

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Beschreibung der Methylierung der hypothalamus-spezifischen
Enhancer des Pro-Opiomelanocortin Gens

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antje Auler

Emsdetten

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Krude
2. Prof. Dr. med. J. Spranger
3. Prof. Dr. med. T. Schöneberg

Datum der Promotion: 27.03.2009

1	Einleitung	1
1.1	Adipositas	1
1.1.1	Definition, Prävalenz, Einordnung	1
1.2	Nucleus arcuatus hypothalami	3
1.2.1	Lokalisation und Stellenwert in der Energiehomöostase	3
1.2.2	Neuronengruppen innerhalb des Nucleus arcuatus	4
1.3	Pro-Opiomelanocortin	5
1.3.1.	Physiologie und Pathophysiologie von Pro-Opiomelanocortin	5
1.3.2.	Transkriptionelle Regulation des Pro-Opiomelanocortin Gens	9
1.4	DNA-Methylierung	12
1.4.1	Der Begriff Epigenetik	12
1.4.2	Grundlagen der DNA-Methylierung	13
1.4.3	Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und transkriptionellem Status	14
1.4.4	Funktionsebenen der DNA-Methylierung	16
1.4.5	DNA-Methylierung von Enhancern	17
1.4.6	DNA-Methylierung und POMC	20
1.5	Fragestellung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Chemikalien	23
2.1.3	Enzyme	24
2.1.4	Enzypuffer	24
2.1.5	Primer	24
2.1.6	Kits	24
2.1.7	Immunhistochemie	25
2.1.8	Sonstige Lösungen und Puffer	25
2.2	Prinzipien der Methoden und Versuchsablauf	25
2.2.1	Isolierung von DNA aus Vollblut	25
2.2.2	Prinzip und Anwendung der Bisulfitmethode	26
2.2.3	Immunhistochemische Färbung der Kryoschnitte	28
2.2.4	Laser-Mikrodissektion	30

2.2.5	Aufbereitung der lasermikrodissezierten DNA	30
2.2.6	Nested-PCR	31
2.2.7	Gel-Elektrophorese	34
2.2.8	Gel-Extraktion	35
2.2.9	Sequenzierung	35
3	Ergebnisse	38
3.1	DNA aus humanen peripheren Blutzellen	40
3.2	murine DNA aus peripheren Blutzellen	41
3.3	DNA aus humanen, Pro-Opiomelanocortin produzierenden Arcuatusneuronen	42
4	Diskussion	47
4.1	Methodik	47
4.1.1	Immunhistochemie, Laser-Mikrodissektion	47
4.1.2	Bisulfit-gestützte DNA-Sequenzierung	48
4.2	Bedeutung der DNA-Methylierung regulatorisch bedeutsamer Regionen außerhalb von CpG-Insel Promotoren	48
4.3	Einflüsse eines DNA-Methylierungsprofils über große Entfernung	49
4.4	Veränderlichkeit des DNA-Methylierungsprofils postmitotischer Zellen	50
4.5	DNA-Methylierung: Primäres oder sekundäres Phänomen im Rahmen der transkriptionellen Genregulation ?	51
4.6	Evolutionäre Konservierung des DNA-Methylierungsstatus	52
4.7	DNA-Hypermethylierung des hypothalamus-spezifischen Enhancers in humanen POMC exprimierenden Arcuatusneuronen	53
4.8	Einfluss des Alters auf das DNA-Methylierungsmuster	57
4.9	Perspektiven	60
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63
7	Anhang	81

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Die Verteilung des BMI im Kinder- und Jugendgesundheitsurvey im Vergleich zum Zeitraum von 1985-1999, Robert Koch Institut 2007
- Abbildung 2 Lokalisation des Nucleus arcuatus hypothalami, verändert nach: Haines DE. Neuroanatomy. An Atlas of Structures, Sections and Systems. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins 2000
- Abbildung 3 Vereinfachendes Schema des hypothalamischen Adipostat-Mechanismus mit einer Auswahl der beteiligten Stoffe
- Abbildung 4 Posttranslationales Processing von POMC durch PC1 und PC2 in Hypophyse und Hypothalamus aus: Coll A, Farooqi IS, et al. Pro-opiomelanocortin and energy balance: Insights from human and murine genetics. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2557-252.
- Abbildung 5 Schematische Darstellung des POMC Gens mit Lokalisation des Promoters sowie der konservierten Enhancerelemente nPE1 und nPE2
- Abbildung 6 Basenfolge der Enhancer nPE1 und nPE2 von Mensch (h) und Maus (m): Homologien, CpG-Dinukleotide, Cis-Elemente für Transkriptionsfaktoren verändert nach De Souza et al. 2005
- Abbildung 7 Bisulfitumwandlung
- Abbildung 8 Übersicht zum Prinzip der Bisulfitumwandlung und sich anschließender Schritte
- Abbildung 9 Darstellung des Prinzips der immunhistochemischen Färbung β -MSH produzierender Neurone
- Abbildung 10a nPE1 beim Menschen, mit Primern (umrahmt) und der Lokalisation der untersuchten CpG-Dinukleotide
- Abbildung 10b nPE2 beim Menschen mit Primern, CpG-Dinukleotiden und außerhalb von CpG-Dinukleotiden vorkommenden Cytosinen
- Abbildung 11 nPE1 der Maus mit Primern, analysierte CpG-Dinukleotide und unmethylierte Cytosin außerhalb der CpGs
- Abbildung 12 grafische Darstellung der DNA-Methylierung von nPE1 und nPE2 in menschlichen Blutzellen mit Lagebeziehungen der Enhancer
- Abbildung 13 Darstellung der Methylierung von nPE1 in murinen peripheren Blutzellen

