

***Veränderungen von zellulären DNA-Methylierungs-
und Expressionsmustern in transgenen
eukaryontischen Systemen***

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

vorgelegt von
Knut Müller
aus Köln

September 2000

***Berichterstatter:* Prof. Dr. Walter Doerfler
Prof. Dr. Börries Kemper**

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2000

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DNA-METHYLIERUNG IN EUKARYONTISCHEN ZELLEN	1
1.2 DNA-METHYLIERUNG UND GENEXPRESSION	3
1.3 BEDEUTUNG DER DNA-METHYLIERUNG FÜR DEN SÄUGERORGANISMUS	4
1.4 EINFLUß DER DNA-METHYLIERUNG AUF DIE CHROMATINSTRUKTUR	5
1.5 INAKTIVIERUNG TRANSPOSABLER ELEMENTE IM SÄUGERGENOM	6
1.6 INTEGRATION FREMDER DNA IN EUKARYONTISCHE GENOME: KONSEQUENZEN FÜR DAS ZELLULÄRE. METHYLIERUNGS- UND EXPRESSIONSMUSTER.....	8
1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	11
2 ERGEBNISSE	14
2.1 MODULATION DER GENEXPRESSION UND DNA METHYLIERUNG IN DER ADENOVIRUS TYP 12- TRANSFORMIERTEN BHK21-ZELLINIE T637	14
2.1.1 <i>Induktion der Genexpression in Ad12-transformierten BHK21 Zellen</i>	15
2.1.2 <i>Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer Gene in der Adenovirus Typ 12- transformierten BHK21-Hamsterzelllinie T637 und ihrer Revertanten</i>	19
2.2 MODULATION DER GENEXPRESSION UND DNA-METHYLIERUNG IN BAKTERIOPHAGE LAMBDA- TRANSGENEN BHK21 ZELLINIEN	23
2.2.1 <i>Differentielle Genexpression in den Bakteriophage Lambda-transgenen BHK21 Zelllinien 10 und 18</i>	24
2.2.2 <i>Bakteriophage Lambda-transgene BHK21 Zelllinien zeigen Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern</i>	28
2.3 KONTROLLEXPERIMENTE	29
2.3.1 <i>Kontrollen zur cDNA Subtraktionstechnik</i>	29
2.3.2 <i>Kontrolle der Expression in Einzelzellklonen von BHK21</i>	31
2.3.3 <i>Kontrolle der Effektivität der MS-RDA-Anreicherung bekannter Zielsequenzen</i>	31
2.3.4 <i>Kontrolle der Adapterabspaltung bei der MS-RDA</i>	33
2.3.5 <i>Kontrolle der Sensitivität der MS-RDA</i>	34
2.3.6 <i>MS-RDA mit BHK21 Einzelzellklonen</i>	36
2.3.7 <i>Einzelzellklone von BHK21 zeigen keine Unterschiede im Methylierungsstatus zellulärer DNA-Segmente, die in I-transgenen BHK21 Zellen differentiell methyliert waren</i>	37
2.4 ENTWICKLUNG DER METHYLIERUNGS-SENSITIVEN AMPLICON-SUBTRAKTION (MS-AS): EINE NEUE STRATEGIE ZUR ISOLIERUNG DIFFERENTIELL METHYLIERTER DNA-FRAGMENTE AUS KOMPLEXEN GENOMEN	38
2.4.1 <i>MS-Analyse Ad12-transformierter und I-transgener BHK21 Zellen</i>	41
2.5 INTRAZISTERNALE-A-PARTIKEL: TRANSPOSABLE ELEMENTE IN SÄUGERGENOMEN	44
2.6 VERÄNDERUNG IM METHYLIERUNGSMUSTER ZELLULÄRER GENE IN TRANSGENEN MÄUSEN	46
2.6.1 <i>Veränderungen im Methylierungsmuster von pAD2E2AL-CAT transgenen Mäusen</i>	46
2.6.2 <i>Veränderung im Methylierungsmuster von Bakteriophage Lambda DNA-transgenen CD-1 Mäusen</i>	50

3 DISKUSSION	55
3.1 VERÄNDERUNG IM ZELLULÄREN METHYLIERUNGSMUSTER VON T637	56
3.2 VERÄNDERUNG IM ZELLULÄREN METHYLIERUNGSMUSTER VON λ -TRANSGENEN BHK21 ZELLEN	58
3.3 VERÄNDERTE GENEXPRESSION IN λ -TRANSGENEN BHK21 ZELLEN	61
3.4 METHYLIERUNGS-SENSITIVE AMPLICON-SUBTRAKTION (MS-AS)	64
3.5 VERÄNDERUNGEN IM METHYLIERUNGSMUSTER TRANSGENER MÄUSE	65
3.5.1 <i>Veränderungen in IL-10 und Igf2r in pAD2E2AL-CAT-transgenen Mäusen</i>	65
3.5.2 <i>Veränderungen im Methylierungsmuster von Bakteriophage Lambda-transgenen CD-1 Mäusen</i>	68
3.6 AUSBLICK	69
4 MATERIAL	71
4.1 CHEMIKALIEN	71
4.2 RADIOCHEMIKALIEN	73
4.3 KITS	73
4.4 ENZYME	74
4.4.1 <i>Restriktionsendonukleasen</i>	74
4.4.2 <i>Sonstige Enzyme</i>	74
4.5 LÖSUNGEN UND PUFFER	75
4.6 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE	79
4.7 MÄUSE	81
4.7.1 <i>Transgene Mauslinien</i>	81
4.7.2 <i>Kontrolltiere</i>	82
4.8 ZELLINIEN	82
4.9 KLONIERTE GENE UND ZELLULÄRE DNA-SEGMENTE	82
4.10 BAKTERIEN	82
5 METHDODEN	83
5.1 ISOLIERUNG VON DNA AUS ORGANEN (GROSS-BELLARD, 1973)	83
5.1.1 <i>Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen</i>	83
5.2 FÄLLUNG, REINIGUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA	84
5.2.1 <i>Ethanolpräzipitation</i>	84
5.2.2 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	84
5.2.3 <i>Restriktionsspaltung von DNA (Nathans u. Smith, 1975)</i>	84
5.2.4 <i>Agarose-Gelelektrophorese (McDonell et al., 1977)</i>	85
5.2.5 <i>Reinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	85
5.3 DNA-TRANSFER AUS AGAROSEGELEN AUF POSITIV GELADENE NYLONMEMBRANEN (SOUTHERN, 1975; CHOMCZYNSKI, 1992; KOETSIER ET AL., 1993)	85
5.4 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN (FEINBERG U. VOGELSTEIN, 1983, 1984)	86
5.5 SZINTILLATIONS-SPEKTROMETRIE (HABERER, 1966)	86
5.6 ISOLIERUNG UND ANALYSE VON RNA	87

5.6.1 Isolierung cytoplasmatischer RNA	87
5.6.2 Poly A mRNA Selektion	87
5.6.3 Northern Blot Experimente	88
5.7 HYBRIDISIERUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEN DNA-SONDEN AN MEMBRANGEBUNDENE DNA ODER RNA	88
5.7.1 Autoradiographie	89
5.7.2 Phospo-Imager-Auswertung	90
5.8 COMPUTERGESTÜTZTE SEQUENZANALYSE	90
5.9 ZELLKULTUR	90
5.9.1 Passagieren von Zellen	90
5.9.2 Einfrieren von Zellen	91
5.9.3 Auftauen von Zellen	91
5.9.4 Einzelzellklonierung	91
5.10 AUFBEWAHRUNG UND KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	91
5.11 HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN	91
5.11.1 Reinigung großer Plasmidmengen über Säulen	92
5.11.2 T-Vector Klonierungs-Systeme (Promega)	92
5.12 IN VITRO METHYLIERUNG VON 5'-CG-3' HALTIGEN DNA-FRAGMENTEN	93
5.13 OLIGO-DESOXYRIBONUCLEOTID-PRIMER	93
5.13.1 Für die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente in pGEM-T Vektoren	93
5.13.2 Für die Methylierungs-sensitive repräsentative Differenzanalyse (MS-RDA)	93
5.13.2 Für die cDNA Subtraktion	94
5.13.4 Für die Methylierungs-sensitive Amplicon-Subtraktion (MS-AS)	94
5.13.2 Für die Amplifikation eines β -Actin Subfragmentes aus genomischer DNA	95
5.14 BESTIMMUNG DER NUKLEOTIDSEQUENZ VON DNA-FRAGMENTEN	95
5.15 EXTRAKTION UND REINIGUNG VON LAMBDA-DNA AUS LYSOGENEN BAKTERIEN	95
5.16. IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG DIFFERENTIELL METHYLIERTER DNA-FRAGMENTE AUS KOMPLEXEN GENOMEN: METHYLIERUNGS-SENSITIVE REPRÄSENTATIVE DIFFERENZANALYSE (MS-RDA)	95
5.16.1 Durchführung der MS-RDA	97
5.17 ISOLIERUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE: cDNA-SUBTRAKTION (DIATCHENKO ET AL., 1996)	101
5.18 METHYLIERUNGS-SENSITIVE AMPLICON SUBTRAKTION (MS-AS)	102
6 ZUSAMMENFASSUNG	105
7 LITERATURVERZEICHNIS	107

Abb.	Abbildung	MS-RDA	Methylierungs-sensitive repräsentative Differenzanalyse
Ad12	Adenovirus Typ 12	MTase	DNA-Methyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat	OD	Optische Dichte
BHK21	engl.: baby hamster kidney cells, clone 21 (Hamsterzelllinie BHK21)	ORF	engl.: Open reading frame
Bp, kBp	Basenpaare, Kilobasenpaare	PCR	Polymerase chain reaction
BSA	Rinderserumalbumin	PSL	Photo Stimulated Luminiscence
ca.	Circa	PSL	engl.: „photo stimulated luminiscence“
cDNA	DNA-Kopie der mRNA	RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
Ci	Curie	RNA	Ribonukleinsäure
cpm	counts per minute, Zählimpulse pro Minute	RNaseA	Ribonuklease A
CTP	Cytosintriphosphat	SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SSH	engl.: Suppressive subtractive hybridization
DNaseI	Desoxyribonuklease I	Tab.	Tabelle
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	TTP	Thymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli	U	Unit
EBV	Epstein-Achung-Barr-Virus	U.p.M.	Umdrehungen pro Minute
EK	Endkonzentration	u.U.	unter Umständen
et al.	und andere	UV	Ultraviolett
EtBr	Ethidium Bromid	V	Volt
GTP	Guanosintriphosphat	v/v	volume/ volume, ml Volumen pro 100 ml Gesamtvolumen
IAP	Intrazisternales A-Partikel	w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
Igf2r	engl.:Insulin-like growth factor 2 receptor		
IL-10	Interleukin-10		
kDa	Kilodalton		
LB	Luria-Bertani		
M	mol/l		
MeCP1/2	Methyl-CpG-bindendes Protein Nummer 1/ 2		
MS-AS	Methylierungs-sensitive Amplicon Subtraktion		

1 Einleitung

1.1 DNA-Methylierung in eukaryontischen Zellen

Bereits 1948 wurde die Modifikation von Cytosinen an ihren Kohlenstoffpositionen 5 durch Methylierung in Kalbsthymus-DNA entdeckt (Übersicht bei Weissenbach, 1993). Die gleiche Modifikation fand man 1951 in Weizenkeimen und 1955 entdeckte man zusätzlich die Methylierung der Stickstoffposition 6 von Adenin in Bakterien. In Prokaryonten ist die Methylierung von Cytosinen und Adeninen hauptsächlich am Restriktions-Modifikations System beteiligt, das der Abwehr von Phageninfektionen dient (Arber, 1965).

Bei der DNA-Replikation in Bakterien, Pflanzen, Pilzen, Säugerzellen und den meisten Viren werden nur die vier Haupt-Nukleotide (dATP, dGTP, TTP und dCTP) in die DNA inkorporiert. Modifizierte Nukleotide werden erst nach der Replikation durch Enzyme gebildet, deren Substrat doppelsträngige DNA ist. Die Methylierung von eukaryontischer DNA findet in der Regel an Cytosinen statt, die Teil des 5'-CpG-3'-Dinukleotids sind (Gruenbaum et al., 1982; Bestor u. Ingram, 1983; Simon et al., 1983). Dabei sind die Desoxycytosinreste dieses Dinukleotidpaares symmetrisch methyliert (Riggs u. Jones, 1983; Doerfler, 1981 und 1983). Säugetierzellen besitzen jedoch auch die Fähigkeit Cytosine zu methylieren, die Teil des 5'-CpNpG-3'-Trinukleotides sind, wobei N jede der vier Hauptbasen sein kann (Clark et al., 1995). Mit Hilfe des genomischen Sequenzierens nach der Bisulfit-Methode konnten auch außerhalb von CpG- oder CpNpG-Sequenzen methylierte Cytosinreste in der DNA von Säugern (Frommer et al., 1992; Tasheva u. Roufa, 1994), Pilzen (Goyan et al., 1994; Selker et al., 1993) und Pflanzen (Meyer et al., 1994) nachgewiesen werden. Abhängig von der Spezies sind 60-90% aller CpG-Dinukleotide und insgesamt 1-6% aller Cytosine im Genom methyliert.

Die in den 5'-CpG-3' Dinukleotiden vorliegenden Desoxycytidine werden durch DNA-Methyltransferasen (MTasen) symmetrisch methyliert. Das DNA-Methyltransferase-Gen aus der Maus (Dnmt) wurde 1988 von Bestor und Mitarbeitern kloniert (Bestor et al., 1988) und in der Folgezeit wurden Homologe im Menschen, Huhn und der Seegurke identifiziert (Übersicht bei Baylin et al., 1998).

Der Mechanismus der Cytosin-Methylierung, bei dem eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methyl donor auf das Kohlenstoff-5 übertragen wird, wurde 1985 von Wu und Santi postuliert (Wu u. Santi, 1985; Wu u. Santi, 1987). Eines der wichtigsten Merkmale dieses Methylierungsprozesses ist die Bildung eines transient auftretenden kovalenten Komplexes zwischen dem Protein und dem zu modifizierenden Pyrimidin. Dabei dient ein Cysteinthiol des Enzyms als Nukleophil, welches das

Kohlenstoff-6 angreift und so ein kovalentes DNA-Protein-Intermediat bildet. Die Addition des Nukleophils aktiviert das Kohlenstoff-5 des Pyrimidinringes und ermöglicht so den Transfer der Methylgruppe vom SAM. Nach dem Methyltransfer wird das Enzym durch β -Eliminierung von der Kohlenstoffposition 6 eliminiert.

Die klonale Weitergabe von Methylierungsmustern und die Etablierung gewebespezifischer Methylierungsmuster in Säugern führte zu der Annahme, daß verschiedene Typen von Methyltransferasen existierten. Die Erhaltungsmethyltransferasen bevorzugen hemimethylierte DNA als Substrat, welche als Produkt aus der DNA-Replikation hervorgeht. Diese Methyltransferasen sichern die klonale Weitergabe von Methylierungsmustern in somatischen Geweben. Im Vergleich dazu wirkt eine *de novo*-Methyltransferase auf unmethylierte DNA-Stellen ein. Jahner und Jaenisch (1985) konnten in frühen Embryonen eine solche *de novo*-Methyltransferase-Aktivität nachweisen. Weiterhin wurde beobachtet, daß eine DNA-MTase-Aktivität in Extrakten aus somatischen Zellkernen hemimethylierte DNA stark bevorzugte, obwohl auch *de novo* Methylierung beobachtet wurde (Gruenbaum et al., 1982; Toth et al., 1990). Weitere Arbeiten von Pfeifer und Mitarbeitern (1983) sowie von Bolden und Mitarbeitern (1984) wiesen nach, daß die *de novo* und Erhaltung-Aktivitäten auf einem Protein liegen, das für hemimethylierte DNA eine 30-40-fach höhere Affinität zeigt. Allerdings weisen auch embryonale Stammzellen der Maus, die defizient für eine Methyltransferase sind, weiterhin *de novo*-Methylierungs-Aktivität auf (Lei et al., 1996). Okano und Mitarbeitern (1999) gelang es zwei weitere DNA-Methyltransferasen aus der Maus zu isolieren. Diese als Dnmt3a und Dnmt3b bezeichneten Methyltransferasen sind essentiell für die *de novo* Methylierung in ES-Zellen und frühen Embryonen

Neben der Fähigkeit, Methylierungsmuster spezifisch zu etablieren, müssen Säugerzellen auch die Fähigkeit zur gezielten Demethylierung von DNA-Sequenzen besitzen. Viele gewebespezifische Gene werden demethyliert, wenn bestimmte Gene während der Differenzierung induziert werden (Razin u. Cedar, 1991). Ob es sich bei dem Prozess der Demethylierung jedoch um eine spezifische Enzymaktivität handelt oder ob der Prozess einem passiven Vorgang unterliegt, war lange Zeit ungeklärt. Wenn die Methyltransferase-Aktivität zum Zeitpunkt der DNA-Replikation inhibiert wird, liegt die Hälfte der replizierten DNA-Stränge nach zwei Replikationsrunden unmethyliert vor. Es wurde postuliert, daß die Bindung von Transkriptionsfaktoren, deren Bindungskapazität nicht durch Methylierung beeinflußt wird (zum Beispiel Sp1), die Erhaltungsmethylierung an der Bindungsstelle verhindert (Brandeis et al., 1994; MacLeod et al., 1994). Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß es sich bei der Demethylierung um einen aktiven Prozeß handeln könnte, der nicht von der DNA-Replikation abhängig ist (Shemer et al., 1991; Paroush et al., 1990; Razin et al., 1986).

In der Tat konnte von Bhattacharya und Mitarbeitern (1999) eine cDNA kloniert werden, die für ein 40 Kilodalton großes Protein mit Demethylase-Aktivität kodiert. Das in Säugerzellen vorhandene Enzym katalysiert die Entfernung von Methylgruppen an der Kohlenstoffposition 5 des Cytosins in der Dinukleotidsequenz ^mCpG. Dabei wird die Methylgruppe als Methanol freigesetzt.

1.2 DNA-Methylierung und Genexpression

In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die sequenzspezifische Methylierung von Promotorbereichen in Pilzen (Rhounim et al., 1992), Pflanzen (Flavell, 1994) und Säugern (Vardimon et al., 1982; Bestor u. Verdine, 1994) eine wichtige Rolle bei der Genregulation einnimmt. Dabei konnte fast ausschließlich eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Transkription festgestellt werden (Sutter u. Doerfler, 1980; Doerfler, 1983; Yeivin u. Razin, 1993). Die Gene, deren Transkription durch DNA-Methylierung unterdrückt wird, weisen im Promotorbereich meist eine hohe Dichte des methylierbaren CpG-Dinukleotides auf. Neben Genen aus DNA- und RNA-Viren (Sutter u. Doerfler, 1980; Stewart et al., 1982; Groudine et al., 1981) besitzen nahezu 60% der bekannten endogenen Säugergene eine CpG-reiche Region im Promotorbereich (Bird, 1986; Pfeifer et al., 1990). DNA-Methylierung in diesen häufig methylierungsfreien CpG-Anhäufungen ist mit einer Langzeit-Hemmung der Genexpression verbunden (Jones, 1999), wie es zum Beispiel beim inaktivierten X-Chromosom bei Frauen beobachtet wurde (Norris et al., 1994). In einigen Fällen korreliert jedoch der erhöhte Methylierungsgrad in einer CpG-reichen Region mit einer erhöhten Transkriptionsrate. Ein gutes Beispiel dafür ist das „Insulin-like growth factor 2 receptor“-Gen (Igf2r) der Maus, bei dem die Transkription des kodierenden Stranges auf dem maternalen Gen möglicherweise eine stromabwärts gelegene CpG-Anhäufung in Region 2 zum Ziel für *de novo*-Methylierung macht. Dadurch kann Region 2 des Igf2r-Gens nicht mehr als Promotor für den nicht kodierenden Strang fungieren (Wutz et al., 1997).

Mindestens zwei alternative Mechanismen können zur Inhibierung der Transkription durch DNA-Methylierung führen. Eine sequenzspezifische Methylierung kann zu einer direkten Störung der Bindung von essentiellen Transkriptionsfaktoren führen, die den Kontakt zu Cytosinen in der „major groove“ der Doppelhelix benötigen. Die meisten Transkriptionsfaktoren haben GC-reiche Bindungsstellen und viele haben CpGs in ihrem Erkennungselement (Bird u. Wolffe, 1999). Interessanterweise vermag der Transkriptionsfaktor Sp1, der für die Transkription vieler „housekeeping“-Gene benötigt wird, sowohl an methylierte als auch an unmethylierte Zielsequenzen zu binden und verhindert darüber hinaus die Methylierung angrenzender Sequenzen (Holler et al., 1988; MacLeod et

al., 1994; Brandeis et al., 1994; Harrington et al., 1988). Da Sp1 nur in höher entwickelten Eukaryonten vorkommt, die 5-Methylcytosin enthalten, kann man vermuten, daß Sp1 eine spezielle Rolle bei der Regulation der Transkription durch Methylierung einnimmt.

Darüber hinaus können Proteine, die spezifisch an DNA-Sequenzen binden, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor verhindern. Das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, welche sowohl eine CpG-bindende Domäne (MBD) als auch eine transkriptionelle Repressionsdomäne (TRD) trägt (Hendrich u. Bird, 1998). MeCP2 ist in der Lage an ein einziges symmetrisch methyliertes CpG-Dinukleotid zu binden und die Transkription in einer Entfernung von mehreren hundert Basenpaaren zu unterdrücken (Lewis et al., 1992). MeCP2 ist jedoch nicht das einzige Protein, das über Bindung an methylierte CpGs eine Inhibierung der Transkription vermitteln kann. Zellen, die defizient für MeCP2 sind (z.B. HeLa Zellen) sind dennoch in der Lage, methylierte Reporterstrukturen zu inhibieren (Ng et al., 1999). MeCP1, ein weiteres CpG-bindendes Protein, kommt in vielen Zelltypen vor und kann an DNA-Sequenzen binden, die mindestens 12 symmetrisch methylierte CpGs besitzen (Meehan et al., 1989). Vier weitere Methyl-CpG-bindende Domänen sind durch die Suche in EST-Datenbanken (EST: „expressed sequence tag“) mit dem Motiv der Methyl-CpG-bindenden Domäne identifiziert worden: MBD 1-4 (Hendrich u. Bird, 1998).

1.3 Bedeutung der DNA-Methylierung für den Säugerorganismus

Eine Korrelation zwischen dem Auftreten von DNA-Methylierung und der Komplexität der methylierten Genome zeigt, daß die Verbreitung der DNA-Methylierung parallel mit einem abrupten Anstieg der Genzahl beim Übergang von Invertebraten zu Vertebraten in der Evolution verbunden war (Tajima u. Suetake, 1998). Im Verlauf der Evolution erfolgte ein Anstieg der Genomgröße von ca. 4000 bakteriellen Genen (z.B. *E. coli*) bis 7000 Genen in *Saccharomyces cerevisiae* und von 12000 bis 25000 Genen in invertebraten Eukaryonten (z.B. *C. elegans*) bis zu 50000-100000 Genen im menschlichen Genom (Klein u. Costa, 1997). Bird (1995) postulierte, daß eine mögliche Funktion der DNA-Methylierung die Unterdrückung unerwünschter „Hintergrundexpression“ in der Zelle sei. Dadurch könnte sich die Transkription auf spezifische Genombereiche mit aktiven Genen konzentrieren. In der Tat ist der größte Teil des Säugergenoms methyliert, mit Ausnahme der stabil Methylierungsfreien CpG-Anhäufungen in der 5'-regulatorischen Region von ungefähr 60% der Säugergene (Antequera u. Bird, 1993; Cross et al., 1995).

DNA-Methylierung ist in Säugern an einer Reihe wichtiger biologischer Prozesse beteiligt. Besonders während der Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung sind die genomischen Methylierungsmuster komplexen Veränderungen unterworfen (Razin u. Cedar, 1993; Monk 1990). Kurz nach der Befruchtung werden die Methylgruppen von fast allen CpG-Dinukleotiden der Gameten-DNA entfernt, und das Genom bleibt bis zum Blastula-Stadium unmethyliert (Monk et al., 1987; Chaillet et al., 1991; Kafri et al., 1992). Obwohl der Mechanismus der Demethylierung nicht vollständig verstanden ist, gibt es doch Hinweise darauf, daß es sich um einen aktiven Prozeß handelt, der nicht von der DNA-Replikation abhängig ist (Shemer et al., 1991; Paroush et al., 1990; Razin et al., 1986). Die Etablierung der somatischen Methylierungsmuster findet um die Zeit der Implantation (Blastula/frühes Gastrulastadium) mit der Induktion der *de novo*-Methylierungsaktivität statt (Jahner u. Jaenisch, 1984). Einige gewebespezifische Loci können noch im weiteren Verlauf der Entwicklung modifiziert werden (Turker u. Bestor, 1997). Die Verteilung der methylierten Cytosine im Säuger genom ist nicht zufällig. Promotorregionen von aktiv transkribierten Genen, die sehr häufig reich am CpG-Dinukleotid sind, bleiben meist unmethyliert (Bestor et al., 1995; Bird et al., 1995). Andere Gene, die z.B. eine parentale Prägung zeigen (Efstradiadis, 1994) und Gene auf dem inaktiven X-Chromosom bei Frauen (Migeon, 1994) können auch in einem unterdrückten Zustand, der sich durch starke Methylierung der Promotorregion auszeichnet, vorkommen. Welche Bedeutung die dynamischen Veränderungen in der DNA-Methylierung für einen korrekten Entwicklungsprozeß in Säugern haben, kann bisher nur vermutet werden. Die Tatsache, daß Mausembryonen, die defizient für die Methyltransferase sind, frühe Implantationsstadien nicht überleben, demonstriert jedoch, daß eine Zerstörung der normalen Methylierungsmuster inkompatibel mit einer normalen Embryonalentwicklung ist (Li et al., 1992; Li et al., 1993). Die Bedeutung der DNA-Methylierung für den Organismus kann jedoch nicht direkt aus dem Phänotyp der mutierten Embryonen abgeleitet werden. Methylierungsmuster im Genom nehmen Einfluß auf die Genexpression während der Entwicklung, kontrollieren aber auch die DNA-Replikation (Taylor, 1984) und spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur (Cleaver, 1995). Eine weitere hypothetische Funktion der DNA-Methylierung ist der Schutz des Genoms vor Fremd-DNA. Es wurde vorgeschlagen, daß DNA-Methylierung in Säugern das Genom vor proliferierenden parasitischen Elementen schützt (Bestor, 1990). Ursprünglich könnte dieser Mechanismus jedoch dazu gedient haben, exogene DNA-Sequenzen wie etwa virale Genome mittels DNA-Methylierung zu inaktivieren (Doerfler, 1991). Als das Säuger genom im Verlauf der Evolution weiter expandierte, konnte diese Schutzfunktion weiter adaptiert werden, um die Expression repetitiver Sequenzen und Retrotransposons zu blockieren (Doerfler, 1991). In der Tat sind diese DNA-Sequenzen in Säugerzellen stark methyliert.

1.4 Einfluß von DNA-Methylierung auf die Chromatinstruktur

Das Muster der DNA-Methylierung kann die Struktur des Chromatins, welche um ein Gen gebildet wird, beeinflussen (Adams et al., 1987; Keshet et al., 1986). Die größte Dichte unmethylierter CpGs in Vertebratengenomen findet sich in sog. CpG-Inseln, die normalerweise einen Promotor oder andere regulatorische Elemente enthalten, die für die aktive Transkription des Gens erforderlich sind. Das Chromatin im Bereich solcher CpG-Anhäufungen ist mit hyperacetylierten Histonen angereichert und meist frei von Linkerhistonen. Im Gegensatz dazu wird methylierte DNA mit acetylierten Histonen assoziiert, ist resistent gegenüber Nukleasen oder Restriktionsendonukleasen und transkriptionell inaktiv. Die Mikroinjektion methylierter oder unmethylierter Template-DNAs in Säugerzellen oder *Xenopus* Oozyten haben zeigen können, daß DNA-Methylierung und nukleosomales Chromatin durch Interaktion zu einer Inhibierung der Transkription führen (Kass et al., 1997). Methylierte Templates werden dabei zunächst transkribiert, die Transkription jedoch zunehmend durch die Anordnung der Nukleosomen unterdrückt (Keshet et al., 1986; Buschhausen et al., 1987). Bei methylierter DNA führt dieser Vorgang letztendlich zum Ausschluß der Transkriptionsmaschinerie, einschließlich der RNA-Polymerase. Ein solcher Ausschluß der Transkriptionsmaschinerie stellt sich bei unmethylierter DNA nicht ein, selbst wenn sie in Nukleosomen organisiert ist.

Wie kann jedoch eine bestimmte Chromatinstruktur über mehrere Zellzyklen erhalten bleiben? In Arbeiten von Sobel und Mitarbeitern (1995) sowie Kuo und Mitarbeitern (1996) konnte gezeigt werden, daß neu zusammengesetzte Nukleosomen acetyliert sind. Es ist daher anzunehmen, daß der Ausgangszustand des Chromatins auf acetylierten Nukleosomen basiert. Da die Erhaltungs-Methyltransferase den wachsenden DNA-Strang kurz nach der Replikation innerhalb der Replikationsgabel methyliert (Gruenbaum et al. 1983), ist es möglich daß MeCP2 unmittelbar nach der Methylierung an die DNA bindet. Durch die Fähigkeit von MeCP2, unter anderem Deacetylasen an die Bindungsstelle rekrutieren zu können, werden inaktive Regionen mit deacetylierten Nukleosomen gebildet. Dieses neu zusammengesetzte Chromatin muß zum parentalen Chromatin identisch sein (Razin, 1998). Besonders Arbeiten an inaktivierten X-Chromosomen aus Eutherzellen unterstützen dieses Modell. Die inaktiven X-Chromosomen waren in der Tat stark methyliert und die nukleosomalen Histone auffällig deacetyliert (Jeppesen u. Turner, 1993).

1.5 Inaktivierung transposabler Elemente im Säugetiergenom

Das menschliche Genom besteht zu mindestens 35% aus erkennbaren Transposons (Smit, 1996). Im Vergleich dazu machen die Exons zellulärer Gene gerade 3 bis 5% des Genoms aus. Retrotransposons, in der Form endogener Retroviren, L1 Elemente sowie Alu-Elemente

kommen am häufigsten vor. Retrovirale Proviren und L1-Elemente können für alle Proteine kodieren, die sie für die replikative Transposition benötigen, während Alu-Elemente auf Faktoren anderer Retrotransposons angewiesen sind. Transposons können in verschiedenster Weise Einfluß auf die Genomstruktur und die regulierte Genexpression nehmen (Schmid, 1996). Die Transposition kann zum einen durch direkte insertionelle Mutagenese ein Gen zerstören (Takahara et al., 1996). Die Rekombination zwischen nicht-allelen repetitiven Sequenzen kann zu Translokationen und anderen Rearrangements der Chromosomen führen (Hartl, 1996). Viele Retrotransposons besitzen zudem starke konstitutive Promotoren, die die Expression benachbarter Gene beeinflussen können (Michaud et al., 1994; Chang-Yeh et al., 1991; Argeson et al., 1996). Zum einen kann es dabei zur Bildung chimärer mRNAs kommen. Ist jedoch ein aktives Retrotransposon in einer umgekehrten Orientierung zum Wirtsgen integriert worden, könnte es andererseits zu „Antisense“-Effekten kommen, wenn die vom Transposon ausgehende Transkription in stromabwärts gelegene Exonbereiche reicht. Angesichts dieser vielfältigen mutagenen Einflüsse, die Transposons auf das Säugergenom ausüben können, ist es erstaunlich, daß sie dem Wirt nur wenig Schaden zufügen. Bisher konnte nur eine von 500 Keimbahnmutationen im Menschen auf die Insertion von Transposons zurückgeführt werden (Yoder et al., 1997).

Cytosin-Methylierung inaktiviert die Promotoren der meisten Viren und Transposons (einschließlich Retroviren und Alu-Elemente) (Schmid, 1996; Harbers et al., 1981; Kuff u. Lueders, 1988). Solche Sequenzen liegen an allen getesteten Stellen in der DNA differenzierter Zellen methyliert vor. In der Tat sind Transposons so zahlreich, CpG-reich und stark methyliert, daß der Hauptanteil des 5-Methylcytosins im Säugergenom in diesen parasitischen Sequenzen liegt.

Es ist noch unklar, welche Erkennungsmechanismen genutzt werden, um repetitive transposable Elemente im Säugergenom durch DNA-Methylierung zu inaktivieren. Ein gemeinsames Charakteristikum invasiver Sequenzen ist ihr Vorkommen in hohen Kopienzahlen. Eine Reihe von Arbeiten postulierten, daß repetitive Sequenzen durch Interaktion ihre gegenseitige Inaktivierung bewirken können. „Repeat-induced point mutations“ (RIP) in *Neurospora crassa* führen während der Sexualphase des Pilzes zur Inaktivierung repetitiver Sequenzen durch DNA-Methylierung und Einfügen zahlreicher C→T Transitionsmutationen (Selker, 1990). Im Pilz *Ascobolus immersus* werden Wiederholungssequenzen mittels „Methylation induced premeiotically“ (MIP) inaktiviert und methyliert (Goyan et al., 1994). Man nimmt an, daß homologe Paarungen an nicht-allelen Positionen im Genom zur Inaktivierung und Methylierung der repetitiven Sequenzen führen. In *Neurospora* ist die Effizienz der „repeat-induced point mutation“ umso höher, je näher die repetitiven Sequenzen zusammenliegen (Selker et al., 1990). Repetitive zelluläre Gene, die in

mehreren Kopien auf einem Chromosom lokalisiert sind, müssen daher durch noch einen unbekanntem Mechanismus vor der Inaktivierung geschützt werden.

Einige Transposons in Säugern zeigen Eigenschaften, die für parental geprägte zelluläre Gene charakteristisch sind. L1-Elemente und Retroviren der mit 900-1000 Kopien pro haploidem Genom vorkommenden IAP (Intrazisternale-A-Partikel) Klasse werden vom männlichen Elternteil unmethyliert und von der Mutter im methylierten Zustand vererbt (Sanford et al., 1987). Die unmethylierten Komponenten dieser Elemente werden kurz nach der Implantation *de novo* methyliert (Monk et al., 1987; Sanford et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, daß die Insertion von IAP in die Nachbarschaft des Agouti-Genlokus zu einer allelspezifischen Expression dieses Gens führte (Michaud et al., 1994).

1.6 Integration fremder DNA in eukaryontische Genome: Konsequenzen für das zelluläre Methylierungs- und Expressionsmuster

Säugerzellen besitzen die Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren. Die Integration fremder DNA in ein etabliertes Wirtsgenom kann einerseits auf natürlichem Wege z.B. durch Infektion der Zellen mit verschiedenen DNA- oder RNA-Viren erfolgen. Andererseits haben viele experimentelle Techniken wie etwa die Transfektion oder die Mikroinjektion einen artifiziellen Transfer fremder DNA und ihre Integration in das Genom von Säugerzellen zum Ziel. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß DNA, die mit der Nahrung aufgenommen wurde, während der Passage durch den gastrointestinalen Trakt nur unvollständig verdaut wird und über das Darmepithel in den Blutstrom gelangen kann (Schubbert et al., 1994). Fragmente dieser DNA konnten in Leukozyten, Milz- und Leberzellen nachgewiesen werden. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen konnten kleine Fragmente der oral verabreichten fremden DNA (Bakteriophage M13-DNA) aus Milz-DNA rekloniert werden (Schubbert et al., 1997).

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß in der Adenovirus Typ 12 (Ad12)-transformierten Tumorzelllinie T1111/2 die an die integrierte adenovirale DNA angrenzende zelluläre DNA in einem Bereich von ca. 1 kbp eine Abnahme in der Methylierung aufwies (Lichtenberg et al., 1988). In ähnlichen Untersuchungen konnte in der Nachbarschaft einer retroviralen Integrationsstelle eine Zunahme in der Methylierung zellulärer DNA beobachtet werden (Jähner u. Jaenisch, 1985). Untersuchungen an Hamsterzellen, die transgen für Ad12-DNA waren, zeigten, daß auch weiter von der Integrationsstelle der fremden DNA entfernt liegende zelluläre Gene Veränderungen im Methylierungsmuster zeigten (Heller et al., 1995, Müller et al., 2000). Da die Hamsterzelllinien mit integriertem Ad12 einen transformierten Phänotyp aufwiesen und ein

Einfluß adenoviraler Genprodukte nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden BHK21 Zellen mit Plasmid-DNA oder/und Bakteriophage Lambda-DNA transfiziert. In einigen der daraus resultierenden Zellklone konnten zunächst nur Methylierungsänderungen in den Retrotransposon-ähnlichen Sequenzen der Intrazisternalen A Partikel (IAP) nachgewiesen werden (Kämmer et al., 1997; Remus et al., 1999), die mit 900 Kopien pro haploidem Hamstergenom vertreten sind. Mit Hilfe der in dieser Arbeit dargestellten Analysemethoden, die eine Genom-weite Suche und Klonierung differentiell methylierter und exprimierter DNA-Segmente ermöglichten, wurde eine Reihe weiterer zellulärer DNA-Sequenzen identifiziert, die in Lambda-transgenen Hamsterzellen in ihrer Methylierung und Expression verändert worden waren (Müller et al., 2000).

Wie die Integration von Fremd-DNA Veränderungen in der Methylierung und Expression zellulärer DNA-Segmente hervorrufen kann, die in trans zur Integrationsstelle liegen ist noch unklar. Es konnte gezeigt werden, daß menschliche Chromosomen im Interphasekern eine bestimmte räumliche Ausrichtung zueinander einnehmen (Haaf u. Schmid, 1991; Cremer et al. 1992; Hubert u. Bourgeois, 1986; Benbow, 1992). Es wurde postuliert, daß die nukleare Matrix, an der sich die Organisation der Chromosomen in Domänen orientiert, auch am gerichteten Transport von Metaboliten zu oder aus bestimmten Bereichen des Interphasekerns beteiligt sei (Razin u. Gromova, 1995). Durch die Anwendung von Fluoreszenz-Mikroskopie mit spezifischen Sonden für transkribierte DNA-Templates, prä-mRNAs und essentiellen mRNA Splicing-Faktoren konnte gezeigt werden, daß die RNA-Polymerase II Transkription auf bestimmte Kompartimente im eukaryontischen Zellkern beschränkt ist (Henzel u. Bazett-Jones, 1995). Eine strukturelle Veränderung dieser Chromosomenorganisation durch die Integration fremder DNA könnte zu Fehlregulationen der Genexpression führen und die Zugänglichkeit zellulärer DNA-Bereiche für DNA-Methyltransferasen verändern. Besonders Arbeiten an *Drosophila* konnten zeigen, daß die Expression von Genen von ihrer räumlichen Lage im Interphasekern abhängig sein kann. Während der Larvenentwicklung von *Drosophila* wird der für die Augenfarbe notwendige brown-Lokus durch Interaktion mit zentromerischen Heterochromatin inaktiviert (Dernburg et al., 1996). Die Interaktion mit weit entfernten heterochromatischen Bereichen alleine führte dabei schon zur Inhibierung des untersuchten Lokus. *Drosophila*-Gene, die im euchromatischen Chromosomenbereichen exprimiert werden, verlieren ihre Aktivität, wenn sie als Transgen in Telomerbereiche integriert werden (Crydermann et al., 1999).

Neben strukturellen Veränderungen in der Organisation der Chromosomen könnte die Integration von Fremd-DNA auch über Interaktionen zwischen repetitiven Sequenzen im Genom zu Methylierungs- und Expressionsunterschieden in trans führen. Endogene repetitive Sequenzen in Nachbarschaft zur Integrationsstelle der fremden DNA könnten auf diese Weise

z.B. ihren veränderten Methylierungsstatus auf homologe Sequenzen im Genom übertragen. Daß ein Transfer von Methylierungsstadien zwischen Allelen auf homologen Chromosomen in der Tat stattfinden kann, zeigten Arbeiten von Colot und Mitarbeitern (1996). In dem gewählten Testsystem konnte in meiotischen Zellen von *Ascobolus immersus* regelmäßig eine Übertragung der Methylierung vom methylierten b2-Allel zum unmethylierten Allel beobachtet werden. Ähnliche trans-Interaktionen zwischen nicht-gekoppelten Transgenen auf nicht-homologen Chromosomen wurden auch in Pflanzen beobachtet, in deren Genom in aufeinanderfolgenden Transformationsschritten mehrere Transgenkomplexe integriert worden waren (Matzke et al., 1992).

Es wurde berichtet, daß die Expression transposabler Elemente wie die intrazisternalen-A-Partikel durch DNA-Methylierung der langen invertierten Wiederholungssequenzen (LTR) am 5'-terminalen Ende reguliert wird (Morgan u. Huang, 1984; Feenstra et al., 1986; Falzon u. Kuff, 1991). In einer Arbeit von Lichtenberg und Mitarbeitern (1988) wurde in direkter Nachbarschaft zur Integrationsstelle der Adenovirus Typ 12-DNA in das Hamstergenom eine Abnahme in der Methylierung von IAP Sequenzen beobachtet. Es besteht die Möglichkeit, daß der hypomethylierte Zustand zur Transposition der in somatischen Zellen meist inaktiven IAP-Elemente führen kann. Derart könnten durch replikative Transposition auch auf anderen Chromosomen Methylierungs- oder Expressionsänderungen durch die Integration der Transposonsequenzen stattfinden. Veränderungen im Methylierungs- und Expressionsmuster in zellulären Genen durch die Insertion von IAPs wurden in einer Reihe von Arbeiten berichtet. Durch IAP-Integration unmittelbar 5' vor dem ersten kodierenden Exon des Agouti-Lokus der Maus wurde die Expression des Gens in Abhängigkeit vom Methylierungsgrad des IAP-Promotors (Michaud et al., 1994) und von der parentalen Herkunft reguliert.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Für verschiedene biologische und medizinische Fragestellungen ist das Einbringen fremder DNA in etablierte Genome von Bakterien, Pilz-, Tier- und Pflanzenzellen zu einer der wichtigsten Techniken geworden. Die verlässlichste Methode, transgene Mäuse zu generieren, ist die Mikroinjektion von Fremd-DNA in einen der Vorkerne der befruchteten Eizelle. Die Möglichkeit DNA jeglicher Herkunft durch Mikroinjektion direkt in den Mausembryo einzubringen, wurde bereits 1980 beschrieben (Gordon et al., 1980). Seitdem findet diese Technik ohne signifikante Modifikationen weltweit Anwendung. In gleicher Weise soll die Generierung von Organismen mit Nullmutationen eines bestimmten Gens mittels der „Gene targeting“-Technik zu einem Verständnis der Funktion dieser Gene im Organismus beitragen. Säugerorganismen mit zusätzlichen Transgenen oder Nullmutationen in einzelnen Genen werden dabei allzu vereinfacht als Organismen analysiert, die sich von normalen Organismen lediglich durch die eingebrachte oder ausgeschaltete Information für ein Protein unterscheiden. Diese Betrachtungsweise vernachlässigt die komplexen Wechselwirkungen im Säuger genom und die Fähigkeit eine Nullmutation durch erhöhte Expressionsniveaus in verwandten Genen kompensieren zu können. In solchen Fällen hat eine Nullmutation offensichtlich keinen Effekt (Weintraub, 1993). Andererseits kann eine einzige Nullmutation zur veränderten Expression anderer Gene führen und den Entwicklungsablauf eines Säugerorganismus verändern (Silva et al., 1992; Grant et al., 1992; Abeliowitch et al., 1993; Conquet et al., 1994; Strittmater et al., 1995). Die beobachteten Phänotypen können in diesen Fällen allenfalls als Reaktionen auf die eingebrachten Mutationen verstanden werden.

