1 μ l (25-50 ng) eines Plasmid-spezifischen Primers in 10% DMSO-Lösung gemischt, im Wasserbad aufgeköcht und anschließend auf Trockeneis schockgefroren. Da die Sequenzierung eines DNA-Fragmentes zuverlässig nur bis zu etwa 400-600 Basenpaaren möglich ist, mußte für einige der untersuchten Regionen weitere Primer verwendet werden, um die zugehörigen DNA-Fragmente von beiden Seiten anzusequenzieren. Folgende Primer fanden Verwendung: T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; bindet an den T7-Promoter der pGEM[®]-T und pT7Blue[®]-Vektoren), SP6 (5'-TTAGGTGACACTATAGAATACTCA-3'; bindet an den SP6-Promoter des pGEM[®]-T-Vektors) und U19 (5'-AGGGTTTTCCAGTCACGACG-3'; pT7Blue[®]-Vektor).

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte mit einem AbiPrism[®] (Modell 377)-Sequencer von Perkin Elmer. Dieses Sequenzierung-System verwendet die AmpliTaq[®]-DNA-Polymerase, eine Variante der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, die in ihrer

aktiven Stelle eine Punktmutation enthält. Die so veränderte Polymerase ist in der Lage, auch an Farbstoffe gebundene Nukleotide zu einer Nukleotid-Kette zusammenzufügen. Die Methode verwendet Farb-Terminator-Nukleotide. Sie tragen ein fluoreszierendes Donor-Molekül (z.B. 6-Carboxyfluorescein, 6-FAM) über ein *Linker*-Molekül gebunden an einen Dichlororhodamin-Akzeptor Farbstoff. Der Donor-Farbstoff absorbiert die Anregungs-Energie eines Argon-Ionen-Lasers, während das *Linker*-Molekül diese Energie an das Akzeptor-Molekül weiterleitet. Nach Auftrennung auf einem speziellen Sequenzierungs-Gels können dann die einzelnen Moleküle anhand der spezifischen Emissions-Spektren ihrer dRhodamin-Akzeptoren identifiziert werden. Man erhält ein Emissions-Spektrum, an dem sich die Sequenz des untersuchten DNA-Fragmentes leicht ablesen läßt.

3.2.3.7 *In vitro* – Methylierung von Plasmid-DNA

Um die Wirksamkeit der Bisulfit-Methode zu testen, wurde jeweils 1 µg des *p71.13.6*-Plasmids *in vitro* mit Hilfe der Methyltransferasen *SssI* und *HhaI* methyliert. Für die Reaktionen beider Enzyme galten folgende Bedingungen:

1 mM Tris-HCl, pH 7.9; 5 mM MgCl₂; 5 mM NaCl; 1 mM Dithiothreitol; 160 µM S-adenosylmethionin und jeweils 10 Einheiten (U) der *SssI* bzw. *HhaI*-Enzyme. Die Mixtur wurde für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Zu dem Reaktionsgemisch wurden $\frac{1}{10}$ Volumen 6 M Ammoniumacetat und ein vierfaches Volumen eiskalten EtOH (100%) gegeben und der Ansatz anschließend bei 13000 U.p.M. (12000 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit 70%igem Ethanol in einem weiteren fünfminütigen Zentrifugationsschritt gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA, wie in Abschnitt 3.1.2.2 beschrieben, einer Bisulfit-Behandlung unterzogen und abschließend sequenziert.

3.3 Isolierung der Maus-DNA aus Schwanzspitzen

Zur Identifikation und Unterscheidung einzelner Tiere, nach Ammen oder Nachkommen transgener Tiere innerhalb eines Wurfes, wurden die Tiere mit Hilfe einer Lochstanze an den Ohren markiert (Hogan *et al.*, 1994). Im Alter von 3-5 Wochen wurde den Tieren, die auf die Existenz des Transgens untersucht werden sollten, 1 - 1.5 cm der Schwanzspitze mit einer sterilen Sezier-Schere entfernt. Die Schwanzstücke wurden anschließend in kleinere Teile geschnitten und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit

0.8 ml Proteinase K-Lösung [10 mg/ml] transferiert und sodann 16 Stunden unter ständiger Rotation in einem Rollschrank bei 54°C inkubiert. Nach vollständiger Lyse des Gewebes wurde die Proteinase K durch 30-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Um die in der Probe enthaltene RNA zu entfernen, wurde die Lösung mit jeweils 5 µl einer RNase A-Lösung versetzt [10 mg/ml], gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 37°C. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion, in der die in der Lösung enthaltenen Proteine denaturiert und anschließend aufgelöst werden (Kirby, 1957). Isoamylalkohol verhindert ein Aufschäumen der Lösung beim Vermischen und hilft bei der Trennung der Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig mit Hilfe einer an der Spitze schräg abgeschnittenen Pipetten-Spitze (zur Verminderung einer Scherung der DNA) in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Es folgte eine Chloroform-Extraktion, um weitere Protein-Reste zu entfernen und den Gehalt an wässriger Lösung in der organischen Phase zu verringern (Penman, 1966; Palmiter, 1974). Die resultierende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene genomische DNA nach Zugabe von 0.7 ml Isopropanol (2-Propanol) durch mehrmaliges Schwenken gefällt. Die genomische DNA wurde anschließend mittels einer Mikro-Glaskapillare, die an den Enden durch Schmelzen auf einer Bunsenbrenner-Flamme verschlossen wurde, aufgespult. Da einige Salze, die bei einer späteren Restriktionsanalyse der DNA unerwünscht sind, in Isopropanol weniger löslich sind als in anderen Alkoholen (z.B. Ethanol) und daher mit der DNA präzipitieren können, wurde die gewonnene DNA kurz in 70%igem Ethanol gewaschen und abschließend an der Luft für 15-30 Minuten getrocknet.

Die präzipitierte DNA wurde dann durch Abbrechen der Mikrokapillaren-Spitze, an der die DNA haftete, in ein neues, 100 µl (150 µl bei erhöhter DNA-Menge) TE-Puffer enthaltendes 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde für 10 Minuten in einem Wasserbad bei 55°C und anschließend für 16 Stunden bei 4°C gelöst, unterbrochen durch zweimaliges kurzes Mischen auf einem Vortexer. Jeweils 5 µl der Proben wurden dann 1:200 in TE verdünnt um anschließend die DNA-Konzentration im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm zu messen (eine OD_{260} von 1 ist in etwa äquivalent zu 50 µg/ml). Die $OD_{260/280}$ -Verhältnisse der präparierten DNA lagen meist zwischen 1.8 und 1.9: Werte, die auf eine ausreichende Reinheit der Proben hindeuteten. Die DNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.4 Isolierung von Maus-DNA aus Organen (nach Gross-Bellard, 1973)

Nach Organentnahme wurden die gewonnenen Gewebestücke kurz in PBS-d gewaschen, um koagulierte Blutreste zu entfernen, in 15 ml Schraubröhrchen überführt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Organe wurden dann in einem Mörser (unter N₂) zu zerstoßen und abhängig von der Gewebemenge in 3 bis 15 ml Proteinase K-Lösung transferiert und bis zu 16 Stunden bei 54°C im Rollschrank inkubiert. Die DNA wurde anschließend nach obiger Methode (siehe 3.2, DNA-Extraktion aus Schwanzspitzen) isoliert und gereinigt.

3.5 Aufarbeitung und Restriktionsanalyse der Maus-DNA

3.5.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit einer geeigneten Menge Restriktionsenzym (5-10 U/μg DNA) für mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert. In den Experimenten, in denen die genomische DNA durch zwei unterschiedliche Restriktionsendonukleasen gespalten wurde, enthielt das Reaktionsgemisch, soweit es die benötigten Puffer-Eigenschaften zuließen, den vom Hersteller empfohlenen Puffer. Unterschieden sich jedoch die Reaktionsbedingungen der einzelnen Enzyme, so wurde erst das Enzym gespalten, welches eine niedrigere Salzkonzentration benötigte. Die Puffer-Eigenschaften wurden anschließend durch Erhöhung der Salzkonzentration für das zweite Enzym optimiert und die Reaktion für weitere 3-4 Stunden mit dem zweiten Restriktionsenzym fortgesetzt.

3.5.2 Ethanolpräzipitation

Nach Beendigung der Restriktionsspaltung wurde die genomische DNA durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natrium-Acetat, pH 5.2, und dem 2.5-fachem Volumen EtOH_{abs} (-20°C) präzipitiert. Neben der Präzipitation, die durch Entfernung der DNA-Hydrathülle durch das Ethanol und die Addition der monovalenten Kationen verursacht wird, werden Proteine und Salze entfernt (Eickbush & Moudrianakis, 1978). Nach 20-minütiger Inkubation der Lösung bei 4°C wurde der gesamte Ansatz für 15 Minuten mit 13000 U.p.M. zentrifugiert. Kürzere Zentrifugations-Zeiten führen zu einer deutlich geringerer Ausbeute (Zeugin & Hartley, 1986). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen (fünfminütige Zentrifugation, 13000 U.p.M.) und 20-30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde

anschließend in einer Lösung, die aus 15 μl TE und 5 μl Bromphenolblau-Marker bestand, für zweimal 5-10 Minuten, (mit zwischenzeitlicher Durchmischung) bei 55°C gelöst.

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese (nach McDonnell *et al.*, 1977)

Die Proben der genomischen DNA wurden gewöhnlich mit 25-35 Volt (etwa 1.75 V/cm) in einem 0.9 %igem Agarosegel für 12-18 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Das 20x20x0.8 cm messende Agarosegel wurde für eine Nutzung in 1x TAE-Puffer präpariert. Der TAE-Puffer eignet sich im Gegensatz zu anderen Puffer (z.B. TBE) wegen seiner guten Auftrennungsvermögens der DNA besonders für diese Analyse. Da die Puffereigenschaften des Puffers relativ gering ist, wurde eine peristaltische Pumpe an die Gel-Kammer angeschlossen, um den Puffer in der Kammer umzuwälzen und somit pH-Änderungen und Laufzeitdifferenzen der DNA über die gesamte Gelfläche zu verhindern. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem der Bromphenol-Blaumarker etwa $\frac{2}{3}$ des Geles durchwandert hatte. Das Gel wurde anschließend in eine Ethidiumbromid-Lösung transferiert und für 5-10 Minuten auf einem Schüttler gefärbt. Das EtBr interkaliert zwischen die Basenpaare und ermöglicht somit eine Identifikation der DNA durch Beobachtung der Fluoreszenzstrahlung (590 nm) des EtBr-DNA-Komplexes bei Bestrahlung mit UV-Licht. Das Gel wurde anschließend 10 Minuten in Wasser gewaschen, um überschüssige EtBr-Reste innerhalb des Geles zu entfernen. Es wurde dann ein Photo des Gels unter UV-Licht angefertigt, an dem sich Konzentration, Laufverhalten und Vollständigkeit der Spaltung der DNA abschätzen ließ.

3.6 DNA-Transfer auf Nylonmembranen und Hybridisierung der DNA

3.6.1 Transfer der genomischen DNA auf Nylonmembranen (Southern, 1975; Chomczynski, 1992; Koetsier *et al.*, 1993)

Die Methode, DNA aus Agarose-Gelen durch Hybridisierung mit komplementären Sequenzen nachzuweisen, wurde (1975) von Southern entwickelt. Viele Jahre später wurden mehrere Protokolle veröffentlicht, die einen nach unten-gerichteten DNA-Transfer auf eine Nylonmembran nutzen (Lichtenstein *et al.*, 1990; Chomczynski, 1992; Duro *et al.*, 1995). Da alle diese Methoden eine lange Zeit für DNA-Transfer und Aufbau des Puffer-Behälters benötigen, wurde hier das für eine Anwendung in dieser

Arbeit nützlichere, veränderte Transfer-Verfahren verwendet (nach Koetsier *et al.*, 1993).

Nach der Auftrennung in einem Agarose-Gel wurden die DNA-Restriktionsfragmente durch Säurebehandlung depuriniert (Entstehung von Einzelstrangbrüchen an den Purinbasen). Dazu wurde das Gel für etwa 10-12 Minuten in 0.25 N HCl geschwenkt, bis der Bromphenol-Blau-Marker sich vollständig gelb verfärbt hatte. Bei der anschließenden Inkubation des Gels in 0.4 M NaOH (5-10 Minuten) entstanden kleinere DNA-Fragmente, welche sich nun bei dem anschließenden nach unten gerichteten Transfer auf eine positive Nylonmembran leichter übertragen lassen. Diese Transfer-Methode nutzt unter anderem die Wirkung von Kapillarkräften und Schwerkraft auf den Transfer-Puffer (0.4 M NaOH). Hierzu wurde auf eine etwa 6 cm hohe Lage saugfähigen Zellstoffs drei trockene und zwei in Transfer-Puffer getränkte Whatman-Papiere (GB-003), mit 20x20 cm der Gelgröße entsprechend, platziert und mit Hilfe einer Pipette zu einer ebenen, glatten Fläche gerollt. Zwischen diesen Papierlagen wurde rund um die Transfer-Fläche herum feste Kunststoff-Folien ausgebreitet um einem Verlaufen des Puffers vorzubeugen. Über dieser Anordnung wurde die positiv geladene, in Transferpuffer getränkte Nylonmembran gelegt, gefolgt von dem Agarosegel, ohne daß Luftblasen dazwischen entstanden. Darüber wurden zwei weitere mit 0.4 M NaOH benetzte Whatman-Papiere gelegt. Zu beiden Seiten der Transfer-Fläche wurden abschließend in >6 cm Höhe die Puffer-Reservoirs installiert und mit zwei übereinander geschichteten 20x60 cm-Whatman-Papieren mit der Transfer-Anordnung verbunden. Diese, mit den über dem Gel gelegenen Vorratsbehältern, verwendete Anordnung ermöglichte einen effizienten DNA-Transfer innerhalb von 2-3 Stunden. Nach Abschluß des Southern-Blot-Transfers wurde die Membran durch leichtes Schwenken in 2 x SSC neutralisiert und 1 Stunde bei 80°C (Qiabrane Nylon Plus) respektive 30 Minuten bei 120°C (Nylonmembranen von Boehringer, Mannheim) gebacken.

3.6.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (nach Feinberg & Vogelstein, 1983)

Die in dieser Arbeit verwandte *Primer-Extensions-Methode* basiert auf einem Protokoll nach Feinberg und Vogelstein (1983). Es nutzt die Fähigkeit des Klenow-Fragmentes der E.coli-DNA-Polymerase I, einen neuen DNA-Strang synthetisieren zu können, der einem Matrizenstrang komplementär ist. Für eine Markierung wurden 30-50 ng der Matrizen-DNA in 10 µl H₂O gelöst und 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Um die DNA im denaturierten Zustand zu fixieren, wurde die Probe anschließend in einem EtOH-

Eisbad abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde mit 5 μl OLB-Puffer (Oligonukleotid-Primer), 1 μl BSA (20 mg/ml) und je 1 μl , nicht radioaktiv markierten Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs; jeweils 10 mM) versetzt. Diese Proben wurden dann mit 5 μl radioaktiv markierten ^{32}P -dATPs oder ^{32}P -dCTPs (50 μCi) und 5 Einheiten Klenow-Polymerase vermischt und für 3-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion startet an einer freien 3'-Hydroxy-Gruppe eines an die Matrize hybridisierten Oligo-Nukleotids. Um einen Abbau der Primer vorzubeugen, fehlt der Klenow-Polymerase die 5' \rightarrow 3'-Exonukleaseaktivität. Um die nicht in neue DNA-Fragmente inkorporierte α - ^{32}P -dNTPs aus der Lösung zu entfernen, wurden die Radionukleotide durch Zentrifugation über eine Sephadex-G-50-Säule abgetrennt. Um mögliche Radionukleotid-Kontaminationen zu vermeiden, wurde die Zentrifugation (3000 U.p.M.) in einem verschließbaren 15 ml Schraubröhrchen durchgeführt (nach Koetsier & Doerfler, 1995). Das radioaktive Eluat wurde abschließend zu 15 ml Hybridisierungslösung gegeben.

3.6.3 Szintillations-Spektrometrie (nach Haberer, 1966)

Für eine hinreichende Markierung der zu untersuchenden DNA sollte die Hybridisierungslösung eine ausreichend hohe spezifische Aktivität (cpm/ μg) besitzen. Daher wurden 100 μl der die radioaktive Sonde enthaltende Hybridisierungslösung in einem Szintillations-Spektrometer auf β -Strahlung untersucht. Die β -Teilchen Emission des Radionukleotids ^{32}P verursacht in dem Szintillations-Kristall des Meßgerätes die energiereiche, sogenannte Cerenkov-Strahlung, welche Lichtblitze hervorruft, die von einer Photokathode mit Prallanoden-SEV (sekundärem Elektronen-Verstärker) aufgenommen und in elektronische Impulse umgewandelt werden. Lag die beobachtete spezifische Aktivität der Hybridisierungslösung über 1×10^8 cpm/ μg DNA (Impulse/Minute), wurde sie für eine Hybridisierung verwendet. Konnte eine spezifische Aktivität von mehr als 5×10^8 cpm gemessen werden, so konnte die Lösung auch für eine zweite Hybridisierung verwendet werden (Halbwertszeit des ^{32}P beträgt 14,3 Tage).

3.6.4 Hybridisierung von membrangebundener DNA mit α - ^{32}P -markierten DNA-Sonden (nach Wahl *et al.*, 1979)

Nach dem Southern-Transfer der DNA wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC gewaschen, um die Membran zu neutralisieren und um anhaftende Gel-Reste zu entfernen. Die an die positiv geladene Nylonmembran gebundenen DNA-Fragmente können durch Hybridisierung der homologen radioaktiv markierten DNA sichtbar

gemacht werden. Dazu wurden zuerst 20 ml einer Prähybridisierungslösung (zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran) für 10 Minuten auf 100°C erhitzt, um die darin enthaltene Lachsspermien-DNA zu denaturieren. Nach fünfminütiger Abkühlung auf Eis wurde diese Lösung zu der in einer Hybridisierungsröhre aufgerollten Membran gegeben und für 4-16 Stunden bei 68°C im Rollschrank inkubiert.

Die Hybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte Sonde enthielt ($\geq 1 \times 10^8$ cpm/ μ g), wurde der Präinkubation folgend für 10 Minuten bei 100°C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Entfernung der Präinkubationslösung aus der Hybridisierungsröhre wurde die radioaktive Lösung zu der Membran gegeben. Die Röhre wurde anschließend eine Stunde so rotiert, daß sich die Membran in der Hybridisierungslösung in sich selbst einrollen konnte. Anschließend wurde die Rotation für 16-20 Stunden über Nacht bei 68°C in entgegengesetzte Richtung fortgesetzt, um ein Abrollen der Membran und damit verbunden eine gleichmäßige Benetzung der Membran durch die Hybridisierungslösung zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt, die Membran kurz in Waschlösung I gespült und anschließend für 15 Minuten (mit frischer Waschlösung I) im Hybridisierungssofen bei 68°C unter langsamer Rotation gewaschen. Es folgten zwei 20-minütige Waschschrte mit Waschlösung II, gefolgt von kurzer Reinigung in 2 x SSC und Trocknung der Membran auf Zellstoff. Die Nylonmembran wurde daraufhin in eine Folie eingeschweißt und zusammen mit einem Röntgenfilm für die Autoradiographie zwischen zwei Verstärkerfolien in eine Filmkassette plziert und bei -80°C aufbewahrt.

Membranen, die für eine erneute Hybridisierung mit einer anderen Sonde Verwendung fanden, wurden zuvor durch 30 minütiges Kochen in Waschlösung II von der radioaktiven Sonde befreit und anschließend kurz in 2 x SSC gewaschen.

3.7 Autoradiographie

Diese Methode beruht auf der Fähigkeit der radioaktiven Proben, Moleküle in der Schicht des Röntgenfilms anzuregen. Durch die Emission der β -Teilchen aus der radioaktiv markierten Membran werden Silberhalogenid-Körnchen der Schicht aktiviert. Bei der Entwicklung des Films werden dann die Silber-Ionen zu metallischem Silber reduziert, was sich in einer Schwärzung der Röntgen-Folie bemerkbar macht. Die Schwärzung ist ein nicht-lineares Maß für die Strahlungsintensität. Die Autoradiographie

der untersuchten Proben wurde bei -80°C auf Kodak XAR 5 Röntgenfilmen durchgeführt.

3.8 Auswertung mittels eines Phospho-Imagers

Neben der Analyse der radioaktiv markierten Membranen mittels einer Autoradiographie, wurden die Messungen, zum Vergleich, auch mit einer linearen Meßmethode unter Verwendung eines Phospho-Imagers durchgeführt. Die Emission der β -Teilchen wurde mit Hilfe einer Imaging-Plate (BASIIIIs, 20 x 40 cm, Fuji) im Bio-Imaging-Analyser BAS 1000 dargestellt. Die entstehenden Signale wurden als PSL-Einheiten (Photo Stimulated Luminiscence) definiert. PSL ist ein direktes, lineares Maß für die Intensität eines radioaktiven Signals.

3.9 Computer-gestützte Auswertung der Hybridisierungs-Signale

Die aus den Hybridisierungsexperimenten stammenden Autoradiographien und Phospho-Imager-Bilder wurden mit zwei Computer-Programmen (*Cybertech CS-1 Image Processing Software*; *TINA V.2.08*) analysiert. Die Methode der Bestimmung der Methylierung einzelner DNA-Proben beruht auf dem Vergleich der Intensitäts-Unterschiede einzelner DNA-Banden. Die aus der Untersuchung mit einem Phospho-Imager entstandenen Bilder lassen sich direkt im Computer zwischenspeichern, während alle Autoradiographien zuerst mit Hilfe eines *Mustek Paragon 8000-Scanners* in verarbeitbare Bild-Formate umgewandelt werden mußten. Durch vertikales densitometrisches Abtasten der Aufnahme des Bandenmusters einer DNA-Probe erhält man ein densitometrisches Profil. Die Höhe und Breite der jeweiligen Kurven geben die ungefähre DNA-Menge in einer Bande wieder.

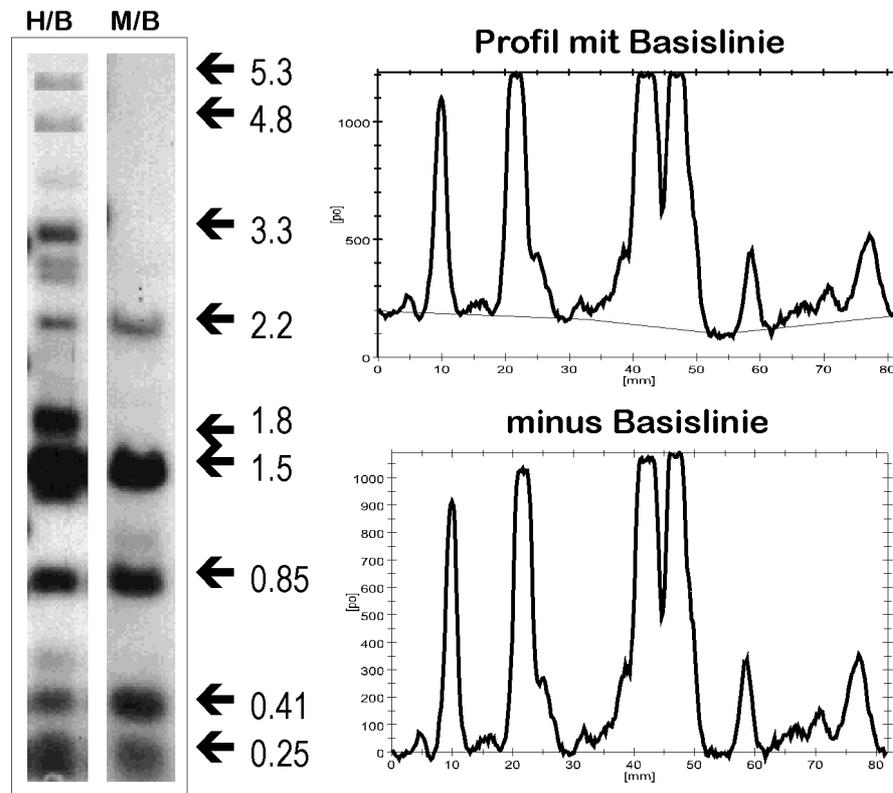


Abb.8: Erstellung eines Banden-Profiles.

Durch vertikales, densitometrisches Abtasten der Proben-Reihe einer Autoradiographie erhält man ein Banden-Intensitäts-Profil. Gewöhnlich ist es notwendig, eine Untergrundkorrektur durchzuführen. Basislinien sind die bevorzugte Methode zur Untergrundkorrektur, mit denen ein inhomogener Untergrund in die Berechnung eingeschlossen werden kann. Eine Basislinie besteht aus einer Reihe von Punkten (Differentiationskurven-Umkehrpunkte), die durch Geradenstücke verbunden werden. Die Intensität unterhalb der Basislinie wird bei der Berechnung der Intensitäten als Hintergrund subtrahiert. Linke Reihe: Theoretisches Bandenmuster des pAd2E2AL-CAT-Transgens nach Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *HpaII* und *BamHI*. Rechte Reihe: Bandenmuster nach Spaltung durch *MspI* und *BamHI*. H = *HpaII*; B = *BamHI*; M = *MspI*. Das Profil wurde mit dem Computerprogramm *Tina V.2.08* erstellt.

Durch direkten Vergleich zweier Probenreihen lassen sich die einzelnen DNA-Fragmente bestimmten Restriktions-Bedingungen zuordnen. Zur Berechnung des Methylierungsindex werden alle so ermittelten Fragmentintensitäten der *MspI*-Banden (siehe Abb. 5) und aller *HpaII*-Banden aufsummiert und in Relation zueinander gesetzt. Da sich die Methoden zur Erstellung der Basislinien nicht exakt bestimmen lassen und die Methoden der verschiedenen Computerprogramme unterschiedlich sind, wurde eine Doppel-Berechnung durchgeführt. Die ermittelten Werte (Methylierungsindizes) spiegeln den numerischen Durchschnitt beider Meßwerte wieder.

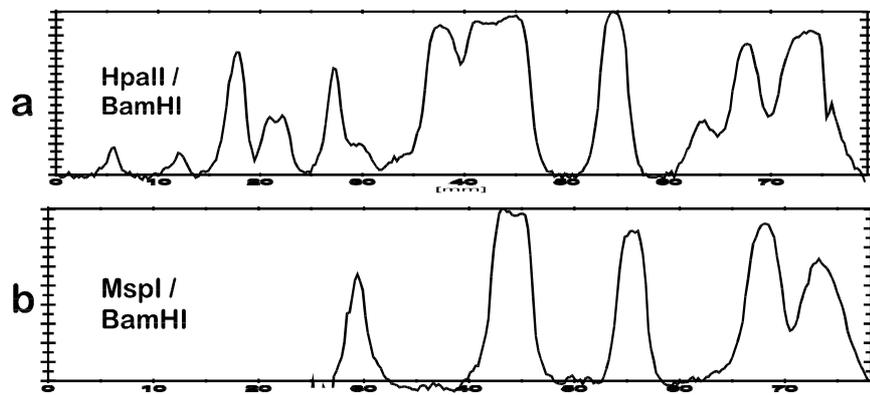


Abb. 9: Ermittlung der *MspI*-Restriktionsfragmente. Aus dem direkten Profil-Vergleich des *HpaII/BamHI*-Musters (a) und einer Vergleichsprobe, geschnitten mit *MspI/BamHI* (b), lassen sich die spezifischen Fragmente innerhalb einer Probenreihe bestimmen. Diese werden über deren Fläche integriert und anschließend addiert. Der Methylierungsindex errechnet sich aus: $[\Sigma b / \Sigma a]$.

4 Ergebnisse

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines neuen Verfahrens, embryonale Stammzellen der Maus mit hoher Effizienz zu neuronalen Zellen zu differenzieren. Der zweite Teil befasst sich mit der Anwendung dieser Technik auf Maus ES-Zellen, um epigenetische Muster während der Differenzierungsphase einer ES-Zelle zu einer neuronalen Zelle zu analysieren. Die ES-Zellen dienen dabei als Modell der frühen embryonalen Säugetier-Entwicklung. Zudem wird die gametisch geprägte PWS/AS-Region in Mensch und Maus einer multivarianten Charakterisierung unterzogen. Untersucht wurden: DNA-Methylierung, Gen-Expression, evolutive Konservierung und strukturelle Eigenschaften der orthologen Imprintingbereiche. Die Daten werden zudem im Kontext einer Theorie zur Evolution dieser "Imprinting"-Domäne untersucht.

4.1 Staurosporin ist ein Aktivator der neuronalen Differenzierung in ES-Zellen der Maus

Staurosporin (STS) ist ein natürlich vorkommendes Molekül, welches ursprünglich aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde. Es gehört zu einer Gruppe von etwa 50 bekannten Alkaloiden, die eine ähnliche Grundstruktur, bestehend aus einer heterozyklischen Indol-Carbazol-Untereinheit und einem Zuckeranteil, besitzen (Abb. 10).

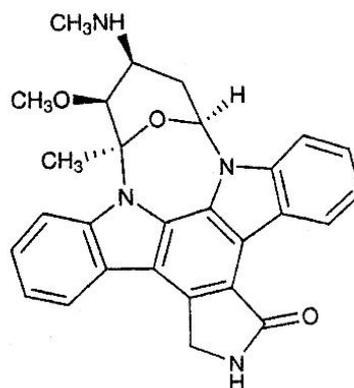


Abb. 10: Struktur von Staurosporin.

STS inhibiert ein breites Spektrum von Protein-Kinasen, indem es durch seine Carbazol-Einheit mit höherer Affinität als das natürliche Substrat ATP an die

katalytische Untereinheit der Kinasen bindet. Da die Protein-Kinasen vielfältige Rollen in der Signal-Transduktion der Zelle einnehmen können, ist eine komplexe Reaktion von ES-Zellen auf eine STS-Gabe zu erwarten.

STS besitzt zudem neben einer fungiziden Wirkung auch ein Potenzial als Anti-Tumor-Mittel, weswegen es häufig in Studien zur Entwicklung von Neuroblastomen eingesetzt wurde. Ein Neuroblastom ist ein Tumor, der häufig im frühen Kindesalter aus neuronalen Crest-Zellen entsteht. Dieser Tumor ist dafür bekannt, sich spontan zurück zu entwickeln und besitzt die Eigenschaft, nach Induktion durch verschiedene neurotrophe Substanzen wie Retinsäure oder *nerve growth factor* (NGF) einen neuronalen Phänotyp auszubilden. Es zeigte sich, daß auch STS einen Neurit-Auswuchs in Neuroblastoma-Zelllinien induzieren kann. Beobachtet wurden neurotrophe Effekte in Pheochromozytoma (PC12)-Zellen, die sich von der Ratten-Medulla (verlängertes Mark) ableiten, und in neuronalen Hybrid-Zelllinien (PC12EN), welche aus der Fusion von PC12-Zellen und Endothelzellen der adrenalen Medulla aus Rind abstammen (Rasouly *et al.*, 1992; Maroney *et al.*, 1994; Rasouly *et al.*, 1996). Neuritenentwicklung wurde auch in anderen murinen Neuroblastoma-Zelllinien wie PC12D, SH-SY5Y und SK-N-SH beobachtet (Sano *et al.*, 1994; Leli *et al.*, 1993; Lombet *et al.*, 2001).

Die neurotrophe Wirkung von STS ist nicht nur auf murine Linien beschränkt, sondern konnte auch in embryonalen Ganglien des Huhns und in Prostata-Krebszellen (TSU-Pr1) des Menschen nachgewiesen werden (Sano *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2000). Es zeigte sich, daß bei einer geringen STS-Konzentration ein Wachstum der TSU-Pr1-Zellen unterdrückt werden konnte und sich innerhalb eines Tages erste neuronale Auswüchse bildeten.

Um zu überprüfen, ob STS auch neurotrophe Effekte in embryonalen Stammzellen induzieren kann, wurden die Maus ES-Zelllinien IB10 (Mausstamm 129/Ola), RW4 (Mausstamm 129/sv) und Bruce4 (Mausstamm: C57Bl/6) auf ihre Wachstumscharakteristika in Gegenwart von STS analysiert. Zur Analyse wurden Zelllinien unterschiedlicher Mausstämme verwendet, da gezeigt werden konnte, daß verschiedene Mauslinien deutliche epigenetische Variabilität besitzen können (Übersicht in Schumacher *et al.*, 2000).

4.1.1 Apoptotische Wirkung von STS in ES-Zellen

Staurosporin kann je nach Konzentration im Nährmedium innerhalb weniger Minuten eine Apoptose in Säugetier-Zellen auslösen (Belmokhtar *et al.*, 2001; Tafani *et al.*, 2001). Daher wurden die zu untersuchenden ES-Zelllinien auf ihre Anfälligkeit durch einen durch STS induzierten Zelltod untersucht, um für jede ES-Zelllinie eine möglichst wenig toxische STS-Konzentration zu ermitteln (Abb. 11).

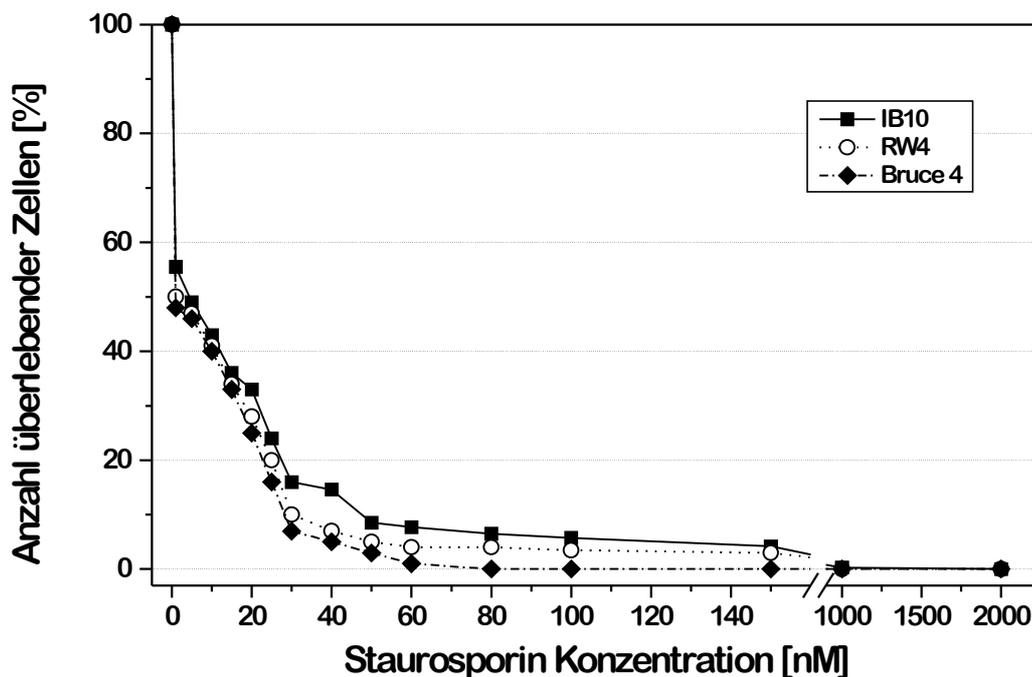


Abb. 11: Induzierter Zelltod durch Staurosporin in embryonalen Stammzellen der Maus. Zellen aus drei verschiedenen Maus ES-Zelllinien wurden mit STS für drei Tage mit den angezeigten Konzentrationen behandelt. Die Anzahl lebender Zellen wurde durch Auszählung der Zellen mit der Eigenschaft Trypan Blau auszuschließen in einem Hematocytometer ermittelt (siehe Material und Methoden).

Wie erwartet, induziert STS abhängig von der eingesetzten Menge einen schnell fortschreitenden Zelltod. Es zeigte sich, daß nach drei Tagen im Nährmedium schon kleine STS-Konzentrationen (< 2 nM) die apoptotische* Maschinerie der Zellen aktivieren konnten. Bei Konzentrationen über 50 nM löste sich die Mehrheit der ES-Zellen (>90%) vom Substrat und zeigte eine charakteristische apoptotische Morphologie.

* Apoptose-Marker wurden nicht verwendet, jedoch deuten vorherige Studien auf apoptotische Mechanismen hin.

Obwohl das Wachstum aller untersuchten Zelllinien von STS inhibiert wurde, reagierten Zelllinien je nach genetischer Herkunft unterschiedlich. So starben Zellen der Bruce4-Linie mit einem C57Bl/6-Hintergrund ab einer kritischen STS-Konzentration (~ 60 nM) vollständig ab, während Zelllinien mit einem 129er genetischem Hintergrund (IB10 und RW4) auch bei solch hohen Konzentrationen des Alkaloids in der Lage waren, lebensfähige Zellen zu generieren. Bei genauerer Betrachtung der Zellmorphologie solcher "STS-resistenten" Zellen zeigte sich, daß viele dieser ES-Zellen offenbar eine Differenzierung durchlaufen hatten. Studien an anderen Zelllinien legen die Vermutung nahe, daß die Unterbindung des Zellwachstums und apoptotische Kaskaden auf verschiedenen Ebenen mit neuronalen Wegen konvergieren können (Mirkes *et al.*, 2000). In der Tat offenbarten viele 129er Zellen bei einer Konzentration von 20-50 nM STS eine charakteristische Neuronen-ähnliche Morphologie (Abb. 12E2).

Um eine neuronale Differenzierung zu fördern und gleichzeitig die von STS induzierte Apoptose zu hemmen, wurden mehrere Protokolle analysiert. Frühere Studien zeigten, daß die Zugabe von bestimmten Substanzen (z.B. RA, Tocopherol, Hydrochinon und Polyethylenimin) das von STS induzierte Absterben der Zellen inhibieren kann (Hazel *et al.*, 1996; Ahlemeyer *et al.*, 2000^b; Ahlemeyer & Kriegstein 2000). Die Zugabe von α -Tocopherol zum Differenzierungsmedium erwies sich zwar als positiv für das Wachstum der ES-Zellen, jedoch zeigte sich, daß dieses Vitamin gleichzeitig auch die neuronale Differenzierung inhibiert (siehe Abschnitt 4.1.2.3). Das Überleben der zu differenzierenden Zellen war im großem Maße auch abhängig von der Adhäsion an extrazelluläre Substrate und Matrix-Proteine. In dieser Arbeit wurden mehrere Adhäsions-Substrate verwendet. Gute Resultate wurden mit hochmolekularer Gelatine, Kollagen, Fibronectin, Laminin oder Poly-L-Lysin erzielt.



Abb. 12: Staurosporin induziert Apoptose und Differenzierung von IB10 ES-Zellen.

IB10 ES-Zellen wurden 3 Tage in Standard-ES Medium (DMEM, siehe Material und Methoden) mit den angegebenen STS-Konzentration inkubiert. **A:** Konfluente IB10 Zellen ohne STS. **B:** Beginnender Zelltod bei geringer STS-Konzentration (10 nM). **B2:** Vergrößerung aus B. Es bilden sich freie Stellen in der vorher konfluenten Zellschicht. **C:** Mit ansteigender STS-Konzentration differenziert ein Teil der überlebenden IB10-Zellen (Pfeile). **D:** Die überlebenden Zellen aggregierten zu größeren Clustern; 25 nM STS. **E:** 50 nM STS, der größte Bereich der Zellkulturschale ist frei von Zellen. **E2:** Vergrößerung aus E. Zelle mit neuronaler Morphologie. **F-G:** Erhöhung der STS - Konzentration führt zum vollständigen Absterben der Zellkultur.

Optimales Wachstums und gute Zelladhäsion wurde beobachtet, wenn die Kulturschalen zuerst mit 0,1% Gelatine in Phosphat-Puffer (1 x PBS) beschichtet wurden, gefolgt von 50 $\mu\text{g/ml}$ Poly-L-Lysin in H_2O . Zur weiteren Analyse wurden die ES-Zellen auch auf dem polykationischen Makromolekül Polyethylenimin (PEI) angezüchtet. PEI existiert als hoch- mittel- und niedermolekulare Lösung und kann STS induzierte Apoptose in embryonalen Neuronen des Huhns hemmen (Ahlemeyer *et al.* 2000^b). In den Experimenten an embryonalen Stammzellen der Maus erwies sich PEI jedoch nicht als vorteilhaft. Das positiv geladene 12 kDa PEI hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum, während sich das höhermolekulare PEI (32 kDa) negativ auf das Zellwachstum auswirkte. Da sich PEI auch in hoher Verdünnung als giftig für die Zellen erwies, wurde auf eine genaue Quantifizierung des Zellwachstums verzichtet. Im Gegensatz zu PEI zeigte sich Hydrochinon (HQ) als starker Inhibitor des durch STS ausgelösten Zelltodes (Abb. 13).

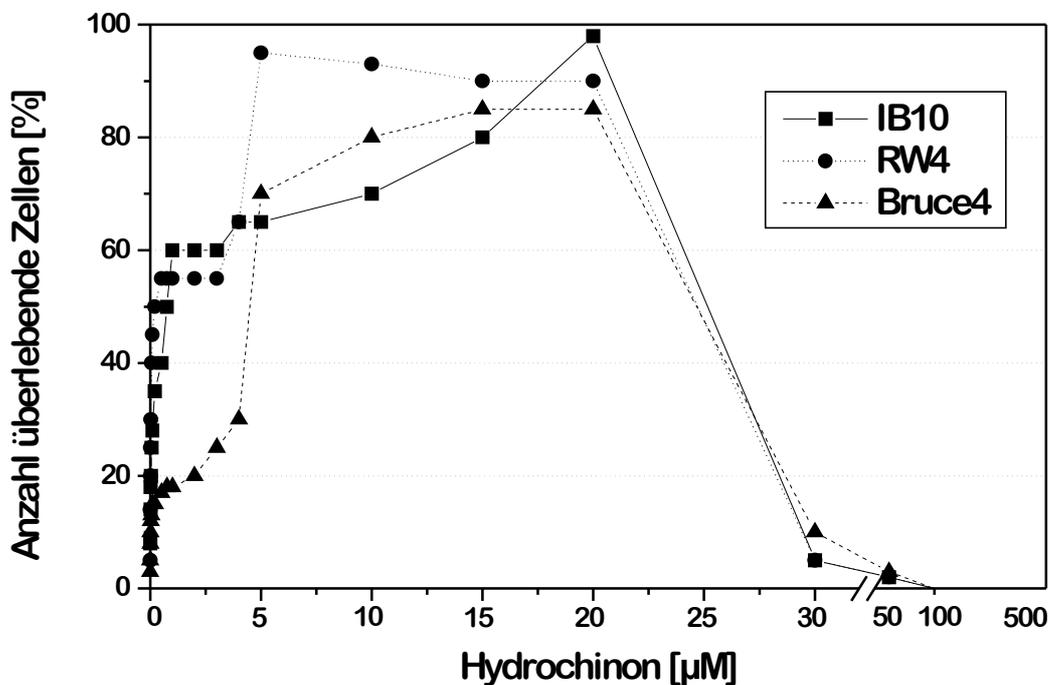
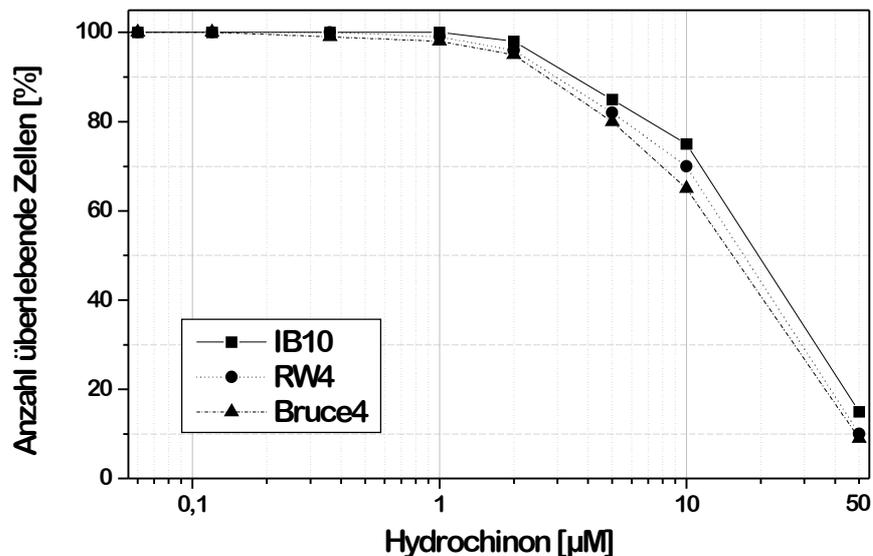


Abb. 13: Hydrochinon (HQ) inhibiert die durch STS verursachte Apoptose in ES-Zellen der Maus. Zellen aus drei verschiedenen Maus ES-Zelllinien wurden mit einer toxischen STS-Konzentration (50 nM) kultiviert. Nach Zugabe von Hydrochinon zeigte sich, daß die Anzahl überlebender Zellen mit steigender HQ-Konzentration anstieg (Messung nach 3-tägiger HQ-Behandlung; STS wurde zeitgleich weitergegeben). Ab einer kritischen HQ-Dosis kehrte sich der Effekt um und führte zu einem zunehmenden Zelltod. Die Anzahl lebender Zellen wurde durch visuelle Beobachtung und Auszählung der Zellen mit der Eigenschaft Trypan-Blau auszuschließen in einem Hematocytometer ermittelt.

Hydrochinon ist ein Metabolit des Benzen und kann in der lebenden Zelle mittels einer Peroxidase Reaktion zu bioreaktivem p-Benzochinon, welches mit den Makromolekülen der Zelle interagieren kann, umgewandelt werden (Pfeifer & Irons, 1983). In Experimenten mit Myeloblasten wurde eine 50%ige Inhibition von STS durch 3 μM HQ erzielt (Hazel *et al.*, 1996). Ähnliche Werte konnten auch für die drei untersuchten ES-Zelllinien ermittelt werden. Eine 50%ige Inhibition des Zelltods zeigte sich im Bereich von 2 μM (für Zelllinien IB10 und RW4) und 5 μM (für Bruce4; Abb. 13). Durch Erhöhung der HQ-Konzentration über 5 μM konnte eine fast vollständige Inhibierung der Apoptose erreicht werden. Der Schutzmechanismus des HQ ist jedoch auf einen engen Konzentrationsbereich beschränkt. Durch Zugabe von mehr als 20 μM HQ sterben nahezu alle Zellen binnen drei Tagen ab. Aus Abbildung 14 wird deutlich, daß das Absterben der ES-Zellen ab einem kritischen Wert von etwa 25 μM HQ durch toxische Wirkung des Benzenderivats verursacht wird.

Abb. 14: Einfluss des Benzen-Metaboliten Hydrochinon auf das Wachstum von embryonalen Stammzellen der Maus. Die drei ES-Zelllinien IB10, RW4 und Bruce4 wurden mit den angegebenen Mengen HQ ohne STS für drei Tage inkubiert.



Ähnlich wie bei HQ konnte auch durch Zugabe von 1 μM RA der STS-induzierte Zelltod fast vollständig verhindert werden. Da sich RA jedoch auch nachteilig auf die STS abhängige Neurogenese auswirkte (siehe Abschnitt 4.1.5), konnte es in den folgenden Differenzierungs-Studien als Supplement nicht verwendet werden.

4.1.2 Analyse kritischer Parameter in der durch STS induzierten Differenzierung embryonaler Stammzellen

4.1.2.1 Embryonale Zellaggregate

Um die neuronale Differenzierung der ES-Zellen zu fördern, wurden die undifferenzierten Zellen in der Form embryonaler Aggregate (*embryoid bodies*, EBs) kultiviert (siehe Abb. 15).

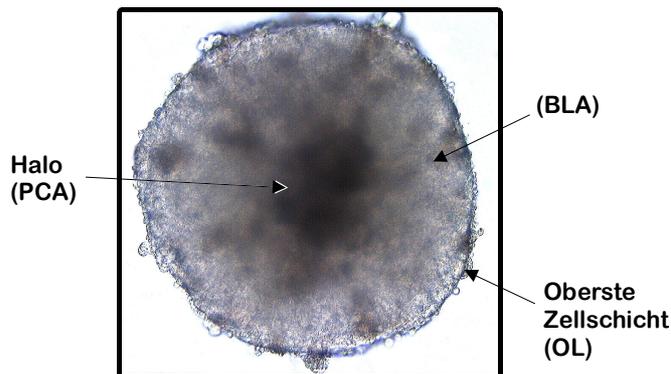


Abb. 15: Ein Aggregat aus etwa 10.000 IB10-Zellen.

EBs bestehen aus mehreren Schichten, einer zentralen, dunklen Halo (*primary central aggregate*, PCA), einer epithel-ähnlichen Zellschicht (*bark-like aggregate*, BLA) und einer äußeren, dünnen Zellschicht (*outer layer*, OL).

Die Ausbildung embryonaler Aggregate ist ein essentieller Schritt in Differenzierungsprotokollen, die RA als Aktivator verwenden (Bain *et al.*, 1995), da RA in undifferenzierten Zellen einen Zelltod verursacht (Robertson, 1987). Es existieren jedoch keine Studien, die sich explizit mit der Rolle der EBs während der *in vitro* Differenzierung befassen. Deshalb wurden einige Experimente durchgeführt, um die Auswirkung solcher Aggregate auf die Zellentwicklung zu analysieren.

Es gibt zwei Methoden, die Bildung von embryonalen Aggregaten zu forcieren. Einerseits können die ES-Zellen in relativ großer Dichte in nicht adhäsiven Petrischalen ausplattiert werden, andererseits können sie in hängenden Tropfen kultiviert werden. Beide Methoden wurden auf die Brauchbarkeit hin überprüft, differenzierungsfähige Zellen zu erzeugen. Durch die Kultivierung von ES-Zellen in einer Suspension (siehe Abb. 16A, 16E) werden EBs in starker Abhängigkeit von der Konzentration der ausplattierten Zellen gebildet. Aus Abbildung 16A wird ersichtlich, daß eine kritische Konzentration von etwa 3×10^5 ES-Zellen/10cm-Petrischale benötigt wird, um die Aggregation zu initiieren. Durch Erhöhung der Zelldichte wird im Weiteren aber auch die Bildung von zusammenhängenden Zellclustern gefördert, so daß die Mehrheit der Zellen in Suspension verklumpen kann.

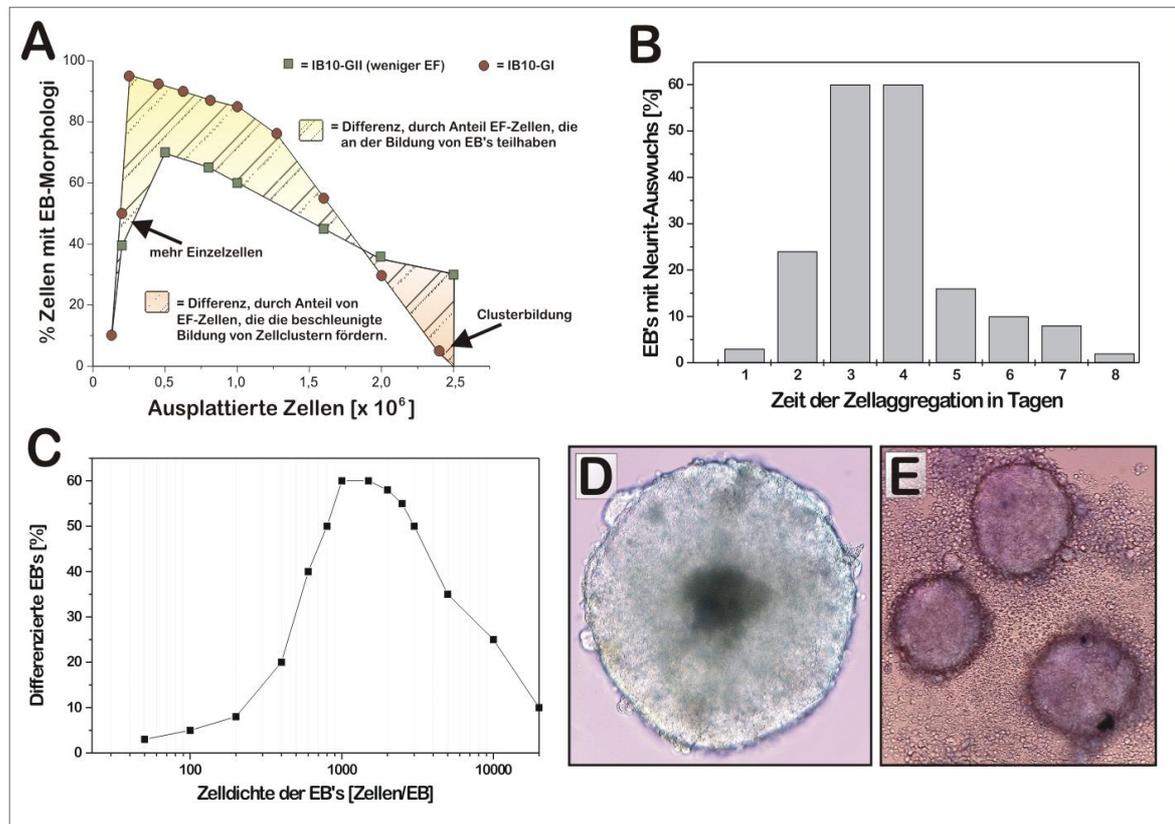


Abb. 16: Die Formung embryonaler Aggregate erhöht die Effizienz der Differenzierungsprotokolle.

A: Werden ES-Zellen in nicht-adhäsiven Petrischalen kultiviert, bilden sich größere Zellcluster, die sich nicht für eine Differenzierung eignen. Embryonale Feederzellen sind von Nachteil, da sie offenbar durch Erhöhung der Zellmasse die Verklumpung der Aggregate fördern. Berechnung der Zellen in EBs: Ausplattierte Zellmenge – Einzelzellen – Anzahl Zellen in Zellclustern. **B:** IB10 und RW4 Zellen wurden in den angegebenen Zeitspannen in DMEM mit 20 nM STS inkubiert. Eine gezieltere Differenzierung kann erreicht werden, wenn die ES-Zellen in hängenden Tropfen kultiviert werden (siehe Material und Methoden). Nach der angegebenen Inkubationsdauer wurden die EBs auf beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert und nach 14 Tagen auf neuronale Morphologien untersucht. Die neuronale Differenzierung erwies sich als abhängig von der Inkubationszeit. **C:** Abhängigkeit der neuronalen Differenzierung von der Zelldichte in den embryonalen Aggregaten. Obwohl eine kritische Zelldichte überschritten werden muss, um Differenzierungs-Kaskaden zu induzieren, verlieren die EBs mit zunehmender Größe die Fähigkeit, neuronale Auswüchse zu generieren. Größere EBs (>2500 Zellen) können sich nicht mehr an ein Substrat binden, da durch die zunehmende Größe erhöhte Scherkräfte im Medium auf die EBs einwirken. **D:** EB erzeugt in hängenden Tropfen aus etwa 5000 IB10 Zellen. **E:** Die Generierung von EBs in Petrischalen resultiert auch in einer unvollständigen Inkorporation aller ES-Zellen in ein Aggregat.

Ein wichtiger Faktor, um möglichst reine EB-Kulturen zu erhalten, ist die vorherige Entfernung embryonaler Fibroblastenzellen (sog. Feederzellen), die in der Anzuchtphase benötigt werden, um die vorzeitige Differenzierung der ES-Zellen zu unterdrücken. So kann durch mehrmaliges Passagieren der Zellen auf einem Fibroblasten-freien Substrat die Clusterbildung minimiert und die relative Anzahl nicht differenzierbarer Anteile in einem EB verringert werden. Ein wesentlicher Nachteil

dieser Methode ist jedoch, daß ein Großteil der ES-Zellen nicht an der Bildung von Aggregaten teilnimmt und somit für eine Differenzierung verloren geht (Abb. 16E).

Als wesentlich geeignetere Methode erwies sich ein Protokoll, abgewandelt nach Strübing *et al.*, 1995. In Kürze: Embryonale Stammzellen werden mit einer Pipette in einem Volumen von etwa 20 μl auf die Deckelunterseite einer Petrischale überführt. Dort verbleiben die Zellen für mehrere Tage bei hoher Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator. Diese Anordnung erzwingt einen Zell-zu-Zell Kontakt und fördert dadurch die Bildung von EBs und eine anschließende Differenzierung. Ein weiterer Vorteil dieses Protokolls ist, daß die Größe der resultierenden EBs durch die pipettierte Zellmenge genau dosiert werden kann und die durch STS verursachte Apoptose nahezu vollständig unterbunden wird. Alle drei untersuchten ES-Zelllinien lieferten mit dieser Methode stabile, differenzierungsfähige Zellaggregate (siehe Abb. 16D).

Die Fähigkeit der ausplattierten EBs neuronale Auswüchse auszubilden ist im hohen Maße von der Anzahl der ES-Zellen im EB abhängig (Abb. 16C). Werden weniger als 400 Zellen zu einem Aggregat zusammengeführt entstehen EBs die sich nicht als effizient differenzierungsfähig erweisen. Offenbar benötigen die Zellaggregate eine bestimmte Anzahl Zellen, um alle notwendigen Zellschichten (Dottersackhülle, Endoderm-, Mesoderm- und Ectodermähnliche Zellanhäufungen) zu bilden, die dem frühen Embryo ähneln. EBs mit einer Zellpopulation von 600-2000 zeigten die besten Differenzierungseigenschaften und produzierten in über 50% der EBs neuronale Zellauswüchse. Eine weitere Vergrößerung der Zellaggregate führte jedoch zu rückläufiger Neuritenbildung. Dies kann einerseits mit der unzureichenden Nährstoffaustausch im Innern der EBs erklärt werden als auch mit den vermehrt auftretenden Scherkräften, die auf die vergrößerte Oberfläche der EBs wirken. So sind Zellaggregate mit über 20.000 Zellen kaum in der Lage, an ein Substrat zu binden.

Die Zellaggregat abhängige Neuritogenese wird zudem von der Zeitspanne beeinflusst, in der die EBs geformt werden (Abb. 16B). Es sind mindestens drei Tage notwendig, um Zellaggregate zu generieren, die effizient eine Differenzierung einleiten können. Diese neurotrophe Phase ist begrenzt, so daß nach Tag 4 der Aggregation die ES-Zellen wieder ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren. Bisherige Protokolle nutzten eine Inkubationszeit von 4-8 Tagen (Bain *et al.*, 1995; Strübing *et al.*, 1995), jedoch deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, daß die STS-induzierten ES-Zellen maximal 4 Tage in Tropfen kultiviert werden können, bevor sie auf ein Substrat aufgebracht werden können.

4.1.2.2 Einfluß der Serum Konzentration auf die EB-Aggregation

Fötales Rinderserum (FCS), wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, ist ein häufig eingesetztes Medium-Supplement, welches die Proliferation und Zellanheftung an die Zellkultur Matrix vieler Zelllinien fördert. Es konnte nachgewiesen werden, daß der Einsatz verschiedener Serumkonzentrationen während der aufeinanderfolgenden Phasen der ES-Zell-Differenzierung unterschiedliche Auswirkungen bedingen kann. So ist während der frühen Induktionsphase mit STS eine hohe FCS-Konzentration (mind. 20%) essentiell um die Bildung von Zellaggregaten zu garantieren (Abb. 17).

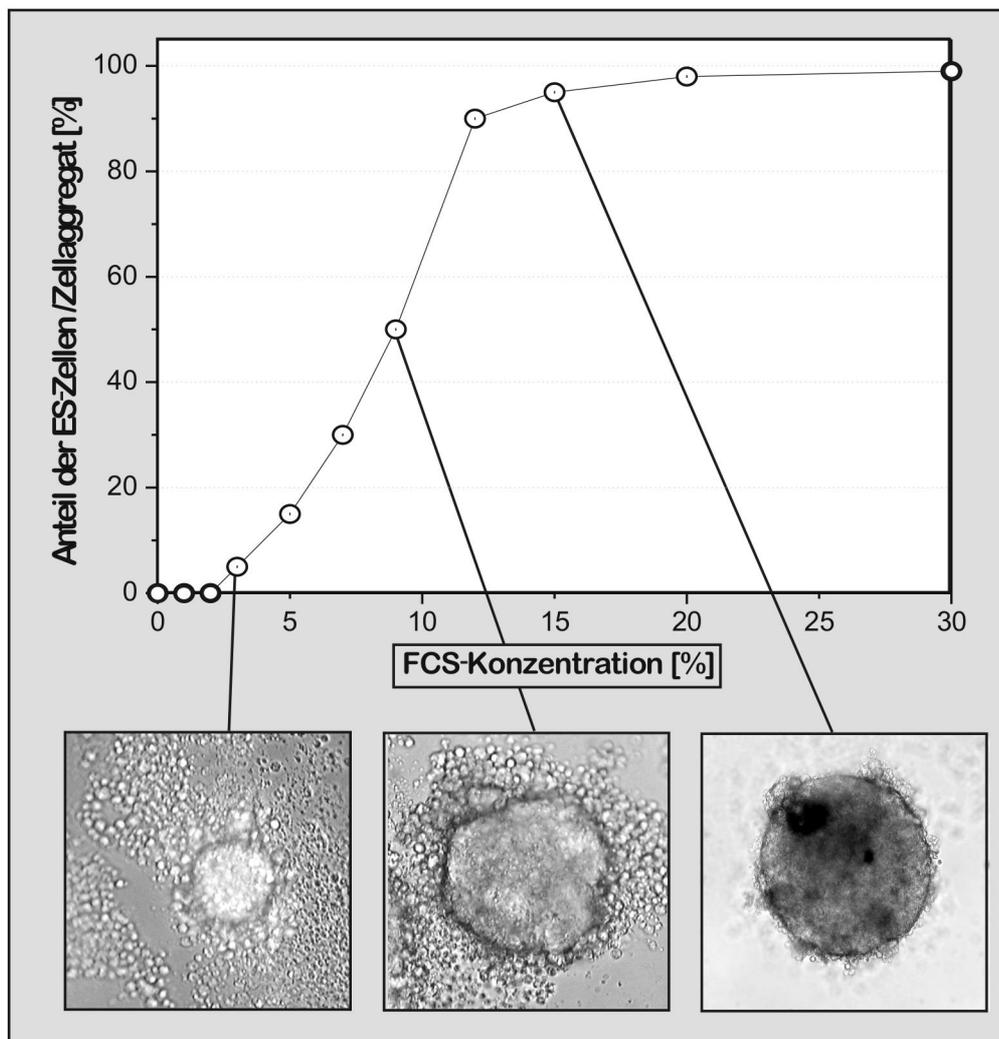


Abb.17: Die Bildung von ES-Zellaggregaten wird durch hohe FCS Konzentrationen begünstigt.

Die primären ES Zell-Kulturen wachsen in Medien mit 12-15% FCS. Diese Konzentration ist jedoch nicht ausreichend, um die Aggregation der Zellen zu gewährleisten. Eine Zugabe von FCS zum Wachstumsmedium ist daher essentiell. Der untere Abschnitt der Graphik zeigt EBs, die mit den jeweils angegebenen Mengen an FCS kultiviert wurden. Bei geringer FCS-Konzentration nimmt nur ein Bruchteil der ES-Zellen an der Bildung von Aggregaten teil, während sich bei hoher FCS-Konzentration ein festes Konglomerat aus nahezu allen eingesetzten ES-Zellen formt. [120x].

Wurden die embryonalen Stammzellen mit geringer FCS Konzentration (<20%) subkultiviert, so konnten keine extensiven Zellkonglomerate beobachtet werden. Es zeigte sich zudem, daß jene EBs, die unter suboptimalen FCS Bedingungen generiert wurden, nicht in der Lage waren, Neuriten auszuwachsen. Hingegen erwiesen sich EBs aus Kulturen mit über 20% FCS als effizient differenzierbar.

Eine nachteilige Serum-Wirkung im Bezug auf eine neurale Differenzierung konnte nach dem Ausplattieren der ES-Zellen während der Differenzierungsphase beobachtet werden. Obwohl die Überlegung nahe lag, FCS könne die Anheftung der EBs/Neuronen an das Zellkultur-Substrat fördern, zeigte sich, daß bei Serumkonzentrationen über 10%, die Neurogenese gehemmt wurde. Die idealen Wachstumsbedingungen für ES-Zell-abgeleitete neuronale Zellen waren entweder ein serumfreies Medium oder die minimale Zugabe von FCS (1%) zum Wachstumsmedium. Aus diesem Grund wurde das Differenzierungs-Protokoll dahingehend verändert, daß die ES-Zellen vor Überführung auf die Zellkulturschalen auf eine niedrige Serumkonzentration adaptiert wurden (Details in Material und Methoden). Die Zellen wurden zu diesem Zweck für weitere 4 Tage in Suspension gehalten und nach jeweils 24 Stunden sedimentiert und in neues ES-Medium mit verringerter FCS Konzentration transferiert. Andere Arbeiten konnten zeigen, daß der Entzug des Serums die Proliferation von Säugetierzellen hemmen und eine Differenzierung fördern konnte (Gerharz *et al.*, 1989). Möglicherweise verhilft die Hemmung der Proliferation den ES-Zellen, eine neurale Differenzierung einzuleiten. Dieser Mechanismus würde *in vivo* Bedingungen ähneln, in denen Neuronen während ihrer Entwicklung im Zellzyklus arretieren und die Proliferation einstellen.

4.1.2.3 Einfluss von Medien-Zusätzen auf die Neurogenese

Nach der Induktionsphase mit Staurosporin (sog. 4+4 Induktion; 4 Tage EB-Bildung + 4 Tage Suspension) wurden die embryonalen Aggregate zur Differenzierung auf beschichtete Zellkulturplatten transferiert. Um die neuronale Entwicklung der ES-Zellen zu optimieren, wurden die Zellen zudem in einem neuen Medium subkultiviert. Es zeigte sich, daß Medien mit hoher Kalziumkonzentration das Wachstum der ES-Zellen förderten. Wurden die Zellen in DMEM/F-12 Medium mit wenig CaCl₂ ausplattiert, so konnte keine Zelldifferenzierung beobachtet werden. Dieses Verhalten ist möglicherweise mit der Eigenschaft des STS zu erklären, den Kalzium-Haushalt der Zelle zu stören.

Obwohl ein Wachstum der ES-Zellen in Standard DMEM-Medium möglich war, erwies sich Neurobasalmedium™ (NB) als effektiver. Neurobasalmedium™ unterstützt Wachstum und Phänotyp neuronaler Zellen und wird gewöhnlich für das Wachstum von Hippocampus- und vielen anderen Neuronen des ZNS genutzt.

Für die erste Plattierung wurde jeweils 25 μ M Glutaminsäure zum NB Medium gegeben um ein Anwachsen der Zellen am Substrat zu fördern. Desweiteren wurden verschiedene Medien-Zusätze getestet, welche sich auf das Zellwachstum und die Differenzierung auswirken könnten (Abb. 18).

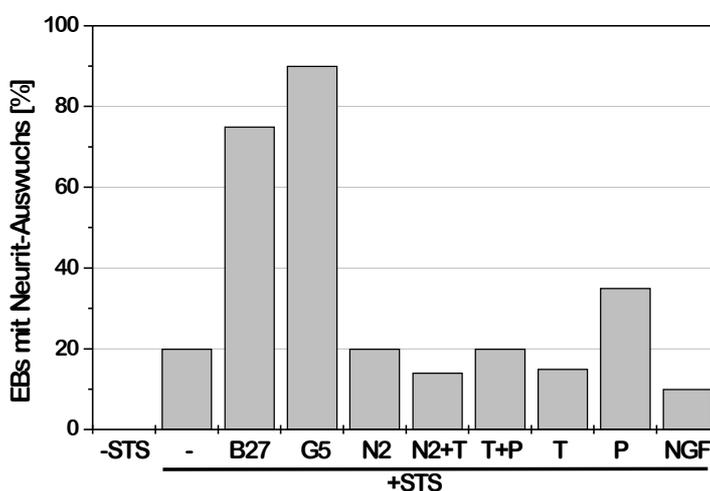


Abb.18: Einfluss verschiedener Medium-Zusätze auf die neuronale Differenzierung.

Jeweils 200 EBs wurden in NB Medium + 1% FCS mit den angegebenen Zusätzen auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellaggregate mit neuronalen Auswüchsen ausgezählt.

T = 0,5 μ g/ml α -Tocopherol; P = 0,5 μ g/ml Putrescin; NGF = 50 ng/ml Nerve Growth Factor 7S; STS = 20 nM Staurosporin.

Staurosporin erwies sich als Aktivator der neuronalen Entwicklung auch ohne die Zugabe von zusätzlichen Medienbestandteilen. Andererseits konnte die Effizienz der Differenzierung um das Mehrfache gesteigert werden, wenn die Zellkulturen mit B27- oder G5-Supplement versetzt wurden. B27 ist ein chemisch definiertes Konzentrat, eine Modifikation von Brewer's B-18 Formulierung (Brewer, 1989), welches ursprünglich für die Kultivierung fötaler Hippocampuszellen der Ratte entwickelt wurde. Eine genaue Liste der Bestandteile dieses Substanz-Gemisches ist jedoch nicht veröffentlicht. Hingegen ist bekannt, daß B27 das Wachstum von Neuronen aus embryonalen Ratten-Striatum, Substantia Nigra, Septum, Cortex und Cerebellum unterstützt.

Eine nahezu optimale neuronale Differenzierung wurde durch die Zugabe von G5 zum Medium erzielt (siehe Abb. 18A, D). G5-Supplement ist ein chemisch definiertes System zur selektiven Kultivierung bestimmter Gliazellen in Verbindung mit einem Basismedium. So unterstützt B27 das Wachstum von primären und etablierten Tumorzelllinien mit Astrozyten-Phänotyp. G5 enthält sowohl Insulin als auch Transferrin, welche schon während der Induktionsphase verwandt wurden. Zudem enthält es

geringe Mengen an Selenit, Biotin, Hydrocortison und die Wachstumsfaktoren EGF und FGF. Es ist möglich, daß durch die Induktion von STS die ES-Zellen zu EGF/FGF-reaktiven neuronalen Vorläuferzellen differenzieren (siehe Abschnitt 4.1.4). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, daß sich die ES-Zellen nicht in der Gegenwart von N2 Supplement differenzieren ließen. N2 besitzt eine ähnliche Formulierung wie G5, jedoch fehlen die beiden Wachstumsfaktoren EGF und FGF vollständig.

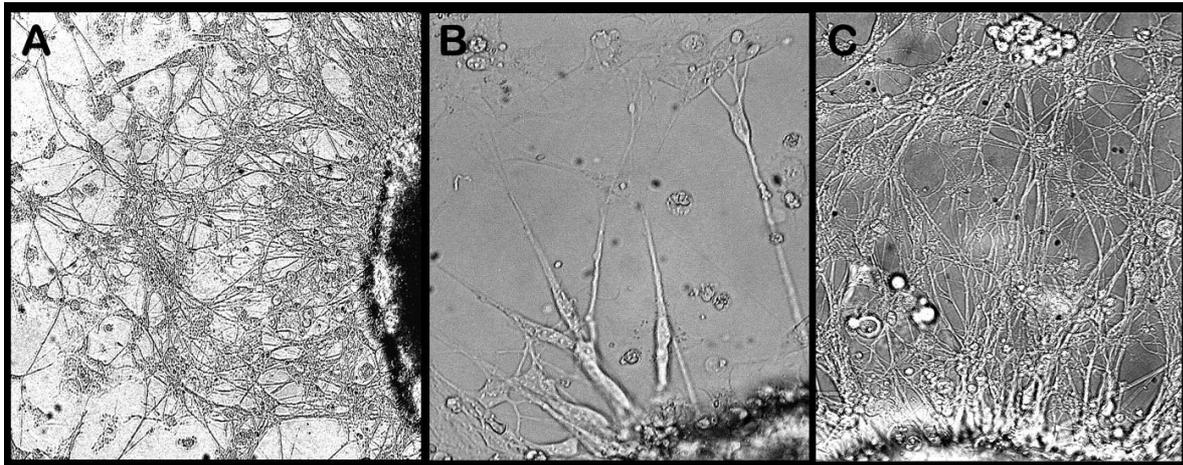


Abb. 19: Embryonale Aggregate 20 Tage nach der Plattierung auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen. **A:** IB10-Zellen in der Gegenwart von G5. Es entstehen neuronale Netzwerke, welche sich mehrere Millimeter von der peripheren Schicht der EBs erstrecken können. [120x]. **B:** Neuritenauswüchse aus EBs der IB10-Zelllinie, welche in Neurobasalmedium mit Supplement B27 kultiviert wurden. [480x]. **C:** Neuronale Auswüchse mit typischer Glia-Morphologie in Zelllinie RW4. Es zeigt sich eine deutliche Zell-Migration an der Peripherie der primären neuronalen Zellen. [120x].

Gewöhnlich dient N2-Supplement der Kultivierung von primären Rattenneuronen in Verbindung mit NB-Medium und enthält neben den erwähnten Bestandteilen auch 0,63 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron und Putrescin in einer Endkonzentration von 16 $\mu\text{g/ml}$ Medium. Wurde den ES-Zellen die vergleichsweise geringe Menge von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin beigelegt, so konnte auch ein leichter Anstieg in der Differenzierungsrate beobachtet werden. Es ist jedoch schwierig zu beurteilen, ob dieser Anstieg signifikant ist, da nur etwa 200 EBs pro Ansatz ausgezählt wurden und trotz der höheren Putrescin-Menge im N2 Supplement keine vermehrte Neuritenbildung ermittelt werden konnte.

Im Gegensatz zu Putrescin führte die Zugabe von α -Tocopherol zu einer verminderten neuronalen Differenzierung, offenbar durch direkte Inhibition, da das Vitamin auch in Verbindung mit Putrescin eine Hemmung der Differenzierung hervorrief. α -Tocopherol dient häufig als wachstumsfördernde Substanz und als genereller Aktivator der Zell-Differenzierung *in vitro*. Da es häufig ein fester Bestandteil von Nährmedien ist, sollte

daher bei Differenzierungsstudien darauf geachtet werden, ein Tocopherol-freies Medium zu verwenden.