-
- Abbildung 14 Immunhistochemische Darstellung von β -MSH und damit auch Pro-Opiomelanocortin exprimierenden Neuronen des Nucleus arcuatus hypothalami im Kryoschnitt, Zellasservierung mit LMPC-Technologie
- Abbildung 15 Beispiele für die PCR Produkte
- Abbildung 16 Ein im Elektropherogrammmodus wiedergegebener Sequenzabschnitt aus hnPE1
- Abbildung 17 grafische Darstellung des Methylierungsstatus von nPE1 in hypothalamischen POMC exprimierenden Arcuatusneuronen
- Abbildung 18 BMI Perzentilenkurven französischer Männer und Frauen nach Rolland-Cachera et al. 1991

Tabellen – eine Übersicht

- Tabelle 1 Arbeiten zum DNA-Methylierungsstatus von Enhancern bei neoplastischen Prozessen
- Tabelle 2 DNA-Methylierung von Enhancern und Expression von Transgenen, provirales Silencing
- Tabelle 3 DNA-Methylierung von Enhancern in der Gewebsdifferenzierung und Entwicklung
- Tabelle 4 DNA-Methylierung von Enhancern und gewebsspezifische Expression von Genen
- Tabelle 5 DNA-Methylierung von Enhancern und Blutzelldifferenzierung
- Tabelle 6 PCR Reaktionen, Fragmentbezeichnung mit Primerkombination, Größe des PCR Produkts
- Tabelle 7 Primer für die Amplifikation der konservierten Elemente
- Tabelle 8 BMI Spektrum und Alter der Personen, von denen die peripheren Blutzellen stammten
- Tabelle 9 BMI Spektrum sowie Alter der Verstorbenen, von denen die Arcuatusneuronen stammten
- Tabelle 10 Übersicht über die gewebs-spezifische DNA-Methylierung des 5'-POMC Promoters des Pro-Opiomelanocortin Gens, Newell-Price 2003 in verschiedenen Tumoren, Gewebeproben und Zelllinien
- Tabelle 11 Body Mass Indices sowie Alter der Verstorbenen

1 Einleitung

Die Prävalenz von Adipositas und Übergewicht als deren Vorstufe ist unter Erwachsenen wie auch unter Kindern in einem sukzessiven Anstieg begriffen.

Trotz aller medizinischen Fortschritte in der Behandlung der mit Adipositas einhergehenden Begleit- und Folgeerkrankungen des metabolischen Syndroms haben diese für die Betroffenen schwerwiegende Folgen.

Das erklärt die Bestrebungen wissenschaftlicher Forschung, die Erkenntnisse über die Regelkreise von Essverhalten und Energiestoffwechsel sowie über die Grundlagen einer verstärkten Suszeptibilität für Adipositas zu vermehren. In diese Bemühungen reiht sich auch die vorliegende Arbeit ein.

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition, Prävalenz, Einordnung

Unter Übergewicht bzw. Adipositas versteht man eine verschiedengradige Erhöhung des Körpergewichts, die im Wesentlichen auf der Zunahme des Körperfettanteils beruht.

Da dieser nur schwer direkt bestimmbar ist, bedient man sich eines indirekten Maßes: Überschreitet der Body Mass Index (BMI), definiert als Körpergewicht in kg geteilt durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat, einen Wert von 25kg/m^2 , so spricht man von Übergewicht. Ab einem Wert von 30kg/m^2 besteht Adipositas [178].

Für Kinder kann man der Entwicklungsabhängigkeit des BMI entsprechend die 90. bzw. 97. alters- und geschlechts-spezifische Perzentile als Grenzwerte für Übergewicht bzw. Adipositas verwenden [173].

Die Prävalenz der Adipositas hat mittlerweile solche Ausmaße erreicht, dass in Deutschland 50% der Frauen und 70% der Männer entweder adipös oder übergewichtig sind, was einem Anteil an der gesamten erwachsenen Bevölkerung von insgesamt etwa 60% entspräche [110].

Zudem können den aktuellen Daten des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits surveys zufolge 15% der Kinder und Jugendlichen als übergewichtig, 6,3% als adipös bezeichnet werden. Letzterer Anteil hat sich auf der Basis der vorliegenden Referenzdaten zum BMI der entsprechenden Altersgruppen etwa verdoppelt [144].

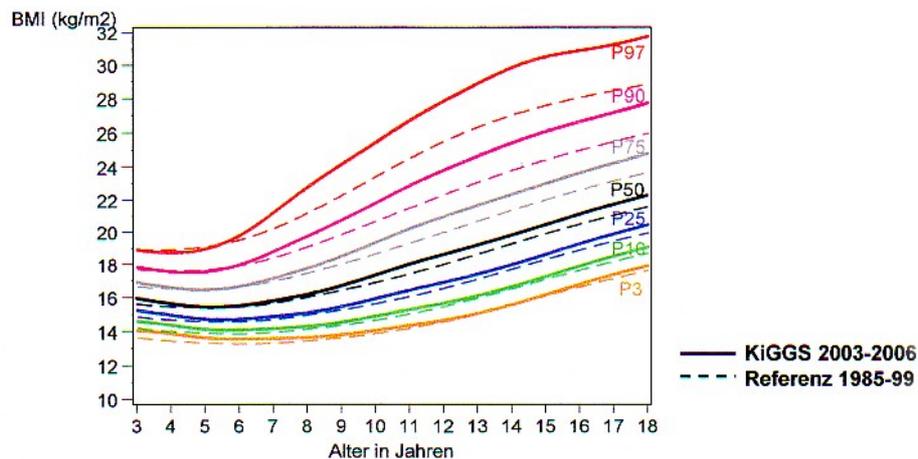


Abbildung 1 Die Verteilung des BMI im KiGGS im Vergleich zum Zeitraum von 1985-1999 zeigt eine Verschiebung der Perzentilenkurven hin zu höheren Werten an. [144]

Obwohl die ausgeprägte Prävalenz der Adipositas sicher nicht losgelöst von sozioökonomischen Faktoren wie einem stetigen Anstieg energiereicher Nahrung bei veränderter Esskultur und vermindertem Umfang körperlicher Aktivität gesehen werden kann, liegen doch zahlreiche Anhaltspunkte vor, die ein Modell unterstützen, in dem die Suszeptibilität für Adipositas zum Großteil genetisch determiniert ist, und Umweltfaktoren mitbestimmen, ob sich ein adipöser Phänotyp entwickeln kann [9].