Im Rahmen früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde an Zellen in Zellkultur untersucht, welchen Einfluß die Integration von Fremd-DNA auf die Methylierung zellulärer Gene haben kann (Heller et al., 1995; Remus 1999). In BHK21 Hamsterzellen, die transgen für Adenovirus Typ 12 (Ad12) DNA waren, konnten eine Reihe von Genen identifiziert werden, die eine gegenüber der parentalen BHK21 Zelllinie veränderte Methylierung zeigten. Da in den Ad12-transgenen BHK21 Zellen adenovirale Genprodukte zu den beobachteten Veränderungen beigetragen haben könnten, wurden BHK21 Zelllinien hergestellt, die transgen für die DNA des Bakteriophagen Lambda waren. Die Untersuchung der zellulären Methylierungsmuster in randomisiert ausgewählten Genen sollte aufklären, ob die Integration der Fremd-DNA per se zu Methylierungsänderungen führen kann. Experimentelle Voraussetzung war die Annahme, daß die Phagen-DNA in der eukaryontischen Wirtszelle nicht exprimiert werden würde. In Southern-Blot Analysen mit zufällig ausgewählten Gensonden konnte jedoch nur in den Sequenzen der Intrazisternalen-A-Partikel eine Veränderung im Methylierungsmuster gefunden werden (Remus et al., 1999).

Ob die Integration fremder DNA zu Veränderungen im zellulären Methylierungs- oder Expressionsmuster führte, konnte durch eine zufällige Auswahl zu analysierender DNA-Segmente nicht beantwortet werden. Bei einer ungefähren Genomgröße des untersuchten Hamstergenoms von 3×10^9 Basenpaaren pro haploidem Genom war die Wahrscheinlichkeit, in Lambda-transgenen BHK21 Zellen durch Zufall veränderte zelluläre DNA-Segmente zu finden, zu gering.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene Analysemethoden experimentell etabliert, die eine Genom-weite Suche nach differentiell methylierten und exprimierten DNA-Segmenten ermöglichte. Die Methylierungs-sensitive repräsentative Differenzanalyse (MS-RDA) (Ushijima et al., 1997) wurde zunächst ausgewählt, um differentiell methylierte DNA-Bereiche aus Ad12- und Lambda-transgenen BHK21 Zellen zu isolieren. Mit Hilfe der cDNA Subtraktionstechnik (Diatchenko et al., 1996) war es möglich, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren.

Im Verlauf der MS-RDA Analysen konnten mehrere differentiell methylierte zelluläre DNA-Segmente aus Ad12- sowie Lambda-transgenen BHK21 Zellen isoliert werden. Allerdings konnte kaum eines der klonierten meist repetitiven DNA-Segmente aufgrund einer Homologie zu bekannten Genen identifiziert werden. Aus diesem Grunde wurde eine neue Analysemethode entwickelt, die ebenfalls die Isolierung differentiell methylierter DNA-Segmente ermöglichte, jedoch nur einen Zyklus subtraktiver Hybridisierung benötigte (siehe Methodenteil). Diese im folgenden als Methylierungs-sensitive Amplicon Subtraktion (MS-AS) bezeichnete Methode ermöglichte eine schnellere und kostengünstigere Analyse der zu vergleichenden genomischen DNA-Proben als bei der MS-RDA. Die MS-AS Methode führte zur Isolierung mehrerer DNA-Segmente, die in Ad12- und Lambda transgenen BHK21 Zellen differentiell methyliert waren. Zudem konnten die meisten Differenzklone anhand einer Homologie zu bekannten Genen identifiziert werden.

Weiterhin sollten in der vorliegenden Arbeit transgene Mäuse daraufhin untersucht werden, ob die Integration von Fremd-DNA in das Mausgenom Methylierungsänderungen in weit vom Integrationsort entfernt liegenden zellulären DNA-Bereichen hervorrufen konnte. Für die Methylierungsstudien standen Tiere aus verschiedenen transgenen Linien zur Verfügung. In früheren Arbeiten wurden bereits Mäuse untersucht, die transgen für ein 3324 Bp großes DNA-Konstrukt waren, welches aus dem späten E2A-Promotor aus Adenovirus Typ 2, verbunden mit dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) und dem Polyadenylierungs-Signal aus SV40 bestand (pAD2E2AL-CAT) (Diplomarbeit von K. Müller, 1997). Experimente an diesen transgenen Tieren wurden in der vorliegenden Arbeit fortgeführt.

Mäuse des CD-1 Stammes, die transgen für die DNA des Bakteriophagen-Lambda waren, wurden in Kooperation mit einem anderen Labor (Klaus Schughart, Strassbourg, damals GSF, München) hergestellt. Da sich im Verlauf der Embryonalentwicklung gewebespezifische Methylierungsmuster ausbilden, war es bei der Analyse dieser Lambda-transgenen Tiere von besonderem Interesse, DNA aus verschiedenen Organen und Geweben (Leber, Niere, Milz, Gehirn, Testis, Schwanz) zu analysieren. Dazu wurden auch die oben bereits erwähnten Analysemethoden MS-RDA und MS-AS eingesetzt, jedoch auch die Methylierung in randomisiert ausgewählten zellulären Genen untersucht. Es sollte gezeigt werden, ob mögliche Methylierungsänderungen in mehreren Organen beobachtet werden konnten oder auf bestimmte Gewebe beschränkt blieben.

2 Ergebnisse

2.1 Modulation der Genexpression und DNA-Methylierung in der Adenovirus Typ 12-transformierten BHK21-Zelllinie T637

Humane Adenoviren (Ad) verursachen in menschlichen Zellen eine produktive Infektion, während sie in Nagetierzellen zu einer abortiven Infektion führen, die gelegentlich eine morphologische Transformation der Zellen zur Folge haben kann. In diesen Zellen wurde die virale DNA in das Wirtsgenom integriert und zumindest die Gene der viralen E1 Region exprimiert. Die E1 Region umfaßt die frühen viralen Gene und besteht aus zwei transkriptionellen Einheiten, E1A und E1B. Einige Arbeiten konnten zeigen, daß beide Einheiten für eine vollständige morphologische Transformation notwendig sind, jedoch auch die E1A Region alleine Nagetierzellen immortalisieren kann (Houweling et al., 1980). Die verschiedenen Adenovirus-Serotypen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, nach Inokulation in neugeborene Hamster Tumore zu erzeugen. So sind Adenoviren des Typs 5 nicht onkogen, wohingegen Ad12 höchst onkogen ist.

Die Rolle der E1A Proteine bei der Transformation basiert darauf, daß zahlreiche zelluläre Proteine sequestriert werden und so nicht mehr mit ihren normalen zellulären Partnern assoziieren können (Flint und Shenk, 1989; Berk, 1986). Beide Proteine der E1B Region scheinen einige der Effekte von E1A zu kontrollieren. Dem E1B 21-kDa Protein kommt dabei die Funktion zu, die von E1A induzierte Apoptose zu inhibieren (Subramanian et al., 1993). Tatsächlich kommt es auch dann zu einer vollständigen Transformation, wenn das E1B 21-kDa Protein durch einen anderen Apoptoseinhibitor (bcl-2) ersetzt wird (Rao et al., 1992).

Die Assoziation der E1A Proteine mit zellulären Proteinen kann jedoch nicht die veränderte Expression zellulärer Gene in Ad-transformierten Zellen erklären. In transienten Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, daß mehrere zelluläre Gene durch E1A über ihre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor E2F induziert wurden (Hiebert et al., 1989, 1991; Lipp et al., 1989). Die Expression eines dieser Gene, c-myc, wird jedoch nicht nach Infektion ruhender 3T3 Zellen mit Ad2 induziert (Liu et al., 1985). In Ad2 infizierten KB Zellen, die normalerweise c-myc exprimieren, kommt es sogar zu einer Abnahme der c-myc-Expression (Rosahl und Doerfler, 1992) und in Adenovirus transformierten Zellen findet man generell eine Abnahme der c-myc-Expression (Timmers et al., 1988).

Diese unterschiedlichen Effekte in transienten Versuchen einerseits und transformierten oder lytisch infizierten Zellen andererseits deuten darauf hin, daß außer E1A noch andere Faktoren die Expression zellulärer Gene beeinflussen können.

In früheren Arbeiten aus unserem Labor wurden in Ad12-transformierten BHK21-Hamsterzellen starke Veränderungen in der Methylierung zellulärer Gene gefunden (Heller et al., 1995). Die Methylierungsveränderungen in endogenen IAP Retrotransposons, der Region des MHC und einer Reihe weiterer Gene konnten nicht in BHK21 Zellen festgestellt werden, die zuvor mit Ad12-infiziert wurden. Da Ad12-infizierte und Ad12-transformierte BHK21-Zellen das gleiche Transkriptionsmuster für die frühen Ad12 Gene aufwiesen (Ortin et al., 1976), ist es unwahrscheinlich, daß die Anwesenheit früher Ad12-Genprodukte zu den beobachteten Veränderungen in der Methylierung geführt haben. Darüber hinaus konnte die Analyse zweier Ad12-transformierter Hamsterzelllinien (T637 und A2497-3) zeigen, daß Veränderungen im Methylierungsphänotyp zellulärer Gene sehr spezifisch für die einzelnen Zelllinien waren. Es schien daher wahrscheinlicher, daß die Integration der fremden Ad12 DNA in das Genom der Hamsterzellen und nicht die frühen viralen Genprodukte zu den gefundenen Veränderungen geführt hatten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit mehreren Analysemethoden eine Genom-weite Suche nach weiteren Veränderungen in der Genexpression und der DNA-Methylierung durchgeführt. Damit sollten Gene und DNA-Segmente im Hamstergenom identifiziert werden, die für die phänotypischen Unterschiede zwischen normalen und transformierten Zellen verantwortlich waren oder durch den onkogenen Phänotyp verändert worden waren.

2.1.1 Induktion der Genexpression in Ad12-transformierten BHK21 Zellen

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurde die Ad12-transformierte Zelllinie T637 verwendet. Diese Zelllinie trägt ca. 15-20 Kopien des adenoviralen Genoms an einer chromosomalen Lokalisation im Genom. Um Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen Ad12-transformierten und den parental BHK21 Zellen zu identifizieren, wurde eine als suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) bezeichnete cDNA Subtraktionstechnik (Diatchenko et al., 1996) angewendet. Diese Technik geht von mRNA Populationen aus, die man aus den beiden zu vergleichenden Zelllinien isoliert hat. Dabei ist der *Driver* diejenige mRNA Population, die während der Subtraktion eliminiert werden soll, wohingegen die *Tester* mRNA Population zusätzliche, differentiell exprimierte Gene enthält. Beide mRNAs wurden revers transkribiert und der SSH-Prozedur unterzogen (Durchführung siehe Methodenteil). Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist, daß der Subtraktionsprozeß überprüft werden kann, bevor die subtrahierten cDNAs weiterverwendet wurden. Die Subtraktionseffizienz kann durch die Reduktion von Transkripten, die in beiden Populationen vorliegen, oder durch die Anreicherung spezifischer Sequenzen aus einer Population nach der Subtraktion kontrolliert werden (siehe auch 2.3.1). Die subtrahierte und mit differentiell exprimierten Sequenzen angereicherte cDNA-Bibliothek wurde bei ausreichender Subtraktionseffizienz in einen TA-Vektor kloniert, in Bakterien transfiziert und auf

Agarplatten, die neben Ampicillin auch X-Gal und IPTG enthalten ausplattiert. Insert-positive weiße Kolonien wurden isoliert und zur Inokulation von LB-Medium in 96-Loch Mikrotiterplatten verwendet. Klonierte Inserts wurden anschließend mittels einer „Kolonie“-PCR amplifiziert (siehe Material u. Methoden). Nach Immobilisierung der PCR Produkte auf positiv geladenen Nylonmembranen, wurden die duplizierten Filter entweder gegen ³²P-markierte cDNA des *Drivers* oder des *Testers* hybridisiert (siehe Abb. 2a). Bei diesem reversen Northern-Blot Experiment war es entscheidend, daß die radioaktiv markierte cDNA zuvor mit einer Restriktionsendonuklease (RsaI) gespalten wurde, da es so im Vergleich zur ungespaltenen cDNA Probe zu intensiveren Hybridisierungssignalen kam. Auf diese Weise konnten auch schwache Signale, die von selten transkribierten Sequenzen stammten, verglichen werden. Diese Vorselektion der subtrahierten cDNA war erforderlich, da je nach Experiment nur maximal 10% der amplifizierten Inserts von differentiell exprimierten Genen stammten.

Abb. 2a: Dot-Blot-Analyse der Differenzprodukte

Reverse Northern Dot-Blots der Differenzprodukte. PCR amplifizierte Anreicherungsprodukte nach einem Zyklus subtraktiver Hybridisierung der cDNA-Präparationen aus T637 und BHK21 wurden in Arrays auf positiv geladenen Nylonmembranen immobilisiert. Die beiden duplizierten Filter mit identischer Klonanordnung wurden gegen ³²P-markierte cDNA Präparationen aus T637 oder der parentalen BHK21-Zelllinie hybridisiert.

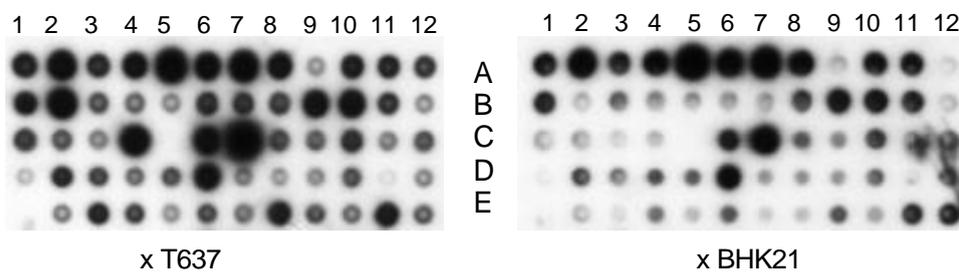
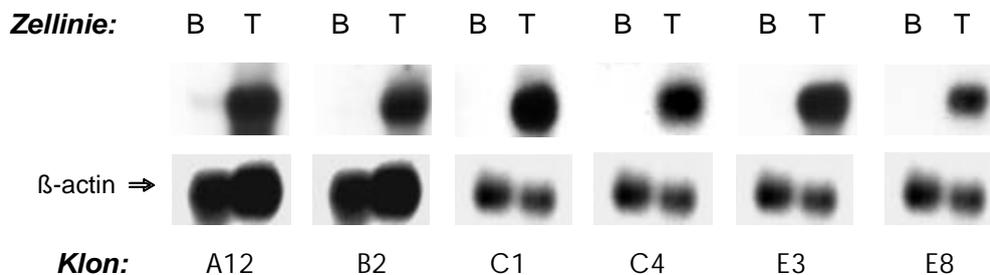


Abb. 2b: Induktion der Genexpression in Ad12-transformierten BHK21-Zellen

cDNA-Klone, die in der Analyse der Dot-Blot Arrays Unterschiede in der Signalintensität zwischen BHK21 (B) und der transformierten T637 (T) Zelllinie zeigten, wurden weiterhin in Northern-Analysen mit 30µg cytoplasmischer RNA untersucht. Die RNA-Proben wurden dazu in 1% Agarosegelen getrennt, die 2,2M Formaldehyd enthielten. Nach Transfer auf GeneScreen Plus Membranen wurde die RNA gegen ³²P-markierte cDNA-Klone hybridisiert. Die Klonbezeichnungen entsprechen der Rasterbeschriftung aus Abb. 2a. Die Rehybridisierungen der Membranen mit β-Actin diente der RNA-Mengenkontrolle.



Da es besonders bei schwachen Signalen, die in dieser Dot-Blot Analyse der Differenzklone erhalten wurden, zu einer Überlagerung mit unspezifischen Hintergrundsignalen kommen konnte, war eine weitere Evaluation der Ergebnisse in Northern-Blot Experimenten erforderlich (siehe Abb. 2b). Die Klonbezeichnungen entsprechen der Rasterbeschriftung aus Abbildung 2a. Außer dem Klon A12 zeigte keiner der gefundenen differentiell exprimierten Klone ein Signal in der parentalen BHK21-Zelllinie. Vielmehr war es in der Ad12-transformierten BHK21-Hamsterzelllinie T637 zu einer Induktion der Expression der isolierten Gene gekommen. Die Daten der reversen Northern-Analyse (Abb. 2a) konnten durch die Northern Analyse cytoplasmatischer RNA (Abb. 2b) bestätigt werden. Da es bei Dot-Blot Analysen zu einer Überlagerung der spezifischen Signale und der unspezifischen Hintergrundsignale auf einer Fläche kam, war eine weitere Auswertung der Expression in Northern-Blot Analysen besonders für schwach exprimierte Gene erforderlich.

Außer Klon E8 konnten alle dargestellten differentiell exprimierten Gene mittels einer Homologiesuche in einer NCBI Datenbank identifiziert werden (siehe Tabelle 1). Die Referenzen für die Datenbankeinträge sind unterhalb der Tabelle aufgeführt. Klon A12 und E3 sind stark homolog zum Strukturprotein Endo-B-Typ I Keratin (Oshima et al., 1988) der Maus und zum Keratin 18 (Fridmacher et al., 1995) aus der Ratte. Klon B2 zeigt Homologie für das plazentale Calcium-bindende Protein und gehört zusammen mit Klon C4, welches zum pEL98 Protein homolog ist, zu einer Familie Calcium-bindender Proteine. Da die Klone A12 und E3 zueinander eine sehr hohe Homologie aufweisen, ist es wahrscheinlich, daß in beiden Fällen unterschiedliche Bereiche des gleichen Gens kloniert wurden. Für die beiden Klone B2 und C4 trifft die gleiche Feststellung zu.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur differentiellen Genexpression

Zelllinie	Differenz-Klon	Datenbank-homologie	Identität (Bp pro Bp) (%)	Regulation verglichen mit BHK21	Expressionslevel, normalisiert
T637	A12	Maus endo B Cytokeratin mRNA	390/431 91%	+	>10
	B2	mRNA für placentales Calcium-bindendes Protein	318/355 90%	+	keine Expression in BHK21
	C1	Humanes Thy-1 Glycoproteingen	112/132 85%	+	keine Expression in BHK21
	C4	Maus mRNA für pEL98 Protein	408/478 85%	+	keine Expression in BHK21
	E3	Rattus norvegicus mRNA für Keratin 18	283/ 308 92%	+	keine Expression in BHK21
	E8	keine		+	keine Expression in BHK21
	Lambda 10	A6	C. griseus Thrombospondin protein	107/110 97%	-
B9		keine	no	+	3,9
C8		Maus Cofilin isoforme mRNA	217/250 87%	+	2,5
E11		keine	no	-	keine Expression in BHK21
F11		Humanes chromosome19, BAC CIT-B-470f8 (BC330812)	141/157 90%	+	0,6
F12		Maus Thrombospondin -gen	347/396 88%	-	6,3
Lambda 18	80-I	Maus Superoxidase dismutase 2 mRNA	424/458 93%	+	8,7
	32-II	Rattus norvegicus ribosomales Protein S12 mRNA	223/240 93%	+	7,5

2.1.2 Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer Gene in der Adenovirus Typ 12-transformierten BHK21-Hamsterzelllinie T637 und ihrer Revertanten

Im Rahmen früherer Studien konnte gezeigt werden, daß der Methylierungsstatus einiger zellulärer Gene und DNA-Segmente in der Ad12-transformierten BHK21-Zelllinie T637 zum Teil stark verändert war. Die randomisiert für die Analyse ausgewählten zellulären Gene und DNA-Segmente zeigten in T637 einen gegenüber der parentalen Zelllinie erhöhten Methylierungsgrad. Methylierungsänderungen wurden nicht nur in cis sondern auch in trans von der adenoviralen Integrationsstelle beobachtet (Lichtenberg et al., 1988; Heller et al., 1995). Da in keinem der untersuchten Gene und DNA-Segmente Methylierungsänderungen nach Infektion von BHK21 Zellen mit Ad12 auftraten (Heller et al., 1995), war es unwahrscheinlich, daß frühe virale Genprodukte alleine für die Methylierungsänderungen in T637 verantwortlich waren. Wenngleich die infizierten BHK21 Zellen im Vergleich zu der etablierten T637 Zelllinie nur eine relativ kurze Zeit unter dem Einfluß früher adenoviraler Genprodukte standen, konnte die Integration der fremden (Ad12) DNA in das Genom der BHK21 Zellen als möglicher Faktor für die Methylierungsänderungen nicht ausgeschlossen werden. Neuere Daten aus unserem Labor weisen allerdings darauf hin, daß zumindest die Gene der E1B-Region in Ad12-infizierten BHK21 Zellen in geringerem Maße exprimiert werden als in der Ad12-transformierten T637 Zelllinie (Marianna Hösel, pers. Mitteilung). Möglicherweise findet dadurch keine Kontrolle der E1A-Genprodukte durch E1B-Genprodukte statt, die z.B. für eine vollständige Transformation der Zelle notwendig wären (Houweling et al., 1980).

Im folgenden Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der *Methylierungs-sensitiven repräsentativen Differenzanalyse (MS-RDA)* eine Genom-weite Suche nach Methylierungsänderungen in T637 durchgeführt. Differenzklone, die nach der MS-RDA Prozedur (Durchführung siehe Methodenteil) mit T637 als *Driver* und BHK21 als *Tester* erhalten wurden, wurden als Hybridisierungs sonden in Southern-Blot Experimenten verwendet (Abb. 3a). In diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob die selektiv amplifizierte genomische Subklone tatsächlich aus Genombereichen stammten, die in der transformierten Zelllinie einen höheren Methylierungsgrad aufwiesen als in der BHK21-Zelllinie. Die Analyse der Methylierungsmuster der zellulären DNA-Sequenzen wurde mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen HpaII (5'-CCGG-3') und HhaI (5'-GCGC-3') durchgeführt. Das zu HpaII isoschizomere MspI zeigt keine Sensitivität gegenüber Methylierung am internen Cytosin der Erkennungssequenz (Waalwijk u. Flavell, 1978) und konnte daher als Kontrolle für die Methylierung von HpaII-Erkennungsstellen verwendet werden.

Positive DNA-Klone wurden weiterhin verwendet, um die Methylierung in Revertantenzelllinien (TR3 und TR12) von T637, in Ad12-infizierten und -transfizierten (H-Ad12neo2/5) BHK21 Zellen sowie einer weiteren Ad12 transformierten Zelllinie (A2497-3) zu analysieren. Die Ergebnisse aus diesen Studien sollten dazu beitragen weitere Aufschlüsse darüber zu erhalten, in welchem Maße die Integration der adenoviralen DNA an den gefundenen Methylierungsänderung beteiligt sein könnte. Eine Zusammenfassung der Hybridisierungsstudien ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Methylierungsstudien

MS-RDA Sonde	<i>DNA aus Zelllinie</i>													
	T637		TR12		TR3		A2497-3		BHK-Ad12		H-Ad12-neo2		H-Ad12-neo5	
	HpaII	HhaI	HpaII	HhaI	HpaII	HhaI	HpaII	HhaI	HpaII	HhaI	HpaII	HhaI	HpaII	HhaI
T1	+	+	-	-	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
T2	++	++	n.a.	n.a.	++	++	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
T13	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-	-
T14	+	+	n.a.	n.a.	+	+	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
T15	++	++	n.a.	n.a.	++	++	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
T49	+	+	n.a.	n.a.	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
T12	++	++	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	+	+

(++) Methylierungsgrad im untersuchten DNA-Segment war signifikant höher als in BHK21

(+) Es wurde eine höherer Methylierungsgrad nachgewiesen

(-) Keine Methylierungsänderung

(n.a.) Methylierung wurde nicht analysiert

Die für die Methylierungsuntersuchung verwendeten Differenzklone zeigten ausschließlich eine Hypermethylierung in der T637 Zelllinie (Abb. 3a). Der höhere Methylierungsgrad in den untersuchten zellulären DNA-Segmenten wurde durch höhermolekulare Hybridisierungssignale in den HpaII und HhaI Spuren von T637 angezeigt. Obwohl bei der MS-RDA eine selektive Anreicherung kleiner HpaII-Spaltfragmente der BHK21 *Tester*-DNA stattfand, spiegelt sich der geringere Methylierungsgrad im *Tester* auch im HhaI-Spaltmuster wider.

In Ausnahmefällen (Sonde T1) konnte eine Wiederherstellung des normalen Methylierungsphänotyps der differentiell methylierten DNA-Segmente in der Revertantenzelllinie TR12 beobachtet werden (Abb. 3b). In welcher Weise die Wiedererlangung der normalen Methylierung mit dem teilweisen Verlust der adenoviralen Sequenzen zusammenhing, konnte nur vermutet werden. Da jedoch die Revertantenzelllinie TR12, die noch einige Kopien des Ad12 Genoms trug, eine Reversion der in T637 gefundenen Methylierungsänderung zeigte, nicht aber TR3, in der keine Ad12 Sequenzen mehr nachgewiesen werden konnten, war die strukturelle Veränderung an der Integrationsstelle als wahrscheinlicher Faktor anzusehen. Wäre ein Verlust früher

adenoviraler Genprodukte verantwortlich für die Wiederherstellung der normalen Methylierung gewesen, hätte auch TR3 diese Veränderung zeigen müssen. Allerdings war auch nicht auszuschließen, daß es sich hier um ein Selektionsartefakt der mittels Einzelzellklonierung gewonnenen Revertantenzelllinien handelte.

Abb. 3a: Veränderung im Methylierungsmuster zellulärer Gene in Adenovirus Typ 12 transformierten BHK21 Zellen

Genomische DNA (5µg) aus den Zelllinien T637 und BHK21 wurde mit HhaI (Hh), HpaII (Hp) oder MspI (M) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die Southern-Blots wurden gegen ³²P-markierte individuelle Anreicherungsprodukte (T1, T2, T13, T14, T15), die nach zwei Zyklen MS-RDA kloniert wurden, hybridisiert.

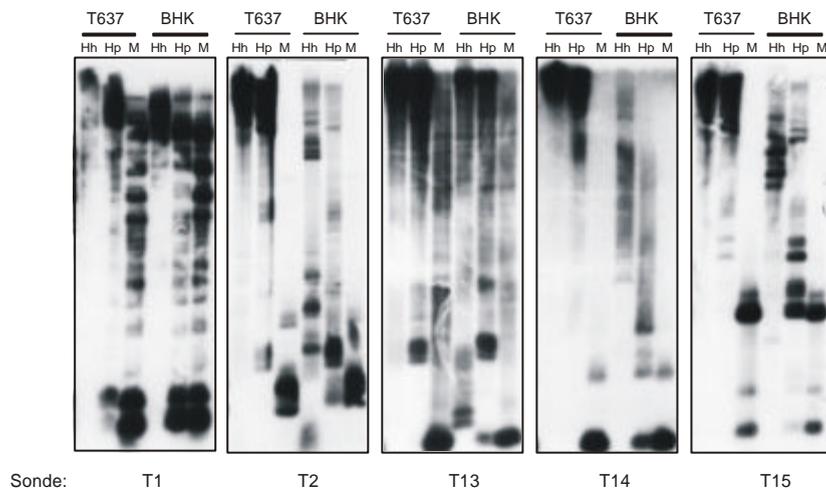
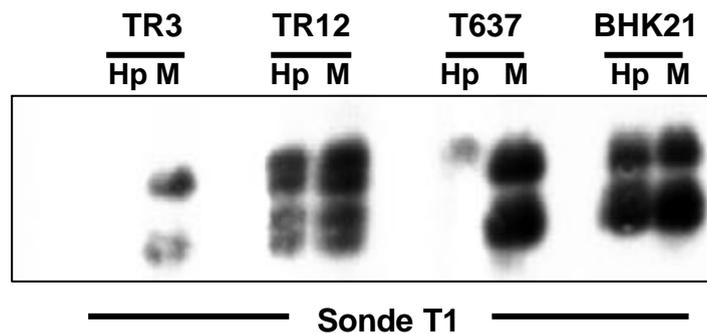


Abb. 3b: Wiederherstellung des normalen Methylierungsphänotyps in TR12

Das Methylierungsmuster des nach zwei Zyklen MS-RDA angereicherten und klonierten Differenzklons T1 entsprach in der Revertanten Zelllinie TR12 der normalen Methylierung in BHK21. Die experimentelle Durchführung entsprach der in der Legende zu Abb. 3a.



Die durch Kotransfektion von Ad12 und pSV2neo-Plasmid entstandenen transgenen BHK21-Zelllinien H-Ad12neo2 und H-Ad12neo5 wiesen im Gegensatz zu T637 keinen transformierten Phänotyp auf, d.h. ihre Morphologie entsprach den parental BHK21 Zellen. Frühe virale Transkripte waren nicht nachweisbar, was auf teilweises (H-Ad12neo5) oder vollständiges Fehlen (H-Ad12neo2) der kodierenden Region E1 in diesen Hamsterzellen

zurückgeführt werden konnte (Orend et al., 1995a). Das in der transformierten Zelllinie T637 gegenüber der normalen BHK21-Zelllinie stärker methylierte DNA-Segment T13 (siehe Abb. 3a und Tab. 2) zeigte in H-Ad12neo2 und H-Ad12neo5 den normalen Methylierungsphänotyp. Allerdings konnte in einem DNA-Segment (Differenzklon T12) in beiden transgenen Zellen ebenfalls eine Hypermethylierung, wie sie auch in T637 gefunden wurde, nachgewiesen werden. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß die beiden Ad12-transgenen, aber nicht transformierten Zelllinien nur in seltenen Fällen die gleichen Methylierungsänderungen wie T637 zeigten (Heller et al., 1995). Diese Daten unterstützten die Annahme, daß die Integration der fremden Ad12-DNA per se zu Methylierungsänderungen führen konnten.

Neben T637 wurde noch eine weitere Ad12-transformierte primäre Hamsterzelllinie untersucht (A2497-3). In dieser Zelllinie konnten jedoch mit den Differenzklonen, die in T637 eine Methylierungsänderung aufwiesen, keine Abweichungen vom normalen Methylierungsmuster festgestellt werden (siehe Tab. 2). Wenngleich im Falle von T637 die Möglichkeit besteht, daß Genprodukte der frühen E1-Region zu den gezeigten Veränderungen beigetragen haben könnten, handelte es sich doch um ein Ereignis, das spezifisch für diese Zelllinie war. Auch in anderen Arbeiten aus unserem Labor konnte nur in einigen Fällen eine in T637 und A2497-3 übereinstimmende Methylierungsänderung gefunden werden (Heller et al., 1995):

In BHK21 Zellen, die 30 Stunden nach der Infektion mit Ad12 geerntet wurden, konnte in keinem der auf Methylierungsänderungen untersuchten DNA-Segmente eine Abweichung vom parentalen Methylierungsphänotyp festgestellt werden (siehe Tab. 2). Obwohl es auch innerhalb dieser 30 Stunden nach der Infektion zur Expression der frühen E1-Gene kam, war jedoch besonders die Expressionsrate des 55 kD E1B-Gens gegenüber T637 vermindert (Marianna Hösel, pers. Mitteilung). Ein direkter Vergleich zwischen der transformierten T637 Zelllinie und einer Population infizierter BHK21 Zellen war ohnehin nur unter Vorbehalt möglich, denn nicht alle der für die Methylierungsanalyse verwendeten BHK21 Zellen waren tatsächlich mit Ad12-infiziert worden. Unterschiede zwischen T637 und Ad12-infizierten BHK21 Zellen in der Expressionsrate der frühen E1B-Gene beruhten daher eher auf einem zahlenmäßigen Unterschied E1B exprimierender Zellen bei infizierten und transformierten BHK21 Zellen.

Die Sequenzanalyse der in T637 differentiell methylierten genomischen DNA-Segmente führte nur bei einem Klon zu einer Zuordnung. Klon T2 konnte als Subklon aus der endogenen Sequenz Intrazisternaler-A-Partikel (IAP) identifiziert werden. Bereits in früheren Experimenten wurde in den IAP-Sequenzen von T637 eine veränderte Methylierung nachgewiesen (Heller et al., 1995). Diese Daten unterstützten weiterhin die Effektivität der verwendeten MS-RDA Technik. Mittels der MS-RDA konnte man zelluläre DNA-Segmente,

in denen bereits eine Methylierungsänderung beschrieben wurde zuverlässig aus dem Hamstergenom subklonieren. Die zusätzlich klonierten DNA-Segmente, zu denen keine Homologie in einer der NCBI Datenbanken gefunden wurde, stammten zumeist von repetitiven Sequenzen im Genom.

2.2 Modulation der Genexpression und DNA-Methylierung in Bakteriophage Lambda-transgenen BHK21-Zelllinien

In welchem Maße die Integration fremder DNA per se zu den vielfältigen Veränderungen in der Expression und Methylierung zellulärer DNA in der transformierten Zelllinie T637 beigetragen hatte, konnte mit den Daten des vorigen Abschnittes nicht stringent beantwortet werden. Der Integration der adenoviralen DNA und die damit einhergehenden strukturellen Veränderungen des Chromatins konnte jedoch schon in diesen Experimenten eine größere Bedeutung bei der viralen Onkogenese der Hamsterzellen zugesprochen werden als bisher angenommen. Um die Integration als Faktor isoliert betrachten zu können, wurden BHK21-Zelllinien etabliert, die transgen für die DNA des Bakteriophagen Lambda und des für die Selektion der Zellen benötigten pSV2neo Plasmides waren (Heller et al. 1995; Remus et al., 1999). Die DNA des Bakteriophagen Lambda wurde für diese Experimente ausgewählt, da eine Expression fremder Gene in der eukaryontischen Hamsterzelllinie ausgeschlossen werden konnte. Der Integrationsstatus der fremden DNA (Bakteriophage Lambda und pSV2neo Plasmid) wurde bereits detailliert beschrieben (Remus et al., 1999; Doktorarbeit von Hilde Heller, 1997; Doktorarbeit von Christina Kämmer, 1995). Veränderungen in der DNA-Methylierung zellulärer DNA-Segmente in transgenen Zellen konnten auf diese Weise auf die Integration der fremden Phagen-DNA zurückgeführt werden. In früheren Experimenten wurden die Zelllinien nach dreifacher Einzelzellklonierung etabliert und die Methylierung in randomisiert ausgewählten, aber bekannten zellulären DNA-Segmenten untersucht. Dabei konnte lediglich in einigen transgenen BHK21-Zelllinien eine geringfügige Veränderung in der Methylierung der Intrazisternalen-A-Partikel, die mit ca. 900 Kopien pro haploidem Genom vorkommen, festgestellt werden. Weitere DNA-Segmente, die in der transformierten Zelllinie T637 differentiell methyliert waren, zeigten in den untersuchten Lambda-transgenen BHK21 Zellen den normalen Methylierungsstatus.

Die Anwendung der beiden bereits beschriebenen Methoden zur Isolierung differentiell exprimierter (cDNA-Subtraktion) und methylierter (MS-RDA) DNA-Segmente schien aufgrund dieser Datenlage erforderlich, um eine umfassendere Aussage zu erhalten, die einen größeren Anteil des Hamstergenoms einbezog.

Dabei war es erforderlich, mindestens 2µg poly (A) mRNA zu verwenden, um Hybridisierungssignale zu erhalten. In Northern Analysen mit bis zu 40µg cytoplasmatischer RNA konnten keine Hybridisierungssignale nachgewiesen werden. Die isolierten cDNA Sequenzen stammten daher vermutlich von gering exprimierten Genen. Eine genauere Evaluierung der relativen mRNA-Niveaus erfolgte mittels Phosphoimager-Analyse der in den Northern-Blots erhaltenen Signale (siehe Tab. 3). Als Mengenkontrolle für die elektrophoretisch getrennte poly (A) mRNA wurde β-Actin verwendet.

Die Transkription der Gene (siehe dazu Tab. 3), gemessen an den relativen mRNA-Niveaus, war in der transgenen Zelllinie zum Teil hochreguliert worden (Klone B9, C8, F11) oder stark vermindert (Klone A6, E11, F12).

Tabelle 3: Phosphoimagerauswertung der Expressionsunterschiede zwischen BHK21 und Lambda 10

<i>Differentiell exprimierte Klone</i>	Signalverhältnis von bActin PSL-Bkg BHK: 1 10	<i>Signalverhältnis derDifferenzklone PSL-Bkg BHK: 1 10</i>	Expressions- niveau normalisiert am Niveau der β- Actin Expression
A6	1:1,1	3,1:1	3,4 (-)
B9	1:1,5	2,6:1	3,9 (+)
C8	1:1,5	1:4	2,5 (+)
E11	3:1	keine Expression in 1 10	0
F11	3:1	2,4:1	0,6 (+)
F12	1:1,5	4,2:1	6,3 (-)

PSL = „Photo stimulated luminiscence“

Bkg = “Background”, unspezifische Hintergrundstrahlung

(+) höhere Transkriptionsrate als in BHK21

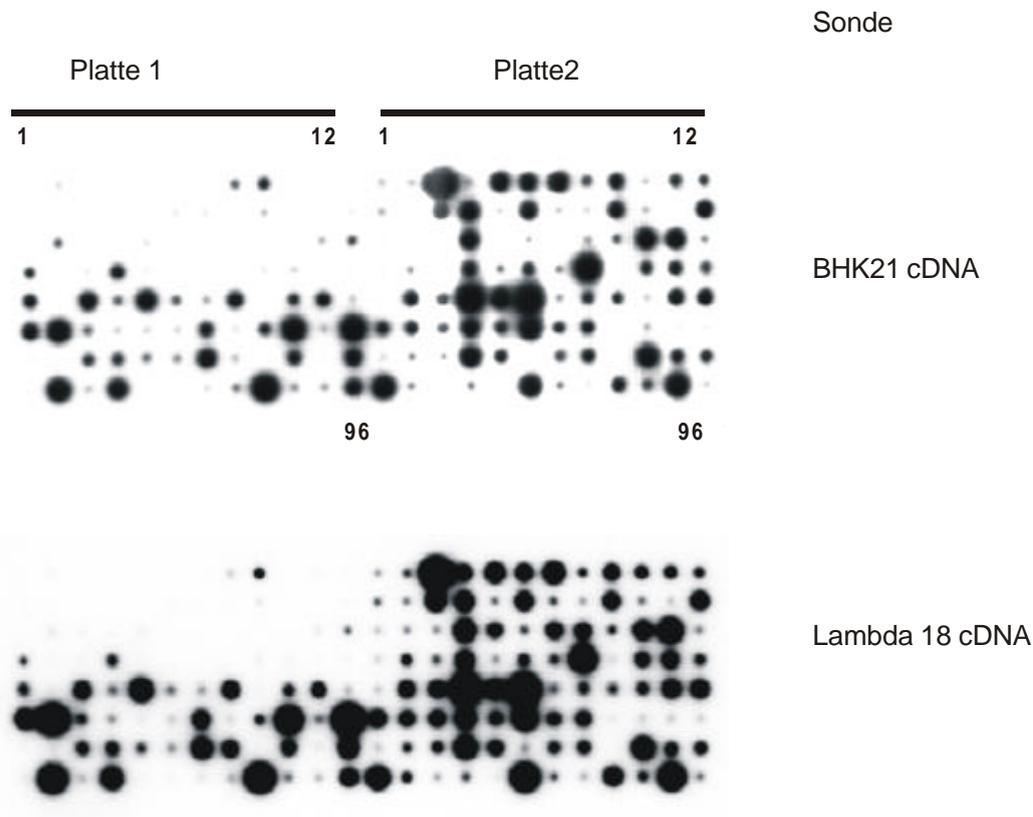
(-) niedrigere Transkriptionsrate als in BHK21

Dabei reichten die relativen Expressionsunterschiede von 0,6 bis mehr als 6-fach. Die Expression von Klon E11 war in der transgenen BHK21 Linie nicht mehr nachweisbar. Die Resultate der Sequenzanalyse und Datenbanksuche sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Zwei der sechs differentiell exprimierten Sequenzen konnten nicht anhand einer Homologie zu bekannten Datenbankeinträgen identifiziert werden.

Die differentiellen cDNA-Arrays in Abbildung 5a zeigten sieben cDNA-Segmente, die in der transgenen Zelllinie λ18 stärker exprimiert wurden als in der parentalen BHK21-Zelllinie. Die Datenbankreferenzen einiger dieser cDNA-Klone sind ebenfalls in der Tabelle 2 aufgeführt.