Staurosporin Differenzierungs-Medium für ES-Zellen		
Neurobasalmedium™	500 ml	Gibco #21103-049
Insulin	1 µg/ml	-
Transferrin	3 µg/ml	Syn.: Siderophilin
Ascorbinsäure	10 µg/ml	-
Fötale Kälberserum (FCS)	1%	-
Penicillin/Streptomycin	6 ml	(Gibco; 100x)
L-Glutamin	6 ml	(Gibco; 100x)
Staurosporin	20 nM	15 nM für Bruce4 Zellen
Putrescin	0,5 µg/ml	-
Natrium Pyruvat	6 ml	(Gibco; 100x)
Nicht-essentielle Aminosäuren	6 ml	(Gibco; 100x)
Glutaminsäure	25 µM	-
optional: Hydrochinon	3µM	nicht essentiell
G-5	5 ml	(Gibco; 100x); Für Astrocyten
B-27	10 ml	(Gibco; 50x); Für Neuronen

Tab. 4: Medium zur neuronalen Differenzierung mit Staurosporin. Formulierung für embryonale Stammzellen der Maus.

Schließlich wurde auch die Wechselwirkung von Staurosporin mit dem neurotrophen Wachstumsfaktor NGF untersucht. Nach Plattierung der ES-Zellen wurde daher 50 ng/ml *Nerve Growth Factor 7S*, ein 130 bis 140 kDa Komplex, der die Entwicklung und die Erhaltung von sympathischen und einigen sensorischen Neuronen reguliert, zu dem NB-Medium hinzugefügt. Es zeigte sich, daß durch die Zugabe des Wachstumsfaktors nicht nur keine Zunahme differenzierter EBs erzielt werden konnte, vielmehr wurden sogar weniger EBs mit neuronaler Morphologie gezählt. Es ist bekannt, daß sich die neurotrophen Kaskaden von STS und NGF an mehreren Stellen kreuzen (Rasouly *et al.*, 1992; Ahlemeyer *et al.*, 2000) und das STS durch Bindung an den NGF-Rezeptor TRK direkt die Neurogenese durch NGF inhibieren kann (Campbell & Neet, 1995). Die Daten an den drei untersuchten ES-Zelllinien deuten darauf hin, daß auch NGF einen Schritt der durch STS aktivierten neuronalen Wege inhibiert. Mögliche Interaktionen der beiden Substanzen werden im Kontext mit Daten zur STS Inhibition durch Retinsäure (Abschnitt 5.1) in der Diskussion besprochen.

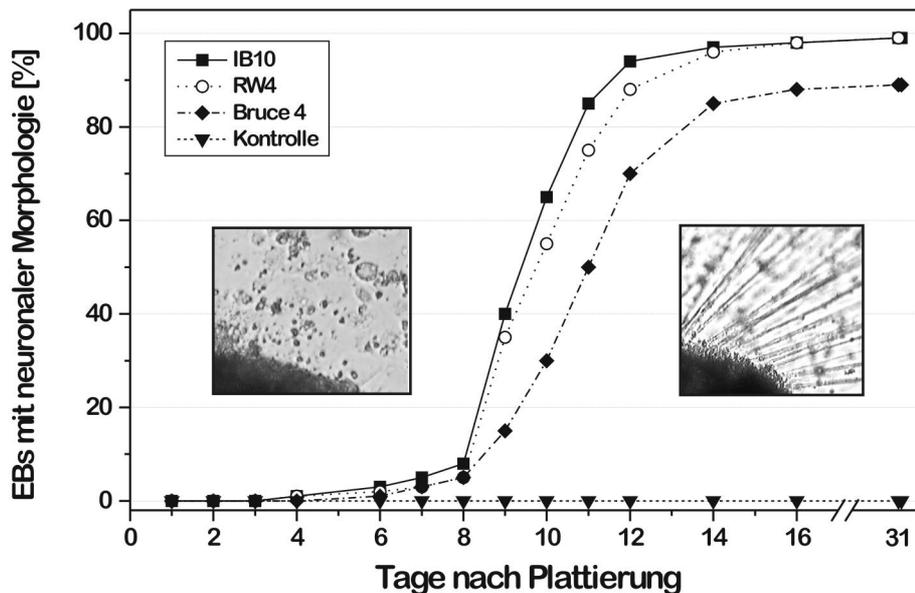


Abb. 20: Zeitabhängige Progression des Neuritauswuchses von embryonalen Aggregaten. EBs der Zelllinien IB10 und RW4 wurden für bis zu einem Monat in Medium mit wenig Serum (1% FCS), Supplement B27 und 20 nM STS inkubiert. Wegen der höheren Anfälligkeit gegenüber STS induzierter Apoptose wurden Bruce4-Zellen mit nur 10 nM STS behandelt. Die Kontrollinie repräsentiert EBs von allen drei Zelllinien ohne die Zugabe von STS. Keine der drei ES-Zelllinien zeigte einen Neuriten Auswuchs ohne STS.

Die Auswertung der gesammelten Daten lieferte eine neue Formulierung für ein Differenzierungsmedium mit STS (Tab. 4). Wurden EBs mit dieser Zusammensetzung kultiviert und auf Gelatine- und Laminin-beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert, so zeigte sich eine nahezu vollständige Konversion von Zellen mit undifferenzierten zu Zellen mit einem neuronal differenzierten Zustand (Abb. 20). Die Neurogenese wurde durch visuelle Auszählung von ES-Zellen mit Neurit-Auswüchsen und durch Färbung der neuronenspezifischen Nissl-Körper mit Cresyl Violet charakterisiert (siehe Material und Methoden). Es wurde berichtet, daß innerhalb von 6 Stunden kleine Neuriten in STS behandelten Pheochromocytoma (PC-12) Zellen beobachtet werden konnten (Yao *et al.*, 1997). Zwar zeigten die untersuchten ES-Zellen innerhalb von 2 Tagen gelegentlich erste neuronale Morphologien (Abb. 20), jedoch startete ein extensives Neuriten-Wachstum erst an Tag 8 nach der Plattierung. Nach zwei Wochen in Kultur zeigten annähernd 90% der EBs der Mausstämme 129/ola (IB10) und 129/sv (RW4) eine neuronale Morphologie. Die Neurogenese in ES-Zellen des Mausstamms C57BL/6 (Bruce4) erwies sich als weniger effektiv (max. 80% Neuriten nach 14 Tagen).

Eine alternative Methode, die embryonalen Stammzellen nach der STS-Inkubation zu differenzieren besteht darin, die Zellen der geernteten EBs vor der Plattierung durch Trypsinisierung voneinander zu lösen. Diese Maßnahme war jedoch nicht so erfolgreich wie die direkte Transferierung intakter Aggregate. Obwohl viele der ES-Zellen eine deutliche Differenzierung durchlebten (siehe Abb. 21), entstanden weder ausgedehnte neuronale Netzwerke, noch konnten Zellen mit deutlicher Dendritenbildung nachgewiesen werden.



Abb. 21: Das Auflösen großer Zellaggregate durch Trypsin-Behandlung führte zu einer verringerten neuronalen Differenzierung. Typische Morphologie einer differenzierten IB10-Zelle, 4 Tage nach der Plattierung auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen [720x]. Obwohl eine klare Differenzierung zu beobachten ist, bildeten die Zellkörper kaum Dendriten und auch die langen Neuriten ähnlichen Zellauswüchse verzweigten sich nicht.

Die Einzelzellkolonien bestanden in diesen Experimenten aus etwa 50 embryonalen Aggregaten, d.h. maximal aus 100.000 Zellen pro Ø10cm Zellkulturschale. Möglicherweise ist diese Zellkonzentration nicht ausreichend, um eine neuronale Signaltransduktion innerhalb der Zellpopulation zu ermöglichen. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß eine nahezu konfluente Kolonie von $\sim 2,5 \times 10^6$ Zellen eine ausgedehnte neuronale Entwicklung ermöglichen könnte.

4.1.2.4 Gerichtete Induktion der neuronalen Entwicklung

EBs, die mit den angegebenen Parametern (siehe Tab. 4), aber ohne Supplement B27 oder G5 kultiviert wurden, veränderten mehrheitlich (>70%) ihre Morphologie. Erstaunlicherweise flachten sie deutlich ab und entwickelten kurz nach ihrer Plattierung rhythmisch pulsierende Zellen, die an Herzmuskelzellen erinnern (siehe Abb. 22A). Diese Zellenansammlungen kontrahierten in einer für Mausherzen typischen Frequenz und waren in der Regel, in eine im Phasenkontrast weniger kompakte Zellschicht, eingekapselt. Diese Daten ähneln denen anderer Gruppen, die eine Kardiomyozytenentwicklung nach Formung von EBs und anschließendem Anheften an eine Matrix in der Abwesenheit von neurotrophen Faktoren beobachten konnten (Wobus *et al.*, 1994; Gajovic *et al.* 1997).

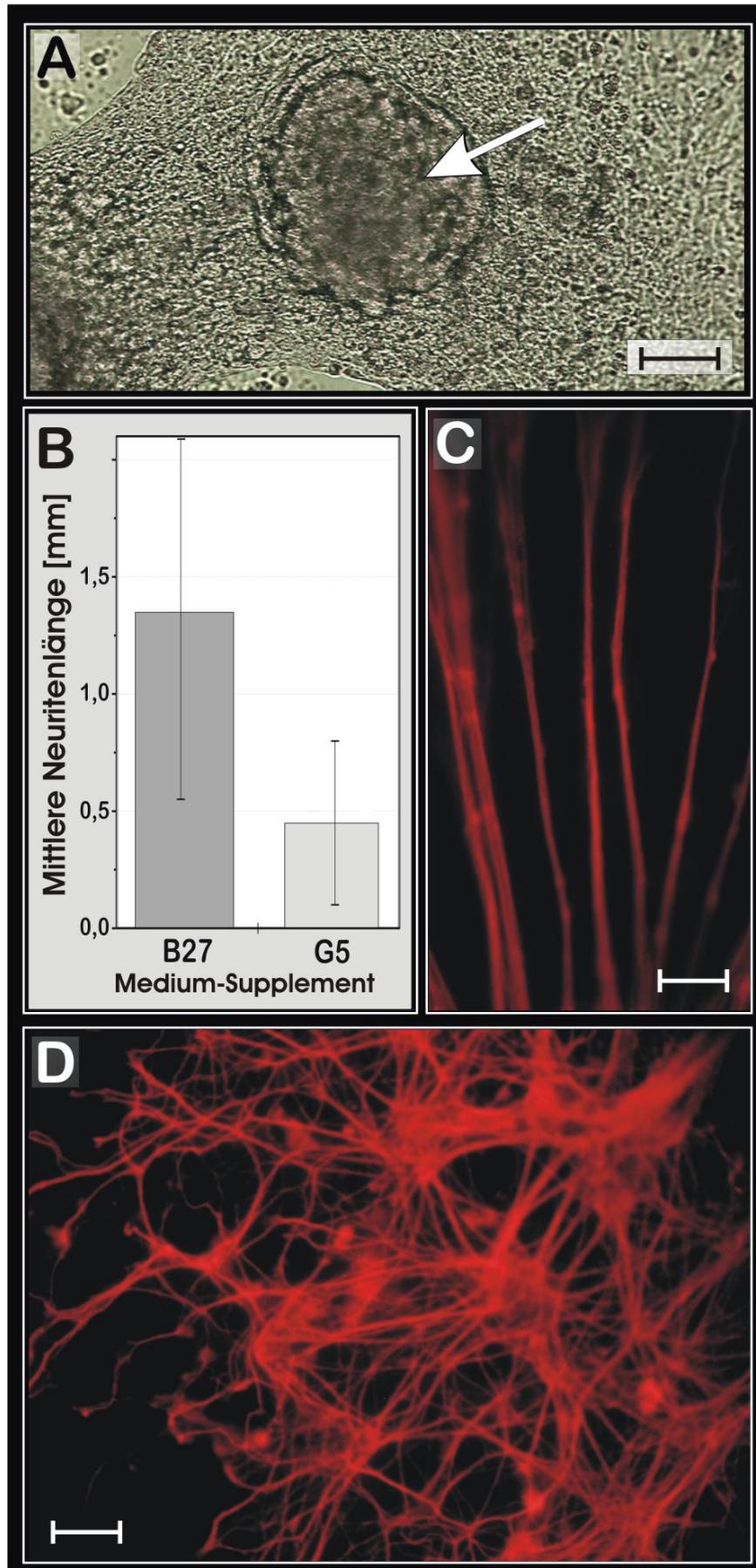
Anscheinend ist der Entzug von LIF, β -Mercaptoethanol und die Bildung von embryonalen Aggregaten ausreichend, um eine kardiomuskuläre Differenzierung von

ES-Zellen *in vitro* zu initiieren. In der Tat zeigen die Experimente dieser Arbeit, daß die Kardiogenese in allen drei ES-Zelllinien unabhängig von der neurotrophen Substanz Staurosporin verlief, denn die Medien-Zusammensetzung ohne STS war ausreichend um pulsierende Zellen zu erzeugen. Vielmehr zeigte sich STS sogar als leichter Inhibitor der Kardiomyozyten-Differenzierung, wahrscheinlich durch eine frühzeitig eingeleitete Neurogenese (siehe dazu auch Abschnitt. 4.1.5).

Nichtsdestotrotz, war es durch eine gezielte Zugabe von Mediensupplementen G5 oder B27 in der Differenzierungsphase möglich, eine zielgerichtete neuronale Differenzierung einzuleiten, die neuronale Gewebe mit sich deutlich voneinander unterscheidbaren Morphologien generierte. Dieses Differenzierungsmuster deutet darauf hin, daß STS-induzierte ES-Zellen einige der biologischen Eigenschaften mit undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen teilen.

Abb. 22: Die Morphologie von STS-induzierten embryonalen Aggregaten ist stark beeinträchtigt durch neurotrophe Medien-Supplemente. **A:** Phasen-Mikroskopie eines an das Substrat angehefteten embryonalen Aggregats aus IB10 ES-Zellen. Wurden die EBs in modifizierten Neurobasalmedium (Tab.4) ohne die Zusätze G5 oder B27 kultiviert, so flachten die EBs ab und bildeten große Areale aus sich rhythmisch pulsierenden Herzmuskelzellen (Pfeil). Skalierungsbalken: 100 μ M. **B:** Nach 7 bis 8 Tagen Post-Plattierung (TPP) wuchsen aus der peripheren Zone der Zellaggregate Neuriten aus. Die durchschnittliche Länge der neuronalen Auswüchse war am größten in Kulturen mit B27. Einige Neuriten erstreckten sich über 4 mm in die Länge. **C:** IB10 Zellen bei 15 TPP nach Immunofärbung durch den neuronalen Marker Tau (Mikrotubulin-assoziiertes Protein). Die meisten EBs, die sich in der Gegenwart von B27 wuchsen, entwickelten lange Auswüchse mit nur wenigen Dendriten, die sich nur nach etwa einem $\frac{1}{5}$ tel der Zellfortsätze verzweigten. Skalierungsbalken: 60 μ M. **D:** In Kulturen mit NB-Medium plus G5 sprossen aus der Differenzierungszone der EBs kurze, verzweigte Neuriten, die interneuronale Netzwerke ausbildeten. Alle Zellen zeigten sich positiv nach Immunofärbung für *microtubule-associated protein tau*. Skalierungsbalken: 60 μ M.

Bild nächste Seite →



EBs, die in der Gegenwart von Supplement B27 wuchsen, bildeten in der Regel lange, kaum verzweigte Neuriten von über 1 mm Länge. Diese Axon-ähnlichen Strukturen verzweigten sich meist erst nach etwa $\frac{4}{5}$ tel der jeweiligen Zellfortsätze (siehe Abb. 22C und 22D). Einige der neuronalen Auswüchse erstreckten sich bis über die 10-fache Länge der EB-Durchmesser und erreichten in manchen Fällen Längen von über 4 mm. Diese Eigenschaft der Neuriten ermöglicht auch eine einfache mechanische Manipulation, die für Struktur- und Funktionsanalysen von Neuronen (z.B. bei der Untersuchung der Wallerian-Degeneration) notwendig ist. Im Gegensatz zu B27 fördert G5 die Entwicklung von Zellen mit relativ kurzen Zellfortsätzen und typischer Glia-Morphologie (siehe Abb. 22B und 22D). Diese Zellen bildeten großflächige Netze aus miteinander interagierenden Zellen (Abb. 22D). Neue Zellkörper mit Astrozytenmorphologie formten sich auch in einigen Abstand zu den EBs, ein Hinweis auf eine Zellmigration innerhalb der Kultur.

Alle neuronalen Zellen konnten über mehrere Wochen (getestet wurde maximal bis 7 Wochen nach Plattierung) in Kultur gehalten werden, ohne daß ein signifikanter Zelltod zu beobachten war.

4.1.3 Immunochemische Charakterisierung neuronaler Zellen

Die Charakterisierung der aus den ES-Zellen differenzierten neuronalen Zellen erfolgte durch Färbung mit Antikörper-assoziierten Fluoreszenzfarbstoffen und durch Analyse der Genexpression mittels RT-PCR.

Um den prozentualen Anteil der postmitotischen Neuronen in den STS-behandelten Kulturen zu erhöhen, wurden die Zellen 6-7 Tage nach der Plattierung mit 4 mg/ml Aphidicolin oder 2 mg/ml Ara-C (Cytosin β -D-Arabinofuranosid) versetzt (siehe Material und Methoden). Diese Zell-Zyklus-Regulatoren inhibieren die eukaryontische DNA Replikation in der S-Phase durch Blockade der zelleigenen Polymerasen. Durch Initiierung apoptotischer Kaskaden sterben nicht-neuronale Zellen zügig ab, und man erhält eine nahezu reine neuronale Zellkultur. Die verbliebenden post-mitotischen Neuronen wurden anschließend durch Immunofärbung mit Antikörpern gegen die neuronenspezifischen Cytoskelett-Proteine Tau und MAP2 erkannt. Beide Proteine gehören zur Familie der MAPs (*microtubule associated proteins*), die wichtige Rollen in der Regulierung der Zellstruktur neuronaler Zellen spielen (Goedert *et al.* 1991). Zudem wurden die Zellen auf Vorhandensein des hochmolekularen Neurofilaments NFH mit Hilfe eines NF200-Antikörpers getestet.

4.1.3.1 Neurofilamente- und Mikrotubulin-assoziierte Proteine Tau und MAP2

Tau ist ein Protein aus 432 Aminosäuren und mit einer Länge von 20 nm das kleinste der bekannten Neurofilamente. Tau-mRNA wird während der ganzen neuronalen Entwicklung exprimiert und induziert vor allem in den Axonen die Polymerisierung von Tubulin. Das Filament findet sich gewöhnlich auch in geringerer Menge innerhalb der Dendriten und den Zellkörpern der Neuronen und ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt der neuronalen Kernstruktur über den post-mitotischen Zustand hinaus.

Diese Arbeit zeigt, daß die Zusammensetzung der Zytoskelett-Elemente in den ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Zellen der Zusammensetzung in Axonen und Dendriten der frühen embryonalen Entwicklung ähnlich ist, so wie sie für Neuronen in primären Kulturen beschrieben wurde (Heidemann, 1996; Mandell & Banker, 1995). Am Tag 15 nach der Plattierung (*Tage Post-Plattierung*, TPP) waren sowohl die langgestreckten "Axon-ähnlichen" Auswüchse der EBs als auch die kürzeren "Dendriten-ähnlichen" Zellfortsätze positiv für anti-Tau (Abb. 23A-D). Im Vergleich zu den umgebenden Neuriten war die Intensität der Färbung in Auswüchsen mit typisch axonaler Morphologie am stärksten.

Das gegenteilige Muster fand sich bei Färbungen für das Mikrotubulin-assoziierte Protein 2 (MAP2), mit einer höheren Intensität in den stärker verzweigten "Dendriten-ähnlichen" Zellfortsätzen (Abb. 24A-D). Diese Daten sind im Einklang mit Entwicklungsprozessen in der frühen neuronalen Differenzierung. Wenn Axone wachsen, verlieren sie typischerweise MAP2, und Tau wird angereichert, während MAP2 primär in dendritischen Fortsätzen konzentriert wird (Mandell & Banker, 1995). In der Tat konnten Neuronen mit ausgeprägt großen Axonen durch anti-MAP2 nicht markiert werden. Aus Abb. 23A wird ersichtlich, daß die aus den ES-Zellen generierten neuronalen Vorläuferzellen tatsächlich morphologisch und wahrscheinlich auch funktionale Neuronen auszubilden vermochten. Die abgebildete Zelle zeigt alle Merkmale eines typischen Neurons *in vitro*, so einen multipolaren Zellkörper mit stark Tau-positivem Axon und verzweigte Dendritenfortsätze mit dendritischen Dornen.

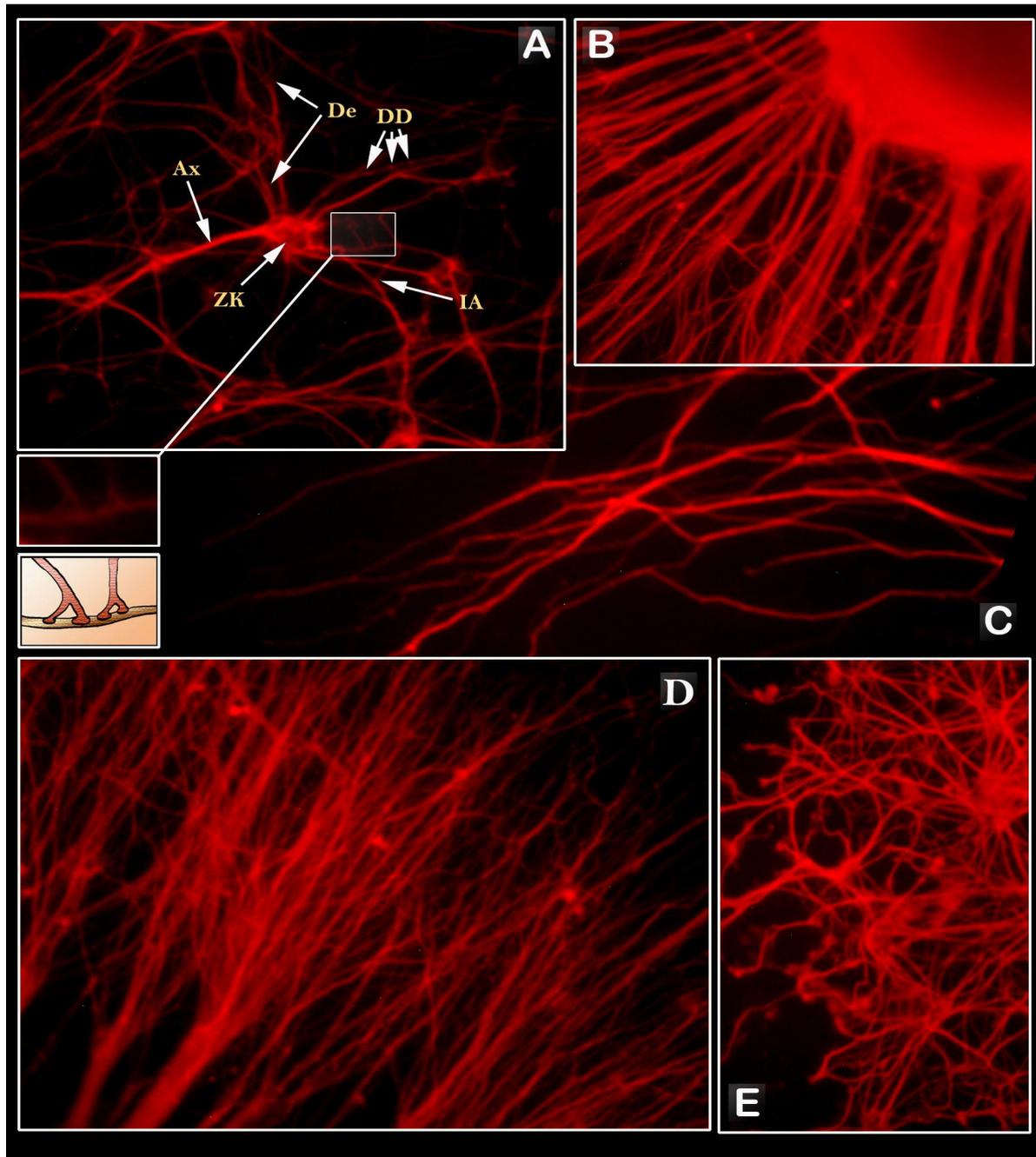


Abb. 23: *Immunocytochemische Charakterisierung der neuronalen Zellen mit anti-Tau.* **A:** Beispiel einer typischen post-mitotischen neuronalen Zelle innerhalb eines Netzwerkes von differenzierten IB10-Zellen in NB-Medium + B27. ZK = Zellkörper; Ax = Axon; De = exzitatorischer Dendrit; DD = Dendritische Dornen; IA: Inhibitorisches Axon einer benachbarten Zelle. Hemmende Axone formen vor allem Kontakte an Synapsen des Zellkörpers, besonders in der Nähe des Axonhügels, an dem das Axon entspringt [720x]. Ausschnitts-Vergrößerung: Erregende (exzitatorische) Synapsen formen eine Verbindung zu den postsynaptischen Membranen benachbarter Zellfortsätze (+ Schema). **B:** Periphere Zone eines embryonalen Aggregats mit Neuritenfortsätzen [240x]. **C:** Feinstruktur der Endverzweigungen der Neuriten [480x]. **D:** Häufig bildeten sich aus den radial ausgehenden Neuriten großflächige, verzweigte "Dendritenbäume". Da die Zellkulturbedingungen keine strukturspezifischen Signale enthalten, wachsen die Neuriten wahrscheinlich ungerichtet von den Zellaggregaten weg. Jedoch ist anzunehmen, daß in der Nähe der EBs ein chemischer Gradient entsteht, der verhindert, daß die Zellfortsätze sich zurück zum Ausgangspunkt bewegen [240x]. **E:** Morphologie der Axon-freien Zellen aus NB-Medium mit Supplement G5 [240x].

Bei genauerer Betrachtung des Zellnetzwerks erkennt man Zellfortsätze benachbarter Neuronen, die synaptische Verbindungen mit der zentral dargestellten Zelle aufnehmen. So führt das Ende eines Axons einer Nachbarzelle direkt an eine Wölbung des Zellkörpers, nahe des austretenden Axons. Diese Struktur wird auch als Axonhügel bezeichnet und ist typischerweise Anheftungspunkt inhibitorischer Axone und daher in der Regel auch reich an hemmenden Synapsen. Typischerweise wuchsen axonartige Neuriten radial aus dem ES Zellaggregat heraus (Abb. 22b). Die Dendritenbäume, die sich am wachsenden Teil der Zellen befinden, orientierten sich ebenfalls nur in radialer Richtung vom Ausgangspunkt weg. Dieses Wachstum lässt darauf schließen, daß in der engeren Umgebung eines EB möglicherweise ein chemischer Gradient entsteht, an dem sich die wachsenden Neuronen ausrichten.

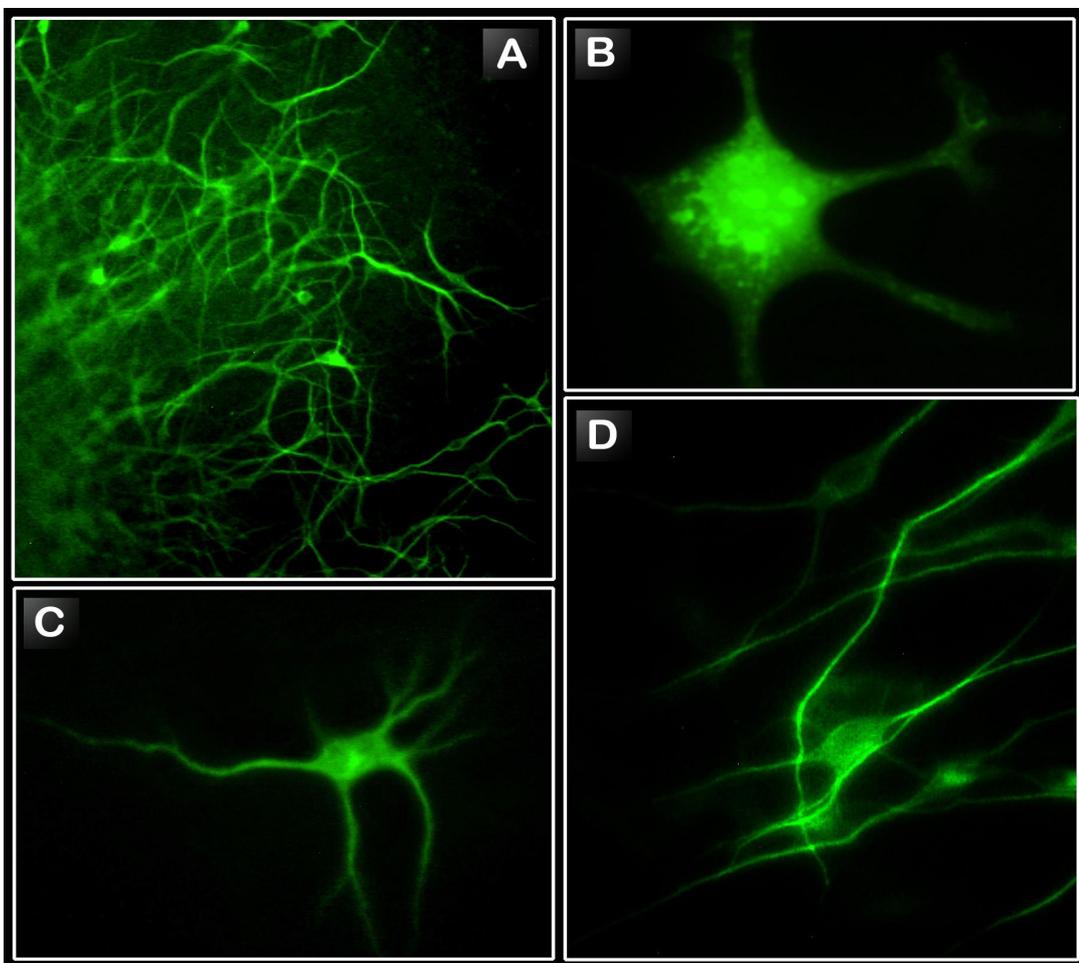


Abb. 24: Neuronale Zellen der Zelllinie IB10 nach Färbung mit anti-MAP2. **A:** Netzwerk von neuronalen Zellen nach Behandlung mit G5; 20 Tage nach der Plattierung. [480x] **B:** Feinstruktur einer neuronalen Zelle. MAP2 akkumuliert an einigen cytosolischen Punkten innerhalb des Zellkörpers [1200x]. **C:** Einzelnes Neuron in der Migrationszone außerhalb des Kern-Zellaggregats [720x]. **D:** Detailaufnahme der Verästelung neuronaler Zellen [720x].

Interessanterweise zeigte sich, daß die Zellen, die keine langen Neuriten ausbildeten (Gliatyp) keine bevorzugte Wachstumsrichtung besaßen (Abb. 23E und 23A).

Die Immunofärbung mit MAP2 lieferte weitere Einblicke in die Feinstruktur der differenzierten ES-Zellen (siehe Abb. 24B). MAP2, ein 100 nM langes Molekül, ist das wichtigste MAP der Dendriten, welches Mikrotubulinfasern innerhalb der neuronalen Zellfortsätze verbindet. Es zeigte sich, daß MAP2 an mehreren Punkten außerhalb des Nukleus akkumulierte. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um freie Polysomen, an denen MAP2 während der Neurogenese produziert wird. Von dort wird das Protein in die Dendriten und zum *microtubule-organizing center* (MTOC) transportiert. Das Vorkommen der MAP-Aggregate deutet darauf, daß diese Zellen sich noch in der frühen Entwicklungsphase befinden. In älteren Neuronen erhöht sich hingegen die MAP2-mRNA Konzentration in den Zellfortsätzen, und der Produktionsort von MAP2 verlagert sich weiter in die Dendriten (Heidemann, 1996).

Um das Entwicklungsstadium von post-mitotischen Neuronen weiter zu charakterisieren, wurden die immunochemischen Untersuchungen auf eine weitere Klasse von Cytoskelett-Proteinen, den Neurofilamenten (NF), ausgedehnt. Neurofilamente gehören zu den intermediären Filamenten (IF, Typ IV) und finden sich in fast allen neuronalen Zellen, speziell in langen Neuronen. Die häufigste Form von IFs in Neuronen wird durch ein Heteropolymer, dem sog. NF-Triplett gebildet. Es besteht aus der hoch-molekularen Untereinheit (NFH, 200 kDa), NFM, dem mittel-molekularen Neurofilament (130-170 kDa) und der leichten Untereinheit NFL (68 kDa). Jede dieser Untereinheiten wird jeweils von einem separaten Gen kodiert. Ein wichtiges Merkmal dieser Filamente besteht darin, daß sich ihr Vorkommen und ihre Komposition innerhalb der Neuronen während der Entwicklung von frühen neuronalen Vorläuferzellen bis zum adulten Neuron drastisch verändern (Übersicht in Lee *et al.*, 1996). Diese Eigenschaft ermöglicht es, neuronale Zellen in ihrem Entwicklungszustand zu charakterisieren.

Das leichte Neurofilament NFL und auch NFM lassen sich vorwiegend während des anfänglichen Neurit-Auswuchses detektieren, während die höher molekulare Untereinheit NFH erst in einer Phase exprimiert wird, wenn die Neuronen bereits myelinisiert und voll differenziert sind. Wie die Daten zu MAP2 zeigte auch die Immunofärbung mit anti-NF200 (NFH), daß die durch STS induzierten Neuronen sich zum Zeitpunkt 30 TPP noch in einer sich differenzierenden Phase befinden. In keiner der untersuchten Zelllinien konnte somit das für die adulten Neuronen charakteristische NFH identifiziert werden. Hingegen erwiesen sich die differenzierenden Zellen nach kurzer STS-Behandlung als positiv für NFL (siehe Abschnitt 4.1.4). Diese Resultate

deuten darauf hin, daß die durch STS induzierten neuronalen Zellen einen für neuronale Zellen typischen Entwicklungsablauf durchleben und nicht *per se* alle Gehirnspezifischen Gene auf einmal angeschaltet werden. Experimente an primären neuronalen Kulturen zeigten weiterhin, daß *in vitro* eine deutliche Expression von NFH innerhalb von 6 Wochen nicht zu erwarten ist (T. Mack, pers. Kommunikation). Da die untersuchten Zelllinien nicht über längere Zeiträume immunochemisch untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, daß eine andauernde Kultivierung auch die Expression von NFH bedingt.

4.1.3.2 Expression des Kohlenhydrat Epitops HNK-1

Die aus den ES-Zellen generierten neuronalen Zellen wurden weiterhin mit einem Antikörper analysiert, der das neuronspezifische Kohlenhydrat Epitop HNK-1 erkennt.

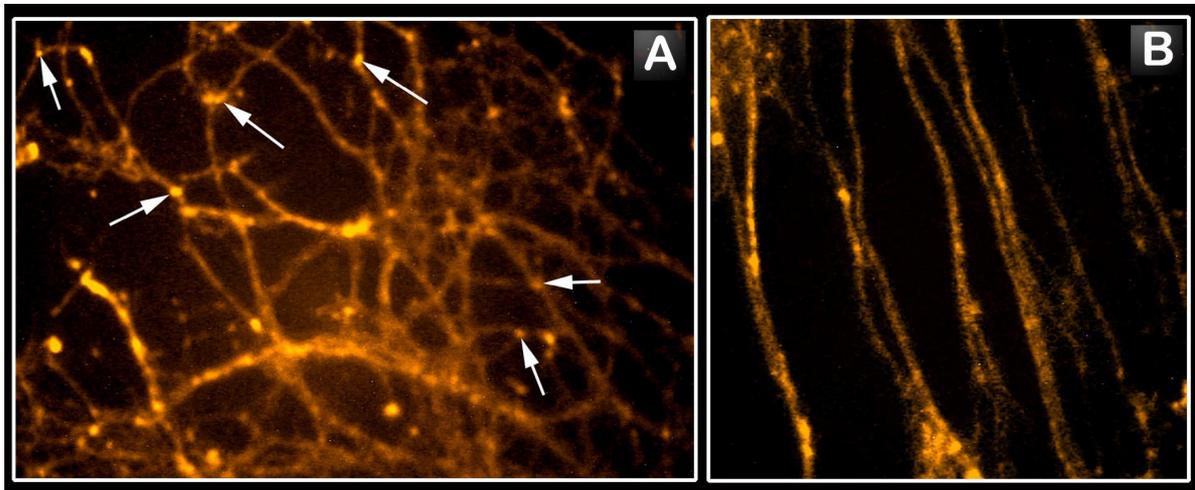


Abb. 25: Immunocytochemische Charakterisierung differenzierter IB10-Zellen mit einem Antikörper gegen das Kohlenhydrat Epitop HNK-1. **A:** Netzwerk aus Zellen, die in der Gegenwart von G5 kultiviert wurden. Häufig fanden sich besonders starke Signale an Zell-Zell Kontakten und Neuriten-Endpunkten (Pfeile) [480x]. **B:** Axonale Neuriten in NB-Medium + B27 [480x].

Das Epitop findet sich an einer Reihe von Zell-Adhäsionsmolekülen, darunter das *neural cell adhesion molecule* (NCAM), L1, *myelin-associated glycoprotein* (MAG), *transiently expressed axonal glycoprotein-1* (TAG-1) und P0. Des Weiteren wird es in einigen Glycolipiden des Nervensystems exprimiert, so SGGL-1 und SGGL-2 (Kruse *et al.*, 1984; Dodd *et al.*, 1988; Krueger *et al.*, 1992). Das HNK-1 Epitop besteht aus dem sulfonierten Trisaccharid $\text{SO}_4\text{-3GlcAb1-3Galb1-4GlcNAc}$, eine Verbindung, die auch Teil mancher Glycoproteine ist. Die Expression von HNK-1 ist zeitlich und räumlich während der Entwicklung des Nervensystems reguliert (Abo & Balch 1981; Bakker *et al.*, 1997). So beobachtete man eine besonders hohe Expression von HNK-1 während

der frühen perinatalen Periode im cerebralen Cortex der Ratte. Diese Phase zeichnet sich besonders durch den Prozess der Myelinisierung und Synaptogenese aus. Auch in Zellen von migratorischen Zellen des Stammhirns zeigt sich eine erhöhte Expression. Diese und andere Arbeiten verdeutlichten, daß HNK-1 wichtige Rollen in Zell-Zell und Zell-Substrat Interaktionen, Zell-Migration, Synaptenbildung und Neuriten Wachstum spielt (siehe auch Bronner-Fraser, 1987; Martini *et al.*, 1992).

Es zeigte sich, daß alle neuronalen Zellen der drei untersuchten ES-Zelllinien positiv für das HNK-1 Epitop waren (Abb. 25). Sowohl in langen Neuriten, als auch in kürzeren und verzweigten Dendriten war das Epitop nachweisbar. Die Signalintensität war in den Endpunkten der EB Auswüchse und an Zell-Zell Kontakten erhöht. Diese Resultate deuteten darauf hin, daß die *in vitro* Kulturen möglicherweise funktionale Synapsen auszubilden vermochten. Da sich andererseits die Verteilung des Trisaccharids als relativ ubiquitär erwies, ist nicht auszuschließen, daß es an mehreren Molekülen mit unterschiedlicher Funktion exprimiert wurde. Da sich HNK-1 mit deutlicher Intensität in allen neuronalen Netzwerken, insbesondere an den Zellkontaktpunkten nachweisen ließ, ist anzunehmen, daß diese Zellen innerhalb der neuronalen Gewebe interagierende Schaltkreise bildeten. Die Nachweis von HNK-1 in Zellen außerhalb der peripheren Zone der embryonalen Aggregate ist auch ein Hinweis auf eine progressive Zellmigration innerhalb der Zellkultur.

4.1.3.3 Expression des gliaspezifischen Filaments GFAP

Die Differenzierung der neuronalen Vorläufer zu Glia-Zelllinien wurde durch Immunofärbung mit einem Antikörper für das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) analysiert. GFAP gehört zu den Klasse III intermediären Filamenten des Nervensystems und ist ein typischer Marker für Astrozyten und einige Schwannsche Zellen.

GFAP-positive Zellen konnten sowohl räumlich isoliert von embryonalen Aggregaten als auch in großflächigen gewebeartigen Strukturen, die sich an neuronale Zellen anschlossen, identifiziert werden. Abbildung 26A-D zeigt GFAP-positive Zellen mit der charakteristischen Morphologie kultivierter radialer Astrocyten. Auffallend ist die Tatsache, daß die Kultivierung neuronaler Vorläuferzellen in Gegenwart von Supplement G5 die Reifung zu Gliazellen förderte. Dennoch konnten auch GFAP-positive Astrozyten in enger Nachbarschaft zu dendritischen Auswüchsen in B27-enhaltenden Neurobasalmedium identifiziert werden. Die Differenzierung der neuronalen Subtypen scheint *in vitro* jedoch nicht zufällig zu geschehen, da die

Astrozyten niemals in engem Kontakt zu langen, unverzweigten Neuriten (Vergleich Abb. 23B) auftraten.

Ein erstmaliges Auftreten von Neuronen und Gliazellen in den Kulturen verlief deutlich asynchron. Die ersten differenzierten Zellen, die bei genauer mikroskopischer Beobachtung erkannt werden konnten, waren durch lange unverzweigte, radiale Neuriten gekennzeichnet (~ 5-8 TPP). In der Folge bildeten sich Dendritenbäume aus den Neuriten, und nach einigen Tagen waren erste neuronale Netzwerke zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt (~ 12 TPP) konnten noch keine Astrozyten in den verschiedenen Zellkulturen identifiziert werden. Erst einige Tage später, etwa ab Tag 15 nach der Plattierung, also der Neuronenbildung folgend, konnten GFAP-positive Astrocyten nachgewiesen werden. Ähnliche Resultate wurden beschrieben für Kulturen aus BLC6 ES-Zellen, die in der Gegenwart von Retinsäure differenziert wurden (Angelov *et al.*, 1998). Es zeigte sich, daß auch die Reifung dieser Neuroglia in einer genauen zeitlichen Abfolge voranschritt.

Es kann spekuliert werden, ob die neuronalen Zellen die Bildung von Astrocyten induzieren. Diese Situation würde der Entwicklung *in vivo* ähneln, in der die neuronale Entwicklung über die frühen Entwicklungsschritte erst dann voranschreitet, wenn sich nach den ersten Neuronen auch Gliazellen gebildet haben (Joosten & Gribnau, 1989). Die Gegenwart der Astrocyten während der Neurogenese ist notwendig, um eine funktionierende Axon Ausrichtung zu gewährleisten und das Überleben der Neuronen durch Sekretion neurotropher Substanzen zu sichern (Übersicht in Montgomery, 1994).

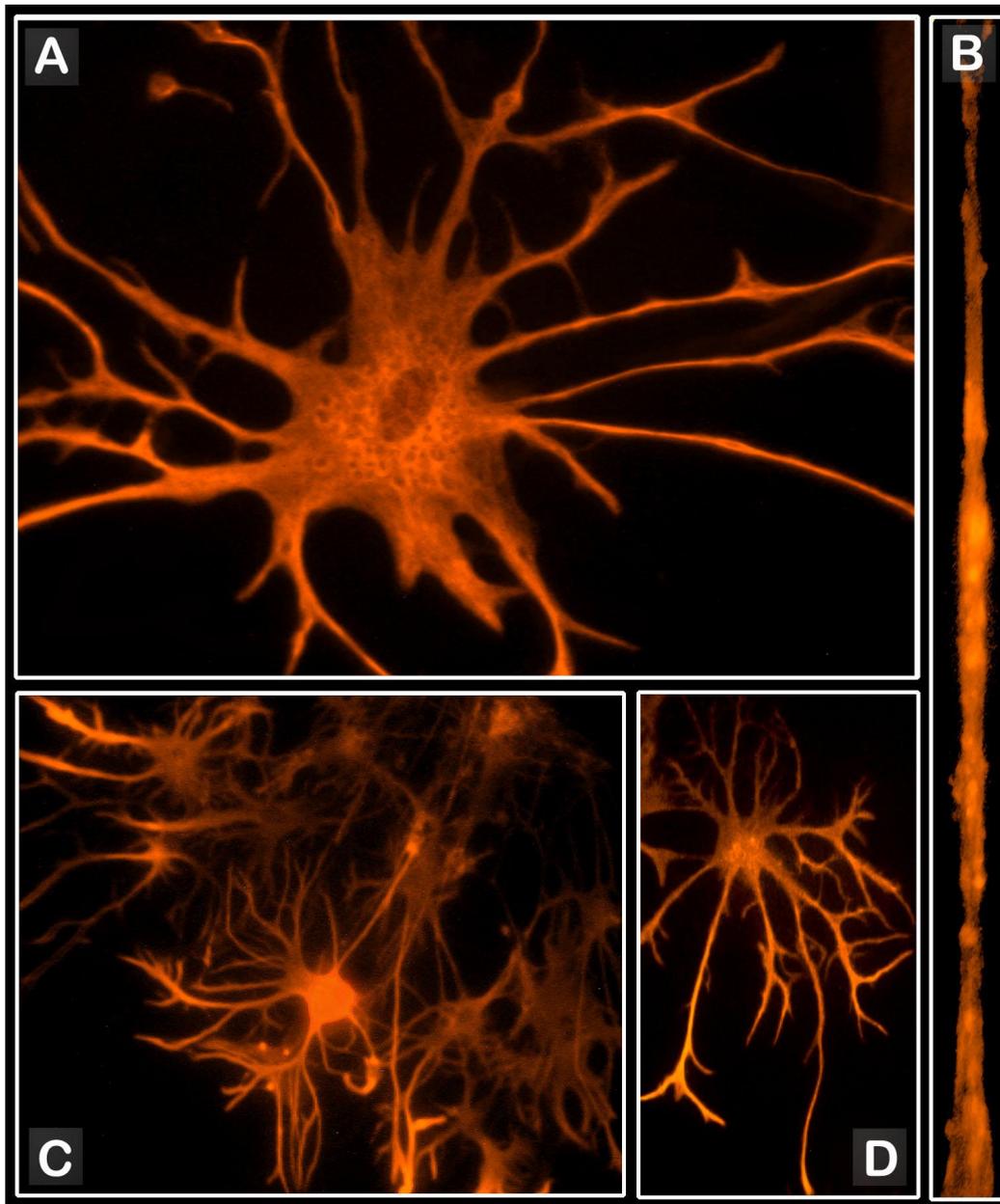


Abb. 26: *Immunochemische Charakterisierung von Gliazellen.* **A:** Feinstruktur einer radialen Astrocyte, gefärbt mit einem Antikörper gegen GFAP. Aufnahme nach 20 TPP in Neurobasalmedium + G5 [1200x]. **B:** Detailansicht eines Zellfortsatzes einer Gliazelle [1480x]. **C:** Peripheres Netzwerk aus migratorischen Gliazellen (20 TPP). [720x]. **D:** Typische Morphologie einer vereinzelt radialen Astrocyte außerhalb der Zone der äußersten Neuritenauswüchse eines embryonalen Aggregats [720x].

Weiterhin sollte nicht unerwähnt bleiben, daß keiner der für diese Arbeit verwendeten Antikörper in der Lage war, undifferenzierte Zellen oder die als Zellmatrix fungierenden Fibroblastenzellen zu färben.

4.1.4 Charakterisierung neuronaler Zellen durch RT-PCR

Um einen genaueren Einblick in die Mechanismen und Zeitabhängigkeit der STS Effekte auf ES-Zellen zu studieren, wurde die Expression der beiden neuronalen Marker Synaptophysin und des leichten Neurofilaments (NFL) genauer untersucht. Bei Synaptophysin handelt es sich um ein Transmembran-Glycoprotein, das in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen im Gehirn, Hirnstamm und neuromuskulären Verbindungen an der Bildung von synaptischen Vesikelformationen beteiligt ist (Wiedemann & Franke, 1985). Undifferenzierte ES-Zellen und ES Zellaggregate wurden für maximal 5 Tage mit jeweils 20 nM STS in Neurobasalmedium und 1x B27 behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten (siehe Abb. 27) wurde die zelluläre RNA isoliert und mit zufälligen Oligonukleotiden (*random primer*) zu cDNA rücktranskribiert (siehe Material und Methoden). Die entstandenen cDNA-Pools wurden dann einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern für Synaptophysin und NFL unterzogen.

Es zeigte sich, daß zum Zeitpunkt der Plattierung keiner der neuronalen Marker zu identifizieren war. Bekannt ist, daß STS binnen weniger Minuten in eine Zelle eindringen und seine apoptotische Wirkung auf die zelluläre Maschinerie ausüben kann (Rasouly *et al.*, 1992; Stepczynska *et al.*, 2001).

Da auch gezeigt werden konnte, daß Synaptophysin durch Behandlung mit RA schon vor der Plattierung von Maus EBs exprimiert werden kann (Strübing *et al.*, 1997) und STS die Expression von Synaptophysin in Neuroblastoma-Zellen vor der Plattierung einzuleiten vermag (Lombet *et al.*, 1997), ist zu erwarten, daß auch eine schnelle Aktivierung durch STS möglich ist. Tatsächlich zeigte sich, ähnlich der Induktion durch RA, daß STS innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe zum Wachstumsmedium die Expression von Synaptophysin in den ES-Zellen induzieren konnte. Die Synaptophysin Expression gipfelte 1 Stunde nach STS Zugabe, erschien jedoch in der folgenden Zeit vermindert bis zu einer nahezu fehlenden Expression am Tag 5. Diese Abnahme wurde möglicherweise durch eine simultan einsetzende Apoptose, die die Expression im Zellpool verkleinern könnte, verursacht. Da die durchgeführte PCR nicht quantitativ durchgeführt werden konnte, ist es jedoch unmöglich, genaue Rückschlüsse über detaillierte Expressionsstärken zu erzielen.

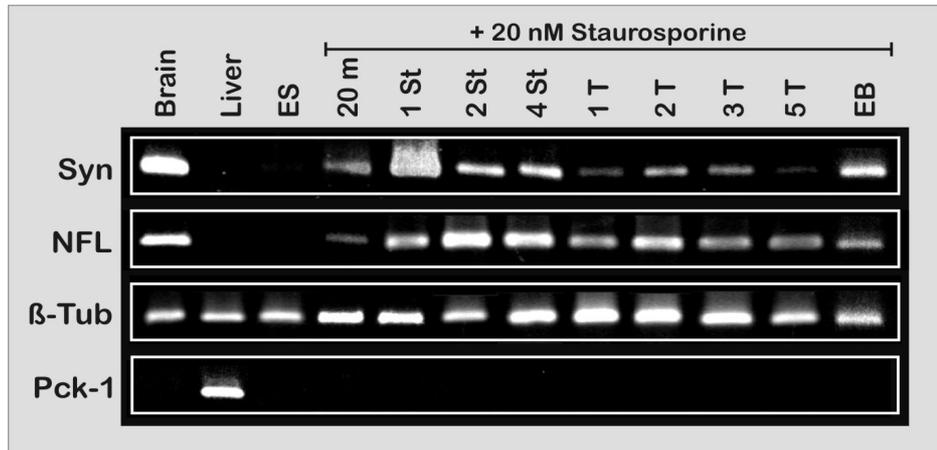


Abb. 27: Zeitabhängige Effekte von Staurosporin auf die Expression der Neuron-spezifischen Marker Synaptophysin (Syn) und 68 kDa Neurofilament (NFL). IB10 ES-Zellen wurden in der Gegenwart des Medium-Supplements B27 mit 20 nM STS für die angegebenen Zeitspannen kultiviert. Im folgenden wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mit Reverser Transcriptase inkubiert. PCRs wurden an der cDNA von ES-Zellen, embryonalen Aggregaten (EB), Maus-Leber und Gehirn wie in *Material und Methoden* beschrieben durchgeführt. Um eine unspezifische Differenzierung in den ES-Zellen auszuschließen wurde in den Proben die Expression des Leber-spezifischen Markers *Pck-1* kontrolliert. Primer für das *house-keeping* Gen β -Tubulin dienen als interner Standard, und RNA aus adultem Mausgehirn fungierte als Positivkontrolle für die Gehirn-spezifischen Gene. Alle PCR Reaktionen an "RT-minus" Proben (ohne Reverse Transcriptase), die als Kontrolle für die Kontaminationen genomischer DNA-Sequenzen dient, waren negativ (Daten nicht präsentiert).

Interessanterweise blieb nach der 5-tägigen Periode der STS-Inkubation die Expression in den embryonalen Aggregaten deutlich nachweisbar. Diese Daten unterstützen die Vermutung, daß die Generierung von Aggregaten aus ES-Zellen eine effektive Neurogenese fördert und gleichzeitig einen voranschreitenden Zelltod durch STS-induzierte Apoptose verhindern kann.

Wie in Abschnitt 4.1.3.1 erläutert, wurde analysiert, ob STS die Formation von Neurofilamenten, die häufigsten aller Zytoskelett Strukturen in Neuronen, in den ES-Zellen induziert. Im Gegensatz zu NFH geht man davon aus, daß das leicht-molekulare Neurofilament NFL schon kurz nach Initiierung axonalen Wachstums exprimiert wird (Benson *et al.*, 1996). In der Tat konnte innerhalb einer Stunde des Wachstums in STS supplementierten Medium ein starkes Signal für NFL-Transkripte detektiert werden (Abb. 27). Im Unterschied zu Synaptophysin bleibt die Expression während der untersuchten Zeitspanne relativ konstant. Die frühe Aktivierung beider Gene deutet darauf hin, daß STS mittels eines sehr schnellen Weges die Neurogenese einzuleiten vermag.

Die durch STS induzierte Differenzierung scheint auch auf die neuronale Linie beschränkt gewesen zu sein. So konnten keine mRNA Transkripte der exemplarisch

analysierten, Leber-spezifischen Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase-1 (*Pck-1*) in STS behandelten ES-Zellen, EBs und neuronalen Zellen identifiziert werden.

Gene →	<i>NF-68</i>	<i>NF-200</i>	<i>Pck-1</i>	β - <i>Tub.</i>	<i>Syn.</i>	<i>GFAP</i>	<i>Tau</i>	<i>Map-2</i>	<i>Hnk-1</i>
ES-Zellen ohne STS	--	--	--	+	--	--	--	--	--
ES-Zellen mit STS	+	--	--	+	+	+	+	+	+

Schema: Zusammenfassung der Expressionstudien an STS-induzierten ES-Zellen.

4.1.5 STS induziert EGF/FGF-reaktive neuronale Vorläuferzellen und Neurosphären

In allen untersuchten ES-Zelllinien, die mit B27 oder G5 kultiviert wurden, konnten mit Medium gefüllte Sphären aus ES-Zellen beobachtet werden, die sich aus vorwiegend kleinen EBs (~400-800 Zellen) heraus entwickelten. Diese sphäroiden Zellaggregate wuchsen rasch, während die verbliebenen Zellen der assoziierten EBs ihr Wachstum einstellten. Wenn die Zellen ein kritisches Volumen erreichten lösten sie sich von der Zellkultur Platte als schwebende Aggregate (siehe Abb. 28A).

Es ist bekannt, daß embryonale Stammzellen sich zu multipotenten "Neurospheres", mit für frühe neurale Stammzellen typischen Charakteristika entwickeln können, wenn sie in einem serumfreien Medium und in der Gegenwart von geeigneten Mitogenen heranwachsen (Okabe *et al.*, 1996; Tropepe *et al.*, 2001). Ähnliche Bedingungen werden auch angewandt um ZNS-Stammzellen aus embryonalem und adultem Säugetiergehirn aufzureinigen. Diese ZNS-Zellen können sich in Reaktion auf exogene Wachstumsfaktoren, so *epidermal growth factor* (EGF) oder *fibroblast growth factor* (FGF), in klonal abgeleitete Kolonien aus undifferenzierten Zellen entwickeln, die eine ebenfalls sphäroide Morphologie aufweisen (Reynolds & Weiss, 1992; Reynolds & Weiss, 1996; Vescovi *et al.*, 1993). Um zu überprüfen, ob die durch STS induzierten Sphären die klassischen Stammzell-Eigenschaften der Selbsterneuerung und Multipotenz besitzen (Erläuterungen in Morrison *et al.*, 1997), wurden Sphären mechanisch und durch Trypsinierung dissoziiert und die resultierenden Zellen in der Gegenwart von STS und G5 (enthält EGF und FGF) replattiert. Nach 5-10 Tagen wuchsen aus den angehefteten Zellen neue Neuriten, die sich positiv für eine Markierung mit anti-Tau erwiesen (siehe Abb. 28B).

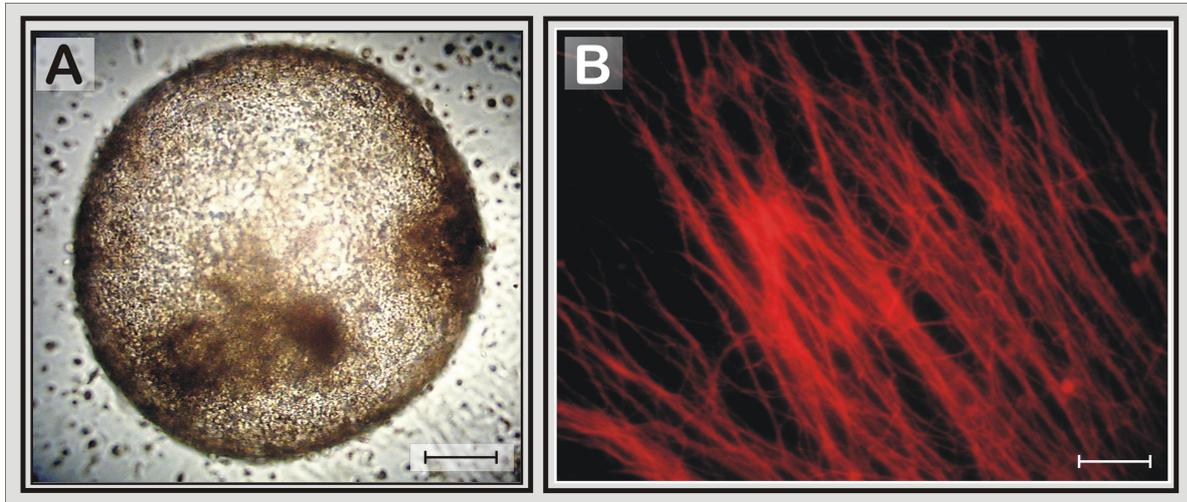


Abb. 28: EGF/FGF-reaktive "ZNS Stammzell"-ähnliche Zellen innerhalb der STS-induzierten EBs entwickelten sich zu Neurosphären. **A:** Typische Morphologie einer Neurosphäre, die aus STS-induzierten embryonalen Aggregaten generiert wurde. Skalierungsbalken: 120 μm . **B:** Dissoziierte Neurosphären, die auf Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturplatten in Neurobasalmedium mit 20 nM STS und 1x G5 wuchsen, generierten radiale Neuriten (10 TPP). Die Zellen wurden mit dem neuronalen Marker anti-Tau gefärbt. Skalierungsbalken: 50 μm .

Eine kleine Anzahl der aus den primären Neurosphären entstandenen Zellen war in der Lage, neue Sphären zu generieren, die wiederum neuronale Vorläuferzellen enthielten. Schon vorher konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von *leukemia inhibitory factor* (LIF), welcher normalerweise die Zellen in einem undifferenzierten Zustand verbleiben lässt, ausreicht, um Neurosphären aus einzelnen ES-Zellen zu generieren (Tropepe *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte festgestellt werden, daß die STS induzierten EBs die Supplemente B27 oder G5 benötigten, um Sphären auszubilden. Wurde das Wachstumsmedium mit Supplement N2 versetzt, welches eine ähnliche Zusammensetzung wie G5 besitzt, aber kein EGF und FGF enthält, so entstanden keine Sphäroide.

Im sehr frühen Säugetierembryo dient nur FGF als Mitogen für pluripotente neuronale Stammzellen. Nach einigen Zellteilungen werden diese Zellen dann auch EGF-reaktiv (Ciccolini & Svendsen, 1998). Die Resultate dieser Arbeit deuten daher darauf hin, daß Staurosporin die Entstehung von FGF-reaktiven neuronalen Vorläuferzellen induziert (siehe Diskussion). Ein kleinerer Anteil der Zellen innerhalb der EBs könnte gleichzeitig auch EGF-sensitiv werden, wodurch sie befähigt wären, "ZNS-Stammzell"-ähnliche Neurosphären auszubilden.

Die Fokussierung über mehrere Ebenen im Lichtmikroskop deutete interessanterweise darauf hin, daß die Neurosphären anscheinend nur aus einer Zellschicht bestanden. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Sphären. Die aus dem ZNS von Nagetieren und aus ES-Zelllinien stammenden

Neurosphären enthielten typischerweise eine Variation vieler neuronaler Zellen innerhalb der Sphären (Tropepe *et al.*, 2001; Reynold & Weiss, 1996; Rietze *et al.*, 2001). Mit der Annahme, daß bei einem gegebenen Radius einer Sphäre die meisten Zellen in der äußeren Hülle von gleicher Größe sind (Literaturwert 7-14 μm), ist es möglich, die theoretische Anzahl der Zellen zu errechnen, die sich entweder in der äußeren Schicht oder im gesamten Volumen der Neurosphäre befinden müssten.

Die Berechnung dieses Problems wird am besten als Annäherung behandelt. Um eine genaue Zahl von theoretisch möglichen Zellen innerhalb einer Sphäre zu berechnen wäre die Kalkulation eines erweiterten 3-dimensionalem Riemann-Integrals notwendig, sozusagen ein "Keplersches Kugelpackungsproblem". Zur Zeit bestehen in der Mathematik jedoch keine konkreten Algorithmen zu dem Problem. Ein zweidimensionaler Ansatz wäre bei einer Sphäre mit dem Radius R und Zellen mit dem Radius $r < R$: $N(R,r,n)$, mit $R > r > 0$ und $n \geq 2$, die maximale Anzahl Zellen. Dann gilt z.B. für eine hexagonale Packung: $N(R,R/2,2)=2$ und $N(R,R/3,2)=7$, mit 6 Zellen, die sich um eine andere herumgruppieren. Eine geeignetere Vorgehensweise ist die Annäherung über eine einfache geometrische Raumberechnung:

Die Anzahl der möglichen Zellen in der Oberfläche der Sphäre $F_{(S)}$ leiten sich ab von der Relation von $F_{(S)}$ mit der Fläche $F_{(Z)}$, die eine Zelle in der Oberfläche einnimmt :

$$\frac{F_{(S)}}{F_{(Z)}} \quad (1)$$

In der schlechtesten Packung benötigt eine Zelle eine Fläche $F_{(Z1)}$ von:

$$F_{(Z1)} = 4r^2 \text{ (umschriebenes Quadrat)} \quad (2)$$

Da die ES-Zellen jedoch flexibel sind, können sie in die Nähe von $F_{(Z2)}$ zusammengedrückt werden:

$$F_{(Z2)} = \pi r^2 \quad (3)$$

Durch die Tatsache, daß die ES-Zellen in Suspension schwimmen und kein festes Gewebe bilden, (mit der Annahme, daß die relative Häufigkeit h des Ereignisses $h(F) = F_{(Z2)} > F_{(Z1)}$ ist), muss $F_{(Z)}$ grob gewichtet werden:

$$F(Z) = \frac{F_{(Z2)} \cdot 2 + F_{(Z1)}}{3} \quad (4)$$

Die Oberfläche einer Kugel errechnet sich aus:

$$F_{(S)} = 4\pi \cdot R^2 \quad (5)$$

Damit ergibt sich bei variablen Durchmesser (\emptyset) der in der Hülle befindlichen Zellen

$$\text{Zellzahl} \approx \frac{\pi \cdot R_{(S)}^2}{\left(\frac{\pi \cdot r_{(Z2)}^2 \cdot 2 + 4r_{(Z1)}^2}{3} \right)} \quad (6)$$

Hingegen errechnet sich die Zellzahl in einer Neurosphäre aus ihrem Volumen

$$V_{(S)} = \frac{4}{3} \pi \cdot R^3 \quad (7)$$

in Abhängigkeit der Volumina von ideal (Zellen, die sich so verformen, daß beim Packen keine Zwischenräume bleiben) $V_{(Z2)}$ und nicht-ideal gepackten Zellen (nehmen das Volumen eines umschreibenden Würfels ein) $V_{(Z1)}$ innerhalb der Kugel:

$$V_{(Z2)} = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3 \quad (8)$$

$$\text{und } V_{(Z1)} = 4r^3 \quad (9)$$

Aus (4) und (7-9) ergibt sich somit eine Zellzahl innerhalb einer Neurosphäre:

$$\text{Zellzahl} \approx \frac{\frac{4}{3} \pi \cdot R_{(S)}^3}{\left(\frac{\frac{4}{3} \pi \cdot r_{(Z2)}^3 \cdot 2 + 4r_{(Z1)}^3}{3} \right)} \quad (10)$$

Die resultierenden Zellmengen, die sich für das Oberflächenareal einer Kugel ergeben, stimmen mit der Anzahl ausgezählter Zellen in etwa überein:

\emptyset Kugel	Zellen Ausgezählt	Erwartet bei einer Zellschicht mit $\emptyset(Z)=12\mu\text{m}$	Erwartet bei einer Zellschicht mit $\emptyset(Z)=8\mu\text{m}$
$\sim 900\mu\text{m}$	8200	4660	10485
$\sim 200\mu\text{m}$	380	230	518
$\sim 500\mu\text{m}^a$	2800	1438	3236
$\sim 500\mu\text{m}^b$	3400	1438	3236

Tab. 5: Anzahl ES-Zellen in Neurosphären. [®]Unter der Annahme, daß eine Säugetier ES-Zelle einen durchschnittlichen Durchmesser von 8 bzw. 12 μm besitzt.

Für die analysierte Sphäre mit dem Durchmesser von 200 μm würde die Zellzahl innerhalb der Sphäre mit 4838 ES-Zellen um einen Faktor von 13 (bei 12 μm Zelldurchmesser) oder mit 16328 ES-Zellen um einen Faktor von 42 (bei 8 μm Zelldurchmesser) höher liegen als der ermittelte Wert. Je größer eine Neurosphäre wird, desto größer wird auch dieser Faktor. So erhöht sich die Zellzahl im Innern einer 500 μm Sphäre im Vergleich zur Oberfläche schon um durchschnittlich das 53-fache (900 μm \rightarrow 190-fach). Da sowohl beim Auszählen der trypsinierten Zellen und beim Vermessen der Sphären als auch bei der annähernden Berechnung prozentuale Fehler erwartet werden müssen, sind die ermittelten Werte nur etwaige Anhaltspunkte. Da jedoch die ermittelten Zellzahlen weit von den theoretischen Werten für gefüllte Sphären entfernt liegen, erhärten diese Daten die Vermutung, daß es sich bei den erhaltenen Neurosphären tatsächlich um einschichtige Zellgebilde handelt.

Es muss jedoch erwähnt werden, daß unter spezifischen Zellkulturbedingungen auch Sphären aus den EBs generiert werden konnten, die Zellen innerhalb des Hohlraums und die zudem keine neuronale Charakteristik besaßen. Wenn die STS-induzierten EBs für einige Tage ohne EGF/FGF Stimulus kultiviert wurden, resultierte die anschließende Zugabe von G5 in einer Mixtur aus Neurosphären und Sphären mit rhythmisch kontrahierenden kardioidähnlichen Muskelzellen. Einige dieser Zellkugeln besaßen eine äußere, kontrahierende Hülle, andere zeigten eine typische "Neurosphere"-Morphologie, enthielten jedoch rhythmisch kontrahierende Zellmassen, die sich von einer zur anderen Seite, quer durch die Hohlkugel erstreckten (siehe Abschnitt 5.1, Abb. 71). Aus diesen Beobachtungen kann man ein Modell ableiten, in dem die embryonalen Aggregate in der Abwesenheit neuronaler Mitogene Herzmuskelzellen produzieren. Nach Zugabe von EGF/FGF könnten verbliebene undifferenzierte Zellen zu Neurosphären auswachsen, die noch vollständig differenzierte Herzmuskelzellen enthalten. Dies ist somit der erste Report, der das Potential von kultivierten embryonalen Stammzellen demonstriert, Sphären mit nicht-neuronalen Eigenschaften zu generieren.

4.1.6 RA inhibiert die *in vitro* Kardiogenese und die durch STS induzierte Differenzierung

Obwohl STS und RA einen Neuritauswuchs in Neuroblastoma- und ES-Zellen induzieren können, aktivieren beide die Neurogenese bidirektional über unterschiedliche Wege. So inaktiviert STS primär verschiedene Protein-Kinasen, während RA vorwiegend über nukleare Rezeptoren der RAR/RXR Familie wirkt, welche die Genexpression direkt durch Bindung an die Promotorsequenzen ihrer Zielgene regulieren (Blomhoff *et al.*, 1990). Morphologische Studien an menschlichen SH-N-Neuroblastoma Zellen, die mit STS und RA zusammen behandelt wurden, zeigten, daß die Zellen einen neuronalen Phänotyp annahmen, ähnlich den Zellen, die nur mit RA behandelt wurden (Slack & Proulx, 1990). Im Unterschied zu diesen Ergebnissen zeigte sich, daß eine Behandlung von STS-induzierten IB10-, RW4- und Bruce4-ES-Zelllinien durch RA, die Anzahl neuronaler Zellen in der Kultur signifikant reduzierte (Abb. 29, Spalte 2 und 6).

Diese Daten wiesen darauf hin, daß STS und RA verschiedene neurotrophe Wege einschlagen könnten. Würden sich beide Moleküle nur einen Weg teilen und um ein spezifisches Zielmolekül wettstreiten, so sollte als Resultat immer ein Neuritenauswuchs zu beobachten sein. Nichtsdestoweniger teilen sich beide Substanzen gemeinsame Ziele, die in Prozessen der Zelldifferenzierung involviert sind. Ein Kandidat ist die Protein Kinase C (PKC), deren Aktivität sowohl durch STS als auch durch RA moduliert wird. RA aktiviert nach Bindung an seinen Zell-Oberflächenrezeptor die Protein-Kinase, welche nun selbst durch Phosphorylierung anderer Proteine eine Vielzahl von intrazellulären Aktivitäten vermittelt (Zorn & Sauro, 1995). Die entgegengesetzte Wirkung erzielt STS, das direkt an die katalytische Domäne von PKC bindet und so die durch RA induzierte nukleare Phosphorylierung inhibiert.

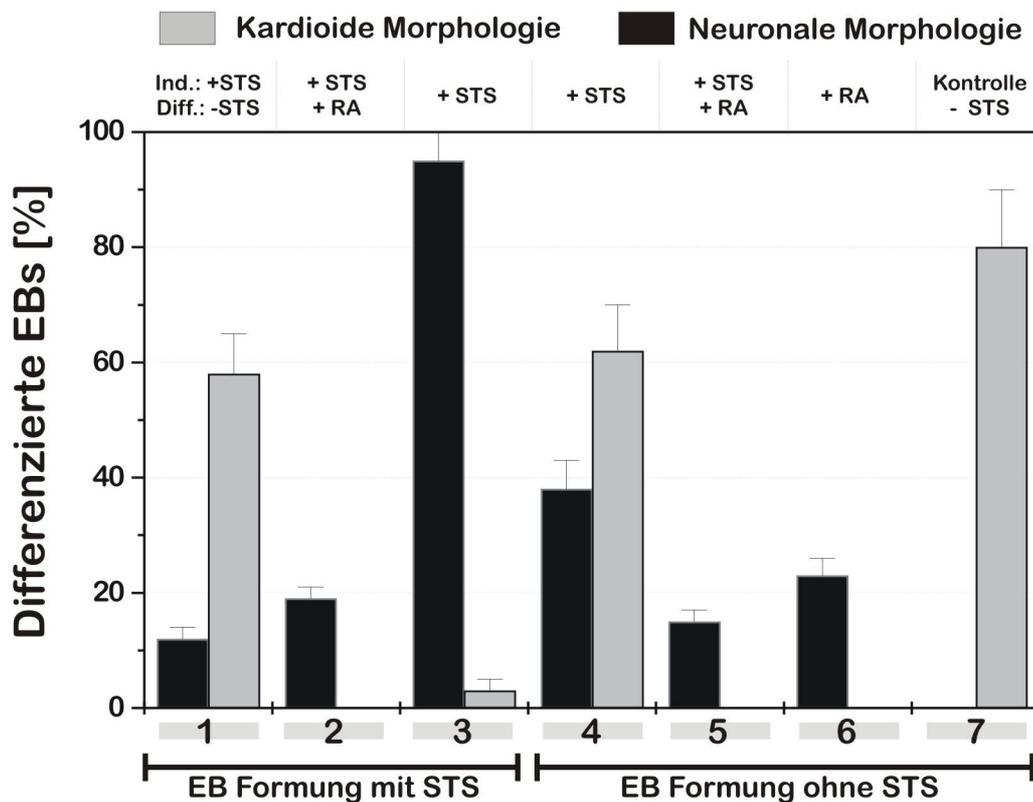


Abb. 29: Effekt der neurotrophen Faktoren STS und RA auf die IB10 ES-Zell-Morphologie während der Induktionsphasen I und II. Embryonale Aggregate wurden in DMEM mit Supplement B27 und in der Gegenwart von 20 nM STS (Spalte 1-3) oder ohne STS (Spalte 4-6; Induktionsphase I) kultiviert. Es folgte die Kultivierung der EBs in Suspension für weitere 4 Tage (Induktionsphase II). Für jedes Experiment wurden jeweils 200 EBs ausgezählt. **Spalte 1:** Der Entzug von STS während der Differenzierungsphase (Post-Plattierung) resultierte in einem verminderten Neuriten-Auswuchs. Die niedrigere Effektivität zeigt, daß Staurosporin während der gesamten Zeit der Induktion im Medium anwesend sein muss. **Spalte 2, 5:** 1 μ M Retinsäure inhibiert die STS-induzierte Neurogenese. **Spalte 3:** Die Behandlung der ES-Zellen mit STS während der Zellaggregation generierte einen erhöhten Neuriten Auswuchs und inhibierte effektiv kardioide Morphologien. **Spalte 4:** Wurde STS nach der Zellaggregation dem Medium beigefügt, so verringerte sich die Neuritogenese im Vergleich zu einer zeitlich früheren Zugabe. Obwohl auch hier die Kardiogenese inhibiert wurde, formten sich dennoch in vielen EBs Kardiomyocyten. **Spalte 6:** RA induzierte Neuritogenese, jedoch mit geringerer Effizienz als STS. Ein besonderes Merkmal der RA-Wirkung besteht in der vollständigen Unterbindung der Kardiomyocyten-Differenzierung. **Spalte 7:** Kontrolle. DMEM ohne STS oder RA..