So schätzen beispielsweise Studien an eineiigen Zwillingspaaren den erblichen Anteil bei Adipositas auf zwischen 60 und 84% [105].

Eine interessante Frage ist aber nicht nur, warum lediglich einige Individuen unter den entsprechenden Umweltbedingungen adipös werden, sondern auch, dass und wie diese ihr erhöhtes Körpergewicht in der Folge verteidigen.

Die „Set Point“ Hypothese des Körpergewichts beinhaltet die Vorstellung, dass das Körpergewicht ähnlich wie andere physiologische Größen der Regelung unterliegt, dass also ein „Adipostat“ existiert, durch den ein Sollzustand eingestellt wird, der sich in einer Aufwärtsspirale stetig erhöht in der Regel nicht wieder permanent gesenkt werden kann [84].

Das Korrelat hierzu stellt eine in Abhängigkeit von Umweltfaktoren im Laufe des Lebens sich einstellende Schwelle für eine Aktivitätsänderung metabolischer Neurone dar, die auf eine Reihe von hormonellen und metabolischen Signalen antworten und die normalerweise die Gewichtszunahme hemmen würden [97].

1.2 Nucleus arcuatus hypothalami

1.2.1 Lokalisation und Stellenwert in der Energiehomöostase

Essverhalten ausschließlich auf eine Reihe molekularer Interaktionen zurückführen zu wollen, würde stark vereinfachen. Dennoch sind einige wichtige physiologische Schaltstellen und Signalmoleküle des komplexen Energiehomöostasesystems bekannt, dessen Drehscheibe der Hypothalamus als übergeordneter Teil des vegetativen Nervensystems darstellt.

Distinkte neuronale Schaltverbindungen im Hypothalamus integrieren nach heutiger Auffassung die afferenten Informationen über die Veränderung der Energiespeicher des Körpers und überführen die eintreffenden Sättigungssignale in eine neuronale Antwort [16].

Neben anderen Kerngebieten kommt dem Nucleus arcuatus als integralem Bestandteil dieser Schaltsysteme ein besonderer Stellenwert zu:

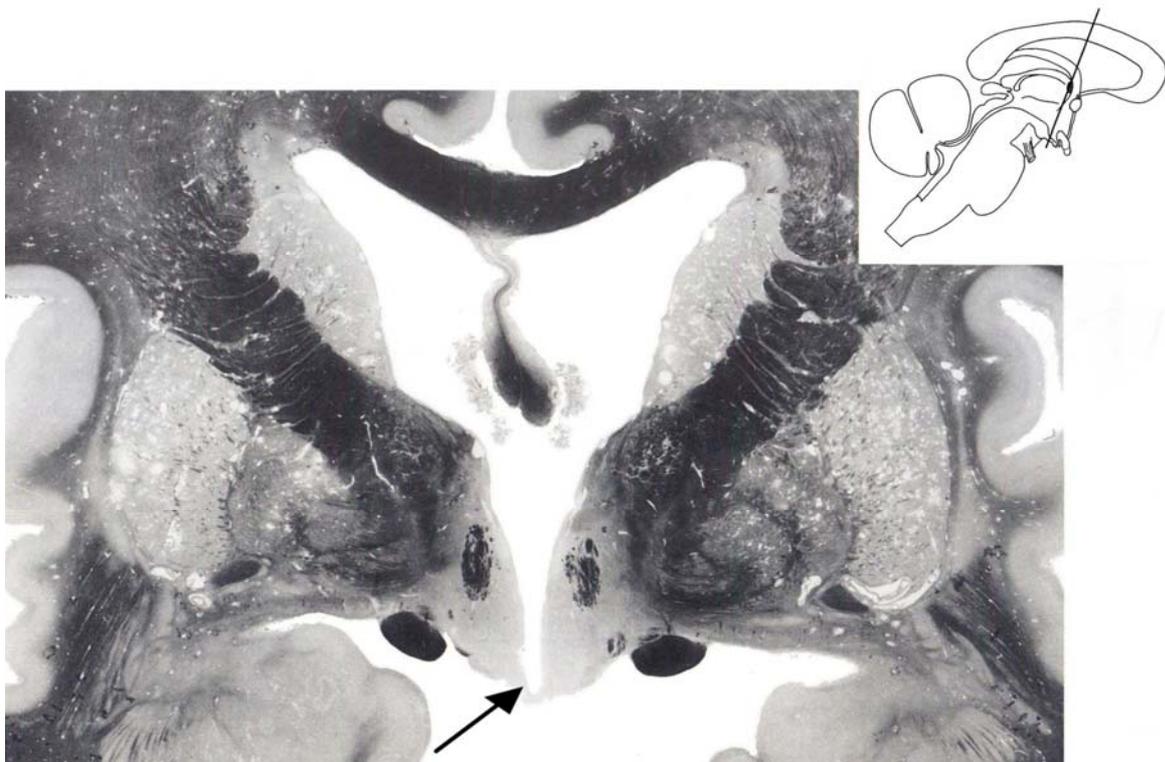


Abbildung 2 Lokalisation des Nucleus arcuatus hypothalami, verändert nach: Haines DE. Neuroanatomy. An Atlas of Structures, Sections and Systems. Lippincott Williams & Wilkins 2000

Der Nucleus arcuatus ist eine bogenförmige Ansammlung von dem Boden des dritten Ventrikels beiderseits anliegenden neuronalen Perikarien, die ca. die Hälfte der dorsoventralen Ausdehnung des gesamten Hypothalamus einnimmt.