Abb. 5a: Dot-Blot-Analyse der differentiell exprimierten Gene in der transgenen BHK21-Zelllinie $\lambda 18$

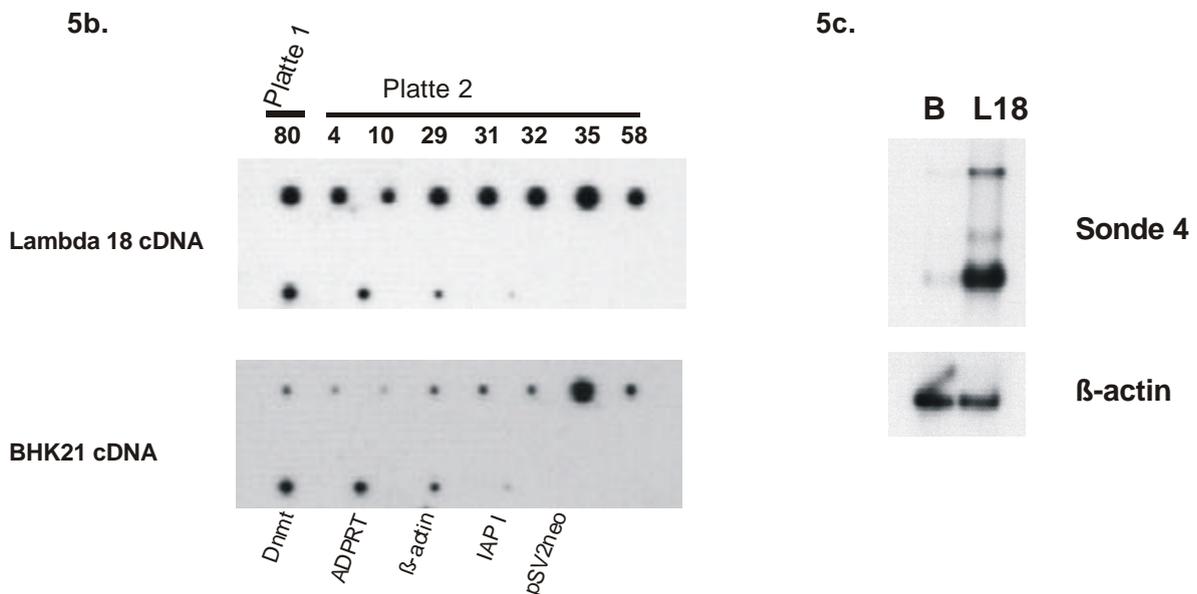
cDNA-Präparationen aus der transgenen Zelllinie $\lambda 18$ und der parentalen BHK21 Zelllinie wurden wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben mit Hilfe der cDNA Subtraktion untersucht. Anreicherungsprodukte wurden in den pGEM-T Vektor von Promega kloniert und nach PCR Amplifikation des Plasmid-Inserts wie in der Legende zu Abb. 2a beschrieben in Dot-Blot Arrays selektioniert. Sieben Klone mit Signalintensitätsunterschieden konnten identifiziert werden, die in weiteren Analysen genauer untersucht wurden (siehe Abb. 5b und 5c)



Die Expressionsanalyse bekannter Gene (DNA-Methyltransferase der Maus (Dnmt), ADPRT, β -Actin, IAP I und pSV2neo) zeigte keine Unterschiede zwischen $\lambda 18$ und der parentalen BHK21 Linie (Abb. 5b). Bei diesem Experiment dienen die beiden Gene ADPRT und β -Actin als Mengenkontrolle, um die Ergebnisse aus Abbildung 5a genauer auswerten zu können. Zusätzlich wurde die Expression einiger Klone in Northern-Blot Experimenten getestet, um die Daten der Dot-Blot Analysen zu bestätigen (Abb. 5c). Auf die Bedeutung der Expression endogener IAP-Sequenzen des Hamstergenoms wird in einem späteren Kapitel noch detaillierter eingegangen (siehe 2.5). Es konnte jedoch eine geringe Expressionsrate von IAPs in der normalen und der transgenen BHK21 Linie nachgewiesen werden. Da IAPs als Transposons im Genom agieren können, ist ihre Expression für die kritische Betrachtung der Daten von Bedeutung.

Abb. 5b und 5c: Array mit positiven Klonen aus dem ersten Dot-Blot Screening und Northern-Blot Analyse der Differenzklone

Reverse Northern Dot-blot Arrays mit vorselektionierten Differenzprodukten nach einem Zyklus cDNA Subtraktion mit der λ -transgenen Zelllinie λ 18 (L18) als *Tester* und der parentalen Zelllinie BHK21 (B) als *Driver*. Die Differenzklone wurden zusammen mit bekannten Genen (DNA-Methyltransferase der Maus (Dnmt), ADPRT, β -Actin, IAPI oder pSV2neo) auf GeneScreen Plus Membranen immobilisiert. Die Membranen wurden gegen 32 P-markierte cDNA-Bibliotheken aus λ 18 oder BHK21 hybridisiert. Einige Klone wurden zur Verifizierung der Dot-Blot Daten in Northern-Analysen mit 2 μ g poly (A⁺) mRNA untersucht.



In einer weiteren transgenen BHK21 Linie (λ 7) konnte keine veränderte Genexpression nachgewiesen werden. In dieser Zelllinie konnte auch lange nach Beendigung der G418 Selektion eine Expression der stabil in das Genom integrierten pSV2neo Sequenzen, die auch bei weiteren λ -transgenen BHK21 Zelllinien getestet wurde, gezeigt werden. Natürlich mußte auch die Expression der pSV2neo Sequenzen als kritischer Faktor bei der Bewertung der erhaltenen Daten mit einbezogen werden. Mehrere im Rahmen dieser Dissertation untersuchten λ - und pSV2neo-transgenen BHK21 Zelllinien, die auch nach Beendigung der G418-Selektion noch pSV2neo-Expression aufwiesen, zeigten keine nachweisbaren Veränderungen in der Methylierung oder Expression zellulärer DNA-Sequenzen. Ein genereller Einfluß des pSV2neo Expressionsproduktes auf die Methylierung und Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

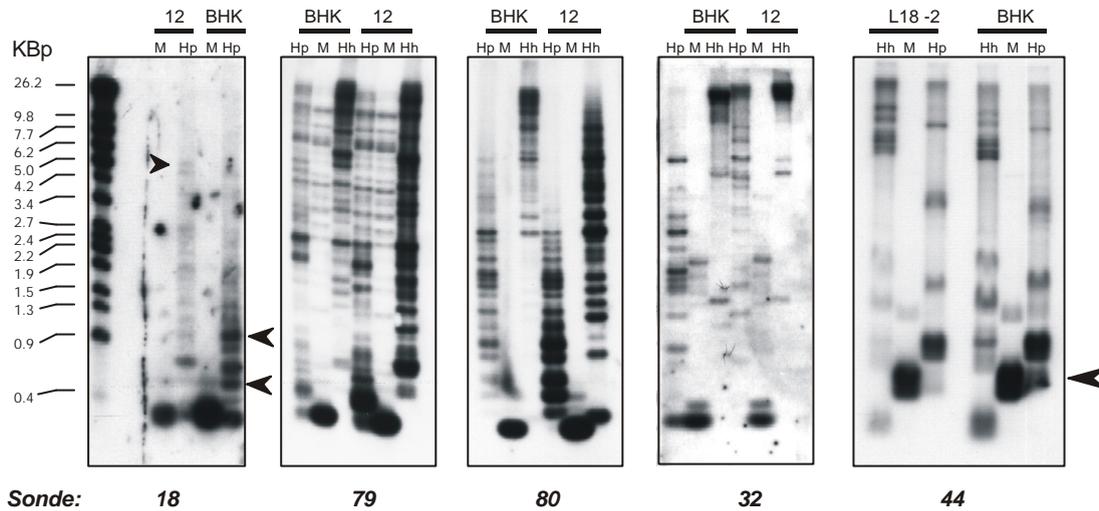
cDNA-Subklone, die von differentiell exprimierten Genen stammten, wurden zum Teil auch für die Analyse des Methylierungsstatus in diesen Genen verwendet. Ein Unterschied zwischen der parentalen BHK21 Linie und den λ -transgenen Linien konnte jedoch bei keinem Differenzklon gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings fehlte den für die Methylierungsstudien verwendeten cDNA-Fragmenten der Promotorbereich der klonierten Gene, was für eine funktionelle Analyse notwendig gewesen wäre.

2.2.2 Bakteriophage λ -transgene BHK21 Zelllinien zeigen Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern

Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer DNA-Segmente wurden wie bereits beschrieben mit Hilfe der MS-RDA aus dem Hamstergenom der experimentellen BHK21 Linien isoliert. Insgesamt wurden sieben verschiedene λ -transgene BHK21 Linien ($\lambda 6$, $\lambda 7$, $\lambda 10$, $\lambda 12$, $\lambda 18-2$, $\lambda 27$) analysiert. Jedoch in nur drei dieser Zelllinien ($\lambda 6$, $\lambda 12$, $\lambda 18$) konnten Veränderungen der zellulären DNA-Methylierung gefunden werden. Für die Vorselektion der nach dem zweiten MS-RDA Zyklus klonierten Anreicherungsprodukte war jedoch die Entwicklung eines neuen Screening-Verfahrens notwendig. Je nach analysierter λ -transgener Hamsterzelllinie enthielt das Gemisch der Anreicherungsprodukte nur bis maximal 3% positiver Differenzklone, die in der Southern-Blot Analyse der Methylierungsmuster einen Unterschied zwischen der parentalen und der transgenen BHK21 Linie zeigten. Daher wurden je 198 Klone wie bereits für das Selektionsverfahren bei der cDNA Subtraktion in Arrays auf positiv geladene Nylonmembranen aufgebracht. Die Membranen wurden dann entweder gegen ^{32}P -markierte Amplicons vom *Tester* oder vom *Driver* hybridisiert (zur Durchführung siehe auch Methodenteil). Klone, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von differentiell methylierten DNA-Sequenzen stammten, wiesen nur auf einer der beiden Membranen ein Signal auf oder auf einer der beiden Membranen konnte ein sichtbar stärkeres Signal nachgewiesen werden. Negative Klone, die von Sequenzen stammten, deren Methylierung an HpaII-Spaltstellen im Genom des *Testers* und *Drivers* identisch war, zeigten auf beiden Membranen gleichermaßen ein Signal. Die Daten dieser Selektionen wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt. Auf diese Weise wurden DNA-Segmente isoliert, die in Southern-Blot Analysen genomischer DNA Unterschiede in der Methylierung der λ -transgenen und normalen BHK21 Zellen aufwiesen (Abb. 6). In der transgenen Zelllinie $\lambda 12$ konnten vier zumeist repetitive DNA-Segmente nachgewiesen werden, die eine veränderte Methylierung aufwiesen. In $\lambda 18-2$ wurde mittels der MS-RDA eine Sequenz des endogenen IAP-Genoms isoliert. Der isolierte Bereich des IAP-Genoms zeigte in der transgenen Linie einen höheren Methylierungsgrad als in der parentalen BHK21 Zelllinie. In der transgenen Linie $\lambda 6$ wurden weitere DNA-Segmente mit geringen Methylierungsänderungen gefunden (Daten nicht gezeigt). Außer dem Differenzklon 44 aus dem MS-RDA Experiment mit $\lambda 18-2$ als *Driver* und BHK21 als *Tester* konnte keine der differentiell methylierten Sequenzen anhand einer Datenbankhomologie identifiziert werden.

Abb. 6: Die Bakteriophage Lambda DNA-transgenen Zelllinien 12 und 18-2 zeigen Veränderungen im zellulären Methylierungsmuster

Die in den Southern-Blot Analysen verwendeten ³²P-markierten Differenzklone wurden nach zwei Zyklen MS-RDA erhalten. Je 5µg genomische DNA aus den transgenen Zelllinien λ12 (12), λ18-2 (L18-2) oder BHK21 (BHK) wurden mit HpaII (Hp), MspI (M) oder HhaI (Hh) gespalten und in 1%-igen Agarosegelen über Nacht getrennt. Nach Transfer auf positiv geladene Nylonmembranen wurde die immobilisierte DNA gegen radioaktiv markierte individuelle Differenzklone hybridisiert. Schwarze Pfeile zeigen Unterschiede in den Fragmentmustern an.



2.3 Kontrolleexperimente

2.3.1 Kontrollen zur cDNA Subtraktionstechnik

Dem Prinzip der suppressiven subtraktiven Hybridisierung zufolge sollten spezifisch diejenigen Gene angereichert und kloniert werden können, die ausschließlich in der *Tester*-Zelllinie exprimiert wurden. Sequenzen, die sowohl in der cDNA Präparation des *Testers* und des *Drivers* vorkamen, wurden im Verlauf der cDNA Subtraktionsprozedur eliminiert. Anhand bekannter Sequenzen, die entweder in beiden Zelllinien exprimiert wurden (z.B. β-Actin) oder exogen der cDNA Präparation des *Testers* zugesetzter Zielsequenzen konnte die Effizienz der cDNA Subtraktion eines jeden Experimentes überprüft werden. Als Zielsequenz wurde die RsaI gesplattene DNA des Bakteriophagen φX174 verwendet. Muskel-mRNA (von Clontech geliefert) wurde wie die experimentelle mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in zwei Portionen aufgeteilt. Diese wurden nach Zugabe von ca. 200 ng der φX174-DNA zu nur einer Portion (*Tester*) der cDNA Subtraktion unterzogen. PCR Produkte der Kontrollproben und der experimentellen Proben wurden anschließend zusammen mit den nicht subtrahierten Kontrollen (-) in Agarosegelen elektrophoretisch getrennt (Abb. 7a). Bei der nicht subtrahierten Kontrolle wurden statistisch alle cDNA-Fragmente an beide Adapter

ligasiert und konnten somit exponentiell mittels PCR amplifiziert werden. Während die nicht subtrahierte Kontrollprobe (Spur 5, Abb. 7a) einen cDNA-„Schmier“ aufwies, konnten in der subtrahierten Kontrolle lediglich die Zielfragmente von ϕ X174 sichtbar gemacht werden. Zum Vergleich wurde eine bereits vom Hersteller mitgelieferte Fragmentkontrolle (Spur 7) aufgetragen. Das Gel, das ebenfalls experimentelle Proben ohne bekannte Zielsequenzen trug, wurde anschließend in einem Southern-Blot Experiment gegen β -Actin hybridisiert (Abb. 7b). Da β -Actin sowohl im *Tester* als auch im *Driver* exprimiert wurde, kam es zu einer Abreicherung, die allerdings bei den experimentellen Proben (Vergleich von Spur 1 mit Spur 2 und Vergleich von Spur 3 mit 4) weniger effizient erfolgte als bei der vom Hersteller mitgelieferten Kontrolle (Vergleich von Spur 5 mit 6). Wenn die parallel zu den experimentellen Proben mituntersuchte Kontrollprobe eine ausreichende Anreicherung der Zielsequenz erkennen ließ und β -Actin bei den experimentellen Proben vermindert wurde, konnten die Differenzklone wie oben beschrieben weiterverwendet werden.

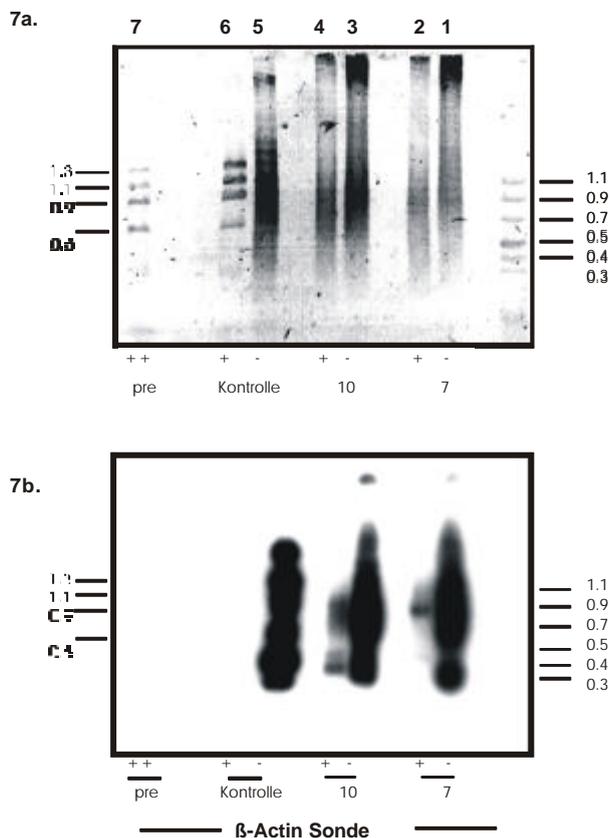


Abb. 7a und 7b: Effizienz der cDNA Subtraktion

Inverse Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels (Abb. 7a). Southern-Blot-Analyse mit β -Actin als 32 P-markierter β -Actin Sonde (Abb. 7b). Anreicherungsprodukte nach einem Zyklus cDNA Subtraktion (+) und die nicht subtrahierten Proben (-) wurden in einem 1%-igen Agarosegel getrennt. Nach Subtraktion der cDNA Präparationen aus den transgenen BHK21 Zelllinien λ 7 (7) und λ 10 (10) mit der parentalen BHK21 Zelllinie konnte nur ein Produktschmier im Gel detektiert werden. Als Kontrolle wurde parallel eine cDNA Subtraktion mit Muskel mRNA durchgeführt (Kontrolle). Nach reverser Transkription dieser mRNA wurde die cDNA-Probe in zwei Portionen aufgeteilt. Nur einer Portion (*Tester*) wurden ca. 200 ng einer bekannten Ziel-DNA (ϕ X174-DNA mit RsaI gespalten) zugesetzt. Die zu erwartenden Anreicherungsprodukte der Kontroll cDNA Subtraktion sind in der von Hersteller des verwendeten cDNA Subtraktions Kit (Clontech) mitgelieferten präsubtrahierten Probe (++/ pre) zu erkennen (Abb. 7a). Weitere Erklärungen im Text.

2.3.2 Kontrolle der Expression in Einzelzellklonen von BHK21

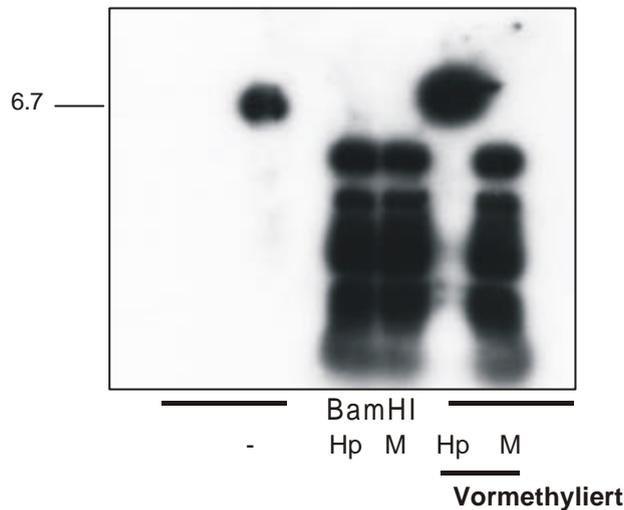
Da die Lambda DNA-transgenen BHK21 Zelllinien von transfizierten Einzelzellklonen abstammten, war es nicht auszuschließen, daß die beobachteten Expressionsveränderungen bereits in der normalen BHK21 Zellpopulation vorlagen. Durch Selektion und Anreicherung individueller transgener Zellklone mit einem von der durchschnittlichen BHK21 Population abweichenden Expressionsprofil konnte ebenfalls der Eindruck einer differentiellen Genexpression entstehen. Um ansatzweise die Möglichkeit auszuschließen, daß beobachtete Expressionsunterschiede zwischen transgenen und den parentalen BHK21 Zellen auf einem Selektionsartefakt beruhten, wurden individuelle Zellen der normalen BHK21 Population dreifach einzelzellkloniert. Anschließend wurde getestet, ob zwischen den 20 verwendeten Einzelzellklonen Unterschiede in der Expression derjenigen Gene vorlag, die in transgenen Zellen eine Expressionsveränderung gezeigt hatten. Jedoch konnte innerhalb der 20 Einzelzellklone für keinen der getesteten Differenzklone eine solche Veränderung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

2.3.3 Kontrolle der Effektivität der MS-RDA - Anreicherung bekannter Zielsequenzen

Mit Hilfe der ursprünglichen repräsentativen Differenzanalyse (RDA) können DNA-Segmente, die nur im Genom der *Tester*-Zelllinie vorhanden sind, jedoch nicht im *Driver*, selektiv amplifiziert und kloniert werden. Um mittels der MS-RDA DNA-Bereiche isolieren und klonieren zu können, die in beiden zu vergleichenden Zelllinien vorhanden waren und sich nur durch ihren Methylierungsstatus voneinander unterschieden, war die Anwendung einer molekularen Vorselektion erforderlich. Die HpaII-Spaltfragmente wurden dazu an universelle Adapter ligasiert und durch PCR amplifiziert. Die Bedingungen während dieser „Amplicon-PCR“ wurden so gewählt, daß nur kleine Spaltfragmente, die von gering methylierten DNA-Segmenten stammten, vermehrt werden konnten. Lag im *Tester* in einem bestimmten DNA-Bereich eine geringere Methylierung als im *Driver* vor, so fehlten diese Sequenzen im Amplicon des *Drivers*, wurden jedoch im Amplicon des *Testers* stark amplifiziert. Im weiteren Verlauf der MS-RDA wurden diese nur im *Tester*-Amplicon existierenden Sequenzen weiter angereichert und konnten so kloniert werden (siehe auch Abb. 1 im Methodenteil). Um die molekulare Wirkungsweise der MS-RDA überprüfen zu können, wurden den unbehandelten genomischen DNA-Proben daher bekannte Ziel-DNAs zugesetzt, die nach Durchführung der MS-RDA nachgewiesen werden konnten. Das linearisierte 6,7 kbp große pN3-Plasmid (siehe Methodenteil) wurde dazu an HpaII-Erkennungstellen vormethyliert und die vollständige Methylierung mit Hilfe der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease HpaII überprüft (Abb. 8a).

Abb. 8a: M-HpaII Methylierung des pN3-Plasmides

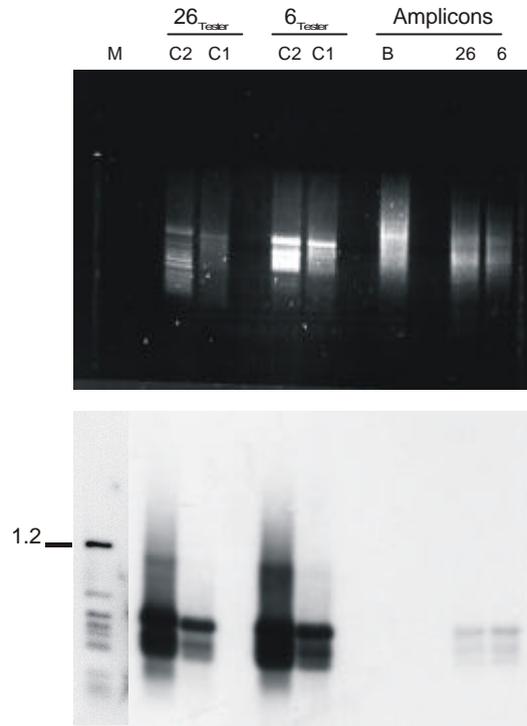
Kontrolle der vollständigen Methylierung der HpaII-Erkennungsstellen (siehe Methodenteil) des mit BamHI linearisierten pN3-Plasmides. Vormethyliertes oder unmethyliertes pN3-Plasmid wurde mit HpaII (Hp) oder MspI (M) gespalten. Je 500 pg der Spaltfragmente wurden elektrophoretisch in einem 1%-igen Agarosegel getrennt. Nach Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde die immobilisierte DNA gegen das 32 P-markierte pN3-Plasmid hybridisiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich noch das BamHI-gespaltene pN3-Plasmid aufgetragen (6,7 kBp).



Die Southern-Blot-Analyse der elektrophoretisch getrennten Spaltfragmente zeigt mit pN3 als radioaktiver Sonde eine vollständige Vormethylierung. Die MspI- und HpaII-Spaltmuster des unmethylierten linearisierten Plasmides waren identisch, während HpaII das vormethylierte Plasmid nicht spalten konnte. Der genomischen DNA des *Testers* wurden zwei Genomäquivalente des unmethylierten linearisierten Plasmides zugesetzt und zwei Genomäquivalente des vormethylierten Plasmides zum *Driver* gegeben. Nach Durchführung der MS-RDA wurden je 500 ng der Amplicon-Proben des *Testers* (hier exemplarisch von den transgenen BHK21 Zelllinien $\lambda 6$ (6) und $\lambda 26$ (26) in Abb. 8b) und des *Drivers* BHK21 (B) zusammen mit gleichen Mengen der Produkte nach einem (C1) und zwei Zyklen (C2) MS-RDA elektrophoretisch getrennt. In einer Southern-Blot Analyse erfolgte der radioaktive Nachweis der Anreicherung der unmethylierten exogenen Zielsequenzen des *Testers* (pN3). In Abbildung 8b kann man erkennen, daß bereits in den *Tester*-Amplicons Plasmid-spezifische Signale nachzuweisen waren, während im *Driver*-Amplicon kein Signal erkennbar war. In den beiden Zyklen der MS-RDA Prozedur (C1 und C2) kam es anschließend zu einer starken Anreicherung einiger der HpaII-Plasmidfragmente (Abb. 8b). Erst nach Überprüfung dieser Anreicherung wurden die Produkte aus dem zweiten MS-RDA Zyklus weiterverwendet. Bei unzureichender Anreicherung der Plasmid-Zielfragmente wurden die Proben verworfen.

Abb. 8b: Anreicherung des pN3 Zielmoleküls durch MS-RDA

Amplicons der transgenen *Tester*zelllinien $\lambda 6$ (6) und $\lambda 26$ (26) sowie der *Driver*zelllinie BHK21 (B) wurden zusammen mit Anreicherungsprodukten nach einem (C1) und nach zwei Zyklen (C2) MS-RDA in einem 1%-igen Agarosegel getrennt (oberer Teil der Abbildung). Nach Transfer auf eine GeneScreen Plus Membran wurden die immobilisierten DNA-Fragmente gegen das ^{32}P -markierte pN3-Plasmid hybridisiert (unterer Teil der Abbildung). Weitere Erklärung im Text.



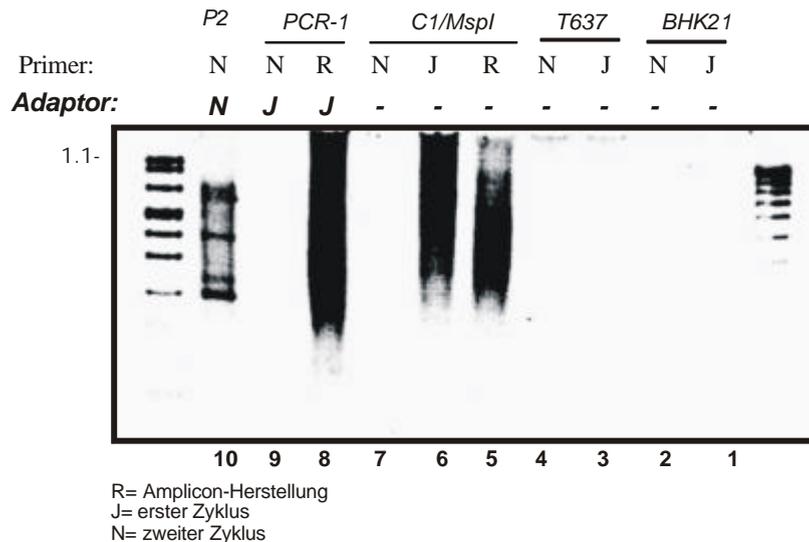
2.3.4 Kontrolle der Adapterabspaltung bei der MS-RDA

Für jeden Zyklus der MS-RDA wurde an die Spalt- oder PCR-Fragmente ein neuer Adapter ligasiert. Dadurch sollte gewährleistet werden, daß exponentiell durch PCR amplifizierte Fragmente spezifisch im Verlauf der subtraktiven Hybridisierung selektiert worden waren. Wie effektiv die Abspaltung der Adapteren beim Übergang in einen weiteren MS-RDA Zyklus wirklich war und in welchem Maße es bei den PCR-Reaktionen zu unspezifischen Produkten kam, wurde in dem in Abbildung 9 gezeigten Experiment überprüft. Zunächst wurde mit den Oligonukleotid-Primern für den ersten (J) und zweiten (N) Zyklus eine PCR mit 500 ng HpaII-gespaltener DNA von BHK21 und T637 als Matrize durchgeführt. Die Abwesenheit sichtbarer Amplifikationsprodukte in den Spuren 1 bis 4 zeigte, daß es im Hamstergenom keine unspezifischen Bindungstellen für die verwendeten Primer gab. Aus einem ersten Zyklus MS-RDA mit BHK21 als *Tester* und T637 als *Driver* wurde das Produkt des ersten Zyklus mit MspI gespalten, um den J-Adapter des ersten Zyklusses zu entfernen. Nach Gelfiltration der Spaltprodukte wurden Aliquots des Adapter-freien Eluats für eine PCR verwendet, in der die Oligonukleotide (siehe Methodenteil) R, J

und N als Primer verwendet wurden (Spuren 5,6,7). Mit den R- und J-Primern, die bereits im ersten Zyklus und bei der Herstellung der Amplicons verwendet wurden, kam es zur Amplifikation der im Eluat erhaltenen Fragmente.

Abb. 9: Kontrolle der Adapterabspaltung bei der MS-RDA

Inverse Darstellung eines Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels. Je 10µl-Aliquots von insgesamt 400µl PCR-Volumen je Ansatz wurden elektrophoretisch getrennt. Die Template-DNAs trugen entweder keine Adapter (-) oder den jeweils in dem entsprechenden MS-RDA Zyklus verwendeten Adapter (hier N oder J). Als Primer dienten die für Ampliconherstellung verwendeten R-Primer oder die im ersten (J) und zweiten (N) MS-RDA Zyklus verwendeten Primer. Weitere Erklärungen im Text.



Diese Amplifikation zeigte, daß die Adapterabspaltung nur unvollständig erfolgt war. Allerdings konnten mit dem N-Primer, dessen Adapter N noch nicht verwendet wurde, keine PCR-Produkte nachgewiesen werden (Spur 7). Die Notwendigkeit der Verwendung neuer Adapter für jeden neuen MS-RDA-Zyklus wurde durch dieses Experiment gezeigt. Als Amplifikationskontrolle dienten die Produkte aus einem zweiten Zyklus MS-RDA mit BHK21 als *Tester* und T637 als *Driver* (Spur 10).

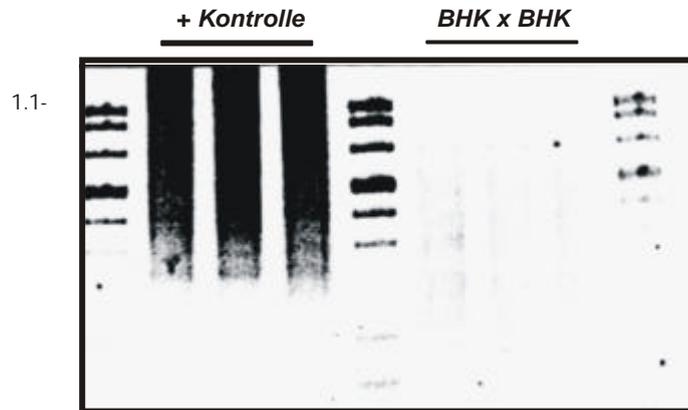
2.3.5 Kontrolle der Sensitivität der MS-RDA

Allen RDA-ähnlichen Techniken ist gemein, daß mit ihrer Hilfe Fragmentungleichheiten selektiv angereichert und Gleichheiten zwischen *Tester* und *Driver* eliminiert werden. In welchem Maße es besonders bei der MS-RDA zu unspezifischen Produkten kommen konnte, sollte durch den Vergleich zweier identischer BHK21-DNA-Proben überprüft werden. Dazu wurde eine BHK21 DNA-Probe in zwei Portionen aufgeteilt und eine Portion als *Tester* und die andere als *Driver* während der MS-RDA verwendet. Nach einem Zyklus selektiver Hybrisierung und PCR konnten keine spezifischen Anreicherungsprodukte nachgewiesen werden (Abb. 10), während die Positivkontrolle (+-Kontrolle, T637 verglichen mit BHK21)

nach gleicher Anzahl an PCR-Zyklen starke Produktsignale im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel erkennen ließ.

Abb. 10: Kontrolle der Sensitivität der MS-RDA Prozedur

Inverse Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels. Anreicherungsprodukte nach einem Zyklus MS-RDA mit zwei genomischen BHK21-Proben (BHKxBHK) oder T637 und BHK21 (+Kontrolle).

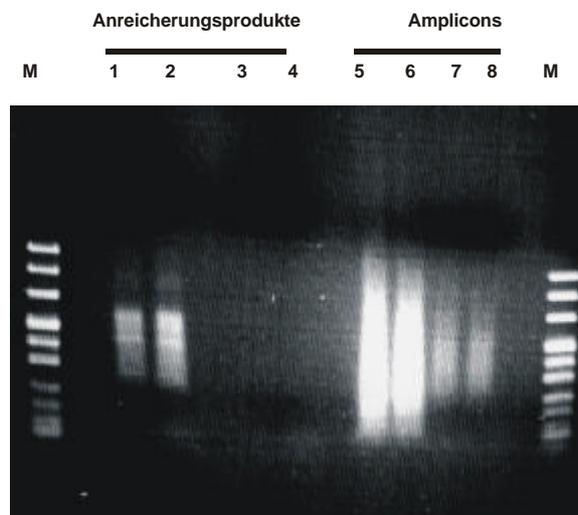


2.3.6 MS-RDA mit BHK21 Einzelzellklonen

Die Selektion transgener BHK21 Zelllinien aus individuellen BHK21 Einzelzellklonen konnte ebenfalls zur Selektion von Zellen geführt haben, deren zellulärer Methylierungsphänotyp nicht dem der durchschnittlichen BHK21 Population entsprach. Es mußte daher, soweit es experimentelle Ansätze zuließen, überprüft werden, ob Einzelzellklone von BHK21 per se Differenzen im Methylierungsstatus zellulärer DNA-Segmente aufwiesen. Einerseits konnte dazu in mehreren BHK21 Einzelzellklonen die Methylierung von DNA-Segmenten untersucht werden, deren Methylierungsstatus in Bakteriophage Lambda DNA-transgenen BHK21 Zellen verändert war (siehe dazu nächsten Abschnitt). Andererseits erschien es erforderlich individuelle BHK21 Klone mittels MS-RDA auf Differenzen im Methylierungsmuster untereinander zu vergleichen. Die Ergebnisse zu diesem Experiment, bei dem 20 verschiedene BHK21 Einzelzellklone verwendet wurden, ist in Abbildung 11 dargestellt.

Abb. 11: MS-RDA Kontrollexperiment mit BHK21 Einzelzellklonen

Die DNA von je 9 verschiedenen BHK21 Einzelzellklonen (Klon 2 bis 10 und 11 bis 19) wurde gesammelt und in zwei verschiedenen MS-RDA Experimenten mit den Einzelzellklonen 1 und 20 (beide als *Driver* eingesetzt) als *Tester* eingesetzt. Die gesammelten *Tester*-DNAs wurden in Kontrollexperimenten mit *MspI* gespalten und mittels MS-RDA mit *HpaII* gespaltenen *Driver*-DNA eingesetzt. Die nach *MspI*-Spaltung erhaltenen Amplicons der *Tester*-Proben (Spur 5 und 6) wiesen eine höhere Produktausbeute auf als die *HpaII* generierten Amplicons (Spuren 7 und 8). Anreicherungsprodukte konnten nach einem Zyklus MS-RDA beim Vergleich der *HpaII*-Amplicons (Klone 11 bis 19 verglichen mit Klon 20 und Klone 2 bis 10 verglichen mit Klon 1) nicht nachgewiesen werden (Spur 3 und 4). Im Kontrollexperiment mit *MspI* generierten *Tester*-Amplicons konnte in zwei unabhängigen Experimenten ein vergleichbares Fragmentmuster der gelektrophoretisch getrennten PCR-Produkte nachgewiesen werden (Spuren 1 und 2).



Die DNA von je 9 verschiedenen BHK21 Einzelzellklonen (Klon 2 bis 10 und Klon 11-19) wurde dazu gesammelt und in zwei verschiedenen MS-RDA Ansätzen mit Klon 1 und 20 als *Tester* eingesetzt. Nach dem ersten Zyklus MS-RDA konnten keine PCR-Produkte

nachgewiesen werden (Spuren 3 und 4). Als Positivkontrolle wurde die DNA der *Tester*-BHK21 Klone mit *MspI* gespalten. Auf diese Weise sollte es mittels MS-RDA zur Anreicherung von Spaltfragmenten kommen, da so selbst hochmethylierte DNA-Segmente in kleinere amplifizierbare Fragmente gespalten wurden. Nach nur wenigen PCR Zyklen konnten spezifische Produkte im Agarosegel sichtbar gemacht werden (Spuren 1 und 2 in Abb. 11). Diese Daten unterstützten die Annahme, daß Unterschiede im Methylierungsmuster in transgenen BHK21 Zelllinien tatsächlich auf die Integration der fremden DNA zurückgeführt werden konnte.

2.3.7 Einzelzellklone von BHK21 zeigen keine Unterschiede im Methylierungsstatus zellulärer DNA-Segmente, die in Lambda DNA-transgenen BHK21 Zellen differenziell methyliert waren

Bereits in früheren Arbeiten aus unserem Labor konnte gezeigt werden, daß DNA-Segmente, die in λ DNA-transgenen BHK21 Zellen eine veränderte Methylierung aufwiesen, in mehr als 60 individuellen BHK21 Zellklonen keine Methylierungsänderung vorlag (Remus et al., 1999).

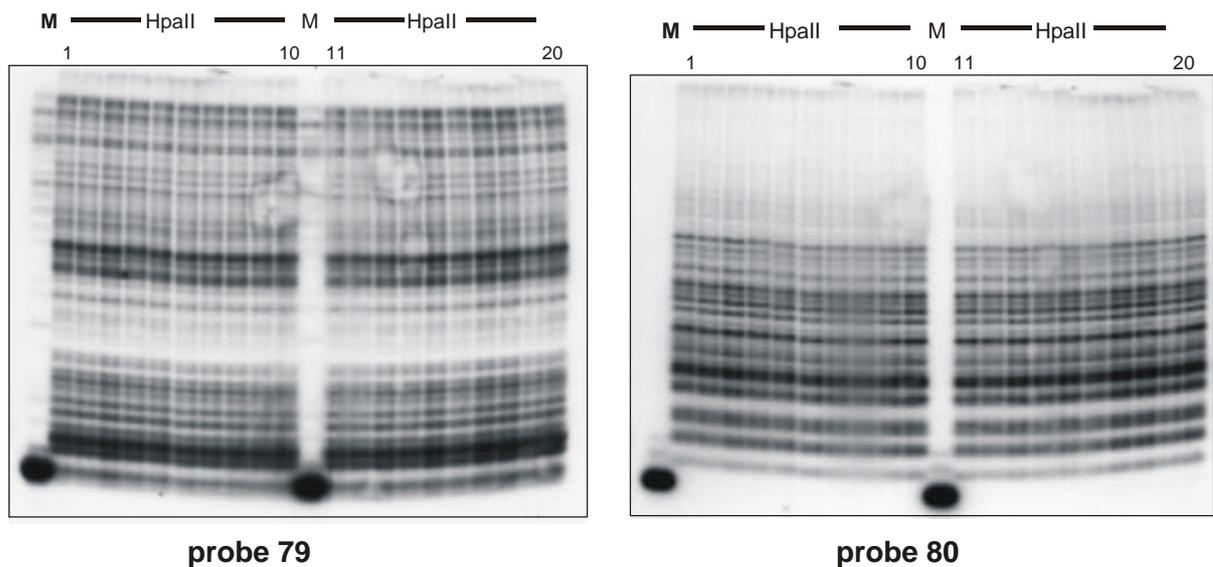


Abb. 12: Methylierung der Differenzklone in individuellen BHK21 Einzelzellklonen

Genomische DNA (5 μ g) aus 20 verschiedenen dreifach einzelzellklonierten BHK21 Linien wurde mit *HpaII* oder *MspI* (M) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die Southern-Blots wurden gegen ³²P-markierte DNA-Segmente, die in λ -transgenen BHK21 Zellen eine differenzielle Methylierung zeigten, hybridisiert. Die beiden exemplarisch dargestellten Hybridisierungen mit den Differenzklonen 79 und 80 wurden in dem MS-RDA Experiment mit λ 12 als *Driver* isoliert (vergleiche auch Fragmentmuster in Abbildung 6)

Diese notwendige Kontrolle einer möglichen natürlichen Variation von Methylierungsmustern in Einzelzellklonen von BHK21 wurde auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Keine der in λ -transgenen Zelllinien differentiell methylierten DNA-Bereiche zeigte bei 20 BHK21 Einzelzellklonen eine Abweichung von der durchschnittlichen Methylierung der BHK21 Population. Die Ergebnisse aus den Southern-Blot Analysen mit den MS-RDA Klonen 79 und 80, die in der λ -transgenen Zelllinie 12 eine Methylierungsänderung zeigten (vergleiche auch Abb. 6), wurden exemplarisch dargestellt.

2.4 Entwicklung der Methylierungs-sensitiven Amplicon-Subtraktion (MS-AS): Eine neue Strategie zur Isolierung differentiell methylierter DNA-Fragmente aus komplexen Genomen

Der Informationsgehalt des Säugetiergenoms wird durch die epigenetisch vererbare Modifikation der DNA-Methylierung stark erhöht. Die Methylgruppen können Einfluß auf die Interaktionen zwischen Proteinen und DNA nehmen, indem sie entweder die Proteinbindung an die DNA verhindern oder erleichtern. Die kovalente Modifikation der DNA-Methylierung hat besonders in Säugetiergenomen Einfluß auf eine Reihe wichtiger biologischer Prozesse wie z.B. Genexpression, Zelldifferenzierung, Tumorgenese, parentales Imprinting, Schutz vor fremder DNA, X-Chromosom Inaktivierung.