Höchst interessant ist das Resultat, daß STS auch die durch RA induzierten neurotrophen Effekte inhibieren konnte (Abb. 29, Spalte 5). Die Inhibierung führt zu der Hypothese, daß STS einen stromabwärts liegenden Schritt eines der RA-Wege beeinträchtigt. Eine der wahrscheinlichsten Interaktionen zwischen RA und STS bezieht sich auf den *nerve growth factor* (NGF)-Weg, der in unterschiedlichen Zelltypen eine Neurogenese einleitet (für eine genaue Erläuterung siehe Diskussion, Abb. 5.1.2). In

Kürze: RA aktiviert den NGF-Weg stromaufwärts von NGF, während STS die NGF-Kaskade stromabwärts durch Inhibierung von Trk-A hemmt (Rasouly *et al.*, 1992; Ahlemeyer *et al.*, 2000). RA seinerseits verringert die STS-Wirkung durch Erhöhung der Trk-A Expression. Die erzielten Ergebnisse aus Abb. 29 passen gut zu den Arbeiten, daß Staurosporin an mindestens zwei Punkten weiter stromabwärts als *Inducer* des NGF-Weges fungieren kann (Leprince *et al.*, 2000; Campbell & Neet, 1995). Zu der These passt auch, daß in den Zelllinien IB10, RW4 und Bruce4 die Zugabe des Trk-A Aktivators NGF, in Verbindung mit STS, zu einem verringerten Neuriten-Wachstums führte (s.o., Abb. 18).

Es ist erwähnenswert, daß in den untersuchten ES-Zelllinien die Zugabe von 1 mM RA zum Wachstumsmedium während der Induktionsphase die Entstehung von Herzmuskelzellen vollständig unterdrückte (Abb. 29, Spalte 2,5 und 6). Dieses Resultat ist deshalb überraschend, weil RA nicht nur verschiedene Schritte der Kardiomyocyten Entwicklung im frühen Embryo positiv beeinflusst, sondern auch weil gezeigt werden konnte, daß eine RA-Behandlung während der ES-Zell-Differenzierung die Anzahl der Kardiomyocyten in einer zeit- und konzentrationsabhängigen Art und Weise erhöhen kann (Wobus *et al.*, 1994; Wobus *et al.*, 1997; Niederreither *et al.*, 2001). Ähnliche Ergebnisse zu dieser Arbeit konnten jedoch in Experimenten beobachtet werden, in denen EBs mit RA bei geringer Serum-Konzentration wuchsen (Gajović *et al.*, 1997). Wie in dem hier präsentierten STS-Protokoll wurden die EBs für eine Periode von 4 Tagen vor der Plattierung (ohne RA) auf Gelatine-beschichtete Zellkulturplatten mit RA in 1% FCS kultiviert. Obwohl auch bei einer Konzentration von 1 μ M RA noch kontrahierende Zellen beobachtet werden konnten zeigte sich mit ansteigender RA-Konzentration während der Induktion, daß sich die Anzahl der EBs, die pulsierende Zellen enthielten, verringerte.

Diese Resultate weisen darauf hin, daß die Wirkung von RA während der *in vitro* Entwicklungsphasen von ES-Zellen stark zeit- und konzentrationsabhängig ist. Zudem zeigen die Daten dieser Arbeit, daß nicht nur RA, sondern auch STS, wenn auch in geringerer Effizienz, die Formation von Kardiomyocyten inhibiert (Abb. 29, Spalte 3 und 4). Die Kardiogenese wurde am stärksten durch eine frühzeitige Zugabe von STS, schon während der ES-Zell-Aggregation gehemmt. Wie die RT-PCR Analysen zeigten, ist die Wirkung von STS offenbar ein schneller Prozess, der die ES-Zellen möglicherweise in ein neuronales Schicksal führt, bevor ein kardioider Differenzierungsweg eingeschlagen werden kann.

Wurden die embryonalen Aggregate jedoch ohne STS geformt, oder wurde den ES-Zellen während der weiteren Differenzierung STS entzogen, so stieg die Anzahl EBs mit

kardioider Morphologie an (Abb. 29, Spalte 1 und 3). Diese Resultate zeigen, daß für eine endgültige neuronale Determinierung der ES-Zellen, eine andauernde Gegenwart von Staurosporin essentiell ist. Da die durch STS induzierte Neurogenese nur durch eine Langzeitexposition mit STS (aber mit hoher Differenzierungs-Kinetik) vollzogen wurde, kann spekuliert werden, daß STS seine neurotrophen Effekte in späten Schritten gegebener neuronaler Wege erwirkt. Nichtsdestoweniger zeigte sich, daß die Entfernung von STS aus dem Medium nach der Differenzierung der ES-Zellen die Morphologie der Zellen nicht mehr ändern konnte. Somit ist der durch die ES-Zellen einmal erworbene neuronale Phänotyp langfristig festgelegt.

Die hier vorgestellte Methode, embryonale Stammzellen der Maus in Zellen mit neuronaler Charakteristik zu differenzieren, fand im der Folge Verwendung in der Untersuchung von Prägungsmechanismen in ES-Zellen. Die STS-Induktion sollte bei diesen Experimenten dazu dienen, eine frühe neuronale Entwicklung von Säugetierzellen nachzuvollziehen. Auf Mauschromosom 7C befindet sich ein Komplex gametisch geprägter Gene, welche vorzugsweise im Gehirn exprimiert werden. Um zu erfahren, ob sich die gametische Prägung dieser Gene spezifisch während einer neuronalen Entwicklung verändert, wurden daher mehrere ES-Zelllinien mit STS behandelt. Die Methylierung der resultierenden neuronalen Zellen wurde dann mit den Methylierungsmustern nicht-differenzierter ES-Zellen verglichen. Die Daten aus diesen Vergleichen werden zusammen mit weiteren Analysen der gametischen Prägung der Gene auf Mauschromosom 7C und der Gene im orthologen Bereich des Menschen (Chromosom 15q11-13) in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.2 Multivariate Charakterisierung der SNURF/SNRPN "Imprinting"-Region

4.2.1 Untersuchung des "Imprinting", Struktur und Evolution des "AS-SRO"

Etwa 70% der Prader-Willi- und Angelman-Patienten haben eine Deletion auf Chromosom 15q11-13 (siehe Übersichtskarte, Abb. 1); 25% der AS-Patienten scheinen eine Mutation in den AS-Genen zu besitzen, welche jedoch noch nicht identifiziert wurde. Eine kleine Gruppe von PWS- (~2-5%) und AS-Patienten (~4-7%) haben offenbar einen Defekt im "Imprinting"-Mechanismus, das heißt, sie haben anscheinend normale Chromosomen biparentalen Ursprungs, aber uniparentaler DNA-Methylierung. Vererbte Mikrodeletionen zwischen PW71 (*D15S63*) und dem *SNRPN*-Gen, die in einigen Patienten gefunden wurden (Buiting *et al.*, 1995), deuten darauf hin, daß in dieser Region ein Element existiert, welches in cis den "Imprint" dieser Region kontrollieren könnte. Dieses Element wird als "Imprinting-Center" oder *IC-Element* bezeichnet und scheint für die Wiederherstellung des "Imprints" in der Keimbahn notwendig zu sein (Reis *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996).

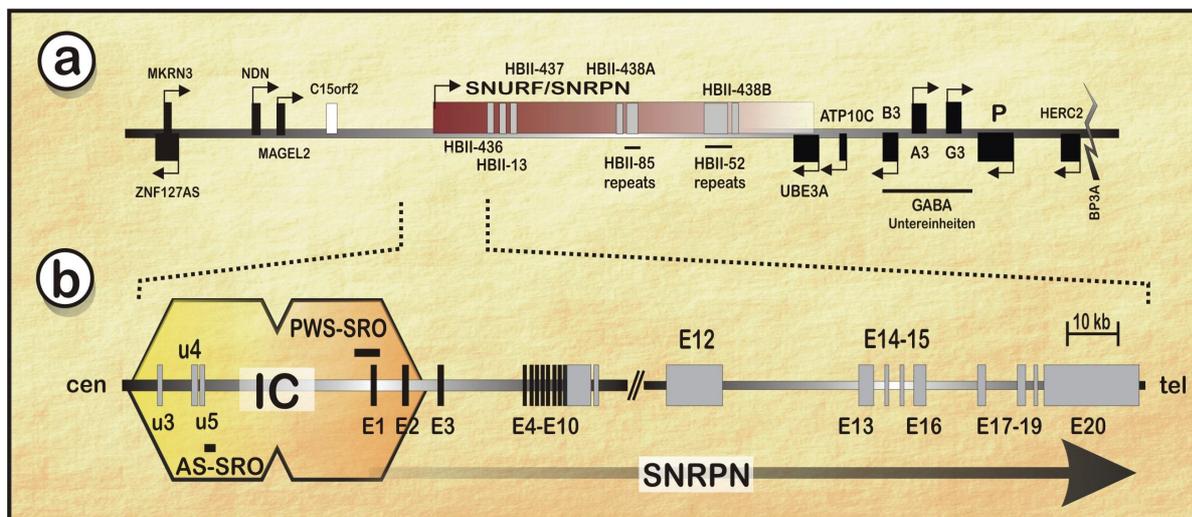


Abb. 31: Übersicht der Prader-Willi/Angelman-Region. **a:** Übersicht der "Imprinting"-Region auf Chromosom 15q11-q13. Graue Boxen = snoRNAs; schwarze Boxen = "Imprinted" Gene; Rote Box = *SNURF/SNRPN*-Exons (das telomerische Ende ist unbekannt). **b:** Ausschnittvergrößerung von a mit der Region, in der das "Imprinting"-Center (IC) lokalisiert ist (nach Dittrich *et al.*, 1996). Der centromere Teil des "Imprinting"-Centers, welcher in AS-Patienten deletiert ist (*AS-SRO*), könnte für den paternalen → maternalen, der in PWS-Patienten deletierte (*PWS-SRO*) telomere Teil für den maternalen → paternalen "Imprint"-Wechsel verantwortlich sein. (Übersicht bei Horsthemke, 1997; Schumacher, 2001). *AS-SRO/PWS-SRO* = „AS/PWS smallest region of deletion overlap“; graue Boxen = nicht translatierte Exons; schwarze Boxen = "Imprinted" Gene/*SNRPN*-Exons; cen, Richtung des Centromers; tel, Richtung des Telomers.

Solche IC-Mutationen können unbemerkt durch die Keimbahn eines Geschlechts weitergegeben werden und manifestieren sich nur nach Transmission durch die Keimbahn des anderen Geschlechts. Die Folge ist ein maternales Chromosom mit paternalem Epigenotyp oder ein paternales Chromosom mit maternalem Epigenotyp. Bisherige Erkenntnisse deuten auf eine zweigeteilte Struktur des IC-Elementes hin (siehe Abbildung 31).

Da sich das "Imprinting"-Center selbst innerhalb der gametisch geprägten Region befindet, könnte es auch durch Methylierung beeinflussbar sein. Um eine mögliche Rolle der Methylierung für die Regulation dieser Region zu identifizieren, wurde der Methylierungsstatus einer Teilregion dieses "Imprinting"-Centers mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung in je einem gesunden männlichen und weiblichen Probanden, einem Angelman-Patienten und einem Prader-Willi Patienten erfasst.

Die Region um *AS-SRO* ist zur Zeit auf 880 Bp eingegrenzt (Buiting *et al.*, 1999). Innerhalb weniger kbp um dieses Element liegen drei CpG-reiche Sequenz-Abschnitte. Zwei von diesen CpG-reichen Regionen befinden sich jedoch in Alu-Sequenzen, die aufgrund ihres vielfältigen Vorkommens im menschlichen Genom möglicherweise nur schwierig zu sequenzieren sind. Beide Bereiche wurden daher bei der Bisulfit-Sequenzierung nicht berücksichtigt. Der untersuchte Sequenzabschnitt liegt direkt telomerisch des Exons u4 (ehemals Exon BD3) innerhalb der *AS-SRO*-Region, überspannt Exon u5, enthält 12 CpG-Dinukleotide (siehe Abb. 32) und ist damit der dritte CpG-reiche Abschnitt. Aufgrund seiner Nähe zu den u4- und u5-Exons könnte eine spezifische Methylierung möglicherweise zur Regulierung der untranslatierten Transkripte und damit des "Imprints" beitragen, da ein 5-Methyl-Cytosin zu Strukturänderungen in der Chromatinstruktur führen kann (Antequera *et al.*, 1989; Muiznieks & Doerfler, 1994; Lefebvre *et al.*, 1995; McArthur & Thomas, 1996).

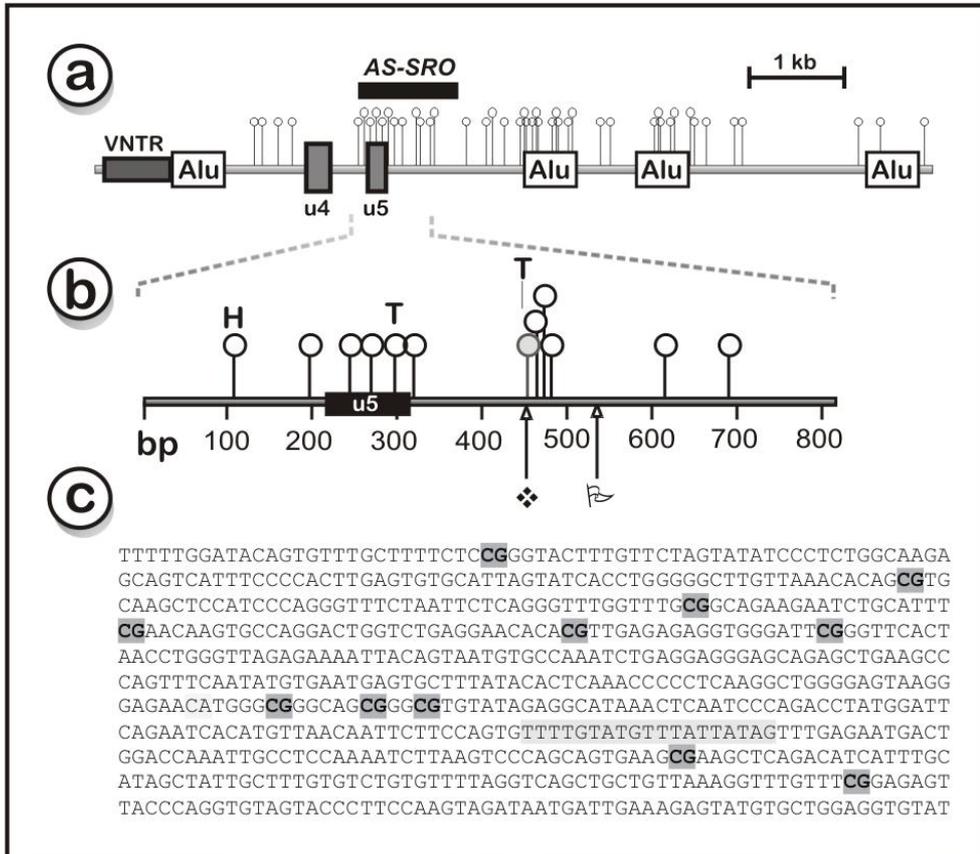


Abb. 32: Übersicht über die bisulfitsequenzierte AS-SRO-Region. **a:** Der AS-SRO befindet sich etwa 35 kbp centromerisch zu SNURF/SNRPN **b:** Ausschnittvergrößerung von a mit den CpG-Dinukleotiden dieser Region. Enthält die sequenzierte Region mit insgesamt 12 CpGs. CpG #7 (❖) existiert als CG → CA Polymorphismus. ⇨ = Insertions/Deletions-Polymorphismus (TTTTCT-ATGT-TTATTA). **c:** Sequenz der analysierten Region. Die CpG-Dinukleotide sind hervorgehoben. Hellgraue Schattierung: Ins/Del-Polymorphismus. H = *HpaII*-Restriktionsschnittstelle; T = *Tail*-Restriktionsschnittstelle; AS-SRO = "Angelman syndrome smallest region of deletion overlap"; O = CpG-Dinukleotide; VNTR = variable number tandem repeat.

4.2.1.1 Methylierungsmuster gesunder Probanden in der AS-SRO-Region

Genomische DNA von gesunden Probanden wurde mit Hilfe der Bisulfit-Methode untersucht, um Aufschluss über das Methylierungsmuster in der AS-SRO-Region zu erhalten. Genaue Methylierungs-Analysen aus der AS-SRO-Region zwischen PW71 (*D15S63*) und dem *SNRPN*-Gen wurden bisher nicht durchgeführt. Lediglich auf *HpaII*-Restriktionsstellen begrenzte Daten sind bekannt. Etwa 10 kbp centromerisch zu dieser Region liegen zwei *HpaII*-Spaltstellen innerhalb des Markers Y48.5, von denen eine teilweise eine allel-spezifische Methylierung aufweist (Buiting *et al.*, 1995; Dittrich *et al.*, 1996).

Weitere 40 kBp centromerisch liegt der Marker PW71 im LTR (*long terminal repeat sequence*) 5' zu Exon u2, welcher eine maternal-spezifisch methylierte *HpaII*-Spaltstelle detektiert. Genauere Analysen zu dieser Region brachten Experimente aus diesem Labor (Zeschngk *et al.*, 1997), die auch weitere CpG-Dinukleotide umfassten. Dieses als PWCFOA bezeichnete Segment enthält zwei *CfoI/HhaI*-Restriktionsschnittstellen, die auf dem maternalen Chromosom methyliert sind. Andere CpGs aus diesem Segment scheinen jedoch nicht in der gleichen, hohen Frequenz methyliert zu sein. Aus der gleichen Arbeit stammen Daten telomerisch zu *AS-SRO* innerhalb des *SNRPN*-Exons 1. Alle CpG-Dinukleotide in diesem Sequenzabschnitt scheinen maternal-spezifisch methyliert zu sein.

Ausgehend von diesen Daten wurde die Vermutung aufgestellt, daß auch in der untersuchten *AS-SRO*-Region eine Methylierung des mütterlichen Allels vorliegt, die eventuell für diagnostische Zwecke Verwendung finden und weitere Hinweise auf den "Imprinting"-Mechanismus liefern könnte. Da über den "Imprinting"-Prozess keine verlässlichen Theorien existieren, ist nicht auszuschließen, daß die Methylierungsmuster in männlichen somatischen Zellen sich von denen in weiblichen unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die DNA sowohl eines männlichen als auch einer weiblichen Probandin untersucht. Beide sind offenbar gesund und mittleren Alters (22-39 Jahre).

4.2.1.2 Ergebnis einer gesunden Probandin in der *AS-SRO*-Region

Die PCR-Amplifikation genomischer DNA der Probandin lieferte Produkte für beide DNA-Stränge, so daß beide separat untersucht werden konnten (siehe Abb. 33). Da keine polymorphen, die parental Chromosomen unterscheidbar machende Sequenzabschnitte identifiziert werden konnten, war es nicht möglich eine väterliche oder mütterliche Zuordnung der Allele vorzunehmen. Mit der Annahme, daß auch dieser Sequenzabschnitt maternal methyliert (gametisch geprägt) ist, wäre somit eine etwa 50%ige Methylierung zu erwarten. Alle CpGs erwiesen sich jedoch als gleichmäßig hypermethyliert.

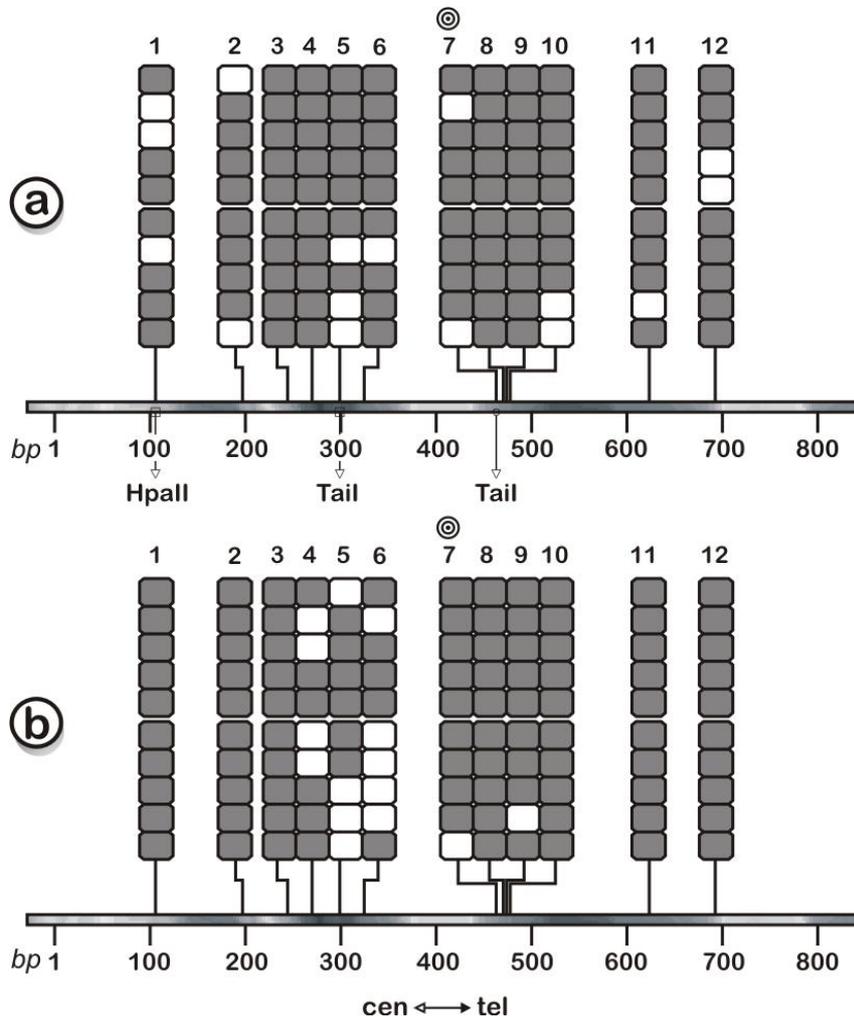


Abb. 33: Verteilung der 5-mC-Reste in der AS-SRO-Region telomerisch zu Exon u4 des *SNRPN*-Gens. Jede vertikale Reihe (#1-12) repräsentiert die Position eines 5'-CpG-3'-Dinukleotides. Eine horizontale Reihe entspricht jeweils einem sequenzierten Klon. Aufgrund ihrer Länge wurde diese Region von beiden Seiten ansequenziert. Die genaue Sequenz ist in Abb. 32 dargestellt. Gefüllte Rechtecke (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. **a:** Gesunde Probandin; Sense (Plus)-Strang; **b:** Gesunde Probandin; Antisense (Minus)-Strang; © = polymorphes CpG-Dinukleotid (CpG → CpA Transition); Gesamt-Methylierung Sense-Strang = 86.6%, Antisense-Strang = 87.5%.

Die CpG-Dinukleotide #3 und #8 waren in allen (100%) Klonen beider DNA-Stränge, die CpGs #2 und #9-12 waren zu mindestens 90% methyliert. Die CpG-Dinukleotide #3 und #7 wurden neu identifiziert und waren nicht in der Originalsequenz verzeichnet. CpG #7 ist in der DNA dieser Probandin in beiden Allelen vorhanden, fehlte jedoch in dem untersuchten PWS-Patienten und auf einem Allel des männlichen Probanden und stellt somit einen nachweisbaren CpG-(CpA)-Polymorphismus dar. Das CpG #3 wurde in allen untersuchten Personen gefunden und kann daher aus den bisherigen Daten nicht eindeutig als Polymorphismus klassifiziert werden. Beobachtet

man die Verteilung der CpGs gegen die Anzahl der Basenpaare, so erkennt man zwei „Cluster“, in denen jeweils 4 CpG-Dinukleotide eng benachbart liegen und somit eine mögliche funktionale Einheit bilden. Beide Gruppen enthalten an ihrer centromeren Seite jeweils eines der möglichen polymorphen CpGs. Während das erste Cluster (CpG #3-6; Bb 243-318) im Vergleich zu den anderen CpGs geringer methyliert ist (>65%), ist die zweite Gruppe (CpG #7-10; Bb 456-474) nahezu vollständig methyliert. Beide „polymorphen“ Cytosin-Basen weichen jedoch in der Methylierung von den anderen ihrer Gruppe ab. So ist das CpG #7 von allen CpG-Dinukleotiden am geringsten methyliert (85%) und scheint somit einer weniger stringenten Methylierung zu unterliegen. Das CpG #1, die einzige *HpaII*- und damit für Southern-Experimente (z.B. für Diagnostik) verwendbare Schnittstelle, ist in den untersuchten Klonen dieser Probandin zu 85% methyliert. Unterschiede zwischen der Methylierung des „Sense“ (Plus) respektive des „antisense“ (Minus)-Stranges konnten beobachtet werden, waren aber nur minimal. Die größte Schwankung am CpG #1 betrug 30%, die mittlere Schwankung zwischen beiden Strängen 0.8%. Ein bestimmtes, häufig wiederkehrendes Methylierungsmuster mehrerer Klone konnte nicht beobachtet werden.

4.2.1.3 Ergebnis eines gesunden Probanden in der AS-SRO-Region

Wie die DNA der weiblichen Probandin konnten auch hier zwei PCR-Produkte für jeweils den Sense- und den Antisense-Strang erhalten werden. Aufgrund eines CpG-Polymorphismus (siehe unten) lassen sich die beiden parental Allele unterscheiden, jedoch ist eine eindeutige maternale oder paternale Zuweisung nicht möglich, da sich keine signifikanten allel-typischen Unterschiede finden lassen. Eine strangspezifische Methylierung konnte nicht beobachtet werden. Sense- und Antisense-Strang unterscheiden sich mit 83.5% respektive 82% nur um 1.5%. Auch eine parental-spezifische Methylierung scheint nicht vorhanden zu sein, da sich die Methylierung beider Allele nicht signifikant unterscheidet („CpA“-Allel = 83%; „CpG“-Allel = 81%). Somit scheint diese Region nicht funktionell durch Allel-spezifische Methylierung gametisch geprägt zu sein. Im Vergleich zu dem Methylierungsmuster der Probandin zeigt sich nur ein minimaler Unterschied. Beide sind mit 87% Gesamt-Methylierung (weibliche Probandin) und 83% Methylierung (männlicher Proband) ähnlich hoch methyliert.

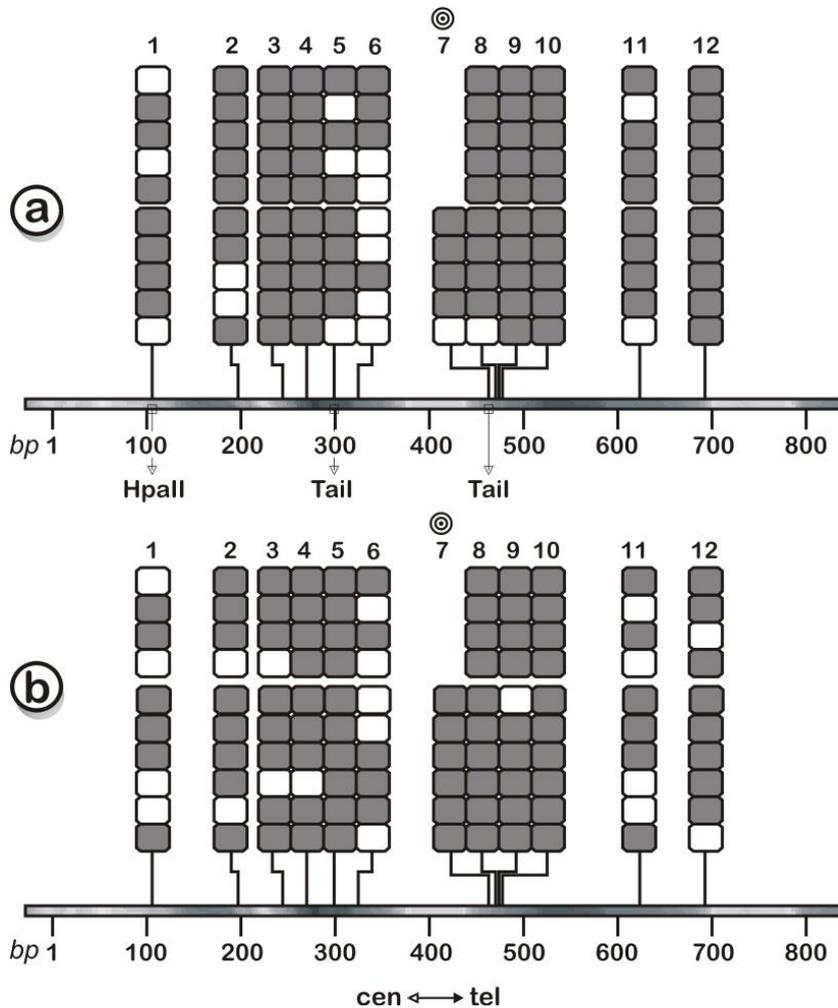


Abb. 34: Verteilung der 5-mC-Reste in der AS-SRO-Region telomerisch zu Exon u4 des *SNRPN*-Gens. Gefüllte Rechtecke (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. **a:** Gesunder Proband; Sense (Plus)-Strang; **b:** Gesunder Proband; Antisense (Minus)-Strang; © = polymorphes CpG-Dinukleotid (CpG → CpA Transition); Gesamt-Methylierung Sense-Strang = 83.5%; Gesamt-Methylierung Antisense-Strang = 82%; Allel-spezifische Methylierung: "CpG"-Allel = 81%, "CpA"-Allel = 83%.

4.2.1.4 Ergebnis des Prader-Willi Patienten in der AS-SRO-Region

Die Methylierung an anderen Positionen nahe dieser Sequenz, so z.B. centromerisch PWCFOA, PWCFOB, PW71 und telomerisch *SNRPN* scheinen überwiegend maternal-spezifisch zu sein. Erwartet man eine ähnliche Methylierung in diesem Abschnitt, müssten die CpG-Dinukleotide dieser Region nahezu vollständig methyliert sein, da das paternale, wenig methylierte Allel durch Deletion dieses Bereiches fehlt. Dies lässt sich in der Tat beobachten (siehe Abb. 35), jedoch ist dieses Ergebnis nur für das maternale Chromosom informativ. Hinweise zur Methylierung des paternalen Chromosoms liefert neben den gesunden Probanden der untersuchte Angelman-Patient (siehe unten). Die Amplifizierung dieser Region gelang nur für den Sense (Plus)-Strang. Eine Polymerase-

Kettenreaktion mit den Primern für den Antisense (Minus)-Strang lieferte kein Produkt, möglicherweise durch eine die Reaktion behindernde Sekundärstruktur der DNA oder mangels ausreichender DNA des Patienten.

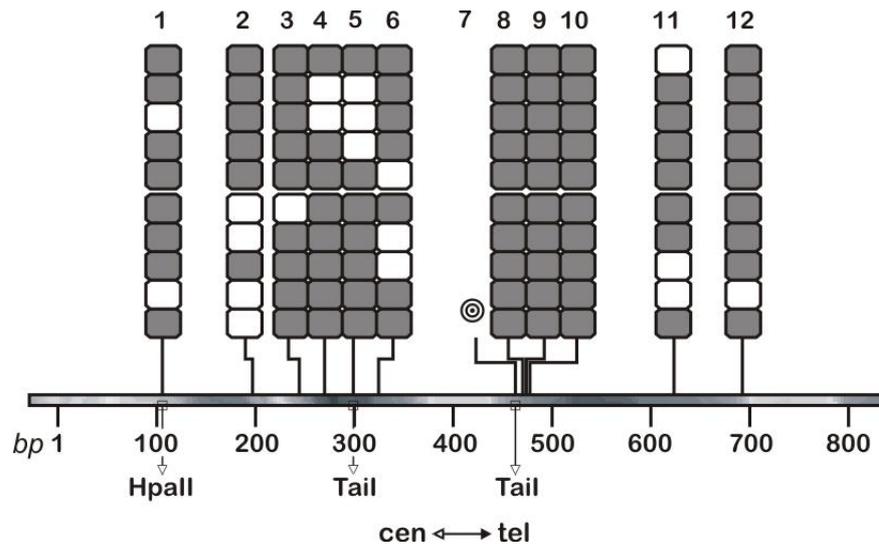


Abb. 35: Verteilung der 5-mC-Reste in der AS-SRO-Region telomerisch zu Exon u4 des *SNRPN*-Gens. Dargestellt ist der Sense (Plus)-Strang; Patient: Prader-Willi Patient (Deletion); Gefüllte Rechtecke (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. ⊙ = CpG-Dinukleotid-Polymorphismus; d.h. dieses CpG (#7) ist in diesem, von der Mutter vererbten Allel nicht vorhanden (s.u.), Gesamt-Methylierung = 83%.

Sowohl die Methylierung der einzelnen CpG-Dinukleotide ist mit denen der gesunden Probanden nahezu identisch (siehe auch Abb. 14), als auch die Gesamt-Methylierung aller CpGs ist mit 83% gegenüber 85% in den gesunden Personen annähernd gleich.

4.2.1.5 Ergebnis des Angelman-Patienten in der AS-SRO-Region

Der gametisch geprägte Chromosomenabschnitt der PWS/AS-Region ist über weite Bereiche allel-spezifisch methyliert. Die meisten untersuchten Sequenzabschnitte weisen eine Methylierung des maternalen Allels auf, während die Gene (*SNRPN*, *NDN*, *MKRN3* u.a.) vorwiegend paternal transkribiert werden. In Angelman Syndrom-Patienten, bei denen eine große Deletion diagnostiziert wurde, fehlt gewöhnlich das hoch methylierte maternale Allel, so daß man auch für die untersuchte AS-SRO-Region ein nahezu unmethyliertes Allel erwarten kann. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse scheint dieser Abschnitt des Chromosoms 15 jedoch relativ homogen, hoch methyliert zu sein. Dieser hohe Methylierungsgrad läßt sich in der Tat auch für den untersuchten Angelman-Patienten nachweisen. Die Methylierung der gesamten Region unterscheidet sich mit 86% nicht signifikant von denen der anderen untersuchten

Personen (85%). Ebenso wie auch beim PWS-Patienten ist die Methylierung der einzelnen CpG-Dinukleotide nahezu identisch mit denen der gesunden Kontroll-Personen.

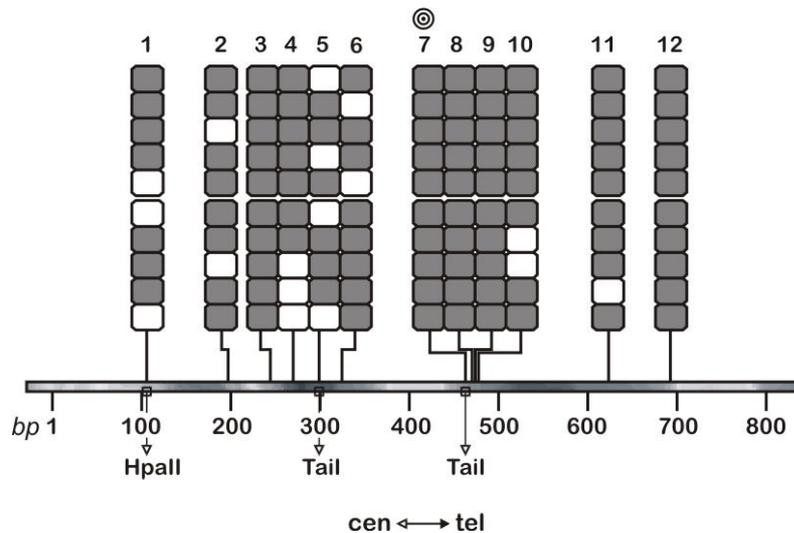


Abb. 13: Verteilung der 5-mC-Reste in der AS-SRO-Region telomerisch zu Exon u4 des SNRPN-Gens. Dargestellt ist der Sense (Plus)-Strang; Patient: Angelman Patient (Deletion); Gefüllte Rechtecke (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. ⊙ = mögliches polymorphes, neu beschriebenes CpG-Dinukleotid; ⊙ = CpG-Dinukleotid-Polymorphismus; d.h. dieses CpG (#7) ist in diesem von dem Vater vererbten Allel vorhanden (s.o.), Gesamt-Methylierung = 85.8%.

Untersucht man den Verlauf der Methylierung von den CpG-Dinukleotiden #1 bis #12, läßt sich bei allen Patienten und gesunden Probanden ein nahezu identisches, wiederkehrendes Muster beobachten:

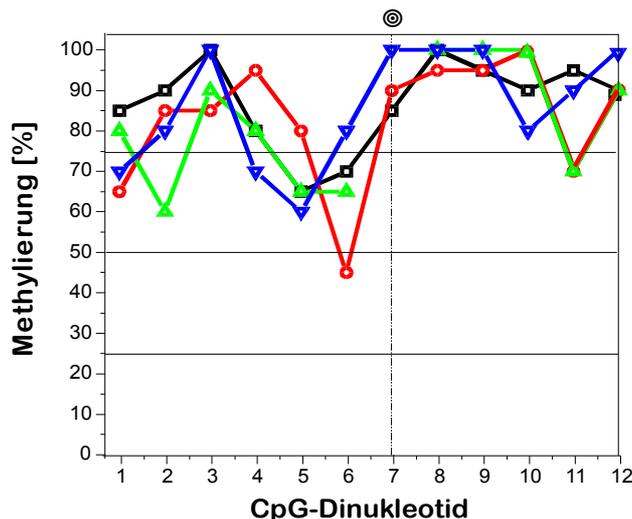


Abb. 36: Prozentuale Methylierung der 12 CpG-Dinukleotide. Dargestellt sind die jeweiligen Methylierungs-Grade der zwölf einzelnen CpG-Dinukleotide der AS-SRO-Region. Die Methylierung errechnet sich aus dem Mittel von Sense- und Antisense-Strang. ⊙ = polymorphes CpG#7



Fasst man alle Daten der untersuchten Personen zusammen, so läßt sich nachweisen, daß beide DNA-Stränge in dieser Region identisch hoch methyliert werden. Der Sense- und der Antisense-Strang weisen mit jeweils 85% eine exakt gleiche Methylierung auf. Ebenso deutlich ist festzustellen, daß sowohl paternales als auch maternales Allel gewöhnlich identisch methyliert werden. Unter Auslassung der Daten der Probandin bei der eine parentale Zuordnung der Allele nicht möglich ist, ergibt sich für beide Allele eine 83.5%ige Methylierung. Da die Datenmenge limitiert ist, werden die Nachkommaziffern gerundet. Damit ergibt sich folgende, abschließende Übersicht:

Tabelle 4: Methylierungs-Grad der AS-SRO-Region auf 15q11-13

Sense-Strang:	85 %
Antisense-Strang:	85 %
Maternales Allel*:	84 %
Paternales Allel*:	84 %

*ohne Daten der weiblichen Probandin.

4.2.1.6 Der CpG-Polymorphismus in der AS-SRO-Region

Die untersuchte Sequenz des Prader-Willi Patienten (siehe Abschnitt 4.2.1.4) enthält einen CpG-Dinukleotid-Polymorphismus, der eventuell für diagnostische Zwecke oder zur Identifikation der parentalen Herkunft genutzt werden kann. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz zeigt sich, daß es sich um eine CpG → CpA-Transition handelt.

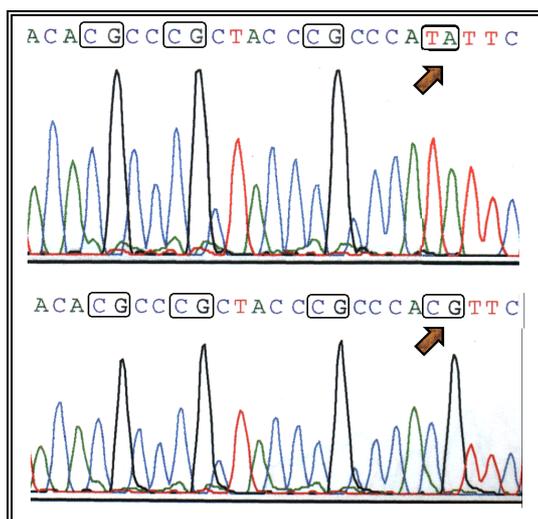


Abb. 37: CpG-Polymorphismus in der AS-SRO-Region. **Oben:** Prader-Willi Patient; sequenzierte AS-SRO-Region des maternal vererbten Chromosoms 15 zwischen den CpG #10 (links) und dem polymorphen CpG #7 (rechts) nach Bisulfit-Behandlung. Das Cytosin des polymorphen CpGs ist nicht methyliert und erscheint hier als Thymin (rot). **Unten:** Sequenz aus einem gesunden Probanden mit dem CpG #7. Die bisulfitbehandelte Sequenz zeigt das methylierte Cytosin des polymorphen CpGs unverändert als Cytosin (blau). ↗ = polymorphes CpG #7.

Dieses polymorphe CpG kann durch die Restriktionsendonuklease *Tail* erkannt werden. *Tail* ist jedoch Methylierungs-Sensitiv, und ein Isoschizomer ist nicht bekannt.

4.2.1.7 Evolutiver Ursprung des AS-SRO

Im Gegensatz zu allen gametisch geprägten Genen auf 15q11-13 ist über die Konservierung des AS-SRO während der Evolution nichts bekannt. Bisher wurde nur vergeblich nach funktionell und strukturell homologen Sequenzen bei der Maus geforscht. Obwohl nicht ausgeschlossen ist, daß eine funktional homologe Sequenz bei der Maus existiert, ist es doch verwunderlich, daß die exakte Sequenz des AS-SRO offenbar nicht konserviert wurde, insbesondere da alle "Imprinting"-Gene sich sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrem "Imprinting"-Status sich als außergewöhnlich stark konserviert erwiesen. Eine Ausnahme bildet lediglich das *M6P/IGF2R*-Gen, welches wahrscheinlich etwa vor 150 Millionen Jahren eine gametische Prägung entwickelte (Kilian *et al.*, 2001). Diese Prägung wurde in Artiodactyla (Paarhufern), Rodentia (Nagetieren) und Marsupialia beibehalten, ging jedoch vor etwa 75 Millionen Jahren in der Primatenlinie verloren. Obwohl *M6P/IGF2R* mehrere Rollen in der Organogenese und Immunität spielte, ist eine Mutation in dem Gen möglicherweise weniger fatal als eine Mutation innerhalb des AS-SRO, dessen Wirkung auf andere Sequenzen sich über mehrere MBp erstreckt. Ein evolutiver Druck auf die Erhaltung dieser IC-Domäne ist deshalb zu erwarten. Um zu untersuchen, wie sich der AS-SRO evolutiv entwickelte, wurden die Genome verschiedener Spezies auf die Existenz der AS-SRO-Sequenz hin untersucht. Hierzu diente eine Dot-Blot Analyse genomischer DNA von verschiedenen, für unterschiedliche evolutive Linien repräsentativen Tiergruppen (siehe Abb. 38).

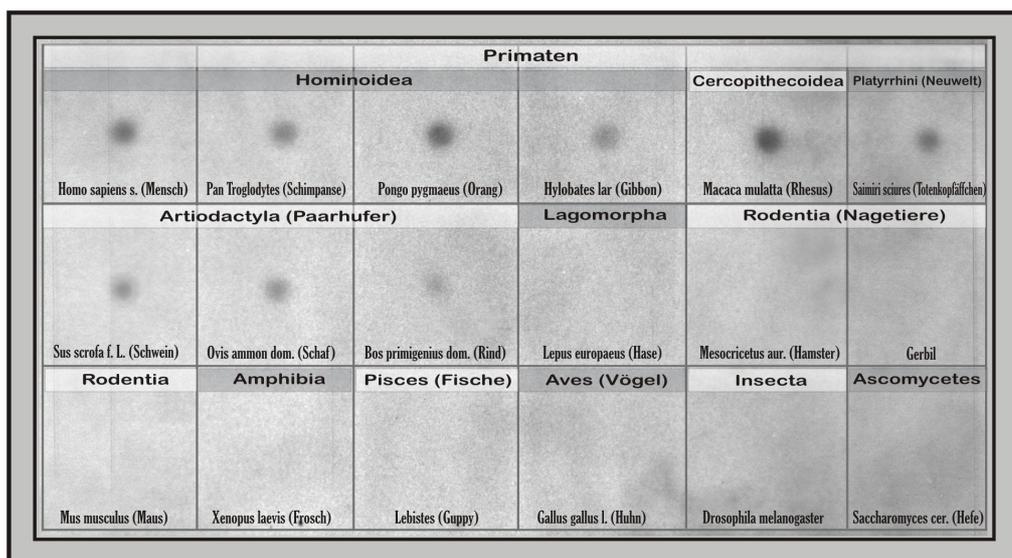


Abb. 38: AS-SRO Zoo-Blot Analyse genomischer DNA von Tieren unterschiedlicher evolutiver Linien. Jeweils 3 µg genomische DNA wurde auf einen Punkt aufgetragen und getrocknet. Die Membran wurde nach UV-Fixierung mit einer Probe, die den gesamten AS-SRO überspannt (~900 Bp; siehe Abb. 39B) hybridisiert. Deutliche Signale lassen sich für alle Primaten und Artiodactyla nachweisen, während andere Spezies offenbar keine größeren Sequenzhomologien mit dem humanen AS-SRO besitzen.

Die AS-SRO-Sequenz erwies sich in allen untersuchten Primaten (Homonoidea, Neuwelt- und Altweltaffen) als konserviert. Ebenso ließen sich Signale für die AS-SRO-Probe in allen Artiodactyla finden. Dies deutet darauf hin, daß die AS-SRO-Sequenz seit mindestens 80 Millionen Jahren, also etwa seit Mitte des Mesozoikums, im Genpool der Spezies vorhanden ist.

Da die Sequenz nicht in Aves, z.B. beim Huhn nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, daß die Sequenz sich frühestens nach dem Auftreten der Säugetiere vor etwa 180-200 Millionen Jahre während des späten Trias entwickelte (siehe dazu auch Phylogenetisches Dendrogramm in der Diskussion). Das Erscheinen des IC-Elementes würde damit etwa in der Zeit der Entstehung der ersten gametisch geprägten Gene im mittleren Jura, vor 150 Millionen Jahren zusammentreffen (Kilian *et al.*, 2001).

Da keine DNA von Marsupialia (z.B. Opossum) oder Monotrema (z.B. Platypus) vorhanden war, ist eine zeitlich genauere Eingrenzung noch nicht möglich. Sowohl Marsupialia als auch Monotrema, die beide ebenfalls IC-abhängige, gametisch geprägte Gene (so auch *SNRPN*) besitzen, trennten sich von den anderen Spezies im Übergang vom Trias zum Jura vor etwa 180 Millionen Jahren ab. Ausgehend von dieser Entwicklung sollte auch eine äquivalente IC-Sequenz in Maus zu identifizieren sein, da die Rodentia (Maus, Hamster etc..) mit den Primaten und Artiodactyla gemeinsame Vorfahren teilen. Es konnte jedoch in keiner der drei untersuchten Rodentia-Arten ein Signal für den AS-SRO identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, daß zumindestens der Großteil der 900 Bp-Sequenz nach der Abspaltung von den anderen Arten zum Ende der Kreidezeit in dieser Linie verloren ging. Da auch keine Sequenz in der DNA von Lagomorphen (z.B. Hase) gefunden wurde, lässt sich der Zeitpunkt des Verlustes der AS-SRO Sequenz in diesen Spezies auf etwa 55-65 Millionen Jahre v. Chr. einschränken.

4.2.1.8 Strukturanalyse des AS-SRO und homologe Motive in Maus

Um eine gezielte Erforschung der Mechanismen des IC zu gewährleisten, ist die Untersuchung des "Imprinting"-Prozesses im Mausmodell von Vorteil. Da jedoch bisher keine dem AS-SRO vergleichbare Domäne in Maus gefunden werden konnte, wurde der humane AS-SRO einer genaueren Analyse unterworfen. Die Analyse geschah unter der Annahme, daß der Großteil der AS-SRO-Sequenz mangels Genfunktion möglicherweise nicht einem evolutiven Selektionsdruck unterliegt. Von daher sollten nur diejenigen Sequenzen konserviert werden, die wirklich am "Imprinting"-Mechanismus direkt beteiligt sind (so z.B. durch Proteinbindung). Eine Identifizierung dieser vermuteten Bindungsstelle(n) geschah unter den Prämissen daß a) repetitive Elemente (ALUs, LINEs etc.) oder retrovirale Sequenzen wahrscheinlich auszuschließen sind, b) die "Imprint"-Funktion nicht durch Polymorphismen beim Menschen unterbunden wird, c) eine Sequenzhomologie in der gametisch geprägten Region bei der Maus existiert und d) eine zu identifizierende Homologie innerhalb des AS-Deletionsbereiches liegen muß. Weiterhin wurde die Region auf konservierte Sequenzcharakteristika von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und auf Regulationseinheiten, wie z.B. TATA-Boxen untersucht.

Repetitive Sequenzen: Eine Standard-Suche in Datenbanken ergibt normalerweise, daß der Kernbereich des AS-SRO über seinen ganzen Sequenzbereich frei von repetitiven Sequenzen ist (siehe Abb. 39A; Accession number: AF148319; GI:5059210). Diese Beobachtung ist damit zu begründen, daß entweder kleinere Elemente nicht von den allgemeinen Parametern der Datenbankprogramme erfasst werden können oder tatsächlich keine repetitiven Elemente in der betreffenden Region existieren. Um auch kleinere Elemente innerhalb des AS-SRO zu identifizieren, wurden daher neue Suchalgorithmen entwickelt, die es ermöglichen, auch Sequenzhomologien in der Größenordnung ab 20-30 Bb zu erkennen. Als Suchprogramm fanden die Programme *RepeatMasker7/16/2000* und *BLASTN 2.1.2* Verwendung.

Bisher galt als die wahrscheinliche funktionale Einheit des AS-SRO das Exon u5, welches in allen Angelman Syndrom IC-Deletionspatienten deletiert ist (Färber *et al.*, 1999; Buiting *et al.* 1999). In dieser Arbeit kann jedoch gezeigt werden, daß das gesamte Exon u5 ein Teil einer repetitiven Sequenz (MER5A) darstellt (siehe Abb. 39C).

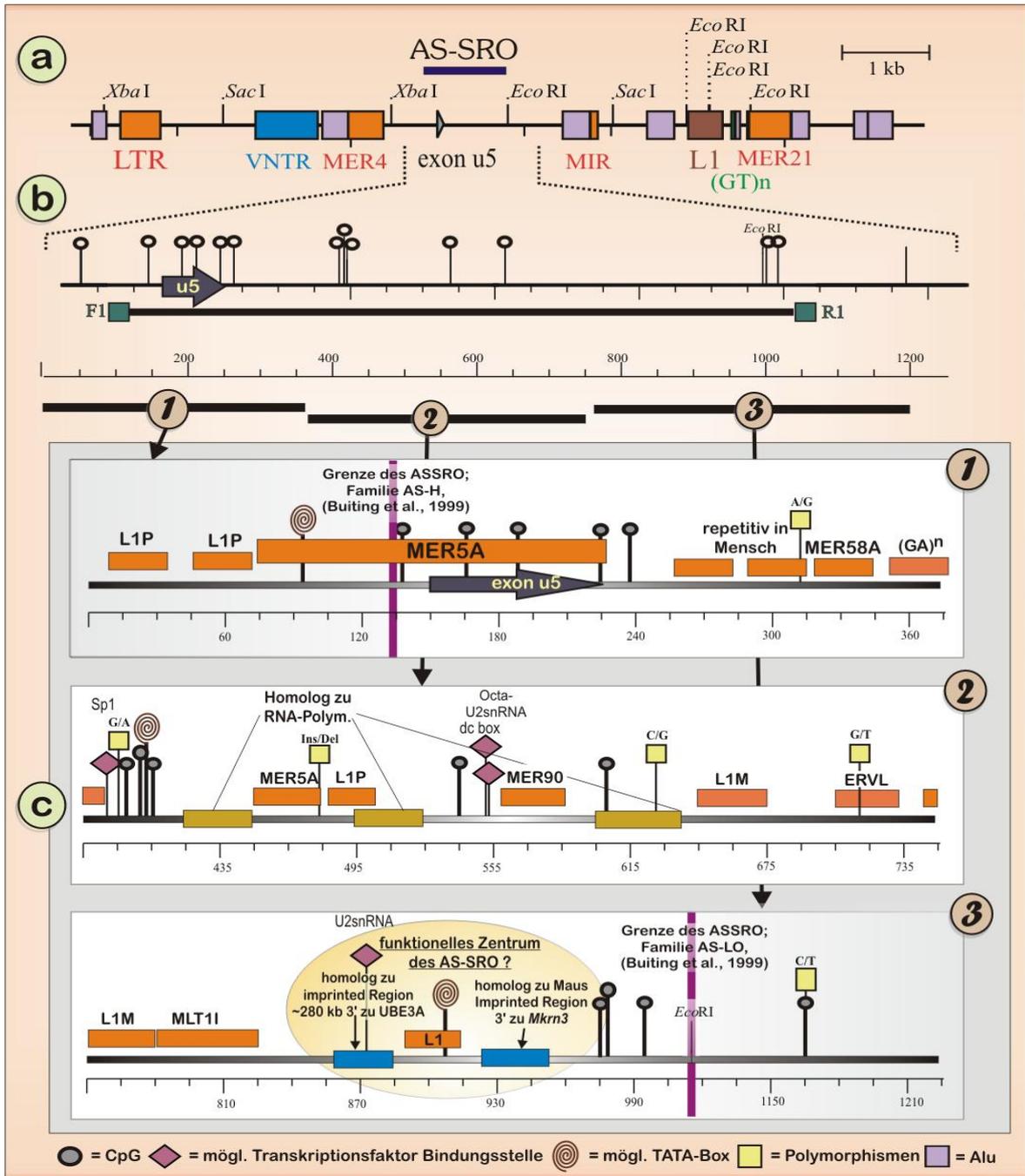


Abb. 39: Strukturanalyse des gesamten AS-SRO-Bereichs in Mensch. **A:** Übersicht über die repetitiven Elemente der AS-SRO-Region. **B:** Kernregion des AS-SRO. F1=Forward-primer, R1: Reverse-primer. **C:** Computerunterstützte Analyse der AS-SRO-Sequenz. Repetitive Elemente sind als orange Rechtecke dargestellt. Es zeigte sich, daß das Exon u5 vollständig Teil einer sog. *Mermaid*-Sequenz ist. Ein möglicherweise funktionelles Zentrum des AS-SRO könnte innerhalb eines telomeren Abschnitts sein, der eine hohe Homologie zu einer gametisch geprägten Mausequenz zeigt.

MER5A gehört zu den MER1-Typ (Mermaid) DNA-Elementen, die zahlreich im Säugetiergenom vorkommen. Es ist als unwahrscheinlich anzusehen, daß eine regulatorische Funktion durch diese repetitive Einheit repräsentiert wird.

Auch außerhalb des Exons u5 finden sich viele kurze "Repeats". Die einzige größere Region, die nahezu frei von repetitiven Elementen ist, befindet sich am telomerischen Ende des AS-SRO (Basenpaare 830-1000, theoretisch funktionale "Imprinting"-**TFI**-Domäne) und gilt somit als wahrscheinlichster Kandidat für eine regulatorische Funktion im "Imprinting"-Prozess.

Polymorphismen: Es existieren mehrere Polymorphismen innerhalb des AS-SRO (Schumacher *et al.*, 1998; K. Buiting, pers. Kommunikation; siehe Abb. 39C). Alle bekannten Polymorphismen liegen innerhalb der ersten 750 Basenpaare der untersuchten Sequenz. Auch hier erweist sich der **TFI**-Abschnitt am telomeren Ende des AS-SRO als wahrscheinlichste "Imprint"-Domäne, da sie möglicherweise keine Sequenzpolymorphismen toleriert.

Sonstige DNA-Elemente: Die Untersuchung dieser DNA-Sequenz auf mögliche Protein-Bindungsstellen erwies sich als schwierig, da verschiedene Computerprogramme (z.B. *MatInspector*, *Transfac 5.0*, *Tfsitescan* u.a.) ungezählte positive Ergebnisse lieferten. Aufgrund zahlreicher Transkriptionsfaktoren und kurzer Erkennungssequenzen ist die theoretische Trefferquote hoch. Es wurden daher nur Bindungsmotive aufgeführt, die eine vollständige Homologie zu existierenden Motiven besitzen, außerhalb der repetitiven Sequenzen liegen und (aufgrund der Basenzusammensetzung) nicht übermäßig häufig im Genom vorkommen. Es zeigte sich, daß neben einem Sp1-Bindungsmotiv zwei Sequenzen außerhalb repetitiver DNA identifiziert werden konnten, die mit den Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für U2snRNA-Genen identisch waren. Dies ist besonders bemerkenswert, da das Genprodukt SmN des gametisch geprägten *SNRPN*-Gens am telomeren Ende des "Imprinting"-Centers an U2snRNA bindet (siehe Diskussion). Ob das Zusammentreffen dieser Sequenzen rein zufällig ist, oder ob eine Verbindung zwischen der Regulierung von U2snRNA Genen und IC-abhängigen Genen besteht, ist ohne weitere Daten nicht zu beurteilen. Da sowohl *SNRPN* und U2snRNAs zeitgleich transkribiert werden müssen lässt sich allerdings ein möglicher koordinierter Regulationsmechanismus durch gleiche Transkriptionsfaktoren nicht ausschließen. Einer der beiden U2snRNA-Bindungsmotive liegt wiederum innerhalb der theoretisch funktionalen Domäne **TFI** (Bb 830-1000, siehe Abb. 39C3) des AS-SRO. Im gleichen Abschnitt liegt auch eine von drei möglichen TATA-Sequenzen. Es ist durchaus anzunehmen, daß diese TATA-Motive für die Expression einiger der untranslatierten 5'-Exons des *SNURF/SNRPN*-Gens (Exon-

Struktur von *SNURF/SNRPN* siehe Abb. 49) verantwortlich sind. Daten zur Regulation dieser Exons sind bisher jedoch nicht bekannt.

Sequenzhomologien: Ein detaillierter Sequenzabgleich mit allen Datenbanksequenzen (NCBI) von Mensch und Maus ergab ein erstaunliches Resultat. Abgesehen von den repetitiven Elementen erwiesen sich nur zwei Sequenzabschnitte als hoch homolog zu Milliarden von Basenpaaren in der Datenbank. Erneut zeigte sich, daß beide Sequenzabschnitte innerhalb der **TFI**-Domäne lagen (Abb. 39C3). Als umso erstaunlicher erwiesen sich die beiden Homologien nach der erfolgten Kartierung (siehe Abb. 40 und 41). Eine Sequenz, die im Folgenden als *Homolog A* bezeichnet wird, ließ sich bis auf wenige kBp auf Chromosom 15q11-q13 des Menschen, zwischen den gametisch geprägten Genen *UBE3A* und *ATP10C*, kartieren. Aufgrund der Existenz von etwa drei Milliarden Basenpaaren im menschlichen Genom erscheint diese Lokalisation als nicht zufällig. Das Bemerkenswerte am Auftreten dieser AS-SRO-homologen Sequenz wird durch die Tatsache erhöht, daß sie nicht nur in der IC-abhängigen gametisch geprägten Region lokalisiert ist, sondern sich in dem Bereich befindet, der nur maternal exprimierte Gene enthält und ursächlich mit der Entstehung des Angelman Syndroms in Verbindung gebracht wird (siehe Diskussion). Der wahrscheinlich nächstgelegene beschriebene Marker ist D15S986.

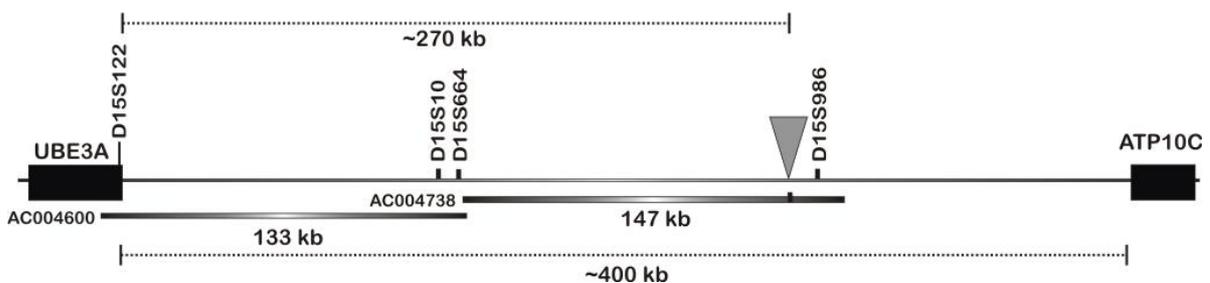


Abb.40: Kartierung des AS-SRO Homologs A auf Chromosom 15q11-q13. Die homologe Sequenz (Protein-Bindungsstelle?) befindet sich auf Klon gi3927853 (AC004738) der sich zwischen Marker D15S518 und D15S1019 befindet. Bestätigte Marker: D15S986. Der Klon überlappt PACs pDJ373b1 (AC004600) und pDJ14i12 (AC004259). AC004600 liegt zwischen D15S1035 und D15S1048 und enthält die Marker WI-1147, WI-6519, WI-11915, D15S664, D15S122 und D15S10. AC004259 liegt zwischen D15S1035 und D15S1048 und enthält die Marker WI-1147, WI-13724 und D15S664. Die exakte Reihenfolge der einzelnen Marker ist unbekannt. Damit ergibt sich eine ungefähre Lokalisation des Homologs A etwa 270-280 kBp telomerisch zum AS-Gen *UBE3A* und etwa 130 kBp centromerisch zum maternal exprimierten *ATP10C*.

Der zweite Bereich der **TFI**-Domäne des AS-SRO (Homolog B), dessen Sequenz sich im Säugetiergenom wiederfindet, liegt auf Mausechromosom 7C. Wieder ist auffallend, daß die homologe Sequenz sich nicht irgendwo im Mausgenom befindet, sondern exakt im gametisch geprägten Bereich um *Snurf/Snrpn* (siehe Abb. 41).

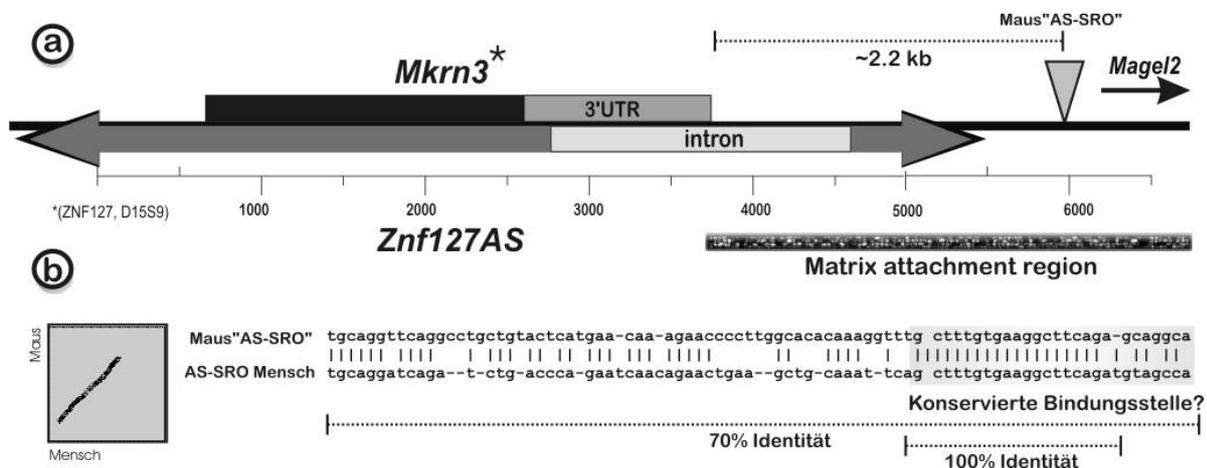


Abb. 41: Kartierung des Homologs B (Maus-AS-SRO ?) auf Mauschromosom 7C, centromerisch zu *Mkrn3*. Die homologe Sequenz befindet sich auf Klon gi1149633 (AC027298) und besitzt in ihrer Kernsequenz (19 Bp Protein-Bindungsstelle?) eine hundertprozentige Sequenzidentität. **A:** Homolog B ist innerhalb einer MAR (*matrix attachment site*) lokalisiert. **B:** Blast-Dot-Blot der beiden Sequenzen und Sequenzvergleich. Der AS-SRO Bereich, der als mögliche funktionale Einheit identifiziert wurde (*TFI*, s.o.), besitzt eine 70%ige Identität zu diesem DNA-Abschnitt. Auch der gesamte AS-SRO über die vollständigen 880 Bp besitzt immerhin eine Sequenzhomologie von 58% zu der Region 3' von *Mkrn3*.

Die relativ hohe Sequenzidentität zum AS-SRO läßt vermuten, daß es sich bei dieser DNA-Region tatsächlich um den langgesuchten Maus AS-SRO handeln könnte. Deletionsexperimente zeigten zuvor, daß der vermutete Maus AS-SRO sich nicht in der Nähe von *Snrpn* befinden kann und wahrscheinlich telomerisch zu *Ndn* lokalisiert ist (Shemer *et al.*, 2000; K. Buiting, pers. Kommunikation). Da der menschliche AS-SRO das "Imprint" in Mäusen mit großen Deletionen des Imprintbereiches kompletieren kann, ist davon auszugehen, daß eine dem AS-SRO verwandte Sequenz in Maus in der Tat existiert (Shemer *et al.*, 2000; Hershko *et al.*, 2001).

Beide Regionen, der humane AS-SRO und das Maus Homolog B teilen sich ein weiteres Charakteristikum. Beide befinden sich in einer *matrix attachment region*, die für eine Heterochromatisierung der jeweiligen chromosomalen Bereiche verantwortlich sein könnte (MARs; Greally *et al.*, 1999^a; Greally *et al.*, 1999^b). MARs sind nur sporadisch im Säugetiergenom anzutreffen. So ist die Region 3' zu *Mkrn3* in Maus über mehrere MBp die einzige Region, die eine Matrix-Assoziation zeigt (Abb.41). Ähnlich scheint die Situation für den AS-SRO zu sein, da im Bereich um *SNURF/SNRPN* alle identifizierten MARs entweder um den AS-SRO (Exon u4 bis Exon u5) oder um den PWS-SRO (einschließlich der Exons 2-10) anzutreffen sind. Eine entscheidende Rolle der MARs in der Etablierung des "Imprints" in Mensch und Maus wurde postuliert (Greally *et al.*, 1999^a). Die Region 3' zum Maus *Mkrn3* ist bisher erst unzureichend charakterisiert. *Mkrn3* besitzt ein "Antisense"-Transkript (*Znf127AS*), das wesentlich im

"Imprinting" Mechanismus für diese Region involviert sein könnte (Jong *et al.*, 1999). Es wurde bewiesen, daß "Antisense"-Transkripte in anderen Regionen an der Etablierung und Kontrolle des "Imprints" teilhaben können (Sleutels *et al.*, 2002; Übersicht in Reik & Walter, 2001). Die Grenzen von *Znf127AS* sind jedoch bisher nicht bekannt. Da man aber ein 11 kBp Transkript identifizieren konnte und *Zfp127AS* nur etwa 2 kb von *Mkrn3* überdeckt, ist es möglich, daß sich das Antisense-Transkript über Homolog B erstreckt und daher unter der Kontrolle dieser AS-SRO-ähnlichen Sequenz stehen könnte.

4.2.2 Untersuchung der repetitiven Sequenzen MER47A und L1ME beim Menschen

Das untersuchte DNA-Fragment C4813J (K. Buiting, pers. Mitteilung) enthält die repetitiven Sequenzen MER47A und L1ME und liegt innerhalb der gametisch geprägten Region auf Chromosom 15, etwa 6 kBp telomerisch zum *SNRPN*-Transkript *PAR-1* (siehe Abb. 42). Diese chromosomale Region charakterisiert sich vorwiegend durch das weitläufige *SNRPN*-Gen mit seinen bisher beschriebenen 148 3'-Exons, die in ihren Introns snoRNAs beherbergen. Die hier untersuchte Region liegt im Intron zwischen Exon 62 und Exon 63, welches als eines der wenigen Introns in diesem Chromosomenabschnitt keine snoRNAs enthält (Runte *et al.*, 2001).

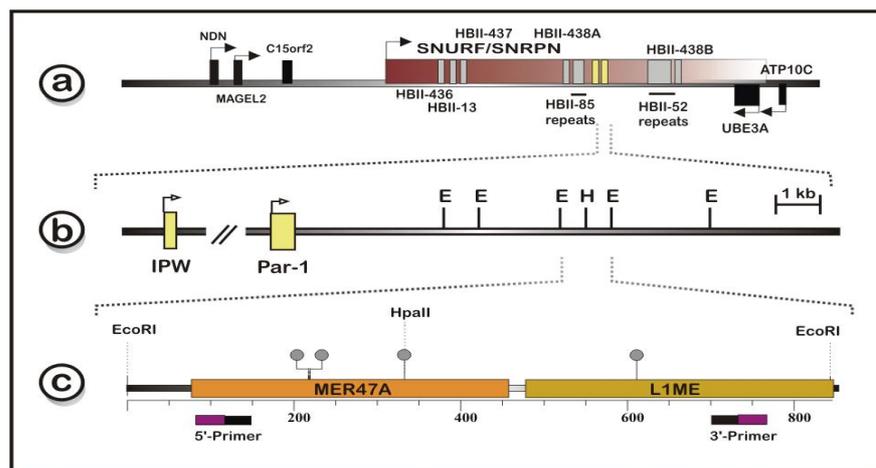


Abb. 42: Übersicht über die chromosomale Region über die sich die Transkripte des *SNURF/SNRPN*-Gens erstrecken. **a:** Die gametisch geprägte Region auf Chromosom 15q11-13 enthält zahlreiche snoRNAs, die sich in den Introns des *SNURF/SNRPN*-Gens befinden. Der untersuchte Bereich liegt etwa 6 kb telomerisch zu *PAR-1* in Richtung der kritischen Angelman-Region zwischen Exon 62 und Exon 63. **b:** Ausschnittsvergrößerung von a. Innerhalb des Introns 62, daß mit 49039 Bp das größte aller *SNRPN*-Exons ist liegen die Retrotransposons *MER47A* und *L1ME*. Das ursprünglich als eigenständiges Gen beschriebene *ipw* besteht aus Exons 59-61, das nicht charakterisierte Transkript *PAR-1* könnte das Exon 62 darstellen. **c:** Ausschnittsvergrößerung von b mit Restriktionskarte der untersuchten Sequenz. Die vier CpG-Dinukleotide sind durch Kreise, die verwendeten Primer durch schwarze Balken dargestellt; E = *EcoRI*; H = *HpaII*.

Über die Methylierung repetitiver Sequenzen in "Imprinting"-Bereichen ist bisher nichts bekannt, jedoch ist auffallend, daß insbesondere LINE1-Sequenzen gehäuft in Nähe von DMRs (*differential methylated regions*) gametisch geprägter Gene auftreten (Engemann *et al.*, 2000). Eine wesentliche Frage besteht darin, ob die integrierten Sequenzen das "Imprint" der Insertionsstelle übernehmen oder einer gametischen Methylierungsprägung entkommen? Beide repetitiven Sequenzen innerhalb des Introns 62 gehören zur Familie der Retrotransposons. Retrotransposons existieren in vielen verschiedenen Subtypen, die sich jeweils zu bestimmten Zeitpunkten der evolutiven Zeitskala entwickelten und vermehrten. Aufgrund dieser Charakteristik läßt sich ungefähr ermitteln, wann die beiden Retrotransposons in die *SNURF/SNRPN*-Region integrierten.

Beide Elemente gehören zu der Unterfamilie der LINES (*long interspersed nuclear elements*), die für eine Reverse Transkriptase kodieren (Übersicht in Smit, 1999). Das Säugetiergenom enthält eine ursprüngliche LINE Familie, die sog. LINE 2 Familie, die vor der Abtrennung der Säugetiere ihre Transposition einstellte und einen jüngeren Subtyp, die L1 oder LINE1 Familie. Viele dieser L1-Transposons, so auch das untersuchte L1ME, inserierten erst nach Abspaltung der Säugetiere in das Genom und sind auch heute noch aktiv. L1-Elemente inserierten vornehmlich über kurze (20 Bp) "*inverted repeats*" in GC arme Regionen (im Gegensatz zu ALUs, die bevorzugt in GC-reichen DNA Abschnitte inserierten). Vollständige L1-Transposons können über 5 kBp groß werden. Somit ist der hier untersuchte Abschnitt entweder nur ein Teil eines weitreichenderen 3'-LINEs oder lediglich ein rudimentäres Fragment. Aufgrund der extrem schnellen Evolutionsrate der L1-Fragmente läßt sich eine genauere Datierung der Insertion beider untersuchter Elemente vornehmen (Smit *et al.*, 1995). So muss das L1ME Fragment etwa vor 110 Millionen Jahren zur frühen Kreidezeit in das Genom integriert worden sein (Vergleich siehe Abb. 82 Phylogenetisches Dendrogramm). Das MER47A Element gehört zu der Unterfamilie der MER2s (*medium reiteration frequency sequences 2*), die sich von 3' untranslatierten Regionen der L1 Sequenzen ableiten und daher jüngeren Ursprungs sind. MER2 Sequenzen werden in Datenbanken nicht mehr als LINES, sondern als DNA-Elemente geführt und inserierten womöglich erst während der Primatenentwicklung in das Genom.

Welches Methylierungsmuster läßt sich erwarten? Da die centromerisch zu den LINES liegenden Gene *MKRNS3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN* und das sehr nahegelegene Transkript *PAR-1* vorwiegend maternal methyliert sind und nur von dem paternalen Allel exprimiert werden, wäre eine allelspezifische Methylierung nicht unerwartet. Aus dem telomerisch zu den LINES liegenden Chromosomenabschnitt sind jedoch bisher

keinerlei Daten zur Methylierung veröffentlicht. Da aber alle snoRNAs telomerisch zu den LINEs eine paternal-spezifische Expression aufweisen, ist eine maternal-spezifische Methylierung denkbar. Erst ungefähr 150 kBp telomerisch zu den LINEs beginnt das, zumindestens in Neuronen des Kleinhirns gametisch geprägte, maternal exprimierte Gen UBE3A. Es ist daher möglich, daß in diesem um die LINEs liegenden Chromosomen-Abschnitt ein Wechsel von maternaler zu paternaler Methylierung vorliegt. Andererseits unterliegen die *SNURF/SNRPN*-Exons und die snoRNA wahrscheinlich keiner Regulierung durch CpGs, da die Transkriptionskontrolle mutmaßlich auf die *SNURF/SNRPN* Promotorregion und IC beschränkt ist.