Die Nervenzellen dieses Gebiets gelten nach heutiger Auffassung als eine zentrale erste Anlaufstelle, was den Input über den Zustand der Energieressourcen des Körpers anbetrifft [39].

Bei den vom Arcuatuskern reich innervierten Neuronengruppen des Nucleus paraventricularis, der Zona incerta, aber auch der perifornikalen und lateralen hypothalamischen Area handelt es sich wahrscheinlich um nachgeordnete Schaltkreise, die ebenfalls mit der Energieregulation befasst sind [153].

Vermittelt werden die Informationen über den peripheren Energiestatus durch zahlreiche auf die hypothalamischen Signalwege einwirkende Botenstoffe, darunter das aus weißem Fettgewebe stammende Leptin. Dieses zirkuliert in zu den Energievorräten proportionalen Konzentrationen und überwindet die Blut-Hirn Schranke wiederum proportional zu seinem Plasmaspiegel, um im ZNS in eine neuronale Antwort überführt zu werden [57].

Dass nun diese neuronale Antwort tatsächlich die Neuronen des Nucleus arcuatus generieren, wird durch zahlreiche Befunde untermauert. So weist der Kern einen dichten Leptinrezeptorbesatz auf, und die Aktionspotentialraten der Arcuatusneurone verändern sich in Abhängigkeit von Leptin, das sogar trophische Wirkungen auf diese Nervenzellen ausübt [35, 41, 24].

Auch die Beobachtungen eines Anstiegs von hypothalamischer Pro-Opiomelanocortin mRNA in den betreffenden Neuronen unter Leptinwirkung sowie einer Reduktion der Pro-Opiomelanocortin Expression der Arcuatusneurone bei Mäusen mit defektem Leptinrezeptor unterstreichen dies [153, 115].

1.2.2 Neuronengruppen innerhalb des Nucleus arcuatus

Zwei Gruppen von Arcuatusneuronen können anhand ihrer Neuropeptidausstattung voneinander abgegrenzt werden:

Eine Neuronengruppe koexprimiert Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related Peptide (AgRP).

Pro-Opiomelanocortin (POMC) zusammen mit Cocaine- and Amphetamine-regulated Transcript (CART) befindet sich in anderen, aber eng zur ersteren Neuronengruppe benachbarten Nervenzellen.

Die Mehrzahl der POMC/CART Neurone und der NPY/AgRP Neurone koexprimieren Leptinrezeptoren, und beide Neuronenpopulationen werden (gegenseitig) durch Leptin reguliert [154].

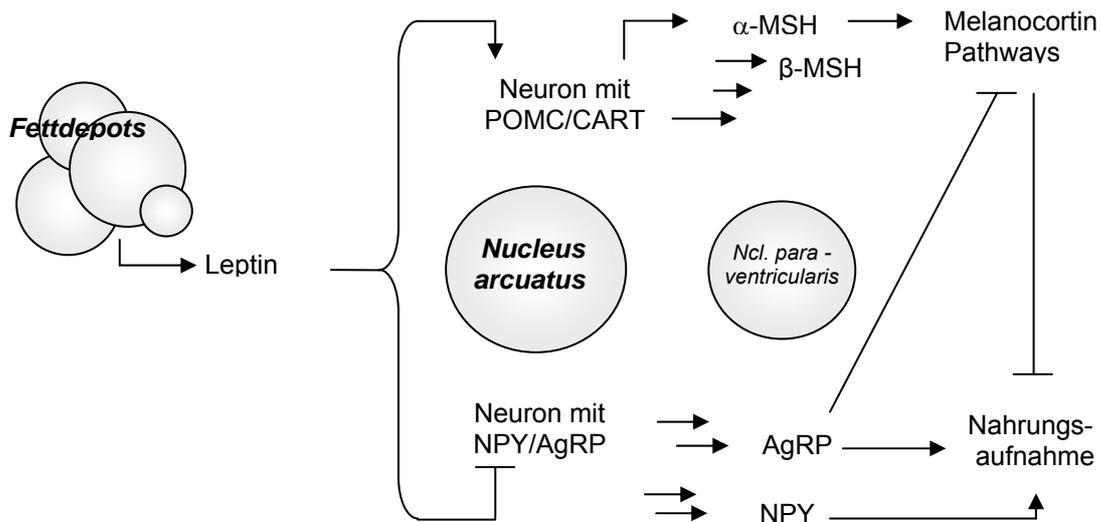


Abbildung 3 vereinfachendes Schema des hypothalamischen Adipostat-Mechanismus mit einer Auswahl der beteiligten Stoffe: Pfeile stellen gleichsinniges, Balken gegensinniges Verhalten dar

Während NPY/AgRP Neurone gehemmt werden, wenn Leptin als Signal für gefüllte Energiedepots ansteigt, erfahren POMC/CART Neurone in der gleichen Situation eine Aktivierung, die sich unter anderem in einer starken Erhöhung der zellulären POMC mRNA auswirkt [115].

Dabei bewirkt eine Hemmung der NPY/AgRP Neurone bei hohem Leptinspiegel auch eine Hemmung der von den in diesen Neuronen exprimierten Peptiden ausgehenden orexigenen Reaktion. Diese ist durch eine vermehrte Nahrungsaufnahme, einhergehend mit vermindertem Energieverbrauch gekennzeichnet.

Die in einer solchen Situation gefüllter Energiespeicher gleichzeitig stärker aktivierten POMC/CART Neurone hingegen setzen eine anorexigene Reaktion mit reduzierter Nahrungsaufnahme und vermehrtem Energieverbrauch in Gang.