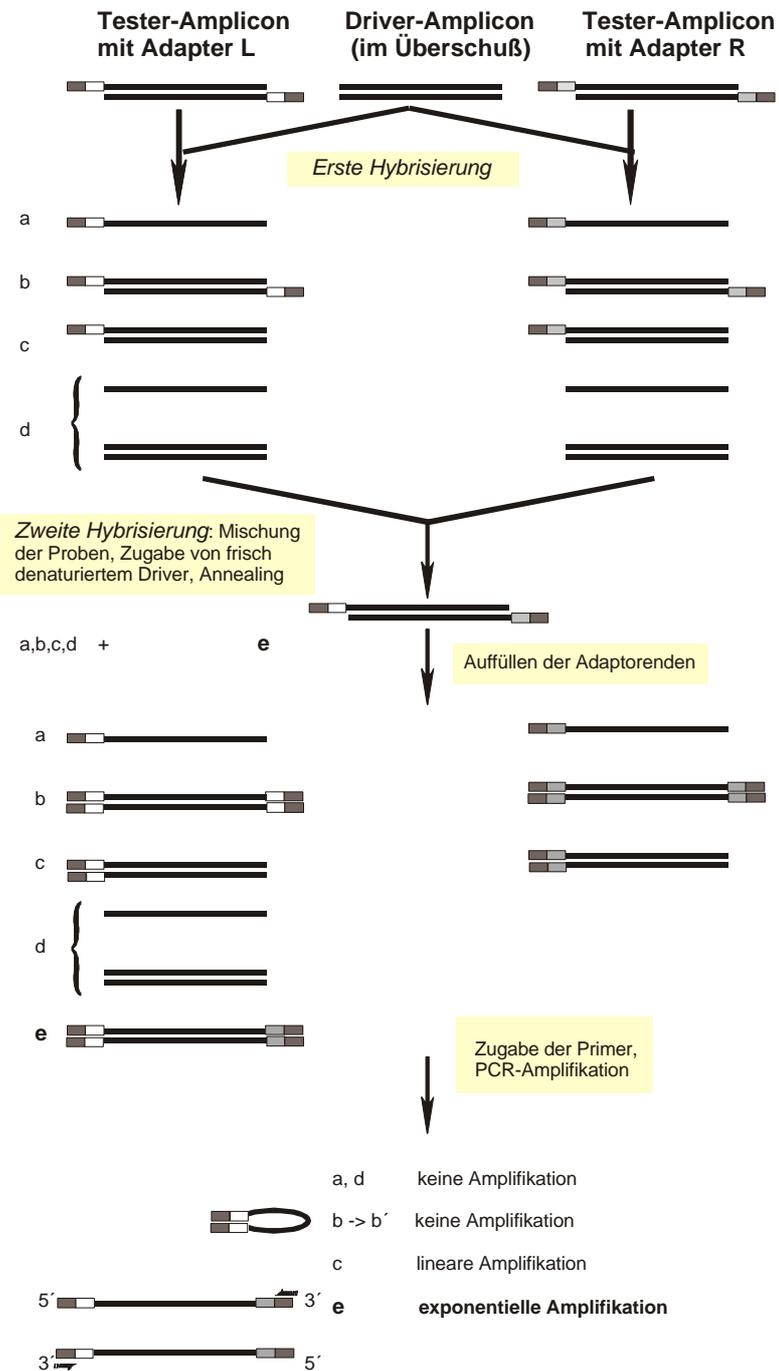
Die Entwicklung neuer Techniken, die zur Isolierung differentiell methylierter DNA-Bereiche aus komplexen Genomen führen, wird hauptsächlich durch das Bestreben zur Aufklärung dieser Prozesse motiviert.

Durch die Anwendung der MS-RDA konnten eine Reihe von DNA-Fragmenten angereichert und kloniert werden, die in λ DNA-transgenen oder Ad12-transformierten BHK21 Zellen eine gegenüber der parental Zelllinie veränderte Methylierung zeigten. Jedoch handelte es sich bei den Differenzklonen um repetitive Sequenzen, die nur in Ausnahmefällen anhand einer Homologie zu bekannten Genen identifiziert werden konnten. Repetitive Sequenzen, die keinen Methylierungsunterschied zwischen *Tester* und *Driver* aufwiesen, hatten ebenfalls einen selektiven Vorteil bei der subtraktiven Hybridisierung und infolge dessen auch bei anschließenden PCR-Reaktionen. Es war daher nicht verwunderlich, daß viele der negativen MS-RDA Klone ohne Methylierungsunterschied repetitive Sequenzen im Genom darstellten. Differentiell methylierte DNA-Segmente, die nur selten im Genom vertreten waren, konnten nur im Verlaufe mehrerer aufeinanderfolgender Zyklen subtraktiver Hybridisierung in ausreichendem Maße angereichert werden. Eine Abspaltung der Adapter mit MspI war erforderlich, um die Spezifität der einzelnen Subtraktionsschritte zu erhöhen. Die Adapterabspaltung hatte allerdings auch zur Folge, daß Fragmente der

Ampliconpräsentationen in kleinere Fragmente gespalten wurden, da alle PCR-Produkte unmethyliert waren. Die Reduktion der Fragmentgröße auf unter 200 Basenpaare konnte im weiteren Verlauf der MS-RDA verhindern, daß diese ursprünglich differentiell methylierten Fragmente angereichert und kloniert werden konnten. Der Anteil positiver Klone nach zwei Zyklen MS-RDA konnte sich dadurch ausgehend vom Amplicon drastisch verringern.

Es wurde daher untersucht, daß eine Methode, die eine Angleichung der Fragmenthäufigkeiten im Amplicon ermöglichen würde und nur einen Zyklus subtraktiver Hybridisierung benötigte, die oben beschriebenen Nachteile der MS-RDA abschwächen könnte. Bei der in diesem Kapitel beschriebenen *Methylierungs-sensitiven Amplicon Subtraktion (MS-AS)* wurde der eigentlich für die Subtraktion von cDNA genutzte Normalisierungsschritt zusammen mit einem suppressiven PCR-Schritt (Siebert et al., 1995) auf genomische DNA angewendet. Genomische DNA vom *Tester* und vom *Driver* wurde dazu mit HpaII gespalten. Die Spaltfragmente wurden an universelle Adapter ligasiert und wie für die MS-RDA beschrieben mittels PCR amplifiziert. Unterschiedliche Methylierung der genomischen DNA des *Testers* und des *Drivers* hatte eine unterschiedliche Fragmentpräsentation in den Amplicons zur Folge. Durch Spaltung der Amplicon-DNA mit RsaI wurden die Adapter entfernt und DNA-Fragmente mit glatten Enden geschaffen. Im folgenden Schritt wurde die RsaI gespaltene Amplicon DNA des *Testers* in zwei Portionen aufgeteilt und jede Portion an unterschiedliche Adapter (R oder L) ligasiert (genaue Durchführung siehe auch Methodenteil). Die beiden Adapter tragenden *Testeramplicons* wurden anschließend getrennt mit einem Überschuß an *Driver Amplicon* (ohne Adapter) gemischt, die Mischung denaturiert und bei 68°C eine erste Hybridisierung durchgeführt (siehe Abb. 13).

Abb. 13: Prinzip der Methylierungs-sensitiven Amplicon-Subtraktion



Eine Normalisierung oder annähernde Angleichung der Fragmenthäufigkeiten im Amplicon erfolgt durch Bildung der Homo-Hybrid-DNA Moleküle (Abb. 13, b). Diese erfolgt aufgrund der Kinetik zweiter Ordnung dieser Reaktion für repetitive Sequenzen schneller. Darüber hinaus findet hier bereits eine Anreicherung von DNA-Fragmenten statt,

die nur im *Tester*-Amplicon vorkommen (a). Gemeinsame Sequenzen des *Testers* und des *Drivers* bilden Hetero-Hybride (c).

In der zweiten Hybridisierung werden die beiden Proben aus der ersten Hybridisierung gemischt und frisch denaturierte Amplicon-DNA des *Drivers* zugegeben. Nur die verbliebenen normalisierten und subtrahierten Einzelstrang-DNAs (a) sind zu einem Reannealing befähigt und bilden (b)-, (c)- und neue (e)-Hybride. Die neugebildeten (e)-Hybride (siehe Abb. 13) tragen unterschiedliche Adaptersequenzen an beiden Molekülen, die von den beiden *Tester*portionen stammen. Nur diese DNA-Moleküle können mittels PCR exponentiell amplifiziert werden. Typ (b)-Moleküle tragen lange invertierte Wiederholungssequenzen an den Enden, die eine stabile Sekundärstruktur nach jedem Denaturierungs-Renaturierungs-PCR-Schritt bilden können. Die daraus resultierenden „panhandle-like“-Strukturen (b') können nicht als Template für eine exponentielle PCR dienen, da das intramolekulare Reannealing der längeren Adaptersequenzen bevorzugt wird und viel stabiler ist als das intermolekulare Annealing der Primer (Chenchik et al., 1996).

Darin besteht der suppressive PCR-Effekt.

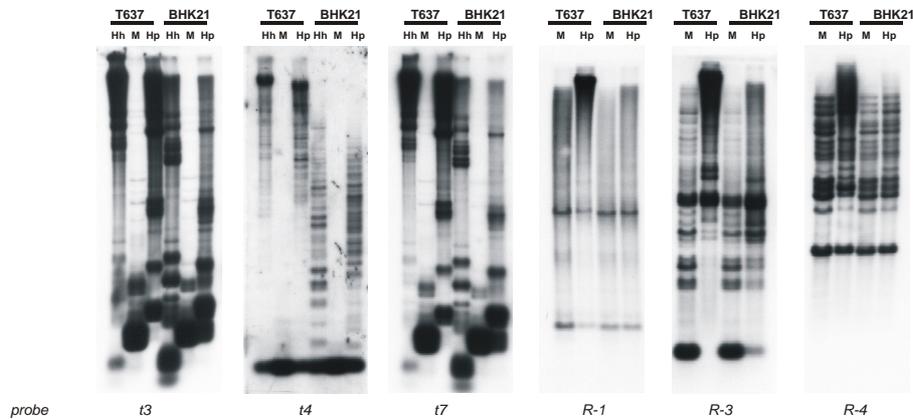
2.4.1 MS-AS-Analyse Ad12-transformierter und λ DNA-transgener BHK21 Zellen

Um einen Vergleich mit der MS-RDA Methode zu schaffen, wurde die Ad12-transformierte BHK21 Zelllinie T637 und die transgene Zelllinie λ 12 mit der MS-AS Methode analysiert. Für beide Zelllinien waren bereits Methylierungsänderungen beschrieben worden (s.o.). Dabei wurde die parentale BHK21 Zelllinie in beiden Experimenten als *Tester* eingesetzt.

Nach einem Zyklus MS-AS konnten sechs differentiell methylierte DNA-Fragmente isoliert werden, die in T637 einen höheren Methylierungsgrad aufwiesen als in normalen BHK21 Zellen (Abb. 14). Mit der Phage λ DNA-transgenen BHK21 Zelllinie 12 als *Driver* konnten in einem ersten Ansatz vier differentiell methylierte DNA-Segmente isoliert werden. Acht von insgesamt 11 unterschiedlich methylierten DNA-Segmenten aus beiden Experimenten konnten anhand einer Datenbankhomologie zu bekannten Genen identifiziert werden (Tab. 4). Ein besonderes Charakteristikum der Differenzklone war ihr hoher CG-Gehalt, der meist über 50% lag. Der durchschnittliche CG-Gehalt des BHK21 Hamstergenoms lag bei 40%. Fast alle Differenzklone wiesen noch intakte Erkennungsstellen für HpaII (MspI) auf. Diese DNA-Segmente wären bei Anwendung der MS-RDA Prozedur in mehrere kleine Fragmente mit Größen unter 100 Basenpaaren gespalten worden. Eine Anreicherung solcher kleiner Fragmente konnte in keinem MS-RDA Experiment beobachtet werden.

Abb.14: Isolierung differentiell methylierter DNA-Fragmente durch MS-AS

Genomische DNA (10µg) aus T637 und normalen BHK21 Zellen wurde mit HpaII (Hp), HhaI (Hh) oder MspI (M) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die DNA auf den Southern-Blots wurde gegen ³²P-markierte DNA-Segmente, die nach einem Zyklus MS-AS isoliert wurden, hybridisiert



Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der MS-AS Analyse von T637 und Lambda 12

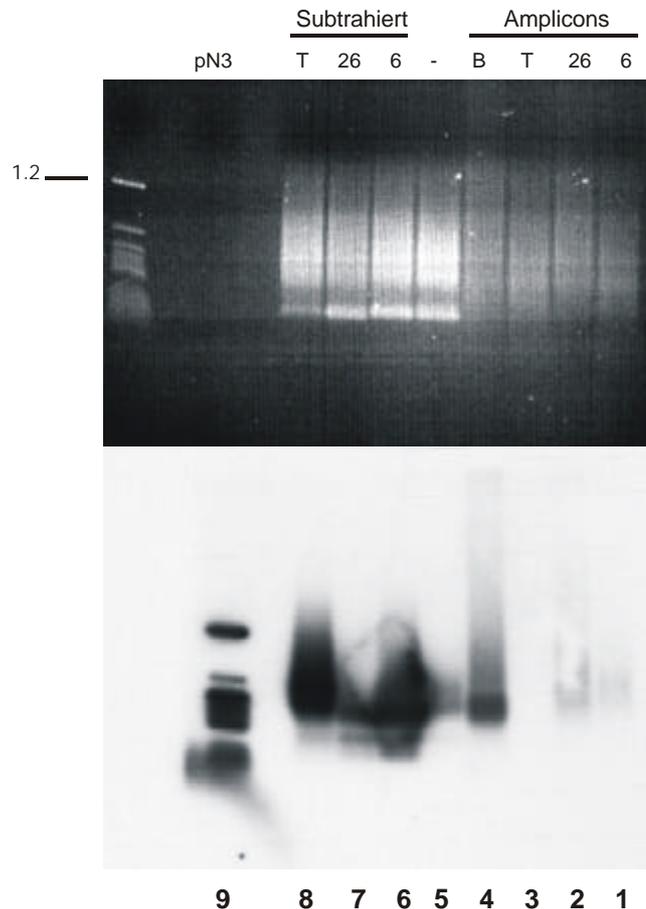
Zelllinie	Klon	Datenbank Homologie	Übereinstimmung
T637	t3	IAP	455/462 (98%)
	t4	Maus 45S prä rRNA Gen	123/125 (98%)
	t7	IAP	268/274 (98%)
	t9	Ratte Thymosin beta-4 mRNA	196/ 207 (95%)
	R-1	Keine	Keine
	R-3	Mesocricetus auratus Klon e23 retrovirus-ähnliches pol Protein mRNA	99/107 (93%)
	R-4	Humaner Hamster-Hybrid Cosmid Klon 38a13	475/542 (88%)
Lambda 12	a6	IAP	214/222 (88%)
	a73	Keine	Keine
	a83	Ratte Thymosin beta-4 mRNA	172/181 (95%)
	a91	keine	Keine

Um die Effizienz des MS-AS-Protokolls bei der Anreicherung differentiell methylierter DNA-Fragmente zu untersuchen, wurden den unbehandelten genomischen DNA-Proben exogene Zielmoleküle beigefügt. Die Anreicherung des pN3-Plasmides, das jeweils in unmethyliertem Zustand dem *Tester* und in methyliertem Zustand dem *Driver* zugefügt wurde, konnte in Southern-Blot Experimenten verfolgt werden (Abb. 15). Neben den Ampliconproben (Spur 1 bis 4) und den Anreicherungsprodukten (Spur 6, 7, 8) nach einem Zyklus MS-AS wurden auch die nicht subtrahierten Proben (Spur 5) gelelektrophoretisch getrennt. Im BHK21 *Tester*-Amplicon (Spur 4) war ein Plasmid-spezifisches Signal nachzuweisen, während in den *Driver*-Amplicons keine oder zum Teil nur sehr schwache Hybridisierungssignale zu erkennen waren. Ein Vergleich zwischen *Tester*-Amplicon und

den Anreicherungsprodukten zeigte, daß in mehreren Experimenten mit unterschiedlichen Zelllinien als *Driver* die pN3-Zielmoleküle unterschiedlich angereichert wurden. Eine Variation in der Anreicherung bekannter Zielmoleküle konnte bereits bei der MS-RDA-Prozedur beobachtet werden. Differentiell methylierte, zelluläre DNA-Segmente aus verschiedenen MS-AS-Experimenten wurden jedoch in allen untersuchten Fällen spezifisch durch die MS-AS-Prozedur angereichert (Daten nicht gezeigt).

Abb. 15: Anreicherung der pN3 Zielmoleküle durch MS-AS

In drei unabhängigen MS-AS-Experimenten mit BHK21 als *Tester* und den Zelllinien T637 (T), λ6 (6) und λ26 (26) als *Driver* wurde der genomischen *Tester*-DNA vor Spaltung mit HpaII 1 bis 2 Genomäquivalente des unmethylierten pN3-Plasmides zugesetzt (siehe auch Methodenteil). Eine gleiche Menge des M-HpaII vormethylierten Plasmides wurde den genomischen *Driver*-Proben beigemischt. Ampliconproben (Spuren 1 bis 4) sowie subtrahierte Proben (Spuren 6, 7, 8) nach einem MS-AS Zyklus und die nicht subtrahierte BHK21 *Tester*probe (Spur 5) wurden elektrophoretisch in einem 1%-igen Agarosegel getrennt. Nach Transfer auf eine GeneScreen Plus Membran wurde die DNA gegen das ³²P-markierte pN3-Zielmolekül hybridisiert. Bei der nicht subtrahierten BHK21 *Tester*probe wurden statistisch alle im *Tester*amplicon vorhandenen Fragmente mittels PCR amplifiziert (siehe auch Methodenteil)



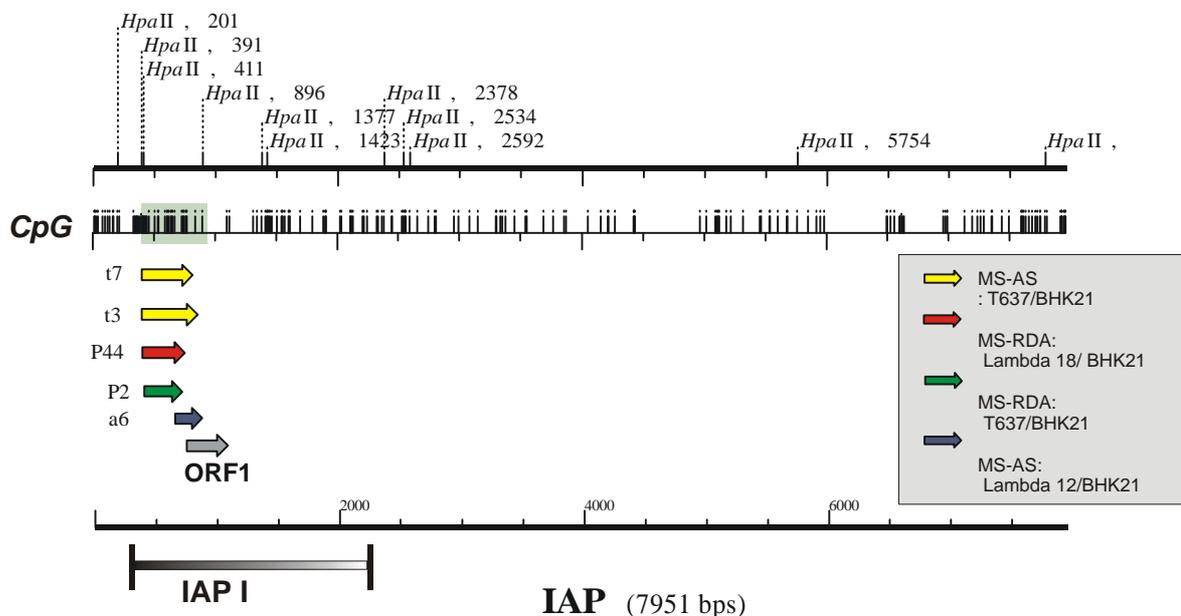
2.5 Intrazisternale-A-Partikel - Transposable Elemente in Säugetiergenomen

Die Aktivierung von Promotoren parasitärer Sequenzelemente (Transposons und endogene Retroviren) kann zu Fehlregulationen benachbarter zellulärer Gene und mittels replikativer Transposition dieser Elemente zu neuen Mutationen führen (Yoder et al., 1997).

Zu den aggressivsten parasitären Sequenzen im Maus- und Hamstergenom gehören die Intrazisternalen-A-Partikel, defekte retrovirale Sequenzen, die normalerweise transkriptionell inaktiv sind (Kuff und Lueders, 1988; Kazazian et al., 1998). Einige Arbeiten konnten zeigen, daß der inaktive Status der ca. 2000 IAP Elemente im Maus- und Hamstergenom durch Methylierung der LTR-Regionen kontrolliert wird (Kuff und Lueders, 1988). Demethylierung der LTR-Regionen von IAPs kann zur Aktivierung dieser Elemente in somatischen Geweben von Mausembryos führen (Walsh et al., 1998). Dabei erfolgt die Transposition durch reverse Transkription eines RNA-Intermediates (Heidmann und Heidmann, 1991).

Abb. 16: Position differentiell methylierter IAP Subklone im IAP-Genom

Schematische Darstellung eines IAP-Genoms (7951 Bp Größe) unter Angabe der HpaII-Erkennungsstellen sowie der Position methylierbarer 5'-CpG-3' Dinukleotide. Die Positionen verschiedener Differenzklone, die in MS-AS- oder MS-RDA-Experimenten mit verschiedenen Zelllinien isoliert wurden, sind durch farbige Pfeile gekennzeichnet. Alle differentiell methylierten Klone positionieren sich in einem Bereich mit hoher CpG-Dichte, der zum IAPI-Bereich des IAP-Genoms gehört. Alle Differenzklone knüpfen an das erste offene Leseraster (ORF) an, von dem aus die IAP-Transkription startet.



Vor diesem Hintergrund ist eine Betrachtung transposabler Elemente als kritische Faktoren bei der Bewertung transgener oder transformierter Systeme und bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen erforderlich. Interessanterweise stammen viele der mittels MS-RDA oder MS-AS isolierten differentiell methylierten DNA-Fragmente aus einer CpG-reichen Region (IAP I-Region) des IAP Genoms (siehe Abb. 16).

Der Bereich, aus dem diese Differenzklone isoliert wurden, schließt sich an die 5'-LTR Region an und überlappt zum Teil mit dem offenen Leseraster 1 (ORF1), von dem aus die Transkription der IAP Elemente startet. Der mehrfach klonierte Bereich des IAP-Genoms muß unmethyliert vorgelegen haben und möglicherweise von aktiven IAP-Elementen stammen. In der Tat konnte in λ DNA-transgenen und in BHK21 Zellen eine geringe IAP-Transkriptionsrate nachgewiesen werden (siehe auch Abb. 5b). Allerdings konnte keine Veränderung der Expressionsrate in λ DNA-transgenen Zellen beobachtet werden. Dennoch kann man nicht ausschließen, daß durch die Integration der exogen zugefügten fremden DNA (λ oder Ad12) IAP-Elemente im BHK21 Genom aktiviert worden sind. Die Transposition aktivierter IAPs zu anderen zellulären DNA-Bereichen könnte als Sekundärereignis zu Veränderungen in der Methylierung oder Expression dieser zellulären DNA-Bereiche geführt haben. Transposable Elemente im Genom könnten daher nicht nur als mögliche Zielsequenzen für Veränderungen durch die Integration fremder DNA betrachtet werden, sondern auch als Faktoren, die diese Veränderungen hervorrufen.

2.6 Veränderung im Methylierungsmuster zellulärer Gene in transgenen Mäusen

Durch Untersuchungen an Zellen in Zellkultur konnte gezeigt werden, daß sich nach der Integration der Fremd-DNA (Ad12-, Plasmid- und Lambda-DNA) in das Wirtsgenom Veränderungen im Methylierungs- und Expressionsmuster zellulärer DNA-Sequenzen ergeben können (Heller et al., 1995; Kämmer et al., 1997; Remus et al., 1999; Müller et al., 200X). Die Auswirkungen dieser Veränderungen blieben nicht auf das Chromosom beschränkt, in dem die Integration der fremden DNA stattgefunden hatte.

In der vorliegenden Dissertation und im Rahmen früherer Arbeiten (Diplomarbeit von Knut Müller, 1997) wurden transgene Mäuse daraufhin untersucht, ob die Integration fremder DNA in das Mausgenom zu Methylierungsänderungen in zellulären DNA-Bereichen führen konnte. Das Einbringen fremder DNA in das Mausgenom durch Mikroinjektion in einen der Vorkerne der befruchteten Eizelle wurde bereits 1980 von Gordon und Mitarbeitern beschrieben (Gordon et al., 1980). Seitdem findet diese Technik ohne signifikante Änderungen weltweit Anwendung. Sehr häufig integriert die injizierte Fremd-DNA in mehreren Kopien in einer kolinearen Anordnung an einer zufälligen Stelle des Wirtsgenoms. Identische Eigenschaften des Integrationsvorganges konnten auch bei Säugerzellen in Zellkultur nachgewiesen werden (Bishop u. Smith, 1989). Ein Vergleich der Daten, die bei Untersuchungen von Zellen in Zellkultur erhalten wurden, mit Daten aus Studien mit transgenen Mäusen ist jedoch nicht möglich, da sich im Verlauf der Embryonalentwicklung gewebespezifische Methylierungs- und Expressionsmuster ausbilden und das Mausgenom dabei auch strukturellen Veränderungen unterworfen ist. Daher war es bei den Methylierungsstudien von besonderem Interesse, DNA aus verschiedenen Organen und Geweben (Leber, Niere, Milz, Gehirn, Testes, Schwanz) der transgenen Tiere zu analysieren. Dabei sollte untersucht werden, ob Methylierungsänderungen zellulärer DNA-Sequenzen gewebespezifisch ausgeprägt waren.

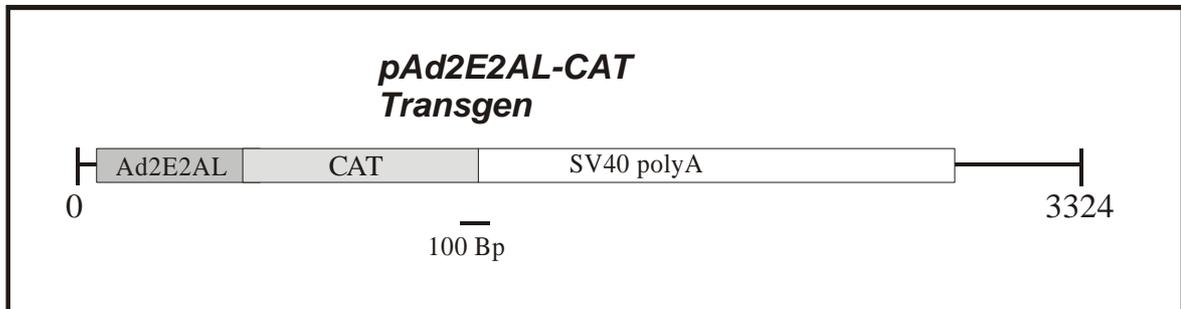
2.6.1 Veränderungen im Methylierungsmuster von pAD2E2AL-CAT transgenen Mäusen

Für die Experimente stand DNA von Tieren aus vier verschiedenen pAD2E2AL-CAT transgenen Mauslinien (Lettmann et al., 1991; Koetsier et al., 1995) zur Verfügung. Die Gründertiere dieser Linien stammen aus Mikroinjektionsexperimenten, die mit befruchteten B6D₂F₁-Oozyten (C57BL/6xDBA/2) durchgeführt wurden (befruchtet durch B6D₂F₁-Männchen). Das in diesen Experimenten injizierte 3324 Bp große DNA-Konstrukt (Abb. 17) bestand aus dem späten E2A-Promotor aus Adenovirus Typ 2, verbunden mit dem

Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) und dem Polyadenylierungssignal aus SV40 (Langner et al., 1986).

Abb. 17: Struktur des pAD2E2AL-CAT Transgens

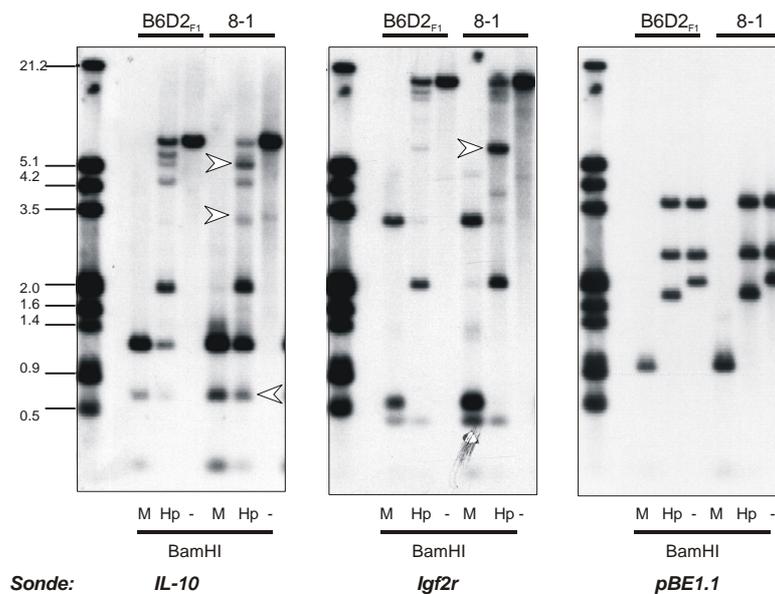
(modifiziert übernommen aus der Inaugural Dissertation von Paul Koetsier, 1995)



In zwei der vier pAD2E2AL-CAT-transgenen Mauslinien (Linie 7-1 und 8-1) konnte eine Abnahme im Methylierungsgrad von Interleukin-10 und Igf2r welches ein parentales Imprinting zeigt, in Leber-DNA nachgewiesen werden (Abb. 18, 19a und 19b).

Abb. 18: Abnahme der Methylierung von Interleukin-10 und Igf2r in der transgenen Mauslinie 8-1

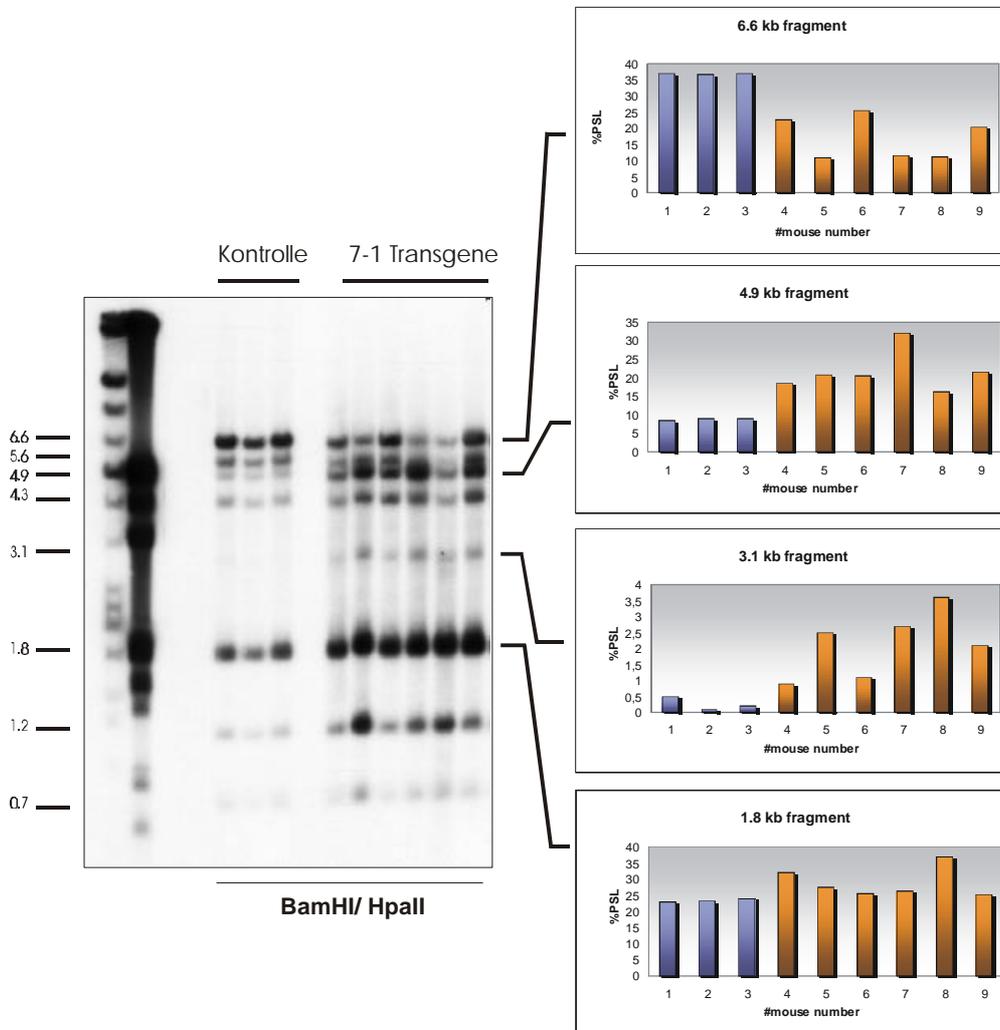
Genomische DNA (20µg) aus der Leber transgener Mäuse der 8-1 Linie und von nicht-transgenen Kontrolltieren (B6D2_{F1}) wurde mit BamHI und HpaII (Hp), mit BamHI und MspI (M) oder nur mit BamHI (-) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die Southern-Blots wurden gegen die ³²P-markierten DNA-Sonden Interleukin-10 (IL-10), Igf2r oder pBE1.1 (einem Glykosylasegen) hybridisiert. Alle dargestellten Hybridisierungen wurden nacheinander mit derselben DNA-tragenden Nylonmembran durchgeführt.



Beide Gene wiesen ein partielles Methylierungsmuster auf, wodurch bei der Southern-Blot Analyse sowohl große als auch kleine Spaltfragmente nachgewiesen werden konnten. Die relativen Intensitäten der Fragmentbanden waren proportional zum Methylierungsgrad in diesen DNA-Bereichen (siehe auch Diplomarbeit von Knut Müller, 1997). Die mit BamHI und der Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonuklease HpaII erhaltenen Fragmentmuster wurden mit den Fragmentmustern in der DNA aus nicht transgenen Kontrolltieren verglichen.

Abb. 19a: Abnahme der Methylierung des Interleukin-10-Gens in der transgenen Linie 7-1

Genomische DNA (20µg) aus der Leber transgener Mäuse der 7-1 Linie und nicht-transgener Kontrolltiere (C57BL/6, DBA/2 und B6D2_{F1}) wurden mit BamHI und HpaII gespalten. Die weitere Durchführung erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 18 beschrieben. Die schematischen Darstellungen zeigen einen Vergleich der in Phosphoimager-Analysen erhaltenen %PSL-Werte („Photo stimulated Luminiscence“) einzelner Fragmentbanden im BamHI/HpaII-Spaltmuster der transgenen Tiere mit den Spaltmustern der Kontrolltiere. Die Anordnung der Balken in den Balkendiagrammen entspricht der Spuranordnung im Autoradiogramm.



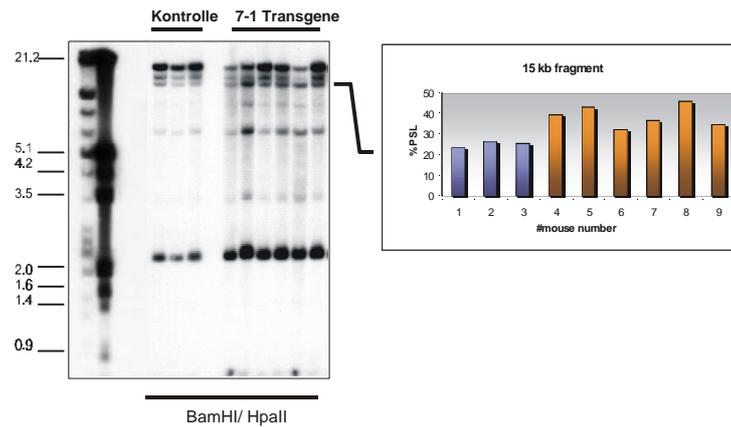


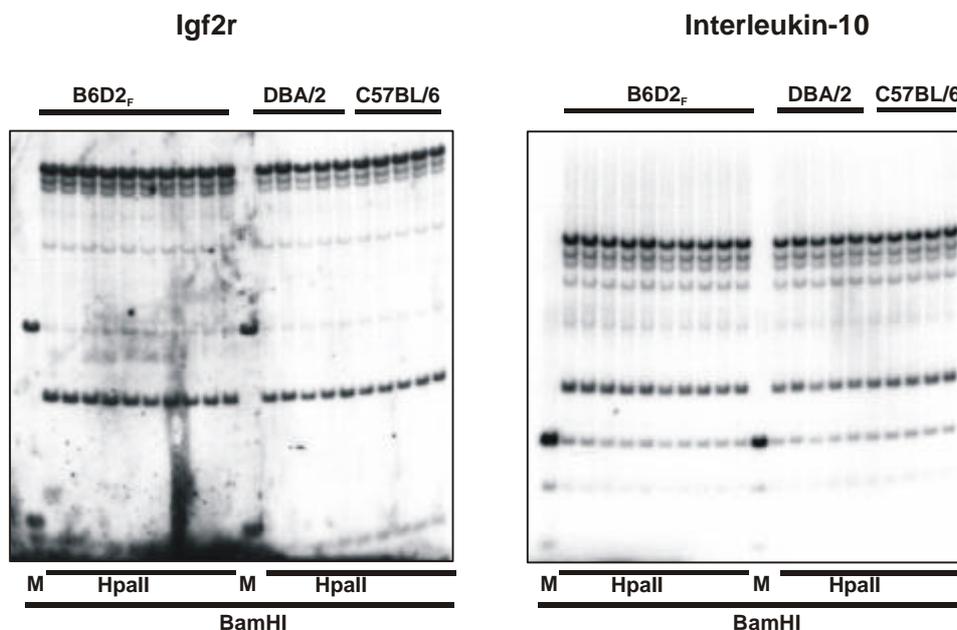
Abb. 19b: Abnahme der Methylierung von Igf2r in der transgenen Linie 7-1

Genomische Leber-DNA Proben (20µg) aus transgenen Tieren der 7-1 Linie und nicht transgener Kontrolltiere (C57BL/6, DBA/2 und B6D2_{F1}) wurden mit BamHI und HpaII gespalten. Die weitere Durchführung entsprach der in der Legende zu Abbildung 19a beschriebenen.

Da für die Mikroinjektion Oozyten aus B6D2_{F1}-Mäusen verwendet wurden, die einen gemischten genetischen Stammhintergrund aufwiesen, wurden sowohl B6D2_{F1}- als auch DBA/2- und C57BL/6-Mäuse als Kontrollen verwendet. Innerhalb einer Kontrollgruppe von bis zu 30 Kontrolltieren konnten keine Unterschiede im Methylierungsmuster von IL-10 und Igf2r festgestellt werden (Abb. 20).

Abb. 20: Methylierungsstatus von IL-10 und Igf2r in Kontrolltieren

Genomische Leber-DNA (20µg) aus nicht transgenen Kontrolltieren (C57BL/6, DBA/2 und B6D2_{F1}) wurden mit BamHI und HpaII gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die DNA auf den Southern-Blots wurde gegen die ³²P-markierten DNA-Sonden Interleukin-10 oder Igf2r hybridisiert



Die Untersuchung einer möglichen Variation des Methylierungsmusters in den beiden Genen IL-10 und Igf2r sollte ausschließen, daß die in transgenen Tieren gefundenen Veränderungen auf einen Methylierungspolymorphismus zurückzuführen waren. Durch Phosphoimager-Analyse der Signalstärken (PSL = „photo stimulated luminiscence“) jeder Fragmentbande konnte der prozentuale Anteil jedes Signals an der Summe innerhalb einer Spur berechnet werden (%PSL). Die prozentualen PSL-Werte einiger Fragmentbanden sind in den Balkendiagrammen der Abbildungen 19a und 19b angegeben. Die Abnahme des Methylierungsgrades des IL-10 Locus lag zwischen 11% und mehr als 25% in den transgenen Mauslinien 7-1 und 8-1. Im Igf2r-Gen betrug die Abnahme der Methylierung 10% bis 25% in einzelnen Tieren. Diese Daten waren jeweils spezifisch für bestimmte Tiere, d.h. Tiere mit niedrigem Methylierungsgrad im IL-10-Gen zeigten zum Teil einen hohen Methylierungsgrad in Igf2r. In bis zu 10 weiteren zellulären Genen, die in dieser Studie analysiert wurden, konnten keine Methylierungsänderungen nachgewiesen werden. In Abbildung 18 wurde exemplarisch das Resultat aus der Hybridisierung mit der pBE1.1-Sonde, einer Glykosylase, aufgeführt. Mit der rehybridisierten Nylonmembran, die für alle in Abbildung 18 dargestellten Hybridisierungen verwendet wurde, konnte mit der pBE1.1-Sonde in transgenen Tieren der 8-1-Linie keine Methylierungsänderung nachgewiesen werden.