Anmerkung: Die Original-Sequenzdaten der Region enthielt ein weiteres CpG-Dinukleotid, welches jedoch in keiner der untersuchten Personen gefunden werden konnte. Wie auch für die anderen hier untersuchten Regionen wurde DNA aus zwei gesunden Probanden und je einem Prader-Willi- bzw. Angelman-Patient untersucht.

4.2.2.1 Methylierung der LINE-Region bei einer gesunden Probandin

Die Amplifizierung des 600 Bp-Fragmentes lieferte ein Produkt sowohl für den Plus- als auch für den Minus-Strand. Da keine polymorphen Marker identifiziert werden konnten, ist eine parentale Zuordnung der einzelnen Sequenzen nicht möglich. Die Methylierung über die gesamte LINE-Region ist in dieser Probandin mit 77.5% relativ hoch, variiert jedoch stark zwischen den einzelnen CpG-Dinukleotiden (siehe Abb. 43). Die CpGs #1 und #2 sind nahezu vollständig methyliert, während das CpG #4 nur zu 64% methyliert ist.

Die Sequenzierung der zwanzig untersuchten Klone zeigte weiterhin, daß das CpG-Dinukleotid #3 in dieser Probandin nur zur Hälfte methyliert war. Ob dieses CpG nur einer weniger stringenten Methylierung oder möglicherweise einer gametischen Prägung unterliegt, ist aus diesen Daten alleine nicht zu ersehen, erscheint aber unwahrscheinlich. Eine vergleichende Untersuchung der Methylierungsmuster in einem PWS- und einem Angelman-Patienten (siehe unten) scheint eine gametische Prägung auszuschließen. Auffallend an dem Methylierungsmuster dieser Probandin ist die meist entgegengesetzte Methylierung der CpG-Dinukleotide #3 und #4. In fünfzehn der untersuchten zwanzig Klone ist das CpG-Dinukleotid #4 immer dann methyliert, wenn CpG #3 unmethyliert ist. Ist das CpG #3 jedoch methyliert, bleibt das CpG #4 meist unmethyliert. Diese reziproke Methylierungsmuster der beiden CpG-Dinukleotide ließ sich jedoch nicht in den anderen untersuchten Personen reproduzieren.

Ebenso wie in der zuvor beschriebenen AS-SRO-Region konnte auch hier kein Unterschied in der Methylierung der beiden DNA-Stränge beobachtet werden. Sowohl der Sense- als auch der Antisense-Strang waren zu je 77.5% methyliert.

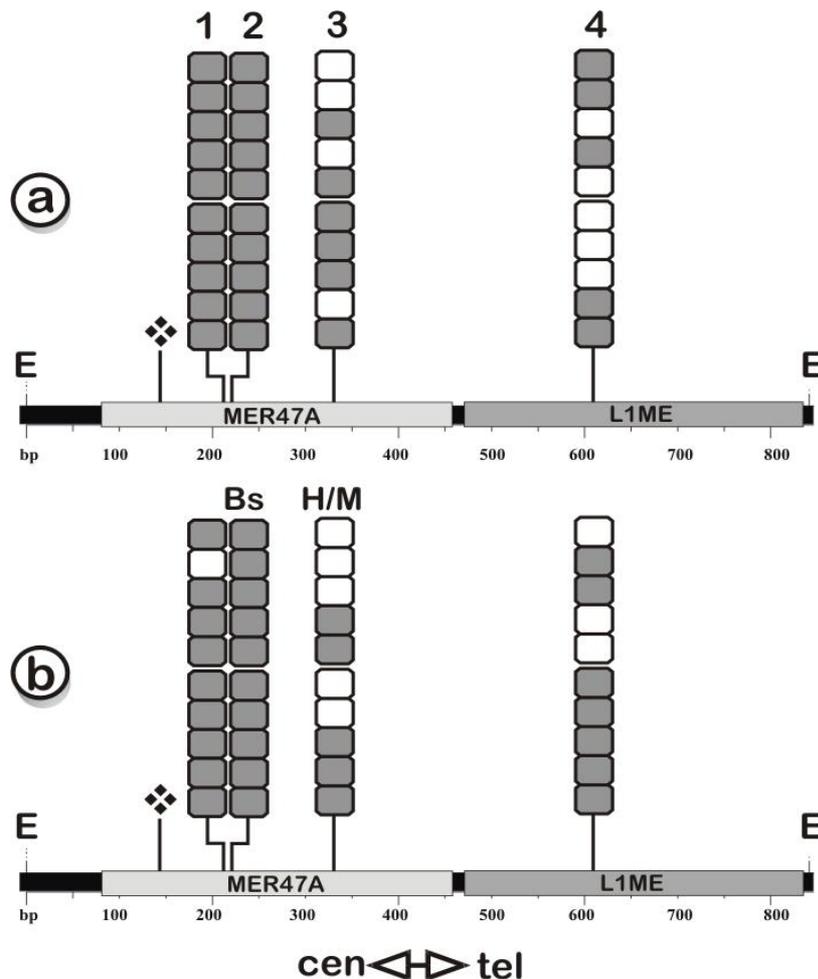


Abb. 43: Verteilung der 5m-Cytosine in der LINE-Region, telomerisch zu SNURF/SNRPN Exon 62 (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. Jede vertikale Reihe (#1-4) repräsentiert die Position eines 5'-CpG-3'-Dinukleotides. Eine horizontale Reihe entspricht jeweils einem sequenzierten Klon. **a:** Gesunde Probandin; Sense (Plus)-Strang; **b:** Gesunde Probandin; Antisense (Minus)-Strang; ❖ = möglicherweise polymorphes CpG-Dinukleotid, in der Originalsequenz dieses Abschnitts existiert an dieser Stelle ein CpG, nicht jedoch in den hier untersuchten Personen; Gesamt-Methylierung Sense-Strang = 77.5%; Gesamt-Methylierung Antisense-Strang = 77.5%; E = *EcoRI*, H = *HpaII*; Bs = *Bsh1236I*; M = *MspI*.

4.2.2.2 Methylierung der LINE-Region bei einem gesunden Probanden

Die Gesamtmethylierung der LINE-Region dieses Probanden unterscheidet sich mit 76% nicht signifikant von der, die für die weibliche Probandin (77.5%) gefunden wurde:

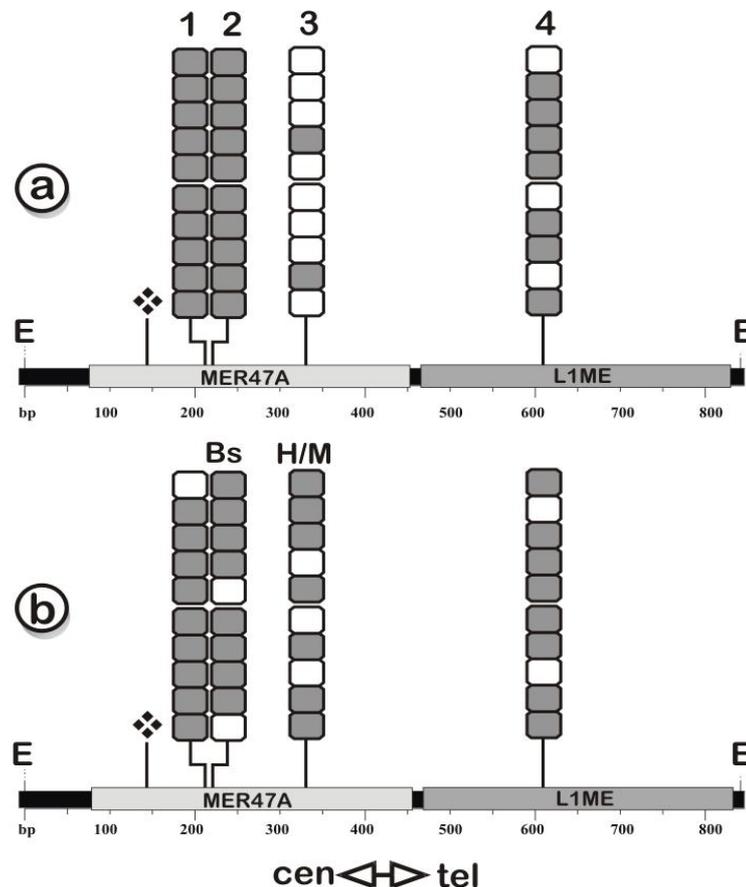


Abb. 44: Verteilung der 5m-Cytosine in der LINE-Region, telomerisch zu *SNURF/SNRPN* Exon 62. Gefüllte Rechtecke (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. **a:** Gesunder Proband; Sense (Plus)-Strang; **b:** Gesunder Proband; Antisense (Minus)-Strang; ❖ = möglicherweise polymorphes CpG-Dinukleotid, Gesamt-Methylierung Sense-Strang = 72.5%; Gesamt-Methylierung Antisense-Strang = 80%; E = *EcoRI*, H = *HpaII*; Bs = *Bsh1236I*; M = *MspI*.

Auch die Verteilung der einzelnen Methylierungsmuster ähnelt derjenigen der weiblichen Probandin. Die CpGs #1 und #2 sind nahezu vollständig methyliert, während die beiden anderen CpG-Dinukleotide eine geringere Methylierung aufweisen (CpG #3: 45%, CpG #4: 75%). Es existiert zwar ein Methylierungs-Unterschied zwischen Sense- und Antisense-Strang von 8%, jedoch ist diese Differenz nicht so signifikant, als daß eine strangspezifische Methylierung angenommen werden kann. Ein spezifisches reziprokes Methylierungsmuster der CpGs #3 und #4 konnte nicht beobachtet werden.

4.2.2.3 Methylierung der LINE-Region bei einem PWS-Patienten

Der hier untersuchte Deletions-Patient ist der gleiche, der auch im Abschnitt zur Methylierung des AS-SRO beschrieben wurde. Aufgrund der Deletion spiegelt das beschriebene Methylierungsmuster das eines maternal vererbten Allels wider:

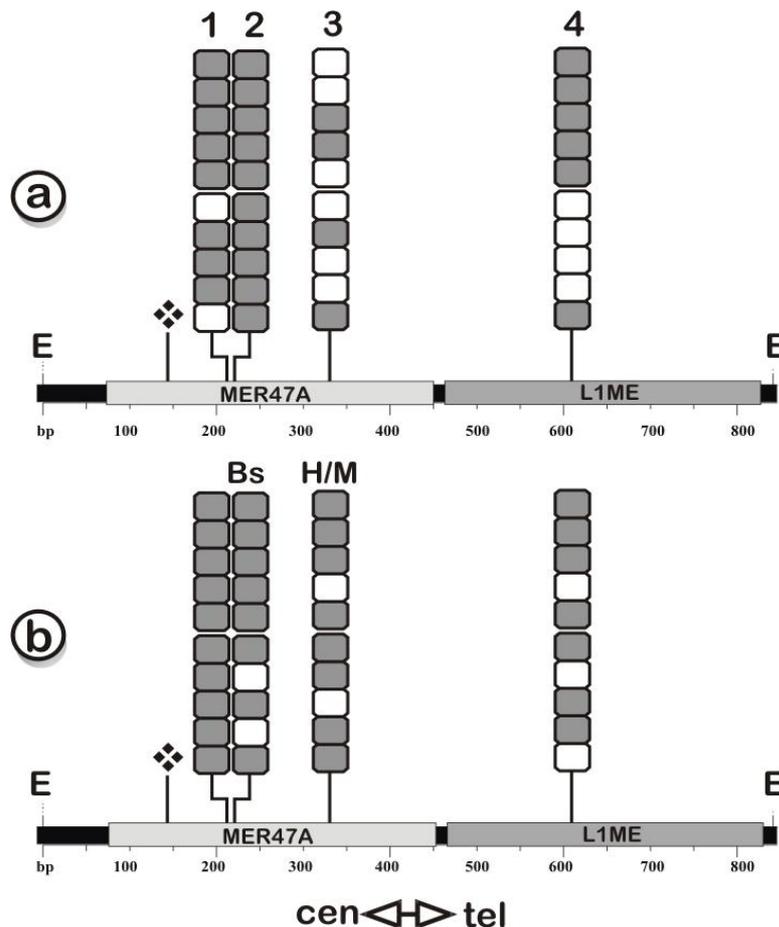


Abb. 45: Verteilung der 5m-Cytosine in der LINE-Region, telomerisch zu SNURF/SNRPN Exon 62. Gefüllte Rechtecke (■) = methylierte, leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. **a:** Prader-Willi Patient; Sense (Plus)-Strang; **b:** Prader-Willi Patient; Antisense (Minus)-Strang; ❖ = möglicherweise polymorphes CpG-Dinukleotid; Gesamt-Methylierung Sense-Strang = 70%; Gesamt-Methylierung Antisense-Strang = 82.5%; E = *EcoRI*, H = *HpaII*; Bs = *Bsh1236I*; M = *MspI*.

Das beobachtete Methylierungsmuster ist mit dem in gesunden Probanden beobachteten fast identisch (siehe auch Abb. 43 und 44). Da keines der untersuchten CpG-Dinukleotide eine „Alles-oder-Nichts“-Methylierung zeigt, scheint diese Region keinem offensichtlichen "Imprint" zu unterliegen. Auch die Gesamt-Methylierung der LINE-Region unterscheidet sich mit 76.3% nicht signifikant von derjenigen der gesunden Probanden.

4.2.2.4 Methylierung der LINE-Region bei einem AS-Patienten

Dieses hier untersuchte, paternal vererbte Allel zeigt ebenso wie das zuvor beschriebene maternale Allel ein Methylierungsmuster, welches denen der gesunden Probanden sehr ähnlich ist:

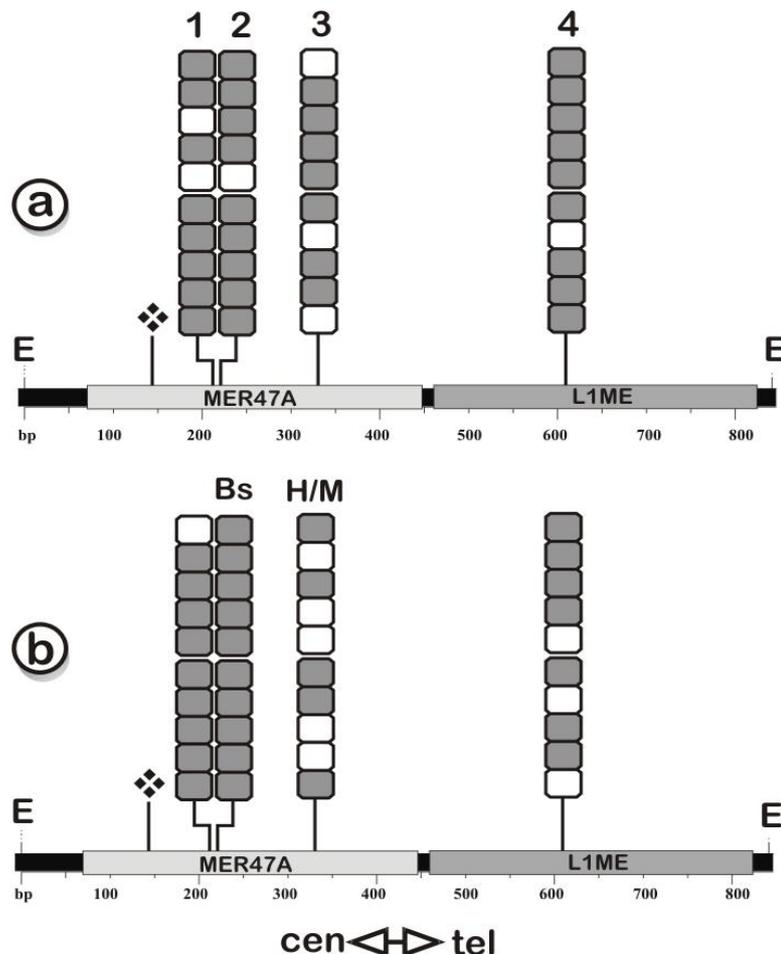


Abb. 46: Verteilung der 5m-Cytosine in der LINE-Region, telomerisch zu *SNURF/SNRPN* Exon 62. Gefüllte Rechtecke () = methylierte, leere Rechtecke () = nicht-methylierte CpGs. **a:** Angelman Patient; Sense (Plus) - Strang; **b:** Angelman-Patient; Antisense (Minus) - Strang; ❖ = möglicherweise polymorphes CpG-Dinukleotid; Gesamt-Methylierung Sense-Strang = 82.5%; Gesamt-Methylierung Antisense-Strang = 77.5%; E = *EcoRI*, H = *HpaII*; Bs = *Bsh1236I*; M = *MspI*.

Beide eng benachbarten CpG-Dinukleotide #1 und #2 sind hoch methyliert, während das CpG #3 wie zuvor in den anderen untersuchten Probanden mit 60% die niedrigste Methylierung aufweist.

Die mittlere Differenz des Methylierungsgrads beider DNA-Stränge in diesem Patienten beträgt 5%. Ein signifikanter Methylierungs-Unterschied zwischen Sense- und Antisense-Strang konnte somit nicht identifiziert werden. Die Gesamtmethylierung dieser Region

beträgt 80% und ist damit nur minimal höher methyliert als in den untersuchten, gesunden Probanden (durchschnittlicher Methylierungsgrad von 77%).

4.2.2.5 Vergleichende Statistik zur LINE-Region

Vergleicht man die Ergebnisse aller untersuchten Personen, so findet sich ein wiederkehrendes Muster der Cytosin-Methylierung (siehe Abb. 47). Die Variation in der prozentualen Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide ist nur gering. Die beiden CpGs #1 und #2, die nur wenige Basenpaare auseinanderliegen, sind durchgehend hoch methyliert (85-100%). Das CpG-Dinukleotid #3 ist mit durchschnittlich 55% am geringsten methyliert. Da kein signifikanter Unterschied zwischen dem maternalen (PWS Patient) und dem paternalen Allel (AS Patient) zu beobachten ist, scheint die Methylierung der repetitiven Elemente nicht an eine gametische Prägung gekoppelt zu sein.

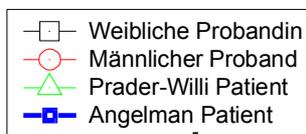
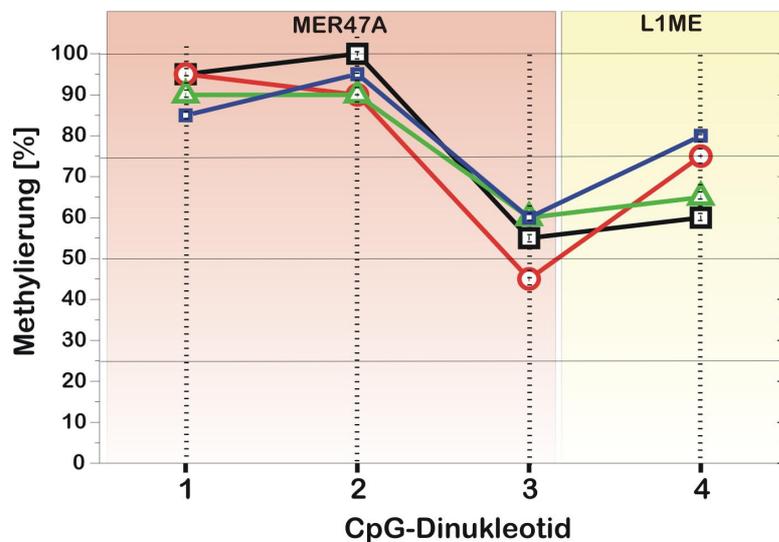


Abb. 47: Prozentuale Methylierung der vier CpG-Dinukleotide. Dargestellt sind die jeweiligen Methylierungs-Grade der vier einzelnen CpG-Dinukleotide innerhalb der MER47A- und L1ME-Elemente. Die Methylierung errechnet sich aus dem Mittel von Sense- und Antisense-Strang. Der farbig unterlegte Bereich zeigt die Variationsbreite der hier beobachteten Methylierung.

Das am weitesten in telomerischer Richtung liegende L1ME-CpG (#4) zeigt mit durchschnittlich 77,5% eine intermediäre Methylierung. Außerdem unterliegen die beiden DNA-Stränge offenbar keiner unterschiedlichen Methylierung. Nimmt man das Mittel aller untersuchten Klone, ergibt sich für den Sense- (Plus-) Strang eine Methylierung von 76% gegenüber 79% Methylierung des Antisense-Stranges. Eine

Methylierung von Cytosin-Basen, die nicht Teil eines CpG-Dinukleotides sind, konnte nicht beobachtet werden.

Tab. 5: Methylierungs-Grad der LINE-Region auf 15q11-13

Sense-Strang:	76 %
Antisense-Strang:	79 %
Maternales Allel*:	77 %
Paternales Allel**:	80 %

*Daten des PWS-Deletions-Patienten; ** Daten des AS-Deletions-Patienten

Anmerkung:

Eine weitere chromosomale Region stromaufwärts zum AS-SRO (zwischen Exon u2 und Exon u3), die als Y48.5 bezeichnet wird (Buiting *et al.*, 1995), wurde ebenfalls in einer vorherigen Studie (im Rahmen der Diplomarbeit, Schumacher, 1998) mit Hilfe der Bisulfit-Technik untersucht. Aufgrund der Datenmenge und der vorherigen Publikation wird daher auf eine ausführliche Besprechung dieser Region verzichtet. *In Kürze:* Es konnte gezeigt werden, daß das biparentale Methylierungsmuster des AS-SRO partiell über die Kernregion des IC-Elementes hinausreicht. Die Region um Y48.5 enthält zahlreiche CpG-Dinukleotide, die auch auf dem paternalen Allel hypermethyliert (~75%) vorliegen. Auch das maternale Allel war nicht vollständig geprägt, überraschender Weise mit ~65% sogar geringer methyliert als das paternale Allel. Ob diese biparentale Methylierung innerhalb der maternal geprägten Region eine strukturelle Funktion besitzen, ist unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß im Gegensatz zum AS-SRO die Y48.5-Sequenz evolutiv hoch konserviert ist (siehe Abschnitt 4.3).

4.2.3 Analyse von *in vitro* prämethylierter Plasmid-DNA

Um die Zuverlässigkeit der Methode der Bisulfit-Sequenzierung zu testen, wurde das Kontroll-Plasmid *p71.13.6 in vitro* prämethyliert. Das Plasmid *p71.13.6* ist ein 6.6 kBp *HindIII*-Subklon des Phagenklons $\lambda 71.13$ (Dittrich *et al.*, 1993; Zeschnigk *et al.*, 1997). Das Plasmid *p71.13.6* enthält die Sequenz des Markers PW71 (PWCFOA-Fragment; Beschreibung siehe Abschnitt 4.2.1). In diesen Kontrollexperimenten kamen zwei Methyltransferasen zum Einsatz. *HhaI* methyliert bevorzugt die Sequenz 5'-GCGC-3', während *SssI* alle CpG-Dinukleotide (5'-CG-3') modifiziert. Das methylierte und unmethylierte *p71.13.6*-Plasmid wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mit Bisulfit behandelt. Das zu untersuchende DNA-Segment wurde dann durch PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden kloniert und anschließend die Nukleotidsequenz von jeweils fünf Klonen eines der *in vitro* methylierten Plasmids bestimmt. Die Resultate sind in Abb. 48a-d zusammengestellt:

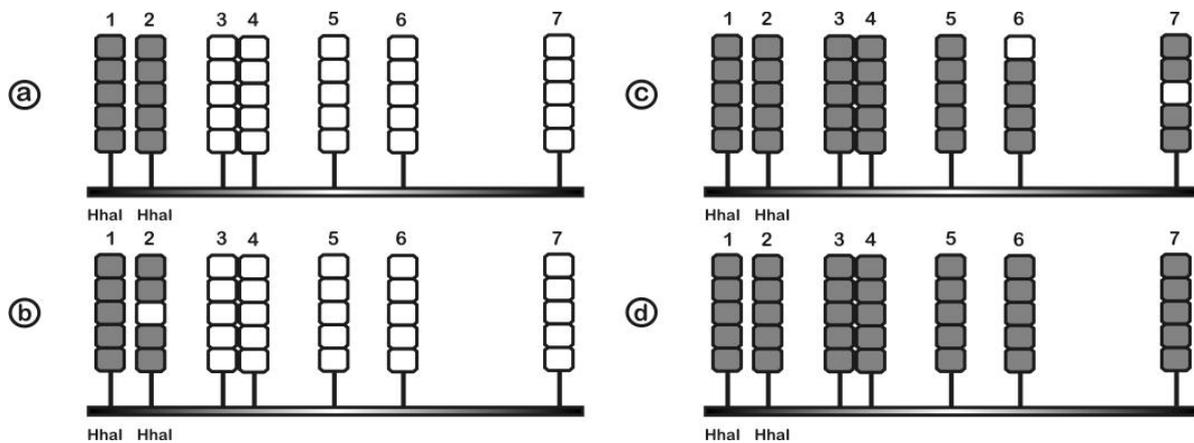


Abb. 48: Verteilung der 5-mC Reste innerhalb *in vitro* prämethylierter Plasmid-DNA (*p71.13.6*). Etwa 50 ng von entweder *HhaI*- (a,b) oder *SssI*- (c,d) methylierter Plasmid DNA wurden mit 5 µg Heringsspermien-DNA in getrennten Reaktionen gemischt und mit Bisulfitlösung behandelt (siehe Methodenteil). Jeweils fünf Klone aus jeder Reaktion wurden isoliert und anschließend sequenziert. Gefüllte Rechtecke (■) = methyliert; leere Rechtecke (□) = nicht-methylierte CpGs. a: *HhaI*-methyliert (5'-GCGC-3'), Sense- (Plus)-Strang; b: *HhaI*-methyliert, Antisense- (Minus)-Strang; c: *SssI*-methyliert (5'-CG-3'), Sense- (Plus)-Strang; d: *SssI*-methyliert, Antisense- (Minus)-Strang.

Die Daten zeigen, daß das *HhaI*-Enzym effektiv nur die 5'-GCGC-3'-Stellen methyliert, während die *SssI*-DNA Methyltransferase fast alle 5'-CG-3'-Dinukleotide modifiziert. Die Resultate demonstrieren, daß maximal drei von neunzig 5-mC Resten (3.3%) durch die verwendeten Methoden nicht detektiert werden könnten. Außerhalb von 5'-CG-3'-Dinukleotiden konnte keine Methylierung von Cytosin-Basen nachgewiesen werden. In nicht-methylierter Kontroll-DNA konnten in keinem Fall 5-mC Nukleotide gefunden werden.

4.2.4 Analyse der neuronal-spezifischen "Imprinting"-Region auf Chromosom 7C in ES-Zellen der Maus

Für die Etablierung und den Erhalt einer gametischen Prägung ist die frühe embryonale Entwicklung eine besonders kritische Phase. Nach der Befruchtung treffen beide parentalen Genome aufeinander und die Zelle muss entscheiden, welche der jeweiligen Allele aktiv sind und welche nicht. Über die genauen Mechanismen ist jedoch wenig bekannt. Offenbar entwickelt sich das erste "Imprint" während der Keimzell-Entwicklung (Übersicht in Reik & Walter, 2001).

Zuerst wird das alte "Imprint" des Muttertieres gelöscht und in der späten Keimzell-Entwicklung geschlechtsspezifisch wiederhergestellt. Welche Methyltransferasen die gametische Prägung initiieren, ist nicht genau bekannt, jedoch gelten Isoforme der *de novo* Methylase Dnmt1 als wahrscheinliche Kandidaten. Während der frühen Embryonalentwicklung wird das "Imprint" in somatischen Zellen wahrscheinlich durch die *de novo* Methylasen Dnmt3a und Dnmt3b etabliert. Nun folgt eine recht wenig verstandene Phase, in der das "Imprint" aufrechterhalten werden muss, jedoch der Embryo genomweit seine Methylierung verliert. Nach dem Verlust der Methylierung beginnt etwa während des Blastocystenstadiums eine Welle einer *de novo* Methylierung. Da zu diesem Zeitpunkt die ES-Zellen aus der inneren Zellmasse der Blastocyste geerntet werden, ist der Methylierungsstatus der Zellen ungewiss, insbesondere da manche DMRs (*differential methylated regions*) möglicherweise einer Demethylierung entgehen können. Diese Arbeit soll zu einem besseren Verständnis beitragen, wann die gametisch geprägten Gene methyliert werden, ob sie eventuell resistent gegenüber einer Demethylierung oder *de novo* Methylierung während der weiteren Entwicklung sind und wie sich das "Imprint" auf die Expression der Gene auswirkt. Dabei soll zudem die Frage geklärt werden, ob sich verschiedene ES-Zelllinien, insbesondere unterschiedlichen genetischen Hintergrundes, unterschiedlich methyliert werden. Zuvor konnte gezeigt werden, daß Methylierungsvariationen verschiedener Mausstämmen wahrscheinlich durch stammspezifische *Modifier* beeinflusst werden können (Schumacher *et al.*, 2000).

4.2.4.1 Analyse der *Snurf/Snrpn*-Region

Die gametisch geprägte Region des Mausechromosoms 7C ist überraschend homolog zu der des humanen Chromosoms 15q11-q13 aufgebaut (siehe Abb. 69), jedoch ist die Orientierung zum Centromer umgekehrt. Die Genreihenfolge ist nahezu identisch, obwohl einige Veränderungen in der Struktur der *Snurf/Snrpn*-Region während der Evolution eintraten. So besitzt das Mausechromosom keine Kopie des *C15orf2*-Gens

(Färber *et al.*, 2000), hingegen ein weiteres, gametisch geprägtes Gen, *Frat3*, welches ein weiteres Mitglied der MAGE-Genfamilie in dieser Region darstellt. *Frat3* und ein weiteres MAGE-Pseudogen (*Atp51-ps1*) wurden erst nach der Abtrennung der Rodentia offenbar durch L1-Retrotransposons in diese chromosomale Region integriert. Die Genreihenfolge wurde ursprünglich falsch interpretiert. *Frat3* bildet das am weitesten telomerisch liegende Gen, gefolgt von *Mkrn3-Magel2-Ndn-Snurf/Snrpn*. *Ndn* als das am weitesten centromerisch liegende Gen der MAGE-Familie liegt etwa 1 MBp telomerisch zum "Imprinting" Center (Promotorregion von *Snurf/Snrpn*):

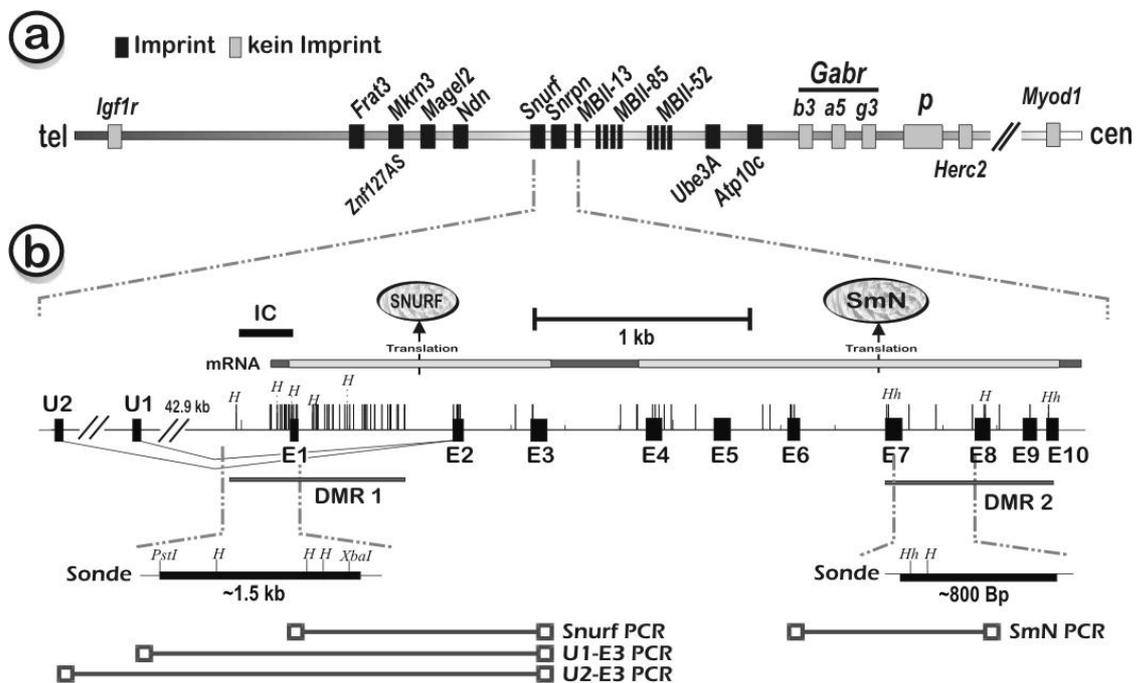


Abb. 49: Übersicht über die gametisch geprägte Region auf Mauschromosom 7C. **a:** Das *Snurf/Snrpn*-Gen liegt im Zentrum der "Imprint"-Region. **b:** Ausschnittsvergrößerung des *Snurf/Snrpn*-Gens. Die angegebenen Sonden detektierten methylierungssensitive Fragmente in Southern-Experimenten. Unten: PCR-Primer für Nachweis einzelner *Snurf/Snrpn*-Transkripte in ES-Zell cDNA. H = *HpaII*; Hh = *HhaI*.

Die Maus *Snurf/Snrpn*-Einheit ist gegenüber der homologen Sequenz beim Menschen hoch konserviert und exprimiert bicistronisch zwei Genprodukte (SNURF und SmN). Die bicistronische Anordnung ist äußerst ungewöhnlich für eukaryotische Genome. Der *Snurf/Snrpn*-Promotor besitzt die gleiche IC-Funktion wie das menschliche Homolog, jedoch enthalten beide Sequenzen keine Basenpaarhomologie (s.u.). Wie das humane Homolog besitzt auch das Maus *Snurf/Snrpn*-Gen untranslatierte 5'- Exons (U1 und U2), die direkt an Exon 2 "gespliced" werden, jedoch keine Sequenzhomologie zu ihren humanen Gegenparts besitzen. Die *Snurf/Snrpn*-Region enthält zwei beschriebene DMRs, die hier untersucht wurden. In somatischen Zellen sollte der DMR1 (siehe Abb. 49), welcher Teil des IC ist, maternal methyliert und paternal unmethyliert sein (Gabriel

et al., 1998; Shemer et al., 1997). Der Bereich zwischen Exon 7 und 10 (DMR2) wurde als differentiell methyliert beschrieben, mit einer erhöhten Methylierung für das paternale Allel (Shemer et al., 1997). Für diese Arbeit wurde die genomische DNA von drei Maus ES-Zelllinien (Stamm 129/sv: IB10; Stamm 129/ola: RW4 und C57BL/6: Bruce 4) untersucht. Die allelspezifische Methylierung wurde mit Hilfe von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen und anschließend Southern-Blotting ermittelt (siehe Material und Methoden).

Ergebnisse für die DMR1-Region: Im Menschen wird das "Imprint" des DMR1 wahrscheinlich erst im frühen post-zygotischen Stadium etabliert (El-Maarri et al., 2001), während vermutet wurde, daß in der Maus der DMR1 als primäres "Imprint" schon während der Oozytenentwicklung entsteht (Shemer et al., 1997). Geht man nun davon aus, daß die gametische Prägung auf Mauschromosom 7C schon in der Oocyte existiert, sollte eine differentielle Methylierung in den ES-Zellen zu erwarten sein. Aus Abbildung 50 geht hervor, daß in der Tat in allen untersuchten ES-Zelllinien der DMR1 bereits allelspezifisch methyliert vorliegt:

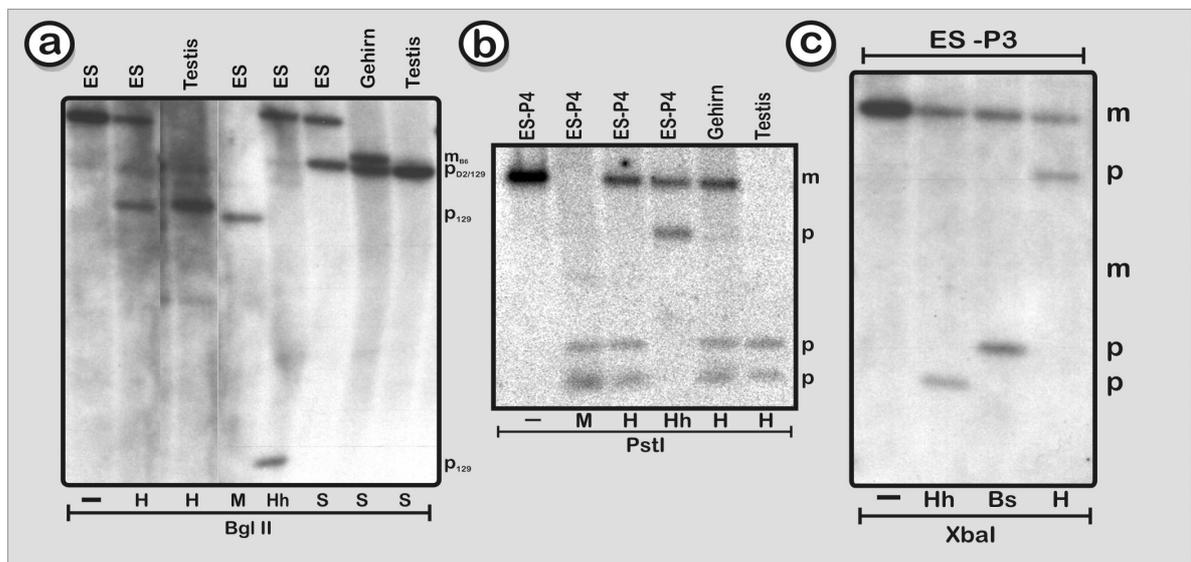


Abb. 50: Allelspezifische Methylierung des DMR1 in embryonalen Stammzellen der Maus. **Durchführung:** Bei der Spaltung genomischer DNA mit methylierungssensitiven Enzymen (z.B. *HpaII*) wird die DNA nur in Abhängigkeit der vorhandenen CpG-Methylierung gespalten. Durch den Verdau eines nicht methylierungssensitiven Enzyms (z.B. *MspI*) werden auch die methylierten CpG-Dinukleotide gespalten. Aus der Relation beider Bandenmuster lässt sich der relative Methylierungsgrad einer genomischen Region bestimmen (siehe Methoden, Abschnitt. 3.9). **a:** Zelllinie IB10. Etwa die Hälfte der genomischen DNA wird mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *HpaII*, *HhaI* und *SmaI* gespalten. Durch Vergleich mit DNA aus Gehirngewebe hybrider Mausstämme ließ sich feststellen, daß jeweils das paternale Allel (p) gespalten wurde, d.h. unmethyliert und das maternale Allel (m) nicht gespalten wurde, d.h. methyliert vorlag. Gestützt wird dieses Resultat durch die Tatsache, daß das paternale Allel in Testis ebenfalls unmethyliert war. **b:** Zellen der vierten Passage der Zelllinie RW4. **c:** Zellen der dritten Passage der Zelllinie RW4. H = *HpaII*; Hh = *HhaI*; S = *SmaI*; M = *MspI* (Isoschizomer zu *HpaII*, spaltet auch mCpGs); B = *BssHII*.

Faßt man die Ergebnisse aller untersuchten Schnittstellen zusammen, so ergibt sich ein homogenes Bild. Alle Zelllinien weisen ein "Imprint" für DMR1 auf. Die Methylierungsrate entspricht jeweils etwa dem Wert, der für die Positivkontrolle (Gehirn), in der das "Imprint" vollständig vorhanden sein sollte, ermittelt wurde. Mit 65% Gesamtmethylierung liegt der DMR1 in der Bruce4-Linie etwas über dem erwarteten Wert. Möglicherweise besitzen einige der CpG-Dinukleotide des paternalen Allels sporadisch Methyreste, jedoch sind für genauere Deutungen über stammspezifische Methylierungsmuster Kenntnisse über den Methylierungsgrad weiterer CpGs notwendig.

	IB10	RW4	Bruce4	Kontrolle Testis	Kontrolle Gehirn
HpaII	50%	55%	65%*	0%	51%
BssHI	-	50%	-		
HhaI	63%	65%	-		
SmaI	46%	-	-		
Σ Mittel	53%	56.5%	65%	0%	51%
	58%				

Tab. 7: Durchschnittliche Methylierungsrate des DMR1 in den untersuchten ES-Zelllinien und Kontroll-DNAs nach Densitometrie (siehe Methoden, Abs. 3.9). *Aus Experiment zur neuronalen Entwicklung der ES-Zellen (Abs. 4.2.4.6)

Die Methylierungsindizes errechnen sich abhängig vom maternalen Allel, welches sich durch Maus-Hybridstämme und im Vergleich zu bisherigen Veröffentlichungen identifizieren ließ. Damit ergäbe sich für einen Wert von 50% ein theoretisch perfekt geprägtes Allel mit vollständiger Methylierung des maternalen Allels und keinerlei Methylierung auf dem paternalen Allel. Ein Wert über 50% deutet auf eine teilweise Methylierung des paternalen Allels hin. Liegt der Wert unter 50%, so kann man davon ausgehen, daß das maternale Allel teilweise demethyliert ist.

Im Gegensatz zum DMR1 scheint der beschriebene DMR2 einer anderen, nicht gametisch geprägten Regulierung zu unterliegen. Über die Methylierung dieser Region zwischen Exon 7 und Exon 10 des *Snrpn*-Gens liegen jedoch unterschiedliche Daten vor. Shemer *et al.*, (1997) beschrieben den DMR2 in Mausgehirn als vorwiegend auf dem paternalen Allel methyliert, mit gleichzeitiger Teilmethylierung auf dem maternalen Allel. Andere Gruppen (Gabriel *et al.*, 1998; K. Buiting, pers. Kommunikation) konnten diese Daten teilweise nicht verifizieren. Für die hier vorgestellte Arbeit wurde DNA aus Gehirn von Mäusen des Maustamms 129 verwendet. Es zeigte sich, daß beide Allele vollständig methyliert waren und somit kein Methylierungs-"Imprint" aufwiesen (siehe Abb. 51).

Ein ähnliches Bild fand sich in den beiden 129er ES-Zelllinien. Beide waren mit 88.5% bzw. 99% hoch methyliert (siehe Tab. 8).

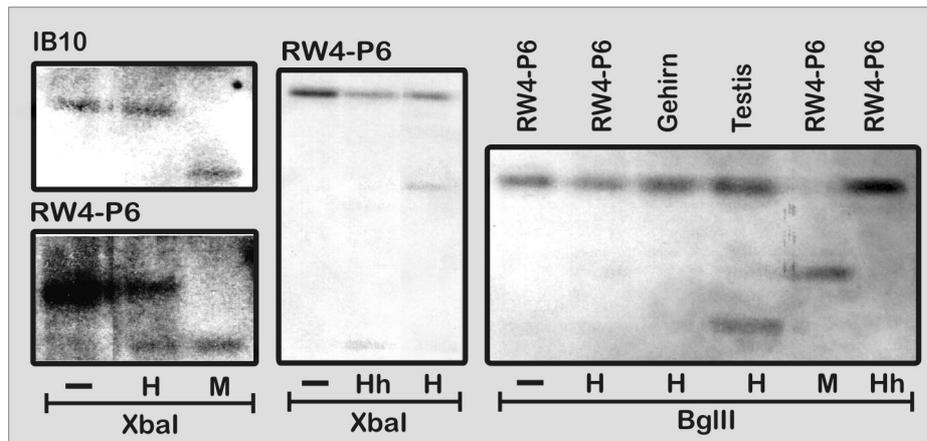


Abb. 51: Der Maus-DMR2 des *Snurf/Snrpn*-Gens entzieht sich einer allelspezifischen Methylierung. Sowohl in Gehirn als auch in ES Zellen erwies sich der als DMR2 bezeichnete Bereich zwischen Exon 7 und Exon 10 als nahezu vollständig methyliert. Im Gegensatz zu den meisten gametisch geprägten Genen finden sich im DMR2 auch methylierte Sequenzen in Testis.

Da der DMR2 auch schon eine signifikante Methylierung in Testis aufweist (siehe Abb. 51) scheint die Methylierung nach der Fertilisation beibehalten zu werden. Da der gesamte Bereich um *Snurf/Snrpn* wahrscheinlich in der Oocyte methyliert wird, ergibt sich daher in den ES-Zellen ein vornehmlich biparentales Methylierungsmuster. Diese Daten und Daten aus anderen Studien (Gabriel *et al.*, 1998) deuten darauf hin, daß der Sequenzabschnitt ab Exon 2 möglicherweise einer Demethylierung im frühen Embryo entgehen kann.

	RW4	IB10	Gehirn	Testis
HpaII	89	99	100	77
HhaI	88	-	-	-
Σ Mittel	88.5	99	100	77

Tab. 8: Durchschnittliche Methylierungsrate des DMR2 in den untersuchten ES-Zelllinien und Kontroll-DNAs. Unter der Annahme, daß das maternale Allel vollständig methyliert ist und das paternale über eine Erhaltungsmethylierung zu 77% methyliert bleibt (Vergleichswert aus Testis des Mausstamms 129/sv), ergäbe sich ein Wert von 88.5% Gesamtmethylierung in ES-Zellen, ein Wert, der exakt für die Zelllinie RW4 (129/sv) ermittelt wurde.

Die ermittelten Methylierungsindizes stehen im Einklang mit einer möglichen methylierungsabhängigen Transkriptionskontrolle, da sich die biparental methylierten Bereiche außerhalb des minimalen Promotorbereichs befinden (siehe auch Hershko *et al.*, 2001). Die Methylierungsverteilung innerhalb des *Snurf/Snrpn*-Transkripts würde demnach bedingen, daß beide translatierten Transkripte des Gens und wahrscheinlich

auch die weiter 3' liegenden snoRNAs unter der alleinigen Kontrolle der DMR1-Region sind. Um zusätzliche Methylierungsdaten weiter 3' zu den translatierten Bereichen zu erlangen, wurde die Methylierungsanalyse auf den ursprünglich als *Ipw*-Gen bezeichneten Bereich ausgedehnt. Die bisher beschriebenen homologen *IPW*-Exons in Mensch wurden mittlerweile als weitere 3'-Transkripte des *SNURF/SNRPN* Gens identifiziert (Runte *et al.*, 2001). Daher ist davon auszugehen, daß auch die Maus *Ipw*-Exons (siehe Abb. 52; Wevrick & Francke, 1997) lediglich Transkripte des *Snurf/Snrpn*-Gens sind. Da keine Intron-Sequenzen in diesem Bereich veröffentlicht sind, wurde eine Sonde konstruiert, die Exon B und Exon C überspannt (Abb. 52). Im homologen Bereich in Mensch liegen an dieser Stelle *HBII-85* snoRNAs. Obwohl die Organisation zwischen humanen und Maus-*Ipw* kaum konserviert ist, so ist nicht auszuschließen, daß die verwendete Sonde somit auch ein Element der Maus *MBII-85* snoRNAs überspannt. Nachgewiesen wurde, daß zumindestens im Intron G eine Kopie der *MBII-52* snoRNA existiert (Cavaillé *et al.*, 2000).

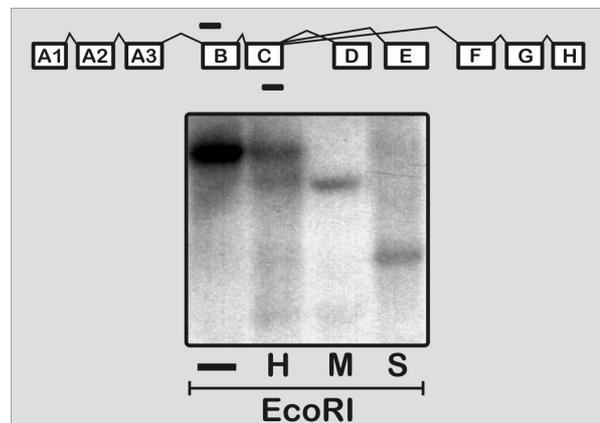


Abb. 52: Southern-Blot Analyse der *Ipw*-Region, 3' zu den translatierten *Snurf/Snrpn*-Transkripten in IB10 ES-Zellen. **Oben:** Struktur der beschriebenen *Ipw*-Exons (Wevrick & Francke, 1997; wahrscheinlich Teil des *Snurf/Snrpn*-Gens). Möglicherweise enthalten die Introns *MBII-52* und/oder *MBII-85* snoRNAs. Schwarze Balken repräsentieren die Primer für die verwendete *Ipw*-Sonde. **Unten:** Restriktionsanalyse für den Bereich zwischen Exon B und C. Ein *HpaII*-Schnittstelle scheint eine teilweise allelspezifische Methylierung aufzuweisen (~65% Gesamtmethylierung), jedoch nicht eine *SmaI*-Erkennungssequenz, deren CpG-Dinukleotid offenbar überwiegend unmethyliert vorliegt (~5% Gesamtmethylierung).

Aus Abbildung 52 geht hervor, daß die Region zwischen Exon B und C uneinheitlich methylierte CpGs enthält. Während das *HpaII*-CpG Dinukleotid mit 65% methyliert ist, wird die *SmaI*-Erkennungssequenz nahezu komplett gespalten und erweist sich damit als nahezu unmethyliert (~5%). Diese Verteilung läßt darauf schließen, daß auch dieser Sequenzbereich keinem strikten Methylierungs-"Imprint" unterliegt.

4.2.4.2 Analyse der *Ndn*-Region

Das *Ndn*-Gen ist das zum "Imprinting"-Center am nächsten gelegene Gen, welches auch einem gametischen "Imprint" unterliegt. Es befindet sich etwa 1 MBp telomerisch zum IC und besitzt im Promotorbereich ein ausgedehntes "CpG-Island". Wie auch das humane *NDN* besteht das Maus Homolog aus einem Exon:

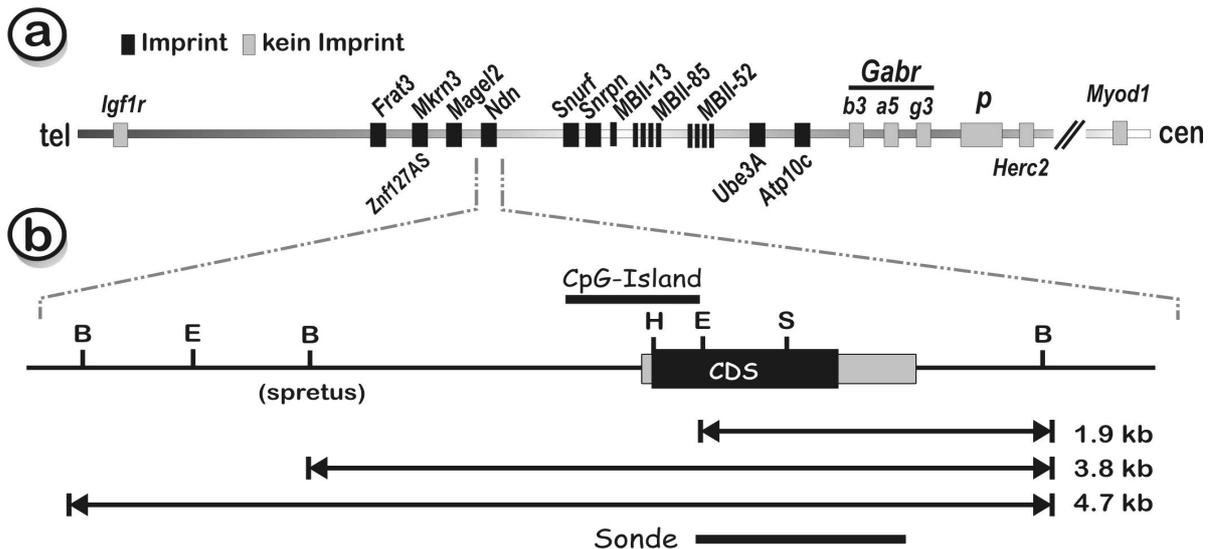


Abb. 53: Übersicht über die gametisch geprägte Region auf Mauschromosom 7C. **a:** Das *Ndn*-Gen liegt etwa 1 MBp telomerisch zum "Imprinting"-Center. **b:** Detailansicht der Region um *Ndn*. Die Sequenz 5' zu *Ndn* enthält eine polymorphe *Bgl*III-Erkennungssequenz, an der die parentale Abstammung eines Allels zu identifizieren ist. CDS = Für NECDIN kodierende Sequenz (*coding sequence*). H = *Hpa*II; E = *Eag*I/*Eco*52I; S = *Sac*II.

Bisherige Veröffentlichungen zum Maus *Ndn*-Gen weisen darauf hin, daß die Methylierung des Gens vorwiegend durch die Gameten bestimmt wird (Hanel & Wevrick, 2001). So wurde ein 35%ige Teilmethylierung in Oozyten und ein Fehlen jeglicher Methylierung in Spermien beschrieben. Letzteres ließ sich auch in Kontrollexperimenten mit Testis-DNA aus 129er Mäusen bestätigen (siehe Abbildung 54A-D und Tabelle 9). Nur eine geringe Restmethylierung (7%) wurde beobachtet, die möglicherweise durch somatische Zellen in der Testis-Präparation verursacht wird.

Die Untersuchung von Gehirngewebe ergab für die drei untersuchten methylierungssensitiven Restriktionsschnittstellen eine durchschnittliche monoallelische Methylierung von 48%, die auf das maternale Allel beschränkt ist. Somit scheinen die untersuchten Kontroll-Gehirne (Mausstämme 129 und C57BL/6xDBA/2F₁) ein vollständiges "Imprint" zu besitzen. Diese Daten stehen teilweise im Gegensatz zu den bisher bekannten Daten, die nur eine stark variable und partiell biallelische Methylierung (15% für das paternale- und 22% für das maternale Allel) in Maus-Gehirn aufzeigen (Hanel & Wevrick, 2001).

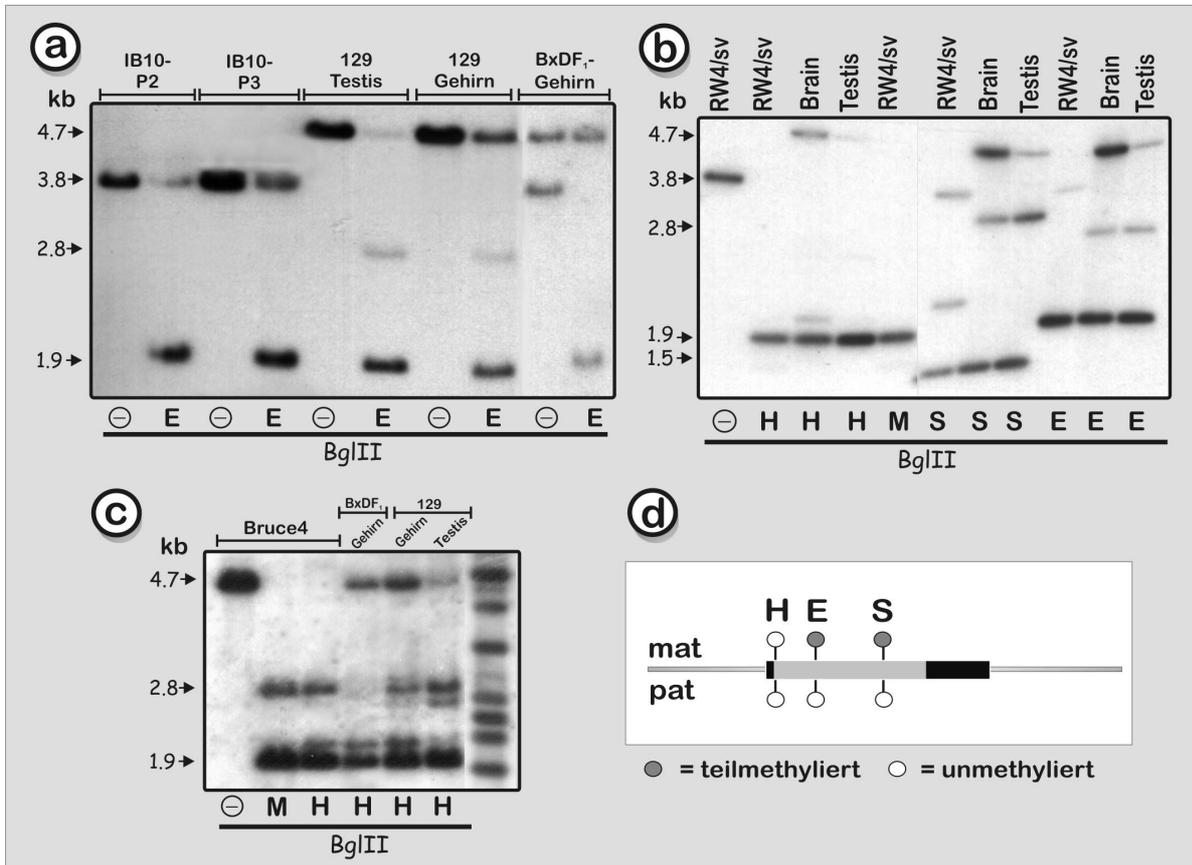


Abb. 54: Analyse des Methylierungsmusters des Maus *Ndn*-Gens. **a:** Untersuchung eines CpG-Dinukleotids innerhalb der *EagI*-Erkennungssequenz in Zelllinie IB10 und Kontroll-DNA. Offenbar besitzt die *EagI*-Sequenz ein Methylierungs-"Imprint". Das paternale Allel ist unmethyliert, das maternale Allel, wenn auch nicht vollständig, vorwiegend methyliert. Es zeigte sich, daß das "Imprint" in Gehirn vollständig ausgeprägt wird. **b:** Southern-Experiment zur Methylierung in RW4-Zellen. Offenbar scheinen die einzelnen CpG-Dinukleotide heterogen methyliert zu sein. Mit einer durchschnittlichen Methylierung von ~15% in den RW4 Zellen ist ein deutliches "Imprint" nicht zu erkennen. **c:** Das untersuchte CpG-Dinukleotid in der *HpaII*-Erkennungssequenz ist in Bruce4-Zellen vollständig demethyliert. Ein Methylierungs-"Imprint" scheint nicht vorhanden zu sein.

Für die untersuchten embryonalen Stammzellen ergibt sich ein anderes Bild. Offenbar scheinen verschiedene CpG-Dinukleotide unterschiedlich stark methyliert zu werden. Für diese Arbeit wurden insgesamt drei unterschiedliche CpGs durch Restriktionsanalyse untersucht. Es zeigte sich, daß in allen drei ES-Zelllinien das *HpaII*-CpG immer vollständig unmethyliert vorlag, während das *SacII*-CpG und das *EagI*-CpG jeweils eine Teilmethylierung aufwiesen. Dies bestätigt vorherige Kenntnisse über diese Region. Offenbar existieren außer im adulten Gehirngewebe keine größeren Bereiche, die einheitlich methyliert werden.

Da in adulten Gehirngewebe ein Methylierungs-"Imprint" für alle drei CpGs nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, daß das "Imprint" erst nach dem Blastocystenstadium initiiert wird. Bisulfitanalysen der 2-Zell-, 4-Zell-, Morula- (8-Zell) und Blastocystenstadium, (Hanel & Wevrick, 2001) zeigten, daß im frühen Embryo die

Methylierung ansteigt, jedoch im Blastocystenstadium die *Ndn*-Region bereits wieder partiell demethyliert vorliegt. Da zu diesem Zeitpunkt üblicherweise ES-Zellen aus den Blastocysten gewonnen werden, ist die beobachtete durchschnittliche Hypomethylierung (11%) in IB10-, RW4- und Bruce4-ES-Zellen zu erklären (siehe Tab. 9).

	IB10	RW4	Bruce 4	Σ(ES)	Gehirn	Testis
HpaII	0% [∇]	<5%	<5%	~0-3%	48%	2%
SacII	-	24%	-	24%	44%	10%
EagI	33%	7%	15% [‡]	18%	51%	9%
Σ Mittel	16.5%	15.5%	0%	11%	48%	7%

Tab. 9: Durchschnittliche Verteilung der CpG Methylierung an verschiedenen CpG-Dinukleotiden des *Ndn* Gens.[∇] siehe Abb. 60 (STS-Abhängigkeit). [‡]siehe Abb.65 (Versuch zur klonalen Stabilität).

Da aus den beschriebenen ES-Zelllinien bereits erfolgreich gesunde Mäuse entwickelt wurden, scheint das Methylierungs-"Imprint" der ES-Zellen noch variabel zu sein. Anhand der *EagI*-Erkennungssequenz wird deutlich, daß die Methylierung verschiedener Zelllinien schwanken kann. Während das maternale Allel in RW4 ES-Zellen nahezu vollständig demethyliert wurde und damit sein Methylierungs-"Imprint" verlor, besitzt das maternale Allel in IB10-Zellen mit 33% eine signifikante CpG-Methylierung. Diese Heterogenität könnte durch den Zeitpunkt der ES-Zell Generierung bedingt sein. Ursprünglich wurde das "Imprint" von *Ndn* über die hier beschriebene *EagI*-Stelle in Gehirngewebe charakterisiert (Watrin *et al.*, 1997).

Die Daten dieser Arbeit zeigen jedoch, daß die Analyse eines einzelnen CpG-Dinukleotids zu irreführenden Ergebnissen zum "Imprinting"-Status eines Gens führen kann. Ohne die Daten zu der zur *EagI*-Stelle am nächsten gelegenen *HpaII*-Sequenz könnte man annehmen, daß das "Imprint" in ES-Zellen vollständig ist. Hingegen scheint die *Ndn*-Region in ES-Zellen für die meisten CpG-Dinukleotide hypomethyliert und daher kaum gametisch geprägt zu sein.

Die Tatsache, daß im frühen Embryo die Methylierung im Abstand zum IC abnimmt, könnte darauf hindeuten, daß das "Imprint" erst während der Entwicklung zum fertigen Embryo vom DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens in den Bereich um *Ndn* hinein wandert (siehe auch Daten zu den anderen Genen und Diskussion).

4.2.4.3 Analyse der Magel2-Region

Magel2 gehört wie *Ndn* zu der Familie der MAGE-Gene. Beide Gene zeigen eine hohe Sequenzhomologie (>50%); so ist das *Magel2*-Gen auch als *Ndn11* (*neccdin-like1*) bekannt. Aufgrund der engen Nachbarschaft zu *Ndn* herrschte über längere Zeit Unklarheit über die relative Position beider Gene zueinander. Neuere Daten deuten darauf hin, daß das *Magel2*-Gen sich innerhalb 100 kBp telomerisch zu *Ndn* befindet (Chai *et al.*, 2001; siehe Abb. 55):

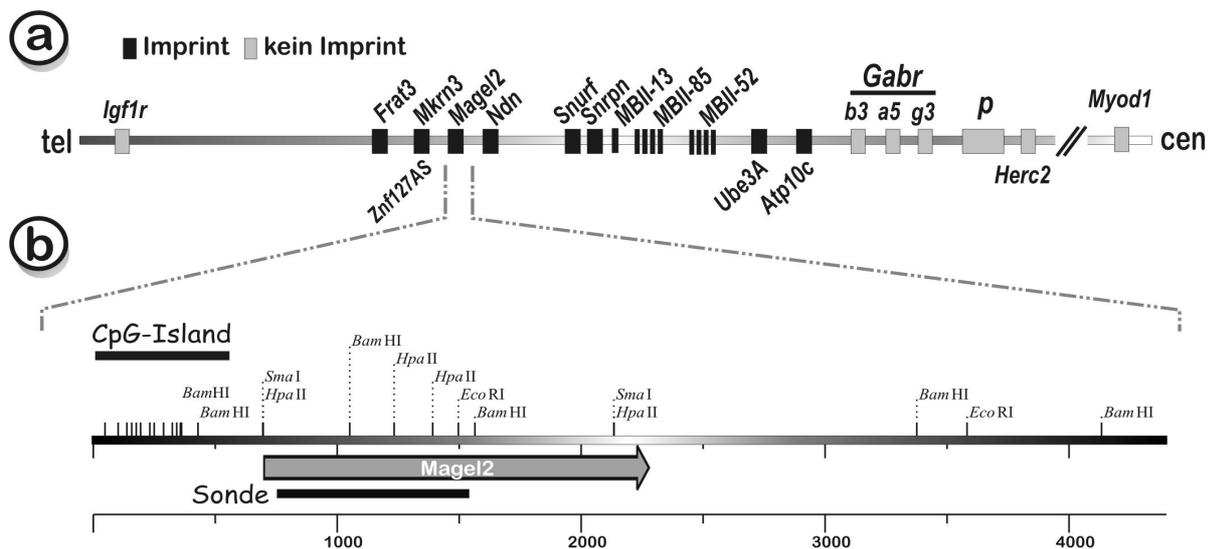


Abb. 55: Übersicht über die gametisch geprägte Region um *Magel2*. **a:** *Magel2* liegt nahe telomerisch zu *Ndn*. **b:** Detailansicht des *Magel2*-Gens und Restriktionskarte des Sequenzbereiches. Der Promotorbereich enthält eine dichte CpG-reiche Region (*CpG-Island*). Einzelne CpG-Dinukleotide sind durch vertikale Striche gekennzeichnet.

Magel2 zeigt sich ausschließlich im Maus-Gehirn als gametisch geprägt, lediglich das paternale Allel wird exprimiert (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Interessanterweise existieren bis heute noch keine veröffentlichten Methylierungsdaten. Die hier vorgestellten Methylierungsmuster sind damit die ersten, die für das *Magel2*-Gen beschrieben werden. Die Untersuchung mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen erwies sich jedoch als ungewöhnlich schwierig, möglicherweise durch die hohe Homologie des Gens zu einer Vielzahl eng verwandter MAGE-Gene im Maus-Genom und eines hoch repetitiven Sequenz innerhalb des Genbereiches (Boccaccio *et al.*, 1999). Die Untersuchung der DNA aus Geweben der Kontrolltiere ergab ein typisches Methylierungs-"Imprint" für die gametisch geprägte Region um *Snurf/Snrpn* (siehe Abb. 56). In Gehirn aus Hybriden Mäusen (C57BL/6xDBA/2)_{F1} konnte eine nahezu 50%ige Methylierung des *Magel2*-Gens identifiziert werden. Eine eindeutige Zuordnung mangels polymorpher Nukleotide konnte nicht erfolgen, jedoch ist davon auszugehen, daß das paternal exprimierte Allel das unmethylierte darstellt,

insbesondere DNA aus Maus-Testis hypomethyliert (siehe Abb. 56 und Tab. 10) und transkriptionell aktiv ist ().

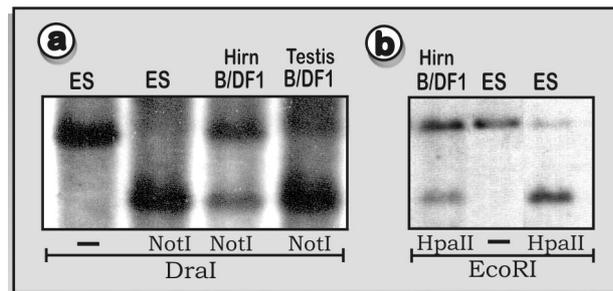


Abb. 56: Analyse des Methylierungsrate des *Mage2*-Gens in ES-Zellen. **a:** Genomische DNA aus Bruce4 ES-Zellen. *NotI* spaltet die *Mage2*-Sequenz vollständig. **b:** DNA aus IB10 ES-Zellen. Die nahezu vollständige Spaltung durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym *HpaII* deutet auf eine Hypomethylierung des *Mage2*-Gens in ES-Zellen hin. B/DF1 = (C57BL/6xDBA/2)_{F1}

Ähnlich der Ergebnisse zu *Ndn* konnte keine signifikante Methylierung für *Mage2* in ES-Zellen nachgewiesen werden. In Bruce4-Zellen zeigte sich die untersuchte *NotI*-Erkennungssequenz als vollständig unmethyliert, und auch in IB10 ES-Zellen war nur eine schwache Bande für nicht gespaltete DNA zu erkennen.

	ES	Testis	Gehirn
IB10	15%	-	65%
Bruce4	0%	7%	53%
Σ Mittel	7.5%	7%	59%

Tab. 10: Durchschnittliche Verteilung der CpG Methylierung an verschiedenen CpG-Dinukleotiden des *Mage2*-Gens.

4.2.4.4 Analyse der *MKRN3/Zfp127AS*-Region

Das *Mkrn3*-Gen (früher *Zfp127*) liegt telomerisch von *Mage2* und codiert für ein Zinkfinger-Protein. Wie auch die umliegenden Gene scheint es vor mehr als achtzig Millionen Jahren durch Retrotransposition in diesen Locus integriert worden zu sein (Jong *et al*, 1999^a). Auch das Maus-Gen besitzt, wie sein Homolog beim Menschen, ein Antisense-Transkript, dessen distale und proximale Enden jedoch nicht bekannt sind.

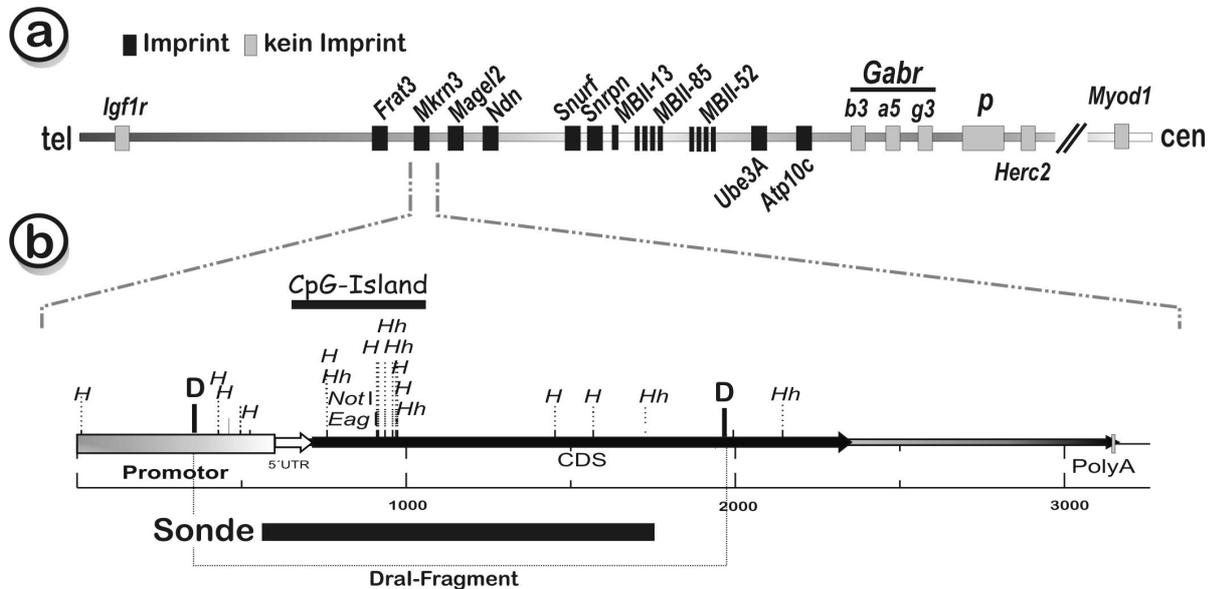


Abb. 57: Übersicht über die untersuchte Region um *Mkrn3*. **a:** *Mkrn3* liegt nahe des telomeren Endes der gametisch geprägten Region auf Mausechromosom 7C. **b:** Restriktionskarte des *Mkrn3*-Gens. H = *HpaII*; Hh = *HhaI*; N = *NotI*; D = *DraI*; CDS = für MKRN3 kodierende Sequenz (coding sequence).

Mkrn3 wird ausschließlich vom paternalen Allel in Gehirn, Herz und Nieren exprimiert (Jong *et al.*, 1999^a). Es wurde auch von einer Expression des Gens in embryonalen Stammzellen berichtet (A.H. Carey & C.L. Stewart, nicht publiziert). Methylierungsdaten für das *Mkrn3*-Gen liegen nur für zwei CpG-Dinukleotide vor, und zwar für eine *BsshIII*- und eine *HhaI*-Erkennungssequenz; (Hershko *et al.*, 1999). Beide CpGs zeigten eine allelspezifische Methylierung in Gehirn 13,5 Tage alter Embryos mit der Methylierung auf dem maternalen Allel. Interessanterweise wurden die CpGs in Maus-Oocyten als unmethyliert beschrieben. Träfe dies zu, müsste das Methylierungs-"Imprint" sofort nach der Befruchtung etabliert werden und durch Erhaltungsmethylierung unverändert weitergegeben werden. Hershko *et al.* berichteten von einer durchgehenden maternalen Methylierung ab dem frühen (7 Stunden post-Fertilisation Stadium) bis ins Blastocystenstadium. Aufgrund dieser Resultate könnte auch in den untersuchten ES-Zellen eine maternal-spezifische Methylierung zu beobachten sein.

Aus Abbildung 58 geht jedoch hervor, daß dies nicht der Fall ist. Beide 129er Zelllinien (IB10 und RW4) zeigen nur eine minimale Methylierung des *Mkrn3*-Gens (<3%). Obwohl in den Bruce4 Zellen eine signifikante Methylierung zu beobachten ist (~24%), liegt dieser Wert noch deutlich unter denen für das gametische "Imprint" in Gehirn. Im Gegensatz zu vielen anderen Genen, die in Testis als unmethyliert gelten, wurde für das *Mkrn3*-Gen auch eine partielle Methylierung (~11%) in Testis nachgewiesen.