Bei niedrigem Leptinspiegel infolge verminderter Fettdepots erfahren wiederum die NPY/AgRP Neurone eine stärkere Aktivierung [154, 39].

1.3 Pro-Opiomelanocortin

1.3.1 Physiologie und Pathophysiologie von Pro-Opiomelanocortin

Lokalisation und Struktur des POMC Gens sind bereits seit einiger Zeit bekannt: POMC befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2, 2p23.3 [133]. Es umfasst 7665bp und besteht aus drei Exons, die getrennt werden durch zwei relativ große Introns.

Lediglich das dritte Exon im Verbund mit einem Teil des zweiten Exons kodiert den Großteil der translatierten mRNA [177, 164].

POMC wird in so unterschiedlichen Geweben wie der Haut, der Plazenta, im Hypothalamus, in der kaudalen Medulla oblongata und im Hypophysenvorderlappen - hier vorwiegend in kortikotrophen Zellen - exprimiert, und je nach Ort der Expression unterscheiden sich die aus Pro-Opiomelanocortin durch posttranslationale Prozessierung hervorgehenden Peptide.

So verwandelt hypophysär die Prohormonkonvertase 1 (PC1) POMC in ein N-terminales Peptid, das Joining-Peptid, ACTH und β -Lipotropin, durch die Prohormonkonvertase 2 (PC2) entstehen im Hypothalamus vorwiegend β -Endorphin, CLIP (Corticotropin-like Intermediate Lobe Peptide) sowie γ -MSH (Melanozytenstimulierendes Hormon), α - und β -MSH [139].

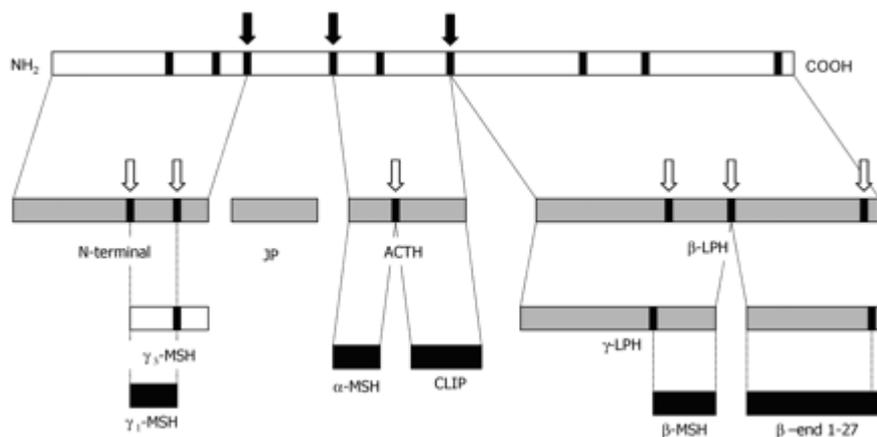


Abbildung 4 Posttranslationales Processing von POMC durch PC1 (schwarze Pfeile) und PC2 (graue Pfeile) in Hypophyse (graue Peptide) und Hypothalamus (schwarze Peptide), nach: Coll A, et al. 2004.

Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen die Verbindung zwischen den POMC-Produkten α - und β -MSH, dem von nachgeordneten Neuronen exprimierten G-Protein gekoppelten Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R) und der Funktion, Energieaufnahme und Grundumsatz auf einem angemessenen Niveau zu halten.

Eine Störung auf der Ebene des POMC verursacht im Mausmodell der POMC-Knockout-Maus einen charakteristischen adipösen Phänotyp [180], es sind jedoch auch Menschen bekannt, die aufgrund von Loss-of-function Mutationen im POMC-Gen an einer früh im Leben beginnenden Adipositas leiden.

Ihr Phänotyp ist entsprechend des modularen Aufbaus des POMC komplex: Adipositas, eine veränderte Pigmentierung mit rötlichem Haar und hellem Teint (fehlende MSH-Wirkung auf Melanocortin 1 Rezeptor in der Haut) sowie ACTH-Mangel (Melanocortin 2 Rezeptor in der Nebennierenrinde) mit konsekutiver Nebennierenrindenatrophie, Hypokortisolismus und Hypoglykämie [89, 91].

Wird die posttranslationale Prozessierung von POMC infolge eines Mangels an Prohormonkonvertase 1 beeinträchtigt, leiden die betroffenen Menschen an einer mit erhöhten POMC Spiegeln einhergehenden, früh einsetzenden Adipositas. Zusätzlich bestehen Hypokortisolismus, eine beeinträchtigte Glucosehomöostase (Verarbeitung von Pro-Insulin zu Insulin) und hypogonadotroper Hypogonadismus (beeinträchtigte Verarbeitung von am GnRH-Releasing beteiligten Peptiden) [78].

Über das bereits erwähnte POMC Produkt α -MSH ist seit Jahren bekannt, dass es, intraventrikulär verabreicht, die Nahrungsaufnahme im Mausmodell reduziert. Ein Effekt, der sich auch bei der Applikation synthetischer Agonisten bestätigt findet und mit Melanocortinantagonisten blockiert werden kann [51].

Im Agouti-Mausmodell (A^y) kommt es aufgrund der ektopen, auch hypothalamischen Produktion des normalerweise in den Haarfollikeln exprimierten Agouti Proteins zu einer Antagonisierung der MC4R, was einen adipösen Phänotyp herbeiführt [51].

Diesen Angriffspunkt hat das Protein jedoch nur aus dem Grund, dass große Homologien zum AgRP (Agouti-related Peptide) bestehen. Anders als das Agouti-Protein wird AgRP physiologischerweise im Hypothalamus exprimiert und stellt dort einen endogenen Melanocortinantagonisten dar. Eine verstärkte Expression im Mausmodell ist in der Lage, Hyperphagie und Adipositas herbeizuführen [132].