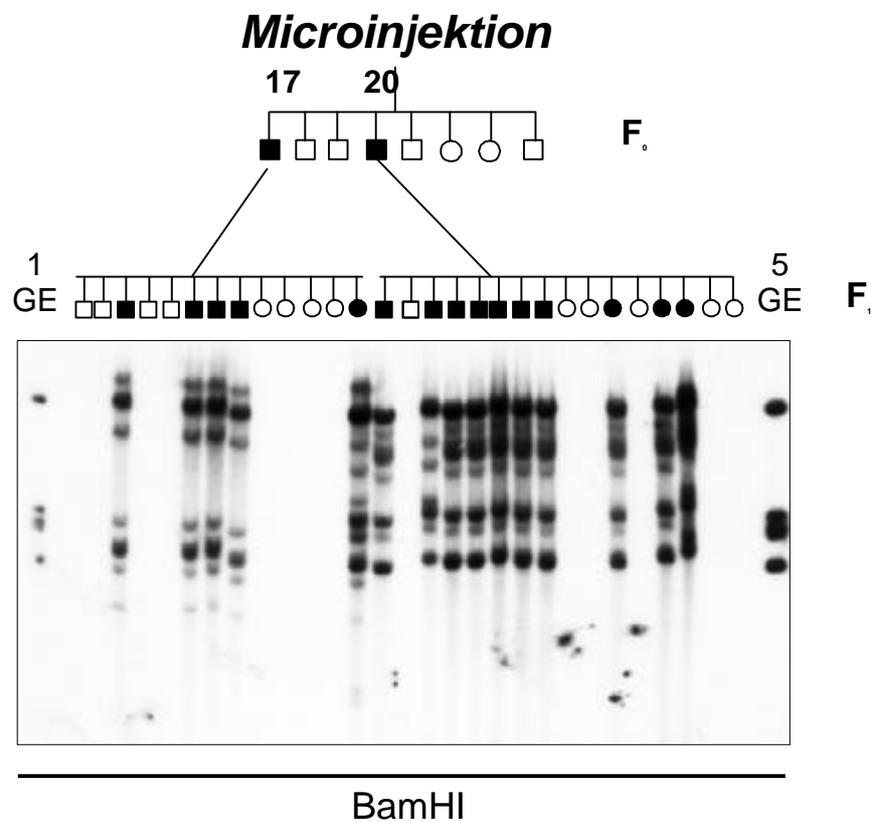
2.6.2 Veränderungen im Methylierungsmuster von Phage Lambda DNA-transgenen CD-1 Mäusen

Die Generierung transgener Mäuse durch die Technik der Mikroinjektion erfordert keinen Selektionsmarker. Das Mausmodell hat daher im Vergleich zu transgenen Zellen in Zellkultur, die durch Kotransfektion des Transgens und eines Selektionsmarkers entstanden, erhebliche Vorteile für die Bewertung der experimentellen Daten. Ob die Integration von Fremd-DNA per se zu Veränderungen in der DNA-Methylierung in transgenen Mäusen beitragen konnte, wurde in diesem Teil der Arbeit durch Verwendung von λ -DNA (48 kBp) als Transgen untersucht. Die prokaryotische DNA konnte als inerte DNA angesehen werden, da keine Expression prokaryontischer Gene in der eukaryontischen Wirtszelle zu erwarten war. Mäuse des CD-1 Stammes, die transgen für die DNA des Bakteriophagen Lambda waren, wurden in Kooperation mit Klaus Schughart (Strasbourg, damals GSF München) hergestellt. Die für die Mikroinjektion in befruchtete CD-1 Oozyten verwendete λ -DNA wurde aus Caesiumchloridgradienten gereinigten Phagen gewonnen. Zur Vorbereitung wurde Lambda-DNA mit XhoI in zwei Fragmente der Größe 33.5 und 15 kBp gespalten und über Elu-Tip Säulen von Schleicher und Schuell gereinigt. Nachkommen, die aus den Mikroinjektionsexperimenten hervorgegangen waren, wurde im Alter von 5 Wochen ein

Stück der Schwanzspitze abgenommen. Die daraus gewonnenen DNA-Proben wurden in Southern-Blot Analysen mit Lambda-DNA als radioaktiv markierte Sonde auf die Integration der injizierten Fremd-DNA untersucht. Transgene Tiere wurden zur Etablierung der transgenen Mauslinien mit nicht-transgenen CD-1 Tieren gepaart und die Nachkommen (F1-Generation) ebenfalls auf ihre Transgenität untersucht (Abb. 21). Aus dem dargestellten Mikroinjektionsexperiment gingen zwei transgene Gründertiere (schwarze Kästen in Abb. 21) hervor.

Abb. 21: Integrationsstatus der Lambda DNA in transgenen CD-1 Mäusen

Genomische DNA (20µg) aus der Schwanzspitze von 5 Wochen alten CD-1 Mäuse (F1-Generation) wurde mit BamHI gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die DNA auf den Southern-Blots wurden gegen die ³²P-markierten DNA des Bakteriophagen Lambda hybridisiert.



Das Transgen konnte stabil an die Nachkommen vererbt werden, d.h. das Spaltmuster in der DNA transgener F1-Nachkommen glich dem parental Spaltmuster (nicht gezeigt). Für eine erste grobe Abschätzung der Anzahl integrierter Kopien wurden 1 und 5 Genomäquivalente Lambda-DNA als Referenz verwendet (1 GE/ 5 GE). Die Intensität der Fragmente in den DNA-Spuren der Nachkommen von Gründertier #17 und #20 wies auf die Integration von mehr als 5 Genomäquivalenten hin. Die BamHI-Spaltmuster der DNA von transgenen F1-Mäuse zeigten zusätzliche Fragmente, deren Laufverhalten nicht mit den

Fragmenten in den Markerspuren übereinstimmte („Off-size“-Banden). Allerdings ließ diese Analyse keine Aussage darüber zu, ob Lambda-DNA an verschiedenen Stellen des Wirtsgenoms oder rearrangierte Lambda-DNA an einer chromosomalen Stelle integriert worden war. Da in der DNA aus beiden transgenen Linien #17 und #20 die Integration von mindestens 5 Kopien der injizierten Lambda-DNA nachgewiesen wurde, waren somit mindestens 242 Kilobasenpaare Fremd-DNA in die Wirtsgenome der CD-1 Mäuse eingebracht worden.

2.6.2.1 De novo Methylierung der integrierten Bakteriophagen λ -DNA

Es zeigte sich, daß in allen für die Untersuchung zellulärer Methylierungsmuster verwendeten Organe die Lambda-DNA de novo methyliert worden war (Abb. 22). Als Referenz für das Spaltmuster unmethylierter λ -DNA wurden 1 und 2 Genomäquivalente HpaII oder MspI gesplattene Lambda-DNA verwendet. Besonders in den Testes beider transgener Gründertiere war die unmethyliert injizierte Lambda-DNA stark de novo methyliert worden. In den DNA-Spuren der transgenen Gründertiere #17 und #20 zeigte sich eine sehr heterogene Signalverteilung, die von hoch- bis zu niedermolekularen Größen reichte. Die in mehreren Kopien integrierte Fremd-DNA lag vermutlich zum Teil hochmethyliert und zum Teil mit geringer Methylierung vor.

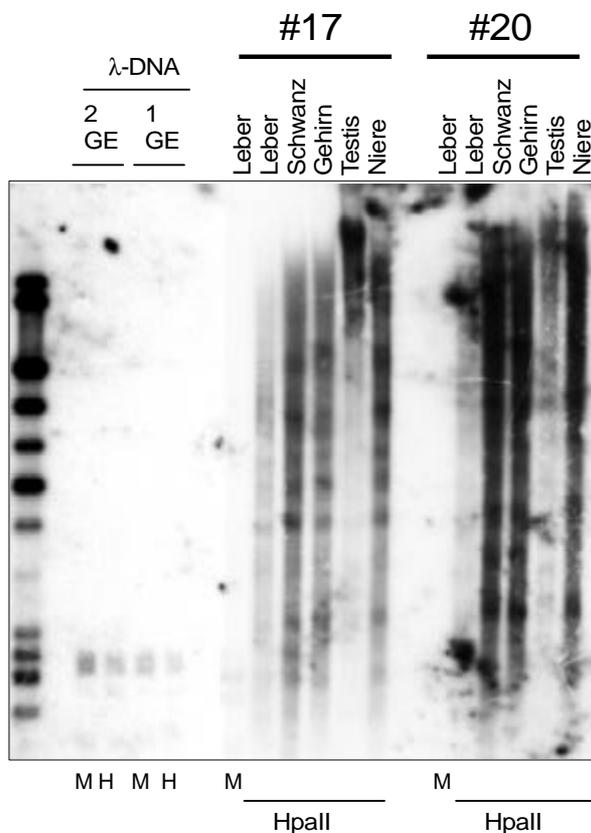


Abb. 22: De novo Methylierung der integrierten Phagen DNA

Je 20 μ g DNA aus Leber, Niere, Gehirn, Testes und der Schwanzspitze der Lambda DNA-transgenen Gründertiere #17 und #20 wurde mit HpaII (H) oder MspI (M) gesplatt und zusammen mit 1 oder 2 Genomäquivalenten (GE) Lambda-DNA, die zuvor mit HpaII (H) oder MspI gesplatt wurde elektrophoretisch getrennt. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die DNA auf den Southern-Blots wurde gegen die 32 P-markierten DNA des Bakteriophagen Lambda hybridisiert.

2.6.2.2 Lambda-transgene Mäuse zeigen Hypermethylierung im Igf2r-Gen

Wie für die pAD2E2AL-CAT-transgenen Mäuse beschrieben wurde bei den λ DNA-transgenen CD-1 Tieren das Methylierungsmuster von bis zu 10 randomisiert ausgewählten, zellulären Genen untersucht. Die Anwendung von MS-RDA oder MS-AS zur Isolierung differentiell methylierter DNA-Segmente in λ DNA-transgenen Mäusen führte lediglich zur Klonierung mehrerer Loci, die in verschiedenen Tieren einen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) in den HpaII-Erkennungsstellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Um eine Interferenz von RFLPs zu minimieren, wurden die DNAs mehrerer Kontrolltiere gesammelt bei der Durchführung der MS-RDA oder MS-AS eingesetzt. Dennoch wurden ausschließlich polymorphe DNA-Segmente angereichert und kloniert (Daten nicht gezeigt). Die Anwendung subtraktiver Hybridisierungstechniken wie der RDA oder MS-RDA für eine vergleichende Analyse verschiedener Individuen wurde bisher nicht beschrieben, abgesehen von Arbeiten, die spezifisch die Isolierung polymorpher Loci im Genom zum Ziel hatten (Xu et al., 1996; Toyota et al., 1998).

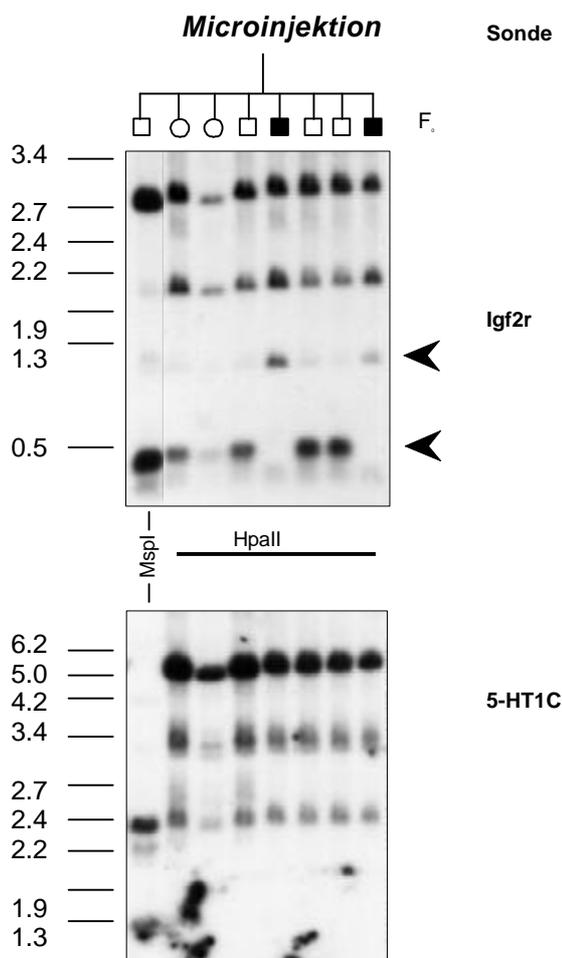


Abb. 23: Hypermethylierung in Igf2r in Lambda-transgenen Mäusen

Genomische DNA (20 μ g) aus dem Herzmuskel transgener und nicht transgener CD-1 Tiere der F0-Generation (Gründergeneration) wurden mit HpaII oder MspI (M) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden über Nacht in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt und anschließend auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Die DNA auf den Southern-Blots wurde gegen die ³²P-markierten DNA-Sonden Igf2r und 5-HT1C hybridisiert.

In dem randomisierten Ansatz wurde DNA aus Leber, Niere, Milz, Herz, Testes, Gehirn und der Schwanzspitze der transgenen Tiere mit der DNA nicht transgener Kontrolltiere des gleichen Wurfes, aber auch mit Kontrolltieren, die keinen Bezug zum Mikroinjektionsexperiment hatten, verglichen. Im *Igf2r*-Gen konnte mit einer 3 kBp großen Sonde aus der Imprinted Region 2 dieses Locus, die nur auf dem maternalen Chromosom methyliert ist, eine Hypermethylierung in der DNA der beiden transgenen Gründertiere #17 und #20 nachgewiesen werden (Abb. 23). Diese Methylierungsänderung zeigte sich jedoch gewebespezifisch nur in DNA, die aus Herzmuskelgewebe gewonnen wurde. Alle weiteren zellulären Gene, die in dieser Studie analysiert wurden, zeigten keine Methylierungsänderung. Die DNA-tragenden Nylonmembranen wurden in mehreren Experimenten mit verschiedenen DNA-Sonden hybridisiert. Da nur in *Igf2r*, nicht aber in anderen untersuchten DNA-Bereichen eine Methylierungsänderung gefunden wurde, konnte eine unzureichende Spaltung der DNA mit *HpaII* oder *MspI* als Ursache für die gezeigten Daten ausgeschlossen werden.

3 Diskussion

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, ob die Integration fremder DNA in ein etabliertes Säuger genom *per se* Veränderungen in zellulären Expressions- und Methylierungsmustern hervorrufen konnte. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen an Hamsterzellen, die transgen für Ad12-, Plasmid- und Lambda-DNA waren, konnten bereits Veränderungen im Methylierungsstatus zellulärer Gene nachweisen (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999). In diesen Experimenten wurden randomisiert ausgewählte Gensonden für Southern-Blot Experimente verwendet, in denen die zu analysierenden genomischen DNA-Proben mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonukleasen gespalten wurden. Ein Nachteil dieser zufälligen Testmethode war jedoch, daß nur wenige Gene und DNA-Segmente untersucht werden konnten. Die Wahrscheinlichkeit, zelluläre Gene mit veränderten Methylierungsphänotypen zu identifizieren, war daher a priori sehr gering. Da Unterschiede aber selbst mit diesen Methoden gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, daß erhebliche Unterschiede im Genom zu finden sein könnten. In der Adenovirus Typ 12-transformierten Zelllinie T637 wurden bereits in diesem zufälligen experimentellen Ansatz mehrere zelluläre DNA-Segmente gefunden, deren Methylierungsstatus gegenüber der parentalen BHK21 Zelllinie verändert worden war. Diese Tatsache zeigt, daß ein sehr hoher Anteil zellulärer Sequenzen in T637 eine veränderte Methylierung aufweisen mußte. In zwei BHK21 Zelllinien, die transgen für die DNA des Bakteriophagen λ - und pSV2neo-DNA waren, konnten nur in den Sequenzen der Intrazisternalen-A-Partikel geringe Veränderungen gefunden werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde daher argumentiert, daß eine abschließende oder weitreichendere Aussage über mögliche Veränderungen im Methylierungsmuster transgener BHK21 Zelllinien nur mit Analysemethoden möglich wären, die selektiv differentiell methylierte DNA-Segmente aus den zu untersuchenden Genomen isolieren könnten. Zu diesem Zweck wurde die Methylierungs-sensitive repräsentative Differenzanalyse (MS-RDA) (Ushijima et al., 1997) etabliert und für die Analyse von Ad12-DNA und λ -DNA-transgenen BHK21 Zellen verwendet. Mit Hilfe der MS-RDA konnten in mehreren Zyklen subtraktiver Hybridisierung DNA-Segmente angereichert werden, die in der *Testerzelllinie* einen geringeren Methylierungsgrad aufwiesen als in der *Driverzelllinie*.

Expressionsunterschiede zwischen transgenen und parentalen BHK21 Hamsterzellen wurden mit Hilfe der cDNA Subtraktionstechnik (Diatchenko et al., 1996) ermittelt.

Die Analyse transgener Mauslinien sollte die Fragestellung auf Säugerorganismen ausweiten und Aufschluß darüber geben, ob mögliche Methylierungsänderung in zellulären DNA-Segmenten Organ-spezifisch auftraten oder in allen untersuchten Organen. Dadurch könnten

Rückschlüsse auf den Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung gezogen werden, zu dem die Methylierungsänderungen stattgefunden hatten.

3.1 Veränderung im zellulären Methylierungsmuster von T637

Die Zelllinie T637 wurde durch Transformation von BHK21 mit dem humanen Adenovirus Typ 12 (Ad12) hergestellt (Strohl et al., 1970). Diese Zelllinie trägt ca. 15 bis 20 Kopien des adenoviralen Genoms an einer chromosomalen Lokalisation und zumindest die Gene der viralen E1-Region werden exprimiert (Ortin et al., 1976). Die E1 Region umfaßt die frühen viralen Gene und besteht aus zwei transkriptionellen Einheiten, E1A und E1B. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression der E1A- und E1B-Gene eine morphologische Transformation der Wirtszelle zur Folge haben kann (Houweling et al., 1980). Änderungen im Methylierungsmuster, die mittels MS-RDA Analyse identifiziert werden konnten (siehe 2.1.2), ließen sich daher nicht einheitlich auf einen Faktor zurückführen. Zum einen konnten virale Faktoren zu diesen Veränderungen geführt haben. Andererseits konnte die mit der Integration von ca. 511 bis 682 Kilobasenpaaren viraler DNA einhergehende strukturelle Veränderung des Wirtsgenoms zu weitreichenden Methylierungsänderungen geführt haben. Um indirekt Aufschluß darüber zu bekommen, welche der beiden diskutierten Faktoren möglicherweise für die beobachteten Methylierungsänderungen in T637 verantwortlich waren, wurden Methylierungsstudien an zwei Revertantenzelllinien (TR3 und TR12, die durch teilweisen oder vollständigen Verlust der Ad12-Sequenzen aus T637 hervorgegangen waren) von T637 durchgeführt. Zusätzlich wurden Ad12 infizierte BHK21 Zellen sowie Ad12-transgene, aber nicht transformierte Zelllinien (H-Ad12neo2/5) und eine weitere Ad12-transformierte primäre Hamsterzelllinie (A2497-3) analysiert. Differenzklone, die in T637 eine differentielle Methylierung zeigten, wurden als Hybridisierungssonden in Southern-Blot Experimenten verwendet, in denen die genomischen DNA-Proben der oben genannten Zelllinien mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonukleasen gespalten wurde.

Mittels MS-RDA konnten in einem ersten Ansatz sechs DNA-Segmente isoliert werden, die in T637 stärker methyliert waren als in BHK21. Der Differenzklon T1 (siehe Tab. 2) zeigte in der Revertantenzelllinie TR12, die durch teilweisen Verlust der Ad12-Sequenzen aus T637 hervorgegangen war, das Methylierungsmuster der parentalen BHK21 Zelllinie (siehe Abb. 3b). Da die Revertantenzelllinie TR12 nur noch wenige Kopien des adenoviralen Genoms trug, konnte vermutet werden, daß die Wiederherstellung des normalen Methylierungsphänotyps auf den Verlust adenoviraler Faktoren zurückzuführen sei. Allerdings zeigte die Revertantenzelllinie TR3, in der keine Ad12-Sequenzen mehr nachgewiesen werden konnten den in T637 gefundenen Methylierungsphänotyp. Es war daher

wahrscheinlicher anzunehmen, daß in TR12 eine durch den Verlust der viralen Sequenzen verursachte strukturelle Veränderung des Genoms zur Wiederherstellung des normalen Methylierungsphänotyps beigetragen hatte. Da die Revertantenzelllinien durch Einzelzellklonierung etabliert wurden, könnte das in TR12 im Bereich des Differenzklons T1 gefundene Methylierungsmuster aus einem Zellpool selektioniert worden sein. Außerdem bestand die Möglichkeit, daß unterschiedliche strukturelle Veränderungen der Chromatinstruktur durch Verlust von Ad12-DNA in den Revertanten zu unterschiedlichen zellulären Methylierungsphänotypen geführt hatte.

Die beiden Zelllinie H-Ad12neo2 und H-Ad12neo5 waren durch Kotransfektion von BHK21 mit Ad12- und pSV2neo Plasmid-DNA entstanden. In diesen beiden Zelllinien fehlte die E1 kodierende Region teilweise (H-Ad12neo5) oder vollständig (H-Ad12neo2) und frühe virale Transkripte waren nicht nachweisbar (Orend et al., 1995a). Das in T637 differentiell methylierte DNA-Segment T12 (siehe Tab. 2) zeigte auch in diesen beiden Zelllinien eine gegenüber der BHK21 Zelllinie höheren Methylierungsgrad. Bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß die beiden Ad12-transgenen, aber nicht transformierten Zelllinien in seltenen Fällen in den gleichen DNA-Segmenten Methylierungsänderungen zeigten, die auch in T637 verändert waren (Heller et al., 1995). Es ist daher anzunehmen, daß außer den frühen viralen Genprodukten noch weitere Faktoren wie die Integration der Ad12-DNA zu veränderten zellulären Methylierungsmustern in transgenen Zellen führen konnten.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß die Integration der fremden (Ad12) DNA zu veränderten zellulären Methylierungsmustern führen konnte, ergab sich bei der Analyse einer weiteren transformierten primären Hamsterzelllinie. In A2497-3 zeigten vier unterschiedliche DNA-Bereiche, die in T637 differentiell methyliert waren, den Methylierungsphänotyp der parentalen BHK21 Zellen (siehe Tab. 2). Es ist daher unwahrscheinlich anzunehmen, daß die in T637 gefundenen Methylierungsänderungen ausschließlich durch virale Faktoren verursacht wurden. Möglicherweise entscheidet der Integrationsort der viralen DNA und die strukturelle Veränderung des Wirtsgenoms über die Wirkung, die virale Faktoren im Zellkern ausüben können. Wenn man davon ausginge, daß lösliche Genprodukte in allen Bereichen des Zellkerns gleichsam wirksam werden könnten, müßten in verschiedenen Ad12-transformierten Zelllinien gleiche Methylierungsänderungen gefunden werden. Jedoch zeigt schon die Betrachtung einzelner Gene in verschiedenen Zelllinien, die entweder mit Adenoviren transformiert oder infiziert wurden, daß der Einfluß früher viraler Genprodukte auf die Expression spezifisch für die gewählten Testsysteme sein kann. Während die Expression des c-myc-Gens in transienten Versuchen durch das adenovirale E1A-Protein induziert wird (Hiebert et al., 1989, 1991; Lipp et al., 1989; Thalmeier et al., 1989), kommt es

nach Infektion von KB-Zellen mit Adenovirus Typ2 (Ad2) und in Ad-transformierten Zellen zu einer Abnahme der c-myc Expression (Rosahl u. Doerfler, 1992; Timmers, 1988).

In der DNA von BHK21 Zellen, die mit Ad12 infiziert wurden, konnten keine Methylierungsänderungen in den zellulären DNA-Segmenten nachgewiesen werden, die bei T637 verändert waren (siehe Tab. 2). Die Expression früher Gene in transformierten und infizierten Zellen war vergleichbar (Heller et al., 1995). Allerdings war ein direkter Vergleich infizierter und transformierter BHK21 Zellen nur unter Vorbehalt möglich. Zum einen handelte es sich bei den infizierten Zellen um ein Zellgemisch, in dem nicht alle Zellen mit Ad12 infiziert worden waren. Außerdem war die Zeitdauer, die die Zellen unter dem Einfluß viraler Faktoren standen, sehr viel geringer als bei der etablierten Ad12-transformierten T637 Linie. Es ist völlig unklar, ob die in T637 beobachteten Methylierungsänderungen unmittelbar nach Integration der viralen DNA stattgefunden hatten oder erst nach mehreren Zellpassagen sukzessive etabliert wurden.

Zusammenfassend zeigen die Methylierungsstudien an Ad12-transgenen, -transformierten und infizierten BHK21 Zellen, daß die Integration der fremden DNA in das Wirtsgenom einen entscheidenden Faktor bei der Veränderung zellulärer Methylierungsmuster darstellt. Viele Studien zur viralen Onkogenese beschreiben Interaktionen zwischen viralen und zellulären Proteinen, um Aufschluß über Transformationsereignisse zu erlangen. Der Einfluß der Integration der viralen DNA *per se* wurde dabei meist vernachlässigt.

3.2 Veränderung im zellulären Methylierungsmuster von λ DNA-transgenen BHK21 Zellen

Bereits für frühere Arbeiten aus unserem Labor wurden BHK21 Zelllinien etabliert, die transgen für die Bakteriophagen Lambda und pSV2neo-DNA waren. Eine Vergleich dieser Zellen mit den parentalen BHK21 Zellen sollte zeigen, ob die Integration fremder DNA *per se* zu Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern führen konnte. Für die MS-RDA Analyse wurden für die vorliegende Arbeit sieben λ -transgene BHK21 Zelllinien verwendet. In drei dieser Zelllinien (λ_6 , λ_{12} , λ_{18-2}) konnten Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern gefunden werden (siehe 2.1.1). Nach Durchführung von zwei Zyklen MS-RDA mit den λ -transgenen Zelllinien als *Driver* und BHK21 als *Tester* wurde zunächst versucht, die klonierten Anreicherungsprodukte randomisiert als Hybridisierungssonden in Southern-Blot Experimenten einzusetzen. Es zeigte sich jedoch, daß der Anteil von Differenzklonen im Anreicherungs-pool nach zwei Zyklen MS-RDA noch sehr gering war. Die Entwicklung eines verbesserten Selektions-Verfahrens war daher erforderlich (siehe Methodenteil). Klonierte und PCR amplifizierte Anreicherungsprodukte wurden in Arrays auf

positiv geladene Nylonmembranen aufgebracht. Die duplizierten Filter mit identischer Klonanordnung wurden gegen ^{32}P -markierte Amplicon-DNA des *Testers* (BHK21) oder *Drivers* (λ -DNA-transgene BHK21 Linie) hybridisiert. Anhand der Signalintensitätsunterschiede zwischen *Tester* und *Driver* konnten Klone identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von differentiell methylierten DNA-Segmenten stammten. Maximal konnten 2% positive Klone in einzelnen Experimenten von jeweils 198 getesteten Anreicherungsprodukten pro Ansatz identifiziert werden. Um den Methylierungsgrad der im Dot-Blot selektionierten Klone in genomischer DNA von transgenen und parentalen BHK21 zu testen, wurden die Differenzklone in Southern-Blot Experimenten als Hybridisierungssonden eingesetzt (siehe Abb. 6).

In mehreren λ DNA-transgenen Linien, in denen in früheren Arbeiten in randomisierten Ansätzen keine Methylierungsänderung nachgewiesen werden konnten, konnte mit Hilfe der MS-RDA differentiell methylierte zelluläre DNA-Segmente identifiziert werden. Diese Daten zeigen die Effektivität der MS-RDA Methode, selektiv differentiell methylierte DNA-Fragmente aus komplexen Genomen anreichern zu können. Ein Anteil der vorselektionierten Anreicherungsprodukte zeigte jedoch in der Southern-Blot Analyse keinen Methylierungsunterschied zwischen der *Tester*- und der *Driver*zelllinie.

Die in den λ DNA-transgenen BHK21 Zelllinien gefundenen differentiell methylierten DNA-Segmente unterstützen die Annahme, daß die Integration fremder DNA *per se* zu Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer Gene führen konnten. Bei den aus MS-RDA Experimenten mit λ DNA-transgenen BHK21 Zelllinien isolierten differentiell methylierten DNA-Segmente handelte es sich meist um repetitive Sequenzen im Genom. Diese Aussage konnte aufgrund der starken Hybridisierungssignale der komplexen Fragmentmuster in Southern-Blot Analysen gemacht werden. Wenn diese repetitiven Sequenzen den Methylierungsstatus des sie umgebenden Chromatins reflektierten, so waren in diesen λ -transgenen Zelllinien wahrscheinlich eine größere Zahl zellulärer DNA-Bereiche verändert worden. Es konnte gezeigt werden, daß der Methylierungs- und Expressionsstatus proretroviraler Elemente im Genom durch den Methylierungs- und Expressionsstatus des umgebenden Chromatins beeinflußt werden kann (Jähner u. Jaehnisch, 1985).

In Kontrollexperimenten wurde untersucht, ob individuelle BHK21 Einzelzellklone in den DNA-Segmenten der Differenzklone das Methylierungsmuster der parentalen BHK21 Linie zeigten. Diese Experimente waren erforderlich, weil alle λ DNA-transgenen Zelllinien durch Einzelzellklonierung transfizierter BHK21 Zellen etabliert worden waren. Dabei hätte es zur Selektion eines Methylierungsphänotyps kommen können, der von der durchschnittlichen BHK21 Zellpopulation abwich. Jedoch zeigten die 20 verwendeten BHK21 Einzelzellklone

keine Abweichung vom Methylierungsmuster der BHK21 Mischpopulation (siehe 2.1.2 und Abb. 12). Natürlich können diese Kontrollexperimente nicht vollständig die Möglichkeit ausschließen, daß Einzelzellklone mit bestimmten Methylierungsphänotypen selektiert worden waren. Wenn jedoch ein genomischer DNA-Bereich untersucht worden wäre, der auch in somatischen Zellen ein sehr polymorphes Methylierungsmuster aufwiese, hätte bereits eine kleine Auswahl individueller Einzelzellklone diese Unterschiede erkennen lassen.

Durch Anwendung der MS-RDA Methode wurde weiterhin untersucht, ob Einzelzellklone von BHK21 *per se* Differenzen im zellulären Methylierungsphänotyp zeigten. Dazu wurden genomische DNA-Proben aus 20 verschiedenen Einzelzellklonen in zwei MS-RDA Experimenten untersucht (siehe 2.1.1). Nach einem Zyklus MS-RDA konnten beim Vergleich der Einzelzellklone jedoch keine Anreicherungsprodukte erhalten werden (siehe Abb. 11). Das Ergebnis dieses Experiments blieb unabhängig von der Anzahl der PCR-Zyklen, die für den ersten MS-RDA Zyklus verwendet wurde. Die Methylierungsphänotypen der untersuchten BHK21 Zellklone zeigten vermutlich keine signifikanten Unterschiede in der Methylierung von HpaII-Erkennungsstellen. Es bleibt jedoch nicht auszuschließen, daß DNA-Sequenzen ausserhalb von HpaII-Erkennungsstellen in der BHK21 Zellklonen unterschiedlich methyliert waren.

Weiterhin wurde für jede der verwendeten λ -transgenen BHK21 Zelllinien getestet, ob die kointegrierten pSV2neo-Sequenzen, die für die Selektion der Zellen benötigt wurden, noch transkriptionell aktiv waren (Daten nicht gezeigt). Zum einen wurde die Wachstumsfähigkeit der Zellen auf selektivem Medium (G418-Selektion), aber auch die Expression des Resistenzmarkers in Northern-Blot Analysen untersucht. Diese Experimente sollten klären, ob zum Zeitpunkt der Untersuchung der zellulären Methylierungs- oder Expressionsmuster noch Genprodukte des integrierten Selektionsmarkers festzustellen waren. Selektierbare Markerkassetten werden regelmäßig für stabile Transfektionen und Infektionen verwendet. In einigen Arbeiten konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die Expression der Neomycin-Resistenz zu Veränderungen im Genexpressionsmuster führen kann (Valera et al., 1994). Diese Veränderungen konnten auch dann nachgewiesen werden, wenn das transfizierte Markerkonstrukt nicht stabil integriert worden war. Eine stabile Integration konnte andererseits zu Veränderungen in der Expression von Genen führen, die bis zu 100 Kilobasenpaare von der transkriptionell aktiven Markerkassette entfernt lagen (Pham et al., 1996). Der Einfluß der Neomycinresistenzmarker mußte auch bei der Bewertung der vorliegenden Experimente beachtet werden. Es zeigte sich jedoch, daß in λ DNA-transgenen Zelllinien, die auf selektivem Medium wachstumsfähig waren und in Northern-Blot Analysen eine Expression des Resistenzmarkers zeigten, keine Veränderungen im zellulären Methylierungs- oder Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte. Andererseits konnten

in λ DNA-transgenen BHK21 Zelllinien, die keine Resistenz gegen G418 aufwiesen, zelluläre DNA-Bereiche mit veränderten Methylierungs- oder Expressionsmustern nachgewiesen werden (siehe z.B. λ 12 in Abb.6 und λ 18 in Abb. 5). Ein direkter Einfluß der Expression des Resistenzmarkers auf die gefundenen Methylierungs- und Expressionsveränderungen in transgenen BHK21 Linien läßt sich durch diese Daten für den Zeitpunkt der experimentellen Durchführung der MS-RDA oder cDNA Subtraktion ausschließen. Welche Veränderungen jedoch bereits während der ersten Selektion der mit λ -DNA und pSV2neo DNA transfizierten BHK21 Zellen etabliert wurden, konnte durch diese Kontrollexperimente nicht erfaßt werden. Für die Bewertung der in dieser und in früheren Arbeiten zu diesem Thema durchgeführten Experimente (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999) wäre die Generierung von Bakteriophage Lambda DNA-transgenen BHK21 Zelllinien von Vorteil gewesen, die keinen Selektionsmarker tragen. Eine Selektion von Zellen, die stabil transfiziert wurden, nur aufgrund der Anwesenheit einer exogenen DNA, von der kein nachweisbares Genprodukt gebildet wird, stellt zur Zeit noch ein technisches Problem dar. In der Vergangenheit wurde in einem ersten Ansatz versucht, nach Transfektion von Bakteriophage Lambda DNA eine zufällige Einzelzellklonierung durchzuführen und die Integration der fremden DNA in BHK21 Zellen mittels Southern-Blot nachzuweisen (durchgeführt von Ralph Remus). Aus diesen Experimenten konnten aber, möglicherweise aufgrund der geringen Transfektionseffizienz, keine λ DNA-transgenen Zellen identifiziert und etabliert werden.

3.3 Veränderte Genexpression in λ DNA-transgenen BHK21 Zellen

Mit Hilfe der cDNA Subtraktionstechnik (Diatchenko et al., 1996) wurde untersucht, ob sich in BHK21 Zellen, die transgen für Lambda- und pSV2neo-DNA waren, zelluläre Expressionsmuster verändert hatten. In den transgenen BHK21 Hamsterzelllinien λ 10 und λ 18 konnten mehrere differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Für die Vorselektion der nach einem Zyklus subtraktiver Hybridisierung vorliegenden Anreicherungsprodukte war auch hier eine Vorselektion mittels reverser Northern Dot-Blot Analyse erforderlich (siehe Abb. 4a und 5a). Nur etwa 3% der in Dot-Blot Arrays analysierten Klone stellten Differenzklone dar, die auch in Northern-Blot Analysen einen Expressionsunterschied zwischen den DNAs aus der transgenen und der parentalen BHK21 Zelllinie zeigten. In der transgenen Zelllinie λ 10 konnten aus 198 getesteten Klone sechs differentiell exprimierte Gene isoliert werden. Vier der sechs Gene konnten durch ihre Sequenzhomologie zu bekannten Genen identifiziert werden (siehe Tab. 1). Für einen Nachweis der Expressionsunterschiede in Northern-Blot Analysen war die Verwendung von mindestens 2 μ g poly (A⁺) mRNA erforderlich (siehe Abb. 4b). Da mit bis zu 40 μ g cytoplasmatischer RNA keine oder nur

schwer zu analysierende Signale erhalten wurden, handelte es sich vermutlich um schwach transkribierte Gene. Während in der Ad12-transformierten BHK21 Zelllinie T637 einheitlich Gene identifiziert wurden, deren Expression in T637 induziert wurde, konnte man in $\lambda 10$ sowohl eine Ab- als auch eine Zunahme der Genexpression feststellen. Eine Evaluierung der Expressionsunterschiede mittels Phosphorimageranalyse der in Northern-Blots erhaltenen Signale war erforderlich, da die Unterschiede der Expressionsniveaus zwischen BHK21 und $\lambda 10$ in einigen Fällen (Klon F11, Abb. 4) nur bei 0,6 lagen. Bei Klon E11 konnte eine Abnahme der Transkriptionsrate in $\lambda 10$ auf ein in dieser Analyse nicht mehr nachweisbares Niveau festgestellt werden (Abb.4). Keine der differentiell exprimierten Gene zeigte Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen BHK21 und $\lambda 10$. Da jedoch nur die klonierten cDNA-Fragmente als Hybridisierungs sonden in Southern-Blot Analysen eingesetzt wurden, konnte keine Aussage über die Methylierung im Promotorbereich der klonierten Gene gemacht werden.

In der transgenen Zelllinie $\lambda 18$ konnten in der Dot-Blot Analyse von 198 PCR amplifizierten Anreicherungsprodukten nach einem Zyklus cDNA Subtraktion mindestens 7 Differenzklone nachgewiesen werden (siehe Abb. 5a). Zusammen mit bekannten Genklonen wurden diese möglichen Differenzklone in einem weiteren Dot-Blot Array analysiert (siehe Abb. 5b). Da auf diesen Arrays, die gegen ^{32}P -markierte cDNA-Präparationen aus BHK21 oder $\lambda 18$ hybridisiert wurden, auch β -Actin und ADPRT analysiert wurden, konnte eine Aussage über die relativen Expressionsniveaus der Differenzklone gemacht werden. In einigen Fällen wurden die Klone zusätzlich in Northern-Blot Analysen untersucht, um die im Dot-Blot festgestellten Expressionsunterschiede zu bestätigen (siehe Abb. 5c).

In der λ -transgenen Zelllinie $\lambda 18$ und in BHK21 konnte eine geringe Expression der Intrazisternalen-A-Partikel Sequenzen nachgewiesen werden (siehe Abb. 5b). Diese, wenn auch schwache Expressionsrate, war ebenfalls entscheidend bei der Bewertung der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten. Obwohl IAP Elemente in somatischen Geweben der Maus stark methyliert und inaktiv vorliegen (Kuff u. Lueders, 1988), findet man in Tumorzellen und Zellen in Zellkultur zum Teil hohe IAP-Transkriptionsraten (Kuff, 1990). Ob es bei diesen beschriebenen Fällen zu einer Genom-weiten Aktivierung von IAP Elementen gekommen war, kann aufgrund der Komplexität der Expressionsmuster der repetitiven Elemente nur schwer festgestellt werden. In Lebergewebe alternder Mäuse konnte die erhöhte IAP-Transkription jedoch auf nur einen aktivierten Lokus zurückgeführt werden (Dupressoir et al., 1995; Puech et al., 1997). Da es sich bei IAP-Elementen um Retrotransposons handelt, deren Transposition durch ihre Transkription gesteuert wird (Dupressoir u. Heidmann, 1997), konnte man auch in den untersuchten λ -transgenen und

parentalen BHK21 Transpositionereignisse durch aktive IAPs erwarten. Diese Betrachtungsweise impliziert, daß das Hamstergenom der untersuchten Zellen in Zellkultur *per se* Veränderungen durch endogene IAP-Elemente unterworfen war. In einer Arbeit von Duhl und Mitarbeitern (1994) konnte gezeigt werden, daß IAP-Insertionen im Genom in der Nachbarschaft zellulärer Gene zur veränderten Methylierung und Expression dieser Gene führen kann. Die IAP-Integration in die Nachbarschaft des Agouti-Lokus der Maus, der normalerweise zur Pigmentierung des Fells beiträgt, kann dazu führen, daß der das Agouti-Gen Eigenschaften eines Onkogens annehmen kann, wenn er unter die Kontrolle des Transposon-Promotors gestellt wird (Michaud et al., 1994). Differentielle Genexpression in λ -transgenen oder auch Ad12-transformierten BHK21 Zellen kann somit auch als mögliche Folge einer Transposon-Insertion in die Nachbarschaft der betroffenen Gene verstanden werden.

Andererseits könnte auch die Integration der Phage Lambda- und pSV2neo-DNA in das Hamstergenom zu den beobachteten Genexpressionsänderungen in λ 10 und λ 18 geführt haben. Transpositionsergebnisse von IAP oder anderen transposablen Elementen hätten durch die Integration der exogen zugeführten DNA induziert werden können. Als Sekundärereignis wäre dann die Veränderung in weiteren zellulären DNA-Segmenten zu verstehen, die durch neu inserierte Transposons hervorgerufen wurden.

Da die Möglichkeit bestand, daß Zellen die in Zellkulturflaschen wuchsen, abhängig von der Konfluenz des Zellrasens unterschiedliche zelluläre Expressionsmuster aufwiesen, wurden die Zellen von bis zu vier Zellpassagen bei einer Konfluenz von ca. 70% gesammelt. Poly (A⁺) mRNA aus diesen gesammelten Zellen wurde für die cDNA Subtraktion eingesetzt.

Die transgenen BHK21 Zelllinien wurden durch Kotransfektion von λ - und pSV2neo-DNA in BHK21 Zellen unter Anwendung der Calciumphosphat-Präzipitat-Methode (Graham u. van der Eb, 1973; Southern u. Berg, 1982) hergestellt (durchgeführt von Hilde Heller, Christina Kämmer und Ralph Remus). Es bestand die Möglichkeit, daß die Transfektionsprozedur *per se* zu Veränderungen in zellulären Methylierungs- und Expressionsmustern geführt hatte. Es wurde daher bereits in früheren Arbeiten untersucht, ob BHK21 Zellen, die der Calciumphosphat-Präzipitat-Prozedur in Abwesenheit exogener DNA unterzogen wurden, veränderte zelluläre Methylierungsmuster aufwiesen. In den untersuchten repetitiven IAP-Sequenzen konnten keine durch die angewendete Transfektionsmethode verursachte Änderungen festgestellt werden (Remus et al., 1999). In Experimenten, in denen eine Liposom-vermittelte Transfektionsmethode verwendet wurde, konnte jedoch auch in Mock-transfizierten Zellen eine Induktion von Interferon-stimulierten Genen festgestellt werden (Li et al., 1998). Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen in zellulären Methylierungs- und Expressionsmustern sind jedoch sehr wahrscheinlich nicht durch die

experimentelle Prozedur verursacht wurden, die für die Herstellung der transgenen BHK21 Zellen notwendig war.