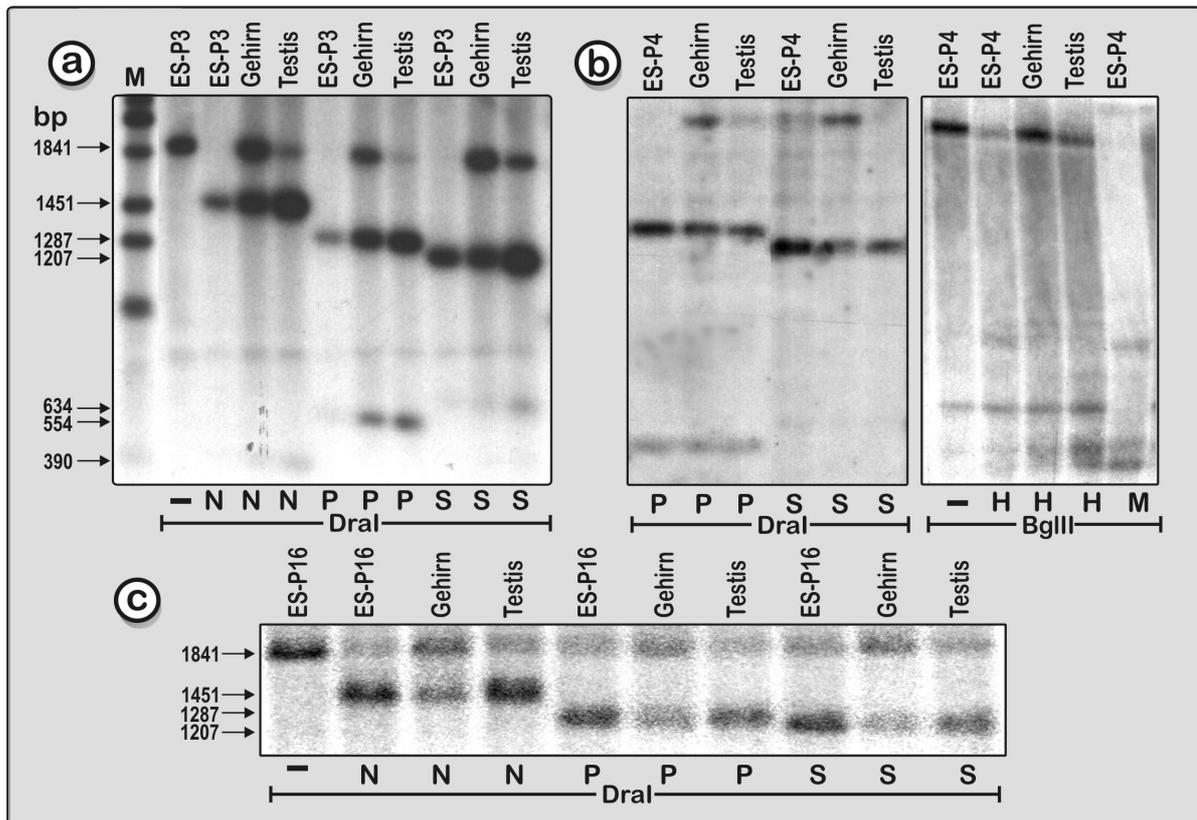


Abb. 58: Methylierungsanalyse des *Mkrn3*-Gens in ES-Zellen. **a:** Restriktionsanalyse genomischer DNA der IB10-Zelllinie. Alle drei untersuchten CpG-Dinukleotide weisen keinerlei Methylierung auf, während das "Imprint" in Gehirn voll ausgeprägt ist. **b:** Die CpGs in RW4-Zellen weisen eine deutliche Hypomethylierung auf (0-10%). **c:** Das *Mkrn3*-Gen erwies sich in Bruce4-Zellen als am höchsten methyliert (>20%). Aufgrund fehlender polymorpher Nukleotide war eine eindeutige Identifizierung des jeweiligen Allels nicht möglich, jedoch kann davon ausgegangen werden, daß die beobachtete Teilmethylierung vorwiegend auf dem maternalen Allel lokalisiert ist. N = *NotI*; M = *MspI*; H = *HpaII*; P = *PaulI*; S = *SmaI*.

Im Gegensatz zu den ermittelten Werten für das *Ndn*-Gen erwies sich die Methylierung verschiedener CpGs innerhalb von *Mkrn3* als homogen. So zeigt Abb. 65A, daß alle drei untersuchten CpG-Dinukleotide in der IB10-Zelllinie gleichermaßen unmethyliert vorlagen. Eine ähnlich homogene Verteilung findet sich auch für die beiden anderen ES-Zelllinien (siehe Abb. 58B und 58C). Die Gesamtmethylierung des *Mkrn3*-Gens belief sich in den analysierten ES-Zellen auf 9% und lag damit deutlich unter dem erwarteten Wert für gametisch geprägte Gene.

	ES	Testis	Gehirn
RW4	3	6	50
IB10	0	7	44
Bruce4	24	22	51
Σ Mittel	9	11	48

Tab. 11: Durchschnittliche Verteilung der CpG-Methylierung an verschiedenen CpG-Dinukleotiden des *Mkrn3*-Gens.

Anmerkung:

Daten zum Methylierungsgrad der centromerisch zum "Imprinting"-Center gelegenen, maternal exprimierten Gene liegen nicht vor. Für *Ube3a* sind nur die extrem CpG-reichen Exon-Sequenzen publiziert (diese sind mit Restriktionsenzymen nicht zu analysieren), und für das Maus *Atp10c*-Gen sind keinerlei Sequenzdaten in Datenbanken gespeichert, so daß keine geeigneten Sonden generiert werden konnten. Telomerisch zu *Mkrn3* befindet sich zudem das kürzlich entdeckte Gen *Frat3* (Chai *et al.*, 2001). Vorläufige Ergebnisse zum Methylierungsstatus durch Southern-Experimente deuten auf eine ähnliche Hypomethylierung in ES-Zellen hin, wie sie für die nah gelegenen *Ndn*, *Magel2* und *Mkrn3*-Gene identifiziert wurden. Da diese Daten jedoch noch verifiziert werden müssen, wird auf eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

4.2.4.5 Analyse der GABA_A-Rezeptor-Region centromerisch zum IC

Wie weit erstreckt sich die gametisch geprägte Region auf Maus-Chromosom 7C? Im menschlichen Genom liegt wie auch in der homologen Region in Maus 3' zu *Atp10c/ATP10C* ein Cluster von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (siehe Übersichtskarte Abb. 61). Häufig fanden sich diese Gene in Angelman-Patienten deletiert, jedoch nicht in Patienten mit Prader-Willi Syndrom (Wagstaff *et al.*, 1991). Lange wurde spekuliert, ob diese Gene auch einer gametischen Prägung unterliegen oder nicht. Bis *dato* waren jedoch keine definitiven Ergebnisse bzw. widersprüchliche Daten bekannt. Knoll *et al.* (1994) beschrieben, daß die Rezeptor-Untereinheiten allelspezifisch repliziert werden. Zudem wurde gezeigt, daß diese Gene offenbar nur vom paternalen Allel in Mensch exprimiert werden (Meguro *et al.*, 1997). Knockout-Experimente am Mausmodell konnten jedoch kein offensichtliches "Imprint" erkennen (Scapoli *et al.*, 2002; Delorey *et al.*, nicht publiziert). Das der gametisch geprägten Region am nächsten gelegene Gen ist *Gabrb3/GABRB3*, welches deshalb in dieser Arbeit auf seinen Methylierungsstatus untersucht wurde (siehe Abb. 59).

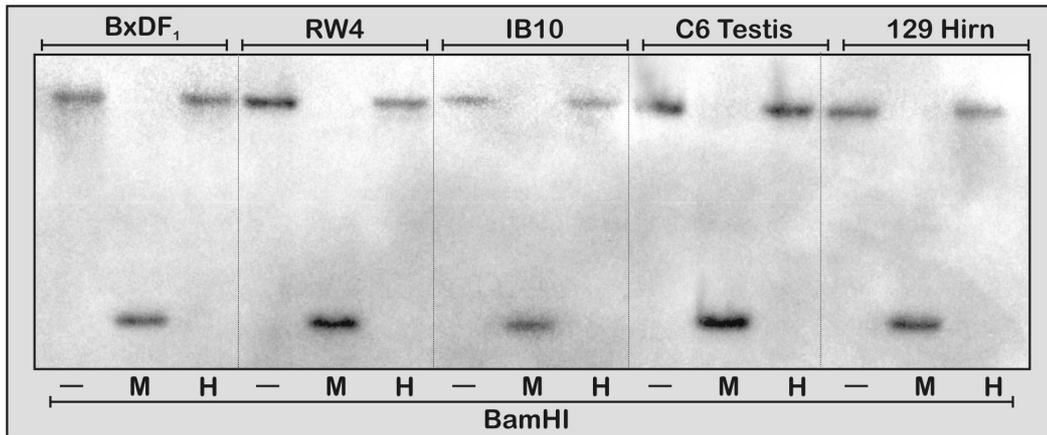


Abb. 59: Analyse der Methylierungsrate des *Gabrb3*-Gens in Maus. Sowohl in Gehirn von 129er-Mäusen als auch in Hybridmäusen (C57BL/6xDBA/2)_{F1} wurde das Gen mit dem *HpaII*-Restriktionsenzym nicht gespalten, was auf eine vollständige Methylierung beider Allele hindeutet. Ein gleiches Bild bietet sich auch für Maus-Testis und für die untersuchten Maus ES-Zelllinien (RW4 und IB10). Die Hypermethylierung der *HpaII*-CpGs des *Gabrb3*-Locus deutet darauf hin, daß ein Methylierungs-"Imprint" innerhalb des *Gabrb3*-Gens möglicherweise nicht existiert.

Es zeigte sich, daß die *HpaII*-CpGs innerhalb des Exons 1 des *Gabrb3*-Gens in allen untersuchten Geweben vollständig methyliert vorlagen. Schon in Maus-Testis erwies sich das paternale Allel als hypomethyliert. Dieses Methylierungsmuster scheint in den ES-Zellen erhalten zu werden, da auch diese eine vollständige Methylierung des *Gabrb3*-Gens aufweisen. Diese Daten stehen im Einklang mit Daten von Nicholls *et al.*, (1993), die keine allelspezifische Expressierung und somit kein "Imprint" in Gehirn von Mäusen feststellen konnten. Da jedoch keine Methylierungsdaten zum Promotor existieren, ist eine theoretische allespezifische Regulierung des *Gabrb3*-Gens nicht vollständig auszuschließen.

4.2.4.6 Dynamik der gametischen Prägung in ES-Zellen während Staurosporin-induzierter neuronaler Entwicklung

Eine essentielle Frage zur gametischen Prägung der *Snurf/Snrpn*-Region ist, wie das "Imprint" in dieser chromosomalen Region etabliert und über das Blastocystenstadium hinaus in ES-Zellen erhalten wird. Im Gegensatz zu nicht gametisch geprägten Genen besitzen geprägte Gene bereits während der Einnistung des Embryos in den Uterus (im frühen Blastocystenstadium) eine signifikante Methylierung (Übersicht in Dean *et al.*, 1998). Dem DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens kommt dabei eine besondere Rolle zu, denn DMRs gelten als resistent gegen eine in der frühen Zygote stattfindende Demethylierung des Genoms (Übersicht in Reik & Walter, 2001). Vieles deutet darauf hin, daß der DMR1 in der Oocyte methyliert (geprägt) wird und diese Prägung bis über das Blastocystenstadium beibehalten wird. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, ob und

wie sich die einmal etablierten Methylierungsmuster genau weiterentwickeln. Viele Daten, so auch die dieser Arbeit deuten darauf hin, daß das die DNA-Methylierung auf Mauschromosom 7C während der embryonalen Entwicklung vom DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens in die umliegenden Bereiche wandert. Demnach könnte während der Embryogenese der DMR1 durch eine Erhaltungsmethylierung unverändert bleiben, während andere gametisch geprägten Gene erst ein "Imprint" aufbauen müssen. Es ist jedoch auch nicht ausgeschlossen, daß dieser Prozess *in vitro* mangels geeigneter Signalwege nicht eingeleitet wird. Um genauere Einsichten in diesen Mechanismus zu bekommen, wurden drei ES-Zelllinien einer durch Staurosporin induzierten *in vitro* Neurogenese unterworfen (siehe auch Abschnitt 4.1, Schumacher *et al.*, 2002). Eine neuronale Entwicklung wurde deshalb gewählt, weil alle bekannten Gene der gametisch geprägten Region um *Snurf/Snrpn* vorwiegend gehirnspezifisch geprägt und exprimiert werden (Übersicht in Schumacher, 2001). Nach etwa 14 Tagen, als ein Teil der ES-Zellen bereits neuronale Morphologien angenommen hatten, wurde die genomische DNA extrahiert und auf ihren Methylierungsgrad hin untersucht (siehe Abb. 60/61).

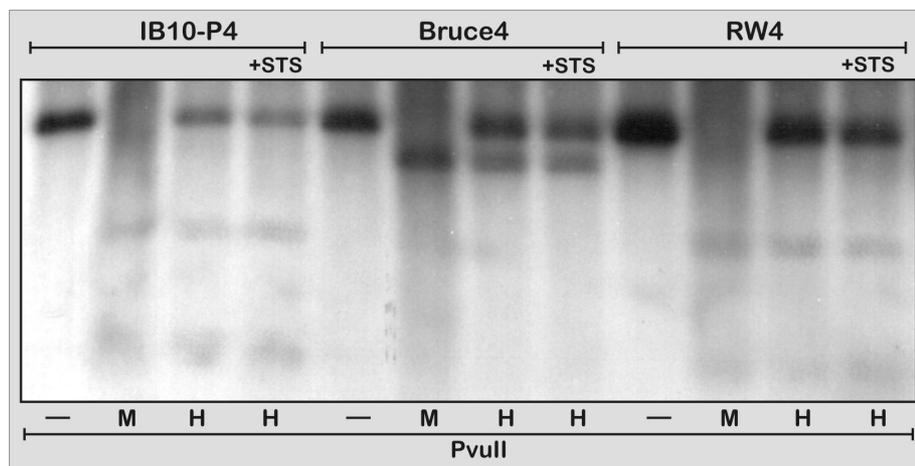


Abb. 60: Southern-Blot Analyse der gametischen Prägung des DMR1.

Die nahezu unveränderte Verteilung der Banden nach STS-Behandlung (+STS) zeigt deutlich, daß auch nach eingeleiteter Neurogenese keine signifikante Änderung im Methylierungsgrad erfolgte. H = *HpaII*; M = *MspI*.

Wie aus Abb. 60 zu ersehen ist, änderte sich die Methylierung des DMR1 während der Neurogenese nicht. Es ergaben sich lediglich minimale Veränderungen, die aufgrund der Methodik als nicht signifikant anzusehen sind (siehe Tab. 12). Ein ähnliches Bild ergab sich für *Ndn* (siehe Abb. 61). Für dieses Gen wurden mehrere CpG-Dinukleotide untersucht. Wie schon erwähnt, verliert *Ndn* in der frühen Embryogenese einen Teil seiner Methylierung (Hanel & Wevrick, 2001). Diese Hypomethylierung wird anschließend in den ES-Zellen beibehalten (siehe Abschnitt 4.2.4.2). Da im adulten

Gehirngewebe ein vollständiger "Imprint" nachgewiesen wurde, muss eine partielle *de novo* Methylierung des maternalen Allels nach dem Blastocystenstadium erfolgen. Wann diese Methylierung erfolgt ist unklar, jedoch zeigen die hier erzielten Ergebnisse, daß zumindestens in ES-Zellen die *de novo* Methylierung noch nicht bei einsetzender Neurogenese aktiviert ist.

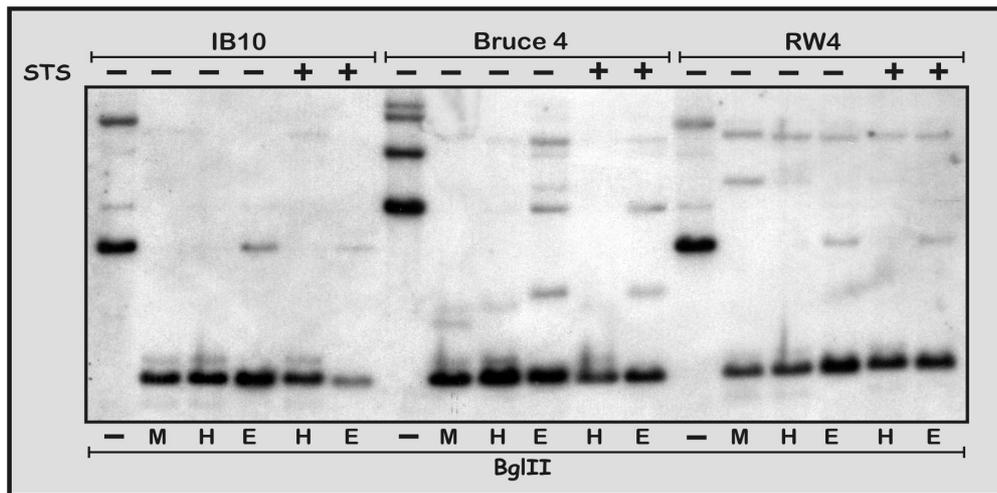


Abb. 61: Southern-Blot Analyse der gametischen Prägung des *Ndn*-Gens. Die nahezu unveränderte Verteilung der Banden nach STS-Behandlung (+STS) zeigt deutlich, daß auch nach eingeleiteter Neurogenese keine signifikante Änderung im Methylierungsgrad des *Ndn*-Gens erfolgte. H = *HpaII*; M = *MspI*; E = *EagI*.

Diese Daten und die Tatsache, daß für manche gametisch geprägten Gene (z.B. *Magel2*) in embryonalen Gehirngewebe kein Methylierungs-"Imprint" nachgewiesen wurde, deutet darauf hin, daß das fertige "Imprint" erst in späten Phasen der Gehirnentwicklung ausgeprägt wird oder nicht nur einer Regulierung durch Methylierung unterliegt.

Locus (CpG)	Stamm	- STS [%]	+ STS [%]	Veränderung [% relativ]	
DMR1 (HpaII)	IB10	50	46.5	-7	
	RW4	55	53	-4	
	Bruce4	65	62.5	-4	
NDN	IB10	H	0	0	
		E	17	11	-6
	RW4	H	<5%	<5%	0
		E	8	8	0
	Bruce4	H	<5%	<5%	0
		E	10	12	+2

Tab.12: Veränderung des Methylierungsgrades zweier Loci in der gametisch geprägten Region auf Mausechromosom 7C nach *in vitro* Neurogenese. H = *HpaII*; E = *EagI*

Da das CpG der *HpaII*-Erkennungssequenz in allen drei untersuchten ES-Zelllinien nahezu vollständig demethyliert vorliegt, könnte man anhand dieser Sequenz am ehesten eine *de novo* Methylierung nachweisen. Wie jedoch auch für die anderen CpGs des *Ndn*-Gens nachzuweisen war, findet während der initialen Neurogenese keine signifikante Methylierung statt.

4.2.5 Stabilität der gametischen Prägung auf Mausechromosom 7C

Viele Arbeiten zeigen, daß das "Imprint" gametisch geprägter Gene in ES-Zellen, ES-Zell-abgeleiteten Föten und adulten Maus-Klonen durch fortschreitende Kultivierung der Zellen oder Mediumsbedingungen beeinflusst werden kann (Dean *et al.*, 1998; Khosla *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2001). Zudem zeigten Studien, daß Zellkerne aus ES-Zellen nach erfolgtem Kerntransfer epigenetisch instabil wurden (Humpherys *et al.*, 2001), wodurch der Phänotyp klonierter Tiere dramatisch verändert werden kann. Auch ein Einfluss von Transgen-induzierten Modifier-Genen auf das zelluläre Methylierungsmuster sind nicht auszuschließen (Schumacher, 1998; Schumacher *et al.*, 2000). Um weitere Aufschlüsse über die epigenetische Stabilität der ES-Zellen und der gametisch geprägten Region um *Snurf/Snrpn* in Maus zu erzielen wurden verschiedene Einflüsse auf die jeweiligen Zellen näher untersucht.

4.2.5.1 Stabilität des "Imprints" mit fortschreitenden ES-Zell Passagen

Neben den Umgebungsfaktoren (Medium, CO₂-Athmosphäre, etc.) gibt es eine Reihe von Stressfaktoren, die auch bis nach einem Transfer eines manipulierten Embryos/ES-Zellen in einen Wirt die weitere Entwicklung hemmen können (Walker *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1998; Sinclair *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 2001).

Ein bekannter Stressfaktor ist die fortschreitende Kultivierung von Zellkulturen über viele Passagen hinweg. Häufig degenerieren Teile des Genoms, telomere Enden einzelner Chromosomen verkürzen sich, oder manche Zelllinien werden insgesamt apoptotisch. Um zu überprüfen, ob eine andauernde Passagierung der ES-Zellen zu einer epigenetischen Instabilität der *Snurf/Snrpn*-Region führt, wurden die 129er ES-Zelllinien IB10 und RW4 über mehrere Monate unter Standardbedingungen (siehe Material und Methoden) kultiviert. Während dieses Zeitraums wurden die ES-Zellen alle 48 Stunden trypsinisiert und passagiert:

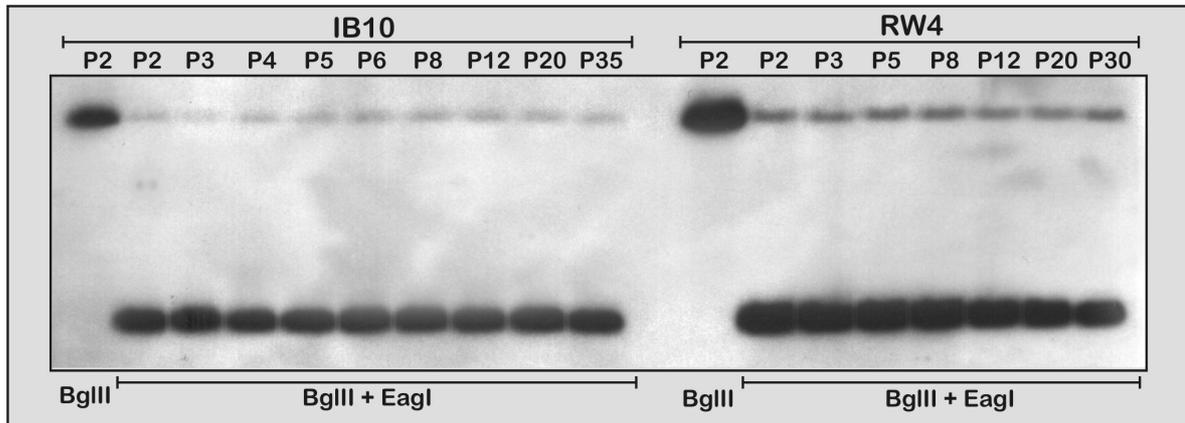


Abb. 62: Methylierung des *Ndn*-Gens in ES-Zellen mit fortschreitender Passagierung. Das Methylierungsmuster verbleibt über den gesamten Zeitraum konstant.

Abbildung 62 zeigt exemplarisch den Verlauf der *Ndn*-Methylierung während der fortschreitenden Kultivierung. Es wird deutlich, daß in beiden ES-Zelllinien auch nach über 30 Passagen ein stabiles Methylierungsmuster zu beobachten ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für C57BL/6 ES-Zelllinien erzielt (siehe folgender Abschnitt). Diese Daten zeigen, daß auch gametisch geprägte Bereiche durchaus über längere Kultivierungsperioden epigenetisch stabil erhalten werden können. Allerdings ist anzumerken, daß die hier beschriebenen ES-Zellen während der Kultivierung nicht eingefroren wurden. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Zellkulturen stellt sicherlich ein wesentlich erhöhten Druck auf die epigenetische Integrität dar als eine ununterbrochene Kultivierung.

4.2.5.2 "Imprint"-Stabilität in SV40- und Adeno-transfizierten ES-Zelllinien

Die Integration fremder DNA in ein etabliertes Wirts-Genom kann zu Änderungen der Methylierung sowohl, der inserierten DNA als auch in den Wirts-Sequenzen führen und damit die zelluläre Transkription stören (Hertz *et al.*, 1999; Schumacher, 1998; Schumacher *et al.*, 2000; Übersicht in Doerfler *et al.*, 2002). Da die gametisch geprägten Bereiche im Genom als besonders anfällig gelten wurden daher transgene ES-Zelllinien auf ihre epigenetische Stabilität hin analysiert (siehe Abb. 63).

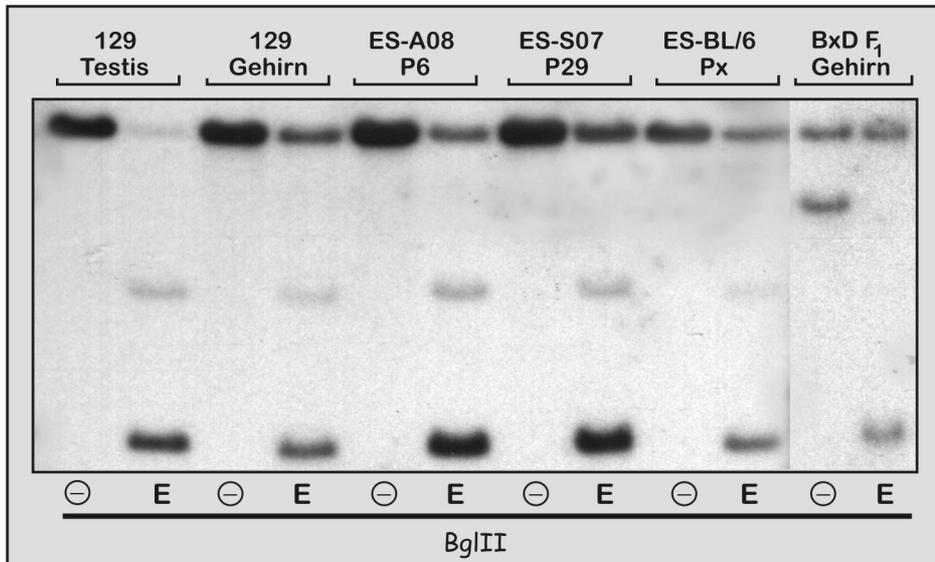


Abb. 63: Analyse des Methylierungsmusters des gametisch geprägten *Ndn*-Gens in transgenen ES-Zelllinien. Die Integration der Transgene scheint keinen Einfluss auf das Methylierungs-"Imprint" der ES-Zelllinien zu haben. P = Passage, E = *EagI*. Die Zelllinien haben einen C57BL/6 genetischen Hintergrund. Zelllinie BL/6 enthält kein Transgen und dient als Kontrolle (Px = Passagenzahl unbekannt).

Als Modellsystem fanden drei C57BL/6 ES-Zelllinien Verwendung, von denen zwei durch homologe Rekombination eine Kopie der B-Lymphozyten-Kinase erhielten (Hertz *et al.*, 1999). Ein Plasmid enthielt den Adenovirus Typ 2 E2AL-Promotor stromaufwärts zu einem Luciferase Reporter gen (Zelllinie ES-A08); das zweite Plasmid trug den frühen SV40 Promotor (Zelllinie ES-S07). Nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *EagI* zeigte sich, daß beide transgenen Zelllinien sich nicht signifikant von der nicht-transgenen Kontrolle unterschieden. Der Vergleich mit der Gehirn-DNA einer hybriden (C57BL/6xDBA/2) F_1 deutet darauf hin, daß jeweils das maternale Allel hypermethyliert vorlag, während das paternale Allel nicht methyliert war. Offenbar hatte die Integration der Transgene keinen Einfluss auf die gametisch geprägte Region um *Snurf/Snrpn*.

4.2.5.3 Methylierung der gametisch geprägten Region in Tumorgewebe

Mehrere Studien zeigten, daß die epigenetische Stabilität gametisch geprägter Gene besonders häufig in Tumoren beeinträchtigt wird (Hashimoto *et al.*, 1995). In der Regel verlieren diese Gene (so z.B. *Igf2* und der Tumorsuppressor *H19*) ihre monoallelische Prägung (*loss of imprinting*, LOI). Der Verlust des "Imprints" geschieht häufig durch eine Hypermethylierung der CpG-reichen Promotorregion des betroffenen Gens. Offenbar sind bestimmte Gene, so neben einigen gametisch geprägten Genen auch Tumorsuppressor Gene, wie *BRCA1*, *E-cadherin* u.a. hoch sensitiv für eine epigenetische Inaktivierung (Übersicht in Baylin & Herman, 2000). Interessanterweise wurde auch in

Prader-Willi Patienten eine überdurchschnittlich hohe Rate an Tumoren diagnostiziert (Cassidy *et al.*, 1999). Ob diese Tumoren aufgrund epigenetischer Faktoren entstehen, ist völlig unbekannt.

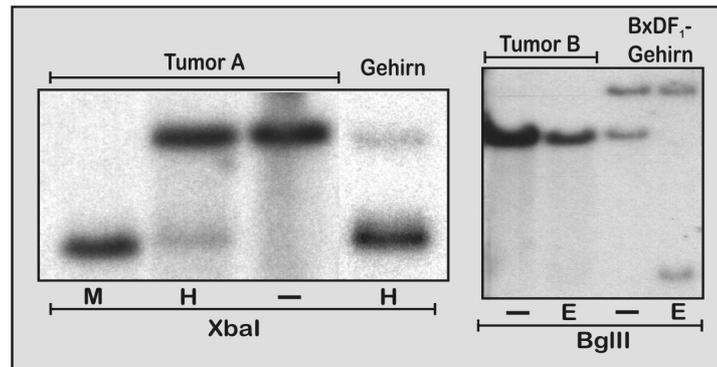


Abb. 64: Southern-Blot Analyse des Methylierungsmusters des Wachstumssuppressors *Ndn* in Maus-Tumoren. **Links:** Tumor A ist eine nicht charakterisierte Zellwucherung, die aus dem Bereich zwischen Auge und Frontal-Cortex einer 129er Maus gewonnen wurde. **Rechts:** Tumor B stammt aus dem subkutanen Bereich des Hinterkopfes einer DBA/2-Maus. Beide Zellwucherungen weisen eine signifikante Hypermethylierung des *Ndn*-Gens auf. M = *MspI*; H = *HpaII*; E = *EagI*.

Um mögliche Ziele für eine Hypermethylierung auf Mausechromosom 7C zu identifizieren, wurden zwei Maus-Tumore auf ihre epigenetische Stabilität hin untersucht (siehe Abb. 64). Als möglicher Kandidat für eine epigenetische Instabilität könnte das *Ndn*-Gen gelten, da es im adulten Organismus an der Unterbindung des Zellwachstums postmitotischer Zellen beteiligt ist (Übersicht in Taniguchi *et al.*, 2000).

Es zeigte sich in der Tat, daß in beiden untersuchten Tumorgeweben ein LOI beobachtet werden konnte. Tumor A, der aus dem Bereich zwischen Auge und frontalem Cortex einer Maus isoliert wurde, zeigte mit über 90% Gesamtmethylierung eine zur Kontrolle deutlich erhöhte Methylierungsrate des *Ndn*-Gens. Der zweite Tumor, der aus dem subkutanen Bereich des Hinterkopfes einer DBA/2 Maus stammt, wies ein vollständig hypermethyliertes *Ndn*-Gen auf.

4.2.5.4 Klonale Stabilität der "Imprinting"-Muster in ES-Zellklonen

Die Stabilität der gametischen Prägung aller Gene eines Organismus hängt ursächlich von der Herkunft der Chromosomen ab. In klonierten Tieren finden sich daher gehäuft "Imprinting"-Fehler, vermutlich u.a. weil der gesamte Genpool aus bereits teilprogrammierten Zellen abstammt oder die Donorzellen bereits ein verändertes "Imprinting"-Muster besaßen. So zeigte sich, daß geklonte Mäuse, die vorwiegend von somatischen Zellkernen abstammen, phänotypische Anomalien und verringerte

Expressionsraten gametisch geprägter Gene aufwiesen (Rideout III. *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2002).

Ein anderes Bild bietet sich, wenn die Zellkerne aus ES-Zellen in entkernte Oocyten überführt werden. Nachkommen, die aus einem Transfer von Maus ES-Zellkernen entstanden, waren besonders anfällig für ein abnormales Wachstum (Rideout III. *et al.*, 2001; Humpherys *et al.*, 2001) und exprimierten gametische geprägter Gene in einer zum normalen "Imprint"-Muster reziproken Art und Weise. Als Ursache gelten verringerte Expressionsraten durch eine epigenetische Instabilität der "imprinted"-Gene in einzelnen ES-Zellen (Dean *et al.*, 1998; Humpherys *et al.*, 2001). Diese Instabilität wurde vorwiegend für die *Igf2/H19*-Region beobachtet, während die Expression des *Snurf/Snrpn*-Gens nur geringe Variationen aufwies.

Der Phänotyp der klonierten Tiere wird durch den alleinigen "Imprint" einer einzigen ES-Zelle bestimmt. Es ist daher notwendig, mehr über die Stabilität der "Imprinting"-Muster in einzelnen Zellklonen zu erfahren. Folglich wurden einzelne ES-Zellen aus Kulturen der Bruce4 ES-Zelllinie isoliert und diese dann zu neuen Kulturen herangezüchtet. Die zehn resultierenden ES-Zelllinien (Bruce4-K1-K10) wurden anschließend auf ihr Methylierungs-"Imprint" des *Ndn*-Gens und des DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens untersucht (siehe Abb. 65).

Es zeigte sich, daß ähnlich den Ergebnissen von Humpherys *et al.* (2001) der epigenetische Status der zehn ES-Zellklone äußerst stabil war. Beide untersuchten Loci, das *Ndn*-Gen als auch der DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens, waren im Vergleich zur ursprünglichen ES-Zellkultur nahezu identisch methyliert. Auch innerhalb der Klone fanden sich nur minimale Variationen der Gesamtmethylierung (maximal 5% Schwankung). Die analysierte gametisch geprägte Region auf Mauschromosom 7C erwies sich damit als sehr stabil.

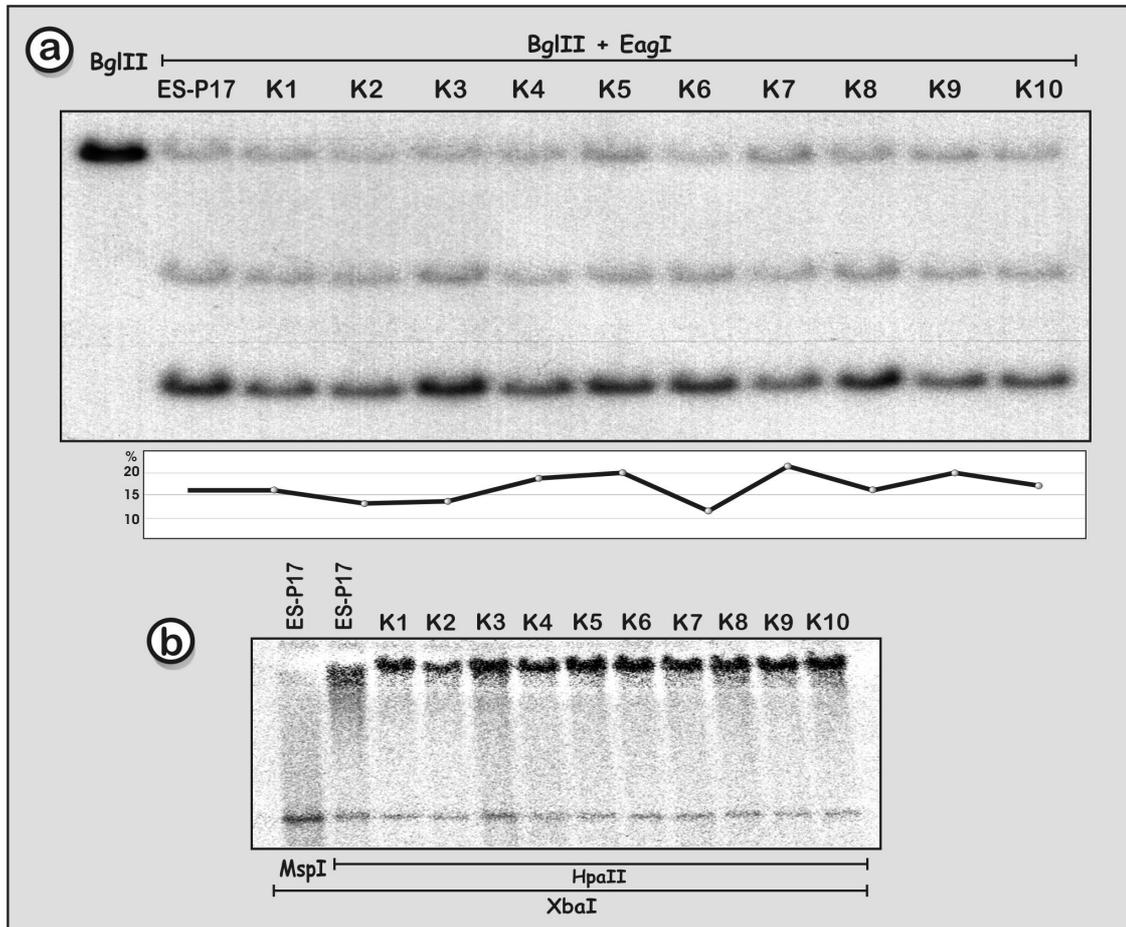


Abb. 65: Methylierung gametisch geprägter Regionen des Mauschromosoms 7C in einzelnen ES-Zellklonen. **a:** Die Methylierung des Ndn-Gens erwies sich als überaus konstant ($16\% \pm 5\%$) und erwies sich im Mittel identisch zur Ursprungszelllinie (Bruce4 ES-P17; 16% Methylierung). **b:** Alle ES-Zellklone behielten mit $65\% \pm 5\%$ Gesamtmethylierung ein leicht hypomethyliertes DMR1. K1-K10 = einzelne ES-Zellklone abgeleitet aus der primären Bruce4 Linie.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Genen scheint die chromosomale Region um *Igf2/H19* um ein vielfaches instabiler zu sein (Humpherys *et al*, 2001). Sowohl die Expression als auch die Methylierung schwankt in diesen Genen innerhalb unterschiedlicher ES-Zell Subklone dramatisch. Das unterschiedliche Verhalten beider Regionen ist umso bemerkenswerter, da beide eng benachbart auf dem gleichen Chromosomenabschnitt 7C beheimatet sind und aus großen Clustern gametisch geprägter Gene bestehen.

Weitere kritische Faktoren, die das "Imprint" in den Zellen beeinträchtigen können, sind durch die Manipulation beim Kerntransfer und durch überalterte Zelllinien gegeben, in denen epigenetische Modifikationen akkumulieren können.

4.2.6 Expression der gametisch geprägten *Snurf/Snrpn*-Transkripte in ES-Zellen und ES-Zell abgeleiteten Neuronen

Die Daten dieser Arbeit und anderer Arbeitsgruppen deuten auf eine zentrale Rolle des *Snurf/Snrpn*-Gens in der Etablierung eines "Imprints" auf Mausemchromosom 7C und in der Etiologie der Prader-Willi- und Angelman Syndrome hin. Ein wichtiges Element scheint die differentiell methylierte Region (DMR1) im 5'-Bereich des *Snurf/Snrpn*-Gens zu sein, jedoch liegen die funktionalen Mechanismen noch vollkommen im Dunkeln. Bisher ist lediglich bekannt, daß sich sowohl der DMR1 als auch der Kernpromotor innerhalb des "Imprinting"-Centers befindet. Die Regulation des *Snurf/Snrpn*-Gens ist zudem eine der kompliziertesten, die für Säugetiergene jemals beobachtet wurde. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus existieren eine Vielzahl von verschiedenen *Snurf/Snrpn*-Transkripten: Mehrere untranslatierte 5'-Transkripte, ein SNURF-kodierendes Transkript, ein für SmN kodierendes Transkript (*Snrpn*), zahlreiche (mindestens 148 !!) untranslatierte 3'-Exons und fast ebenso viele exprimierte snoRNAs (siehe auch Detailansicht zum *Snurf/Snrpn*-Gen, Abb. 49). Wie wird dieser Komplex reguliert? Daten zur Expression von *Snurf/Snrpn* in nicht-transgenen oder nicht-disomischen ES-Zellen liegen bisher noch nicht vor.

Um die Grundzüge der Expression des *Snurf/Snrpn*-Gens besser zu verstehen, wurde daher die Dynamik der Expression verschiedener Transkripte in ES-Zellen und in aus ES-Zellen abgeleiteten Neuronen analysiert (siehe Abb. 66). RT-PCR Experimente (siehe Material & Methoden) zeigten, daß das ursprünglich als Hauptprodukt identifizierte *Snrpn*-Transkript (kodiert für SmN) nicht eindeutig in den untersuchten ES-Zellen (IB10) nachzuweisen war (siehe Abb. 66A). Diese Daten scheinen im Kontrast zu Resultaten von Szabó & Mann (1994) zu stehen, die eine Expression von *Snrpn* in androgenetischen (Ag; zwei paternale Allele) und parthenogenetischen (Pg; komplette maternale Disomie) ES-Zellen nachweisen konnten. Eine Deregulation in diesen disomischen Zelllinien ist jedoch nicht auszuschließen.

Die Nachweisgrenze für *Snrpn*-Transkripte konnte erhöht werden, wenn zusätzliche PCR-Zyklen eingeführt wurden (Daten nicht präsentiert). Demnach scheinen zumindestens geringe Mengen der *Snrpn*-Transkripte in den IB10 ES-Zellen vorhanden gewesen zu sein. Ähnliche Daten wurden auch von frühen Mausembryos berichtet (Barr *et al.*, 1995). Erst ab Tag 7,5 konnten *Snrpn*-Transkripte nachgewiesen werden. Da ES-Zellen gewöhnlich zwischen Tag 4,5-6 (Implantationsphase) aus den Blastocysten isoliert werden, wäre eine nicht vorhandene oder nur geringe Transkription nicht unerwartet.

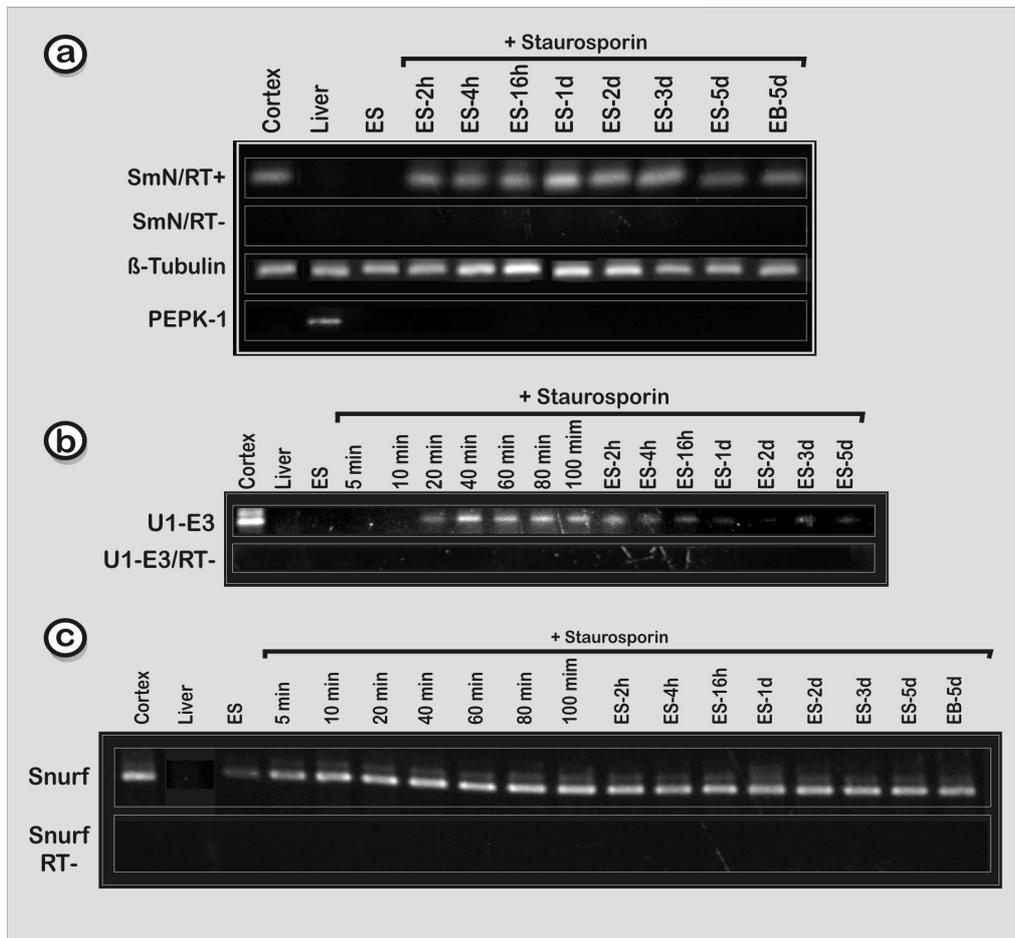


Abb. 66: Expression der *Snurf/Snrpn*-Transkripte in ES-Zellen und in STS-induzierten ES-Zellen und EBs mit neuronaler Morphologie. IB10 ES- und EB-Zellen wurden in der Gegenwart des Medium-Supplements B27 mit 20 nM STS für die angegebenen Zeitspannen kultiviert. Im Folgenden wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mit Reverser Transkriptase inkubiert. PCRs mit Transkript-spezifischen Primern wurden an der resultierenden cDNA der ES-Zellen, Gehirn, Leber und embryonalen Aggregaten EBs wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. **a:** Expression des für SNURF kodierenden *Snrpn*-Transkriptes. **b:** Expression eines untranslatierten 5'-Transkripts. **c:** Expression des für SmN kodierenden *Snurf*-Transkriptes.

Im Gegensatz zu *Snrpn* gelang der signifikante Nachweis des *Snurf*-Transkriptes (Exon 1-3 des bicistronischen Gens) in den ES-Zellen (siehe Abb. 66C). Dies scheint bei erster Betrachtung widersprüchlich, da sich die *Snurf*-Exons mit den *Snrpn*-Exons einen gemeinsamen Promotor teilen. Neben der Möglichkeit, daß beide Transkripte unterschiedlich stabil sind, ist jedoch anzunehmen, daß aufgrund zusätzlicher epigenetischer Eigenschaften des Promotors und weiteren wahrscheinlichen *cis*-Elementen die eigentliche Transkriptionskontrolle weitaus komplexer ist (siehe Diskussion). So wurden auch in Maus weitere stromaufwärts liegende Exons (U1-U2) identifiziert, die möglicherweise eine Existenz weiterer sekundärer Promotoren bedingen (Bressler *et al.*, 2001). Die Analyse der Transkription mit Primern für eines der

untranslatierten Exons (U1, *spliced* an *Snurf*-Exon 2) zeigte keine Transkription der U1-E3 Variante in ES-Zellen (siehe Abb. 66B).

Um zu überprüfen, ob sich die Transkription der einzelnen Exons während einer Neurogenese in den ES-Zellen verändert, wurden die Expression während einer STS-Induktion beobachtet. Zudem wurde das Expressionsmuster in ausdifferenzierten embryonalen Aggregaten mit neuronaler Morphologie und in Gehirngewebe analysiert. Es zeigte sich, daß trotz persistierender Methylierung, der *Snurf/Snrpn*-Promotor während der STS-Induzierung nicht demethyliert wurde (siehe Abschnitt 4.2.4.6), die Inkubation mit Staurosporin die Expression des *Snurf/Snrpn*-Gens aber aktivierte (Abb. 66A-C). Schon nach wenigen Minuten wurde eine Erhöhung der Anzahl aller drei *Snurf/Snrpn*-Transkripte beobachtet.

Da keine quantitative PCR durchgeführt werden konnte, kann jedoch keine definitive Aussage über die Dynamik der Expressionsaktivierung getätigt werden. Es ist auch möglich, daß nur eine Subpopulation der Zellen aktiviert wurde. Da alle analysierten Transkripte in Gehirn und aus EBs abgeleiteten neuronalen Zellen nachgewiesen wurden (siehe Abb. 66A-C), ist jedoch anzunehmen, daß die Expressions-Aktivierung eine Gehirn-spezifische Funktion einnimmt.

Viele Charakteristika der gametisch geprägten Region um den *Snurf/Snrpn*-IC deuten darauf hin, daß der gesamte "Imprinting"-Komplex spezifische Aufgaben im Säugetiergehirn wahrnimmt (Übersicht in Schumacher, 2001).

Auffällig sind u.a. die zahlreichen neuroanatomischen Unterschiede zwischen Angelman- und Prader-Willi-Patienten; so auch gehäufte Missformationen der linken Gehirnhemisphäre von Angelman-Patienten wie auch ein unnatürlich häufiges Auftreten von Linkshändigkeit in diesen Personen. Diese hemisphärischen Unterschiede und der Nachweis, daß uniparentale Zellen (Pg- und Ag-Zellen, s.o.) in chimären Mäusen in spezifischen, unterschiedlichen Bereichen des Maus-Gehirns akkumulieren (Allen *et al.*, 1995), führten zu der Vermutung, daß bestimmte "Imprinting"-Effekte Geschlechts-spezifische und Hemisphären-spezifische Auswirkungen bedingen (Schumacher, 2001; siehe auch Diskussion). Um einen genauern Einblick in diese Mechanismen zu erlangen, wurden die Expressionsstudien zu den *Snurf/Snrpn*-Transkripten auf bestimmte Bereiche des Maus-Gehirns ausgedehnt (siehe Abb. 67).

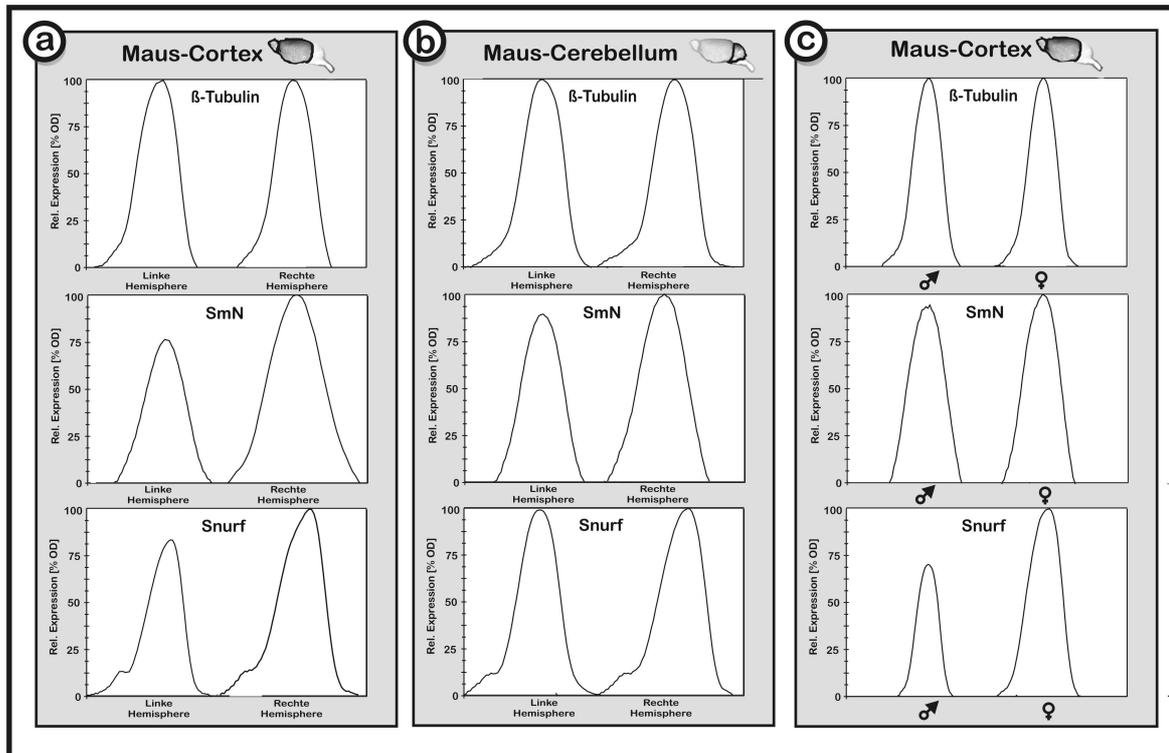


Abb. 67: Semiquantitative Analyse der Expression der *Snurf/Snrpn*-Transkripte in verschiedenen hemisphärischen Bereichen des Maus-Gehirns. Aus Cortex und Cerebellum 4 Wochen alter C57BL/6-Mäuse wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mit Reverser Transkriptase inkubiert. PCRs mit *Snurf/Snrpn* Transkript-spezifischen Primern wurden an den resultierenden cDNA-Pools unter suboptimalen (geringe Anzahl der Reaktionszyklen; max. 25 Zyklen) wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und densitometrisch erfasst. **a:** Expressions-Profil der *Snurf/Snrpn*-Transkripte in Maus-Cortex. **b:** Expressions-Profil der *Snurf/Snrpn*-Transkripte in Maus-Cerebellum. **c:** Expressions-Profil der *Snurf/Snrpn*-Transkripte im Cortex weiblicher und männlicher Mäuse. Die Expressionsrate von β -Tubulin wurde zur Eichung der gemessenen RNA-Mengen eingesetzt.

Die Auswertung der Expressions-Profile (siehe Abb. 67A und 67B) deutet darauf hin, daß beide *Snurf/Snrpn*-Transkripte möglicherweise eine hemisphärische Prädisposition (vor allem im Frontal-Cortex) besitzen. Dies wäre im Einklang mit einer evolutiven Theorie der Vorderhirnentwicklung in Säugetieren (Schumacher, 2001; Isles *et al.*, 2000), die vermuten lässt, daß die parental-spezifische Weitergabe bestimmter Merkmale einen Selektionsvorteil bedingen könnte. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die relative Verteilung zwischen weiblichem und männlichem Gehirn (siehe Abb. 67C), bei der die paternal vererbten (maternal geprägten) Allele möglicherweise vorwiegend im männlichen Gehirn ausgeprägt werden. Auch diese asymmetrische Verteilung könnte auf evolutiven Mechanismen beruhen, die sich auf einen geschlechts-spezifischen Phänotyp auswirken.

Die hier erzielten Ergebnisse können zur Zeit jedoch nur als vage Hypothesen gelten, da sie jedoch nicht quantitativ ermittelt wurden; daher können exakte Angaben über die

Verteilung der gametisch geprägten Transkripte nicht getroffen werden. Weitere Experimente, wie quantitative RT-PCR Analysen sind nötig um die Rolle parentaler Allele in der Gehirnentwicklung und Evolution aufzudecken.

Anmerkung: Das Expressionsprofil der *Snurf*-Exons könnte auf eine weitere Splice-Variante in Maus-Gehirn hindeuten (zweigipfelige Kurve), die im Gel höher migriert, d.h. ein weiteres Exon enthalten könnte. Im Menschen ist solch eine Variante (*SNURF*-Exon 3b) bekannt, bisher jedoch noch nicht in Maus.

4.3 Evolution der "Imprinting"-Region

Obwohl die gesamte "Imprinting"-Region um *Snurf/Snrpn* zwischen Mensch und Maus hoch konserviert ist, unterscheiden sich die Sequenzen in ihrer Funktionalität. So kann die DMR1 Region (einschließlich Exon1) aus Mensch, wenn sie anstelle des Maus-DMR1 in das Maus-Genom eingefügt wird, die Methylierung des maternalen Allels nicht induzieren (Hershko *et al.*, 2001). Diese Resultate zeigten, daß im Maus-Promotor ein "Imprinting" cis-Signal existieren muss, welches in der orthologen Region im Mensch nicht existiert. Zudem zeigen beide DMR1-Sequenzen mechanistische Unterschiede. Während der *Snurf/Snrpn*-DMR1 während der Oogenese etabliert wird (Shemer *et al.*, 1997), bleibt der menschliche *SNURF/SNRPN*-DMR1 in den Oocyten unmethyliert (El-Maari *et al.*, 2001). Ein anderer auffälliger Unterschied zwischen beiden Genomen ist das mögliche Fehlen einer funktional dem AS-SRO entsprechenden Sequenz in Maus (siehe Abschnitt 4.2.1.7).

Um festzustellen, wie sich die einzelnen "Imprinting"-Elemente evolutiv entwickelten, wurde wie schon zum AS-SRO beschrieben (s.o.) ein evolutiver Homologievergleich mittels Zoo-Dot-Blot Analyse durchgeführt (siehe Abb. 68).

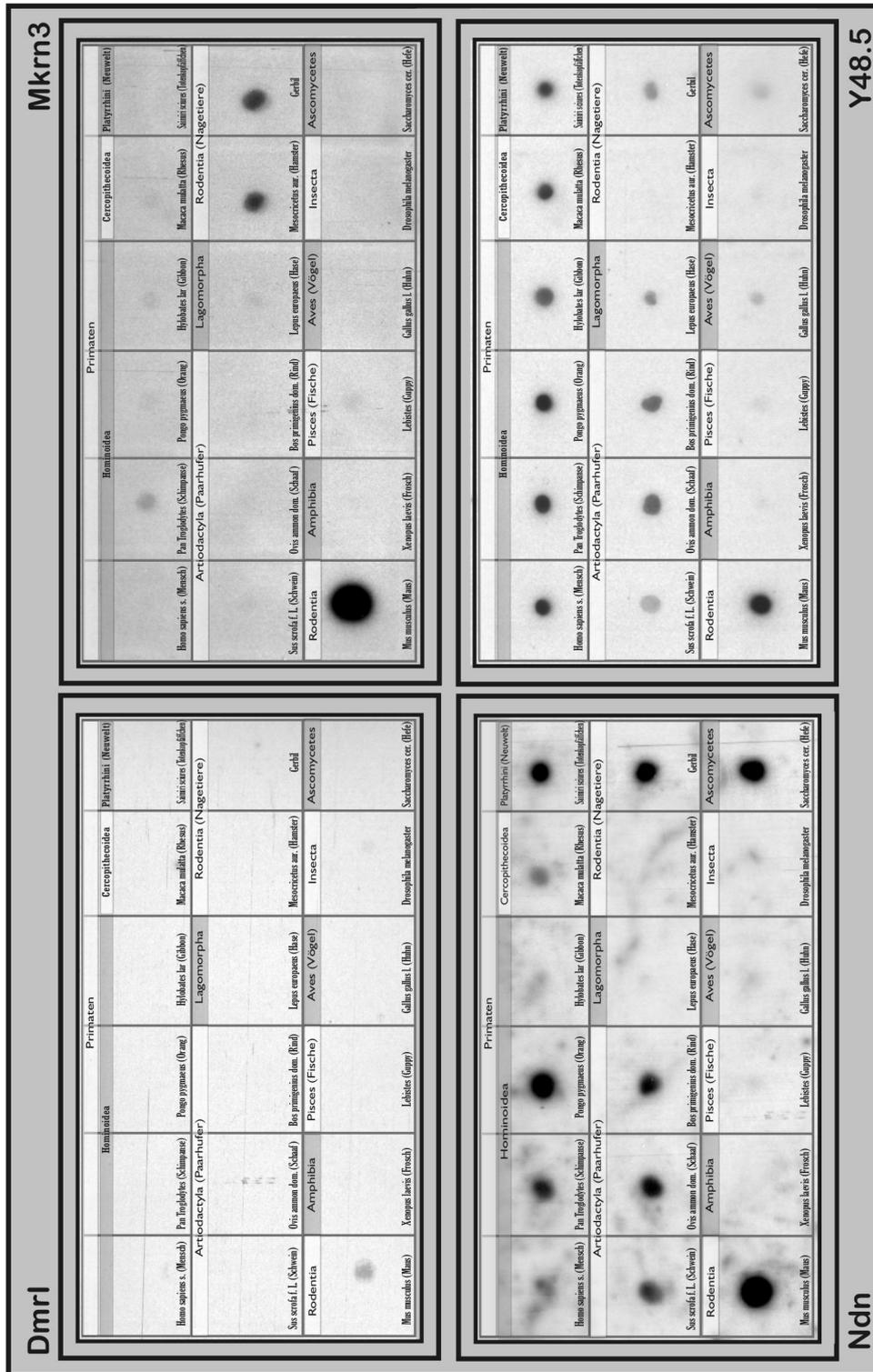


Abb. 68: Zoo-Blot Analyse genomischer DNA von Tieren unterschiedlicher evolutiver Linien. Jeweils 3 µg genomische DNA wurde auf einen Punkt aufgetragen und getrocknet. Die Membranen wurden anschließend mit Sonden für den Maus-DMR1, Maus-Ndn, Y48.5 aus Mensch (Vergleich siehe Abschnitt 4.2.2.5; Schumacher, 1998) und Maus-Mkrn3 (zudem AS-SRO; siehe Abb. Abschnitt 4.2.1.7) hybridisiert und die Signalintensität mittels Autoradiographie und Phospho-Imager Auswertung gemessen.

Wie aus direkten Sequenzvergleichen zwischen Maus-DMR1 und Mensch-DMR1 zu erwarten war (Hershko *et al.*, 2001), scheint sich diese Region ähnlich der AS-SRO Sequenz evolutiv unterschiedlich entwickelt zu haben. Beide DMRs unterscheiden sich

in ihrer Sequenz weitgehend, nur eine kleine Region um den minimalen Promotor (7 Bp Protein-Bindungsstelle) zeigt eine signifikante Homologie. Demgegenüber zeigen Signale für die beiden Mausgene *Ndn* und *Mkrn3* in anderen Spezies, daß diese Gene weitestgehend gleich blieben. *Ndn* ist das zwischen Mensch und Maus am stärksten konservierte Gen der gametisch geprägten Region. Deutliche Signale in Membran-"Dots" mit DNA von Artiodactyla und Primaten lässt auf eine allgemein hohe evolutive Konservierung schließen. Auch für *Mkrn3* finden sich Signale in Primaten. Diese sind jedoch wesentlich schwächer als für *Ndn*. Im wesentlichen wurden nur die fünf Zinkfinger-Motive des Gens konserviert (Jong *et al.*, 1999^a), während eine hohe Konservierung (möglicherweise auch das ganze Gen) in Artiodactyla verloren ging (siehe Abb. 68). Beide Gene scheinen erst während der Abspaltung der Säugetiere entstanden zu sein. *Ndn* und verwandte Gene der MAGE-Genfamilie konnten in anderen Spezies nicht nachgewiesen werden. So konnte auch hier kein Signal in Amphibien, Vögeln, Insekten und Fischen nachgewiesen werden. Ein *Ndn*-Signal wurde in Hefe beobachtet, jedoch könnte dieses Signal auf Kreuzhybridisierungen oder spezifische Protein-Motive hindeuten, da das Hefe-Genom keine MAGE-Gene enthält (Öhman-Forslund *et al.*, 2001).

Eine evolutive Konservierung von Proteinfunktionen (und somit Sequenzähnlichkeit) ist leicht nachzuvollziehen, jedoch ist es erstaunlich, daß auch andere, nicht-kodierende Sequenzabschnitte der gametisch geprägten Region konserviert wurden (Y48.5, siehe Abb. 68; K. Buiting, pers. Kommunikation). Obwohl der AS-SRO, abgesehen von einer etwa 150 Bp-Kernsequenz (siehe Abschnitt 4.2.1.7), über seinen größten Bereich nicht zwischen Mensch und Maus konserviert ist, findet sich die zum AS-SRO benachbarte Region Y48.5 in fast allen Spezies. Um den Marker Y48.5 (lokalisiert zwischen den *SNRPN*-Exons u2 und u3) sind mehrere *HpaII*-Restriktionsstellen lokalisiert, von denen zwei mit der Sonde Y48.5E/ST (500 Bb *EcoRI*/*Styx*-Fragment) erkannt werden. Diese häufig für diagnostische Zwecke genutzte *HpaII*-Restriktionsstellen erkennen ein partielles parental-spezifische Methylierungsmuster (für Details siehe auch Diskussion und Schumacher, 1998; Buiting *et al.*, 1995). Die überaus hohe strukturelle Konservierung der orthologen, gametisch geprägten Regionen lassen auf eine strikte "Imprint"-Kontrolle schließen, die möglicherweise einen evolutiven Selektionsvorteil der Gehirnentwicklung in Säugern bedingte. Diese Ergebnisse werden im Rahmen einer neuen "Imprint"-Theorie in der Diskussion besprochen.

5 Diskussion

5.1 Staurosporin als Aktivator der neuronalen Differenzierung

Die Daten dieser Arbeit zeigen, daß embryonale Stammzellen der Maus effektiv durch Staurosporin in Zellen mit neuronalen Charakteristika umgewandelt werden können. Die experimentellen Befunde deuten darauf hin, daß die differenzierten Zellen je nach Medium-Zusammensetzung Neuronen oder Gliazellen bilden können und sogenannte Stammzell-ähnliche Neurosphären ausbilden.

5.1.1 Phänotypische Auswirkung der Staurosporin-Induktion

Die neurotrophe Wirkung von STS wird vermutlich über die Bindung der Carbazol Untereinheit an diverse Zielproteine ausgelöst (Prade *et al.*, 1997; Lawrie *et al.*, 1997). So inhibiert STS ein großes Spektrum an Protein-Kinasen, indem es mit hoher Affinität an die katalytische Domäne der Kinasen bindet und daher die Bindung des eigentlichen Kinase-Substrats ATP unterbindet. Obwohl das Alkaloid verschiedene Protein Kinasen inhibieren kann, so PKA ($IC_{50} = 7$ nM), $p^{60v-src}$ Tyrosin Protein Kinase ($IC_{50} = 6$ nM), CaM Kinase ($IC_{50} = 6$ nM) und Cyklin-abhängige Protein Kinasen (CDKs, $IC_{50} = 10-50$ nM), zeigt es die höchste Affinität zu den zwölf bekannten Protein-Kinase C (PKC) Isoenzymen ($IC_{50} = 1-3$ nM). Die PKC-Isoenzyme formen eine Familie von Phospholipid-abhängigen Serin/Threonin Protein-Kinasen, die essentielle Rollen in zahlreichen Signal-Transduktions Kaskaden einnehmen. Die Entstehung von Krebs wird ursächlich mit deregulierten PKC Signal-Wegen in Verbindung gebracht. Folglich wurde STS auch als potentiell Anti-Krebs Mittel in zahlreichen Studien an verschiedenen Tumor- und Neuroblastoma-Zelllinien eingesetzt. STS verhindert die Vermehrung tumorigener Zellen möglicherweise durch eine Umwandlung in neuronale Zellen oder dadurch, daß es eine Apoptose in den behandelten Zellen einleitet.

Ein ähnliches Verhalten auf eine STS-Gabe in das Nährmedium konnte auch für die untersuchten ES-Zelllinien beobachtet werden. In alle drei Zelllinien wurde schon nach Zugabe geringer Mengen STS (2-10 nM) ein fortschreitender Zelltod und ein gelegentlicher Neuriten-Auswuchs beobachtet. Die Zellen der 129er Mauslinien (IB10 und RW4) erwiesen sich dabei als resistenter im Vergleich zu den Zellen der etwas anfälligeren Zelllinie Bruce4, die einen C57BL6 Hintergrund besitzt. Es war daher nötig, die STS-Konzentrationen zu bestimmen, die für eine gegebene Zelllinie die Neurogenese

einleiten, jedoch noch nicht einen extensiven Zelltod herbeiführen. Die eigentliche Neurogenese wurde daher mit 10-15 nM STS für Bruce4 und 20 nM für die IB10- und RW4-Zelllinien durchgeführt. Es ist anzunehmen, daß bei STS-Konzentrationen über 20 nM apoptotische Wege aktiviert werden, die von Cyklin-abhängigen Kinasen und Caspasen eingeleitet werden (Zong *et al.*, 1999; Stepczynska *et al.*, 2001). Gegenüber den Kinasen werden diese Proteine aufgrund einer geringeren Affinität für eine STS-Bindung erst bei deutlich höheren STS-Gaben inhibiert. Die Folge sind z.B. Caspase-abhängige proteolytische Kaskaden und eine Schädigungen der Mitochondrienintegrität sowie ein CDK-abhängiger G1-Arrest.

Um apoptotische Kaskaden zu vermindern und gleichzeitig den prozentualen Anteil neuronaler Zellen in den Kulturen zu erhöhen, wurden verschiedene Modifikationen von Wachstumsmedien und Differenzierungsprotokollen analysiert. So erwiesen sich zwei Methoden als besonders effektiv, um einen STS-induzierten Zelltod vorzubeugen. Sowohl die Zugabe von bis zu 5 μ M Hydrochinon (HQ) als auch die Generierung von embryonalen Aggregaten aus ES-Zellen kann den Zelltod nahezu vollständig verhindern. Eine höhere Hydrochinon-Dosierung wirkt sich jedoch negativ auf das Zellwachstum aus. Zudem zeigten vorläufige Resultate, daß der Benzen-Metabolit möglicherweise die neuronale Entwicklung in den ES-Zell Kulturen negativ beeinträchtigen kann. Weitere Studien sind jedoch nötig, um die Wechselwirkungen zwischen STS und HQ aufzuklären und eine etwaige Rolle als Medium-Supplement für Differenzierungsstudien zu ergründen. Für eine intensive neuronale Differenzierung unabdingbar erwies sich jedoch die Generierung von ES-Zellaggregaten.

Es existieren zwei Methoden, diese *embryoid bodies* (EBs) zu formen. Die erste Methode nutzt die Eigenschaft der ES-Zellen, sich bei hoher Zelldichte in nicht-adhäsiven Petrischalen zu Clustern zusammenzufinden. Diese Zellanhäufungen ließen sich zwar in neuronale Zellen differenzieren, jedoch starben viele Zellen durch die STS-Behandlung ab. Ein wesentlich effektiverer Schutz gegen die Apoptose wurde dadurch erzielt, wenn die ES-Zellen für 3-4 Tage in hängenden Tropfen kultiviert wurden (abgewandelte Methode nach Strübing *et al.*, 1995). In diesen Kulturen fanden sich bei idealen Bedingungen trotz der Anwesenheit von 20 nM STS keinerlei apoptotische Zellen. Genaue Mechanismen, die diesen Schutz bewirken, sind jedoch nicht bekannt. Eine Möglichkeit besteht sicherlich darin, daß durch den engen Zell-Zell Kontakt Signal Transduktionswege initiiert werden könnten, welche in der Lage sind, ES-Zellen in eine beginnende Differenzierung zu treiben. In diesem Stadium wäre es möglich, daß typische apoptotische Kaskaden durch fehlende Stimuli nicht mehr aktiviert werden können. Neben ihrer anti-apoptotischen Wirkung ermöglicht die gezielte Zellaggregation

nach letztgenannter Methode auch die Zellen in genau definierter Anzahl einzusetzen. Es zeigte sich jedoch, daß die Aggregation und eine erfolgreiche Differenzierung von drei Faktoren abhängig sind. So müssen die EBs mindestens 3 Tage in den Tropfen verweilen, um eine feste Konsistenz der EBs zu garantieren. Offensichtlich hängt der Erfolg einer neuronalen Differenzierung direkt damit zusammen, daß diese Zell-Zell Kontakte gegeben sind. Werden die EBs zu früh ausplattiert, so konnten nur sporadisch auftretende Neuronen beobachtet werden. Hingegen darf die Plattierung auch nicht zu lange hinausgezögert werden, da die neuronale Effizienz nach 4-5 Tagen wieder dramatisch abfällt. Es ist denkbar, daß die relativ geringe Menge an Nährmedium (max. 25 μ l), die den *embryoid body* in einem Tropfen umgibt, nicht ausreicht, um die Zellen für mehr als 4 Tage umfassend zu ernähren. Es konnte zudem festgestellt werden, daß die EBs nur in einem engen Grenzbereich der Zelldichte mit hoher Ausbeute zu differenzieren waren. Zu kleine (<400 Zellen) oder zu große Aggregate (>10.000 Zellen) verringern die Differenzierungseffizienz signifikant. Da viele Anzeichen dafür sprechen, daß die EBs mehrere, dem frühen Embryo ähnliche Zellschichten entwickeln müssen, um determinierbar zu werden (Bain *et al.*, 1995; Angelov *et al.*, 1998), sind wahrscheinlich viele Zellen nötig, um diese Schichten entwickeln zu können. Ab einer bestimmten Größe wirken wiederum erhöhte Scherkräfte auf die EBs. Dadurch wird ein für die Differenzierung notwendige Anheftung an eine externe Matrix verhindert. Ein dritter wichtiger Faktor ist die Serumkonzentration, die eine Aggregation der ES-Zellen intensiv beeinflusst. Die primären ES-Zellen werden üblicherweise in DMEM mit 12-15% FCS kultiviert (Torres & Kühn, 1997). Diese Serum-Konzentration ist jedoch nicht ausreichend, um alle Zellen in der Kultur in eine Aggregat-Formation zu zwingen. Die Experimente zeigen, daß alle ES-Zelllinien einen 20%igen FCS-Zusatz zum Medium benötigten, um feste, differenzierfähige EBs zu generieren. Die Bestandteile des Serums scheinen aber nur die Integrität der EBs zu sichern, denn hohe FCS-Konzentrationen (>3%) während der anschließenden Differenzierungsschritte wirken hemmend auf die neuronale Entwicklung.

5.1.2 Mechanismen der Staurosporin-Induktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit deutet darauf hin, daß die STS-behandelten ES-Zellen die biologischen Eigenschaften von EGF-reaktiven, undifferenzierten neuronalen Vorläufern entwickeln, und sich anschließend, für ein *in vitro* Experiment, mit einer hohen prozentualen Quote (>90%) in neuronale Zellen und Glia differenzieren lassen.

Die neurale Morphologie erwies sich durch gezielte Zugabe von Supplementen (G5 und B27) als modifizierbar. So ließen sich EBs in Gegenwart von B27 zu ungewöhnlich langen Neuriten (bis über 4 mm) differenzieren, die es ermöglichen, einzelne Zellen mechanisch in der Zellkultur zu manipulieren.

Die Daten zur Immunofärbung demonstrieren, daß die entstandenen neuronalen Zellen (*neuron like cells*, NLCs) der drei ES-Zelllinien charakteristische Eigenschaften früher, post-mitotischer Neuronen besitzen. Alle NLCs exprimierten die Mikrotubuli-assoziierten Proteine Tau und MAP2 in einer Komposition, die der neu geformter Axonen und Dendriten primärer ZNS-Kulturen ähneln (Vergleich in Heidemann, 1996; Mandell & Banker, 1995). Die differenzierten Zellen exprimierten weiterhin das niedermolekulare (68 kDa) Neurofilament NFL, welches ein typischer Marker für den anfänglichen Neuriten-Auswuchs *in vitro* und *in vivo* darstellt. Ein Nachweis des schweren Neurofilaments NFH (200 kDa) gelang jedoch nicht, ein weiterer Hinweis darauf, daß die NLCs die charakteristischen Eigenschaften früher neuronaler Zellen besitzen. Ob sich die Zellen *in vitro* über dieses frühe Stadium hinaus entwickeln können ist ungewiss; längere Experimente wären notwendig, um die verschiedenen Aspekte einer neuronalen Reifung zu analysieren. Dennoch scheinen die Zellen auch *in vitro* einige Schwellen der Neurogenese zu überschreiten. Die meisten der NLCs waren auch Synaptophysin- und HNK-1-positiv; Indizien für eine vorhandene Zell-Migration, Synaptogenese und Bildung neuronaler Netzwerke.