Was das POMC Peptid β -MSH anbetrifft, so erbrachte die Entdeckung einer funktionell beeinträchtigenden Missense Mutation im β -MSH kodierenden Abschnitt des POMC Gens beim Menschen, assoziiert mit früh einsetzender Adipositas, einen Hinweis auf eine Bedeutung des β -MSH für den Melanocortinpathway [18].

Auch zur Bedeutung des Melanocortinrezeptors 4 (MC4R) existiert ein Mausmodell, in dem ein Knockout des MC4R bei den betroffenen Tieren eine Hyperphagie einhergehend mit einer rapiden Gewichtsakkumulation bewirkt [34, 74].

In Analogie zu den Verhältnissen bei MC4R-Defekten bzw. MC4R-Antagonisierung im Mausmodell wurden auch funktionell beeinträchtigende Mutationen im MC4R beim Menschen beschrieben [181].

Für diese hat sich mittlerweile herausgestellt, dass sie als die wohl häufigste Form monogenetischer Adipositas beim Menschen anzusehen sind: Wahrscheinlich liegt bis zu 5% der pädiatrischen Adipositasfälle eine solche MC4R-Mutationen zugrunde, wobei Homozygote stärker betroffen sind als Heterozygote [52].

Obwohl die dargestellten Mutationen beim Menschen insgesamt betrachtet verhältnismäßig selten sind, gilt POMC als starkes Kandidatengen, was die Prädisposition für Adipositas anbelangt.

Das unterstreichen die Ergebnisse mehrerer - unabhängig voneinander - an verschiedenen Populationen durchgeführter genomweiter QTL Scans (Quantitative Trait Locus Scans). Diese folgten dem sogenannten positionellen Kandidatengenverfahren, beinhalteten also keinerlei *a priori* Annahmen zur physiologischen Funktion oder Lokalisation der Kandidatengene und zeigten eine hochsignifikante Assoziation zwischen genetischen Markern in einer den POMC Locus umfassenden Region auf dem Chromosom 2 und mit Adipositas als phänotypischem Merkmal.

Sowohl innerhalb der untersuchten afro-amerikanischen, als auch bei kaukasischen und mexikanischen Populationen bestand diese Assoziation [38, 147, 42].

Es konnten jedoch in zwei wiederum unabhängig voneinander an verschiedenen Populationen durchgeführten Untersuchungen des Pro-Opiomelanocortin Locus auf polymorphe Marker keine Polymorphismen in den kodierenden Abschnitten des POMC Gens aufgefunden werden, die die Struktur oder Funktion des Genprodukts verändert hätten, und so die beobachtete Assoziation hätten erklären können [72, 42].

In Anbetracht der aus den QTL-Scans stammenden Daten legen diese Befunde die alternative Überlegung nahe, dass Mutationen in nichtkodierenden, regulatorischen Abschnitten den Level von POMC mRNA-Transkripten beeinflussen und so in der Folge auch die zentrale Konzentration von POMC verändern könnten [90]. Diese Hypothese verschiebt den Blickpunkt auf diejenigen Cis-Elemente, die für die transkriptionelle Regulation von POMC im Hypothalamus von Bedeutung sind.

1.3.2 Transkriptionelle Regulation des Pro-Opiomelanocortin Gens

Die transkriptionelle Regulation von POMC wurde primär in Hypophysenzellen untersucht, wobei sowohl *in vitro* Transfektion als auch *in vivo* Expression in transgenen Mäusen zur Anwendung kamen.

So konnte gezeigt werden, dass ein zwischen -323bp und -34bp proximal des Transkriptionsstarts gelegener DNA-Abschnitt in der Lage ist, eine Reporterexpression in der Hypophyse transgener Mäuse zu veranlassen [100].

Ein transgenes Konstrukt, das den so identifizierten Promoter und weitere 4 kb der 5'-flankierenden Region desselben enthielt, war jedoch nicht in der Lage, gleiches in den Arcuatuseuronen der Tiere zu bewirken [148].

Bis vor kurzem war also in starkem Gegensatz zur gut untersuchten hypophysären Expressionsregulation von POMC weder bekannt, welche Cis-Abschnitte genau für die hypothalamische Transkription von POMC verantwortlich sind, noch welche Transfaktoren für die hypothalamische Expressionsregulation bedeutsam sein könnten [183, 122].

Vor kurzem beschrieb die Arbeitsgruppe Low allerdings auf dem Wege einer funktionellen Expressionsanalyse in transgenen Mäusen nPE1 und nPE2 als ein konserviertes Paar von Enhancern mit spezifischer Bedeutung für die POMC Expression im Ncl. arcuatus, nachdem ausgehend von der Suche nach möglichen Bindungsstellen wichtiger Transkriptionsfaktoren ein phylogenetisches Footprinting zu Kandidatensequenzabschnitten geführt hatte.

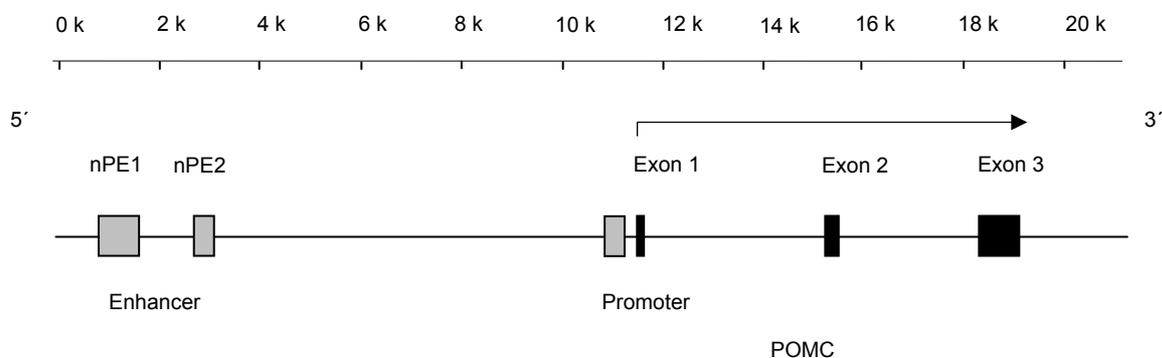


Abbildung 5 Schematische Darstellung des POMC Gens mit Lokalisation des Promoters sowie der konservierten Enhancerelemente nPE1 und nPE2