3.4 Methylierungs-sensitive Amplicon Subtraktion (MS-AS): Eine neue Strategie zur Isolierung differentiell methylierter DNA-Segmente aus komplexen Genomen

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokoll der Methylierungs-sensitiven Amplicon Subtraktion (MS-AS) dient der Isolierung differentiell methylierter DNA-Fragmente aus zwei zu vergleichenden genomischen DNA Proben (siehe Methodenteil und 2.2). Das MS-AS Protokoll nutzt den für die Subtraktion von cDNA-Präparationen beschriebenen Normalisierungs- und suppressiven PCR-Schritt (Siebert et al. 1995), der unter anderem für die Isolierung seltener Transkripte Anwendung findet (Diatchenko et al., 1996). Im Gegensatz zur MS-RDA-Methode (Ushijima et al., 1997) wird das *Tester*-Amplicon in zwei Aliquots aufgeteilt, die nach Ligasierung an verschiedene Adaptoren zunächst getrennt gegen einen Überschuß an *Driver*-Amplicon hybridisiert werden (siehe Abb. 13). Da der Hybridisierungsvorgang eine Reaktion zweiter Ordnung darstellt, können repetitive Amplicon-Sequenzen des *Testers*, die keinen homologen Partner im *Driver*-Amplicon haben, schneller Homodimere bilden (b-Moleküle in Abb. 13) als selten vertretene *Tester*-Fragmente. Dadurch wird die Konzentration einzelsträngiger repetitiver Ampliconsequenzen, die ausschließlich im *Tester* vorkommen, der Konzentration einzelsträngiger *Tester*-Sequenzen mit geringer Konzentration angeglichen. Durch Mischung beider Hybridisierungsansätze können sich doppelsträngige DNA-Fragmente des *Testers* bilden, die zwei unterschiedliche Adaptoren an den Molekülen tragen (e-Moleküle in Abb. 13). Eine effiziente Amplifikation der Hybridisierungsprodukte ist nur bei Molekülen möglich, die beide Adaptoren tragen. Homodimere mit nur einem Adaptortyp (b-Moleküle in Abb. 13) können nicht amplifiziert werden, da die Adaptoren an den Enden des DNA-Moleküls größere Homologien zueinander aufweisen (48 Basenpaare invertierte Wiederholungssequenzen) als die verwendeten Primer zu den Adaptoren. Das intramolekulare Annealing der Adaptoren ist stabiler als die Bildung von Primer-Template Hybriden bei der PCR, wodurch eine exponentielle Amplifikation verhindert wird.

Eine Anwendung dieses von Siebert und Mitarbeitern beschriebenen Normalisierungsschritt (Siebert et al., 1995) für die Isolierung von DNA-Segmenten, die differentiell methyliert sind oder nur in einer von zwei zu vergleichenden genomischen DNA-Proben vorkommen, wurde bisher nicht beschrieben. Da das MS-AS Protokoll nur einen Zyklus subtraktiver Hybridisierung erforderte, waren die isolierten differentiell methylierten

DNA-Fragmente häufig größer als Differenzklone aus MS-RDA Experimenten. Im Verlauf der MS-RDA war für jeden der bis zu drei Zyklen subtraktiver Hybridisierung die Verwendung unterschiedlicher Adaptoren notwendig. Die Abspaltung der Adaptoren erfolgte mit MspI und führte ebenfalls zur Spaltung der Ampliconfragmente. HpaII-Erkennungsstellen, die in genomischer DNA methyliert vorlagen, waren in PCR generierten Amplicon-Fragmenten unmethyliert und konnten so gespalten werden. Dadurch konnte es im Verlauf der MS-RDA zum Verlust von differentiell methylierten DNA-Fragmenten kommen, da Fragmente, die kleiner als 200 Basenpaare waren nur sehr ineffizient angereichert werden konnten (Ushijima et al., 1997). Bei sehr kleinen Molekülen kompetitiert das Reannealing der homologen Einzelstränge mit dem Primer-Annealing. Daher schien es von Vorteil, in der MS-AS Methode nur einen Zyklus subtraktiver Hybridisierung ohne Adaptorwechsel durchzuführen. Nach MS-AS Analyse von Ad12-transformierten und λ -transgenen BHK21 Zellen konnten mehrere differentiell methylierte DNA-Fragmente isoliert werden (siehe Abb. 14 und Tab. 4). Viele der Differenzklone stammten aus CG-reichen Regionen mit einem CG-Gehalt über 50%. Die Differenzklone wiesen mehrere intakte HpaII-Erkennungsstellen auf und wären im Verlauf einer MS-RDA Prozedur in kleinere Fragmente mit einer Größe von zum Teil unter 100 Basenpaaren gespalten worden, was ihre Anreicherung ausgeschlossen hätte. Zudem konnten 7 von 11 in den dargestellten MS-AS Analysen isolierten Klonen aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Genen oder DNA-Segmenten identifiziert werden.

Manche Gene besitzen im Promotorbereich Regionen mit CG-Anhäufungen (Yeivin und Razin, 1993) und häufig wird diese Eigenschaft genutzt, um neue Gene im Genom zu identifizieren (Shago u. Giguere, 1996). Möglicherweise waren viele der in den MS-AS Analysen gefundenen Differenzklone aufgrund ihres hohen CG-Gehaltes mit Genen assoziiert. Die Isolierung differentiell methylierter DNA-Fragmente und ihrer Identifizierung könnte durch Anwendung der MS-AS Methode erleichtert werden. Mit Hilfe der MS-AS Methode konnten in Ad12-transformierten BHK21 Zellen und in der transgenen Zelllinie λ 12 weitere differentiell methylierte Gene und DNA-Segmente identifiziert werden.

3.5 Veränderungen im Methylierungsmuster transgener Mäuse

3.5.1 Veränderungen in IL-10 und Igf2r Methylierungsmuster in pAD2E2AL-CAT-transgenen Mäusen

Bereits im Rahmen früherer Arbeiten wurde untersucht, ob die Integration fremder DNA zu Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern in transgenen Tieren führen konnte (Diplomarbeit von Knut Müller, 1997). Die dabei analysierten Tiere waren transgen für ein 3324 Bp großes DNA-Konstrukt, bestehend aus dem späten Promotor aus Adenovirus Typ 2,

verbunden mit dem Chloramphenicol Acetyltransferase-Gen (CAT) und dem Polyadenylierungssignal aus SV40 (Langner et al., 1986). Die pAD2E2AL-CAT-transgenen Mauslinien wurden im Rahmen eines anderen Projektes zur Untersuchung der Beziehung zwischen DNA-Methylierung und Promotoraktivität in transgenen Mäusen von Clarissa Lettmann, damals in Köln, hergestellt (Lettmann et al., 1991). Dazu wurde das unmethylierte oder in vitro HpaII-vormethylierte DNA-Konstrukt in einen Vorkern der befruchteten Oozyten injiziert. Die daraus resultierenden transgenen Mauslinien trugen zwischen einer (6-2-Linie) und mehr als 20 Transgenkopien (8-1-Linie) im Genom integriert. Abhängig von der chromosomalen Integrationsstelle (Positionseffekt) behielt das Transgen in den Gründertieren das vorgegebene Methylierungsmuster bei, wurde de novo methyliert oder verlor teilweise die Methylierung. Um transgene Mauslinien zu etablieren, wurden die Gründertiere für zwei bis vier Generationen mit Mäusen des C57BL/6-Inzuchtstammes gekreuzt. Männliche und weibliche Tiere von drei etablierten transgenen Linien (5-8, 7-1 und 8-1) wurden systematisch mit Mäusen aus verschiedenen Inzuchtstämmen gekreuzt (C57BL/6, DBA/2). Diese Versuche sollten Aufschluß darüber geben, ob die Methylierung des Transgens vom Stammspezifischen Hintergrund beeinflusst werden kann. Daher wiesen alle transgenen Tiere einen gemischten genetischen Hintergrund auf (Koetsier et al., 1995)

DNA aus Organen der 5-8-, 6-2-, 7-1- und 8-1-Linie wurde verwendet, um zelluläre DNA-Segmente auf Veränderungen im Methylierungsmuster zu untersuchen. In Tieren der 7-1- und 8-1-Linie konnte im Interleukin-10- und Igf2r-Gen eine Abnahme in der Methylierung beobachtet werden (siehe Abb. 18, 19a und 19b). Besonders von Transgenloci der Maus war bekannt, daß der genetische Stammhintergrund Einfluß auf die Methylierung des Transgens nehmen konnte (Sapienza et al., 1989; Allen et al. 1990; Reik et al., 1990; Engler et al., 1991; Koetsier et al., 1995). Es wurde daher untersucht, ob IL-10 und Igf2r in verschiedenen für die Kreuzung verwendeten Inzuchtstämmen (C57BL/6, DBA/2) oder im gemischten genetischen Stammhintergrund (B6D2_{F1}) unterschiedliche Methylierungsmuster aufwiesen (siehe Abb. 20). In einer Kontrollgruppe von mindestens 40 nicht transgenen Tieren konnte für IL-10 und Igf2r kein Stamm-spezifisches Methylierungsmuster festgestellt werden. Das Methylierungsmuster dieser beiden Genen war auch nicht abhängig vom Geschlecht der Tiere. Von IAP-Sequenzen des Mausgenoms war bekannt, daß die Methylierungsmuster der DNA von C57BL/6- und DBA/2-Mäusen spezifische Unterschiede zeigten (Kuff et al., 1985). Zudem konnte im Rahmen früherer Arbeiten gezeigt werden, daß der B29-Lokus der Maus (Wood et al., 1993) eine Stamm-spezifische Methylierung aufwies (Diplomarbeit von Knut Müller, 1997). Der Unterschied im Methylierungsmuster zeigte sich in der DNA nicht transgener Kontrolltiere des C57BL/6- und DBA/2-Stammes. Eine genauere Analyse zeigte, daß ein RFLP als Ursache für diese Unterschiede ausgeschlossen werden konnte. Da Stamm-

spezifische Methylierungsmuster bereits in Tieren der Inzuchtstämme vorliegen, konnten die Methylierungsänderungen in IL-10 und Igf2r in den transgenen 7-1- und 8-1-Linien nicht durch den Stammhintergrund hervorgerufen worden sein. Andernfalls hätte sich bereits in Kontrolltieren verschiedener Stämme ein Methylierungsunterschied gezeigt. Durch Kontrollexperimente ließ sich ebenfalls ausschließen, daß die beobachteten Methylierungsänderungen in IL-10 und Igf2r abhängig vom Alter der Tiere war (Diplomarbeit von Knut Müller). Es war daher zu vermuten, daß die Integration der fremden DNA in das Mausgenom mit zu den nachgewiesenen Methylierungsänderungen beigetragen hatte.

Igf2r und Interleukin-10 zeigen im Bezug auf ihr Methylierungsmuster eine Besonderheit. Beide Gene tragen einen partiellen Methylierungsphänotyp. Im Falle einer partiellen Methylierung können in Spaltmustern von DNA, die mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonukleasen gespalten wurde, sowohl große als auch kleine Fragmente nachgewiesen werden (vergleiche Abb. 18). Die relative Signalintensität der Fragmentbanden in einer Spur ist dabei proportional zum Methylierungsgrad in dem untersuchten Gen. Solche Methylierungs-Mosaizismen wurden bereits in einzelnen Organen der Maus beobachtet (MacLeod et al., 1994; Feil et al., 1994). Der Ursprung solcher Methylierungs-Mosaizismen an verschiedenen Stellen des Genoms könnte eine inkorrekte Erhaltungsmethylierung im Verlauf der Embryonalentwicklung sein. Dadurch könnten einige Gene in verschiedenen Zellen mit unterschiedlichen Methylierungsmustern vorliegen. Im Falle von Igf2r, welches in dem untersuchten Genbereich eine allelspezifische Methylierung aufweist (Stöger et al., 1993) könnte das partielle Methylierungsmuster die allelspezifische Prägung widerspiegeln. Allerdings ist nicht bekannt, ob daß Interleukin-10-Gen der Maus allelspezifisch methyliert ist. Möglicherweise reagieren besonders solche Loci, deren Methylierung allelspezifisch oder variabel ist, auf die Integration fremder DNA in das Genom.

Die Abnahme des Methylierungsgrades in IL-10 reicht von 11% bis 25% in den transgenen Linien 7-1 und 8-1. Im Igf2r-Lokus konnte eine bis zu 25%-ige Abnahme des Methylierungsgrades mittels Phosphorimager-Analyse festgestellt werden (siehe Balkendiagramme in Abb. 18 und 19). Dabei waren der Verlust der DNA-Methylierung spezifisch für die beiden Genloci, d.h. Tiere, die in Igf2r eine geringe Methylierung zeigten, wiesen in IL-10 keine großen Methylierungsverlust auf. In anderen untersuchten Genloci konnte in gleichen Tieren keine Abweichung vom Methylierungsmuster der Kontrolltiere festgestellt werden. Diese Tatsache zeigte, daß die gefundenen Veränderungen spezifisch für Igf2r und IL-10 waren.

Zudem liegen beide Gene (Igf2r und IL-10) auf unterschiedlichen Mauschromosomen. Das Interleukin-10-Gen liegt auf Chromosom 1 (Moore et al., 1990) und Igf2r auf Chromosom 17 (Foreit u. Gregorova, 1992). Diese Daten aus den Untersuchungen zellulärer

Methylierungsmuster in pAD2E2AL-CAT transgenen Mäusen zeigen, daß der IL-10- und Igf2r-Lokus in zwei von vier untersuchten transgenen Linien gewebespezifisch verändert worden waren. Sollte die Integration der fremden DNA in das Mausgenom die Ursache für diese Veränderung gewesen sein, so hatte diese Integration auch DNA-Bereiche in trans beeinflußt, da in der 8-1-Linie das Transgen nur an einer chromosomalen Stelle integriert worden war (Koetsier et al., 1995).

3.5.2 Veränderungen im Methylierungsmuster von Bakteriophage Lambda DNA-transgenen CD-1 Mäusen

Mäuse des CD-1 Stammes, die transgen für die Bakteriophage Lambda-DNA waren, wurden in Kooperation mit Klaus Schughart (Strasbourg; damals GSF, München) hergestellt. Zwei transgene Gründertiere wurden daraufhin untersucht, ob die Integration der mikroinjizierten λ -DNA zu Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern geführt hatte. Dabei dienten nicht-transgene Geschwistertiere des gleichen Wurfes als Kontrollen.

In einem Ansatz wurden die Methylierungsmuster in DNA aus verschiedenen Organen in bis zu 10 randomisiert ausgewählten Genen untersucht. In den transgenen Gründertieren #17 und #20 konnte im Herzmuskelgewebe eine Hypermethylierung des Igf2r-Lokus gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden (siehe Abb. 23). Durch Anwendung der MS-RDA-Methode sollten weitere DNA-Segmente des Mausgenoms isoliert werden, die in λ -transgenen Mäusen differentiell methyliert waren. Dabei wurden die DNA-Proben eines bestimmten Organs aus verschiedenen Kontrolltieren gesammelt eingesetzt und in der MS-RDA Analyse mit genomischer DNA der Gründertiere verglichen. Das Sammeln der DNA aus verschiedenen Tieren sollte die Interferenz von RFLPs minimieren. Alle isolierten und in Southern-Blot getesteten Differenzklone wiesen jedoch einen RFLP in den HpaII-Erkennungsstellen verschiedener Tiere auf (Daten nicht gezeigt). Die Anreicherung von RFLPs erfolgte unabhängig vom untersuchten Organ. Da es sich bei den mittels MS-RDA isolierten DNA-Segmenten offensichtlich um polymorphe Loci handelte, konnten die Abweichungen im Methylierungsmuster der transgenen Gründertiere nicht auf die Integration der fremden DNA zurückgeführt werden. Der für die Mikroinjektion verwendete CD-1 Mausstamm stellte einen Auszuchtstamm dar, dessen Genotyp durch zufällige Verpaarung nicht so homogen war wie in Inzuchtstämmen. Möglicherweise hätte die unerwünschte Anreicherung polymorpher Loci durch die Verwendung der befruchteten Oozyten eines Inzuchtstammes für die Mikroinjektion der fremden DNA minimiert werden können. Der Vorteil bei der Verwendung befruchteter Oozyten aus Auszuchtstämmen (CD-1) oder Mäusen mit gemischtem genetischen Stammbhintergrund (B6D2_{F1}-Weibchen) beruht darauf,

daß die isolierten Embryonen eine höhere Stabilität aufweisen, d.h. die Anzahl der Embryonen, die die Prozedur der Mikroinjektion überleben, größer ist als bei Embryonen aus Inzucht-Mäusen (Heterosis-Effekt).

Andererseits zeigte die spezifische Anreicherung von DNA-Fragmenten, die in Kontrolltieren, aber nicht in transgenen Tieren vorlagen, die Effektivität der MS-RDA Methode. In mehreren Arbeiten wurde die Verwendung subtraktiver Hybridisierungstechniken wie der Repräsentativen Differenzanalyse (RDA) für die Identifizierung polymorpher DNA-Bereiche im Genom beschrieben (Xu et al., 1996; Toyota et al., 1998).

3.6 Ausblick

Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Analysen zeigen, daß die Integration fremder DNA in das Säuger genom zu Veränderungen im zellulären Methylierungs- und Expressionsmuster führen kann. Die Untersuchungen an Ad12-transformierten BHK21 Zellen zeigte, daß der onkogene Phänotyp nicht alleine auf den Einfluß adenoviraler Genprodukte zurückzuführen war. Vielmehr zeigen die Daten früherer Arbeiten (Heller et al., 1995) und die mittels MS-RDA Analyse erhaltenen Daten dieser Arbeit, daß Methylierungsänderungen im Genom durchaus durch die Integration der fremden DNA verursacht werden konnten. Dabei ist nicht auszuschließen, daß der Einfluß viraler Faktoren abhängig von der chromosomalen Lokalisation der integrierten Ad12-DNA sein kann. Es ist zu vermuten, daß die morphologische Transformation von Hamsterzellen durch Adenoviren durch eine Kombination aus viralen Faktoren (Übersicht bei Zantema et al., 1995) und strukturellen Veränderungen des Wirtsgenoms resultiert. In BHK21 Zellen, die transgen für die transkriptionell inaktive Lambda-DNA waren, konnten ebenfalls weitreichende Veränderungen in zellulären Methylierungs- und Expressionsmustern nachgewiesen werden. Zwar zeigten die transgenen Zellen keinen erkennbaren mutierten Phänotyp. Die Tatsache, daß viele der differentiell methylierten DNA-Segmente in repetitiven Sequenzen des Genoms lagen (z.B. IAP) zeigte jedoch, daß große Bereiche des Genoms verändert worden waren. Viele der in dieser und früheren Arbeiten zu dieser Fragestellung durchgeführten Kontrollexperimente analysierten kritisch die Möglichkeit, daß die experimentelle Prozedur, die für die Generierung der λ DNA-transgenen Zellen angewendet wurde, zu Veränderungen in zellulären Methylierungs- oder Expressionsmustern führen konnte. In keinem Falle konnte für die verwendete Calciumphosphat-Präzipitat Methode ein solcher Einfluß auf die Zellen festgestellt werden (Remus et al., 1999). Auch ein Einfluß der Expression des für die Selektion der transfizierten BHK21 Zellen notwendigen pSV2neo Plasmides auf zelluläre

Methylierungs- und Expressionsmuster konnte nicht festgestellt werden. Allerdings wäre die Generierung transgener Zellen ohne Selektionsmarker von Vorteil für diese Fragestellung. Aus diesem Grunde stellte die Analyse transgener Tiere, in deren Genom fremde DNA ohne einen Selektionsmarker eingebracht werden konnte, ein für diese Fragestellung wertvolles Model dar. In den untersuchten transgenen Mauslinien konnte ebenfalls in zwei Genen Methylierungsänderungen nachgewiesen werden. Die Gewebespezifität der gefundenen Veränderungen in IL-10 und Igf2r läßt vermuten, daß die Methylierungsänderung zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung etabliert worden waren. Wären die Veränderungen in frühen Stadien etabliert und stabil an Zellnachkommen weitergegeben worden, wären vermutlich in mehreren Gewebetypen Methylierungsänderungen nachweisbar gewesen. Die Anzahl der randomisiert analysierten Gene war jedoch besonders bei der Analyse der transgenen Tiere sehr limitiert und auch die Anwendung der MS-RDA konnte nicht zur Isolierung weiterer differentiell methylierter DNA-Bereiche beitragen. Möglicherweise kann mit Hilfe anderer Analyseverfahren die Frage nach Methylierungsänderungen in transgenen Tieren beantwortet werden.

Für fortführende Arbeiten wäre es interessant, den Mechanismus aufzuklären, über den die Integration fremder DNA zu veränderten Expressions- und Methylierungsmustern in trans führen kann. Die Interaktion repetitiver Sequenzen, die Aktivierung transposabler Elemente, aber auch durch Integrationsereignisse hervorgerufene Störungen der Genomstruktur könnten hier als mögliche Faktoren analysiert werden. Solche Analysen wären besonders für die Vorbereitung gentherapeutischer Verfahren sinnvoll. Die Identifizierung von Genombereichen in bestimmten Zelltypen, die mit therapeutischer DNA „belegt“ werden können, ohne zu weitreichenden Veränderungen im Wirtsgenom zu führen, könnte ein Nebenprodukt solcher Analysen sein. Darüber hinaus stellt sich auch die Frage nach der Methode, mit der eine therapeutische DNA in die Wirtszellen eingebracht werden kann, ohne der Zelle zu schaden.

4 Material

4.1 Chemikalien

(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[3-propansulfonsäure]) (HEPPS)	Sigma, Deisenhofen
2-Merkaptoethanol	Fluka, Buchs SG, Schweiz
3-[N-morpholino]-2-hydroxypropansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland
Ampicillin-Natriumsalz	Bristol-Myers GmbH, Stolberg
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, MI, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Caesiumchlorid	Gebr. Faust Feinchemikalien, Köln-Porz
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Deionisiertes Formamid	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosid-5´ - triphosphate	Promega, Madison, WI, USA
Dextransulfat, Na-Salz	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Dodecylsulfat, Na-, (SDS)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid (2, 7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenantridium-bromid)	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) („Titriplex III“)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Geniticinsulfat (G418)	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland
Glucose	Schwarz, Mannheim
Glycerin	J.T. Baker Chemikals, Deventer, Holland
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Hexamin(III)cobaltchlorid (HACoCl_3)	Sigma, Deisenhofen
Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid-hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kochsalz (NaCl)	Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck, Darmstadt
Maltose	Schwarz, Mannheim
Maltose-Monohydrat	Sigma, Deisenhofen
Mangan(II)chlorid-tetrahydrat	Merck, Darmstadt
MES (2-[N-morpholino]ethan-sulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Glücksklee, München
Natrium-acetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt

NP-40	Sigma, Deisenhofen
NZ-Amine	Otto Alday GmbH, Hamburg
Oligonukleotide d(N) ₆	Pharmacia Biotech, Frankfurt
Phenol	J.T.Baker Chemicals, Deventer, Holland
Polyethylenglykol 8000	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Schwarz, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SeaPlaque Agarose	FMC, Rockland, USA
Sephadex G-50 (medium)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Stickstoff	Linde, Höllkriegelsreuth
Streptomycin	Sigma Chemicals, St. Louis, USA
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat (Na-citrat)	Merck, Darmstadt
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Xylen Cyanol FF (XC)	Sigma, Deisenhofen

4.2 Radiochemikalien

Desoxyribonukleosid-5`-[alpha-³²P]-triphosphate,
spezifische Aktivität 3000 Ci/mM

New England Nuclear, Dreieich

4.3 Kits

QiaexII Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid maxi/ midi/ mini Kit	Qiagen, Hilden
Jetstar Plasmid midi Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
mRNA Isolierungs Kit	Boehringer, Mannheim

cDNA Subtraktions Kit

Clontech, Heidelberg

4.4 Enzyme

Die folgenden Enzyme wurden, falls nicht anders beschrieben, in den Reaktionspuffern der Hersteller und unter den von ihnen beschriebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

4.4.1 Restriktionsendonukleasen

Die einzelnen Restriktionsenzyme, die im Kapitel „Ergebnisse“ und „Diskussion“ beschrieben werden, wurden von den Firmen Boehringer GmbH, Mannheim; New England Biolabs Inc., Beverly, USA und Fermentas MBI, Wilna, Litauen bezogen.

4.4.2 Sonstige Enzyme

Advantage cDNA Polymerase Mix

Clontech, Heidelberg

AMV Reverse Transkriptase

Clontech, Heidelberg

DNaseI

Boehringer, Mannheim

HpaII Methylase

Fermentas MBI, Wilna, Litauen

Klenow-Polymerase

Boehringer, Mannheim

Mung-Bean Nuclease

New England Biolabs Inc., Beverly, USA

Proteinase K

Merck, Darmstadt

Qiagen, Hilden

Rnase H

Clontech, Heidelberg

RNaseA

Serva, Heidelberg

SssI Methylase

New England Biolabs Inc., Beverly, USA

T4 DNA Ligase

New England Biolabs Inc., Beverly, USA

Taq DNA Polymerase

Promega, Madison, WI, USA

4.5 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser, welches über eine Millipore-Super-Q Filtrationsanlage entsalzt worden war, angesetzt. Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf Gewicht pro Volumen (w/v).

20 x Genitacin (G-418 Sulfat)	20 mg/ml in 0,1 M HEPES, pH 7,3
2TY	16 g Bacto-Tryptone 10 g Bacto-Yeast-Extract 5 g NaCl auf 1l auffüllen
2TY-Agar (mit Ampicillin)	zu 2 TY 16 g/l Bacto-Agar 100 µg/ml Ampicillin zugeben
3 x EE Puffer	30 mM EPPS, pH 8,0 3 mM EDTA, pH 8,0
Chloroform (für DNA Extraktion)	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 gemischt
CMN (Transformation von Bakterien)	pro 100 ml: 1,47 g CaCl ₂ 1,39 g MnCl ₂ 40 ml 0,1 M Na-Acatat pH 6,8 - 7,0 auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen
Depurinisierungslösung für Agarosegele	0.25 M HCl
DnD-Mix	1,53 g DTT 9 ml DMSO 100 µl 1 M KAc, pH 7,5
Dulbecco modifiziertes Medium	Bablanian et al., 1965
Einfriermedium für Zellen	75% Dulbecco-Medium 15% Glycerin 10% FCS
HEPES	1 M, pH 7,0
Hoch-Salz-Puffer (Schleicher&Schuell Elu-Tip Säulen)	2.0 M NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 1.0 mM EDTA
Hybridisierungslösung	2x SSC 1% SDS 0,5% Milchpulver 0.5 mg/ml Lachsspermien-DNA 10% Dextransulfat

IPTG (Isopropylthio- β -D-galaktosid)	2 g IPTG/ 10 ml H ₂ O Lagerung bei 4°C
Lambda-Verdünnungspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM MgSO ₄
LB-Agarplatten	zu LB-Medium 1,25% Bacto-Agar hinzufügen
LB-Medium	1% Bacto-Tryptone 0,05% Bacto-Yeast-Extract 0,5% NaCl
Lysis-Puffer	0,1 M NaOH 1% SDS
Milchpulvermix (10x)	5% Magermilchpulver 10% SDS
MOPS-Puffer (1x)	20 mM MOPS 5 mM Na-Acetat, pH 5,2 1 mM EDTA, pH 7,5 mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
Niedrig-Salz-Puffer (Schleicher&Schuell Elu-Tip Säulen)	0.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 1.0 mM EDTA
NP40-Lösung	10% in H ₂ O
NZY-Medium (Transformation von Bakterien)	10 g/l Caseinhydrolysat 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt 5 g/l NaCl Nach dem Autoklavieren 1,25 ml 1 M MgCl ₂ , 1,25 ml 1 M MgSO ₄ und 2 ml 20% Glucose pro 100 ml zugeben und steril filtrieren.
Oligo-Labeling-Puffer (10x)	2,5 pg/ μ l Hexanukleotide 2 mg/ml BSA 0,5 M HEPES, pH 7,0 0,1 M MgCl ₂ 1 mM DTT
PBS	140 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM CaCl ₂ 0,03% Penicillin 0,015% Streptomycin
PBS-d	PBS ohne MgCl ₂ , CaCl ₂ und Antibiotika

Phenol, pH 7,5	Zugabe von 0,1% Hydroxychinolin nachdem das Phenol durch Ausschütteln einmal mit 0,5 M Tris-HCl pH 9,5 und zweimal mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert wurde
Prähybridisierungslösung	2x SSC 1% SDS 0,5% Magermilchpulver 0.5 mg/ml Lachsspermien-DNA
Probenpuffer für RNA zum Auftragen im Gel	50% Formamid 2,2 M Formaldehyd 1 x MOPS 1 % Ficoll
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, die 10 mg/ml in 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5 enthält, zugeben)
RNase A-Lösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 15 mM NaCl 15 min bei 100°C
Saccharoselösung	10% und 40% in TE 1 M NaCl
SM-Puffer	pro 1l 5,8 g NaCl 2,0 g MgSO ₄ ·H ₂ O 50 ml 1 M Tris-HCl , pH 7,5 5.0 ml 2% Gelatine (EK=0,01%)
SOB-Medium	2% Bacto-Tryptone 0.5 % Bacto Yeast Extrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 1,25% Bacto-Agar
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 Zitronensäure auf pH 7,0 einstellen
Stopplösung für Restriktionsenzyme (10x)	50 mM EDTA, pH 8,0
TAE (50x, pH 8,0)	242 g Tris/1l 100 mM EDTA, pH 8,0 85.5 ml/l Essigsäure
TBE (10x, pH 8,0)	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 40 mM EDTA, pH 8,0 89 mM Borsäure
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
TEN (für die Lagerung von Sephadex G-50)	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 100 mM NaCl
TFB	100 mM KCl 45 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O 10 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 3 mM H ₂ CoCl ₃ 10 mM K-MES
Top-Agar	1% Bacto-Tryptone 0,05% Bacto-Yeast-extract 0,5% NaCl 0,7% Agarose
Transferlösung für Southern-DNA-Transfer	0.4 M NaOH
Tritonlösung	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 % Triton X-100 62,5 mM EDTA, pH 8,0
Trypsinlösung	0,25% ig in Tris-Saline
Wash I	2x SSC 0,1% SDS
Wash II	0,1% SSC 0,1% SDS
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktosid)	20 mg/ml in DMF Lagerung bei -20°C

4.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

384 Pin-Replikator	V&P Scientific, Inc., San Diego, CA, USA
Analysenwaage	Sartorius, Leichlingen
Blotting Papier (GB 002- 004)	Schleicher & Schuell, Dassel
Brutschränke	Heraeus, Düsseldorf
Dialyseschläuche	Medicell International, London
Digital-pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Dot-Blot Vaccumkammer (Covertible Filtration Manifold System)	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland
Einmal-15 und 50 ml Schraubröhrchen	Greiner, Solingen
Einmal-Kanülen	Terumo, Sucursal en España, ME, USA
Einmal-Probenreaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Einmal-Spritzen	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Feinwaage	Sartorius, Leichlingen
Gelfiltrationssäulen („cDNA Spun columns“)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Glas-Kapillaren	Brand, Berlin
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Hybridisierungsröhrchen	Bachofer, Reutlingen
Membranporenfilter (0,2 µm Porendurchmesser)	Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
Membranpumpe	Vaccubrand, Wertheim
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 (positiv geladen, Qiabrane Nylon plus)	Qiagen, Hilden
Parafilm "M"	American Can Company, Greenwich, CT, USA

Peristaltische Pumpe	Stalprodukter, Uppsala, Schweden
Petrischalen	Greiner, Solingen
Phosphor-Imager BAS 1000 und Imaging Plate BAS-III _s (20x40 cm)	Fuji, Tokio, Japan
Photometer	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Pipette (0,5 - 10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipetten-Pumpen	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz	Fa. Kleef, Bonn
Refraktometer	Carl Zeiss, Jena
Röntgenfilme (X-OMAT AR und BIO-MAX)	Kodak, Rochester, NY, USA
Röntgenfilmkassetten zur Autoradiographie mit zwei Verstärkerfolien Dr. Goos Suprema	Faust, Köln
S&S Biotrap Elektroseparationssystem	Schleicher&Schuell, Dassel
Scheren und Pinzetten	Aesculap, Tuttlingen
Sonifizierer B-12	Branson sonic power, Danbury, CO, USA
Spannungsgeber (Gelelektrophorese)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Speed Vac Concentrator	Savant Instruments, Hicksville, NY, USA
β-Counter LS 6000 IC	Beckmann, München
Szintillations-Counter LS 1801	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zellulosepapier (ungebleicht)	Papierfabrik Hedwigthal, Fastnacht, Bonn
Zentrifugen:	
Biofuge Pico (Heraeus, Düsseldorf)	
Doctor (Wifug, Stockholm, Schweden)	
Labofuge GL (Heraeus, Düsseldorf)	
Medifuge 13000 (Heraeus, Düsseldorf)	

RC-5B (Sorvall, DuPont, Wilmington, USA)

J2-21 (Beckmann, München)

L8 55 M (Beckmann, München)

4.7 Mäuse

4.7.1 Transgene Mauslinien

4.7.1.1 *pAD2E2AL-CAT transgene Mäuse*

Die pAD2E2AL-CAT-transgenen Mauslinien stammen aus Mikroinjektionsexperimenten von Clarissa Lettmann (Lettmann et al., 1991), die mit befruchteten B6D2_{F1}-Oozyten durchgeführt wurden (B6D2_{F1} x B6D2_{F1}). B6D2_{F1}-Mäuse sind Hybride, die aus einer Kreuzung zwischen den Inzuchtstämmen C57Bl/6 und DBA/2 hervorgehen. Das transgene DNA-Konstrukt, bestehend aus dem späten E2A-Promotor aus Adenovirus Typ 2, verbunden mit dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) und dem Polyadenylierungssignal aus SV40 (Langner et al., 1986) wurde entweder unmethyliert oder in vitro HpaII-methyliert für die Mikroinjektion verwendet.

Um transgene Mauslinien zu etablieren, wurden die Gründertiere für zwei bis vier Generationen mit C57BL/6-Tieren gekreuzt. Männliche und weibliche Tiere von drei etablierten transgenen Linien (5-8, 7-1, 8-1) wurden systematisch gekreuzt, um Aufschluss darüber zu bekommen, ob die Methylierung des Transgens vom Stamm-spezifischen Hintergrund beeinflusst werden kann (Koetsier et al., 1996). Daher wiesen alle transgenen Tiere einen gemischten genetischen Stammbhintergrund auf.

4.7.1.2 *Bakteriophage Lambda DNA transgene Mäuse*

Die Bakteriophage Lambda DNA (48,5 kBp) wurde mit XhoI gespalten, wodurch zwei lineare DNA-Fragmente mit 33,5 kBp und 15 kBp Größe entstanden. Nach Phenolextraktion der Spaltfragmente und Ethanolpräzipitation wurde die DNA über Cäsiumchlorid-, Saccharose-Gradienten Zentrifugation oder Schleicher&Schuell Elu-Tip Säulen gereinigt. In allen Fällen wurde die DNA nach der Reinigung präzipitiert und als Ethanolpräzipitat verschickt. Die Mikroinjektionen wurden im Labor von Klaus Schughart (damals GSF, München) durchgeführt. Dazu wurde die XhoI gespaltene Bakteriophage Lambda DNA in Zygoten aus Mäusen des CD-1 Auszuchtstammes injiziert. Gründertiere und ihre nicht transgenen Geschwister wurden für die Studien zur veränderten Methylierung zellulärer Gene verwendet.

4.7.2 Kontroll-Tiere

Männliche und weibliche Mäuse aus den Inzuchtstämmen C57Bl/6 und DBA/2 sowie aus dem Hybridstamm B6D2_{F1} wurden im Alter von 4 bis 6 Wochen von Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA bezogen.

4.8 Zelllinien

Die verwendeten BHK21 Zellen stammen von Nierenzellen neugeborener Hamster ab. Die BHK21 Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA bezogen. Die Bakteriophage Lambda-DNA transgenen BHK21 Zelllinien sind ein Geschenk von Hilde Heller, Christina Kämmer und Ralph Remus aus unserem Labor. Für Experimente mit der Adenovirus Typ 12 transformierten BHK21 Zelllinien T637 und ihrer Revertanten TR3 und TR12 wurde lediglich DNA verwendet, die zu einem früheren Zeitpunkt isoliert worden war (von Hilde Heller)

4.9 Klonierte Gene und zelluläre DNA-Segmente

Interleukin 10 (IL10)	Moore <i>et al.</i> , 1990
Intrazisternales A-Partikel (IAP)	Lueders, K.K. & Kuff, E.L., 1981; Ono u. Oishi, 1983
Igf2r	Stöger <i>et al.</i> , 1993
MeA DNA-Glykosylase	Engelward <i>et al.</i> , 1993
Mouse DNA Methytransferase (Dnmt)	Zur Verfügung gestellt von S. Pradhan
5-HT1C-Rezeptor-Gen	Foguet <i>et al.</i> , 1992

4.10 Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden in unterschiedlichem Maße verwendet:

DH5 α	Geschenk von C. Schettner, Köln
XL1-blue MRF'	Geschenk von I. Muiznieks, Köln/ Riga
N1323(λ) (λ cl857-Sam7)	Geschenk von B. Müller-Hill, Köln
BHB 2600	Geschenk von A. Twiehaus

5 Methoden

5.1 Isolierung von DNA aus Organen (Gross-Bellard, 1973)

Nach dem Herausschneiden der Organe (Leber, Niere, Milz, Testis, Gehirn) wurden diese kurz in PBS-d von koagulierten Blutresten befreit, in ein 15 ml Schraubröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Organe in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in 15 ml Proteinase K-Lösung in 50 ml Röhrchen (Leber) oder 3 ml in 15 ml Röhrchen (alle anderen Organe) überführt und bis zu 16 Stunden bei 54°C im Rollschrank inkubiert. Nach der vollständigen Auflösung der Organe waren die Lösungen homogenen und hochviskos. Die Reinigung der DNA erfolgte durch Extraktion über Phenol, Phenol/ Chloroform (1:1) und Chloroform, wobei die wässrigen Oberphasen nach jedem Schritt mit einer Pasteurpipette, deren Öffnung durch Abbrechen der Spitze vergrößert wurde (Verminderung von Scherung der DNA), in ein sauberes Röhrchen überführt wurden. Aus der wässrigen Oberphase des letzten Extraktionsschrittes konnte die DNA durch Mischung mit einem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt werden. Eine Mikrokapillare diente zum Aufrollen und Isolieren der fädigen DNA. Diese wurde nach kurzem Schwenken in 96%igem und 70%igem EtOH durch Abbrechen der Kapillare in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß mit 1,5 ml TE (Leber- und Nieren-DNA) oder 0,5 ml (Testis- und Milz-DNA) überführt. Nachdem sich die DNA innerhalb von 2-3 Tagen bei 4°C gelöst hatte, wurden mit 1:200 in H₂O verdünnten Aliquots die DNA-Konzentration mit einem Spectrophotometer bei 260nm gemessen. Die OD_{260/280}-Quotienten der mit dieser Methode präparierten DNA betragen meist 1,8 bis 2,0, was auf eine ausreichende Reinheit der DNA hinwies.

5.1.1 Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen

Tieren, die auf die Integration des Transgens in ihrer DNA untersucht werden sollten, wurde im Alter von 3 bis 5 Wochen bis zu 1,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten. Durch Markierung der Ohren mit einer feinen Lochstanze konnten die Tiere eines Wurfes unterschieden werden (Hogan *et al.*, 1986). Die Schwanzspitzen wurden mit einer Schere in 3 bis 4mm lange Stücke geschnitten und zusammen mit dem aus dem Ohr gestanzten Gewebe in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert, mit 0,7 ml Proteinase K-Lösung versetzt und bis zu 16 Stunden bei 54°C im Rollschrank inkubiert. Die DNA wurde anschließend wie bei den Organen isoliert und gereinigt.

5.2 Fällung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

5.2.1 Ethanolpräzipitation

Verdünnte DNA-Lösungen können durch Ethanolpräzipitation konzentriert werden, wobei gleichzeitig Proteine und Salze entfernt werden. Ethanol entzieht der DNA in Gegenwart monovalenter Kationen die Hydrathülle und führt zur Fällung der DNA (Eickbush u. Moudrianakis, 1978). Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 und dem 2,5-fachem Volumen EtOH_{abs} (-20°C) versetzt und nach guter Durchmischung einer 20 bis 30minütigen Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C unterzogen. Daraufhin wurde das Sediment mit 70%igem EtOH gewaschen, 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in TE aufgenommen. Die Ausbeute betrug ca. 90%.

5.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch eine Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt werden. Eine Absorptionseinheit bei 260nm entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 33 µg/ml Oligonukleotiden. Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 zu der bei 280 nm (aromatische Gruppen der Proteine) bestimmt: Eine DNA ohne Proteinverunreinigungen weist ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf.

5.2.3 Restriktionsspaltung von DNA (Nathans u. Smith, 1975)

Genomische DNA wurde mit 5 bis 10 Einheiten des Restriktionsenzym pro Mikrogramm DNA mindestens 3,5 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei Spaltung genomischer DNA mit zwei Restriktionsenzymen wurde, soweit möglich, der nach Herstellerangaben geeignete Reaktionspuffer eingesetzt. Waren jedoch die optimalen Reaktionsbedingungen der Enzyme unterschiedlich, wurde die DNA zuerst mit dem Enzym, welches eine niedrige Salzkonzentration benötigte, gespalten. Dann wurde die für das zweite Enzym benötigte Salzmenge zugesetzt und eine weitere Inkubationszeit von 4 Stunden mit dem zweiten Enzym angeschlossen.

Plasmid-DNA wurde mit 3 bis 4 Einheiten Restriktionsenzym pro Mikrogramm DNA in 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

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

Spaltungsprodukte der DNA können in Agarose-Gelelektrophoresen sichtbar gemacht werden. Die Konzentration der eingesetzten Agarose richtet sich nach der Größe der linearisierten DNA und reicht von 0,3% (w/v) zur Trennung von DNA im Bereich von 5 bis 60 kBp bis 2,0% (w/v) für den Bereich von 0,1 bis 2kbp. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr), das zwischen den Basenpaaren der DNA interkaliert, kann die DNA unter UV-Licht durch die Fluoreszenzstrahlung (590nm) des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes identifiziert werden.

Genomische DNA wurde gewöhnlich über Nacht bei 1,75 V pro cm in einem 0,7%igen 20x20x0,75 cm großen Agarosegel unter Verwendung von 1xTAE oder 1xTBE als Laufpuffer getrennt. Die Verwendung von TAE als Laufpuffer führte zu einer besseren Trennung verschieden großer DNA-Fragmente als TBE. Da jedoch die Pufferkapazität von TAE nicht sehr hoch ist, wurde an die Gelkammer eine peristaltische Pumpe angeschlossen, über die der Laufpuffer zirkulierte. Dadurch konnte eine Änderung des pH-Wertes, welcher ein verändertes Laufverhalten der DNA zur Folge gehabt hätte, verhindert werden. Die Gelelektrophorese wurde abgeschlossen, wenn der Bromphenolblau-Marker 2/3 des Gels durchlaufen hatte.

Die gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Minigelen wurde mit 1xTBE als Laufpuffer bei einer Feldstärke von 10-15 V pro cm durchgeführt.

5.2.5 Reinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Sonden wurden vor ihrer Verwendung mit entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Vektor freigesetzt und in einem Agarosegel getrennt.