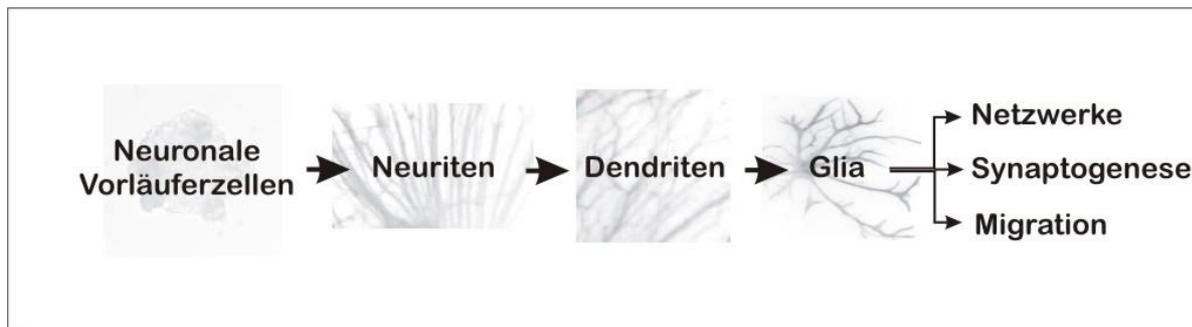


Abb.70: In der Gegenwart von Staurosporin durchlaufen die aus ES-Zellen abgeleiteten Zellen *in vitro* mehrere Stadien, die möglicherweise jeweils einen neuen Differenzierungsschritt einleiten. Diese neurale Dynamik würde der Entwicklung des frühen Embryo-ZNS ähneln, in dem auch mehrere Stadien aufeinander folgen müssen um die neuronale Entwicklung zu komplettieren. So müssen sich aus z.B. aus den embryonalen Stammzellen zuerst neuronale Vorläuferzellen bilden, damit aus diesen wiederum Neuriten auswachsen können. Die ersten Neuritenauswüchse einer Zelle entwickeln sich *in vivo* i.d.R. in das Axon, wonach sich sekundär Dendriten bilden können. Die neuronalen Zellen können sich wiederum nur dann weiter entwickeln, wenn sich Gliazellen gebildet haben, die nun eine weitere Differenzierung initiieren.

In der Tat formten sich nach ~14-tägiger Kultur aus den NLCs erste sichtbare Netzwerke. Etwa zum gleichen Zeitpunkt (Tag 12-14 TPP) erschienen erste Astrocyten

in den Kulturen, deutlich später als Neuronen. Man kann spekulieren, ob die zeitlich später ausdifferenzierten Neuroglia von der vorherigen Entwicklung der Neuronen abhängen, also in einer festgesetzten Zeitabhängigkeit heranwachsen. Diese zeitliche Abfolge würde den natürlichen Verlauf der neuronalen Entwicklung *in vivo* widerspiegeln, bei der nicht vollständig entwickelte Neuronen die Astrocyten-Reifung initiieren. Die neugeformten Astrocyten wiederum segregieren neurotrophe Faktoren, die das Überleben und die Reifung neuronaler Zellen sichern.

Eine genauere Charakterisierung der Entwicklung der neuronalen Zellen ist auch dadurch gegeben, daß die ES-Zellen mit laufender STS-Behandlung ihre EGF-Sensitivität erhöhen. Mehrere Studien zeigten, daß Neuronen- und Retina-Vorläuferzellen ihre EGF-Reaktivität durch Einführung zusätzlicher EGF-Rezeptoren erhöhen (EGFRs; Lilien, 1995; Lilien & Wancio, 1998). Es zeigte sich, daß frühe Vorläuferzellen die vornehmlich sensitiv auf FGF sind, die Differenzierung zu Neuronen favorisieren. Hingegen entwickeln sich spätere Vorläuferzellen, mit erhöhter EGF-Reaktivität mit höherer Wahrscheinlichkeit zu Gliavorläufern (Quian *et al.*, 1997).

Da nachgewiesen werden konnte, daß STS auch die Anzahl hoch affinitiver EGFRs in A431 Zellen erhöht (Friedman *et al.*, 1990), wird hier ein Modell der STS-induzierten EGF-Reaktivität von ES-Zellen vorgestellt (siehe auch Abb. 71 und 72). Staurosporin inaktiviert eine bis *dato* noch nicht identifizierte Protein-Kinase, die sich für eine Herabregulierung der EGFR-Expression verantwortlich zeigt. Weiterhin beeinflusst STS die EGFR Protein-Kinase, welche durch 20 nM STS teilweise inhibiert werden sollte (IC₅₀ = 100 nM). Die ES-Zellen reagieren vermutlich mit einer erhöhten Expression der EGFRs auf das Zellgift. Während der Induktionsphase werden die Zellen daher zunehmend EGF reaktiv und bilden erste Neuronen, gefolgt von Neuroglia. Es ist jedoch auch denkbar, daß STS die endgültigen Differenzierungssignale über Äste des NGF-Weges ausübt (Fig. 72). Dieses Modell wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, daß STS direkt die EGF-Bindung an seinen Rezeptor beeinflusst; wahrscheinlich durch Inhibierung einer Serin/Threonin-Kinase (Johannessen *et al.*, 2001). Vermutlich regulieren PKC- (und damit auch STS-) abhängige Signalwege die Affinität der EGFRs zu EGF durch eine Serin/Threonin-Phosphorylierung (Countaway *et al.*, 1990). Die erhöhte Anzahl der hoch affinitiven EGFRs in STS behandelten Zellen korreliert mit der Verringerung des Phosphoserin- und Phosphothreoningehalts der EGFRs (Friedman *et al.*, 1990). Dadurch wird eines der PKC-Isoenzyme ein möglicher Kandidat, der für die beobachtete, durch STS induzierte EGF-Sensitivität, verantwortlich ist.

Der weit fortgeschrittene Differenzierung der *in vitro* Kulturen wurde auch deutlich durch die Beobachtung, daß radiale Astrocyten außerhalb der peripheren Zonen der

EBs gefunden wurden. Diese Lokalisation ist vermutlich auf eine Migration der neuronalen bzw. glialen Vorläufer zurückzuführen. Gewöhnlich flachten die Neuroglia mit fortschreitender Reifung ab, wodurch die mikroskopische Untersuchung der Feinstruktur erleichtert wurde. So zeigte die Immunofärbung mit GFAP eine ubiquitäre Präsenz des Filaments in den Zellkörpern und in den Auswüchsen der Astrocyten, jedoch nicht in den Nuklei der Zellen. Diese Daten zeigen, daß das vorgestellte STS Protokoll ein wertvolles Hilfsmittel zur Feinanalyse der Morphologien einzelner Zellen darstellt.

Der möglicherweise herausragende Aspekt des vorgestellten Protokolls ist die Fähigkeit des STS, aus ES-Zellen klonal abgeleitete Neurosphären zu generieren. Es konnte schon früher gezeigt werden, daß ES-Zellen in der Lage sind, in Erwiderung auf exogenes EGF oder FGF-2 klonale Kolonien von undifferenzierten, neuronalen Vorläuferzellen zu bilden, die sich zu Neurosphären zusammenfinden (Reynolds & Weiss, 1996; Tropepe *et al.*, 1999; Tropepe *et al.*, 2001).

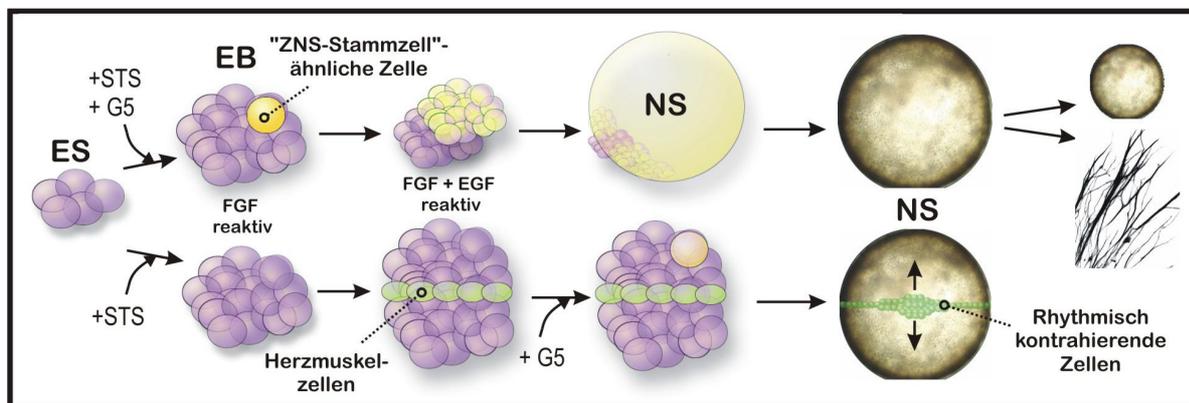


Abb. 71: Schematische Darstellung einer möglichen Stammzell-Reaktion auf die Zugabe von STS und der Wachstumsfaktoren FGF und EGF. **Obere Reihe:** Werden primäre ES-Zellen während der EB-Aggregation mit STS behandelt, so bilden sich zuerst FGF-reaktive Zellen. Nach einigen Zellteilungen entfalten diese Zellen eine EGF-Reaktivität mit klassischen Stammzell-Charakteristiken. Einige dieser Vorläuferzellen formen Sphären aus undifferenzierten Zellen während sie ihre frühe Stammzell-Charakteristik beibehalten (Vergleich in Okabe *et al.*, 1996; Tropepe *et al.*, 2001). Werden diese Sphären neu ausplattiert, so generieren sie neue, klonal abgeleitete Neurosphären, die sich wieder aus neuronalen Vorläufern und Stammzell-ähnlichen Abkömmlingen zusammensetzen. **Untere Reihe:** ES-Zellen, die für einige Tage ohne den Stimulus eines Wachstumsfaktors kultiviert werden, differenzieren zu EGF/FGF-reaktiven, nicht neuronalen Linien, wie z.B. rhythmisch kontrahierenden Herzmuskelzellen. Werden die EBs dann mit EGF komplementiert, so entstehen aus einigen der noch nicht differenzierten Zellen chimäre Sphären, die teilweise eine neuronale Charakteristik erhalten, aber gleichzeitig ihre kardioiden Eigenschaften beibehalten. NS = Neurosphäre; EB = Embryoid Body.

Diese und die hier vorgestellten, durch STS induzierten Neurosphären können als klassische Stammzellen betrachtet werden. Sie unterscheiden sich von anderen Arten von Vorläuferzellen dadurch, daß sie einen undifferenzierten Zustand als auch

Multipotenz behalten und das Potential der Selbsterneuerung besitzen (siehe auch Übersicht in Morrison *et al.*, 1997; Stemple & Mahanthappa, 1997).

Es konnte gezeigt werden, daß die aus ES-Zellen entstandenen Neurosphären in der Lage waren, neuronales Gewebe als auch neue, sekundäre Sphären auszubilden. Im Gegensatz zu EBs, die eine relativ hohe Zelldichte benötigen, um neuronale Zellen hervorzubringen, entwickelten sich sogar aus vollständig dissoziierten Sphären neue Neurosphären. Da die Zellen dadurch vorwiegend als Einzelzellen im Medium schwimmen, kann davon ausgegangen werden, daß diese sekundären Sphären die klonalen Abkömmlinge einzelner Zellen darstellen. Beide, primäre und sekundäre Neurosphären, waren EGF-abhängig und enthielten teilungsfähige Nachkommen die in NLCs differenzieren konnten. Obwohl die Staurosporin-abhängige Induktion neuritogener Auswüchse den morphologischen und biochemischen Effekten von NGF und RA ähnelt, sind keine detaillierten Mechanismen der STS-Wirkung auf neuronale Wege bekannt. Studien an verschiedenen Neuroblastoma-Zelllinien zeigten, daß anders als der Neuritenauswuchs der durch NGF initiiert wird, die Neuriten, die in Erwiderung auf STS erzeugt wurden, in ihrer Länge reduziert waren und keine Netzwerke ausbilden konnten (Rasouly *et al.*, 1992). Andererseits zeigen die Daten dieser Arbeit, daß in ES-Zell Kulturen auch niedermolekulare Mengen STS in der Lage sind, die Ausbildung sehr langer, axonaler Neuriten und extensiver neuronaler Netzwerke zu induzieren. Um zu ergründen, ob und wie STS auch neuronale NGF-Wege in den ES-Zellen beeinflusst, wurden die Interaktionen mit NGF und dem neurotrophen Agens RA genauer untersucht. Es ist bekannt, daß sowohl RA als auch STS die NGF-Kaskade in unterschiedlichen Zelltypen beeinträchtigen können (siehe Abb. 72). Die Neurogenese wird durch die Bindung von NGF an seinen Rezeptor Trk-A initiiert, wodurch die Aktivierung des Guanin Nukleotid-bindenden Proteins RAS erfolgt (Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991). Der Bildung von GTP-RAS folgt die Aktivierung von Raf und MEK, welche dann ihrerseits die Aktivierung der ERK-Familie der MAP Kinasen (MAPK) einleiten (Kyriakis *et al.*, 1992; Marais *et al.*, 1993). Die neurotrophe Substanz Retinsäure potentierte die Effekte von NGF mindestens in zwei voneinander unabhängigen Wegen: Einerseits kann RA die Trk-A Expression erhöhen, zum anderen kann es die Sekretion von NGF erhöhen (Ahlemeyer *et al.*, 2000). Hingegen konnte gezeigt werden, daß STS die Trk-Expression behindert, wodurch die Neuritenverlängerung in RA- und NGF-behandelten Zellen blockiert wird (Campbell & Neet, 1995). Nun konnte enthüllt werden, daß STS die durch RA induzierte Neurogenese signifikant inhibiert und ebenso *vice versa* RA die durch STS induzierte Neurogenese hemmt.

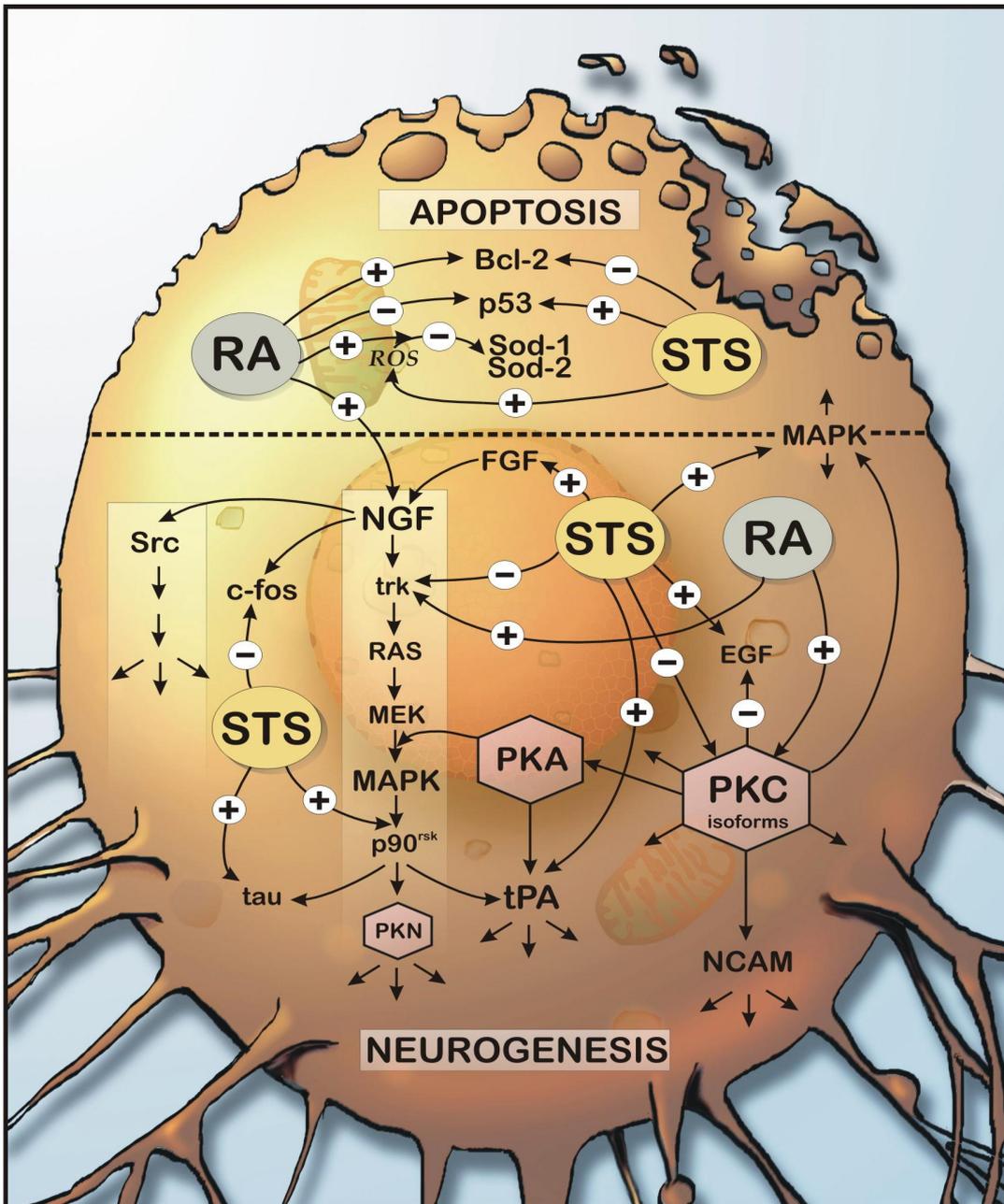


Abb.72: Modell der antagonistischen Effekte der pleiotropen Substanzen STS und RA. Retinsäure inhibiert die durch STS induzierte Neurogenese und schützt die Zellen gleichzeitig vor STS-abhängiger Apoptose. In ähnlicher Weise beeinträchtigt Staurosporin die durch RA induzierten neuronalen Pfade. RT-PCR Analysen zeigten, daß die Effekte von STS auf die Zelle innerhalb weniger Minuten einsetzen können; ein Hinweis darauf, daß STS gegebenenfalls auf späte Stufen der neuronalen Pfade einwirkt. Als mögliche Ziele gelten Protein-Kinasen, die Teil der NGF- oder PKC-Kaskaden sind. Obwohl RA die STS-Induktion neuronaler Entwicklung hemmt, konnten Reste neuronaler Zellen in den ES-Kulturen identifiziert werden. Diese Daten deuten darauf hin, daß RA eventuell auf einen oder mehrere andere neurotrophe Pfade einwirkt, die von STS nicht berührt werden. Die Mehrheit der Substanzen, die eine durch STS-induzierte Apoptose verhindern, beeinträchtigen in der Regel auch die STS-abhängige Neurogenese. Dies deutet auf Kreuzungspunkte hin, die in ES-Zellen neurotrophe und apoptotische Pfade miteinander verbinden. ROS, *mitochondrial reactive oxygen species*; PKN, unbekannte Protein Kinase; STS, Staurosporin; RA, Retinsäure; PKC, Protein Kinase C; + = Aktivierung; - = Inhibition.

Die beobachteten Auswirkungen unterstützen die Theorie, daß beide Substanzen, RA und STS, teilweise über den NGF-Weg agieren. Nichtsdestotrotz konnte ein geringer Neuritenwuchs beobachtet werden, wenn die ES-Zellen mit RA und STS zusammen behandelt wurden; möglicherweise ein Hinweis darauf, daß RA die durch STS erfolgte Inhibition des NGF Wegs herabreguliert oder daß beide neurotrophe Substanzen auch andere neuronale Pfade einschlagen.

Zumindestens scheint STS den NGF-Pfad an mindestens zwei Positionen stromabwärts der MAP-Kinasen zu aktivieren (LePrince *et al.*, 1996; Campbell & Neet, 1995). Diese Hypothese wird durch die Tatsache erhärtet, daß STS die Expression zweier neuronaler Gene innerhalb von 20-30 Minuten induzieren konnte. Diese Resultate führen zu der Überlegung, daß STS eine der späten Kinasen beeinflusst, die ihrerseits die Aktivität neuronaler Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Für PC12-Zellen wurde beschrieben, daß STS einen wesentlich schnelleren Neuritenauswuchs induziert (möglicherweise innerhalb einiger Stunden), als es NGF oder RA vermögen (Yao *et al.*, 1997). Wie bereits erwähnt, beeinflusst STS die Anzahl der EGF-Rezeptoren, deren Aktivität *in vivo* durch PKC Isoenzyme reguliert wird, die ebenfalls die zweite wichtige neuronale Kaskade bilden, die sowohl durch STS als auch durch RA beeinträchtigt werden. RA aktiviert cytosolische und nukleare PKC durch seinen Zell-Oberflächenrezeptor. Hingegen inhibiert STS die Kinase direkt durch Bindung an die katalytische Domäne, wodurch die durch RA ausgelöste Phosphorylierung diverser stromabwärtsliegender Zielproteine blockiert wird (Zorn & Sauro, 1995). Eine PKC-Inhibition fördert die Differenzierung neuronaler Zellen, während die Hyperaktivierung der PKC-Isoenzyme zu fortschreitender Neurodegeneration führt (Boyce *et al.*, 1997; Schaap & Parker, 1990).

An späten Stufen scheinen sich die NGF- und PKC-Pfade zu kreuzen, wodurch sie die Aktivität des neuronalen Zelladhäsions-Moleküls (NCAM; Gallagher *et al.*, 2000) gemeinsam modulieren. So führt die Inhibition der PKC δ , welche die Polysialysierung von NCAM steuert, zu einer neuritogenen Antwort. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß STS möglicherweise späte Schritte neurotropher Wege beeinflussen kann.

Weiterhin deuten die Daten dieser Arbeit in Verbindung mit Resultaten anderer Gruppen darauf hin, daß apoptotische Pfade auf einigen Ebenen mit neurotrophen Kaskaden konvergieren könnten. Einige Substanzen, so RA, NGF, das Phorbol-Acetat PMA, Hydrochinon, Aurintricarboxylinsäure und Tocopherol, die alle die STS induzierte Apoptose hemmen, verhindern ebenfalls die Induktion des Neuritenauswuchs durch STS (Prince & Orelan, 1997; Ahlemeyer & Kriegelstein, 2000; Lombet *et al.*, 2001; diese Arbeit). Beispiele für antiapoptotische Effekte von RA auf STS-induzierten

Wachstumsstop und Apoptose sind in Abb. 72 dargestellt. Mögliche Ziele dieser anti-apoptotischen Substanzen beinhalten PKC δ , da deren Zielprotein NCAM die Zellteilung in der G1-Phase hemmen kann, eine Phase in der die Zellen während der Kontaktinhibition verharren (Nishizuka, 1984). Es ist auffallend, daß STS eben diese G1-Phase arretieren kann, ebenso wie es in der Lage ist, MAP-Kinasen zu inhibieren, die sowohl in neurotrophen als auch apoptotischen Pfaden aktiv sind (Zong *et al.*, 1999; Mirkes *et al.*, 2000). Ebenso zeigten sich einige der PKC-Isoenzyme (PKC ϵ und PKC α) in der Lage, eine Neuritogenese in Neuroblastoma-Zellen zu induzieren (Boyce *et al.*, 1996). Diese Daten sind im Einklang mit Ergebnissen, die zeigen, daß PKC ϵ *in situ* inaktiviert wird, wenn Neuronen ihrem mitotischen Zyklus einstellen (Magoura *et al.*, 1993). Es werden jedoch noch viele Studien notwendig sein, um ein ungefähres Bild der Wirkungsweise von STS in der Neurogenese und der Apoptose zu erhalten.

Abschließend kann man feststellen, daß die hier neu entwickelte Methode ein geeignetes Mittel darstellt, die frühe Neurogenese in ES-Zellen zu studieren. Die pleiotrophe Substanz STS ermöglicht es, große Mengen ES-Zell abgeleitetes, neuronales Gewebe zu produzieren. Die Möglichkeit, diese neuronalen Zellen über längere Zeiträume zu kultivieren und über Neurosphären zu vermehren, ermöglicht neue Wege, um neuronale Krankheiten, Transplantationen und die frühe Neurogenese zu studieren, und findet daher hier eine Anwendung in der Untersuchung von Imprinting-Phänomenen während der Neurogenese in ES-Zellen der Maus.

5.2 Gametische Prägung in embryonalen Stammzellen

Mitte der 1980er Jahre entdeckte man die ersten Anzeichen dafür, daß unterschiedlich exprimierte Allele einiger Gene ursächlich an der Entstehung von Erbkrankheiten beteiligt sind (Surani *et al.*, 1984; McGrath & Solter, 1984; Mann *et al.*, 1984; Cattanaach & Kirk, 1985). Einige Jahre später erkannte man als ein wesentliches Merkmal dieser gametisch geprägten Gene die allelspezifische DNA-Methylierung. Solche epigenetischen Methylierungs-"Markierungen" fanden sich in Oocyten als auch in Spermien und führten offenbar ursächlich zu einer differentiellen Expression maternaler und paternaler Chromosomenabschnitte (Reik *et al.*, 1987; Sapienza *et al.*, 1987; Swain *et al.*, 1987; Chaillet *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993). Bis heute ist jedoch wenig darüber bekannt, wie die in den Gameten geprägten Gene ihre Prägung über das Zygotenstadium hinaus erhalten und diese während der frühen Embryonalentwicklung an neue Zellen weitergeben. Aufschluss über diese Mechanismen könnten Untersuchungen früher Phasen der Zygoten-Entwicklung hin zum ausdifferenziertem Embryo liefern. Als Versuchmodell eigneten sich besonders embryonale Stammzellen der Maus, die während der frühen embryonalen Entwicklung (zwischen Morulastadium und spätem Blastocystenstadium) gewonnen werden (siehe Abschnitt 1.1).

5.2.1 Das primäre Methylierungs-"Imprint" der *Snrpn*-Region wandert nach der Implantation in benachbarte Chromosomenbereiche

Bis zur ES-Zell Gewinnung im Blastocystenstadium verlieren die Zellen einen Großteil ihrer Methylierung, und nur wenige CpG-Dinukleotide bleiben partiell methyliert (Monk *et al.*, 1987; Kafri *et al.*, 1992). Offenbar verhalten sich gametisch geprägte Gene jedoch anders. Im Gegensatz zu ihren nicht-geprägten Gen-Nachbarn besitzen einige von ihnen schon während des Blastocystenstadiums eine signifikante Methylierung. Manche Gene, so z.B. das *insulin-like growth factor 2-receptor*-Gen (*Igf2r*, Stöger *et al.*, 1993), *U2af1-rs1* (A. Schumacher, nicht publiziert; Feil *et al.* 1997) und *Snrpn* (Shemer *et al.*, 1997) übernehmen diese Methylierung aus ihren Gameten. Diese Dynamik der Methylierung ist jedoch nicht bei allen gametisch geprägten Genen zu beobachten. Es ist auch möglich, daß diese Gene (z.B. *Igf2*) während oder nach der Implantation ihre allelspezifische Prägung erhalten (Brandeis *et al.*, 1993). Um die Erkenntnis über diese Prozesse zu erweitern, wurde die gametisch geprägte Region um *Snurf/Snrpn* in mehreren Maus ES-Zelllinien auf ihren Methylierungsgrad und Expression der Gene untersucht. Da der gametisch geprägte Bereich um *Snurf/Snrpn* auf

Mauschromosom7C aus mehreren bekannten Genen besteht, stellt sich die Frage, ob dieser Gen-Komplex zeitgleich ein "Imprint" etabliert oder ob die Methylierung ausgehend von einem "Methylierungs-Center" (nicht zu verwechseln mit dem Imprinting-Center !) in die benachbarten Gensequenzen einwandert.

Wie aus Abbildung 73 zusammenfassend zu ersehen ist, besitzt nur die als DMR1 bezeichnete Promotor-Region des *Snurf/Snrpn*-Gens während des Blastocystenstadiums eine parental-spezifische Methylierung:

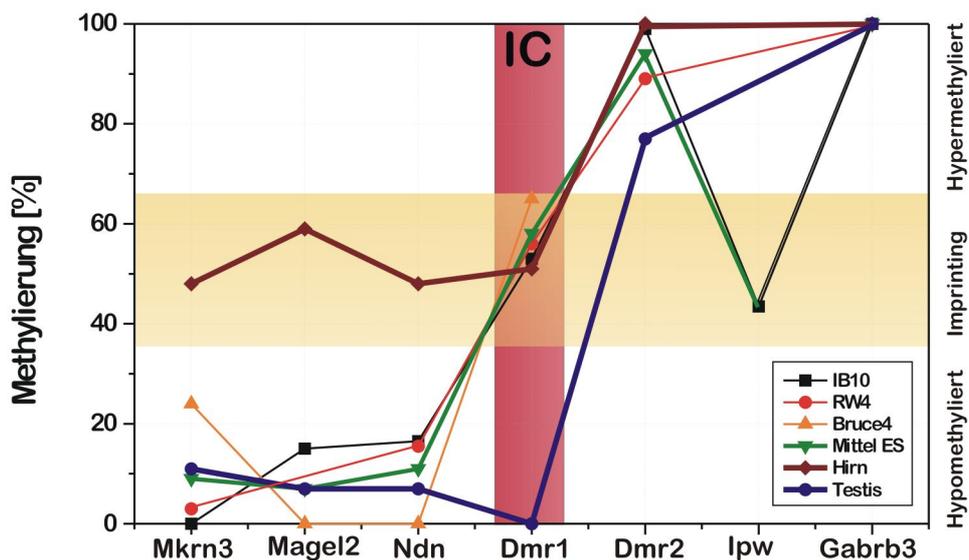


Abb. 73: Methylierung verschiedener Loci innerhalb der *Snurf/Snrpn*-"Imprinting"-Region in embryonalen Stammzellen der Maus. Offenbar breitet sich das Imprint vom DMR1 in die zu *Snurf/Snrpn* stromaufwärts liegenden chromosomalen Bereiche aus. Der Bereich 3' zu *Snurf/Snrpn* erwies sich als hypermethyliert, möglicherweise durch Übernahme des parentalen Methylierungsmusters aus Spermien in die Zygote. Der nicht gametisch geprägte Bereich (*Gabrb3*) 3' zu *Snurf/Snrpn* ist biparental methyliert.

Der Vergleich mit den Methylierungsmustern hybrider Mausstämmen, Testis-DNA und veröffentlichten Daten zur allelspezifischen Prägung dieser Region in somatischen Zellen weist auf eine maternal-spezifische Methylierung des DMR1 hin. Für das paternale Allel konnte weder in ES-Zellen noch in Testis methylierte CpGs nachgewiesen werden. Diese Daten sind im Einklang mit Daten von Shemer *et al.*, 1997, die zeigen, daß der DMR1-Locus bereits in der Oocyte methyliert wird und einer genomweiten Demethylierung in der Zygote entgehen kann (siehe auch Abb. 74).

Im Gegensatz zum DMR1 erwiesen sich alle Gene 5' zum Imprinting-Center als hypomethyliert. Trotz geringfügiger Schwankungen zwischen den untersuchten ES-Zelllinien ließ sich dieses Methylierungsmuster in allen Zelllinien reproduzieren. Je weiter sich ein Gen vom DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens entfernt befindet, desto niedrigere Methylierungsgrade wurden in den ES-Zellen beobachtet. Da all diese Gene in den

gleichen Mausstämmen, aus denen die ES-Zellen generiert wurden in Gehirn-Gewebe ein allespezifisches "Imprint" aufweisen (siehe Abb. 73), muss ihre Prägung nach der Implantation erfolgen.

Die hier dargelegten Daten deuten darauf hin, daß das primäre Methylierungs-"Imprint" vom DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens in die benachbarten chromosomalen Bereiche hineinwandert. In Abbildung 74 wird ein Modell vorgestellt, welches die vermutete Methylierungs-Dynamik gametisch geprägter und nicht-geprägter Gene um den *Snurf/Snrpn* Imprinting-Center herum beschreibt. Die ES-Zell Methylierungsmuster unterstützen eine "Position-Effect" Theorie von Greally *et al.*, (1999), die besagt, daß die gametische Prägung ausgehend vom *Snurf/Snrpn*-Promotor (innerhalb des DMR1-Bereich) mittels Heterochromatininformation in die benachbarten Genbereiche einwandert. Nach diesem Modell befindet sich da paternale Allel ab der Spermatogenese in einer Euchromatinstruktur, während das maternale Allel am DMR1 durch "matrix attachment sites" (MARs) in eine Heterochromatin-Struktur gedrängt wird.

Bevor das "Imprint" für diese chromosomale Region etabliert werden kann, muss das parentale "Imprint", d.h. die Methylierung des maternalen Allels, in den jeweiligen Gameten gelöscht und neu "programmiert" werden. Die Löschung ist nach etwa Tag 12-13 der Embryonalentwicklung abgeschlossen (Brandeis *et al.*, 1993). Keimbahnzellen, die aus dieser Phase heraus kultiviert werden, besitzen eine umfangreiche Demethylierungs-Aktivität, wenn sie mit somatischen Zellen fusioniert werden (Tada *et al.*, 1997). Nach der Löschung des "Imprints" beginnt schon während fötaler Stadien eine *de novo* Methylierung, die bis nach der Geburt in den Gameten beibehalten wird (Kafri *et al.*, 1992). Differentiell methylierte Regionen (DMRs) wie der DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens scheinen in den Gameten entweder einer besonders spezifischen *de novo* Methylierung zu unterliegen, oder sie sind von einer allgemeinen genomweiten Methylierung in nicht-prägenden Gameten geschützt (Übersicht in Reik & Walter, 2001). Für *Snrpn* wurde zuvor ein zweiter DMR-Bereich (DMR2) beschrieben (Shemer *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeitsgruppe konnte in den hier untersuchten ES-Zellen und Maus-Geweben kein uniparentale Methylierungs-"Imprint" nachgewiesen werden (siehe Abb. 73). Die beobachtete Hypermethylierung in den drei ES-Zelllinien könnte auf eine *de novo* Methylierung des DMR2 in Spermien hindeuten, die in der Zygote beibehalten wird. In der Tat konnte eine beträchtliche Methylierung des DMR2 bereits in Spermien nachgewiesen werden (siehe Abb. 73). Die Daten von Shemer *et al.*, (1997), zeigten zudem, daß CpG-Dinukleotide des DMR2 zu Anfang der Spermatogenese und Oogenese methyliert werden, jedoch während der Reifung der

Oocyten diese Methylierung wieder partiell verloren geht. Die hier erzielten Ergebnisse bestätigen vielmehr Daten von Blaydes *et al.*, (1999), die in hybriden Mäusen ein biparentales Methylierungsmuster innerhalb des DMR2 feststellen konnten.

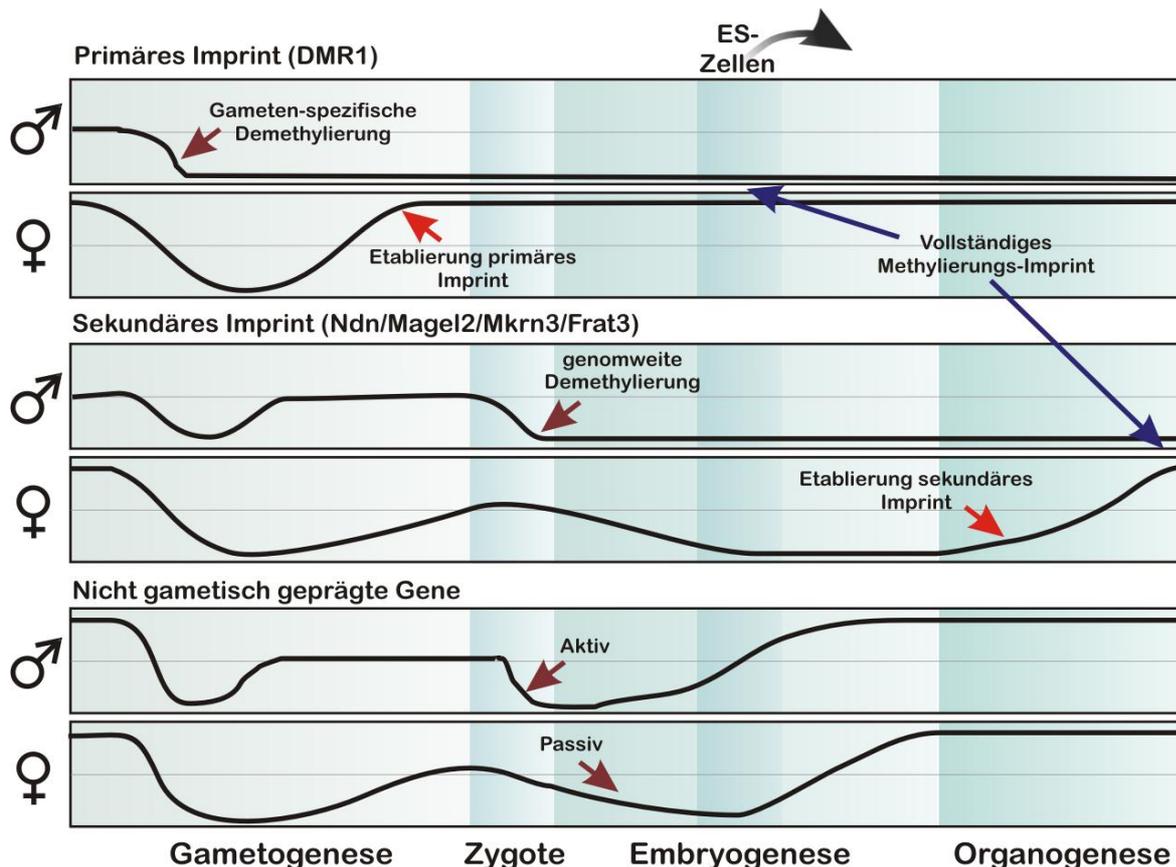


Abb. 74: Modell der Etablierung und Erhaltung der allelspezifischen Methylierung innerhalb der *Snurf/Snrpn*-Region auf Mausemchromosom 7C. Der Methylierungsgrad ist durch eine Kurve dargestellt (Hypermethylierung = Berg, Hypomethylierung = Tal). Die Säugetierzelle unterscheidet in der Etablierung von Methylierungsmustern zwischen primären "Imprint", sekundären "Imprint" und nicht geprägten Sequenzbereichen. **Oben:** In der Oocyte wird der Promotor-Bereich des *Snurf/Snrpn*-Gens (DMR1) maternal geprägt. Diese Methylierung fungiert in der Zygote als primäres "Imprint" und entgeht einer genomweiten Demethylierung. Während des Blastocystenstadiums, wenn die ES-Zellen aus dem Embryo gewonnen werden, ist bereits ein vollständiges Methylierungs-"Imprint" vorhanden. Die Etablierung des Gameten-spezifischen Imprints geschieht zeitlich asynchron. Während das paternale "Imprint" früh in der Gametogenese entwickelt, findet sich das maternale "Imprint" erst in der reifen Oocyte. **Mitte:** Die gametisch geprägten Gene außerhalb der DMR1-Region verlieren ihre Prägung während einer Gameten-spezifischen Demethylierung. In einer zweiten "Welle" genomweiter Demethylierung in der frühen Zygote werden weitere mögliche Methylierungsreste entfernt. Erst während der späten Organogenese (für diesen Genbereich speziell in der Neurogenese) erhalten die Gene (*Ndn*, *Magel2*, *Mkrn3* und *Frat3*) ihre allelspezifische Methylierung (sekundäres "Imprint"). **Unten:** Nicht geprägte Gene verlieren ihre Methylgruppen vor der Implantation nahezu vollständig. Alle maternalen Allele (auch die gametisch geprägten Gene) verlieren ihre Methylierung durch einen passiven Mechanismus, d.h. durch fehlende Erhaltungsmethylierung während der Zellteilung, während das jeweils paternale Allel aktiv demethyliert wird. Nach der Implantation werden die neuen (biparentalen) Methylierungsmuster neu etabliert.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden *Snrpn*-DMRs lässt sich möglicherweise durch ihre Struktur erklären. DMR1 entspricht einem "typischen" DMR (Übersicht in Reik & Walter, 2001), weil er eine sehr hohe CpG-Dichte enthält, welche das Kriterium für ein "CpG-Island" erfüllt. Hingegen besitzt der DMR2 nur wenige CpG-Dinukleotide. Autosomale "CpG-Islands" werden aber in der Regel nicht methyliert. Es ist daher davon auszugehen, daß der DMR1 epigenetisch so modifiziert wird, daß eine *de novo* Methylierung eintreten kann. Interessanterweise ist eine Vielzahl der bekannten DMRs eng mit repetitiven Sequenzen der LINE-Familie assoziiert. Auch im *Snurf/Snrpn*-Bereich finden sich diese LINE-Sequenzen. Es konnte gezeigt werden, daß repetitive Sequenzen in verschiedenen Organsimen ein epigenetisches Ziel darstellen, die zur Heterochromatisierung des lokalen DNA-Bereichs führen kann (Dorer & Henikoff, 1994). Die Hypomethylierung der *Snrpn*-assoziierten LINE-Sequenzen, wie sie in dieser Arbeit für ES-Zellen präsentiert wurden (siehe Abschnitt 4.4.2.), könnte ein Anzeichen für eine Heterochromatinstruktur in deren Genbereich sein. Die Heterochromatisierung könnte wiederum eine Methylierung des assoziierten DMRs bedingen und während der neuronalen Entwicklung allelspezifisch in die benachbarten Genbereiche (z.B. in das *Ndn*-Gen) einwandern. Ein typisches Merkmal solcher Gameten-spezifischen Heterochromatinbereiche ist eine asynchrone Replikation zwischen maternalen und paternalen Allel in der S-Phase des Zellzyklus, wie sie auch für die gesamte *Snurf/Snrpn*-Region nachgewiesen wurde. Es gibt Hinweise darauf, daß solche epigenetischen Modifikationen einer DNA-Methylierung (zumindestens in Oocyten) voraussehen (Simon *et al.*, 1999).

Wie wird aber das primäre Methylierungs-"Imprint" nach der Befruchtung erhalten? Da die dem DMR1 umgebenen Sequenzbereiche bis ins Blastocystenstadium demethyliert werden, muß das primäre "Imprint" nur im DMR1 selber gesichert werden. Die beiden parental Genome sind während der sehr frühen Embryonalentwicklung noch durch ihre Pronuklei räumlich getrennt (Mayer *et al.*, 2000) und unterscheiden sich in ihrer Chromatinstruktur (Schweizer *et al.*, 1999). Das paternale Allel wird schnell durch einen aktiven Prozess demethyliert, während das maternale Allel wahrscheinlich durch Ausschluß der Methyltransferase aus dem Nukleus während der Zellteilungen allmählich seine Methylierung verliert (Carlson *et al.*, 1992). Der DMR1 muß dieser passiven Demethylierung entgehen. Ein möglicher Schutz (Histonmodifikationen, Chromatin-Modellierung oder Proteinbindung) könnte während der Oocytenentwicklung manifestiert werden. Ein Kandidat für dieses Schutzmechanismus ist die allelspezifische Histon H3- und H4-Methylierung und Acetylierung des DMR1

(Xin *et al.*, 2001; Saitoh & Wada, 2000), die eine allelspezifische Chromatinpackung initiiert.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus den Methylierungsdaten der ES-Zellen ist, daß die gametisch geprägten Gene stromaufwärts der *Snurf/Snrpn*-Region ihre Prägung (hier als sekundäres "Imprint" bezeichnet) erst nach der Implantation erhalten. Viele Studien deuten darauf hin, daß dieses "Imprint" möglicherweise erst während der späten Gehirnentwicklung (d.h. im adulten Gehirn) vollständig etabliert ist (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Die zeitliche Regulation der mit der Prägung verbundenen allelspezifischen Expression korreliert mit der neuronalen Funktion der beteiligten Gene. Wie sich das sekundäre "Imprint" entwickelt, konnte nicht festgestellt werden, aber mehrere epigenetische Mechanismen sind denkbar (für Details siehe Übersicht über epigenetische Mechanismen in Reik & Walter, 2001; Brannan & Bartolomei, 1999).

Der Mechanismus, der für die Etablierung der gametischen Prägung um den *Snurf/Snrpn*-Locus verantwortlich ist, scheint sich jedoch in der evolutiven Entwicklung zwischen Mensch und Maus verändert zu haben (Blaydes *et al.*, 1999; El-Maarri *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu der Situation Maus-Oocyten ist der DMR1 in Oocyten des Menschen hypomethyliert. Demnach muss das maternale "Imprint" im Menschen entweder während der sehr späten Ovulation initiiert werden oder gar erst nach der Befruchtung, wenn die beiden parentalen Allele noch durch ihre Pronuklei voneinander getrennt sind.

5.2.3 Expression und Methylierung der gametisch geprägten Gene während der Neurogenese

Es konnte festgestellt werden, daß die in den ES-Zellen durch Staurosporin induzierte Neurogenese während der untersuchten Zeitspanne von 14 Tagen weder im *Ndn*-Gen noch im DMR1 eine deutliche Veränderung des Methylierungsmusters auslöst. Lediglich für den DMR1 konnte eine kaum als signifikant anzusehende Demethylierung von etwa 4-7% beobachtet werden. (Tab. 12; dieser Prozentsatz liegt im möglichen Fehlerbereich der densitometrischen Nachweismethode). Dennoch zeigte sich, daß während der STS-Induktion zumindestens die Expression der *Snurf/Snrpn*-Transkripte anstieg (die Expression des *Ndn*-Gens wurde nicht analysiert). Diese Daten scheinen auf dem ersten Blick unerwartet, da eine Methylierung des *Snurf/Snrpn*-Promotors (DMR1) ursächlich mit der Expressionskontrolle zu korrelieren scheint (Glenn *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 1997; Saitoh & Wada, 2000; Bressler *et al.*, 2001; Hershko *et al.*, 2001). Im

Säugetiergehirn wird jeweils das hypomethylierte *Snurf/Snrpn*-Allel exprimiert, während die Methylierung auf dem maternalen Allel die Transkription unterbindet. Der beobachtete Expressionsanstieg in den STS-behandelten ES-Zellen kann mehrere Ursachen haben. Zum einem scheint der eigentliche Promotor des *Snurf/Snrpn*-Gens nur ein minimaler Abschnitt (160 Bp) des DMR1 zu sein (Hershko *et al.*, 2001), so daß die weitreichende Methylierung innerhalb des DMR1-Bereichs nicht notwendigerweise mit der Aktivität des Promotors korreliert. Zudem zeigte eine *in vitro* Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide mit der Methyltransferase SssI, welche alle CpGs methyliert, und den CpG-spezifischen Methyltransferasen HhaI und HpaII in HEK-293 Zellen, daß nur wenige CpGs an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind (Hershko *et al.*, 2001). So konnte eine Methylierung des *HpaII*-CpGs in Exon 1 (siehe Abb. 49 und Abb. 75) und der *HhaI*-CpGs Hh2 und Hh3 den Promotor nicht inaktivieren. Vielmehr erwies sich ein einzelnes *HhaI*-CpG-Dinukleotid als kritisch für die Promotorfunktion. Die Stabilität der Methylierung in den analysierten ES-Zellen konnte jedoch nur für die *HpaII*-CpGs innerhalb des DMR1 nachgewiesen werden. Eine mögliche Demethylierung des *HhaI*-CpGs Hh1 könnte nur durch eine aufwendige Bisulfit-Sequenzierung ermittelt werden.

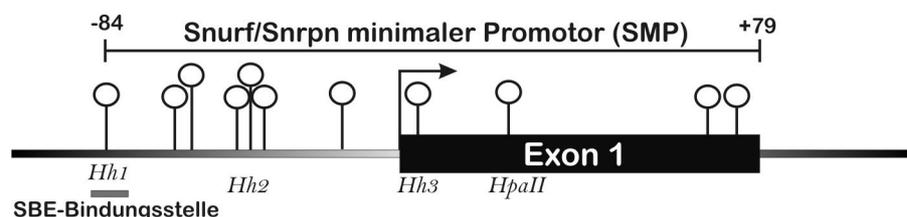


Abb. 75: Minimaler Promotorbereich des *Snurf/Snrpn*-Gens in Maus (nach Hershko *et al.*, 2001). Die Methylierung eines einzelnen CpGs (Hh1), welches sich im Bereich einer Protein-Bindungsstelle (SBE) befindet, unterbindet die Aktivität des Promotors.

Die "Imprinting"-Kontrolle der gametisch geprägten Region wird zudem nicht alleine vom minimalen Promotor (SMP) gesteuert (Shemer *et al.*, 2000); eine weitere Transkriptionskontrolle scheint auch über *cis*-Sequenzen 5' zum DMR1 ausgeübt zu werden. Eine Protein-Bindungsstelle (SBE) um das CpG Hh1, die eine Transkription in Maus möglicherweise beeinflusst, ist zwischen Maus und Mensch zudem nicht konserviert. Dies ist als Hinweis zu deuten, daß weitere Sequenzabschnitte in der Transkriptionskontrolle beteiligt sind.

Eines dieser möglichen Elemente liegt wahrscheinlich >50 kBp telomerisch zum SMP, da mehrere 5'-Exons des *Snurf/Snrpn*-Gens existieren (U1 und U2, siehe Abb. 49B), die wahrscheinlich nicht unter der Kontrolle des SMP stehen. Auch diese Exons werden im Mausgehirn exprimiert (U1 siehe Abb. 66b; Daten für U2 nicht gezeigt) und während der STS-Behandlung vom nicht-transkribierten Zustand in den transkribierten Zustand

überführt. Da diese Transkripte direkt an Exon E2 des *Snurf/Snrpn*-Gens gespleißt werden, könnte ein weiteres Promotor- oder Enhancer-Element, welches die U-Exons kontrolliert auch die Transkription der übrigen Exons beeinflussen. Da bisher keine Funktion der 5'-Exons bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die RNAs dieser Exons im "Imprinting"-Prozess beteiligt sind. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für 5'-Exons im orthologen Bereich im Menschen postuliert (Färber *et al.*, 1999).

Der DMR1 im Menschen ist Teil des PWS-SRO Imprinting-Centers und ist wahrscheinlich für eine Erhaltung des paternalen Methylierungs-"Imprints" im adulten Organismus verantwortlich (Bielinska *et al.*, 2000). Geht man davon aus, daß die homologe Mausequenz auch das paternale Allel in Maus hypomethyliert hält, wäre ein stabiles Methylierungsmuster des DMR1 und umgebenden Sequenzen auch während der Neurogenese zu erwarten. Man kann daher annehmen, daß neben der DNA-Methylierung auch andere epigenetische Modifikationen die Expression und das "Imprint" der *Snurf/Snrpn*-Region steuern. So konnte gezeigt werden, daß die Acetylierung bestimmter H4-Histone im DMR1 direkt mit einer Aktivierung der *SNURF/SNRPN*-Expression assoziiert ist (Saitoh & Wada, 2000).

Es ist auch unklar, ob die durch Staurosporin aktivierte Neurogenese der neuronalen Entwicklung *in vivo* ähnelt. Es ist nicht auszuschließen, daß die Expression der gametisch geprägten Region auf Mausechromosom 7C im frühen Embryo über andere Mechanismen reguliert wird. So wäre es auch denkbar, daß Staurosporin lediglich den Abbau der mRNAs inhibiert oder Imprinting-Mechanismen umgehen kann.

Vor Einleitung der Neurogenese konnte eine sehr schwache Expression des *Snrpn*-Transkripts in den ES-Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten sind im Einklang mit Expressionsstudien an Maus Präimplantationsembryos, die eine Expression des *Snrpn*-Transkriptes vom paternalen Allel zeigten (Szabo & Mann, 1995). Obwohl das *Snrpn*-Transkript mit dem *Snurf*-Transkript eine bicistronische Einheit bildet (Gray *et al.*, 1999), konnten in den analysierten ES-Zellen wesentlich mehr *Snurf*-mRNAs identifiziert werden (siehe Abb. 66C). Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären? Einerseits ist es leicht möglich, daß die Transkription in der Mehrheit der Fälle nach Exon 3 (also nach Vollendung des *Snurf*-Transkriptes) abbricht. Andererseits wurde berichtet, daß die homologen *SNRPN*-Transkripte im Menschen äußerst instabil sind (Huntriss *et al.*, 1998). Demnach könnte zur Zeit der RNA-Extraktion schon ein Großteil der *Snrpn*-Transkripte degradiert sein. Eine Funktion für die vornehmlich gehirnspezifischen *Snurf/Snrpn*-Transkripte im frühen Embryo/ES-Zellen ist jedoch nicht bekannt.

Wie bereits erwähnt, bleibt auch das Methylierungsmuster des *Ndn*-Gens während der induzierten Neurogenese stabil. Diese Daten unterstreichen die Vermutung, daß die Ausbreitung des Methylierungs-"Imprint" erst im adulten Mausgehirn vollendet ist. Möglicherweise können auch einzelne Neuronen in der Zellkultur nicht die epigenetischen Veränderungen so ausprägen, wie während der *in vivo* Neurogenese beobachtet, da auch die Expression (und damit eventuell auch die Methylierung) im Säugetiergehirn kompartimentiert ist (siehe Abb. 81).

5.2.4 Epigenetische Stabilität der gametischen Prägung

Mit dem Beginn des 21. Jahrhunderts erreichte die Gentechnik ein Stadium, durch das es gelang, das Säugetiergenom auf bisher nicht machbaren Ebenen der Entwicklung zu modifizieren und manipulieren. So sind somatisches Klonen von Säugetieren, Klonen durch ES-Zell Kerntransfer, *in vitro* Fertilisationen (IVF) und intra-cytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI) Gegenstand der allgemeinen Aufmerksamkeit geworden. Zeitgleich mit der Entwicklung dieser Techniken häuften sich jedoch auch Berichte, die zeigten, daß abhängig von der verwendeten Prozedur und involvierten Spezies, Umwelteinflüsse dramatisch die Entwicklung der manipulierten Embryos bis ins adulte Lebewesen beeinträchtigen können (Walker *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1998; Sinclair *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 2001; Humpherys *et al.*, 2001). Obwohl die phänotypischen Anomalien zwischen den einzelnen Säugetier-Spezies variieren, wird als weit verbreitete Ursache eine gestörte gametische Prägung einiger Gene vermutet. Es wird angenommen, daß ein wesentlicher Faktor für eine Deregulation der gametischen Prägung durch die *in vitro* Kultur der manipulierten Zellen gegeben ist. Alle Klonierungs- und Fertilisations-Methoden benötigen jedoch eine zeitweise Kultur der Zellen außerhalb des natürlichen Organismus. Auch während der *in vitro* Fertilisation im Menschen müssen die reifen Oocyten teilweise bis zum Blastocystenstadium in Kultur gehalten werden. Gehäufte Berichte über Säuglinge, die mittels IVF gezeugt wurden und ein verringertes Geburtsgewicht aufwiesen, wurden ursächlich mit der *in vitro* Methodik in Verbindung gebracht (te Velde *et al.*, 1998; van Steirteghem, 1998; Khosla *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2001). Längere Kultur von Säugetierembryos resultierten nachweislich in abnormalem Geburtsgewicht, fötalem und perinatalem Tod sowie Skelett- und Organ-Anomalien (Walker *et al.*, 2000; Sinclair *et al.* 2000). Auch somatisches Klonen benötigt eine *in vitro* Kultur nach dem Transfer des somatischen Zellkerns in eine entkernte Oocyte (McLaren, 2000). Sowohl in geklonten Schafen und Rindern als auch in Mäusen wurden gehäuft morphologische Anomalien identifiziert.

Ein abnormales fötales Wachstum und perinataler Tod wurde zudem als Konsequenz von Kultur-induziertem Verlust der Pluripotenz und der gametischen Prägung in ES-Zellen beschrieben (Nagy *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 1998).

In ES-Zellen und ES-Zell-abgeleiteten Klonen wurden epigenetische Veränderungen für die gametisch geprägten Gene *Igf2*, *H19*, *U2af1-rs1*, *H19*, *Peg1/Mest* und *Meg1/Grb10* beschrieben (Humpherys *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 1998). Es sind jedoch keine Daten für die epigenetische Stabilität in der *Snurf/Snrpn*-"Imprinting" Region bekannt. Aufgrund der Vielzahl von gametisch geprägten Genen, die durch *in vitro* Kultivierung in ihrer Prägung gestört werden, wurde eine allgemeine Instabilität der epigenetischen Muster in ES-Zellen postuliert (Humpherys *et al.*, 2001). Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde untersucht, ob auch die *Snurf/Snrpn*-Imprinting Region durch eine *in vitro* Kultur beeinflusst werden kann, und ob die gametische Prägung um das *Snurf/Snrpn*-Gen herum *per se* stabil ist. Verschiedene Einflüsse auf das "Imprint" in embryonalen Stammzellen wurden analysiert (siehe Abschnitt 4.2.5.1).

Es zeigte sich in fast allen Experimenten eine überaus hohe Stabilität des Methylierungs-"Imprints". So konnte gezeigt werden, daß die Methylierung für die gametisch geprägte Region, exemplarisch demonstriert anhand des *Ndn*-Gens, auch nach über 30 Zellkultur-Passagen nahezu unverändert blieb. Dieses Resultat deutet nicht auf eine allgemeine epigenetische Instabilität in ES-Zellen hin. Zudem muss angemerkt werden, daß die Kultivierung der Zellen in einem Medium durchgeführt wurde, welches nicht speziell für ES-Zellen entwickelt wurde. Während der Reifung des frühen Embryos im Ovidukt herrschen jedoch sehr spezielle Umgebungsbedingungen, die *in vitro* kaum reproduziert werden können.

Die ES-Zellen tolerierten auch eine hohe Serumkonzentration ($\geq 15\%$ FCS), ohne ihr "Imprint" zu verändern, obwohl eine Deregulierung des Methylierungs-"Imprints" für andere Gene in ES-Zellen durch hohe Serumkonzentrationen (ab 5%) nachgewiesen wurde (Khosla *et al.*, 2001). Es ist jedoch möglich, daß stringenter Kulturbedingungen auch die Prägung des *Ndn*-Gens beeinflussen könnte. So wurde vermutet, daß durch Einfrieren von ES-Zellen und frühen Embryonen die natürliche Methylierung geschädigt wird (Dulioust *et al.*, 1995). Die hier untersuchten ES-Zellen wurden jedoch kontinuierlich passagiert, ohne die Zellen zwischen den Vermehrungsphasen einzufrieren. Im Kontext der Methylierungs-Dynamik (siehe Abschnitt 5.2.1) erscheint die Stabilität des "Imprints" jedoch weniger überraschend. Zum Zeitpunkt der ES-Zell-Passagierung ist das primäre "Imprint" bereits etabliert. Das bedeutet, daß möglicherweise Modifikatoren, die auf die epigenetische Struktur einwirken könnten, zu diesem Zeitpunkt in der Zelle nicht mehr exprimiert werden. Erst später, während der

neuronalen Entwicklung, setzen erneut epigenetische Mechanismen ein. In diesem Punkt unterscheidet sich die *Snurf/Snrpn*-Region deutlich von den anderen Genen, bei denen eine epigenetische Instabilität beobachtet werden konnte. Praktisch alle Gene, für die eine Modifikation in Methylierungsgrad und Expression während der *in vitro* Kultur beobachtet wurde, sind am Wachstum einer Zelle beziehungsweise am Wachstum des Embryos beteiligt. Dadurch sind diese Gene auch während der Stammzellkultur aktiv und wahrscheinlich epigenetisch variabel sind. Ein weiterer Grund für die hohe Stabilität des "Imprints" in der untersuchten Region könnte darin begründet sein, daß der DMR1-Bereich des *Snurf/Snrpn*-Gens aktiv das paternale Methylierungs-"Imprint" kontrolliert und reguliert. Studien an einem Prader-Willi Patienten, der mosaik für eine Maus-DMR1 analoge Deletion des (PWS-SRO) ist, deuten darauf hin, daß dieser Teil des Imprinting-Centers in der Tat postzygotisch die Prägung des Chromosoms aktiv erhält (Bielinska *et al.*, 2000).

Wie aber verhält sich das "Imprint" in einzelnen Zellen, beziehungsweise in Klonen, die aus einzelnen Stammzellen gewonnen wurden? Da klonierte Organismen nur von einer Zelle abgeleitet sind, wirkt sich eine epigenetische Instabilität stärker aus, als wäre eine multizellulärer Genpool Quelle für die Entstehung eines Embryos. Zur Analyse der gametischen Prägung in ES-Zellklonen, die aus einzelnen ES-Zellen entstanden, wurden zehn Bruce4-Zelllinien aus jeweils einzelnen, isolierten Zellen generiert. Die Untersuchung der Methylierung wurde zudem auf den DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens ausgedehnt. Es zeigte sich, daß auch die Methylierung der *Snurf/Snrpn*-Region in einzelnen ES-Zellklonen äußerst stabil war. Sowohl der DMR1 als auch das *Ndn*-Gen war in allen untersuchten Klonen identisch und damit in ihrer epigenetischen Stabilität von anderen gametisch geprägten Genen (z.B. *H19* oder *Peg1*; Humpherys *et al.*, 2001) unterschiedlich. Es ist somit festzustellen, daß epigenetische Charakteristika einer gegebenen chromosomalen Region nicht notwendigerweise instabiler sind als in anderen, nicht gametisch geprägten Genen.

Wie verhält sich die gametische Prägung, wenn Fremd-DNA in Form eines Transgens in ein etabliertes Genom eingeführt wird? Diese Frage ist im Bezug auf Manipulationen des Erbguts in ES-Zellen von großer Bedeutung. Vorherige Arbeiten aus diesem Labor zeigten, daß die Integration von Fremd-DNA in ein Wirts-Genom die Methylierung im Wirtsgenom, auch abseits des Integrationsortes, verändern kann (Heller *et al.*, 1995; Übersicht in Doerfler *et al.*, 2002). Besonders die Integration größerer Transgene, die bevorzugt mit mehreren Kopien als repetitive Einheit in das Säugetiergenom integrieren, können eine epigenetische Veränderung des Wirts-Genom auslösen (Übersicht in Schumacher 1998; Schumacher *et al.*, 2000). Es wurde auch von Transgenen berichtet,

die unabhängig von ihrem Integrationsort selber eine gametische Prägung annehmen (Allen *et al.*, 1990; Surani *et al.*, 1990). Um zu untersuchen, ob eine Transgen-Insertion in Maus ES-Zellen das "Imprint" um *Snurf/Snrpn* beeinflussen kann, wurde das Methylierungsmuster des *Ndn*-Gens in zwei transgenen ES-Zelllinien untersucht (Details siehe Abschnitt 4.2.5.2). Wiederum konnte keine Instabilität der gametischen Prägung beobachtet werden. Wie für die nicht-transgenen ES-Zelllinien beschrieben, blieb auch das "Imprint" in den SV40- und Adeno-transfizierten ES-Zelllinien mit wachsender Passagenzahl (>P29) konstant. Der Integrationsort der beiden Transgeneinheiten ist nicht lokalisiert; durch das Fehlen von Transgen-Einflüssen *in cis* ist es aber unwahrscheinlich, daß sie innerhalb der geprägten Region um *Snurf/Snrpn* integrierten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Integration in einen für das "Imprint" kritischen Bereich auch das "Imprint" *in trans* beeinflussen könnte. Eine Veränderung des "Imprints" *in trans* könnte durch eine Insertions-Inaktivierung sog. Modifier-Gene verursacht werden (Übersicht in Schumacher *et al.*, 2000) oder durch eine Störung eines Imprinting-Center Elements durch eine Transgen-Insertion in oder nahe des IC. Kürzlich wurde auch von einem genomweiten Imprintingdefekt berichtet, der die gametische Prägung über das gesamte menschliche Genom (einschließlich des DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens) *in trans* veränderte (Judson *et al.*, 2002). Mechanismen dieser epigenetischen Krankheit sind bisher nicht bekannt, jedoch deuten erste Anzeichen auf einen Imprinting-Mechanismus hin, der in der Oocyte ein maternales "Imprint" *in trans*, vorzugsweise in DMRs, initiieren kann.

Eine anderer genomweiter Einfluss auf Methylierungsmuster, besonders gametisch geprägter Gene, entsteht dann, wenn eine Zelle tumorigen wird (Hashimoto *et al.*, 1995; Miura *et al.*, 1999; Übersicht in Baylin & Herman, 2000). In vielen Tumoren verlieren die Gene ihre allelspezifische Methylierung (*loss of imprinting*, LOI), und ihre Expression wird unterbunden. Nun konnte festgestellt werden, daß auch das *Ndn*-Gen in Tumoren sein epigenetisches Methylierungsmuster verliert. In zwei Tumoren aus zwei Tieren unterschiedlichen genetischen Hintergrundes erwies sich das Gen als hypermethyliert (>90%) für beide Allele (siehe Abschnitt 4.2.5.3). Offensichtlich kann der DMR1 in diese Zellen das paternale Allel nicht weiter in einem demethylierten Zustand halten. Es gibt Hinweise darauf, daß Zellen, wenn sie tumorigen werden ein "Imprint" reprogrammieren (Tada *et al.*, 1998). Als Mechanismus wurde eine anfängliche Demethylierung in Tumoren, gefolgt von einer *de novo* Methylierung der gametisch geprägten Gene *H19* und *Snurf/Snrpn*, postuliert (Miura *et al.*, 1999). Der Methylierungsstatus des *Snurf/Snrpn*-Gens in den untersuchten Maus-Tumoren konnte aufgrund zu geringer DNA-Mengen jedoch nicht analysiert werden. Erwähnenswert ist

die deutliche Hypermethylierung des *Ndn*-Gens, da die Hypermethylierung in Tumoren ein wiederkehrendes Merkmal von Tumor-Suppressor Genen ist. Auch *Ndn* besitzt *in vivo* eine wachstumshemmende Funktion indem es den post-mitotischen Wachstumsstop in Neuronen initiiert.

Ob eine kausaler Zusammenhang zwischen Hypermethylierung des *Ndn*-Gens und seiner Funktion als Wachstums-Supressor existiert ist unbekannt, jedoch wurde bei Prader-Willi-Patienten mit einem falsch geprägten oder deletiertem Chromosom 15q11-13 (inkl. *Ndn*-Gen) überdurchschnittlich häufig eine Tumorbildung diagnostiziert (Cassidy *et al.*, 1999).

5.3 Theoretische Aspekte der epigenetischen Mechanismen in der *Snurf/Snrpn*-Region

5.3.1 Epigenetik der IC-Elemente AS-SRO und PWS-SRO im Kontext der Imprinting-Theorie

Die Identifizierung von Mikrodeletionen in PWS- und AS-Patienten führte zur Definition eines "Imprinting-Centers" (IC) mit einer zweigeteilten Struktur (siehe Abb. 31), welcher die gametische Prägung einer Reihe von Genen auf 15q11-q13 während der Gametogenese steuert. Mutationen des centromeren Teils des IC (AS-SRO) unterbinden den paternalen → maternalen "Imprint"-Wechsel während der weiblichen Gametogenese, während Mutationen die den telomeren Anteil betreffen (PWS-SRO) die maternale → paternale "Imprint"-Erhaltung blockieren (Buiting *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 1994; Saitoh *et al.*, 1996; El-Maarii *et al.*, 2001).

Nachkommen, die diese nicht reprogrammierten Chromosomen von ihren Eltern erben, besitzen entweder zwei maternale Epigenotypen (PWS-Phänotyp) oder haben einen paternalen Epigenotyp auf ihrem maternal vererbten Chromosom (AS-Phänotyp).

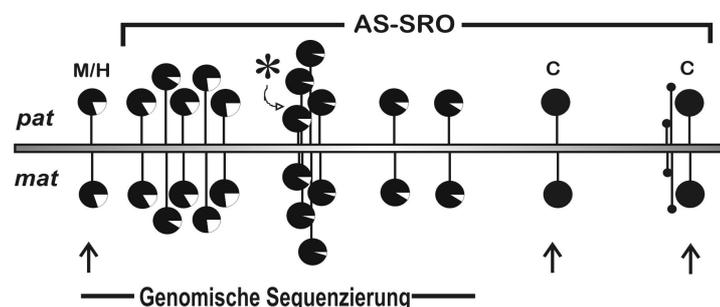


Abb. 76: Methylierung des gesamten AS-SRO. Das paternale und das maternale Allel sind nahezu identisch methyliert. Für das CpG #1 existieren Vergleichsdaten aus Southern-Experimenten (Schumacher *et al.*, 1998). Für die CpG-Dinukleotide #13 und 16 sind nur Daten aus Southern-Experimenten verfügbar (Pfeile). Die CpGs #1-12 wurden genomisch sequenziert, für die CpGs #14 und #15 existieren keine Methylierungsdaten. (Kreisfüllung = Methylierungsgrad).

Die Suche nach einem Modell, welches adäquat das Verhalten des IC beschreibt, ähnelt der Untersuchung einer kriminellen Tat; viele Puzzleteile müssen zusammengetragen werden um das Rätsel zu lösen. "It is an old maxim of mine that when you have excluded the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth." (Sir Arthur Conan Doyle, 1892). Nun, was kann man ausschließen? Dazu muss man zuerst mehr über die epigenetischen Eigenschaften der IC-Elemente selbst kennen. Diese Arbeit konnte zeigen, daß der AS-SRO, entgegen einiger Erwartungen (Tilghman *et al.*, 1998), biparental geprägt (siehe Abb. 76) ist und damit wahrscheinlich nicht das primäre "Imprint" der Region um *SNURF/SNRPN* darstellt. Die Untersuchung der Methylierung des DMR1 in Maus (DMR1 ist Teil des PWS-SRO in Mensch) zeigte, daß ein primäres Methylierungs-"Imprint" wahrscheinlich vom DMR1 des *Snurf/Snrpn*-Gens während der Embryogenese in benachbarte Chromosomen-Bereiche einwandert.

Wie sind diese Daten mit den gängigen Modellen in Einklang zu bringen?

Ein Modell basiert auf der Feststellung, daß in allen AS-Patienten, für die eine IC-Deletion diagnostiziert wurde, das stromaufwärts liegende *SNURF/SNRPN*-Exon u5 betroffen war (Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999). Somit könnte das Exon u5 oder ein dem Exon nahe gelegenes Element innerhalb der 880-Bp Region des AS-SRO für den "Imprint"-Umschaltung relevant sein. Computerunterstützte Analysen der AS-SRO Region (siehe Abschnitt 4.2.1.8, Abb. 39) zeigten nun aber, daß das Exon u5 lediglich ein Teil einer Primaten-spezifischen repetitiven Sequenz (MER5A) darstellt und somit kaum als zentrales Element des IC gelten kann. Obwohl bisher außerhalb der Primatenlinie kein dem AS-SRO (und Exon u5) analoge Sequenzeinheit identifiziert werden konnte, ist eine Beteiligung dieser Sequenz am Imprinting-Prozeß nicht zu erwarten. Einerseits ist diese Sequenz erst nach der Aufspaltung von Rodentia und Primaten entstanden, andererseits ist die MER5A-Sequenz äußerst instabil (transponierendes Element) und zahlreich im menschlichen Genom vertreten.

Durch eine detailliertere Analyse der AS-SRO-Sequenz wurde eine Region identifiziert, die ein größeres Potential besitzt, die regulatorische Einheit des AS-SRO zu sein. Diese als TFI-Domäne (*theoretisch funktionale "Imprint"-Domäne*) bezeichnete Sequenz ist etwa 150 Bp groß und enthält als einziger Abschnitt innerhalb des kritischen AS-SRO-Bereichs keine bekannte Polymorphismen oder repetitive Elemente (siehe Abb. 39). Die Suche nach homologen Sequenzabschnitten zum TFI in Mensch und Maus erbrachte zwei Homologie-Bereiche (Homolog A [Mensch] und Homolog B [Maus]). Überraschenderweise lagen beide Sequenzhomologien innerhalb der jeweiligen gametisch geprägten Regionen um *Snurf/Snrpn*. Eine Kartierung des Homologs A

zeigte eine Lokalisation zwischen den maternal exprimierten Genen *UBE3A* und *ATP10C* (siehe Abb. 40).

Die Lokalisation von Homolog A löst die Entstehung eines breiten Spektrums an Hypothesen aus. Da der AS-SRO das "Imprint" der maternal exprimierten Gene bedingt, ist es möglich, daß der AS-SRO ursprünglich im Bereich dieser maternalen Gene zu finden war. Nach dieser Theorie könnte die beobachtete Sequenz entweder eine Kopie "Pseudo-AS-SRO" sein oder einen rudimentären Teil des ursprünglichen, z.B. durch Inversion oder Translokalisierung versetzten AS-SRO darstellen. Eine andere Möglichkeit wäre eine noch vorhandene Funktion des Homologs A im "Imprinting"-Prozeß. Es existieren einige Befunde über Angelman Patienten mit "Imprinting"-Defekten, bei denen keine Deletion im AS-SRO gefunden werden konnten. Möglicherweise könnte diese Sequenz in *cis* das "Imprint" der maternal geprägten Gene beeinflussen. Diese Theorie ist zwar spekulativ, nichtsdestotrotz erscheint eine genauere Analyse dieser Sequenz in Angelman-Patienten ohne AS-SRO Deletion als sinnvoll, um eine mögliche Beteiligung des Homologs A entweder zu verifizieren oder zu widerlegen. Besonders eine funktionelle Analyse des Maus-Homologs B könnte von Interesse sein, da ein Maus-AS-SRO bisher nicht identifiziert werden konnte. Homolog B liegt etwa 2,2 kBp centromerisch zu *Mkrn3* innerhalb der gametisch geprägten Region auf Mauschromosom 7C. Über die gesamten 150 Bp besitzt das Homolog eine 70%ige Sequenzhomologie. Ein 30 Bp-Sequenz innerhalb dieses Abschnitts ist mit über 90% (20 Bp-Kernsequenz = 100%) fast vollständig zwischen Mensch und Maus konserviert. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Sequenz eine Bindungsstelle für ein Protein besitzt, welches ursächlich am "Imprinting"-Prozeß beteiligt ist. In der Tat wurde postuliert, daß der AS-SRO einen "Imprinting"-Initiations Komplex in der maternalen Keimbahn bindet (Surani, 1998). Die Existenz eines dem AS-SRO funktional homologen Sequenz in Maus ist sehr wahrscheinlich, da der menschliche AS-SRO in der Lage ist, die gametische Prägung in Mäusen mit Deletionen des orthologen Bereichs zu komplementieren (Shemer *et al.*, 2000; Hershko *et al.*, 2001).