Die sich mit etwa 10 bzw. 12 kb upstream des transkriptionellen Starts von POMC relativ weit entfernt vom eigentlichen Gen befindenden Abschnitte nPE1 (600bp) und nPE2 (150bp) steuern als einzige nicht repetitive Sequenzabschnitte im von Low als relevant charakterisierten Bereich die Reporterexpression in hypothalamischen Neuronen, nicht aber in der Hypophyse transgener Mäuse. Sogar ohne den Promoter konnte ein Reporter gen über die Enhancer exprimiert werden. Umgekehrt kann die komplette Deletion von nPE1 und nPE2 im Kontext der ganzen transkriptionellen

Einheit die POMC Expression im Hypothalamus ausschalten, ohne diejenige der Hypophyse mit einzubeziehen.

Die Bindungsmotive zahlreicher Transkriptionsfaktoren sind innerhalb der Enhancerabschnitte lokalisiert, darunter CREB (cAMP Response Element Binding) und STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription).

nPE1

```

h _AGCCTGGTGTCCCTCTCCTGGGCAAT GGGACT_GAGGGCACAGTGGG
m GGCCCAAGTGTCACTACCTGGGACAGCAGGACA__GAGGCGGTTCTGA

h GGCTC__TCCGGCCCCAGGTG GGCTGCCTGGATTCCCTGTCTGGCTG
m ACCTCAGTTCGGGCTGC__TTGATTGAAGTCCGGGTTG

h CTCCATTCTTTGAGCAGCAGGCATGAAAATGGA AGATGGGTACCTAA__CC
m CTCCGTTCTTTGTGAGCAGCAGGCATGAAA CAACAGAGGA__CACCAG

h GGGCCGGGGGCTGGAGAGGGAGACTGAGCTGAGTGCCTGT_AAAAGGGC
m G__CGGCAGGGACA GGGACTGAGCTGAGTGCCTGT_AAAAGGGC

h CACTTCAAGCCCCTCCA__CCAGCCATTGTTGGG TCTGGAGGAAGGAGGA
m CACTTCAAGCCC__ATTGTGGGACAGCAGCAGG_TGGG

CREB-like
h CCGCTCGAAGCITCTGAATGC__CCCC__TGTGATGCACT_CACTAATGGA
m CAAG TCTGAG__CTTTGAATGCCTTTCCCGTGTGCACTACGCTAATGGA

OCT-1
h ATGTGCATTAG TGGCCCTCCTCTGGCCCA__CCATCA CTCTCCCTACCTCA
m ATGTGCATTAG CAGTGTCTCTCTGGCCCA__CCGATCGCTCCCTTTCTCTCA

NERF/ELF-2
h ACTG CTGGCTGGAGAACTCCCATTTCTTGGAAAA GTAGCAGTCATGCTC
m GGCCCTG_CTGGAGAACTCTGCATTCTGAGGAAGGGCAGCAGTCA GTGC

h CAGCCCCTAACAAAGGCTGTCCCCACAAAAGGACCATTATGACCACCC
m __TAAAGGC__CCAGAAATGGGGCCATTGTGTGTCATGAC
    
```

```

h TGAGTCAGAATGGTGGCCCTGGCACCTGAGCTCTGTCTGGAAGAGCC
m TGAGTCACACTA GTGACTA CTGGCACCTGAGCTCAGTCTGGAGTAAG TG

h GCAGCAGGGCCGCTATTAAGCAGAGCCTGGTGTGTCTGTTAT TATGTCC
m GTTT CAGGGAAATGATCTGGAGAGTCTGGTGGAGTCTAATAACGTCC

CREB/ATF
h ACAGACATCTTCAGCAAAGACAC TACTTCCA GGAAGTCTACTTGGATTGC
m AGGAACATTTTCAGCAAAGACTGCCTTCCA GGAAGTCTACTTCTGACTGC

STAT3
h AGAGGCCCAAGCCTTCTTGTGAAAAAGGGCTTGGGATAAGGGAGTGGT
m CCAA GAACAAACCCTCATT TGA AAAAGAGAGTTTGGGCTAAGGCAAGCTT
    
```

nPE2

```

h CCGCATTAGTGGATA AAAGCAGTCTCAAGGGT CTCTTCA__CCAGG
m TGCATTAGTGGATGAAGCCGTCTCAAGGGGCTCTTACCAGG

h TCCCTTTGGCTG GAATAAGCAAATTA AACCCATTCAAAGGT
m GCCCTTTGGCTG TAATAAGCAAATTA AACCCATTCAAAGGT

Nkx6.1/Brn2.0 COUP/ERRα
h CAATTGAAATCTTTTTCATT CAGTTCTCTG CACAAATTGATTCC
m CAATTGAAATCTTTTTCATT TCTTCTCCA CACAAATTGATTCC

h TCTTTGCCCTTGAGGTCAAACCCAGGCTGGTGAAGTAGCC__
m TCTTTGCCCTTGAGGTGCACTGAATGCCA__TAAAGGGGCC
ERRα
    
```

Abbildung 6 Basenfolge der Enhancer nPE1 und nPE2 von Mensch (h) und Maus (m): Homologien grau unterlegt, schwarz CpG-Dinukleotide, farbig potenzielle Cis-Elemente für Transkriptionsfaktoren verändert nach [44].