Zur Vorbereitung wurde das mit geeigneten Restriktionsenzymen aus den Plasmiden freigesetzte Insert in einer ersten Gelelektrophorese von der Plasmid-DNA getrennt. Die nach EtBr-Färbung sichtbare, Insert-tragende DNA-Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein zweites 0,6%iges Agarosegel eingegossen und bei 5 V pro cm einer weiteren gelelektrophoretischen Trennung unterzogen. Aus diesem Agarosegel wurde erneut die entsprechende DNA-Bande isoliert und die DNA mittels QIAquick Gel Extraktionskit eluiert. Dabei wurden die Angaben des Herstellers eingehalten.

5.3 DNA-Transfer aus Agarosegelen auf positiv geladene Nylonmembranen (Southern, 1975; Chomczynski, 1992; Koetsier *et al.*, 1993)

Nach gelelektrophoretischer Trennung genomischer DNA-Fragmente auf einem Agarosegel (0,7%; 20x20x0,75 cm) wurde das Gel für maximal 15 Minuten in 0,25N HCl geschwenkt. Diese Behandlung depurinisiert die DNA (Einzelstrangbrüche an Purinbasen) und führt bei der anschließenden Inkubation (5 Minuten) des Gels in 0,4 M NaOH (Transferlösung) zur Spaltung größerer DNA-Fragmente. Bei der verwendeten nach unten gerichteten Transfer-
Prozedur wurde die DNA durch Kapillarkräfte mit Unterstützung der Schwerkraft und der Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Hierzu wurden auf einen ca. 4 cm hohen Stapel Papierhandtücher zwei trockene und dann zwei in 0,4 M NaOH getränkte Whatman-Papiere (GB 003) in der Größe der Gelfläche gelegt und zu einer ebenen Fläche ausgerollt. Auf diesem Stapel wurde die in Transferlösung getränkte Nylonmembran gelegt und auf diese das Gel ohne Luftblasen plaziert. Durch Auflegen zwei weiterer nasser Whatman-Papiere in Gelgröße und zwei längeren, die in Vorratsbehälter mit Transferlösung hineinreichten, wurde der Blotaufbau abgeschlossen. Die stets bis zum Rand gefüllten Vorratsbehälter wurden so plaziert, daß ihr Rand etwas höher lag als das Gel. Dies ermöglichte innerhalb von 2 bis 3 Stunden einen effizienten DNA-Transfer. Nach dem Blotten wurde die Membran in 2xSSC neutralisiert und entweder sofort einer Prähybridisierung unterzogen oder bei 80°C für 1 Stunde gebacken.

5.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Feinberg u. Vogelstein, 1983, 1984)

Das von Feinberg und Vogelstein entwickelte Protokoll basiert auf der Verwendung kleiner Oligonukleotide als Starter für die Klenow-Polymerase. Für die radioaktive Markierung wurden 30-40 ng in 23 µl H₂O gelöst und 3 bis 5 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend schnell auf Eis abgekühlt, um die DNA im denaturierten Zustand zu fixieren. Dem Reaktionsansatz wurden 4 µl 10xOLB und je 1 µl nicht radioaktiv markierter Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 10 mM) zugegeben. Nachdem 5 µl radioaktiv (³²P) markierter dCTPs (50µCi) und 9 Einheiten Klenow-Polymerase zugesetzt wurden, folgte eine 2 bis 5stündige Inkubation bei 37°C.

Nicht inkorporierte ³²P-dNTPs konnten von den neu synthetisierten markierten DNA-Fragmenten durch Zentrifugation über eine Sephadex-G50-Säule getrennt werden. Die Zentrifugation (3000 U.p.M.) fand in einem 15 ml Schraubröhrchen statt, um Kontaminationen zu vermeiden (Koetsier u. Doerfler, 1995). Das Eluat, welches die markierte DNA enthielt, wurde zu 10 bis 12 ml Hybridisierungslösung gegeben.

5.5 Szintillations-Spektrometrie (Haberer, 1966)

Zur Messung der spezifischen Aktivität (cpm/ μg) einer Hybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt, wurde ein 100 μl Aliquot einer Szintillations-Spektrometrie unterzogen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß ausgestrahlte β -Teilchen mit bestimmten Molekülen zusammenstoßen, die beim Zusammenstoß Licht ausstrahlen. Das ausgestrahlte Licht wird dann gemessen. Die Messung der β -Strahlung erfolgte bei dem verwendeten Szintillations-Zähler in der Einheit cpm (Impulse pro Minute), was nur die vom Detektor gezählten Zerfälle, nicht aber die tatsächliche Anzahl der β -Teilchen angibt.

Lag der Wert der gezählten Zerfälle pro Minute und Mikrogramm DNA höher als 1×10^8 wurde die Hybridisierungslösung für eine Hybridisierung verwendet.

5.6 Isolierung und Analyse von RNA

Die bei Arbeiten mit RNA verwendete Glasware und alle Lösungen wurde unmittelbar vor Gebrauch autoklaviert. Alle weiteren Gegenstände wie Gelkammer und Gelkämme wurden vor Gebrauch ausreichend mit 0,1 N NaOH/ 1 mM EDTA und Ethanol gespült. Es wurden nur RNase freie Pippettenspitzen mit Filtereinsatz verwendet.

5.6.1 Isolierung cytoplasmatischer RNA

Cytoplasmatische RNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Scott et al., 1983 isoliert. Monolayer (75 cm^2) der jeweiligen Zelllinie wurden bei einer Zelldichte von ca. 70-80% geerntet. Nach Abgießen des Kulturmediums wurden die Zellmonolayer zwei mal mit eiskaltem Tris-Saline gewaschen und anschließend für 10 min in Tris-Saline, die 25 mM EDTA enthielt, bei RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Glaspipetten in Weißkappröhrchen gesammelt und bei 2000 U.p.M. (Wifug, Stufe III) für 5 min bei RT pelletiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Zellsediment wurde anschließend in 1 ml TSE Puffer je verwendeten 75cm^2 Monolayer resuspendiert. MgCl_2 wurde bis zu einer Endkonzentration von 5 mM und anschließend NP40 bis 0,5% (v/v) zugegeben. Durch vortexen (10-20 sec) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zellkerne durch Zentrifugation bei 8000 U.p.M. für 2 min entfernt. Der Überstand wurde mit einem Volumen Tris-HCl gesättigtem Phenol, welches auf 65°C vorgewärmt wurde, in Anwesenheit von 0,5% (w/v) SDS und 25 mM EDTA extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch zwei mal mit je zwei Volumina Phenol: Chloroform (1:1) reextrahiert und anschließend durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,5 und 3-fachem Vol abs. Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Dann wurde es bei 13,000 U.p.M. und 4°C für 10 min zentrifugiert, kurz bei RT getrocknet und in ddH₂O gelöst.

5.6.2 Poly A mRNA Selektion

Die Isolierung von poly A mRNA aus Zellen in Zellkultur wurde mit dem mRNA Isolierungs Kit von Boehringer durchgeführt. Das System basiert auf der Basenpaarung zwischen poly A Resten, die Bestandteil der meisten reifen mRNAs sind und Biotin-markierten oligo (dT)₂₀ Sonden. Die Hybride können an Streptavidin Partikeln, die ihrerseits an magnetische Partikel gebunden sind, immobilisiert werden und unter stringenten Waschbedingungen an einen Magneten gebunden werden. Die mRNA wurde durch Zugabe von ddH₂O bei 65°C eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.6.3 Northern Blot Experimente

Bis zu 2 µg poly A mRNA oder 30 µg cytoplasmatischer RNA wurden in 1%-igen Agarosegelen, die 6,6% Formaldehyd enthielten, elektrophoretisch getrennt. Zur Vorbereitung wurden die RNA Proben mit einem zweifachen Volumen des RNA-Probenpuffers versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden 2 µl des RNA Ladepuffers zugegeben.

Das Gel wurde wie folgt vorbereitet: 2,8 g Agarose wurden zunächst nach Zugabe von 174 ml ddH₂O und 56 ml 5xMOPS Puffer aufgekocht und in Lösung gebracht. Die Agaroselösung wurde im Wasserbad auf 55°C gekühlt und nach Zugabe von 50 ml 37% Formaldehyd zum Gießen des Gels verwendet. Nach Polymerisierung der Agarose erfolgte ein Vorlauf des Gels in 1xMOPS Puffer bei 2V/ cm für 10 min. Anschließend wurden die RNA Proben und 1 ng eines geeigneten, mit 0,1 M NaOH denaturierten DNA Größenmarkers auf das Gel geladen und über Nacht bei 20 V elektrophoretisch getrennt.

Der Transfer der Nukleinsäuren auf positiv geladene Nylonmembranen erfolgte mit 20xSSC als Transferpuffer. Das Gel wurde zuvor kurz mit ddH₂O gespült und anschließend in einen Blotaufbau eingebettet wie er auch für Southern-Transfer verwendet wurde. Der Transfer wurde nach 5-6 h beendet, die Nylonmembran mit 2xSSC gewaschen und zur Fixierung der Nukleinsäuren für 2 h bei 80°C gebacken.

Die Prähybridisierungs- und Hybridisierungsprozeduren gleichen denen für Southern-Blot Hybridisierung.

5.7 Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden an membrangebundene DNA oder RNA

Die nach erfolgtem Transfer an die positiv geladene Nylonmembran gebundene DNA (RNA) kann durch Hybridisierung mit homologer radioaktiv markierter DNA sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die die DNA- (RNA-) tragende Membran nach der Blotting Prozedur

kurz in 2 x SSC gewaschen, um anheftende Agarosestückchen zu entfernen. 15 ml der Prähybridisierungslösung wurden zur Denaturierung der Lachsspermien-DNA 10 Minuten bei 100°C gekocht, 5 Minuten auf Eis abgekühlt und zur aufgerollten Membran in eine Hybridisierungsröhre gegeben. In der Prähybridisierungslösung wurde die Membran entrollt und bei 68°C in einem Rollschrank für mindestens 1 Stunde inkubiert. Bei diesem Schritt werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgedeckt.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte DNA enthielt (mindestens 1×10^8 cpm/ μ g spezifische Aktivität), 10 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nachdem die Prähybridisierungslösung aus der Röhre entfernt worden war, wurde die Hybridisierungslösung zugegeben. Es empfiehlt sich, die Membran vor Zugabe der Hybridisierungslösung wieder aufzurollen und erst in der Hybridisierungslösung wieder zu entrollen. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung der Lösung während des gesamten Hybridisierungsprozesses, der bei 68°C über Nacht im Rollschrank durchgeführt wurde.

Die Membran wurde am folgenden Tag zunächst mit Wash I kurz gespült, anschließend 2 x 10 Minuten mit Wash I und 2 x 20 Minuten mit Wash II bei 68°C im Rollschrank gewaschen. Daraufhin wurde die Membran in Folie eingeschweißt und für die Autoradiographie zusammen mit einem XAR 5-Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt, die über Nacht bei -80°C gelagert wurde.

5.7.1 Autoradiographie

Die Methode der Autoradiographie beruht auf der Bildung von Silberkeimen in einer photographischen Emulsion durch β -Strahlung. Die Silberkeime werden in einem normalen Entwicklungsprozeß in schwarze Silberkörner verwandelt. Der Grad der Schwärzung ist ein Maß für die Radioaktivität. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß der Grad der Schwärzung (im Gegensatz zur Messung im Phospho-Imager) eine nichtlineare Funktion der Strahlendosis ist. Die Autoradiographie wurde auf Kodak XAR 5 Röntgenfilmen in einer Filmkassette, die mit zwei Spezialverstärkerfolien ausgestattet waren, bei -80°C durchgeführt.

5.7.2 Phospho-Imager-Auswertung

Radioaktive Signale können mit Hilfe einer *Imaging-Plate BASIII*s (20 cm x 40 cm, Fuji) im *Bio-Imaging-Analyser BAS 1000* dargestellt und ausgewertet werden. Dazu wurde die radioaktive Probe je nach Signalstärke einige Minuten bis einige Stunden auf der Platte exponiert. Die erhaltenen Signale werden als PSL-Einheiten („Photo Stimulated Luminiscence“) angegeben. PSL ist ein direktes Maß für die relative Stärke eines radioaktiven Signals und der Expositionszeit direkt proportional.

5.8 Computergestützte Sequenzanalyse

Für die Analyse von Sequenzen wurde das Programmpaket der „University of Wisconsin Genetics Group“ (UWGCG) verwendet. Als Computerhardware standen hierzu PC486-Rechner zur Verfügung. Für die Analysen wurden Kopien der EMBL DNA Datenbank Version 38 (Stoehr et al., 1991) abgefragt.

5.9 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Antair BSK) durchgeführt. Das verwendete Medium und der Waschpuffer wurden auf 37°C, das Serum und die Trypsin-Lösung auf Raumtemperatur vorgewärmt.

5.9.1 Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in 75 cm² oder in 175 cm² Gewebekulturflaschen aus Kunststoff bei 37°C vermehrt. Die Zellen wuchsen, je nach Zelllinie, in 2-3 Tagen zu einem konfluenten Zellrasen und wurden dann wieder neu ausgesät.

In eine neue Gewebekulturflasche wurden 30 bzw. 75 ml Dulbeccos modifiziertes Medium (Bablanian et al., 1965) vorgelegt, das 10% fötales Kälberserum enthielt. Um konfluent gewachsene Zellen auf neue Gewebekulturflaschen auszusäen, wurde zunächst das alte Medium vollständig abgegossen und die Zellen zweimal mit PBS-d gewaschen. Anschließend wurden sie mit 1 bzw. 3 ml Trypsinlösung versetzt und nach kurzer Inkubationszeit durch leichtes Klopfen gegen die Gefäßwand abgelöst. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und ein Aliquot (10-20%) der Zellsuspension in die vorbereiteten Gewebekulturflaschen überführt.

Die ausgesäten Zellen wurden in geschlossenen Kulturflaschen im Warmraum bei 37°C inkubiert.

5.9.2 Einfrieren von Zellen

Trypsinierte Zellen einer 75 cm²-Gewebekulturflasche wurden in einem Glasröhrchen (13 ml, Pyrex), in dem 0,5 ml FCS vorgelegt war, zentrifugiert (Wifug Doctor, Stufe I, 1,250 U.p.M., 10 min, RT). Das Zellsediment wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Schraubröhrchen (Cryotubes, Greiner) überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.9.3 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden nach Erwärmen auf 37°C in 75 cm²-Gewebekulturflaschen mit Dulbecco-Medium gegeben, das 20% FCS enthielt. Das Medium wurde am nächsten Tag erneuert.

5.9.4 Einzelzellklonierung

Für die Einzelzellklonierung wurden die Zellen passagiert und dreimal 1:100 in Dulbecco-Medium (10% FCS) verdünnt. Die letzte Verdünnung wurde auf Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen mit 0,2 ml Medium pro Vertiefung ausplattiert und bei 37°C, 85% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach einigen Stunden wurden die Vertiefungen unter dem Mikroskop auf die Anwesenheit von Einzelzellen untersucht. Im Verlauf der weiteren Wachstumszeit wurde wiederholt kontrolliert, ob die Zellen nur aus einer Zelle hervorgegangen waren. Sobald die Fläche der Vertiefungen einen konfluenten Zellrasen aufwies, wurden die Zellen dreimal 1:250 verdünnt und erneut in Vertiefungen einer neuen Gewebekulturplatte gegeben. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt, wodurch die Wahrscheinlichkeit verringert werden sollte, daß noch Zellgemische vorlagen. Nach der dritten Einzelzellklonierung wurden die Zellen zunächst auf Gewebekulturplatten mit 24 und anschließend 6 Vertiefungen passagiert. Die Zellen wurden dann auf 75 cm²-Kulturflaschen weiter kultiviert.

5.10 Aufbewahrung und Kultivierung von Bakterien

Siehe Diplomarbeit von K. Müller (1997)

5.11 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Das am häufigsten verwendete Protokoll zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA geht auf eine von Hannahan beschriebene Methode zurück.

Dazu wurde von einer frischen XL1-BlueMRF[']-Plattenkultur eine Kolonie isoliert und über Nacht in 5 ml SOB Medium bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten

Morgen wurde die Bakterienlösung 1:50 mit SOB in einem Gesamtvolumen von 25 ml verdünnt und für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 10-minütiger Kühlung der Bakterienlösung auf Eis werden die Bakterien 10 min bei 3000 U.p.M. und 4°C in einem 50 ml Falconröhrchen zentrifugiert und das Bakteriensediment in 8,5 ml TFB Puffer durch vortexen resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf Eis gekühlt und wiederum unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das in 2 ml TFB resuspendierte Bakteriensediment wurde mit 70 µl DnD-Mix versetzt und 10 Minuten unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 70 µl DnD-Mix und kurzer Kühlung auf Eis werden 200 µl der Bakterienlösung mit bis zu 1 ng eines Plasmides oder Ligationsansatzes gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 90 sec einem Hitzeschock unterzogen. Der Ansatz wurde schnell auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 1 ml SOC Medium eine Stunde bei 37°C geschüttelt.

Aliquots dieser Bakterienkultur werden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Insert-positive weisse Kolonien konnten nach dieser Blau-Weiß Selektion ausgewählt werden.

5.11.1 Reinigung großer Plasmidmengen über Säulen

Die Reinigung großer Plasmidmengen erfolgte mit dem *Plasmid Midi Kit* von Genomed. Das Prinzip der für das *Genomed Midi Kit* verwendeten Reinigungsmethode für Plasmide aus Bakterien wurde bereits 1979 von Birnboim und Doly beschrieben. Nach alkalischer Lyse der Bakterien und grober Entfernung der Proteine, des SDS und der chromosomalen DNA mit einer Kaliumacetatlösung wurde die Plasmid-DNA mit der Genomed-Säule von restlichen Proteinen und RNA gereinigt. Die Säulen basieren auf einer modifizierten Silicagelmatrix nach dem Verfahren eines Anionenaustauschers. Verunreinigungen wurden mit einem salzhaltigen Puffer entfernt, bei dessen Konzentration die Plasmid-DNA noch nicht eluiert. Durch Erhöhung der Ionenstärke wurde die DNA von der Säule gewaschen und anschließend mit Isopropanol entsalzt und präzipitiert.

5.11.2 T-Vektor Klonierungs-Systeme (Promega)

Klonierungsvektoren mit überhängenden Thyminresten an beiden Seiten der Ligationstelle wurden verwendet, um PCR-Produkte, die mit einer Taq DNA-Polymerase generiert wurden, effizient zu klonieren. Dieser Vorgang wurde durch die Eigenschaft der Taq-Polymerase, bei Überschuß von freien dNTPs an den zu synthetisierenden DNA-Strang ein Adenosin anzuhängen, ermöglicht. Das von Promega verwendete System wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.12 In vitro Methylierung von 5'-CG-3'-haltigen DNA-Fragmenten

Die in vitro Methylierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurde in einem Methylasepuffer unter Zugabe von 2-5 U/ μ g Methylase (HpaII- oder SssI-Methylase) durchgeführt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurde dem Ansatz eine frische Dosis des Methyl donors S-Adenosylmethionin zugegeben und für weitere 5 Stunden inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Proteinase K/SDS-Behandlung und anschließender Phenolextraktion. Nach Ethanolpräzipitation wurde die DNA in TE oder ddH₂O gelöst. Eine Kontrolle der Methylierung erfolgte mittels methylierungs-sensitiver Restriktionsenzyme.

5.13 Oligo-Desoxyribonukleotid-Primer

5.13.1 Für die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente in pGEM-T Vektoren

Name	Sequenz: 5'-3'	Länge (nt)	G/C-Gehalt (%)	T _m °C (1 M Na ⁺)
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	19	36	61
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	40	64

5.13.2 Für die Methylierungs-Sensitive repräsentative Differenzanalyse (MS-RDA)

Name	Sequenz: 5'-3'	Länge (nt)	G/C-Gehalt (%)	T _m °C (1 M Na ⁺)
R1	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAC	24	62	79
R2	CGGTCGGTGAG	11	72	49
J1	ACCGACGTCGACTATCCATGAAAC	24	50	74
J2	CGGTTTCATGG	11	54	43
N1	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAC	24	58	77
N2	CGGTCCCTCGG	11	81	54
S1	ACTTCTACGGCTGAATTCCGACAC	24	50	74
S2	CGGTGTCGGAAT	12	58	49

5.13.3 Für die cDNA Subtraktion

Name	Sequenz: 5' - 3'
cDNA Synthese Primer	TTTTGTACAAGCTT ₃₀ N ₁ N
G3PDH5'	ACCACAGTCCATGCCATCAC
G3PDH3'	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
P1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NP1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
NP2	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
Ad1-top	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
Ad1- bottom	ACCTGCCCCG
Ad2-top	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
Ad2- bottom	ACCTCGGCCG

5.13.4 Für die Methylierungs-Sensitive Amplicon Subtraktion (MS-AS)

Name	Sequenz: 5' - 3'
R1	AGCACTCTCAGCCTCTCACCGAC
R2	CGGTCGGTGAG
P1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NP1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
NP2	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
Ad1-top	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
Ad1- bottom	ACCTGCCCCG
Ad2-top	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
Ad2- bottom	ACCTCGGCCG
S1	ACTTCTACGGCTGAATTCCGACAC
S2	CGGTGTCGGAAT

5.13.5 Für die Amplifikation eines β -Actin Subfragmentes aus genomischer DNA

Name	Sequenz: 5´- 3´
β -Actin	AGTGATGATGATATCGCCGC
β -Actin rev.	GTGTGGTGCCAGATTTTCTCC

5.14 Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA-Fragmenten

Die Nukleotidsequenzen wurden mit einem automatischen DNA-Sequenzierer der Firma Applied Biosystems (373A) bestimmt. Die Funktionsweise des Gerätes arbeitet nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) mit fluoreszierenden ddNTPs. Die Sequenzierung wurde von Birgit Schmitz in unserem Labor durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurden 1 μ g Insert-tragende Plasmid-DNA nach Denaturierung mit NaOH mittels Zugabe von NH_4Ac (EK: 1 M) und 3-fachem Volumen Ethanol abs.bei RT über Nacht präzipitiert. Die gefällte DNA wurde nochmals mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 μ l ddH₂O gelöst. Die Sequenzierung wurde nach Zugabe von 50 ng (in 2 μ l) eines spezifischen Primers durchgeführt.

5.15 Extraktion und Reinigung von Lambda-DNA aus lysogenen Bakterien

Siehe Diplomarbeit von K. Müller (1997).

5.16 Identifizierung und Isolierung differentiell methylierter DNA-Fragmente aus komplexen Genomen: Methylierungs-Sensitive repräsentative Differenzanalyse (MS-RDA)

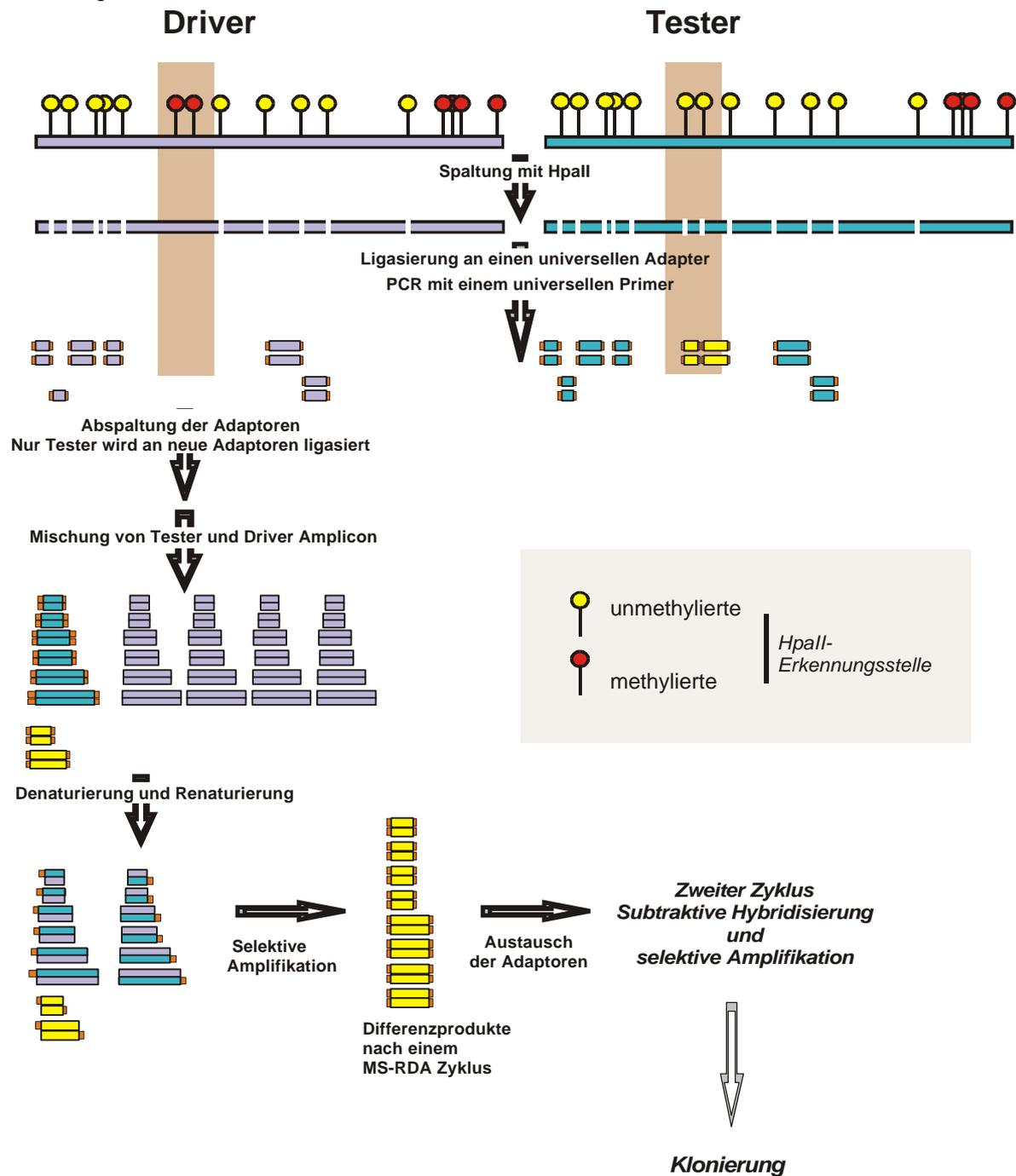
Um eine Genom-weite Suche nach DNA-Segmenten durchzuführen, die in transformierten oder transgenen Zellen eine gegenüber der normalen BHK21 Ursprungszelllinie veränderte Methylierung aufwiesen, wurde u.a. ein von Ushijima et al. (1997) modifiziertes Protokoll verwendet. Das Verfahren basiert auf einer von Lisitsyn und Mitarbeitern (1993) entwickelten Methode, in der subtraktive Hybridisierungen und selektive PCR zur Anreicherung von DNA-Fragmenten führt, die in der Test-DNA (Tester), nicht aber in der Steuerungs-DNA (Driver) vorhanden sind (siehe auch schematische Darstellung der MS-RDA in Abbildung 1). Ursprünglich wurde die repräsentative Differenzanalyse (RDA) entwickelt, um DNA-Abschnitte, die in Krebszellen deletiert oder amplifiziert sind, zu

isolieren. Die erste Phase jeder RDA-Technik umfaßt die Herstellung einer Repräsentation der beiden zu vergleichenden Genome. Dabei werden die genomischen DNA-Proben von Tester und Driver mit Restriktionsendonukleasen gespalten, an universelle Oligonukleotid-Adapter ligasiert und durch Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Die PCR-Bedingungen werden so gewählt, daß nur kleine DNA-Fragmente (1 bis 2,5 kBp) effizient amplifiziert werden können. Dadurch wird erreicht, daß die Fragmentkomplexität der Repräsentationen (Amplicons) um ein Vielfaches niedriger liegt als in der ursprünglichen DNA. Diese Reduktion der Fragmentkomplexität erhöht die Effizienz der zweiten Phase erheblich, in der wiederholte Zyklen aus subtraktiver Hybridisierung und selektiver PCR zur Anreicherung von DNA-Fragmenten führt, die nur im Tester-Amplicon vorliegen.

Um dieses Prinzip für die Isolierung unterschiedlich methylierter DNA-Fragmente nutzbar zu machen, werden bei der MS-RDA Oligonukleotid-Adapter verwendet, die an 5'-GC-Überhänge ligasiert werden können, die nach Spaltung genomischer DNA mit der Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonuklease HpaII (5'-CCGG-3') entstehen. Sind die Erkennungsstellen für HpaII in einem bestimmten DNA-Bereich methyliert, kann das Enzym dort nicht spalten und es entsteht ein großes DNA-Fragment. Liegt der gleiche DNA-Bereich in der Tester-DNA jedoch unmethyliert vor, so entstehen hier nach Spaltung kleinere DNA-Fragmente (z.B. kleiner als 3 kBp). Nach Ligasierung der DNA-Fragmente an universelle Adapter, können in der darauffolgenden PCR nur die kleinen HpaII-Spaltfragmente der Tester-DNA, nicht aber die großen des gleichen Bereiches in der Driver-DNA amplifiziert werden. In weiteren Schritten werden die universellen Adapter von den Amplicon-Fragmenten abgespalten und nur die Tester-Fragmente an neue Adapter ligasiert. Die Mischung aus Adapter-tragenden Tester-Fragmenten und einem Überschuß an Driver-Fragmenten wird denaturiert und renaturiert. In der anschließenden PCR können nur jene Tester-DNA Fragmente effizient amplifiziert werden, die keinen homologen Partner im Überschuß der Driver Fragmente hatten und infolge dessen Adaptermoleküle an beiden Seiten des DNA-Moleküls tragen. Eine weitere subtraktive Hybridisierung und PCR führt zu einer noch höheren Anreicherung der Tester-Fragmente. Im Verlauf der subtraktiven Hybridisierungen kommt es zu einer gleichzeitigen Reduktion derjenigen DNA-Fragmente, die in beiden Repräsentationen vorhanden sind.

Abb. 1: Prinzip der Methylierungs-sensitiven Amplicon-Subtraktion (MS-RDA)

Erklärungen im Text



5.16.1 Durchführung der MS-RDA

5.16.1.1 Amplicon-Präparation

Nach Spaltung von 20 µg der Tester- und Driver-DNA mit einem Überschuß der Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonuklease *HpaII* erfolgte eine Extraktion der

Spaltfragmente durch Phenol/ Chloroform und anschließender Ethanol-fällung. Nach Lösung des Präzipitats in 30 µl ddH₂O wurden 1 µg der Spaltprodukte an 500 pmol R-Adapter (Hybridisierungsprodukt aus den Primern R1 und R2) ligasiert. Präsentationen (Amplicons) wurden durch Amplifikation der Ligationsprodukte in 25 bis 30 PCR Zyklen unter Verwendung des R1-Primers hergestellt. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

	Ausgangs- lösung	Zu verwendendes Volumen [µl]	Amplifikationsbedingungen
Ligationslösung		3	72°C, 3 min
10 x PCR Puffer III	10 x	40	 95°C, 1 min 72°C, 3 min x 25-30
dNTP-Mix	je 25 mM	4,8	
R1-Primer	50µM	8	
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	3	
ddH ₂ O		343,2	
Gesamt		402 µl	

Für die Herstellung des Driver-Amplicons wurden 10 Ansätze und für die Herstellung des Tester-Amplicons ein Ansatz mit obiger Zusammensetzung benötigt. Je 10 µl jedes PCR-Ansatzes wurden anschließend in einem 1,5% igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, um Produktmenge und Produktgröße zu überprüfen. Optimalerweise hatten die Produkte eine Größe zwischen 2,5 kBp und 300 Basenpaaren. Die PCR-Produkte wurden zweimal mit Phenol und zweimal mit Chloroform extrahiert und anschließend durch Zugabe von einem halben Volumen 7,5 M NH₄Ac und 3 Volumen EtOH abs. gefällt. Nach Lösung der Präzipitate in einem geeigneten Volumen ddH₂O erfolgte die Abspaltung der Adapter mit MspI.

5.16.1.2 Adapterabspaltung

Die in ddH₂O gelösten PCR-Produkte wurden mit je 5U/µg der Restriktionsendonuklease MspI (5'-CCGG-3') gespalten. Dieses Enzym ist ein Isoschizomer zu HpaII, spaltet an den Erkennungstellen jedoch unabhängig von der Methylierung. Die Restriktionsspaltung wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms und Phenolextraktion der Spaltungsfragmente gestoppt. Die Adapter werden durch Gelfiltration (cDNA spun columns, Pharmacia) von größeren DNA-Fragmenten getrennt. Aliquots von je 10 µl des Eluats aus der Gelfiltration und der Fraktion vor der Reinigung wurden in einem 2% igen Agarosegel getrennt, um die Trennung der abgespaltenen Adapter von größeren DNA-Fragmenten zu überprüfen.

5.16.1.3 Kompetitive Hybridisierung und selektive Amplifikation

Nur an das Tester-Amplicon (200 ng) wurden 500 pmol des J-Adapters (Hybridisierungsprodukt aus Primer J1 und J2) ligasiert. Anschließend wurde das Volumen des Ligationsansatzes mit TE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und die Ligationsprodukte einmal mit einem Volumen Phenol extrahiert. Nach Mischung der wässrigen Oberphase mit 40 µg des Driver-Amplicons in einem Gesamtvolumen von 400 µl wurde der Ansatz noch einmal mit Phenol und zweimal mit Chloroform extrahiert. Das Präziptat aus der darauffolgenden Ethanol-fällung wurde in 4 µl des 3 x EE-Puffers gelöst, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und für 10 min bei 96°C in einer PCR-Maschine denaturiert. Die denaturierte Driver-Tester-Mischung wurde mit 1 µl 5 M NaCl versetzt und anschließend weitere 16 Stunden bei 67°C im Thermal-Cycler inkubiert.

Durch Zugabe von 45 µl 1 M NaCl in TE (auf 67°C vorgewärmt) wurde die Mischungsprobe verdünnt (verd. Mix) und die kompetitive Hybrisierung beendet. Ein Aliquot der Hybrisierungsprodukte wurde sofort mittels PCR amplifiziert:

PCR-1:

	Ausgangs- lösung	Zu verwendendes Volumen [µl]	Amplifikationsbedingungen
10 x PCR Puffer III	10 x	40	72°C, 3 min ← 5 µl verd. Mix
dNTP-Mix	je 25 mM	4,8	
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	3	95°C, 1 min ← 8 µl J1-Primer
ddH ₂ O		343,2	
			70°C, 3 min x 13
Gesamt		391 µl	

Der PCR-Probe wurden 5 µl der verdünnten Mischung aus Tester und Driver zugegeben und die Amplifikation nach Inkubation bei 72°C für 3 min durch Zugabe von 5 µl des J1-Primers (50 µM Ausgangskonzentration) gestartet.

Nach Ablauf der Amplifikation wurde die PCR-Probe 10 min bei 72°C inkubiert, mit 40 µl 10 mM ZnSO₄ und 100 U Mung-Bean Nuklease (MBN) versetzt und anschließend 30 min auf 30°C erwärmt. Dieser Schritt dient dem Abbau einzelsträngiger PCR-Syntheseprodukte. Doppelsträngige DNA wurde durch Phenol und Chloroform extrahiert, mit Ethanol und

NH₄Ac gefällt und in einem geeigneten Volumen ddH₂O gelöst. 5 µl dieser DNA-Lösung wurden in einer weiteren PCR mit dem J1-Primer amplifiziert.

PCR-2:

	Ausgangs- lösung	Zu verwendendes Volumen [μ l]	Amplifikationsbedingungen
10 x PCR Puffer III	10 x	40	95°C, 3 min
dNTP-Mix	je 25 mM	4,8	
Taq DNA Polymerase	5 U/ μ l	3	95°C, 1 min
MBN beh. Lösung		5	
ddH ₂ O		341,2	70°C, 3 min
Gesamt		394 μl	

8 μ l J1-Primer
x 25

Dem PCR-Ansatz wurden 8 μ l des J1-Primers (50 μ M) zugegeben, sobald das Reaktionsgefäß auf 95°C erhitzt worden war. Die PCR-Produkte aus diesem ersten Zyklus wurden nach Phenolextraktion für einen weiteren Zyklus kompetitiver Hybridisierung verwendet. Dazu wurden die Adapter nochmals gewechselt (N-Adapter) und nur 40 ng der Produkte des ersten Zyklusses mit 40 μ g Driver-Amplicon gemischt. Die subtraktive Hybridisierung und die selektive Amplifikation wurden wie im ersten Zyklus durchgeführt.

5.16.1.4 Selektion und Analyse der Differenzprodukte des zweiten MS-RDA Zyklus

PCR Produkte wurden nach zwei Runden subtraktiver Hybridisierung in den pGEM-T Vektor kloniert und in kompetente XL1BlueMRF' transfiziert. Insert-positive Klone wurden nach Blau-Weiss-Selektion isoliert und in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen mit je 180 μ l LB-Medium, welches 100 μ g/ml Ampicillin enthielt, über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler vermehrt. Je 3 μ l jeder der 96 Bakterienkulturen wurde für eine PCR mit dem SP6- und T7-Primer verwendet, bei der die Plasmid-Inserts amplifiziert wurden. Für diese PCR wurde der Standard-Reaktionspuffer von Promega verwendet.

Insert-PCR:

	Ausgangs- lösung	Zu verwendendes Volumen [μl]	Amplifikationsbedingungen
10 x PCR Puffer	10 x	4	96°C, 3 min
MgCl ₂	25 mM	4	
dNTP-Mix	je 25 mM	0,48	94°C, 30 sec
T7/Sp6-Mix	je 50 μ M	0,4	
Taq DNA Polymerase	5 U/ μ l	0,3	
Bakterienkultur		3	60°C, 1,5 min
ddH ₂ O		27,82	
Gesamt		40 μl	x 30

Die PCR-Produkte wurden anschließend in 0,8 M NaOH, 50 mM EDTA denaturiert und mittels Dot-Blot auf zwei positiv geladenen Nylonmembranen identisch angeordnet. Die beiden identischen Membranen wurden mit ³²P-markierter Amplicon-DNA von Tester und Driver hybridisiert. Die dazu verwendeten Amplicons wurden mit dem S-Adapter (bestehend aus Primer S1 und S2) und dem S1-Primer, der im Verlauf der MS-RDA nicht verwendet wurde, hergestellt. Dadurch konnten Kreuzhybridisierungen der Adapter bei der Dot-Blot-Hybridisierung ausgeschlossen werden.

Positive Klone wurden anhand der Signalintensitätsunterschiede zwischen Tester und Driver selektiert und in Southern-Blot Experimenten verwendet, um zu bestimmen, ob und in welchem Maße die selektierten Klone Unterschiede in der Methylierung in genomischer DNA aus Tester und Driver zeigt.

5.17 Isolierung differentiell exprimierter Gene: cDNA-Subtraktion (Ditchenko et al., 1996)

Um Unterschiede in der Genexpression zwischen transformierten oder transgenen BHK21-Zellen und normalen BHK21-Zellen zu analysieren wurde eine von Ditchenko und Mitarbeitern entwickelte Methode genutzt. Die Methode basiert hauptsächlich auf der Anwendung einer als suppressiven PCR beschriebenen Prozedur (Siebert et al., 1995), zusammen mit einer Normalisierung und Subtraktion der zu vergleichenden cDNA Bibliotheken in einem Schritt. Nur cDNAs, die in der Tester Zelllinie, nicht aber in der Driver Zelllinie vorhanden sind, werden angereichert, während die Synthese von cDNAs, die in

beiden Zelllinien vorliegen, unterdrückt wird. Die zur Durchführung notwendigen Komponenten wurden als Multi-Komponenten-System von der Firma Clontech bezogen.

Zur Vorbereitung wurde aus den zu untersuchenden Zelllinien poly A mRNA isoliert (Boehringer). Von der Tester und Driver Zelllinie wurde mit 2 µg poly A mRNA mittels der cDNA-Synthese Primer cDNA Präparationen hergestellt. In allen weiteren Schritten wurden genau die Angaben des Herstellers befolgt. Für PCR Reaktionen wurde der Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) verwendet.

Differenzprodukte wurden nach einem Durchgang in den pGEM-T Vektor (Promega) kloniert und mit Standardmethoden in XL1BlueMRF' transfiziert. Insert-positive Bakterienklone wurden in 180 µl LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) üN bei 37°C in 96-Loch Platten vermehrt. 3 µl der Bakterienkultur wurden für eine PCR mit dem SP6 und T7-Primer verwendet (siehe oben). Die amplifizierte Plasmid-Inserts wurden in 384-Loch Platten transferiert, mit 0,8 M NaOH/ 50 mM EDTA (beides EK) versetzt und mit dem 384-Spitzen-Replikator auf positive geladene GeneScreen Plus Membranen aufgetragen. Auf diese Weise wurden zwei Membranen mit identischer Klonanordnung hergestellt, die anschließend gegen ³²P-markierte cDNA Präparationen von Tester und Driver hybridisiert wurden. Positive Klone aus diesem inversen Northern-Blot Experiment wurden selektiert und für Northern-Blot Analysen mit cytoplasmatischer RNA oder poly A mRNA verwendet.

5.18 Methylierungs-sensitive Amplicon Subtraktion (MS-AS)

Im folgenden wird lediglich die Durchführung der MS-AS beschrieben. Eine genauere Betrachtung dieser neuen Technik erfolgt im Ergebnisteil dieser Arbeit.