Die genaue Rolle des AS-SRO im Imprinting-Mechanismus ist jedoch ungenügend verstanden und Inhalt zahlreicher Diskussionen. Ein Modell (Tilghman *et al.*, 1998) beschreibt eine "enhancer-competition" für die gametisch geprägte Region um *SNURF/SNRPN* (siehe Abb. 77). Der *SNRPN*-Promotor erzielt demnach seine Wirkung dadurch, daß er mit *UBE3A* um einen Enhancer konkurriert. Auf dem maternalen Chromosom ist der *SNRPN*-Promoter jedoch durch Methylierung inaktiviert, wodurch *UBE3A* der für seine Expression notwendiger Zugang zum Enhancer ermöglicht wird.

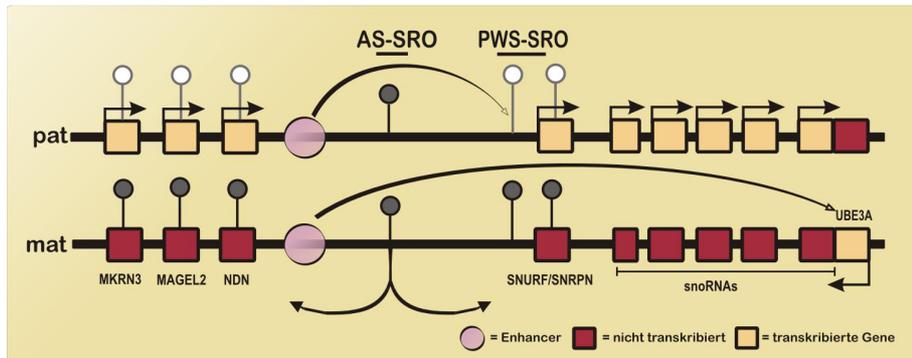


Abb. 77: „Enhancer Competition Modell“ nach Tilghman *et al.* (1998). Die Region um das Imprinting-Center (IC) auf Chromosom 15q11-13. Der violett gefüllte Kreis stellt einen möglichen Enhancer dar, der seine Wirkung entweder auf den *SNRPN*-Promoter oder einen mit *UBE3A* assoziierten Promotor ausübt.

Das „Enhancer-Competition Modell“ sagt nun voraus, daß die IC-Mikrodeletionen auf dem maternal vererbten Chromosom in AS-Patienten demnach als maternale, epigenetische Markierung dienen. Eine Deletion auf dem maternalen Chromosom würde dann dazu führen, daß das maternale Allel unmethyliert vorliegt und mit einem paternalen "Imprint" weitervererbt wird, so daß die resultierenden AS-Patienten nur paternal-spezifische Gene exprimieren würden. Entsteht nun eine Deletion innerhalb des *SNRPN*-Promotors, so sollten die AS-Gen(e) dadurch aktiviert werden, daß die Konkurrenz für einen Enhancer nicht mehr existiert. Dem Enhancer-Modell mangelt es jedoch, wichtige genetische Aspekte zu erklären. Erstens finden sich in Angelman-Patienten die IC-Mutationen ausschließlich auf dem Chromosom, welches vom Großvater mütterlicher Seite stammt. Zweitens finden sich diese Mutationen in Prader-Willi-Patienten jedoch nur auf dem Chromosom, das von der Großmutter väterlicher Seite stammt. Sogar bei den PWS-Patienten mit Imprinting-Defekt ist immer das großmütterliche Chromosom inkorrekt geprägt (Buiting *et al.*, 1998). Drittens sind mindestens zwei PWS IC-Deletionen bekannt, die sich über den AS-SRO erstrecken und trotzdem ein maternales "Imprint" auf dem paternalen Chromosom erzeugen (Horsthemke *et al.*, 1997^b). Dies bedeutet, daß trotz des Fehlens des AS-SRO ein maternales "Imprint" entstehen konnte. Das Enhancer-Modell besagt jedoch, daß der maternale epigenetische Marker Teil des AS-SRO sein muss, welcher die Ausbreitung der Methylierung über das Chromosom bedingt. Zudem beschreibt das Modell die Notwendigkeit einer allelspezifischen Methylierung des AS-SRO. Die Daten zu dieser Arbeit zeigen jedoch, daß der AS-SRO vollständig biparental methyliert ist und daher wohl nicht als primäres maternales "Imprint" dient, von dem die Methylierung sich über das Chromosom ausbreitet.

Im Gegensatz zum Enhancer-Competition Modell zeigten Shemer *et al.*, daß die differentielle Methylierung der PWS-SRO-Region (Promotor und Exon 1 des *SNURF/SNRPN*-Gens) die primäre epigenetische Markierung darstellt (Shemer *et al.*, 1997). Die Resultate zur DMR1-Methylierung in Maus ES-Zellen bestätigen diese Theorie (s.o.). Tatsächlich zeigte sich, daß eine 215 Bp-Sequenz, die den *SNURF/SNRPN*-Promotor überlappt, die Fähigkeit besitzt als "Silencer" in transgenen *Drosophila* zu fungieren; möglicherweise ein Hinweis auf seine Aktivität im Imprinting-Mechanismus (Lyko *et al.*, 1998). Es wurde auch von einem Transgen berichtet, welches den AS-SRO und den Maus DMR1 trägt und befähigt ist, eine allelspezifische Methylierung, "parent-of-origin" Transkription und asynchrone Replikation in Mäusen zu erzeugen (Shemer *et al.*, 2000). Ausgehend von diesen Daten wurde ein "Imprint-Box" Modell der gametischen Prägung vorgestellt:

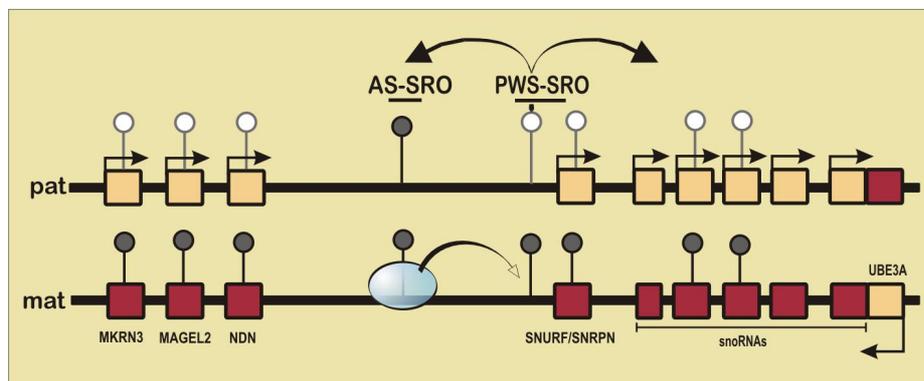


Abb. 78: Imprinting-Box Modell nach Shemer *et al.* (2000). Die Bindung eines Oocyten-spezifischen Faktors (blaues Oval) an *cis*-agierende Elemente innerhalb des AS-SRO auf dem maternalen Allel (mat) erzeugt eine Methylierung (gefüllte Kreise) des *SNURF/SNRPN*-Promotors. Durch die Methylierung wird das maternale Allel transkriptionell inaktiviert. Der aktive (unmethylierte) Status des paternalen Allels wandert mittels eines unbekanntes Mechanismus in die umgebenden chromosomalen Bereiche (bidirektionale Pfeile). Die paternal exprimierten Gene (gelbe Rechtecke) verbleiben im Soma unmethyliert und aktiv. Die snoRNAs (Antisense-RNAs zu *UBE3A*) verhindern die Expression von *UBE3A* auf dem paternalen Allel, ähnlich wie es für die Antisense-Transkripte für *Xist* und *Igf2r* beschrieben wurde (Lee *et al.*, 1999; Wutz *et al.*, 1997).

Eine Besonderheit des IC ist seine ungewöhnlich hohe Dichte an "matrix attachment regions" (MARs), welche häufig eine *cis*-agierende epigenetische Aktivität besitzen (Greally *et al.*, 1999). Zahlreiche MARs wurden direkt in Verbindung mit den IC-Elementen identifiziert. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß der mögliche Maus-AS-SRO ebenfalls innerhalb eines MAR lokalisiert ist (siehe Abb. 41).

Diese Daten könnten darauf hindeuten, daß die identifizierte TIF-Sequenz (s.o) auch funktionell dem menschlichen AS-SRO ähnlich ist. Obwohl die Sequenzen zwischen Maus und Mensch evolutiv stark divergierten (siehe auch Abschnitt 5.2.6), zeigen sich die MARs in ihren jeweiligen orthologen Bereichen äußerst ähnlich verteilt. Da MARs

gewöhnlich mit heterochromatischen Chromatininformationen assoziiert sind, wird angenommen, daß die MARs des IC während der Oogenese als Heterochromatin organisiert sind, nicht aber während der Spermatogenese (Greally *et al.*, 1999). Im Einklang mit diesem Modell zeigten Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen eine starke Matrix-Assoziation des maternalen IC, während der paternale IC in einer dekondensierten Form innerhalb der Kern-Halo lokalisiert war.

Weitere Berichte enthüllten weitere Einsicht in den komplexen Mechanismus, der den IC umgibt (Bielinska *et al.*, 2000; Shemer *et al.*, 2000). So wurde eine PWS-Familie, in welcher der Vater eines erkrankten Kindes mosaik für die IC-Deletion auf seinem paternalen Chromosom war, identifiziert. Dieses Chromosom enthielt überraschend eine maternale Prägung, die an die Nachkommen weitergegeben wurde. Diese Daten implizieren, daß die Etablierung eines maternalen "Imprints" nicht auf die maternale Keimbahn begrenzt ist. Ähnliche Befunde wurden in chimären Mäusen, die eine ähnliche Deletion trugen, beobachtet (Bielinska *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998). In allen Fällen muss die Deletion vor der Trennung von Keimzellen und Somazellen aufgetreten sein (z.B. in der inneren Zellmasse des Blastocysten). Die Daten implizieren, daß PWS durch einen Fehler, die paternale Prägung zu erhalten, entsteht und nicht in einer fehlerhaften "Imprint"-Umschaltung. Demnach würde, wie schon zuvor postuliert (Surani, 1998), die paternale Prägung (demethyliert) den ursprünglichen Zustand nach Reprogrammierung der maternalen Prägung in den Keimzellvorläufern darstellen.

Die Rolle des AS-SRO Elements scheint noch komplizierter. Man kann annehmen, daß der erste Schritt in den Keimbahnvorläuferzellen die Auslöschung der parental-spezifischen epigenetischen Modifikationen ist. Da der größte Teil des paternalen Allels demethyliert vorliegt, könnte der aktive Prozess der Auslöschung der alten Prägung und der Etablierung einer neuen Prägung ein Schritt sein. In der weiblichen Keimbahn könnte ein IC-Element innerhalb des AS-SRO die Auslöschung der Prägung verhindern, indem die Aktivität des PWS-SRO-Elementes "überschrieben" wird. Weiterhin beschützt der AS-SRO das maternale Allel vor Demethylierung im Präimplantations-Embryo. Es ist allerdings nicht klar, ob dies nicht ein allgemeiner, für diese "Imprint"-Region, nicht-spezifischer Mechanismus ist.

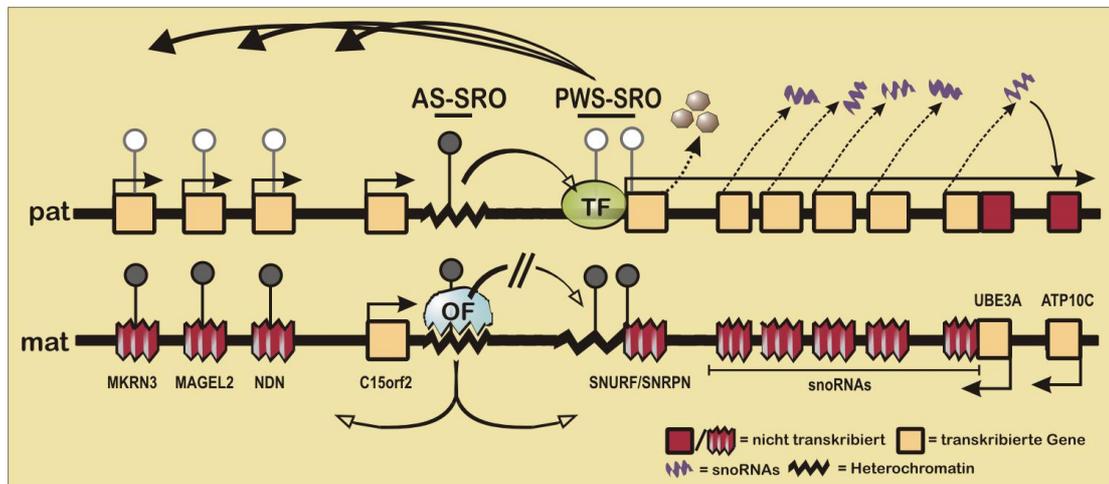


Abb. 79: Imprinting-Modell nach Schumacher (2001). Ein Transkriptionsfaktor (TF) bindet an den paternalen, unmethylierten Promotor des *SNURF/SNRPN*-Gens innerhalb des PWS-SRO. Eines der paternal-spezifischen Produkte, z.B. das noch nicht funktionell charakterisierte SNURF-Protein oder die zahlreichen snoRNAs erhalten das paternale Allel in einem demethyliertem Zustand, ähnlich, wie es für die Regulation der X-Chromosom Inaktivierung beschrieben wurde (Brockdorff *et al.*, 2000). Durch die Transkription der snoRNAs wird zudem das auf dem zum *SNURF/SNRPN*-Gen Antisense liegende *UBE3A*-Gen paternal inaktiviert. Der AS-SRO ist biparental methyliert (Schumacher *et al.*, 1998; diese Studie) und wird in *cis* benötigt (in Nähe und in der korrekten Orientierung zum PWS-SRO; Buiting *et al.*, 2001), um eine TF-Bindung zu gewährleisten. Der AS-SRO bleibt als durchgehende Prägung während der gesamten Entwicklung methyliert und wird demnach auch nicht während der paternalen Gametogenese demethyliert. (Diese Vermutung konnte bestätigt werden; Buiting, pers. Kommunikation). In der weiblichen Keimbahn existiert ein Oocyten-spezifischer Faktor, der an den TFI-Komplex (diese Studie) des AS-SRO binden kann. Dadurch wird die Transkriptionsfaktor-Bindung an den *SNURF/SNRPN*-Promotor unterbunden und eine "Silence"-Funktion des PWS-SRO, die durch eine Nuklease-sensitive Sequenz repräsentiert wird (Schweizer *et al.*, 1999), verhilft zu einer somatischen Unterdrückung der *SNURF/SNRPN*-Transkripte auf dem maternalen Allel. Durch die Inaktivierung wird auch die Fähigkeit des PWS-SRO unterbunden, das maternale Allel in einem unmethyliertem Zustand zu behalten. Aufgrund der epigenetischen Gegebenheiten des maternalen Allels (Histon-Acetylierung und Methylierung; Gregory & Feil, 1999; Xin *et al.*, 2001) wird während der Embryonalentwicklung (spezifisch während der Neurogenese) eine Methylierung des maternalen Allels ausgelöst (siehe Daten zur ES-Zell Methylierung, diese Studie). Die Gen-Methylierung des maternalen Allels, wahrscheinlicher aber die Demethylierungs-Erhaltungs Aktivität des paternalen Allels benötigt spezifische Ziel-Signale, weil einige Loci innerhalb der gametisch geprägten Region einer allelspezifischen Methylierung und Transkription entgehen (DMR2; IPW; AS-SRO, LINEs, diese Studie; *C15orf2*, Färber *et al.*, 2000). Wie nach diesem Modell zu erwarten ist, konnte gezeigt werden, daß das nicht-geprägte Gen *C15orf2* in Spermien unmethyliert vorliegt, aber nach der Befruchtung biparental methyliert wird.

Es konnte gezeigt werden, daß Gene, die in Spermien hoch methyliert vorliegen, aktiv in der frühen Zygote demethyliert werden, bevor die erste Runde der DNA-Replikation einsetzt (Oswald *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den paternalen sind die Oocyten-abgeleiteten Allele vor dieser Reprogrammierung nicht beeinträchtigt.

Die hier erzielten Daten fließen in ein Modell der Imprinting-Regulation auf Chromosom 15q11-13 ein (siehe Abbildung 79).

5.3.2 Gametische Prägung im Säugetiergehirn und Evolution der *Snurf/Snrpn*-"Imprinting" Region

Die Vielzahl der epigenetischen Mechanismen im Säugetier, insbesondere im Gehirngewebe führt zwangsläufig zu der Frage: Warum? Wie konnte eine gametische Prägung urzeitlich entstehen? Was macht das "Imprint" so wichtig, daß es in unzähligen Spezies über Millionen von Jahren in nahezu unverändert konservierter Form erhalten wurde? Ist es möglich, daß die gametische Prägung einen evolutiven Prozess in Gang setzte, so daß sich die eutherischen Lebewesen zu denen entwickeln konnten, was wir heute sind?

5.3.2.1 Der Ursprung des "Imprinting"

Eine Vielzahl von Theorien wurde dem Phänomen der gametischen Prägung zugesprochen. Seit längerem ist die parentale Konflikt-Theorie eine der meist diskutierten; sie beschreibt, daß sich die epigenetischen Muster aufgrund der Konflikte über unterschiedliche parentale Investments für den Nachwuchs entwickelte (Moore & Haig, 1981). Andere Theorien vermuten, daß das "Imprint" aus einem alten Verteidigungs-Mechanismus gegen die Entstehung von Parthenogenese (Varmuza & Mann, 1994) oder gegen das Eindringen invasiver retroviraler DNA entstand (Barlow, 1993). Wiederum andere Hypothesen erklären gametische Prägung mit einem Schutz gegen Chromosomenverlust (Thomas, 1995) und als Regulator der Gen-Dosierung (Solter, 1988). Keine dieser Theorien ist jedoch in der Lage, das Verhalten aller gametisch geprägten Gene sinnvoll nachzuvollziehen.

Kern aller Imprinting-Mechanismen ist die Reprogrammierung der parentalen epigenetischen Muster während der Embryogenese. Diese Reprogrammierung ist in allen Säugetieren konserviert, nicht jedoch in Spezies wie *Xenopus* oder Zebrafisch (Übersicht in Haig & Trivers, 1995). Eine beschriebene Imprint-Reprogrammierung für das *Igf2*-Gen findet sich jedoch in Marsupialia (z.B. Opossum) und Monotrema (z.B. Platypus; Killian *et al.*, 2000, 2001). Damit lässt sich ein Erscheinen der gametischen Prägung auf einen Zeitraum vor etwa 190-200 Millionen Jahren eingrenzen (siehe auch Phylogenetisches Diagramm zum AS-SRO, Abb. 83). Interessanterweise finden sich Formen gametischer Prägung auch in Pflanzen, ein Anzeichen für die mehrmalige Entstehung eines solchen Mechanismus (Grossniklaus *et al.*, 2001; Übersicht in Martienssen & Colot, 2001). Auch die Prägung der *Snurf/Snrpn*-Region lässt sich in etwa auf einen Zeitraum vor 190 Millionen Jahren eingrenzen, wodurch die Vermutung genährt wird, daß alle Imprinting-Mechanismen einen ähnlichen Ursprung haben könnten. So konnte gezeigt werden, daß das "Imprint" sowohl von *Snrpn* als auch von

Mkrn3 im Tammar Wallaby, einem der drei einzig rezenten Monotrema-Spezies, konserviert wurde (Toder *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den meisten Genen, die in Säugern, Marsupialia und Monotrema einer gametischen Prägung unterliegen, besitzen die Gene der *Snurf/Snrpn*-Region keine Wirkung auf das Wachstum eines Organismus, sondern besitzen ausschließlich spezielle Funktionen im Gehirn (eine detaillierte Übersicht über die genauen Funktionen der Gene um *Snurf/Snrpn* im Kontext dieser Arbeit wurde in Schumacher (2001) veröffentlicht).

5.3.2.2 Gametische Prägung im Gehirn

Die konzentrierte Zusammenballung Gehirn-spezifischer Gene um den Imprinting-Center lässt darauf schließen, daß dieser Imprinting-Komplex eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Gehirns spielt. Das einzige Gen auf dem menschlichen Chromosomenabschnitt 15q11-q13, welches einer gametischen Prägung entgeht, ist das Testis-spezifische Gen *C15orf2*, das durch retrovirale Insertion in den Locus gelangte (Färber *et al.*, 2000).

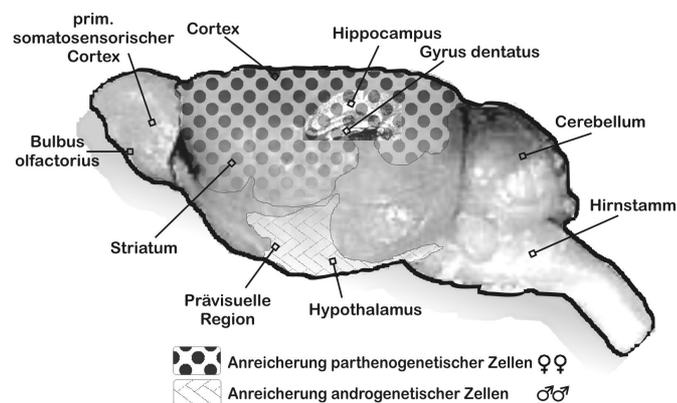


Abb. 80: Übersicht über das Mausgehirn. Die gepunkteten Gebiete repräsentieren Gehirnregionen, welche die höchste Anhäufung parthenogenetischer (Pg) Zellen aufweisen, so z.B. im pyriformen und frontalem Cortex. Androgenetische (Ag) Zellen akkumulieren (Zieglmuster) vorzugsweise in den Bereichen, aus denen Pg-Zellen ausgeschlossen sind.

Die ersten Anzeichen für eine deutliche Beteiligung gametisch geprägter Gene an der Hirnentwicklung lieferten Experimente mit chimären Mäusen, die normale und uniparentale Zellen enthielten (Allen *et al.*, 1995; Keverne *et al.*, 1996). Es zeigte sich, daß parthenogenetische (Pg, zwei maternale Allele) und androgenetische (Ag, zwei paternale Allele) Zellen unterschiedlich zu bestimmten Regionen des Mausgehirns beitragen (siehe Abb. 80). Zum Zeitpunkt der Geburt finden sich Zellen, die disomisch für das paternale Genom sind, substantziell in den Bereichen des Gehirns, die für ein primär motiviertes Verhalten (z.B. Hypothalamus, Septum, Stria Terminalis) wichtig

sind. Während der weiteren Entwicklung wandern sie in den frontalen Cortex, werden jedoch aus dem sich entwickelndem Neocortex, Striatum und Telencephalon ausgeschlossen. Das Gegenteil zeigt sich für die Pg-Zellen, die intensiv im Neocortex und Striatum akkumulieren.

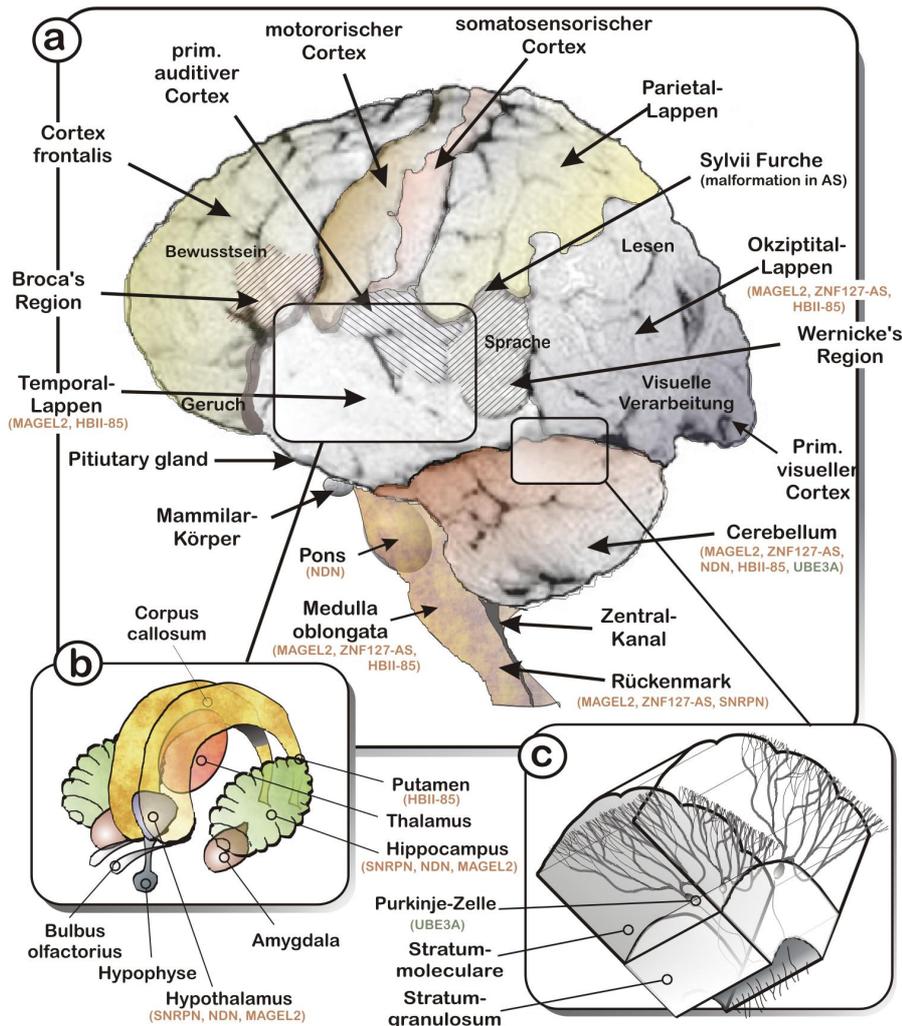


Abb. 81: Struktur des menschlichen Gehirns und Expression der PWS/AS-Gene. **a:** Sicht auf die linke Hemisphäre. Regionen mit paternal-spezifisch exprimierten Genen (rote Schrift) und maternal-spezifisch exprimierten Genen (grüne Schrift) sind markiert. **b:** Die innere Struktur des Cerebrums. **c:** Schnitt durch den cerebralen Cortex – eine Struktur, die das Cerebellum umgibt. Die primären Neuronen im Cerebellar Cortex sind die Purkinje-Zellen (PZs), die einzigen Neuronen, deren Axone das Cerebellum verlassen, um mit anderen Strukturen des Gehirns zu interagieren. Das *UBE3A*-Gen, welches mit der Entstehung des Angelman-Syndroms in Verbindung gebracht wird, zeigt nur im Gehirn eine allelspezifische Prägung und wird fast ausschließlich in den Purkinje-Zellen exprimiert.

Diese Daten zeigen, daß parental-spezifisch exprimierte Gene eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung spielen und daß die gametische Prägung möglicherweise eine treibendes Mittel in der Vorderhinevolution darstellte. In der Tat werden paternal-spezifisch exprimierte Gene, wie *Snurf/Snrpn*, *Mkrn3*, *Magel2* und *Ndn*, vorwiegend in den Teilen des Gehirns exprimiert, in denen Ag-Zellen akkumulieren (Abb. 81; Übersicht in Schumacher, 2001).

5.3.2.3 Defekte in der neuronalen Entwicklung in PWS- und AS-Patienten

Welche Rolle spielen die Gene um *Snurf/Snrpn* im Prader-Willi- und Angelman-Syndrom? Die Experimente am Mausmodell zeigten, daß die Expression der gametisch geprägten Gene im Gehirn, im Gegensatz zu anderen Organen (z.B. Leber), vorwiegend in Bereichen des Gehirns stattfindet (Übersicht in Schumacher, 2001). Erste Anzeichen deuten darauf hin, daß die Transkriptionskontrolle möglicherweise auch zwischen dem Geschlecht des Tieres und der hemisphärischen Lokalisation im Gehirn zu unterscheiden vermag (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2.6).

Bei der Untersuchung der Gehirne von an PWS und an AS erkrankten Kindern fielen einige Unterschiede ins Auge (Williams *et al.*, 1989; Leonard *et al.*, 1993). So fand man in AS-Patienten gehäuft Anomalien im kortikalen Wachstum, die sich zu kortikalen Atrophien, Microencephalien und Ventricular Erweiterungen ausprägten. Es wird vermutet, daß in AS-Patienten das anormale kortikale Wachstum der Region, die für den Ausdruck und das Verstehen gesprochener Sprache notwendig ist (Silvii Furche; siehe Abb. 81), auf einer fehlerhaften Axonorientierung beruht (Leonard *et al.*, 1993). Ein Teil dieser Region ist das sogenannte Broca-Areal innerhalb der Frontalbank, welches in der Ausbildung der gesprochenen Sprache involviert ist und das Wernicke-Areal, welches ursächlich mit dem Verstehen der Sprache verknüpft ist. Beide Areale sind durch ein Bündel weißer Masse verbunden, dessen Integrität für die Erlernung gesprochener Sprache unabdingbar ist (Heilman & Valenstein, 1980). Eine Missbildung dieses Faser-Bündels könnte erklären, daß Angelman-Patienten, im Gegensatz zu Prader-Willi-Patienten, niemals die gesprochene Sprache erlernen.

Eine andere Auffälligkeit in AS-Patienten basiert auf der Tatsache, daß Säugetiergehirne in zwei ungleiche Hemisphären aufgeteilt sind, die durch eine große Furche voneinander getrennt sind. An der Basis dieser Furche liegen jene Nervenfasern, die es den beiden Gehirnhälften ermöglichen, miteinander zu kommunizieren. Diese hemisphärische Organisation könnte eine der Ursachen dafür sein, daß die meisten Menschen (~80-90%) eine Rechtshändigkeit erlangen. Eigenartigerweise besaßen viele Angelman-Patienten zahlreiche abnormal vergrößerte Strukturen innerhalb der linken Gehirnhemisphäre. Diese Anomalien könnten den Befund erklären, daß die Mehrheit der AS-Patienten zur Linkshändigkeit neigen.

Die bisher einzig identifizierten Gene, die an den beobachteten Phänotypen beteiligt sein könnten, sind *UBE3A*, *ATP10C* und drei *GABA_A*-Rezeptor-Untereinheiten (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997; Meguro *et al.*, 2001; Sinnott *et al.*, 1996; siehe Übersichtskarte, Abb. 1). Über die regionale Verteilung von *ATP10C* im menschlichen

Gehirn ist zur Zeit nichts bekannt, jedoch ist eine Beteiligung des Phospholipid-Transporters in neurologischen Defekten von Angelman-Patienten wahrscheinlich. *UBE3A* wird vorzugsweise vom maternalen Allel in Purkinje-Zellen (PZs; siehe Abb. 81C) exprimiert. Obwohl PZs dem cerebellarem Cortex entspringen, sind sie die einzigen Neuronen, die mit anderen Regionen des Gehirns interagieren können, so z.B. durch Inhibition der Motor-Kontroll Aktionen, die im Hirnstamm entstehen oder mit dem sensimotorischem Cortex oder Rückenmark.

Zwei Eigenschaften der PZs im Bezug auf das Imprinting-Phänomen sind von besonderem Interesse. Zum einem ist der inhibitorische Transmitter, der durch die PZs freigesetzt wird, GABA. Die Gene seiner Rezeptoreinheiten liegen nahe zu *UBE3A* und könnten auch einer gametischen Prägung unterliegen. Eine mit *UBE3A* koordinierte Kontrolle oder eine partielle Beteiligung am AS-Phänotyp (besonders bei weitreichenden Deletionen des Chromosoms 15q13) ist nicht auszuschließen. In dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die $GABA_A$ -Rezeptoruntereinheiten zumindestens in Maus nicht gametisch geprägt sind. Da über das "Imprint" der Rezeptoren im Menschen nur unklare und teilweise widersprüchliche Daten existieren, wäre es aber möglich, daß sich die gametische Prägung um den $GABA_A$ -Locus evolutiv in den Arten veränderte. So könnten die $GABA_A$ -Rezeptoruntereinheiten, je nach Spezies, die Prägung der umgebenden IC-Region angenommen haben oder ihr ursprüngliches "Imprint" im Laufe der Jahrmlionen verloren haben.

Die zweite interessante Charakteristik der PZs beruht auf ihrer Eigenschaft, durch komplexes Bewegungslernen und erlerntem Sozialverhalten verändert zu werden. So beeinflussen diese erlernenden Tätigkeiten die Dendriten-Verzweigung und synaptische Organisation der Purkinje Zellen (Floeter & Greenough; 1979; Kleim *et al.*, 1997). Demnach könnte die gametische Prägung in 15q11-13 das geschlechtsspezifische Verhalten und die soziale Kognition regulieren (s.u.).

5.3.2.4 Evolutive Dynamik der IC-Region und das Modell der "Geschlechtsspezifischen Verhaltens-Selektion durch gametische Prägung"

Es ist unwahrscheinlich, daß die Entstehung der gametischen Prägung geschah, ohne einen direkten Selektionsvorteil zu beinhalten. Aufgrund der beschriebenen Phänotypen, die durch eine IC-Mutation entstehen können, liegt die Vermutung nahe, daß ein selektiver Vorteil darin besteht, Verhalten und kognitive Funktionen (z.B. durch physiologische, neurogenetische Modellierung) parental-spezifisch zu vererben. Dieses evolutive Phänomen wäre nicht einzigartig, da auch andere gametisch geprägten Gene in Mensch und Maus ein geschlechtsspezifisches Verhalten regulieren. Ein Beispiel für "parent-of-origin" Effekte für kognitive Fähigkeiten findet sich bei Untersuchungen an Turner-Syndrom Patienten. Die Krankheit entsteht durch den partiellen oder vollständigen Verlust eines X-Chromosoms. Frauen, die mit Turner-Syndrom geboren wurden und ihr verbliebenes X-Chromosom von der Mutter vererbt bekamen (X^m) zeigten deutlich mehr klinisch signifikante Schwächen im Sozialverhalten als Frauen, die ihr X-Chromosom vom Vater erhielten (X^p ; Skuse *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2000). Auch ihr verbaler IQ war gegenüber X^p -Frauen herabgesetzt; hingegen besaßen sie bessere visuospatiale Fähigkeiten (Übersicht in Isles & Wilkinson, 2000). Ursächlich wurde eine paternal-spezifisch exprimierte Region auf dem X-Chromosom identifiziert (Xp11.23-Xqter), die der zufälligen X-Inaktivierung entgeht (Skuse *et al.*, 1997). Wahrscheinlich wird diese chromosomale Region inaktiviert, wenn sie von der Mutter weitervererbt wird. Ähnliche parental-spezifische Effekte wurden für Autismus (AD; MIM:209850), Gilles de la Tourette-Syndrom (GTS; MIM:137580), Schizophrenie (SCZD; MIM:181500), *Bipolar affective disorder* (BPAD; MIM:125489), einigen Formen der Epilepsie (MIM:603205), Coffin-Lowry Syndrom (CLS; MIM:303600), Huntington Krankheit (HD, MIM:143100), Rett Syndrom (RTT; MIM:312759) und Cornelia de Lange Syndrom (MIM:122470) beobachtet.

Andere gametisch geprägten Gene regulieren direkt das Verhalten in Säugetieren. Deletionen von *Mest* (*Peg1*) auf dem Mauschromosom 6, ein Gen, welches vornehmlich im Hypothalamus vom paternalem Allel exprimiert wird, führt zu einem abnormalen maternalem Verhalten der Mutter zum Neugeborenen (Lefebvre *et al.*, 1998). Phänotypische Konsequenzen der *Mest*-Mutationen prägen sich nur nach Transmission durch die paternale Keimbahn aus. Die betroffenen Weibchen sind nicht mehr in der Lage angemessen auf die Neugeborenen zu reagieren; so säugen die Mütter nicht mehr und unterlassen nach der Geburt die Entfernung ihres extraembryonischen Gewebes. Ähnliche Verhaltensmuster finden sich bei Deletion des paternal-spezifisch exprimierten Gens *Peg3* (Kuroiwa *et al.*, 1996). Andere parental

geprägte Gene (z.B. *Grf1* und möglicherweise *MHC*-Allele) verändern das Verhalten von Säugetieren auf Pheromone und dadurch auf das geschlechtsspezifische Verhalten der Individuen (Plass *et al.*, 1996; Isles *et al.*, 2001; Potts, 2002).

Bewegt man sich entlang des phylogenetischen Baumes von den frühen Säugetieren bis zu den heutigen Primaten, so stellt man fest, daß sich der Neocortex und das Striatum mit der Zeit erheblich gegenüber den anderen Hirnarealen vergrößerten. Demgegenüber verkleinerten sich der Hypothalamus, das prä-optische Areal und das Septum. Die Verteilung der androgenetischen und parthenogenetischen Zellen im Säugergehirn deuten darauf hin, daß die gametische Prägung ursächlich mit der evolutiven Formung des Gehirns verbunden ist.

Welche Elemente könnten in der *Snurf/Snrpn*-Region einen evolutiven Schub ausgelöst haben? Um diese Frage zu beantworten muss festgestellt werden, welche DNA-Sequenzen früh in der Säugetierentwicklung in der gametisch geprägten Region entstanden.

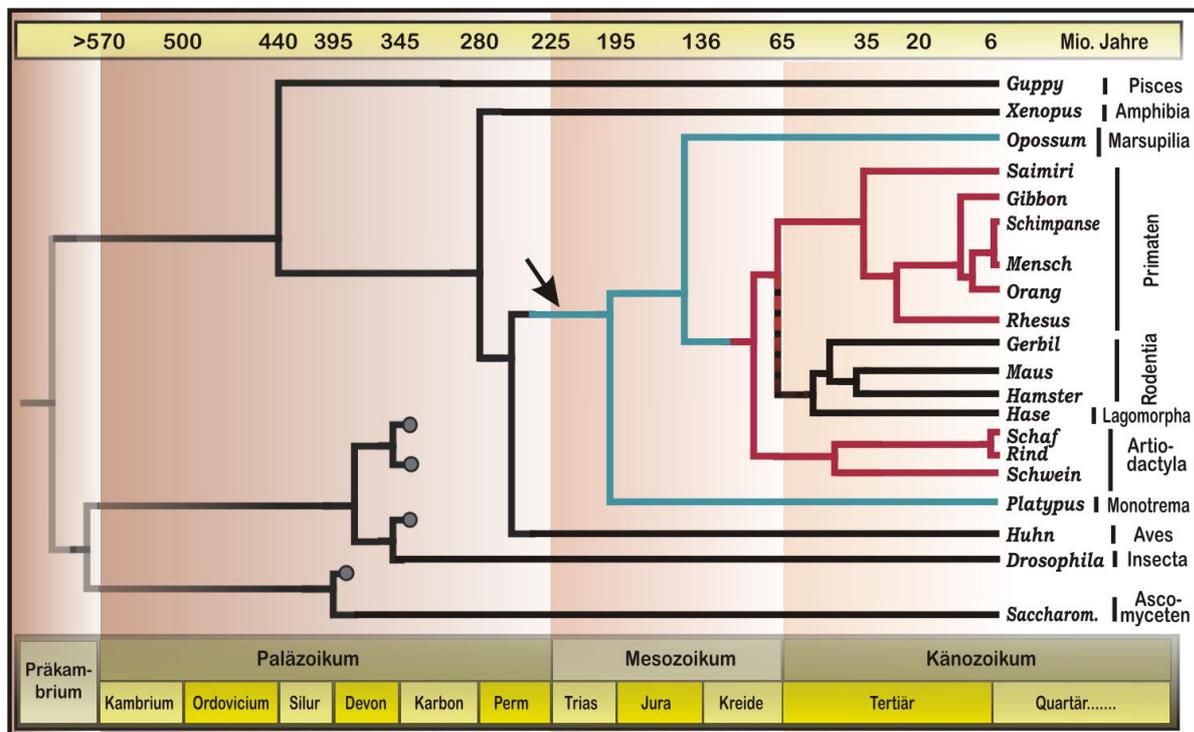


Abb. 82: Dendrogramm der phylogenetischen Verteilung des AS-SRO "Imprinting"-Elementes (nach Zoo-Blot Hybridisierungs-Experimenten; siehe Abschnitt 4.2.1.7). Schwarze Linie: Die Sequenz ist unbekannt in diesen Spezies (und wahrscheinlich ebenso in ihren Vorläufern nicht vorhanden). Rote Linie: Nachweis einer AS-SRO-ähnlichen Sequenz. Blaue Linie: Daten zum AS-SRO existieren nicht, jedoch zeigt sich in diesen Linien bereits eine gametische Prägung des *Snrpn*-Gens. Da auch die meisten Arten nach Aufspaltung im Mesozoikum dies AS-SRO-Sequenz tragen, ist eine Existenz des AS-SRO in diesen Spezies wahrscheinlich. Graue Linie: Urzeitliche Spezies; Verwandtschaft ist unklar. Pfeil: Angenommener Ursprung der gametischen Prägung des *Snrpn*-Gens.

Da ein gametisches "Imprint" für *Snrpn* in Eucharionta (u.a. Primaten, Rodentia, Artiodactyla), Marsupialia und Monotremata konserviert ist (s.o.), kann man vermuten, daß sich die für das "Imprint" benötigten regulatorischen Einheiten geschichtlich früh entwickelten. Die Zoo-Blot Analysen (siehe Abschnitt 4.2.1.7) zeigten, daß der AS-SRO wahrscheinlich schon früh in der *Snurf/Snrpn*-Region vorhanden war (siehe Abb. 82).

Auch der Bereich nahe des AS-SRO (Y48.5) zeigte sich in den meisten Arten stark konserviert, so daß eine weitreichende Konservierung der gesamten gametisch geprägten Region zu vermuten ist.

Das älteste Elemente des IC-Bereiches sind wahrscheinlich der *Snrpn*-Promotor (DMR1/PWS-SRO) und das *Snrpn*-Gen, mit seinen sechs für das SmN Protein kodierenden Exons, welches aus einer Duplikation des *Snrpb'*-Gens entstand (Gray *et al.*, 1999; Chai *et al.*, 2001). Sehr früh in der Entwicklung der IC-Region muss die Fusion von *Snurf* und *Snrpn* zu einem bicistronischen Transkript entstanden sein (Gray *et al.*, 1999; Nicholls *et al.*, 1999; Übersicht in Schumacher, 2001). Auch diese Begebenheit könnte ein "Imprint" ausgelöst haben. Ebenfalls die in den 3'-Introns des *Snurf/Snrpn*-Gens enthaltenen snoRNAs sind äußerst stark konserviert und entwickelten sich demnach schon früh im Mesozoikum durch Duplikation einzelner snoRNAs innerhalb den *Snrpn*-Locus (Cavaillé *et al.*, 2000). Zu dieser Theorie passend ist das Fehlen von mindestens einer dieser snoRNAs außerhalb der Eutheria (de los Santos, 2000).

Das hier vorgestellte Modell der Evolution der IC-Region geht demnach davon aus, daß die gametische Prägung durch die Funktion des *Snrpn*-Gens, *Snurf*-Gens oder der snoRNAs entstand (siehe Abb. 83A und 83B). Alle anderen Gene 5' zu *Snrpn* integrierten erst später in diese Region und nahmen das "Imprint" des *Snrpn*-Gens an (entspricht der sog. "Innocent bystander Theory" der gametischen Prägung; Varmuza & Mann, 1994). Nach dieser Theorie erhielten die neu inserierten Gene das "Imprint" deshalb, weil sie Sequenzen enthalten, die für eine Weitergabe der Prägung förderlich sind, so z.B. "CpG-Islands", MARs und repetitive oder virale Sequenzen. Alle Gene, die nachträglich in diese Region eindringen, sind abhängig von repetitiven Sequenzen, durch Retrotransposition entstanden; wahrscheinlich durch das gehäufte Vorkommen von Retrotransposons (vorwiegend L1-Elemente) 5' zu *Snrpn*. Diese Integrationsmuster erklären auch, warum alle neu integrierten Gene nur aus einem Exon bestehen; größere Genkomplexe sind hingegen nicht in der Lage, einfach zu transponieren. Als Attraktor der gametischen Prägung könnten auch die dichten CpG-reichen Regionen der neuen Gene fungiert haben.

Das erste Gen, *Mkrn3*, welches in den "Integrations Hotspot" integrierte (siehe Abb. 83A), entstand vor etwa 100-120 Millionen Jahren, noch vor der Rodentia-Primates-Aufspaltung, durch Retrotransposition des *Mkrn1*-Gens (Jong *et al.*, 1999^a; Jong *et al.*, 1999^b; Gray *et al.*, 2000).

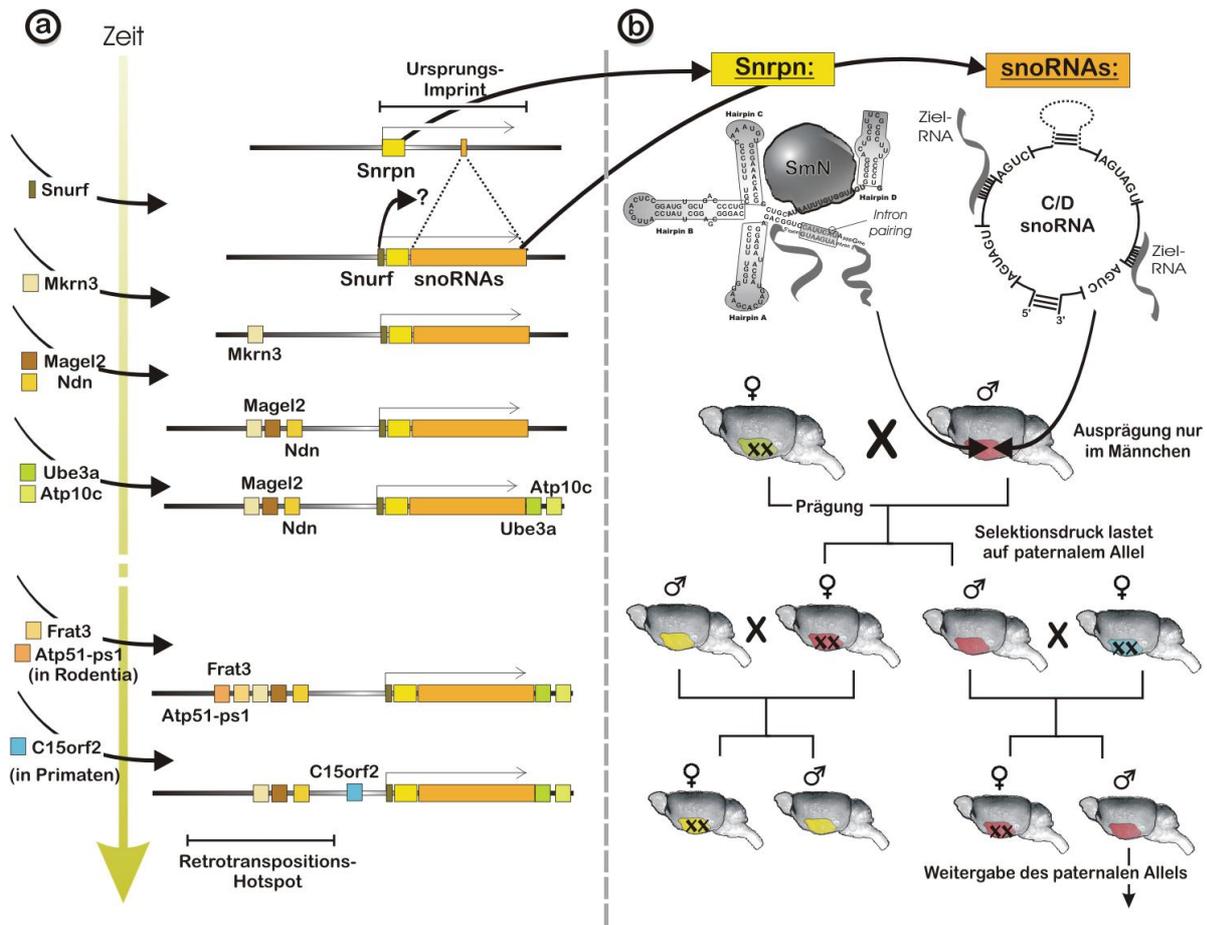


Abb. 83: Evolution der gametischen Prägung um *Snurf/Snrpn*. **a:** Durch Retrotransposition gelangten einige Gene in die ursprünglich geprägte Region (Retrotransposition-Hotspot). Durch repetitive Sequenzen, CpG-reiche Regionen und MARs übernahmen sie das "Imprint" der umgebenden Region (*Innocent bystander* Theorie). **b:** Der selektive Mechanismus, der eine gametische Prägung bedingte, wurde wahrscheinlich durch die Produkte des *Snrpn*-Gens (SmM), der snoRNA-Gene oder des *Snurf*-Gens (Proteinfunktion unbekannt) ausgelöst. Theorie: Die gametische Prägung der parentalen Gene im Gehirn (hier Mausgehirn) verändert Geschlechtsspezifisch das Verhalten der Nachkommen. Prägen sich die Gene nur im Männchen aus, so liegt der selektive Druck im "Erfolg" der Expression der Gene im Vatertier. Eine Weitergabe eines exprimierten (unmethylierten) Allels über die Mutter wäre von Nachteil, da das Allel im Muttertier nicht auf die Funktion getestet werden konnte (kein Selektionsdruck, z.B. durch fehlende Zielmoleküle für SmN oder snoRNAs). *Beispiel:* Die Funktion von *Snrpn* im Hypothalamus des Vaters regelt das Verhalten. Das Gen hat keine Funktion (*xx*) im Weibchen (grün). Durch die gametische Prägung wird sichergestellt, daß nur das erfolgreiche Allel (rot) in den Nachkommen exprimiert wird. In weiblichen Nachkommen wirkt sich das *xx*-Genprodukt nicht aus, und das selektive Allel wird von einem Männchen weitervererbt (gelb). Die maternale Methylierungs-Prägung sichert, daß nur das paternale Allel aktiv weitervererbt wird. Ein männlicher Nachkomme vererbt wiederum das großväterliche Allel (rot) an seine Nachkommen. Struktur der snoRNA-Komplexe nach Filipowicz, 2000.

Etwa vor 80-100 Millionen Jahren integrierten die Intron-losen MAGE-Gene *Ndn* und *Magel2*, ihr genauer Ursprung ist jedoch ungeklärt (Lee *et al.*, 2000). Zu ähnlicher Zeit sind wahrscheinlich die maternal exprimierte Gene *Ube3a* und *Atp10c* in die gametisch geprägte Region eingedrungen (Meguro *et al.* 2001; Nicholls & Knepper, 2001). Da für diese beiden Gene Homologe in Hefe und Fisch existieren, wurde vermutet, daß sie durch Translokation in den 3'-Bereich zu *Snrpn* kamen (Chai *et al.*, 2001). Auch in den letzten Millionen Jahren war der Integrations-Hotspot 5' zu *Snrpn* noch aktiv. So integrierte das *Frat3*-Gen durch Retrotransposition einer *Frat1*-Kopie vor etwa 18-26 Millionen Jahren in diesen Rodentia-Locus, etwa zur Zeit der *Mus-Rattus* Divergenz (siehe Abb. 83A; Nei *et al.*, 2001; Adkins *et al.*, 2001).

Auf ähnliche Weise integrierte auch das Pseudogen *Atp51-ps* etwa zur Zeit der Divergenz von *M. musculus* und *M. spretus*, vor ~3 Millionen Jahren in diesen Locus. Beide Gene, sowohl *Atp51-ps* als auch *Frat3* fehlen in Primaten, in denen wiederum das *C15orf2*-Gen durch Retrotransposition in den IC-Locus gelang (Färber *et al.* 2001; Übersicht in Chai *et al.*, 2001).

Wie kann die Funktion der ursprünglichen Gene eine gametische Prägung auslösen? Das SmN-Protein bindet an snRNAs, die Teil des zellulären Spleißmechanismus sind (Übersicht in Schumacher, 2001). Über die Rolle des *Snurf*-Genproduktes ist nichts bekannt. SnoRNAs sind gewöhnlich an der Biogenese eukaryontischer Ribosomen beteiligt, indem sie prä-rRNAs und rRNAs durch 2'-O-ribose Methylierung und Pseudouridylierung modifizieren (Cavaillé *et al.*, 2000; Übersicht in Schumacher, 2001).

Das hier vorgestellte Modell sagt aus, daß eines oder alle dieser Genprodukte einen geschlechtsspezifisches Verhalten im Säugetier-Gehirn auslösen (Detaillierte Erklärung siehe Abb. 83b). Ist der Phänotyp nur in einem Geschlecht ausgeprägt (z.B. durch Interaktion mit Geschlechts-spezifischen hormonellen Wegen), so lastet der Evolutionsdruck nur auf diesem parentalen Allel. Eine Weitergabe des Allels über das andere Geschlecht wäre von Nachteil, da der Phänotyp, der durch das Allel ausgelöst werden würde, nicht in der Praxis ausgetestet würde. Demnach sollte z.B. das Verhalten des Säugens von Nachkommen nur vom Muttertier weitervererbt werden, da das dazugehörige Verhaltens-Gen im Vatertier defekt sein könnte. In diesem Fall würde im Gegensatz zur klassischen Parentalen-Konflikttheorie (s.o.) beide Elterntiere und Nachkommen profitieren.

Diese zielgerichtete Selektion eines parentalen Allels könnte durch eine zusätzliche epigenetische Information des Genoms die Evolution schneller vorangetrieben haben. Gestützt wird diese Theorie durch mathematische Populationsmodelle zur gametischen

Prägung (Anderson & Spencer, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß ein "Imprint"-System mit unterschiedlichem Selektionsdruck in einem Geschlecht trotz nicht-Mendelscher Vererbung evolutiv stabil sein kann (Modell eines "Imprinting"-Systems mit unterschiedlicher Lebensfähigkeit). Die gametische Prägung reguliert demnach effizient die Dominanz-Beziehungen der Allele durch Reduzierung funktionaler Heterozygoten in der Population.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob gametisch geprägte Gene in der Evolution und Remodellierung des Säugetiergehirns beteiligt waren und so bis zu einem gewissen Ausmaß Unterschiede im kognitiven und sozialen Verhalten ausgelöst haben, die es uns in heutiger Zeit ermöglichen, uns als menschliche Wesen zu verhalten.

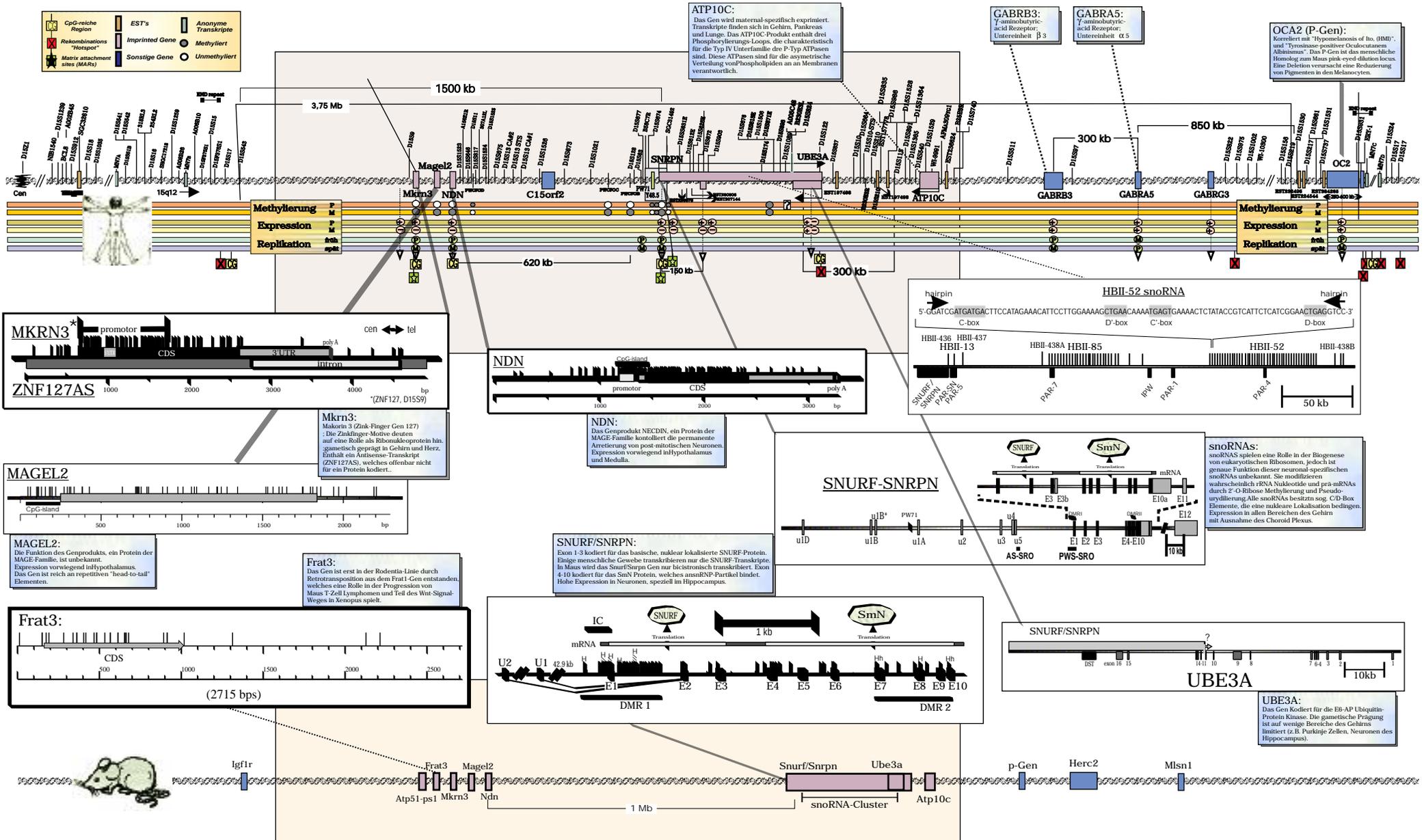


Abb. 69: Homologie der orthologen Genbereiche in Mensch und Maus.

6.1 Zusammenfassung

Das Prader-Willi Syndrom (PWS) und das Angelman Syndrom (AS) entstehen durch inkorrekte epigenetische Prägungen oder Deletionen des Chromosoms 15q11-q13. Teil der gametischen Prägung (sog. *genomic imprint*) ist eine monoallelische Methylierung einiger Geneomabschnitte. Reguliert wird diese Methylierung durch einen "Imprinting Center" (IC), der das parentale Imprint eines Organismus bestimmt. Der IC besteht aus zwei Elementen, deren eigene CpG-Methylierung im Kontext der Imprinting-Theorie untersucht wurde. Deletionen des centromeren Teils (AS-SRO) führen zu AS, Deletionen des telomeren Abschnitts (PWS-SRO) führen zu PWS. Bisher galt der Bereich um den IC als monoparental methyliert, d.h. nur das maternale Allel zeigt eine Methylierung. In dieser Arbeit konnte mittels Bisulfit-Sequenzierung gezeigt werden, daß der AS-SRO durchgehend biparental methyliert ist. Diese Daten deuten darauf hin, daß der AS-SRO nicht wie bisher vermutet das primäre epigenetische Imprint der chromosomalen Region darstellt. Es wurde auch gezeigt, daß repetitive Elemente (sog. LINES) in der Imprinting-Region einer gametischen Methylierungs-Prägung entgehen können. Um weitere Mechanismen der gametischen Prägung der gehirnspezifischen Gene um den IC zu untersuchen, wurde die Analyse des Methylierungs-Imprints auf embryonale Stammzellen der Maus ausgedehnt. Durch Computeranalysen wurde eine chromosomale Region in Maus identifiziert, die möglicherweise ein dem menschlichen AS-SRO homologes Element enthält. Methylierungsanalysen mittels methylierungssensitiven Restriktionsenzymen zeigten, daß die Mehrzahl der Gene innerhalb der IC-Region in ES-Zellen noch keine vollständige Prägung aufweisen. Lediglich das bicistronische *Snurf/Snrpn*-Gen erwies sich als maternal-spezifisch methyliert. Die Methylierungsdaten dieser Arbeit deuten darauf hin, daß der Promotorbereich des *Snurf/Snrpn*-Gens (DMR1; entspricht dem PWS-SRO IC-Element) die primäre epigenetische Markierung der IC-Region darstellt, von der die Methylierungsprägung während der Neurogenese in benachbarte Genbereiche einwandert. Die Methylierung wird wahrscheinlich erst im adulten Tier engültig etabliert, da eine Neurogenese der ES-Zellen zu keiner *de novo* Methylierung der gametisch geprägten Gene führte. Hingegen zeigte sich, daß trotz der stabilen Methylierung zeitgleich die Expression des neuronalen-spezifischen *Snurf/Snrpn*-Gens initiiert wurde.

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre deuten auf eine abnormale epigenetische Instabilität von gametisch geprägten Genen in ES-Zellen und ES-Zell abgeleiteten klonalen Organismen hin. Hier zeigte sich, daß die epigenetischen Methylierungsmuster der IC-

Region gegenüber anderen beschriebenen Imprinting-Bereichen stabil war. Sowohl eine fortschreitende Kultivierung über mehr als 30 Passagen, Integration viraler Sequenzen in das ES-Zell Genom als auch die klonale Selektion einzelner ES-Zellen änderte die beobachteten Methylierungsmuster nicht. Lediglich in Maus-Tumoren wurde eine epigenetische Instabilität, die sich in einem fehlerhaften, hypermethylierten *Ndn*-Gen ausprägte, identifiziert.

Dot-Blot Evolutionsstudien zeigten zudem eine hohe Konservierung der IC-Region in Säugetieren. Die gesammelten Daten dieser Arbeit fließen in einer Theorie der "Geschlechtsspezifischen Verhaltens-Selektion durch gametische Prägung" ein.

Um die Dynamik der gametischen Prägung während der neuronalen Entwicklung zu studieren wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt mittels des Alkaloids Staurosporin eine effektive Neurogenese der ES-Zellen herbeizuführen. Staurosporin (STS) inhibiert ein breites Spektrum an Protein-Kinasen und besitzt ein Potential als Anti-Tumor Mittel, weswegen es häufig in Studien zur Entwicklung von Neuroblastomen eingesetzt wurde. Andere Studien zeigten, daß STS einen Neurit-Auswuchs in Neuroblastoma-Zelllinien induzieren kann. Es existieren jedoch bis heute keine Daten über das neurotrophe Potential des Alkaloids in embryonalen Stammzellen der Maus. Verschiedene Protokolle werden verwendet um ES-Zellen in neuronale Zellen umzuwandeln, jedoch besitzt keine dieser Methoden eine hohe Differenzierungsrate. Um zu überprüfen, ob STS auch neurotrophe und neuritogene Effekte in embryonalen Stammzellen induzieren kann, wurden die Maus ES-Zelllinien IB10 (Mausstamm 129/Ola), RW4 (Mausstamm 129/sv) und Bruce4 (Mausstamm C57Bl/6) auf ihre Wachstumscharakteristika in Gegenwart von STS analysiert. Es zeigte sich, daß bei hoher STS-Konzentration (>25 nM) eine Apoptose in den ES-Zellen eingeleitet wurde. Bei niedriger Dosierung von STS entwickelten sich aus den ES-Zellen jedoch mit hoher Effizienz EGF-sensitive neuronale und gliale Vorläuferzellen, die weiterhin zu Neuronen, Glia und Neurosphären differenziert werden konnten. Die klonal abgeleiteten Neurosphären enthielten vermehrungsfähige, multipotente Zellen mit klassischen Charakteristika von frühen ZNS-Stammzellen. STS zeigte antagonistische Effekte zu Retinsäure (RA), einer anderen neuritogenen Substanz. RT-PCR Analysen und die Inhibitions-Studien mit RA deuten darauf hin, daß Staurosporin seine neurotrophen Wirkungen durch Einwirkung auf verschiedene Ebenen des Protein-Kinase C (PKC)- und *nerve growth factor* (NGF)-Weges erreicht.

6.2 Abstract

Prader-Willi syndrome (PWS) and Angelman syndrome (AS) are caused by the loss of function of imprinted genes in proximal 15q11-q13. In a small percentage of patients this loss is due to an imprinting defect. These patients have apparently normal chromosomes 15 of biparental origin, but in PWS the paternal chromosome carries a maternal imprint (CpG-methylation) and in AS the maternal chromosome carries a paternal imprint. In 15-20% of cases, the incorrect imprint is caused by a microdeletion of the imprinting center (IC). The IC consists of two elements, the PWS-smallest region of deletion overlap (PWS-SRO) and the AS-smallest region of deletion overlap (AS-SRO). In this study, bisulfite-sequencing revealed, that the AS-SRO is surprisingly not maternal-specific methylated, but is instead methylated on both alleles. These data show, that the AS-SRO is unlikely to bear the primary mark which induces spreading of DNA methylation along the chromosome. Furthermore, it could be shown, that also repetitive element (LINES) within the critical imprinted region, escape a parental-specific methylation. To clarify some of the mechanisms underlying the epigenetic processes that affect a variety of genes within the IC region, further analysis were performed with mouse embryonic stem cells. However, a mouse AS-SRO could not be identified so far. Now, with the help of several computeranalysis it was possible to isolate a highly AS-SRO-homologous 150 bp sequence in mouse, which could indeed represent the mouse IC-Element.

Analysis with methylation-sensitive restriction enzymes showed, that the majority of the imprinted genes around the IC in mouse ES cells bear no fully established methylation imprints. Only the bicistronic *Snurf/Snrpn* gene was found to be completely maternal-specific methylated. The methylation data of this study indicate, that the promotor region of *Snurf/Snrpn* (DMR1; part of the orthologous PWS-SRO IC-Element) might represents the primary epigenetic mark, from which the methylation imprint spreads into the neighbouring genes during neurogenesis. The final, brain-specific imprint is presumably established late during the brain development, since early neurogenesis of ES-cells did not result in *de novo* methylation of the imprinted genes. However, in contrast to the observed methylation stability, STS-induced neurogenesis of ES-cells increased the expression of the *Snurf/Snrpn* gene.

During the last years, several independent groups reported that the epigenetic modifications of imprinted genes are highly unstable in ES cells and ES cell-derived clonal organisms. In contrast to these observations, this study revealed no epigenetic instability of the *Snurf/Snrpn* imprinting region in embryonic stem cells. Furthermore,

the methylation imprint remained stable after ongoing cultivation of the ES cells over 30 passages, the integration of viral sequences into the ES cell genome and after the clonal selection of single ES-cells. An epigenetic instability of one of the imprinted genes (*Ndn*) could only be observed in two mouse-tumors. The gamete-specific methylation instability resulted in a total hypermethylation of the *Ndn*-gene, which is a common characteristic of tumor-suppressor genes during carcinogenesis.

Zoo-Blot analysis revealed, that the IC-region on human chromosome 15q11-q13 is evolutionary highly conserved. The gathered data of this work were integrated into a theory of "Sex-specific behaviour-selection via genomic imprinting", which describes the evolution and function of the genomic imprint of the *Snurf/Snrpn* region.

To analyze the dynamics of the genomic imprint during ES cell neurogenesis, a protocol was developed, that uses the neuritogenic alkaloid Staurosporine (STS), to differentiate ES cells into neuronal progenitors. STS, a broad spectrum protein kinase inhibitor, has been demonstrated to induce neurite outgrowth in several neuroblastoma cell lines. However, at present, no data exist on the neurotrophic potential of this alkaloid in embryonic stem cell systems. Several procedures have been used to generate neuronal tissues from murine stem cell lines but existing protocols are not able to reproducibly convert the majority of cells to the desired neural fate. Therefore, three mouse ES cell lines, IB10, RW4 and Bruce 4 were induced to differentiate in culture with low concentration STS. These cells differentiated with high efficiency into EGF-responsive neuronal and glial precursor cells, which could be further developed to neurons, astrocytes and neurospheres. The clonally derived spheres consisted of multipotent cells with some classical characteristics of early CNS stem cells, which can be propagated in vitro. STS was antagonistic in several ways to retinoic acid (RA), another substance that promotes neuritogenesis. Results from RT-PCRs and inhibition-studies with RA provide evidence that staurosporine exerts its neurotrophic effects through induction of very late levels of the nerve growth factor (NGF) and protein kinase C (PKC) neurogenesis pathways.

7 Literaturverzeichnis

Aïssani, B. & Bernardi, G. (1991)^a

CpG islands: features and distribution in the genomes of vertebrates.
Gene **106**:173-183

Aïssani, B. & Bernardi, G. (1991)^b

CpG islands, genes and isochores in the genome of vertebrates.
Gene **106**:185-195

Ahlemeyer, B. & Krieglstein, J. (2000).

Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis.
Neurochem. Int. **36**: 1-5.

Ahlemeyer, B., Fischer, D., Kissel, T. & Krieglstein, J. (2000)^b.

Staurosporine-induced apoptosis in cultured chick embryonic neurons is reduced by polyethylenimine of low molecular weight used as a coating substrate.
Neurosci. Res. **37**: 245-253.

Ahlemeyer, B., Huhne, R. & Krieglstein, J. (2000)^a.

Retinoic acid potentiated the protective effect of NGF against staurosporine-induced apoptosis in cultured chick neurons by increasing the *trkA* protein expression.
J. Neurosci. Res. **60**: 767-778.

Aizawa, T., Maruyama, K., Kondo, H. & Yoshikawa, K. (1992)

Expression of *Necdin*, an embryonal carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain.
Dev. Brain Res. **68**: 265-274

Albrecht, U., Sutcliffe, J.S., Cattanach, B.M., Beechey, C.V., Armstrong, D., Eichele, G. & Beaudet, A.L. (1997)

Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons.
Nature Genet. **17**: 75-77

Albus, J.S.

A theory of cerebellar function.
Math. Biosci. **10**: 25-61

Allen, N.D., Logan, K., Lally, G., Drage, D.J., Norris, M.L. & Keverne, E.B. (1995)

Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behaviour.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 10782-10786

Anderson, R.J.E. & Spencer, H. G. (1999)

Population models of genomic imprinting. I. Differential viability in the sexes and the analogy with genetic dominance.
Genetics **153**: 1949-1958

Angelman, H. (1965)

"Puppet" children: A report on three cases.
Dev. Med. Child. Neurol. **7**: 681-688

Angelov, D.N., Arnhold, S., Andressen, C., Grabsch, H., Puschmann, M., Hescheler, J. & Addicks, K. (1998).

Temporospatial relationships between macroglia and microglia during *in vitro* differentiation of murine stem cells.
Dev. Neurosci. **20**: 42-51

Antequera, F. & Bird, A. (1993)

Number of CpG islands and genes in human and mouse.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**:11995-11999

Bain, G. & Gottlieb, D.I. (1998).

Neural cells derived by *in vitro* differentiation of P19 and embryonic stem cells.
Perspect. Dev. Neurobiol. **5**: 175-178.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E. & Gottlieb, D.I. (1995).

Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*.
Dev. Biol. **168**: 343-357.

Bain, G., Ray, W.J., Yao, M. & Gottlieb, D.I. (1994).

From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway.
Bioessays **16**: 343-348.

Barlow, D.P. (1993)

Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation?
Science **260**: 309-310

Barlow, D.P. (1995)

Gametic imprinting in mammals.
Science **270**: 1610-1613

Barr, J., Glenister, P.H. & Cattanach, B.M. (1995)

Ubiquitous expression and imprinting of *Snrpn* in the mouse.
Mamm. Genome **6**: 405-407

Bates, G. & Lehrach, H. (1994)

Trinucleotide repeat expansions and human genetic disease.
BioEssays **16**: 277-284

Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000)

DNA hypermethylation in tumorigenesis.
Trends Genet. **16**: 168-173

Baylin, S.B., Makos, M., Wu, J., Yen, R.-W., Yende Bustros, A., Vertino, P. & Nelkin, B.D. (1991)

Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression.
Cancer Cells **3**: 383-390

Belmokhtar, C.A., Hillion, J. & Segal-Bendirdjian, E. (2001).

Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms.
Oncogene **20**: 3354-3362.

Benson, D.L., Mandell, J.W., Shaw, G. & Banker, G. (1996).

Compartmentation of alpha-internexin and neurofilament triplet proteins in cultured hippocampal neurons.
J. Neurocytol. **25**: 181-196.

Bestor, T. (1987)

Supercoiling-dependent sequence specificity of mammalian DNA methyltransferase. Nucl. Acids Res. **15**: 3835-3843

Bestor, T. and Ingram, V.M. (1983)

Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity and mode of interaction with DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 5559-5563

Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V.M. (1988)

Cloning and sequencing of a cDNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. J. Mol. Biol. **203**: 971-983

Bestor, T.H. (1990)

DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. Phil. Trans. R. Soc. Lond., **B326**: 179-187

Bestor, T.H. (1995)

The biochemical basis of allele-specific gene-expression in genomic imprinting and X inactivation. In: Ohlsson, R., Hall, K. & Ritzen, M. (Eds.), Genomic Imprinting: Causes and consequences. Cambridge University Press, pp. 109-116

Bestor, T.H. and Tycko, B. (1996)

Creation of genomic methylation patterns. Nature Genet. **12**: 363-367

Bielinska, B., Blaydes, S.M., Buiting, K., Yang, T., Krajewska-Walasek, M., Horsthemke, B. & Brannan, C.I. (2000)

De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. Nature Genet. **25**: 74-78

Bird, A.P. & Southern, E.M. (1978)

Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation. J. Mol. Biol. **118**, 27-47

Bird, A.P. (1992)

The essentials of DNA methylation. Cell **70**: 5-8

Bird, A.P. (1995)

Gene number, noise reduction and biological complexity. Trends Genet. **11**: 94-100

Birger, Y., Shemer, R., Perk, J. & Razin, A. (1999)

The imprinting box of the mouse Igf2r gene. Nature **397**: 84-88

Birnbolm, H.C. & Doly, J. (1979)

A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1524

Bishop, D.V. et al., (2000).

Distinctive patterns of memory function in subgroups of females with Turner syndrome: evidence for imprinte x-chromosome after neurodevelopment. Neuropsychologia **38**: 712-721

Bjorklund, A. (1999).

Transplanted precursors of nerve cells: Das and Altman and the revival of of neural transplantation research. Brain Res. Bull. **50**: 477-478.

Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T. & Norum, K.R. (1990).

Transport and storage of vitamin A. Science **240**: 399-404

Boccaccio, I., Glatt-Deeley, H., Watrin, F., Roëckel, N., Lalande, M. & Muscatelli, F. (1999)

The human MAGEL2 gene and ist mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. Hum. Mol. Genet. **8**: 2479-2505

Borsani, G. et al., (1991)

Characterisation of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. Nature **351**: 325-329

Bottani, A., Robinson, A.P., DeLozier-Blanchet, C.D., Engel, E., Morris, M.A., Schmitt, B., Thun-Hohenstein, L. & Schinzel, A. (1994)

Angelman syndrome due to paternal uniparental disomy of chromosome 15: A milder phenotype? Am. J. Med. Genet. **51**: 35-40

Boyce, J., Ennulat, D., Leli, U. & Shea, T. (1996).