Genomische DNA (5 µg) von Tester und Driver wurden mit einem Überschuß der Restriktionsendonuklease HpaII gespalten. Die Spaltprodukte wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und nach Ethanol-fällung in ddH₂O gelöst. 200 ng der DNA-Fragmente wurden an 500 pmol des R-Adapters ligasiert und in einer PCR mit dem R1-Primer amplifiziert (siehe Ampliconpräparation bei MS-RDA). Die gewählten PCR-Bedingungen wurden bereits beschrieben (Lisitsyn et al., 1993). Die PCR Produkte wurden mit RsaI gespalten, um DNA-Fragmente mit „glatten“ Enden zu erhalten. Das Tester Amplicon wurde dann in zwei Portionen von 500 ng aufgeteilt und jede an unterschiedliche Adapter ligasiert (Adapter L oder R). Anschließend werden zwei Hybridisierungen durchgeführt. In der ersten Hybridisierung werden 2 µl der RsaI gespaltenen Amplicon DNA des Drivers (1 bis 2 µg) zusammen mit 1 µl der Adapter-ligierten Tester Amplicons (50 ng) und einem 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer (200 mM Hepes, pH 8,3, 2 M NaCl, 0,08 M EDTA, pH 8,0, 40% PEG 8000) gemischt. Die beiden Lösungen werden mit Mineralöl überschichtet, die DNA bei 98°C für 2 min denaturiert und bei 68°C für 8 Stunden

renaturiert. Alle Schritte wurden in einem Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480 durchgeführt. Für die zweite Hybridisierung wurden die beiden Proben aus der ersten Hybridisierung vereinigt und gleichzeitig eine frische Dosis denaturiertes Driver Amplicon (500 ng in 1 µl) zugegeben. Die zweite Hybridisierung wurde für weitere 16 Stunden bei 68°C im Thermalcycler durchgeführt und anschließend durch Zugabe von 200 µl des auf 68°C vorgeheizten Verdünnungspuffer (20 mM Hepes, 50 mM NaCl, 0,2 mM EDTA) gestoppt. 1 µl der verdünnten Hybridisierungsprobe wurden in einer PCR mit dem P1-Primer amplifiziert. Für diese PCR und die darauffolgende wurde der Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) und der mitgelieferte Standardpuffer verwendet.

	verwendetes Volumen [µl]
ddH ₂ O	19,5
10 x PCR Puffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
PCR Primer P1 (10µM)	1,0
50 x Advantage 2 Pol. Mix	0,5
verd. Hybridisierungsprobe	1,0
Gesamt	25 µl

Die PCR-Proben wurden zunächst für 5 min bei 75°C inkubiert, um die Adapter aufzufüllen. Für die Amplifikation wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

94°C, 30 sec	x 27
66°C, 30 sec	
72°C, 1,5 min	

Die Produkte aus dieser Amplifikation wurden 1:10 in ddH₂O verdünnt und 1 µl für eine weitere Amplifikation verwendet, die unter folgenden Bedingungen und folgender Zusammensetzung durchgeführt wurde:

	verwendetes Volumen [µl]
ddH ₂ O	18,5
10 x PCR Puffer	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
PCR Primer NP1 (10µM)	1,0
PCR Primer NP2 (10µM)	1,0
50 x Advantage 2 Pol. Mix	0,5

verd. PCR Probe	1,0
Gesamt	25 μ l

Reaktionsbedingungen:

94°C, 30 sec		x 12
68°C, 30 sec		
72°C, 1,5 min		

Die PCR Mischung sollte nun mit Fragmenten angereichert sein, die ausschließlich im Tester Amplicon vorlagen. Die Klonierung der Amplifikationsprodukte erfolgte in den pGEM-T Vektor, der, wie bereits im Abschnitt über die MS-RDA beschrieben, in XL1BlueMRF' transfiziert wurde. Die Selektion der Differenzprodukte, bevor sie individuell für Southern-Blot Analysen verwendet wurden, wurde ebenfalls bereits beschrieben.

6 Zusammenfassung

In früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium konnten bereits in Hamsterzellen, die transgen für Adenovirus Typ 12 (Ad12) DNA waren, Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer Gene nachgewiesen werden (Heller et al., 1995). Diese Ad12-transgenen BHK21 Zellen exprimierten frühe virale Gene und wiesen einen transformierten Phänotyp auf. In BHK21 Zellen, die mit Ad12 infiziert worden waren, konnten keine Methylierungsänderungen in zellulären Genen nachgewiesen werden, obwohl diese ein den Transkriptionsmuster aufwiesen, das transformierten BHK21 Zellen vergleichbar war (Ortin et al., 1976). Es wurde daher argumentiert, daß die Methylierungsänderungen nicht ausschließlich auf den Einfluß viraler Faktoren zurückzuführen seien, sondern eher durch die Integration der fremden (Ad12) DNA verursacht worden waren. Um dieser Hypothese gezielter nachzugehen, wurden BHK21 Zellen hergestellt, die transgen für Bakteriophage Lambda-DNA und pSV2neo-Plasmid-DNA waren. Mit Hilfe dieses Testsystems sollte untersucht werden, ob die Integration fremder und transkriptionell inaktiver DNA *per se* zu weitreichenden Methylierungsänderungen zellulärer Bereiche im Wirtsgenom führen konnte. Bereits in Ad12-transformierten BHK21 Zellen zeigten sich Veränderungen in den Sequenzen der Intrazisternalen A Partikel, die mit ca. 900 Kopien pro haploidem Genom auf verschiedenen Hamsterchromosomen vorkamen (Meyer zu Altenschildesche et al., 1996). Da die Ad12-DNA in diesen Zellen an einer chromosomalen Stelle integriert worden war, wurde die Frage nach einer möglichen „Fernwirkung“ der integrierten DNA gestellt.

In einigen der λ DNA-transgenen Hamsterzellen konnte jedoch in einer limitierten Anzahl randomisiert ausgewählter Genen und DNA-Bereiche nur in den Sequenzen der Intrazisternalen A Partikel eine Methylierungsänderung beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer Fortführung dieser Fragestellung verschiedene Analysemethoden etabliert, die eine Genom-weite Suche nach differentiell methylierten oder differentiell exprimierten DNA-Segmenten ermöglichten. Mit Hilfe der von Ushijima und Mitarbeitern entwickelten Methylierungs-sensitiven repräsentativen Differenzanalyse (MS-RDA) konnten mehrere DNA-Segmente isoliert werden, die in Bakteriophage- λ - sowie Ad12-transgenen BHK21 Zellen Methylierungsänderungen zeigten.

Viele der mittels MS-RDA isolierten DNA-Fragmente stammten aus repetitiven Sequenzen des Hamstergenoms, die nicht aufgrund einer Homologie zu bekannten Genen oder DNA-Segmenten identifiziert werden konnten. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein neues Protokoll zur Isolierung differentiell methylierter DNA-Bereiche aus komplexen Genomen entwickelt. Diese

als Methylierungs-sensitive Amplicon Subtraktion (MS-AS) bezeichnete Methode (Müller u. Doerfler, Manuskript in Vorbereitung) hatte gegenüber der MS-RDA Methode einige Vorteile. Die MS-AS Prozedur benötigt nur einen Zyklus subtraktiver Hybridisierung. Viele der mittels MS-AS isolierten in λ DNA-transgenen BHK21 Zellen differentiell methylierten DNA-Segmente wiesen einen hohen CG-Gehalt auf, waren größer als MS-RDA Produkte und konnten anhand einer Homologie zu bekannten Genen identifiziert werden. Die MS-AS-Prozedur war zudem im Vergleich zur MS-RDA zeit- und kostensparend.

In Kontrollexperimenten wurde untersucht, ob individuelle BHK21 Zellklone ebenfalls Methylierungsunterschiede in DNA-Bereichen zeigten, die in transgenen Zellen verändert worden waren. Keiner der in λ DNA-transgenen BHK21 Zellen differentiell methylierten DNA-Bereiche zeigte in BHK21 Einzelzellklonen Abweichungen vom Methylierungsphänotyp der gesamten BHK21 Zellpopulation. Diese Daten zeigten, daß die in transgenen BHK21 Zellen gefundenen Methylierungsänderungen nicht schon in der parentalen BHK21 Population vorgelegen haben.

Mit Hilfe der suppressiven subtraktiven Hybridisierungstechnik (Diatchenko et al., 1996), die im Prinzip eine subtraktive Hybridisierung von cDNA-Präparationen darstellt, wurde die Möglichkeit differentieller Genexpression in Ad12-DNA und λ DNA-transgenen BHK21 Zellen untersucht. Mit Hilfe dieser Technik wurden mehrere differentiell exprimierte Gene aus Ad12- sowie Lambda-transgenen Zellen isoliert.

Bereits in früheren Arbeiten wurde untersucht, ob die Integration fremder DNA in das Mausgenom zu Veränderungen in zellulären Methylierungsmustern in transgenen Mäusen führen konnte (Dilomarbeit von Knut Müller, 1997). In zwei Mauslinien (7-1 und 8-1), die transgen für das 3324 Bp große pAD2E2AL-CAT-Konstrukt waren, konnte in Interleukin-10 und dem parental geprägten Igf2r eine Abnahme in der DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Die Methylierungsänderungen traten spezifisch in DNA aus Lebergewebe auf.

In Gründertieren, die transgen für Bakteriophage-Lambda DNA waren, konnte spezifisch in DNA aus Herzmuskelgewebe eine Zunahme in der Methylierung des Igf2r-Lokus gefunden werden.

Die Anwendung der MS-RDA zur Isolierung weiterer differentiell methylierter DNA-Segmente aus transgenen Mäusen führte lediglich zur Isolierung von Loci, die einen Restriktionsfragment Längenpolymorphismus in HpaII-Erkennungsstellen aufwiesen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten unterstützen die Annahme, daß zelluläre Expressions- und Methylierungsmuster durch die Integration fremder DNA in ein etabliertes Genom verändert werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Abeliovitch, A., Chen, C., Goda, Y., Silva, A.J., Stevens, F., Tonegawa, S. (1993)**
Modified hippocampal long-term potentiation in PKC ϵ -mutant mice
Cell **75**: 1253-1262
- Allen, N.D., Norris, M.L., and Surani, M.A. (1990)**
Epigenetic control of transgenic expression and imprinting by genotype specific modifiers
Cell **61**, 853-61
- Antequera, F., and Bird, A. (1993)**
CpG islands
In: DNA methylation: Molecular biology and biological significance, pp. 169-185. Eds. Jost, J.-P., and Saluz, H.-P., Birkhäuser Verlag, Basel
- Arber, W. (1965)**
Host-controlled modification of bacteriophage
Annu Rev Microbiol. **19**:365-78.
- Argeson, A.C. Nelson, K.K., Siracusa, L.D. (1996)**
Molecular basis of the pleiotropic phenotype of mice carrying the hypervariable yellow (Ahvy) mutation at the agouti locus
Genetics **142**: 557-567
- Bablanian, R., Eggers, H.J., Tamm, I. (1965)**
Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage. The relation between poliovirus-induced metabolic and morphogenic alterations in cultured cells
Virology **26**: 100-113
- Baylin, S.B., Herman, G., Graff, J.R., Vertino, P.M., Issa, J.P. (1998)**
Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia
Advances in Cancer Res. **72**: 141-96
- Benbow, R.M. (1992)**
Chromosome structures
Sci. Prog. **76**: 425-450
- Berk, A.J., (1986)**
Adenovirus promoters and E1A transactivation
Annu Rev Genet **20**: 45-79
- 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. (1988)**
Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases
J. Mol. Biol. **203** (4): 971-83
- Bestor, T.H. (1990)**
DNA methylation: Evolution of a bacterial immune function into a regulator of genome structure and activity in higher eukaryotes
Phil. Trans. Royal Soc. Lond. **B 326**, 179-187

- Bestor, T.H. (1995)**
The biochemical basis of allele-specific gene expression in genomic imprinting and X inactivation
in: R. Ohlsson, K. Hall and M. Ritzén (eds.), *Genomic imprinting: Causes and Consequences*, Cambridge University Press, pp. 109-116
- Bestor, T.H., and Verdine, G.L. (1994)**
DNA methyltransferases
Curr. Opin. Cell. Biol. **6**: 380-398
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., Szyf, M. (1999)**
A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA
Nature **397**: 579-583
- Bird, A. P. (1986)**
CpG rich islands and the function of DNA methylation
Nature **321**, 209-213
- Bird, A.P. (1995)**
Gene number, noise reduction and biological complexity
Trends Genet. **11**: 94-100
- Bird, A.P., Wolffe, A.P. (1999)**
Methylation induced repression - belts, braces, and chromatin
Cell **99**: 451-454
- Birnbolm, H.C., and J. Doly (1979)**
A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1524
- Bishop, J.O., and Smith, P. (1989)**
Mechanisms of chromosomal integration of microinjected DNA
Mol. Biol. Med. **6**, 283-294
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn M., Nemes, A., Temper V., Razin, A., and Cedar, H. (1994)**
Sp1 element protect a CpG island from de novo methylation
Nature **371**, 435-438
- Buschhausen, G., Wittig, B., Graessmann, M., Graessmann, A. (1987)**
Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 1177-1181
- Chaillet, J.R., Vogt, T.F., Beier, D.R., and Leder, P. (1991)**
Parental specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during development
Cell **66**, 77-83
- Chang-Yeh, A., Mold, D.E., Huang, R.C. (1991)**
The mouse intracisternal A particle-promoted placental gene retrotransposition is mouse-strain-specific
Nucleic Acid Res. **19**: 3667-3672
- Chenchik, A., Moquadam, F., and Siebert, P.D. (1996)**
A new method for full-length cDNA cloning by PCR
In „A laboratory guide to RNA isolation, analysis and synthesis“
ed. P.A., Krieg (Wiley-Liss, Inc., NY) pp. 273-321
- Chomczynski, P. (1992)**
One hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA or RNA
Anal. Biochem. **201**, 134-139

- Clark, S.J., Harrison, J. and Frommer, M. (1995)**
CpNpG methylation in mammalian cells
Nature Genetics **10**, 20-27
- Cleaver, J.E. (1995)**
It was a very good year for DNA repair
Cell **76**: 1-4
- Colot, V., Maloisel, L., Rossignol, J.C. (1996)**
Interchromosomal transfer of epigenetic states in ascobulus: Transfer of DNA methylation is mechanistically related to homologous recombination
Cell **86**: 855-864
- Conquet et al. (1994)**
Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1
Nature **372**: 237-
- Cremer, C., Remm, B., Bischoff, A., Vollweiler, T. (1992)**
Automated detection of radiation-induced chromosome aberrations following fluorescence in situ hybridization
J. Radiat. Res. **33**: 189-205
- Cross, S.H., Bird, A.P. (1995)**
CpG islands and genes
Curr. Opin. Genet. Dev. **5**: 309-314
- Crydermann, D.E., Morris, E.J., Biessmann, H., Elgin, S.C., Wallrath, L.L. (1999)**
Silencing at drosophila telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles
EMBO J. **18** (13): 3724-3735
- Dernburg, A.F., Broman, K.W., Fung, J.C., Marshall, W.F., Phillips, J., Agard, D.A., Sedat, J.W. (1996)**
Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions
Cell **85**: 745-759
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F.C., Campbell, A.P., Cgenchik, A., Moqam, F., Huang, B., Likyanov, S., Likyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996)**
Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 6025-6030
- Doerfler, W. (1981)**
DNA methylation - a regulatory signal in eukaryotic 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
- Duhl, M.J., Vrieling, H., Miller, K.A., Wolff, G.L., Barsh, G.S. (1994)**
Neomorphic agouti mutants in obese yellow mice
Nature Genetics **8**: 59-65
- Duppressoir, A., Heidmann, T. (1997)**
Expression of intracisternal A-particle retrotransposons in primary tumors of oncogene-expressing transgenic mice
Oncogene **14**: 2951-2958

- Duppressoir, A., Puech, A., Heidmann, T. (1995)**
IAP retrotransposons in the mouse liver as reporters of ageing
Biophys. Acta 1264: 397-402
- Efstratiadis, A. (1994)**
Parental imprinting of autosomal mammalian genes
Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 265-280
- Engelward, B.P., Boosalis, M.S., Chen, B.J., Deng, Z., Siciliano, M.J., and Samson, L.D. (1993)**
Cloning and characterisation of a mouse 3-methyladenine/7-methylguanine/3-methylguanine DNA glycosylase cDNA whose gene maps to chromosome 11
Carcinogenesis 14, 175-181
- Engler, P., Haasch, D., Pinkert, C.A., Doglio, L., Glymour, M., Brinster, R., and Storb, U. (1991)**
A strain specific modifier on mouse chromosome 4 controls the methylation of independent transgene loci
Cell 65, 939-947
- Falzon, M., Kuff, E. (1991)**
Isolation and characterization of a protein fraction that binds to enhancer core sequences in intracisternal A particle long terminal repeats
J. Biol. Chem. 264: 21915-21922
- Feenstra, A., Fewell, J., Lueders, K., Kuff, E. (1986)**
In vitro methylation inhibits the promoter activity of a cloned intracisternal A particle LTR
Nucleic Acid Res. 14: 4343-4352
- Feil, R., Walter, J., Allen, N.D., and Reik, W. (1994)**
*Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *igf2r* and *H19* genes*
Development 120, 2933-2943
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983)**
A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity
Analytical Biochemistry 132, 6-13
- Flavell, R.B. (1994)**
Inactivation of gene expression in plants as a consequence of novel sequence duplication
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3490-3496
- Flint, J., Schenk, T., (1989)**
Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator
Annu Rev Genet 23: 141-161
- Forejt, J., and Gregorova, S. (1992)**
*Genetic analysis of genomic imprinting: An imprintor-1 gene controls inactivation of the paternal copy of the mouse *Tme* locus*
Cell 70, 443-450
- Fridmacher, V., Le Bert, M., Guillou, F., Magre, S., (1995)**
*Switch in the expression of the *K19/ K18* keratin genes as a very early evidence of testicular differentiation in the rat*
Mech. Dev. 52: 199-207
- Gonzalzo, M.L.; Liang, G., Spruck, C.H., 3rd, Zingg, J.M., Rideout, W.M., 3rd, and Jones, P.A. (1997)**
Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR
Cancer Res. 57: 594-599

- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. (1980)**
Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** (12): 7380-4
- Goyan, C., Nogueira, T.I.V., Faugeron, G. (1994)**
*Perpetuation of cytosine methylation in *Ascobolus immersus* implies a novel type of maintenance methylase*
J. Mol. Biol. **240**: 42-51
- Graham, F.L., van der Eb, A.J. (1973)**
A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
Virology **52**: 456-467
- Grant, S.G.N., O'Dell, T.J., Karl, K.A., Stein, P.L., Soriano, P., Kandel, E.R. (1992)**
*Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice*
Science **258**: 1903-
- Gross-Bellard, M., Oudet, P., and Chambon, P. (1973)**
Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells
Eur. J. Biochem. **36**: 32-38
- Groudine, M., Eisenmann, R., and Weintraub, H. (1981)**
Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation
Nature **292**, 311-317
- Gruenbaum, Y., Cedar, H., and Razin, A. (1982)**
Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase
Nature **295**, 620-622
- Gruenbaum, Y., Szyf, M., Cedar, H., Razin, A. (1983)**
Methylation of replicating and postreplicated mouse L cell DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 4919-4921
- Haaf, T., Schmid, M. (1991)**
Chromosome topology in mammalian interphase nuclei
Exp. Cell. Res. **192**: 325-332
- Haberer, K. (1966)**
Measurements of beta activities in aqueous samples utilizing Cerenkov radiation
Packard Technical Bulletin **16**
- Hanahan, D. (1983)**
*Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids*
J. Mol. Biol. **166**, 557-580
- Harbers, K., Jahner, D., Jaenisch, R. (1981)**
Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 7609-7613
- Harrington, M.A., Jones, P.A., Imagawa, M., Karin, M. (1988)**
*Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor *Sp1**
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 2066-2070
- Hartl, D.L. (1996)**
The most unkindest cut of all
Nat. Genet. **12**: 227-229
- Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Okazaki, Y., Hatada, I., Shibata, H., Kawai, J., Hirose, K., Watanabe, S., Fushiki, S., Wada, S., et al. (1993)**
Restriktion landmark genomic scanning method and its various applications
Electrophoresis **14**: 251-258

- Heidmann, O. and Heidmann, T. (1991)**
Retrotransposition of a mouse IAP sequence tagged with an indicator gene
Cell **64**: 159-170
- Heller, H. (1997)**
Zur DNA Methylierung und Genomorganisation in Ad12-transformierten und I-transgenen Hamsterzellen
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Heller, H., Kämmer, C., Wilgenbus, P., Doerfler, W., (1995)**
Chromosomal integration of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage 1) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments
Proc Natl Acad Sci USA **92**: 5515-5519
- Hendrich, B., Bird, A. (1998)**
Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins
Mol. Cell. Biol. **18**: 6538-6547
- Henzel, M.J., Bazett-Jones, D.P. (1995)**
RNA polymerase II transcription and the functional organization of the mammalian cell nucleus
Chromosoma **103**: 509-516
- Hiebert, S.W., Blake, M., Azizkhan, J., Nevins, J.R., (1991)**
Role of E2F transcription factor in E1A mediated transactivation of cellular genes
J. Virol **65**: 3547-3552
- Hiebert, S.W., Lipp, M., Nevins, J.R., (1989)**
E1A-dependant trans-activation of the human MYC promotor is mediated by the E2F factor
Proc Natl Acad Sci USA **86**: 3594-3598
- Hogan, B., Constantini, F., and Lacy, E. (1986)**
Manipulating the mouse embryo
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Holler, M., Westin, G., Jiricny, J., Schaffner, W. (1988)**
Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated
Genes Dev. **2**: 1127-1135
- Houweling, A., van der Elsen, P.J., van der Eb, A.J., (1980)**
Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA
Virology **105**: 537-550
- Hubert, J., Burgeois, C.A. (1986)**
The nuclear skeleton and the spatial arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of vertebrate somatic cells
Hum. Genet. **74**: 1-15
- Jähner, D., and Jaenisch, R. (1985)**
Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene activity
Nature **315**, 594-597
- Jeppesen, P., Turner, B.M. (1993)**
The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by the lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression
Cell **74**: 281-289
- Jones, P.A. (1999)**
The methylation paradox
Trends in Genetics **15**: 34-37

- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarry, J., Cedar, H., and Razin, A. (1992)**
Developmental pattern of gene specific DNA methylation of the mouse embryo and germ line
Genes Dev. **6**, 705-714
- Kämmer, C. (1995)**
Fremde DNA in Säugerzellen: Methylierungsprofile in transfizierter und endogen-zellulärer DNA
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Kass, S.U., Landsberger, N., Wolffe, A.P. (1997)**
DNA methylation directs a time-dependant repression of transcription initiation
Curr. Biol. **7**: 157-165
- Kazazian, H.A. & Moran, J.V. (1998)**
The impact of L1 retrotransposons on the human genome
Nature Genet. **19**: 19-243
- Keshet, I., Liemann-Hurwitz, I., Cedar, H. (1986)**
DNA methylation affects the formation of active chromatin
Cell **44**: 535-543
- Klein, C.B., Costa, M. (1997)**
DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens
Mutation Res. **386**: 163-180
- Koetsier, P. (1995)**
Stability of transgene methylation patterns in mice
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Kuff, E.L., and Fewell, J.W. (1985)**
Intracisternal A-particle gene expression in normal mouse thymus tissue: gene products and strain-related variability
Mol. Cell. Biol. **5**, 474-483
- Kuff, E.L., Lueders, K.K. (1988)**
The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects
Advances in Cancer Res. **51**: 183-276
- Kuo, M.A., Brownwell, J.E., Sobel, B.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., Allis, C.D. (1996)**
Transcription linked acetylation by Gcn5 of histones H3 and H4 at specific lysines
Nature **383**: 269-272
- Langner, K.D., Weyer, U. and Doerfler, W. (1986)**
Trans effect of the E1 region of adenoviruses on the expression of the procaryotic gene in mammalian cells: resistance to 5'-CCGG-3' methylation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1598-602
- Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Jüttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., Li, E. (1996)**
De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells
Development **122**: 3195-3205
- Lewis, D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992)**
Purification, sequence, and cellular localisation of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA
Cell **69**, 905-914

- Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. (1993)**
Role for DNA methylation in genomic imprinting
Nature **366**, 362-365
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992)**
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality
Cell **69**, 915-926
- Li, X.L., Boyanapalli, M., Weihua, X., Kalvakolanu, D.V., Hassel, B.A. (1998)**
Induction of interferon synthesis and activation of interferon-stimulated genes by liposomal transfection reagents
J. Interferon Cytokine Res. **18**(11):947-52
- Lichtenberg, U., Zock, C., Doerfler, W. (1988)**
Integration of foreign DNA into the mammalian genome can be associated with hypomethylation at the site of insertion
Virus Res. **11**: 335-342
- Lipp, M., Schilling, R., Bernhardt, G., (1989)**
Trans-activation of human MYC: The second promotor is target for the stimulation by adenovirus E1A proteins
Cell **61**: 1217-1224
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. Wigler, M. (1993)**
Cloning the differences between complex genomes
Science **259**: 946-951
- Liu, H.T., Baserga, R., Mercer, W.E., (1985)**
Adenovirus type 2 activates cell cycle-dependant genes that are a subset of those activated by serum
Mol Cell Biol **5**: 2936-2942
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., Bird, A.P. (1994)**
Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island
Genes Dev. **8**, 2282-2292
- Matzke, M.A., Neuhuber, F., Matzke, A.J.M. (1993)**
A variety of epistatic interactions can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing
Mol. Gen. Genet. **236**: 379-386
- McDonell, M.W., Simon, M.N., and Studier, F.W. (1977)**
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels
J. Mol. Biol. **110**, 119-146
- Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., and Bird, A.P. (1989)**
Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs
Cell **58**, 499-507
- Michaud, E., van Vugt, M.J., Bultmann, S.J., Sweet, H.O., Davisson, M.T., Woychik, R.P. (1994)**
Differential expression of a new dominant agouti allele (A^{apy}) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage
Genes Dev. **8**: 1463-1472
- Migeon, B.R. (1994)**
X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences
Trends Genet. **10**: 230-235

- Monk, M. (1990)**
Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting
 Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. **326**, 179-187
- Monk, M., Boubelik, M., and Lehnert, S. (1987)**
Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic, and germ cell lineages during mouse development
 Development **112**, 371-382
- Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstein, M.L., Khan, T.A., and Mosmann, T.R. (1990)**
Homology of Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (IL10) to the Epstein-Barr Virus Gene BCRF1
 Science **248**, 1230-1234
- Morgan, R.A., Huang, R.C.C. (1984)**
Correlation of undermethylation of intracisternal A particle genes with expression in murine plasmacytomas but not in NIH/3T3 embryo fibroblasts
 Cancer Res. **44**: 5234-5241
- Müller, K. (1997)**
Integration fremder DNA in das Säugergenom und Veränderungen im Methylierungsmuster zellulärer DNA-Segmente: Untersuchungen an transgenen Mäusen
 Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Universität zu Köln
- Müller, K., Heller, H., Doerfler, W. (2000)**
The integration of foreign DNA into an established mammalian genome can lead to alterations in methylation and transcription patterns remote from the insertion site
manuscript in preparation
- Nathans, D., and Smith, H.O. (1975)**
Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules
 Ann. Rev. Biochem. **44**, 273-293
- Ng, H.-H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Burner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., Bird, A. (1999)**
MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex
 Nat. Genet. **23**: 58-61
- Norris, D.P., Patel, D., Kay, G.F., Penny, G.D., Brockdorff, N., Sheardown, S.A., and Rastan, S. (1994)**
Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation
 Cell **77**, 41-51
- Ono, M., Oishi, H. (1983)**
Long terminal repeat sequences of intracisternal A particle genes in the Syrian hamster genome: Identification of the tRNA^{Phe} as putative tRNA
 Nucleic Acids Res. **11**: 7169-7179
- Orend, G., Knoblauch, M., Kämmer, C., Tija, S., Schmitz, B., Linkwitz, A., Meyer zu Altenschildesche, G., Doerfler, W. (1995a)**
The initiation of de novo methylation of foreign DNA integrated into a mammalian genome is not exclusively targeted by nucleotide sequence
 J. Virol. **69**: 1226-1242
- Ortin, J., Scheidtmann, K.-H., Greenberg, R., Westphal, M., Doerfler, W., (1976)**
Transcription of the genome of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells
J. Virol 20: 355-372

- Oshima, R.G., Trevor, K., Shevinsky, L.H., Ryder, O.A., Cecena, G., (1988)**
Identification of the gene coding for the Endo B murine cytokeratin and its methylated, stable inactive state in mouse nonepithelial cells
Genes Dev. 2: 505-516
- Paroush, Z., Keshet, I., Yisraeli, J., and Cedar, H. (1990)**
Dynamics of demethylation and activation of the β -actin gene in myoblasts
Cell 63, 1229-1237
- Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Hansen, R.S., Gartler, S.M., and Riggs, A.D. (1990)**
Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8252-8256
- Puech, A., Duppressoire, A., Loireau, M.-P., Mattei, M.-G., Heidmann, T. (1997)**
Characterization of two age-induced intracisternal A-particle-related transcripts in the mouse liver. Transcriptional read-through into an open reading frame with similarities to the yeast ccr4 transcription factor
J. Biol. Chem. 272: 5995-6003
- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S., White, E., (1992)**
The Adenovirus E1a proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1b 19-kda and bcl-2 proteins
Proc Natl Acad Sci USA 89: 7742-7746
- Razin, A. (1998)**
CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three way connection
EMBO J. 17: 4905-4908
- Razin, A., and Cedar, H. (1993)**
DNA methylation and embryogenesis
In: DNA methylation: molecular biology and biological significance, pp. 343-357. Eds Jost, J.-P., and Saluz, H.-P., Birkhäuser Verlag, Basel
- Razin, A., Cedar, H. (1991)**
DNA methylation and gene expression
Microbiol. Rev. 55: 451-458
- Razin, A., Szyf, M., Kafri, T., Roll, M., Giloh, H., Scarpa, S., Carotti, D., and Cantoni, G.L. (1986)**
Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA demethylation during differentiation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2827-2831
- Razin, S.V., Gromova, I.I. (1995)**
The channels model of nuclear matrix structure
BioEssays 17 (5): 443-450
- Reik, W., Howlett, S.K., and Surani, M.A. (1990)**
Imprinting by DNA methylation: from transgenes to endogenous sequences
Development (Suppl.), 99-106
- Remus, R., Kämmer, C., Heller, H., Schmitz, B., Schell, G., Doerfler, W. (1999)**
Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA-sequences
J. Virol. 73 (2): 1010-1022
- Rhounim, L., Rossignol, J.-L., and Faugeron, G. (1992)**
*Epimutation of repeated genes in *Ascobulus immersus**
EMBO J. 11, 4451-4457

- Riggs, A.D. and Jones, P.A. (1983)**
5-methylcytosine, gene regulation and cancer
Adv. Cancer Res. **40**, 1-30
- Rosahl, T., Doerfler, W., (1992)**
Alterations in the levels of expression of specific cellular genes in adenovirus-infected and adenovirus-transformed cells
Virus Res **26**: 71-90
- Sanford, J.P., Clark, H.J., Chapman, V.M., Rossant, J. (1987)**
Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse
Genes Dev. **1**: 1039-1046
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467
- Sapienza, C., Paquette, J., Tran, T.-H., and Peterson, A. (1989)**
Epigenetic and genetic factors affect transgene methylation imprinting
Development **107**: 165-168
- Schmid, C.W. (1996)**
Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **53**: 283-319
- Schubbert, R., Lettmann, C.M., Doerfler, W. (1994)**
Ingested foreign (M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice
Mol. Gen. Genetics **242**: 495-504
- Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B., Doerfler, W. (1997)**
Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 961-966
- Selker, E.U. (1990)**
Pre-meiotic instability of repeated sequences in Neurospora crassa
Annu. Rev. Genet. **24**: 579-613
- Shago, M., Giguere, V. (1996)**
Isolation of a novel retinoic acid-responsive gene by selection of genomic fragments derived from CpG-island-enriched DNA.
Mol. Cell. Biol. **16**(8):4337-48
- Shemer, R., Kafri, T., O'Connell, A., Eisenberg, S., Breslow, J.L., and Razin, A. (1991)**
Methylation changes in the apolipoprotein AI gene during embryonic development of the mouse
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 11300-11304
- Siebert, P.D, Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukryanov, K.L., & Lukryanov, S.A. (1995)**
An improved method for walking in uncloned genomic DNA
Nucleic Acid Res. **23**, 1087-1088
- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M., Tonegawa, S. (1992)**
Impaired spatial learning in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice
Science **257**: 206-
- 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

- Smit, A.F. (1996)**
Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes
Curr. Opin. Genet. Dev. **6**: 743-748
- Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T., Allis, C.D. (1995)**
Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 1237-1247
- Southern, E.M. (1975)**
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. **98**, 503-517
- Southern, E.M., Berg, P. (1982)**
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter
J. Mol. Appl. Genet. **1**: 327-341
- Stoehr, P.J., Cameron, G.N. (1991)**
The EMBL data library
Nucleic Acids Res. **19**, 2227-2230
- Strittmatter, S.M., Frankhauser, C., Huang, P.L., Mashimo, H., Fishman, M.C. (1995)**
Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking neuronal growth cone protein GAP-43
Cell **80**: 445-452
- Strohl, W.A., Rouse, H., Teets, K., Schlesinger, R.W. (1970)**
The response of BHK21 cells to infection with type 12 adenovirus. 3. Transformation and restricted replication of superinfecting type 2 adenovirus
Arch. Gesamte Virusforsch. **31**, 93-112
- Subramanian, T., Tarodi, B., Govindarajan, R., Boyd, J.M., Yoshida, K., Chinnadurai, G., (1993)**
Mutational analysis of the transforming and apoptosis suppression activities of the adenovirus E1B-175R protein
Gene **124**: 173-181
- Sutter, D., and Doerfler, W. (1980)**
Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 253-256
- Tajima, S., Suetake, I. (1998)**
Regulation and function of DNA methylation in vertebrates
J. Biochem. **123**: 993-999
- Takahara, T. et al. (1996)**
Dysfunction of the Orleans reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of an active L1 sequence into the skipped exon
Hum. Mol. Genet. **5**: 989-993
- Taylor, J.H. (1984)**
Origins of replication and gene regulation
Mol. Cell. Biochem. **61**: 99-109
- Timmers, H.T., De Wit, D., Bos, J.L., van der Eb, A.J., (1988)**
E1A products of adenovirus reduce the expression of cellular proliferation genes
Oncogene Res **3**: 67-76

- Toth, M., Müller, U., Doerfler, W. (1990)**
Establishment of de novo methylation patterns. Transcription factor binding and deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus promotor
J. Mol. Biol. **214**: 673-683
- Toyota, M., Ushijima, T., Suzui, M., Murakumo, Y., Imai, K., Sugimura, T., Matsuyama, M. (1998)**
Generation of polymorphic markers tightly linked to the thymus enlargement loci by phenotype-directed representational difference analysis.
Mamm Genome **9** (9):735-9
- Turker, M.S., Bestor, T.H. (1997)**
Formation of methylation patterns in the mammalian genome
Mutation Res. **386**: 119-130
- Ushijima, T., Keiichirou, M., Hosoya, Y., Okonogi, H., Tatematsu, M., Sugimura, T., Nagao, M. (1997)**
Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2284-2289
- Vardimon, L., Kressmann, A., Cedar, H., Maechler, M., Doerfler, W. (1982)**
Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 1073-7
- Waalwijk, C., Flavell, R.A. (1978)**
DNA methylation at a CCGG sequence in the large intron of the rabbit beta-globin gene: tissue-specific variations
Nucleic Acids Res. **5**(12):4631-4
- Walsh, C.P., Chaillet, J.R., Bestor, T.H. (1998)**
Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation
Nature Genet. **20**: 116-117
- Weissbach, A. (1993)**
A chronicle of DNA methylation (1948-1975)
DNA methylation: Molecular biology and biological significance (Jost, J.P., and Saluz, H.P., eds.) pp. 1-10,
Birkhäuser Verlag, Basel
- Wood, J.W., Thomson, A.A., Korenberg, J., Chen, X.N., May, W., Wall, R., and Denny, C.T. (1993)**
Isolation and Chromosomal Mapping of the Human Immunoglobulin-Associated B29 Gene (IGB)
Genomics **16**, 187-192
- Wu, J.C., Santi, D.V. (1987)**
Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase
J Biol Chem. **262**(10):4778-86.
- Wu, J.C., Santi, D.V. (1985)**
On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases.
Prog. Clin. Biol. Res. **1198**:119-29
- Wutz et al., (1997)**
Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island
Nature **389**: 745-749
- Xu, H.P., Yanak, B.L., Wigler, M.H., Gorin, M.B. (1996)**
New polymorphic markers in the vicinity of the pearl locus on mouse chromosome 13.
Mamm. Genome **7**(1):16-9

Yeivin, A., and Razin, A. (1993)

Gene methylation patterns and expression

In: DNA methylation: molecular biology and biological significance, pp. 523-568. Eds Jost, J.-P., and Saluz, H.-P., Birkhäuser Verlag, Basel

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

Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites

Trends in genetics **13** (8): 335-340

Zantema, A., van der Eb, A.J. (1995)

Modulation of gene expression by adenovirus transformation

Curr. Top. Microbiol. Immunol.;**199** (Pt 3):1-23

Erklärung

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 diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von den 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 Arbeit ist von Prof. Walter Doerfler betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgenden Titeln publiziert bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Knut Müller, Ralph Remus, Anja Schramme, Hilde Heller, Christina Kämmer, and Walter Doerfler (2000)

Alterations in cellular DNA methylation and gene expression patterns upon integration of foreign DNA

Vortragspräsentation, Adenovirus Meeting 2000

Ralph Remus, Knut Müller, Anja Schramme, Hilde Heller, Christina Kämmer and Walter Doerfler (2000)

Consequences of foreign DNA integration

Vortragspräsentation, Jahrestagung 2000 der Gesellschaft für Virologie

Knut Müller, Hilde Heller, and Walter Doerfler

The integration of foreign DNA into an established mammalian genome can lead to alterations in methylation and transcription patterns remote from the insertion site

eingereicht bei Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Knut Müller and Walter Doerfler

Methylation-sensitive Amplicon subtraction: A novel tool for the rapid isolation of differentially methylated DNA sequences out of complex genomes

Manuskript in Vorbereitung

Knut Müller and Walter Doerfler (2000)

The integration of foreign DNA into the mammalian genome can lead to alterations in cellular methylation and expression patterns

Posterpräsentation, 50th annual meeting of the American Society of Human Genetics

Köln, den 14.09.2000

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. W. Doerfler zum einen für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, vielmehr jedoch für seine nie versiegende konstruktive Kritik und seine Unterstützung bei der Realisierung wissenschaftlicher Ideen danken.

Meinem Kollegen Gerd Wronka möchte ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und das langjährige tolle Laborklima danken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung „Medizinische Genetik und Virologie“ für das gute Arbeitsklima danken.

Meiner Frau Karin gilt an dieser Stelle natürlich besonderer Dank, da sie unermüdlich aufmunternd zur Seite stand, wenn alles mal wieder nicht funktionierte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Müller, Knut
Anschrift:	Euskirchener Str. 32 50937 Köln
Telefon:	0221 / 413661
E-Mail:	kmueller@scan.genetik.uni-koeln.de
Geburtsdatum:	13.07.1969
Geburtsort:	Köln
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung

08/1976 - 06/1980	<i>Grundschule</i>	GGs Buschfeldstraße, Köln-Holweide
08/1980 - 05/1989	<i>Gymnasium</i>	Städt. Gymnasium Genovevstraße Köln-Mülheim

Hochschulausbildung

10/1990	<i>Beginn des Biologie-Studiums</i>	Universität zu Köln
10/1994 - 2/1996	<i>Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Doefler</i>	
3/ 1996 - 3/1997	<i>Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Doerfler</i>	
seit 4/1997	<i>Arbeit an der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Doerfler</i>	Universität zu Köln

Abstract

In hamster cells transgenic for the adenovirus type 12 (Ad12) or for the DNA of bacteriophage lambda, the patterns of DNA methylation in specific cellular genes or DNA segments remote from the site of transgene insertion were considerably altered. A wide scope of cellular DNA segments and genes was analyzed. The technique of methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) selects against DNA-segments that were heavily methylated and hence rarely cleaved by the methylation-sensitive endonuclease HpaII. The MS-RDA protocol led to the isolation of several cellular DNA-segments that were hypermethylated in lambda DNA- and Ad12-transgenic hamster cell lines. By applying a subtractive hybridization technique to cDNA preparations from non-transgenic and Ad12-transformed or lambda DNA-transgenic hamster cells, several cellular genes were cloned that showed altered transcription patterns in Ad12-transformed or in lambda DNA-transgenic hamster cells, respectively. Many of the DNA segments with altered methylation, which were isolated by a newly developed methylation-sensitive amplicon subtraction (MS-AS) protocol, and cDNA fragments derived from genes with altered transcription patterns were identified by their nucleotide sequences. In one mouse line transgenic for the DNA of bacteriophage lambda, hypermethylation was observed in the imprinted gene *Igf2r* in a tissue-specific manner. Two mouse lines transgenic for an adenovirus promoter-indicator gene construct showed hypomethylation in the interleukin 10 (IL-10) and *Igf2r* loci. We conclude that the insertion of foreign DNA into an established genome can lead to marked alterations in cellular DNA methylation and transcription patterns.

Kurzzusammenfassung

In Hamsterzellen, die transgen für Adenovirus Typ 12 -oder für Bakteriophage Lambda-DNA sind, konnten Veränderungen im Methylierungsmuster bestimmter zellulärer Gene, die weit vom Integrationsort des Transgens entfernt lagen, nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Methylierungs-sensitiven repräsentativen Differenzanalyse (MS-RDA) wurde gegen hoch methylierte DNA-Bereiche selektiert, die nur selten von der Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonuklease HpaII gespalten werden. Das MS-RDA Protokoll führte zur Isolierung mehrerer DNA-Bereiche, die in Lambda DNA- und Ad12-transgenen Hamsterzellen einen höheren Methylierungsgrad aufwiesen. Durch subtraktive Hybridisierung von cDNA Präparationen konnten mehrere Gene kloniert werden, die in Ad12-transformierten oder Lambda DNA-transgenen BHK21 Hamsterzelllinien ein gegenüber der parental BHK21 Linie verändertes Transkriptionsmuster aufwiesen. Viele der DNA-Segmente, die mit dem neu entwickelten Protokoll der Methylierungs-sensitiven Amplicon-Subtraktion (MS-AS) und cDNA-Fragmente mit veränderten Transkriptionsmustern konnten aufgrund ausgeprägter Homologien zu bekannten Genen identifiziert werden. In einer Lambda DNA-transgenen Mauslinie konnte im parental geprägten *Igf2r*-Gen eine gewebespezifische Methylierungsänderung festgestellt werden. In zwei Mauslinien, die transgen für ein Adenovirus Promotor-Indikatorgenkonstrukt sind, konnte Hypermethylierung in Interleukin 10 und *Igf2r* nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß die Integration fremder DNA in ein etabliertes Säuger genom zu weitreichenden Veränderungen in zellulären Methylierungs- und Expressionsmustern führt.