Regulation of neuronal differentiation by the α and ϵ isoforms of protein kinase C. Neurosci. Res. Comm. **18**: 195-201.

Boyd, S.G., Harden, A. & Patton, M.A. (1988)

The EEG in early diagnosis of the Angelman (happy puppet) syndrome. Eur. J. Pediatr. **147**: 508-513

Brambilla, R., Gnesutta, N., Minichiello, L., White, G., Roylance, A.J., Herron, C.E., Ramsey, M. et al. (1997)

A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long term memory. Nature **390**: 281-286

Brandeis, M., Kafri, T., Ariel, M., Chaillet, J.R., McCarrey, J., Razin, A. & Cedar, H. (1993)

The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. EMBO J. **12**: 3669-3677

Bressler, J., Tsai, T.F., Wu, M.Y., Tsai, S.F., Ramirez, M.A., Armstrong, D. & Beaudet, A.L. (2001)

The SNRPN promotor is not required for genomic imprinting of the Prader-Willi/Angelman domain in mice. Nature Genet. **28**: 232-240

Brewer, G.J. & Cotman, C.W. (1989).

Survival and groth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of sandwich culture technique or low oxygen. Brain Res. **7**: 65-74.

Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S., & Rastan, S.

The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus.

Cell **71**: 515-526

Bronner-Fraser, M. (1987).

Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody.

Dev Biol. **123**: 321-31.

Brown, T. & Jirincy, J. (1987)

A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine.

Cell **50**: 945-950

Brüstle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D. & McKay, R.D. (1999).

Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants.

Science **285**: 754-756.

Brüstle, O., Spiro, A.C., Karram, K., Choudary, K., Okabe, S. & McKay, R.D. (1997).

In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 14809-14814.

Buiting, K., Barnicoat, A., Lich, C., Pembrey, M., Malcolm, S. & Horsthemke, B. (2001)

Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome.

Am. J. Hum. Genet. **68**: 1290-1294

Buiting, K., Dittrich, B., Dworniczak, B., Lerer, I., Abeliovich, D., Cottrell, S., Temple, I.K., Harvey, J.F., Lich, C., Groß, S. & Horsthemke, B. (1999)

A 28-kb deletion spanning D15S63 (PW71) in five families: a rare neutral variant?

Am. J. Hum. Genet. **65**: 1588-1594

Buiting, K., Dittrich, B., Ende, S. & Horsthemke, B. (1997)

Identification of novel exons 3' to the human SNRPN gene.

Genomics **40**: 132-137

Buiting, K., Dittrich, B., Groß, S., Greger, V., Lalande, M., Robinson, W.P., Mutiranyagura, A., Ledbetter, D. & Horsthemke, B. (1993)

Molecular definition of the Prader-Willi syndrome chromosome region and orientation of the SNRPN gene.

Hum. Mol. Genet. **2**: 1991-1994

Buiting, K., Dittrich, B., Gross, S., Lich, C., Färber, C., Buchholz, T., Smith, E. et al. (1998)

Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis.

Am. J. Hum. Genet. **63**: 170-180

Buiting, K., Dittrich, B., Robinson, W.P., Guitart, M., Abeliovich, D., Lerer, I. & Horsthemke, B. (1994)

Detection of aberrant DNA methylation in unique Prader-Willi syndrome patients and its diagnostic implications.

Hum. Mol. Genet. **3**, 893-895

Buiting, K., Neumann, M., Lüdecke, H.J., Senger, G., Claussen, U., Antich, J., Passarge, E. & Horsthemke, B. (1990)

Microdissection of the Prader-Willi syndrome chromosome region and identification of potential gene sequences.

Genomics **6**: 521-527

Buiting, K., Saitoh, S., Gross, S., Dittrich, B., Schwartz, S., Nicholls, R.D. & Horsthemke, B. (1995)

Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15.

Nature Genet. **15**: 74-77

Butler M.G. & Palmer C.G. (1983)

Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome.

Lancet **I**:1285-1286

Butler, M.G., Meaney, F.J. & Palmer, C.G. (1986)

Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome.

Am. J. Med. Genet. **23**:793-809

Campbell, X.Z. & Neet, K.E. (1995).

Hierarchical analysis of the nerve growth factor-dependent and nerve growth factor-independent differentiation signaling pathways in PC12 cells with protein kinase inhibitors.

J. Neurosc. Res. **42**: 207-219.

Cassidy, S.B., Lai, L.-W., Erickson, R.P., Magnuson, L., Thomas, E., Gendron, R. & Herrman, J. (1992)

Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy.

Am. J. Hum. Genet. **51**: 701-708

Cattanach, B.M. & Kirk, M. (1985)

Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice.

Nature **315**: 496-498

Cavaillé, J. & Bachellerie, J.P. (1996)

Processing of fibrillarin-associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure.

Biochimie **78**: 443-456

Cavaillé, J., Buiting, K., Kiefmann, M., Lalande, M., Brannan, C.I., Horsthemke, B., Bachellerie, J.P., Brosius, J. & Hüttenhofer, A. (2000)

From the cover: Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 14311-14316

Chai, J.-H., Locke, D.P., Ohta, T., Greally, J.M. & Nicholls, R.D. (2001)

Retrotransposed genes such as Frat3 in the mouse chromosome 7C Prader-Willi syndrome region acquire the imprinted status of their insertion sites.

Mamm. Genome **12**: 813-821

Chomczynski, P. (1992)

One hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA or RNA.

Anal. Biochem. **201**: 134-139

Christman, J.K., Sheiknejad, G., Marasco, C.J. & Sufirin, J.R. (1995)

5-Methyl-2'-deoxycytidine in a single stranded DNA can act in cis to signal de novo methylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 7347-7351

Church, G.M. & Gilbert, W. (1984)

Genomic sequencing.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 1991-1995

Ciccolini, F. & Svendsen, C.N. (1998).

Fibroblast growth factor 3 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2.

J. Neurosci. **18**: 7869-7880.

Clark, J.M. (1988)

Novel non-template nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases.

Nucl. Acids Res. **16**: 9677

Clark, S.J, Harrison, J. & Frommer, M. (1995)

CpNpG methylation in mammalian cells.

Nature Genet. **10**: 20-27

Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. & Frommer, M. (1994)

High sensitivity mapping of methylated cytosines.

Nucl. Acids Res. **22**: 2990-2997

Clayton-Smith, J. (1993)

Clinical research on Angelman syndrome in the United Kingdom: Observation on 82 affected individuals.

Am. J. Med. Genet. **46**: 12-15

Clayton-Smith, J.m & Pembrey, M.E. (1992)

Angelman syndrome.

J. Med. Genet. **29**: 412-415

Clearer, J.E. (1995)

It was a very good year for DNA repair.

Cell **76**: 1-4

Cosloy, S.D. & Oishi, M. (1973)

Genetic transformation in Escherichia coli K12

Proc. Acad. Sci. U.S.A. **70**: 84-87

Coulondre, C., Miller, J.H., Farabaugh, P.J. & Gilbert, W. (1978)

Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli.

Nature **274**: 775-780

Countaw, J.L., McQuilkin, P., Girones, N. & Davis, R.J. (1990).

Multistep phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Use of site-directed mutagenesis to examine the role of serine/threonine phosphorylation.

J. Biol. Chem. **265**: 3407-3416.

Craig, J.M. & Bickmore, W.A. (1994)

The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes.

Nature Genet. **7**: 376-382

Cross, S., Kovarik, P., Schmidtke, J., Bird, A. (1991)

Nonmethylated islands in fish genomes are GC-poor.

Nucleic Acids Res. **19**: 1469-1474

De los Santos, T., Schweizer, J., Rees, C.A. & Francke, U. (2000)

Small evolutionary conserved RNA, resembling C/D box small nucleolar RNA, is transcribed from PWCR1, a novel imprinted gene in the Prader-Willi deletion region, which is highly expressed in brain.

Am. J. Hum. Genet. **67**: 1067-1082

Dean, W., Bowden, L., Aitchison, A., Klose, J., Moore, T., Meneses, J.J., Reik, W. & Feil, R. (1997).

Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes.

Development **125**: 2273-2282.

DeChiara, T.M., Robertson, E.J. & Efstradiatis, A. (1991)

Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene.

Cell **64**: 849-859

Dinsmore, J., Ratliff, J., Deacon, T., Pakzaban, P., Jacoby, D., Galpern, W. & Isacson, O. (1996).

Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation.

Cell Transplant. **5**: 131-143.

Dittrich, B., Buiting, K., Gross, S. and Horsthemke, B. (1993)

Characterization of a methylation imprint in the Prader-Willi syndrome chromosome region.

Hum. Mol. Genet. **2**: 1995-1999

Dittrich, B., Buiting, K., Korn, B., Rickard, S., Buxton, J., Saitoh, S., Nicholls, R.D., Pustka, A., Winterpacht, A., Zabel, B. & Horsthemke, B. (1996)

Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene.

Nature Genet. **14**: 163-170

Dittrich, B., Robinson, W.P., Knoblauch, H., Buiting, K., Schmidt, K., Gillesen-Kaesbach, G. & Horsthemke, B. (1992)

Molecular diagnosis of the the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent-of-origin-specific DNA methylation in 15q11-13.

Hum. Genet. **90**: 313-315

Dodd, J., Morton, S.B., Karagogeos, D., Yamamoto, M. & Jessell, T.M. (1988).

Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons.

Neuron **1**: 105-116.

Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubert R. (2001)

The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms.

Dev Biol (Basel) **106**: 89-97; discussion 143-60

Doerfler W, Hohlweg U, Muller K, Remus R, Heller H, Hertz J. (2001)

Foreign DNA integration--perturbations of the genome--oncogenesis.
Ann N Y Acad Sci 2001 Sep; **945**: 276-88

Doerfler, W. (1981)

DNA methylation - a regulatory signal in eucaryotic gene expression.
J. Gen. Vir. **57**: 1-20

Doerfler, W. (1983)

DNA methylation and gene activity.
Ann. Rev. Biochem. **52**: 93-124

Doerfler, W. (1991)

Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **372**: 557-564

Doerfler, W. (1992)

Transformation of cells by adenoviruses: less frequently discussed mechanisms.
In: Malignant Transformation by DNA Viruses. Molecular Mechanisms., W.Doerfler & P. Böhm, eds., Verlag Chemie, Weinheim, New York 87-109

Doerfler, W. (1993)

Adenoviral DNA integration and changes in methylation patterns: A different view of insertional mutagenesis.
Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol., W.E. Cohn & K. Moldawe, eds. **46**: 1-36

Doerfler, W. (1995)

The insertion of foreign DNA into mammalian genomes and its consequences: A concept of oncogenesis.
Adv. Cancer Res. **66**: 313-344

Driscoll, D.J., Waters, M.F., Williams, C.A., Zori, R.T., Glenn, C.C., Avidano, K.M. & Nicholls, R.D. (1992)

A DNA methylation imprint, determined by the sex of the parent, distinguishes the Angelman and Prader-Willi syndromes.
Genomics **13**: 917-924

Duro, G., Barbieri, R., Ribaldo, M.R., Feo, S. & Izzo, V. (1995)

A downward capillary blotting procedure from hundred base pairs to hundred kilobases nucleic acids.
Anal. Biochem. **225**: 360-362

Duval, D., Reinhardt, B., Kedinger, C. & Boeuf, H. (2000).

Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent embryonic stem cell survival.
Faseb J. **14**: 1577-1584.

Dykens, E.M. & Cassidy, S.B. (1996)

Correlates of maladaptive behavior in children and adults with Prader-Willi syndrome.
Am. J. Med. Genet. **62**: 205-212

Efstradiadis, A. (1994)

Parental imprinting of autosomal mammalian genes.
Curr. Opin. Genet. Dev. **4**: 265-280

El-Maarri, O., Buiting, K., Peery, E.G., Kroisel, P.M., Balaban, B., Wagner, K., Uрман, B., Heyd, J., Lich, C., Brannan, C.I., Walter, J. & Horsthemke, B. (2001)

Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization.
Nature Genet. **27**: 341-344

Engemann et al., (2000).

Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedeman region: implication for a novel imprinting centre and extended imprinting.
Hum. Mol. Genet. **9**: 2691-2706.

Evans, M.J. & Kaufman, K.H. (1981)

Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.
Nature **292**: 154-156.

Färber, C., Dittrich, B., Buiting, K. & Horsthemke, B. (1999)

The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC deletion.
Hum. Mol. Genet. **8**: 337-343

Färber, C., Groß, S., Neesen, J., Buiting, K. & Horsthemke, B. (2000)

Identification of a testis-specific gene (C15orf2) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15.
Genomics **65**: 174-183

Feil, R. & Khosla, S. (1999)

Genomic imprinting in mammals. An interplay between chromatin and DNA methylation?
Trends Genet. **15**: 431-435

Feil, R., Boyano, M.D., Allen, N.D. & Kelsey, G. (1997)

Parental chromosome-specific chromatin conformation in the imprinted U2af1-rs1 gene in the mouse.
J. Biol. Chem. **272**: 20893-20900

Feil, R., Charlton, J., Bird, A.P., Walter, J. & Reik, W. (1994)

Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for genomic sequencing.
Nucleic Acids Res. **22**: 695-696

Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983)

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132**: 6-13

Ferguson-Smith, A.C., Sasaki, H., Cattanaach, B.M. & Surani, M.A. (1993)

Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene.
Nature **362**: 751-755

Filipowicz, W. (2000)

Imprinted expression of small nucleolar RNAs in brain: Time of RNomics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 14035-14037

- Floeter, M.K. & Greenough, W.T. (1979)**
Cerebellar plasticity: modification of Purkinje cell structure differential rearing in monkeys.
Science **206**: 227-229
- Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P. & Samarut, J. (1995).**
In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial and functional neurons.
J. Cell Sci. **108**: 3181-3188.
- Frank, D., Keshet, I., Shani, M., Levine, A., Razin, A. & Cedar, H. (1991)**
Demethylation of CpG islands in embryonic cells.
Nature **351**: 239-241
- Fridman, C., Varela, M.C., Kok, F., Diamant, A. & Koiffmann, C.P.**
Paternal UPD15: Further genetic and clinical studies in four Angelman syndrome patients.
Am. J. Med. Genet. **92**: 322-327
- Friedman, B., Fujiki, H. & Rosner, M.N. (1990).**
Regulation of the epidermal growth factor receptor by growth-modulating agents: effects of staurosporine, a protein kinase inhibitor.
Cancer Res. **50**: 533-538.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. & Paul, C.L. (1992)**
A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 1827-1831
- Gabriel, J.M., Gray, T.A., Stubbs, L., Saitoh, S., Ohta, T. & Nicholls, R.D. (1998).**
Structure and function correlations at the imprinted mouse *Snrpn* locus.
Mamm. Genome **9**: 7888-793
- Gajović, S., St-Onge, L., Yokota, Y. Gruss, P. (1997).**
Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells.
Differentiation **62**: 187-192.
- Gallagher, H.C., Odumeru, O.A. & Regan, C.M. (2000).**
Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation state by cell-cell contact and protein kinase C delta.
J. Neurosci. res. **61**: 636-645.
- Gerard, M., Hernandez, L., Wevrick, R., Stewart, C. (1999)**
Disruption of the mouse *Necdin* gene results in early postnatal lethality: a model for neonatal distress in Prader-Willi syndrome.
Nature Genet. **23**: 199-202
- Gillesen-Kaesbach, G., Demuth, S., Thiele, H., Theile, U., Lich, C., Horsthemke, B. (1999)**
A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect.
Eur. J. Hum. Genet. **7**: 638-644
- Glenn, C.C., Nicholls, R.D., Robinson, W.P., Saitoh, S., Nikawa, N., Schinzel, A., Horsthemke, B. & Driscoll, D.J. (1993)^a**
Modification of 15q11-13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients.
Hum. Mol. Genet. **9**: 1377-1382
- Glenn, C.C., Porter, K.A., Jong, M.T.C., Nicholls, R.D. & Driscoll, D.J. (1993)^b**
Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene.
Hum. Mol. Genet. **2**: 2001-2005
- Glenn, C.C., Saitoh, S., Jong, M.T., Filbrandt, M.M., Surti, U., Driscoll, D.J., Nicholls, R.D. (1996)**
Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene.
Am. J. Hum. Genet. **58**: 335-346
- Goedert, M., Crowther, R.A. & Garner, C.C. (1991).**
Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2.
Trends Neurosci. **14**: 193-199.
- Goyan, C., Nogueira, T.I.V. & Faugeron, G. (1994)**
Perpetuation of cytosine methylation in *Ascomobolus immersus* implies a novel type of maintenance methylase.
J. Mol. Biol. **240**, 42-51
- Gray, T.A., Saitoh, S., Nicholls, R.D. (1999)**
An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 5616-5621
- Greally, J.M., Gray, T.A., Gabriel, J.M., Song, L., Zemel, S. & Nicholls, R.D. (1998)**
Mapping and evolutionary conservation of nuclear matrix attachment regions in the 15q11-q13 imprinted domain. Fourth Chromosome 15 Workshop; Abstracts in: <http://mendel.medgen.ubc.ca/medgen/15mapdata.html>
- Greally, J.M., Gray, T.A., Gabriel, J.M., Song, L.Q., Zemel, S., Nicholls, R.D. (1999)**
Conserved characteristics of heterochromatin-forming DNA at the 15q11-q13 imprinting center.
Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 14430-14435
- Greene, L.A. & Tischler, A.S. (1976).**
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**: 2424-2428.
- Greger, V., Woolf, E., Lalonde, M. (1993)**
Cloning of the breakpoints of a submicroscopic deletion in an Angelman syndrome patient.
Hum. Mol. Genet. **2**: 921-924
- Gregory, R.I., Feil, R. (1999)**
Analysis of chromatin in limited numbers of cells: a PCR-SSCP based assay of allele-specific nuclease sensitivity.
Nucleic Acids Res. **27**: e32
- Grigg, G. & Clark, S. (1994)**
Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA.
BioEssays **16**: 431-436
- Grimaldi, K., Horn, D.A., Hudson, L.D., Terenghi, G., Barton, P., Polak, J.M., Latchman, D.S. (1993)**
Expression of the *SmN* splicing protein is developmentally regulated in the rodent brain but not in the rodent heart.
Dev. Biol. **156**: 319-323

Gross, D.S. & Garrard, W.T. (1988)

Nuklease hypersensitive sites in chromatin.
Annu. Rev. Biochem. **57**: 159-197

Gross-Bellard, M., Oudet, P. & Chambon, P. (1973)

Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells.
Eur. J. Biochem. **36**: 32-38

Gruenbaum, Y., Cedar, H. and Razin, A. (1982)

Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase.
Nature **295**: 620-622

Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H. & Razin, A. (1981)

Sequence specificity of methylation in higher plant DNA.
Nature **292**: 860-862

Guldberg, P., Grønbaek, K., Aggerholm, A., Platz, A., Thor Straten, P., Ahrenkiel, V., Hokland, P. & Zeuthen, J. (1998)

Detection of mutations in GC-rich DNA by bisulfite denaturing gradient gel electrophoresis.
Nucl. Acids Res. **26**: 1548-1549

Gunaratne, P.H., Nakao, M., Ledbetter, D.H., Sutcliffe, J.S., Craig Chinault, A. (1995)

Tissue-specific and allele-specific replication timing control in the imprinted human Prader-Willi syndrome region.
Genes Dev. **9**: 808-820

Gunay-Aygun, M., Heeger, S., Schwartz, S., Cassidy, S.B. (1997)

Delayed diagnosis in patients with Prader-Willi syndrome due to maternal uniparental disomy 15.
Am. J. Med. Genet. **71**: 106-110

Haberer, K. (1966)

Measurements of beta activities in aqueous samples utilizing Cerenkov radiation.
Packard Technical Bulletin **16**

Haig, D. (1992)

Genomic imprinting and the theory of parent-offspring conflict.
Semin. Devel. Biol. **3**: 153-160

Hall, J.G. (1990)

Genomic imprinting: Review and relevance to human diseases.
Am. J. Hum. Genet. **46**: 857-873

Hamabe, J., Fukushima, Y., Harada, N., Abe, K., Matsuo, N., Nagai, T., Yoshioka, A., Tonoki, H., Tsukino, R., & Niikawa, N. (1991^b)

Molecular study of the Prader-Willi syndrome: Deletion, RFLP, and phenotype analyses of 50 patients.
Am. J. Med. Genet. **41**: 54-63

Hamabe, J., Kuroki, Y., Imaizumi, K., Sugimoto, T., Fukushima, Y., Yamaguchi, A., Izumikawa, Y. & Niikawa, N. (1991^a)

DNA deletion and its parental origin in Angelman syndrome patients.
Am. J. Med. Genet. **41**: 64-68

Hanahan, D. (1983)

Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557-580

Hanel, M.L. & Wevrick, R. (2001)

Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse Ndn: Implications for maintenance of imprinting in target genes of the imprinting center.
Mol. Cell. Biol. **21**: 2384-2392

Hashimoto, K., Azuma, C., Koyama, M., Ohashi, K., Kamiura, S., Nobunaga, T., Kimura, T., Tokugawa, Y., Kanai, T & Saji, F. (1995)

Loss of imprinting in choriocarcinoma.
Nature Genet. **9**: 109-110.

Hayatsu, H. (1976)

Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **16**: 75-124

Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K. & Iida, S. (1970)

Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives.
Biochemistry **9**: 2858-2865

Hazel, B.A., Baum, C. & Kalf, G.F. (1996)

Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblasts.
Stem Cells **14**: 730-742.

Heidemann, S.R. (1996)

Cytoplasmic mechanisms of axonal and dendritic growth in neurons.
Int. Rev. Cytol. **165**: 235-296.

Heilman, K.M., Valenstein, E. (1980)

Emotional disorders caused by CNS dysfunction.
Geriatrics **35**: 77-86

Heller, H., Kämmer, C., Wilgenbus, P. & Doerfler, W. (1995)

Chromosomal insertion of foreign DNA (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage λ) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 5515-5519

Hellman-Blumberg, U., Hintz, M.F., Gatewood, J.M. & Schmid, C.W. (1993)

Developmental differences in methylation of human Alu repeats.
Mol. Cell. Biol. **13**: 4523-4530

Henikoff, S. & Matzke, M.A. (1997)

Exploring and explaining epigenetic effects.
Trends Genet. **13**: 293-295

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. (1996)

Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**: 9821-9826

- Hershko, A., Razin, A. & Shemer, R. (1999)**
Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse *Zfp127* gene.
Gene **234**: 323-327
- Hershko, A.Y., Finberg, Y., Kantor, B., Shemer, R. & Razin, A. (2001)**
The mouse *Snrpn* minimal promoter and its human orthologue: activity and imprinting.
Genes to Cells **6**: 967-975
- Hochstrasser, M. (1996)**
Ubiquitin-dependent protein degradation.
Ann. Rev. Genet. **30**: 405-439
- Hoekstra, W.P., Bergmans, H.E. & Zuidweg, E.M. (1980)**
Transformation in *Escherichia coli*: studies on the nature of donor DNA after uptake and integration.
Genet. Res. **35**: 279-289
- Hogan, B., Constantini, F. & Lacy, E. (1994)**
Manipulating the mouse embryo; A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY
- Holliday, R. & Pugh, J.E. (1975)**
DNA modification mechanisms and gene activity during development.
Science **187**: 226-232
- Holm, V.A., Cassidy, S.B., Butler, M.G., Hanchett, J.M., Greenswag, L.R., Whitman, B.Y. & Greenberg, F. (1993)**
Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria.
Pediatrics **91**: 398-402
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981)**
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. **114**: 193-197
- Holmquist, G.P. (1987)**
Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression.
Am. J. Hum. Genet. **40**: 151-173
- Holmquist, G.P. (1992)**
Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features.
Am. J. Hum. Genet. **51**: 17-37
- Horsthemke, B. (1997)**
Structure and function of the human chromosome 15 imprinting center.
J. Cell. Physiol. **173**: 237-241
- Horsthemke, B., Dittrich, B. & Buiting, K. (1995)**
Parent-of-origin-specific DNA methylation and imprinting mutations on human chromosome 15.
In: Ohlsson, R., Hall, K. & Ritzen, M. (Eds.), *Genomic Imprinting: Causes and consequences*.
Cambridge University Press, pp. 109-116
- Horsthemke, B., Dittrich, B., Buiting, K. (1997)**
Imprinting mutations on human chromosome 15.
Hum. Mutat. **10**: :329-337
- Hotchkiss, R.D. (1948)**
The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleotides by paper chromatography.
J. Biol. Chem. **168**: 315-332
- Howlett, S.K. & Reik, W. (1991)**
Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development.
Development **113**: 119-127
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M. (1991)**
A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18.
EMBO J. **10**: 41294135
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout III, W.M., Binischkiewicz, D., Yanagimachi, R. & Jaenisch, R. (2001)**
Epigenetic instability in ES Cells and cloned mice.
Science **293**: 95-97.
- Hurst, L. (1997)**
Evolutionary theories of genomic imprinting.
In: Surani M.A. & Reik, W. (Eds.) *Genomic Imprinting*. **18**: 211-237
- Hurst, L.D. & McVean, G. T. (1997)**
Growth effects of uniparental disomies and the conflict theory of genomic imprinting.
Trends Genet. **13**: 436-443
- Imoto, H., Hirotsune, S., Muramatsu, M., Okuda, K., Sugimoto, O., Chapman, V.M. & Hayashizaki, Y. (1994)**
Direct determination of NotI cleavage sites in the genomic DNA of adult mouse kidney and human trophoblast using whole-range restriction landmark genomic scanning.
DNA Res. **1**: 239-243
- Inoue et al., (2002)**
Faithful expression of imprinted genes in cloned mice.
Science **295**: 297
- Isles, A.R. & Wilkinson, L.S. (2000)**
Imprinted genes, cognition and behaviour.
Trends Cogn. Sci. **4**: 309-318
- Izumikawa, Y., Naritomi, K. & Hirayama, K. (1991)**
Replication asynchrony between homologs 15q11.2: cytogenetic evidence for genomic imprinting.
Hum. Genet. **87**: 1-5
- Jay V., Becker, L.E., Chan F-W., Perry, T.L. (1991)**
Puppet-like syndrome of Angelman: a pathologic and neurochemical study.
Neurology **41**: 416-422
- Jay, P., Rougeulle, C., Massacrier, A., Moncla, A., Mattei, M-G., Malzac, P., Ro ckel, N., Taviaux, S., Bergé Lefranc, J-L., Cau, P., Berta, P., Lalande, M., Muscatelli, F. (1997)**
The human *necdin* gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region.
Nature Genet. **17**: 357-361
- Jeppesen, P. (1997)**
Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis.
BioEssays **19**: 67-74

- Ji, Y., Walkowicz, M.J., Buiting, K., Johnson, D.K., Tarvin, R.E., Rinchik, E.M., Horsthemke, B. et al. (1999)**
The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities.
Hum. Mol. Genet. **8**: 533-542
- Johannessen, L.E., Haugen, K.E., Østvold, A.C., Stang, E. & Madhusui, I.H. (2001)**
Heterodimerization of the epidermal-growth-factor (EGF) receptor and ErbB2 and the affinity of EGF binding are regulated by different mechanisms.
Biochem J. **356**: 87-96.
- Jones, P.A., Rideout, W.M., III Shen, J.-C., Spruck, C.M. & Tsai, Y.C. (1992)**
Methylation, mutation and cancer.
BioEssays **14**: 33-36
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Stouboulis, J. & Wolffe, A.P. (1998)**
Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.
Nature Genet. **19**: 187-181
- Jones-Villeneuve, E.M., McBurney, M.W. Roger, K.A. & Kalnins, V.I. (1982)**
Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells.
J. Cell Biol. **94**: 253-262.
- Jong, M.T., Gray, T.A., Ji, Y., Glenn, C.C., Saitoh, S., Driscoll, D.J., Nicholls, R.D. (1999)^b**
A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region.
Hum. Mol. Genet. **8**: 783-793
- Jong, M.T.C., Carey, A.H., Caldwell, K.A., Lau, M. H., Driscoll, D.J., Stewart, C.L., Richnik, E.M., Nicholls, R.D. (1999)^a**
Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region.
Hum. Mol. Genet. **8**: 795-803
- Joosten, E. & Gribnau, A.A.M. (1989)**
Astrocytes and guidance of outgrowing corticospinal tracts in the rat: An immunocytochemical study using anti-vimentin and anti-gial fibrillary acidic protein.
Neuroscience **31**: 439-452.
- Judson, H., Hayward, B.E., Sheridan, E. & Bonthron, D.T. (2002)**
A global disorder of imprinting in the human female germ line.
Nature **416**: 539-542
- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. & Razin, A. (1992)**
Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line.
Genes & Dev. **6**: 705-714
- Kafri, T., Gao, X. & Razin, A. (1993)**
Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the preimplantation mouse embryo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 10558-10562
- Kaplan, D.R., Martin, Z.D. & Parada, L.F. (1991)**
Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF.
Nature **350**: 158-160.
- Kawame, H., Gartler, S.M. & Scott Hansen, R. (1995)**
Allele-specific replication timing in imprinted domains: absence of asynchrony at several loci.
Hum. Mol. Genet. **4**: 2287-2293
- Kawame, H., Gartler, S.M., Scott Hansen, R. (1995)**
Allele-specific replication timing in imprinted domains: absence of asynchrony at several loci.
Hum. Mol. Genet. **4**: 2287-2293
- Keverne, E.B. (1997)**
Genomic imprinting in the brain.
Curr. Opin. Neurol. **7**: 463-468
- Keverne, E.B. (2001)**
Genomic imprinting and the maternal brain.
Progr. Brain Res. **20**: 1-7
- Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W. & Feil, R. (xxx)**
Culture of pre-implantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes.
Biol. Reprod. **2001** **64**: 918-26.
- Kilian, J., Nolan, C.M., Wylle, A.A., Li, T., Vu, T.H., Hoffman, A.R. & Jirtle, R.L. (2001)**
Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from the Jurassic to the Quaternary.
Hum. Mol. Genet. **17**: 1721-1728.
- Kim, J., Noskov, V.N., Lu, X., Bergmann, A., Ren, X., Warth, T., Richardson, P., Kouprina, N., Stubbs, L. (2000)**
Discovery of a novel, paternally expressed ubiquitin-specific processing protease gene through comparative analysis of an imprinted region of mouse chromosome 7 and human chromosome 19q13.4.
Genome Res. **10**: 1138-1147
- Kirby, K.S. (1957)**
A new method for the isolation of desoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between desoxyribonucleic acid and protein.
Biochem. J. **66**: 495-504
- Kishino, T., Lalonde, M., Wagstaff, J. (1997)**
UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome.
Nature Genet. **15**: 70-73
- Kishino, T., Wagstaff, J. (1998)**
Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes.
Genomics **47**: 101-107

- Kleim, J.A., Vij, K., Ballard, D.H., Greenough, W.T. (1997)**
Learning-dependent synaptic modifications in the cerebellar cortex of the adult rat persist for at least four weeks.
J. Neurosci. **17**: 717-721
- Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E. & Barbarçid, M. (1991).**
The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor.
Cell **65**: 189-197.
- Knoll, J.H.F., Wagstaff, J. & Lalonde, M. (1993)**
Cytogenetic and molecular studies in Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview.
Am. J. Med. Genet. **46**: 2-6
- Kochanek, S., Renz, D. & Doerfler, W. (1993)**
DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells.
EMBO J. **12**: 1141-1151
- Koeberl, D.D., Bottema, C.D.K., Ketterling, R.P., Bridge, P.J., Lillicrap, D.P. & Sommer, S.S. (1990)**
Mutations causing hemophilia B: direct estimate of the underlying rates of spontaneous germ-line transitions, transversions, and deletions in a human genome.
Am. J. Hum. Genet. **47**:202-217
- Koetsier, P.A. & Doerfler, W. (1996)**
A simple device to prevent contamination during spin-column gel filtration.
Trends Genet. **12**: 339
- Koetsier, P.A., Schorr, J. & Doerfler, W. (1993)**
A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA.
BioTechniques **15**: 260-261
- Kono, T., Obata, Y., Yoshimizu, T., Nakahara, T. & Carroll, J. (1996)**
Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse.
Nature Genet. **13**: 91-94
- Krueger, R. Jr., Hennig, A.K & Schwartz, N.B. (1992).**
Two immunologically and developmentally distinct chondroitin sulfate proteoglycans in embryonic chick brain.
J. Biol. Chem. **267**: 12149-12161.
- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C. & Schachner, M. (1984).**
Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1.
Nature **306**: 376-378.
- Kubota, T., Aradhya, S., Macha, M., Smith, A. C., Suhr, L.C., Satish, J., Verp, M.S., Nee, H.L., Johnson, A., Christian, S.L. & Ledbetter, D.H. (1996)**
Analysis of parent of origin specific DNA methylation at SNRPN and PW71 in tissues: implication for prenatal diagnosis.
J. Med. Genet. **33**: 1011-1014
- Kubota, T., Niikawa, N., Jinno, Y., Ishimaru, T. (1994)**
GABAA receptor $\beta 3$ subunit gene is possibly paternally imprinted in humans.
Am. J. Med. Genet. **49**: 452-453
- Kuroiwa, Y., Kaneko-Ishino, T., Kagitani, F., Kohda, T., Li, L-L., Tada, M., Suzuki, R., Yokoyama, M., Toshihiko, T., Wakana, S. et al. (1996)**
Peg3 imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein.
Nature Genet. **15**: 186-190
- Kuslich, C.D., Kobori, J.A., Mohapatra, G., Gregorio-King, C., Donlon, T.A. (1999)**
Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene.
Am. J. Hum. Genet. **64**: 70-76
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U. R. & Avruch, J. (1992).**
Raf-1 activates MAP kinase-kinase.
Nature **358**: 417-421.
- Lang, E., Mazauric-Stuker, M.L., and Maelicke, A. (1989).**
States of developmental commitment of a mouse embryonal carcinoma cell line differentiating along a neural pathway.
J. Cell Biol. **109**: 2481-2493.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R. & Prydz, H. (1992)**
CpG islands as gene markers in the human genome.
Genomics **13**:1095-1107
- Lawrie AM, Noble ME, Tunnah P, Brown NR, Johnson LN, Endicott JA. (1997)**
Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK2.
Nat Struct Biol 1997 **4**: 796-801
- Lee, M.K. & Cleveland, D.W. (1996).**
Neuronal intermediate filaments.
Annu. Rev. Neurosci. **19**: 187-217.
- Lee, M.P., DeRaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M., Feinberg, A.P. (1999)**
Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to *KvLQT1* occurs frequently in Bechwit-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 5203-5208
- Lee, S., Kozlov, S., Hernandez, L., Chamberlain, S.J., Brannan, C.I., Stewart, C.L., Wevrick, R. (2000)**
Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-Willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype.
Hum. Mol. Genet. **9**: 1813-1819
- Lee, S., Wevrick, R. (2000)**
Identification of novel imprinted transcripts in the Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome deletion region: further evidence for regional imprinting control.
Am. J. Hum. Genet. **66**: 848-858

- Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S.C., Ishino, F., Keverne, E.B., Surani, M.A. (1998)**
Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of imprinted gene *Mest*.
Nature Genet. **20**: 163-169
- Leli, U., Shea, T.B., Cataldo, A., Hauser, G., Grynspan, F., Beermann, M.L., Liepkalns, V.A., Nixon, R.A. & Parker, P.J. (1993).**
Differential expression and subcellular localization of protein kinase C alpha, beta, gamma, delta, and epsilon isoforms in SH-SY5Y neuroblastoma cells: modifications during differentiation.
J. Neurochem. **60**: 289-298.
- Leonard, C.M., Williams, C.A., Nicholls, R.D., Agee, O.F., Voeller, K.K., Honeyman, J.C., Staab, E.V. (1993)**
Angelman and Prader-Willi syndrome: a magnetic resonance imaging study of differences in cerebral structure.
Am. J. Med. Genet. **46**: 26-33
- Leprince, P., Bonvoisin, C., Rogister, B., Mazy-Servais, C. & Moonen, G. (1996).**
Protein kinase4- and staurosporine-dependent induction of neurite outgrowth and plasminogen activator activity in PC12 cells.
Biochem. Pharmacol. **52**: 1399-1405.
- Levebvre, A., Mauffret, O., El Antri, S., Monnot, M., Lescot, E. & Fermandjian, S. (1995)**
Sequence dependent effects of CpG cytosine methylation.
Eur. J. Biochem. **229**: 445-454
- Li, E., Bestor, T. & Jaenisch, R. (1992)**
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.
Cell **69**: 915-926
- Li, L-L., Keverne, E.B., Aparicio, S.A., Ishino, F., Barton, S.C., Surani, M.A. (1999)**
Regulation of maternal behaviour and offspring growth by paternally expressed *Peg3*.
Science **284**: 330-333
- Lichtenstein, A.V., Moiseev, V.L. & Zaboikin, M.M. (1990)**
A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening.
Anal. Biochem. **191**: 187-191
- Lilien, L. & Wancio, D. (1998).**
Changes in epidermal growth factor receptor expression and competence to generate glia regulate timing and choice of differentiation in the retina.
Mol. Cell. Neurosci. **10**: 296-308.
- Lilien, L. (1995).**
Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor.
Nature **377**: 158-162.
- Lin, M.S., Zhang, A., Fufimoto, A. (1995)**
Asynchronous DNA replication between 15q11.2q12 homologs: cytogenetic evidence for maternal imprinting and delayed replication.
Hum. Genet. **96**: 572-576
- Lindahl, T. (1982)**
DNA repair enzymes.
Annu. Rev. Biochem. **51**: 67-87
- Lombet, A., Zujovic, V., Kandouz, M., Billardon, C., Carvajal-Gonzalez, S., Gompel, A. & Rostène, W. (2001).**
Resistance to induced apoptosis in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH in relation to neuronal differentiation.
Eur. J. Biochem. **268**: 1352-1362
- Lyko, F., Buiting, K., Horsthemke, B., Paro, R. (1998)**
Identification of a silencing element in the human 15q11-q13 imprinting center by using transgenic *Drosophila*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 1698-1702
- MacDonald, H.R., Wevrick, R. (1997)**
The *neccin* gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse.
Hum. Mol. Genet. **6**: 1873-1878
- MacPherson, P.A., Jones, S., Pawson, P.A., Marshall, K.C. & McBurney, M.W. (1997).**
P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro.
Neuroscience **80**: 487-499.
- Maden, B.E.H. (1990)**
The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA.
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **39**: 241-303
- Magoura, D., Segos, V. & Dawson, G., (1993).**
Protein kinase $C\epsilon$ is a developmentally regulated, neuronal isoform in the chick embryo central nervous system.
J. Neurosci. Res. **35**: 488-498.
- Mandell, J. W. & Banker, G.A. (1995).**
The microtubule cytoskeleton and the development of neuronal polarity.
Neurobiol. Aging **16**: 229-238.
- Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R. (1993).**
The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain.
Cell **73**: 381-393.
- Martin, G.R. (1981)**
Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 7634-7638.
- Martini R, Xin Y, Schachner M. (1994)**
Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture.
Glia **10**: 70-4
- Massenet, S., Mougins, A., Branlant, C. (1998)**
in Modification and editing of RNA: The alteration of RNA structure and function,
eds. Grosejean, H. and Benne, R. (American Society of Microbiology Press, Washington D.C.), 201-228
- Matsuo, K., Clay, O., Takahashi, T., Silke, J. & Schaffner, W. (1993)**
Evidence for erosion of mouse CpG islands during mammalian evolution.
Somatic Cell Mol. Genet. **19**: 543-555

- Matsuura, T., Sutcliffe, J.S., Fang, P., Galjaard, R.-J., Jiang, Y.-H., Benton, C.S., Rommes, J.M., et al. (1997)**
De novo truncation mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome.
Nature Genet. **15**: 74-77
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980)**
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
Meth. Enzymol. **65**: 499-560
- Maxwell, E.S., Fournier, M.J. (1995)**
The small nucleolar RNAs.
Annu. Rev. Biochem. **64**: 897-934
- McBurney, M.W. & Roger, B.J. (1982).**
Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns.
Dev. Biol. **89**: 503-508.
- McGrath, J., Solter, D. (1984)**
Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes.
Cell **37**: 179-183
- McKay, R. (1997).**
Stem cells in the central nervous system.
Science **276**: 66-71.
- Meguro, M., Mitsuya, K., Sui, H., Shigenami, K., Kugoh, H., Nakao, M., Oshimura, M. (1997)**
Evidence for uniparental, paternal expression of the human GABAA receptor subunit genes, using microcell-mediated chromosome transfer.
Hum. Mol. Genet. **6**: 2127-2133
- Meyer, P., Niedenhof, I. & Lohuis, M. (1994)**
Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*.
EMBO J. **13**: 2084-2088
- Migeon, B.R. (1994)**
X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences.
Trends Genet. **10**: 230-235
- Miketta, G. (1998)**
Vererbung: Der Apfel fällt nicht weit vom Stamm.
Focus **3**: 108-115
- Mirkes, P.E., Wilson, K.L. & Cornel, L.M. (2000).**
Teratogen-induced activation of ERK, JNK, and p38 MAP kinases in early postimplantation murine embryos.
Teratology **62**: 14-25.
- Miura, K., Obama, K., Masuzaki, H., Ikeda, Y., Yoshimura, Akashi, T. et al., (1999)**
Methylation imprinting of H19 and SNRPN genes in human benign ovarian teratomas.
Am. J. Hum. Genet. **65**: 1359- 1367
- Monk, M. & Salpekar, A. (2001)**
Expression of imprinted genes in human preimplantation development.
Mol. Cell. Endocr. **183**: S35-S40
- Montgomery, D.L. (1994).**
Astrocytes: Form, functions, and roles in disease.
Vet. Pathol. **31**: 145-167.
- Moore, T. & Haig, D. (1991)**
Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war.
Trends Genet. **7**: 45-49
- Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J. (1997).**
Regulatory mechanisms in stem cell biology.
Cell **88**: 287-298.
- Muiznieks, I. & Doerfler, W. (1994)**
The topology of the promoter of RNA polymerase II- and II-transcribed genes is modified by the methylation of 5'-CG-3' dinucleotides.
Nucl. Acids. Res. **22**: 2568-2575
- Muscатели, F., Abrous, D.N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Moal, M.L., Cau, P., Cremer, H. (2000)**
Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome.
Hum. Mol. Genet. **9**: 3101-3110
- Nagy, A., Góczy, E., Merentes Dias, E., Prideaux, V.R., Iványi, M., Markkula, M. & Rossant, J. (1990).**
Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse.
Development **110**: 815-821.
- Nakada, Y., Taniura, H., Uetsuki, T., Inazawa, J., Yoshikawa, K. (1998)**
The human chromosomal gene for *necdin*, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region.
Gene **213**: 65-72
- Nathans, D. & Smith, H.O. (1975)**
Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules.
Ann. Rev. Biochem. **44**: 273-293
- Neumann, B., Kubicka, P., Barlow, D.P. (1995)**
Characteristics of imprinted genes.
Nature Genet. **9**: 12-13
- Nicholls, R.D. (1999)**
Incriminating gene suspects, Prader-Willi style.
Nature Genet. **23**: 132-134
- Nicholls, R.D., Knoll, J.H., Butler, M.G., Karam, S. & Lalonde, M. (1989^a)**
Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome.
Nature **342**: 281-285
- Nicholls, R.D., Knoll, J.H., Glatt, K., Hersh, J.H., Brewster, T.D., Graham, J.M. Jr., Wurster Hill, D., Wharton, R. & Latt, S.A. (1989^b)**
Restriction fragment length polymorphisms within proximal 15q and their use in molecular cytogenetics and Prader-Willi syndrome.
Am. J. Hum. Genet. **33**: 66-77

- Niederreither, K., Vermot, J., Messaddeq, N., Schuhbauer, B., Chambon, P. & Dolle, P. (2001).** Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* **128**: 1019-1031.
- Ning, Y., Roschke, A., Christian, S.L., Lesser, J., Sutcliffe, J.S., Ledbetter, D.H. (1996)** Identification of a novel paternally expressed transcript adjacent to snRPN in the Prader-Willi syndrome critical region. *Genome Res.* **6**: 742-746
- Nishizuka, Y. (1984).** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-697
- Oh, C.E., McMahon, R., Benzer, S., Tanouye, M.A. (1994)** *Bendless*, a *Drosophila* gene affecting neuronal connectivity, encodes a ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J. Neurosci.* **14**: 3166-3179
- Ohta, T., Buiting, K., Kokkonen, H., McCandless, S., Heeger, S., Leisti, H., Driscoll, D.J., Cassidy, S.B., Horsthemke, B., Nicholls, R.D. (1999)** Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 385-369
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M. & McKay, R.D. (1996).** Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* **59**: 89-102.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D. & Li, E. (1999)** DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257
- Olander, E., Stamberg, J., Steinberg, L., Wulfsberg, E.A. (2000)** Third Prader-Willi Syndrome phenotype due to maternal uniparental disomy 15 with mosaic trisomy 15. *Am. J. Med. Genet.* **93**: 215-218
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., Walter, J. (2000)** Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biol.* **10**: 475-478
- Özçelik, T., Leff, S.E., Robinson, W., Donlon, T., Lalonde, M., Sanjines, E., Schinzel, A., Francke, U. (1992)** Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi critical region. *Nature Genet.* **2**: 265-269
- Palmer, T.D., Markakis, E.A., Willhoite, A.R., Safar, F. & Gage, F.H. (1999).** Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* **19**: 8487-8497.
- Palmiter, R.D., (1974)** Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. *Biochemistry* **13**: 3606-3615
- Penner, K.A., Johnston, J., Faircloth, B. H., Irish, P. & Williams, C.A. (1993)** Communication, cognition, and social interaction in the Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **46**: 34-39
- Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Mueller, P.R., Wold, B. & Riggs, A.D. (1989)** Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* **246**, 810-813
- Pfeiffer, S., Jacob, H., Mikoshiba, K., Dubois, P., Guénet, J.-L., Nicolas, J.F., Gaillard, J., Chevance, L.G., and Jacob, F. (1981).** Differentiation of a teratocarcinoma line: preferential development of cholinergic neurons. *J. Cell. Biol.* **88**: 57-66.
- Potts, W.K. (2002)** Wisdom through immunogenetics. *Nature Genet.* **30**: 130-131
- Prade, L., Engh, R.A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., and Bossmeyer, D. (1997).** Staurosporine-induced conformational of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential. *Structure* **5**: 1627-1637
- Prader A., Labhart, A., Willi H. (1956)** Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **86**: 1260-1261
- Prince, J.A. & Orelund, L. (1997).** Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res. Bull.* **43**: 515-523.
- Qian, X., Davis, A.A., Goderie, S.K. & Temple, S. (1997).** FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* **18**: 81-93.
- Raizis, A.M., Schmitt, F. & Jost, J.-P. (1995)** A Bisulfite Method of 5-Methylcytosine Mapping That Minimizes Template Degradation. *Analytical Biochem.* **226**: 161-166
- Rasouly, D., Shavit, D., Zuniga, R., Elejalde, R.B., Unsworth, B.R., Yayon, A., Lazarovici, P. & Lelkes, P.I. (1996).** Staurosporine induces neurite outgrowth in neuronal hybrids (PC12EN) lacking NGF receptors. *J. Cell Biochem.* **62**: 356-371.
- Rasouly, D., Rahamim, E., Lester, D., Matsuda, Y. & Lazarovici, P. (1992).** Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of protein kinase C inhibition. *Mol. Pharmacol.* **42**: 35-43.

Razin, A. and Cedar, H. (1993)

DNA methylation and embryogenesis.
In: Jost, J.P. & Saluz, H.P. (Eds.), *DNA Methylation: Molecular and Biological Significance*.
Birkhauser Verlag Basel/Schweiz, 344-357

Reeben, M. & Prydz, H. (1994)

An improved method for detection of 5-methylcytosine by PCR-based genomic sequencing.
BioTechniques **16**: 416-417

Reik, W. & Murell, A. (2000)

Silence across the border.
Nature **405**: 408-409

Reik, W., & Walter, J. (2001)

Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote.
Nature Genet. **27**: 255-256

Reik, W., Dean, W. & Walter, J. (2001)

Epigenetic reprogramming in mammalian development.
Science **293**: 1089-1092

Reik, W., Walter, J. (2001)

Genomic imprinting: Parental influence on the genome.
Nat. Rev. Genet. **2**: 21-32

Reis, A., Dittrich, B., Greger, V., Buiting, K., Lalande, M., Gillesen-Kaesbach, G., Anvret, M., Horsthemke, B. (1994)

Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes.
Am. J. Hum. Genet. **54**: 741-747

Relaix, F., Wei, X.J., Wu, X., Sasson, D.A. (1998)

Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NF κ B signal transduction pathway.
Nature Genet. **18**: 287-291

Reynolds, B.A. & Weiss, S. (1992).

Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.
Science **255**: 1707-1710.

Reynolds, B.A. & Weiss, S. (1996).

Clonal and population analyses demonstrate that the EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell.
Dev. Biol. **175**: 1-13.

Rideout, W.M. et al., (2001)

Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome.
Science **293**: 1093-1097

Rideout, W.M., III Coetzee, G.A., Olumi, A.F. & Jones, P.A. (1990)

5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes.
Science **249**: 1288-1290

Rideout, W.M., Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Yanigamachi, R. & Jaenisch, R. (2000).

Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning.
Nature Genet. **24**: 109-110.

Rietze, R.L., Vacanis, H., Brooker, G.F., Thomas, T., Voss, A.K. & Bartlett, P.F. (2001).

Purification of a pluripotent neural stem cell from adult mouse brain.
Nature **412**: 736-739.

Riggs, A.D. & Jones, P.A. (1983)

5-methylcytosine, gene regulation and cancer.
Adv. Cancer Res. **40**: 1-28

Riggs, A.D. (1995)

X inactivation, differentiation and DNA methylation.
Cytogenet. Cell Genet. **14**: 9-11

Robertson, E.J. (1987).

Embryonic stem cells. In *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach*. Edited by E.J. Robertson.
IRL Press, Oxford, 205-224.

Robinson, W.P., Lalande, M. (1995)

Sex-specific meiotic recombination in the Prader-Willi/Angelman syndrome imprinted region.
Hum. Mol. Genet. **4**: 801-806

Robinson, W.P., Lalande, M. (1995)

Sex-specific meiotic recombination in the Prader-Willi/Angelman syndrome imprinted region.
Hum. Mol. Genet. **4**: 801-806

Roof, E., Stone, W., MacLean, W., feurer, I.D., Thompson, T., Butler, M.G. (2000)

Intellectual characteristics of Prader-Willi syndrome: comparison of genetic subtypes.
J. Intell. Dis. Res. **44**: 25-30

Rougeulle, C., Cardoso, D., Fontes, M., Colleaux, L., Lalande, M. (1998)

An imprinted antisense RNA overlaps UBEA3 and a second maternally expressed transcript.
Nature Genet. **19**: 15-16

Rougeulle, C., Glatt, H., Lalande, M. (1997)

The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain.
Nature Genet. **17**: 14-15

Rubin, C.M., VandeVoort, C.A., Tiplitz, R.L. & Schmid, C.W. (1994)

Alu repeated DNAs are differentially methylated in primate germ cells.
Nucleic Acids Res. **22**: 5121-5127

Runte, M., Hüttenhofer, A., Groß, S., Kiefmann, M., Horsthemke, B. & Buiting, K. (2001).

The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A.
Hum. Mol. Genet. **23**: 2687-2700.

Russel, G.J., Walker, P.M.B., Elton, R.A. & Subak-Sharpe, J.H. (1976)

Doublet frequency analysis of fractionated vertebrate nuclear DNA.
J. Mol. Biol. **108**: 1-23

- Saitoh, S., Buiting, K., Rogan, P.K., Buxton, J.L., Driscoll, D.J., Arneemann, J., Konig, R., Malcolm, S., Horsthemke, B., Nicholls, R.D. (1996)**
Minimal definition of the imprinting center and fixation of a chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7811-7815
- Saitoh, S., Wada, T. (2000)**
Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1958-1962
- Saluz, H.P. & Jost, J.P. (1986)**
Optimised genomic sequencing as a tool for the study of cytosine methylation in the regulatory region of the chicken vitellogenin II gene. *Gene* **42**, 151-157
- Saluz, H.P. & Jost, J.P. (1989)**
Genomic footprinting with Taq polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2602-2606
- Sano, M., Iwanaga, M., Fujisawa, H., Nagahama, M. & Yamazaki, Y. (1994).**
Staurosporine induces the outgrowth of neurites from the dorsal root ganglion of the chick embryo and PC12D cells. *Brain Res.* **639**: 115-124.
- Sapienza, C. (1990)^b**
Genome imprinting, cellular mosaicism and carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* **3**: 118-121
- Schaap, D. & Parker, P.J. (1990).**
Expression, purification and characterization of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265**: 7301-7307.
- Scheffner, M., Nuber, U., Huibregtse, J.M. (1995)**
Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**: 81-83
- Schmauss, C., Brines, M.L., Lerner, M.R. (1992)**
The gene encoding the Small Nucleolar Ribonucleoprotein-associated Protein N is expressed at high levels in neurons. *J. Biol. Chem.* **267**: 8521-8529
- Schmid, C.W. & Jelinek, W.R. (1982)**
The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* **216**, 1065-1070
- Schorderet, D.F. & Gartler, S.M. (1992)**
Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 957-961
- Schuffenhauer, S., Bartsch, O., Stumm, M., Buchholz, T., Petropoulou, T., Kraft, S., Belohradsky, B., Hinkel, G.K., Meitinger, T. & Wegner, R.-D. (1995)**
DNA, FISH and complementation studies in ICF syndrome: DNA hypomethylation of repetitive and single copy loci and evidence for a trans-acting factor. *Hum. Genet.* **96**: 562-571
- Schumacher, A. & Doerfler, W. (2002)**
Epigenetic stability of the Snurf/Snrpn-Imprinting region in mouse embryonic stem cells. *EMBO J.*, in preparation
- Schumacher, A. & Doerfler, W. (2002)**
Genomic Imprinting and neurogenesis of the Snurf/Snrpn-Imprinting region in mouse embryonic stem cells. *Gene Funct. Dis.*, in preparation
- Schumacher, A. (2001).**
Mechanisms and brain specific consequences of genomic imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Gene Funct. Dis.* **1**: 7-25
- Schumacher, A. (2002)**
The evolution of genomic imprinting and the mammalian brain. *J. Theor. Biol.*, in preparation
- Schumacher, A., Arnhold, S., Addicks, K. & Doerfler, W. (2002)**
Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial and "CNS stem cell"-like neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. *J. Neurosci.*, submitted
- Schumacher, A., Buiting, K., Zeschnigk, M., Doerfler, W., Horsthemke, B. (1998)**
Methylation analysis of the PWS/AS region does not support an enhancer-competition model. *Nature Genet.* **19**: 324-325
- Schumacher, A., Koetsier, P.A., Hertz, J., Doerfler, W. (2000)**
Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of de novo imposed methylation patterns in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275**: 37915-37921
- Schweizer, J., Zynger, D., Francke, U. (1999)**
In vivo nuclease hypersensitivity studies reveal multiple sites of parental origin-dependent differential chromatin conformation in the 150 kb SNRPN transcription unit. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 555-566
- Selker, E.U., Fritz, D.Y. & Singer, M.J. (1993)**
Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. *Science* **262**, 1724-1728
- Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A.D., Razin, A. (1997)**
Structure of the imprinted mouse Snrpn gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10267-10272
- Shemer, R., Hershko, A.Y., Perk, J., Mostoslavsky, R., Tsuberi, B., Cedar, H., Buiting, K., Razin, A. (2000)**
The imprinting box of the Prader-Willi/Angelman syndrome domain. *Nature Genet.* **26**: 440-443
- Shen, J.-C., Rideout, W.M., III & Jones, P.A. (1994)**
The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucl. Acids Res.* **22**: 972-976

- Simon, D., Stuhlmann, H., Jahner, D., Wagner, H., Werner, E. and Jaenisch, R. (1983)**
Retrovirus genomes methylated by mammalian but not bacterial methylase are non-infectious.
Nature **304**: 275-277
- Sinclair, K.D., Young, L.E., Wilmut, I. & McEvoy, T.G. (2000).**
In utero overgrowth in ruminants following embryo culture: Lessons from mice and warning to men.
Human Reprod. **15, Suppl. 5**: 68-86
- Siomi, H., Dreyfuss, G. (1997)**
RNA-binding proteins as regulators of gene expression.
Curr. Opin. Genet. Dev. **7**: 345-353
- Skuse, D.H., James, R.S., Bishop, D.V., Coppin, B., Dalton, P., Aamodt-Leeper, G., Bacarese-Hamilton, M., Creswell, C., McGurk, R. & Jacobs, P.A. (1997)**
Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function.
Nature **387**: 705-708
- Skuse, D.H., James, R.S., Bishop, D.V.M., Coppin, B., Dalton, P., Aamod-Leeper, G. et al., (1997)**
Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function.
Nature **387**: 705-708
- Slack, R.S. & Proulx, P. (1990).**
Effects of retinoic acid and staurosporine on the protein kinase C activity and the morphology of two related human neuroblastoma cell lines.
Biochim. Biophys. Acta **1053**: 89-96
- Sleutels, F. & Barlow, D.P. (2002)**
The origins of genomic imprinting in mammals.
Adv. Genet. **46**: 119-147
- Sleutels, F., Zwart, R., Barlow, D. (2002)**
The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes.
Nature **415**: 810-813.
- Smit, A.F. (1999).**
Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes.
Curr. Opin. Genet. Dev. **9**: 657-663.
- Smit, A.F., Toth, G., Riggs, A.D. & Jurka, J. (1995).**
Ancestral, mammalian wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences.
J. Mol. Biol. **246**: 401-417.
- Smith, C.M., Steitz, J.A. (1998)**
Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes.
Mol. Cell. Biol. **18**: 6897-6909
- Smith, S.S., Kann, J.L.C., Baker, D.J., Kaplan, B.E. & Dembek, P. (1991)**
Recognition of unusual DNA structures by human DNA (cytosine-5) methyltransferase.
J. Mol. Biol. **217**: 39-51
- Southern, E.M. (1975)**
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-517
- Spencer, H.G. & Williams, M.J.M. (1997)**
The evolution of genomic imprinting: Two modifier-locus models.
Theor. Pop. Biol. **51**: 23-35
- Spritz, R.A., Bailin, T., Nicholls, R.D., Lee, S.T., Park, S.K., Mascari, M.J., Butler, M.G. (1997)**
Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele.
Am. J. Med. Genet. **71**: 57-62
- Spruck, C.H., Rideout, W.M., III Shen, J.C. & Jones, P.A. (1993)**
DNA methylation and cancer.
In: Jost, J.P. & Saluz, H.P. (Eds.), *DNA Methylation: Molecular and Biological Significance*.
Birkhäuser Verlag Basel/Schweiz, 487-509
- Stemple, D.L. & Mahanthappa, N.K. (1997).**
Neural stem cells blasting off.
Neuron **18**: 1-4.
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I.H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. (2001).**
Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation.
Oncogene **20**: 1193-1202.
- Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedemann, B., Hescheler, J. & Wobus, A.M. (1995).**
Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons.
Mech. Dev. **53**: 275-287.
- Strübing, C., Rohwedel, J., Ahnert-Hilger, G., Wiedemann, B., Hescheler, J. & Wobus, A.M. (1997).**
Development of G-protein mediated Ca²⁺ channel regulation in mouse embryonic stem cell-derived neurons.
Eur. J. Neurosci. **9**: 824-832.
- Subak-Sharpe, H., Burk, R.R., Crawford, L.V., Morrison, J.M., Hay, J. & Keir, H.M. (1966)**
An approach to evolutionary relationships of mammalian DNA viruses through analysis of the pattern of nearest neighbour base sequences.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **31**, 737-748
- Sun, Y., Nicholls, R.D., Butler, M.G., Saitoh, S., Hainline, B.E., Palmer, C.G. (1996)**
Breakage in the SNRPN locus in a balanced 46,XY,t(15;19) Prader-Willi syndrome patients.
Hum. Mol. Genet. **5**: 517-524
- Surani, M.A. (1998)**
Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line.
Cell **93**: 309-312

- Surani, M.A., Barton, S.C., Norris, M.L. (1984)**
Development of reconstituted eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis.
Nature **308**: 548-550
- Sutcliffe, J.S., Nakao, M., Christian, S., Orstavik, K.H., Tommerup, N., Ledbetter, D.H., Beaudet, A.L. (1994)**
Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region.
Nature Genet. **8**: 52-58
- Suzuki, H., Ueda, R. & Takahashi, T. (1994)**
Altered imprinting in lung cancer.
Nature Genet. **6**: 332-333
- Sved, J. & Bird, A.P. (1990)**
The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 4692-4696
- Tafani, M., Dmitri, A., Minchenko, A., Serroni, A. & Farber, J.L. (2001)**
Induction of the mitochondrial transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine.
Cancer Res. **61**: 2459-2466.
- Takahashi, N., Takahisa, S. & Takeda, K. (2000)**
Low-dose staurosporine suppresses proliferation and induces neurites in human prostatic cancer TSU-Pr1 cells.
The Prostate **44**: 328-333.
- Taniguchi et al., (2000)**
The postmitotic growth suppressor *neclin* interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neural cytoplasm.
J. Biol. Chem. **275**: 31674-31681
- Taniura, H., Matsumoto, K., Yoshikawa, K. (1999)**
Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor *Necdin* with p53.
J. Biol. Chem. **273**: 16242-16248
- Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M., Yoshikawa, K. (1998)**
Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1.
J. Biol. Chem. **273**: 720-728
- Tartof, K. & Bremer, M. (1990)**
Mechanisms for the construction and developmental control of heterochromatin formation and imprinted chromosome domains.
Development Supplement, 35-45
- Tasheva, E.S. & Roufa, D.J. (1994)**
Densely methylated DNA islands in mammalian chromosomal replication origins.
Mol. Cell. Biol. **14**, 5636-5644
- Taylor, J.H. (1984)**
Origins of replication and gene regulation.
Mol. Cell. Biochem. **61**: 99-109
- te Velde, E.R., van Laar, A.L., van Kooij, R.J. (1998)**
Concerns about assisted reproduction.
Lancet **351**: 1524-1525
- Thompson, S.L., Konfortova, G., Gregory, R.I., Reik, W., Dean, W. & Feil, R. (2001)**
Environmental effects on genomic imprinting in mammals.
Toxicology Letters, **120**: 143-150
- Tilghman, S.M., Caspary, T., Ingram, R.S. (1998)**
Competitive edge at the imprinted Prader-Willi/Angelman region?
Nature Genet. **18**: 206-208
- Torres, R.M. & Kühn, R. (1997)**
Laboratory protocols for conditional gene targeting.
Oxford Press, Oxford/UK. pp. 57-123.
- Toth, M., Lichtenberg, U. & Doerfler, W. (1989)**
Genomic sequencing reveals a 5-methyldeoxycytosine-free domain in active promoters and the spreading of preimposed methylating patterns.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 3728-3732
- Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T.W., Rossant, J. & van der Kooy, D. (2001)**
Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism.
Neuron **30**: 65-78.
- Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F. & van der Kooy, D. (1999)**
Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon.
Dev. Biol. **208**: 166-188.
- Tsai, T.F., Armstrong, D., Beaudet, A.L. (1999)**
Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome.
Nature Genet. **22**: 15-16
- Tsai, T.F., Jiang, Y.H., Bressler, J., Armstrong, D., Beaudet, A.L. (1999)**
Paternal deletion from *Snrpn* to *Ube3a* in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome.
Hum. Mol. Genet. **8**: 1357-1364
- Turker, M.S. and Bestor, T.H. (1997)**
Formation of methylation patterns in the mammalian genome.
Mutation Res. **386**, 119-130
- Varmuza, S. & Mann, M. (1994)**
Genomic imprinting – defusing the ovarian time bomb.
Trends Genet. **10**: 118-123
- Vescovi, A.L., Reynolds, B.A., Fraser, D.D. & Weiss, S. (1993)**
bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells.
Neuron **11**: 951-966.
- Vu, T.H., Hoffman, A.R. (1997)**
Imprinting of the Angelman syndrome gene, *UBE3A*, is restricted to brain.
Nature Genet. **17**: 12-13

- Wagstaff, J., Knoll, J.H.M., Fleming, J., Kirkness, E.F., Martin-Gallardo, A., Greenberg, F., Graham, J.M., Menninger, J., Ward, D., Venter, J.C., Lalande, M. (1991)**
Localization of the gene encoding the GABA_A receptor subunit $\beta 3$ subunit to the Angelman/Prader-Willi region on human chromosome 15.
Am. J. Hum. Genet. **49**: 330-337
- Wahl, G.M., Stern, M. & Stark, G.R. (1979)**
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**: 3683-3687
- Walker, S.K., Hartwich, K.M. & Seamark, R.F. (1996).**
The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges.
Theriogenology **45**: 111-120.
- Wang, R. Y.-H., Gehrke, C.W. & Ehrlich, M. (1980)**
Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues.
Nucleic Acids Res. **8**: 4777-4790
- Wang, Z., Kiefer, E., Urbáné, P. & Wagner, E.F. (1997)**
Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech. Dev.* **62**: 137-145.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C. & Reynolds, B.A. (1996).**
Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis.
J. Neurosci. **16**: 7599-7609.
- Wevrick, R., Francke, U. (1997)**
An imprinted mouse transcript homologous to the human imprinted in Prader-Willi syndrome.
Hum. Mol. Genet. **6**: 325-332
- Wevrick, R., Kerns, J.A., Francke, U. (1994)**
Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region.
Hum. Mol. Genet. **3**: 1877-1882
- Wiebauer, K. & Jirinsky, J. (1990)**
Mismatch-specific thymidine DNA glycosylase and DNA polymerase β mediate the correction of GT mispairs in nuclear extracts from human cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 5842-5845
- Wiedemann, B. & Franke, W. W. (1985).**
Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of M_r 38,000 characteristic of presynaptic vesicles.
Cell **41**: 1017-1028.
- Wigler, M.H. (1981)**
The inheritance of methylation patterns in vertebrates.
Cell **24**: 285-286
- Williams, C.A., Hendrickson, J.E., Cantu, E.S., Donlon, T.A. (1989)**
Angelman syndrome in a daughter with *del(15) (q11q13)* associated with brachycephaly, hearing loss, enlarged foramen magnum, and ataxia in the mother.
Am. J. Med. Genet. **32**: 333-338
- Wirth, J., Back, E., Hüttenhofer, A., Nothwang, H.G., Lich, C., Groß, S., Menzel, C., Schinzel, A., Kioschis, P., Tommerup, N., Ropers, H. H., Horsthemke, B., Buiting, K. (2001)**
A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15.
Hum. Mol. Genet. **10**: 201-210
- Wobus, A.M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.C., Rohwedel, J., Ji Guanju., Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J. & Franz, W.M. (1997).**
Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol. **29**: 1525-1539.
- Wobus, A.M., Rohwedel, J., Maltsev, V. & Hescheler, J. (1994).**
In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid.
Roux's Arch. Dev. Biol. **204**: 36-45
- Wutz, A., Smrzka, O.W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E.F., Barlow, D.P. (1997)**
Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island.
Nature **389**: 745-749
- Xin., Z., Allis, D. & Wagstaff, J. (2001)**
Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at the Prader-Willi Syndrome Imprinting Center.
Am. J. Hum. Genet. **69**: 1389-1394
- Yamamoto, Y., Huibregtse, J.M., Howley, P. (1997)**
The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing.
Genomics **41**: 263-266
- Yang, A.S., Shen, J.-C., Zingg, J.-M., Mi, S. & Jones, P.A. (1995)**
HhaI and HpaII DNA methyltransferases bind DNA mismatches, methylate uracil and block DNA repair.
Nucl. Acids Res. **23**: 1380-1387
- Yang, T., Adamson, T.E., Resnick, J.L., Leff, S., Wevrick, R., Francke, U., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Brannan, C.I. (1998)**
A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations.
Nature Genet. **19**: 25-31
- Yang, T., Adamson, T.E., Resnick, J.L., Leff, S., Wevrick, R., Franke, U., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. & Brannan, G.I. (1998)**
A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations.
Nature Genet. **19**: 25-31

Yao, R., Yoshihara, M. & Osada, H. (1997).

Specific of a c-Jun NH2-terminal kinase isoform and induction of neurite outgrowth in PC-12 cells by staurosporine. *J. Biol. Chem.* **272**: 18261-18266.

Yoder, J.A., Soman, N.S., Verdine, G.L., & Bestor, T.H. (1997)

DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanisms-based probe. *J. Mol. Biol.* **270**: 385-395

Young, L.E., Sinclair, K.D. & Wilmut, I. (1998).

Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* **3**: 155-163.

Zeschnigk, M., Schmitz, B., Dittrich, B., Buiting, K., Horsthemke, B., Doerfler, W. (1997)

Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 387-395

Zeschnigk, M., Schmitz, B., Dittrich, B., Buiting, K., Horsthemke, B. & Doerfler, W. (1997)^a

Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 387-395

Zeugin, J.A. & Hartley, J.L. (1985)

Ethanol precipitation of ethanol. *Focus, Bethesda Res. Laboratories* **7**: 1-2

Zong, Z.P., Fujikawa-Yamamoto, K., Li, A.L., Yamaguchi, N., Chang, Y.G., Murakami, M., Odashima, S. & Ishikawa, Y. (1999).

Both low and high concentration of staurosporine induce G1 arrest through down-regulation of cyclin E and cdk2 expression. *Cell. Struct. Funct.* **24**: 457-463.

Zorn, N.E. & Sauro, M.D. (1995).

Retinoic acid induces translocation of protein kinase C (PKC) and activation of nuclear PKC (nPKC) in rat splenocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**: 303-311

8 Erklärung

Köln, im Mai 2002

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Walter Doerfler betreut worden.

(Axel Schumacher)

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Teilpublikationen entstanden:

- **Schumacher, A., Buiting, K., Zeschnigk, M., Doerfler, W., Horsthemke, B. (1998)**
Methylation analysis of the PWS/AS region does not support an enhancer-competition model.
Nature Genet. 19: 324-325
- **Schumacher, A., Koetsier, P.A., Hertz, J., Doerfler, W. (2000)**
Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of de novo imposed methylation patterns in transgenic mice.
J. Biol. Chem. 275: 37915-37921
- **Schumacher, A. (2001).**
Mechanisms and brain specific consequences of genomic imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes.
Gene Funct. Dis. 1: 7-25
- **Schumacher, A., Arnhold, S., Addicks, K. & Doerfler, W. (2002)**
Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial and "CNS stem cell"-like neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells.
J. Neurosci., submitted
- **Schumacher, A. & Doerfler, W. (2002)**
Epigenetic stability of the Snurf/Snrpn-Imprinting region in mouse embryonic stem cells.
EMBO., in preparation
- **Schumacher, A. (2002)**
The evolution of genomic imprinting and the mammalian brain.
J. Theor. Biol., in preparation
- **Schumacher, A. & Doerfler, W. (2002)**
Genomic Imprinting and neurogenesis of the Snurf/Snrpn-Imprinting region in mouse embryonic stem cells.
Gene Funct. Dis., in preparation

9 Danksagung



Ich möchte die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen Personen zu bedanken, die mich mit Diskussionen, Kommentaren, technischer Hilfe, Materialien und guten Ratschlägen unterstützt haben. Zuerst danke ich **Prof. Walter Doerfler** ohne dessen langjährige Unterstützung diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Mein besonderer Dank gilt auch **Prof. Börries Kemper** für die Bereitstellung eines Laborplatzes.

Für ihre wertvolle Hilfe im Laboralltag danke ich zudem **Diana Wagner-Stippich**, **Petra Böhm**, **Iana Parvanova** und **Silke Argo**.

Für eine sorgfältige Reinigung der Laborgeräte sowie das Autoklavieren der Lösungen möchte ich insbesondere den Frauen der Spülküchen (sowohl des Instituts im Weyertal und des Instituts Zülpicher Str.) danken.

Viel Zeit verbrachte ich auch im Labor von **Prof. Klaus Rajewsky**, wo ich unter der ausgesprochen hilfreichen, informativen und vor allem freundlichen Hilfe von **Angela Egert** die ES-Zell Technik erlernte. Mein Dank an beide.

Ich möchte auch nicht vergessen mich bei all denen zu bedanken, die eine Veröffentlichung meiner Ergebnisse ermöglichten, besonders **Dr. Karin Buiting**, die mir immer freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand und **Prof. Bernhard Horsthemke** und **Dr. Stefan Arnhold** für ihre überaus wertvolle Unterstützung. Weiterhin muss ich meinen Dank an **Dr. Michael Coleman** und **Dr. Volker Nölle** bekunden, die sich die Zeit nahmen meine Veröffentlichungen aufmerksam zu lesen und zu korrigieren.

Meine besondere Anerkennung geht an **Dr. Robert Feil** und **Dr. Till Mack**, von denen ich viel lernen konnte und die mir immer überaus freundliche und kompetente Kollegen waren.

Zuletzt gilt mein Dank meinem guten Freund **Oleg Yudin**, der mich während der vielen Nächte vor dem Computer aus St. Petersburg anrief um zu gewährleisten, daß ich nicht einschlafe.



10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Axel Schumacher
geboren am: 14.06.1969 in Kreuztal - Kredenbach
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980 - 1989 Genoveva - Gymnasium in Köln-Mülheim
19. Mai 1989 *Abschluß:* Abitur
Note: 1

Zivildienst

01.06.1989- 07.11.1989 Altenzentrum "Haus Maar", Effelsberg
12.11.1989- 30.09.1990 Marie-Juchacz Altenzentrum, Köln-Chorweiler

Studium

1990 - 1998 Studium der Biologie an der Universität Köln
Schwerpunkte: Genetik, Biochemie, Botanik
Fachrichtung: Med. Genetik u. Virologie

15.08.1998 *Abschluß:* Diplom
bei: Prof. Dr. Walter Doerfler, Köln
Note: 1
Titel der Abschlußarbeit:
Zur Funktion der DNA-Methylierung: Genetic Imprinting und Stabilität von *de novo* Methylierungsmustern.

Promotion

2000-2002 Promotion am Institut für Genetik, Köln
Thema: *Gametische Prägung und Neurogenese: Analyse der parental geprägten Snurf/Snrpn-Region im Menschen und in embryonalen Stammzellen der Maus.*
Note der Dissertation: 0,7

Köln, den 02. 05. 2002



(Axel Schumacher)