CREB vermittelt abgesehen von seiner Einbindung in kalzium- und wachstumsfaktorabhängige Signalwege auch cAMP-abhängige Expressionsantworten, unter anderem in Zellen mit Melanocortinrezeptorbesatz [114, 99].

Daher wurde von mehreren Gruppen der Phosphorylierungsgrad von CREB in Ncl. arcuatus und Ncl. tractus solitarii abhängig von Ernährungszustand und Leptinspiegel untersucht und eine mit der Erhöhung des zellulären pCREBs in Verbindung stehende verstärkte Transkription von POMC mRNA beobachtet [170, 116, 17, 92].

Bei STAT3 handelt es sich um ein in seiner phosphorylierten Form als starker transkriptioneller Aktivator wirkendes Element des JAK/STAT-Pathways, das sich als notwendig für die leptinvermittelte hypothalamische transkriptionelle Regulation von POMC erwiesen hat [58, 25].

So bewirkt Leptingabe nicht nur eine rasche Phosphorylierung von STAT3 im Hypothalamus [117], auch beobachtet man bei Mäusen, deren aktivierbares STAT3 spezifisch aus den POMC Neuronen entfernt wurde, ein erniedrigtes Niveau von POMC mRNA sowie einen Anstieg der Körperfettmasse [179].

Im Kontext der dargestellten Forschungsergebnisse stellen sich also nPE1 und nPE2 als starke Kandidatenregionen für eine verstärkte Suszeptibilität für Adipositas beim Menschen dar. Um so mehr, als dass Sequenzpolymorphismen in den Enhancern, die für die hypothalamische Expression des POMC essentiell sind, andere phänotypische Merkmale weitgehend unbeeinflusst lassen könnten. Unter entsprechenden Ernährungsbedingungen könnten sie zu exzessiver Gewichtszunahme prädisponieren, ohne dass der Grad der physiologischen Aktion von hypophysär freigesetzten POMC Peptiden beeinflusst würde [44].

Bisher unveröffentlichten, aus unserer Arbeitsgruppe stammenden Daten zufolge handelt es sich bei nPE1 und nPE2 jedoch um interindividuell hochgradig konservierte Elemente. Bei einer Untersuchung lymphozytärer DNA von 368 adipösen und 264 normalgewichtigen Kindern konnte nur bei zwei Personen ein Polymorphismus in nPE1 nachgewiesen werden. Dieser zeigte weder in den untersuchten Gruppen, noch in einer Familienassoziationsstudie eine signifikante Assoziation zu Adipositas [Krude, personal communication].

Da sich somit die Sequenz der Enhancer als hochgradig konserviert erwiesen hat und auf Sequenzebene keine Assoziation zwischen Polymorphismen und Adipositas aufgedeckt werden konnten, stellt sich die Frage, ob die Enhancer für alternative Möglichkeiten der Genexpression im Sinne einer epigenetischen Veränderung empfänglich sind.

1.4 DNA-Methylierung

1.4.1 Der Begriff Epigenetik

Bemerkenswert ist, dass und wie in multizellulären Organismen mit weitgehend homogenem genetischen Repertoire die einer Gewebisdifferenzierung entsprechenden Gene über viele Zellgenerationen hin zur Expression gebracht werden, andere jedoch in einer bestimmten Gewebeart zuverlässig verstummen [79].

Solche mitotisch, aber auch meiotisch erblichen, stabilen, jedoch potenziell reversiblen Veränderungen des Genexpressionsmusters, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind, also gewissermaßen außerhalb der Ebene konventioneller Genetik stattfinden, umfasst der Begriff der „Epigenetik“ (*epi-* griech. oberhalb, außerhalb) [22, 48, 33].

Drei große, miteinander in Wechselbeziehungen stehende Gruppen molekularer Grundmechanismen der Epigenetik sind bis dato bekannt:

Erstens die vielgestaltige Gruppe der die nukleosomale Chromatinkonformation direkt beeinflusenden Histonmodifikationen. Diese betreffen die N-terminalen Histon-Tails in Form von Mono-, Di- oder Trimethylierung von Lysin, Methylierung von Arginin, Azetylierung von Lysin, Phosphorylierung von Serin und ADP-Ribosylierung.

Sogar die Ankopplung kleiner Proteine wie Ubiquitin oder SUMO an Lysin wird beobachtet. Histonmodifikationen können aber auch an den Core-Domänen stattfinden [53].

Darüber hinaus lassen sich auch verschiedene Histonvarianten voneinander abgrenzen, die sich in ihrer Aminosäurefolge unterscheiden [134, 66].

Einen zweiten Mechanismus stellt das RNA-assoziierte Silencing von Genen dar: siRNA (Small Interfering RNA), doppelsträngige RNAs von 21-22 Nukleotiden Länge induzieren die Spaltung von mRNA mit exakt komplementären Sequenzen über sogenannte RISCs (RNA Induced Silencing Complexes).

Alternativ rekrutieren diese hemmende Proteine zu exakt komplementären DNA-Sequenzabschnitten, deren epigenetische Modifikation ebenfalls durch siRNA gefördert werden kann [55, 127].

Drittens beinhalten epigenetische Regulationsmechanismen das bereits seit langer Zeit bekannte und ausführlich beschriebene Phänomen der DNA-Methylierung, auf das im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.4.2 Grundlagen der DNA-Methylierung

Die Enzymfamilie der DNA-Methyltransferasen (Dnmt) hat die Aufgabe, das zelluläre Methylierungsmuster zu etablieren und aufrecht zu erhalten und katalysiert den Methylgruppentransfer von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das C-5-Atom des Cytosins im Kontext des Dinukleotids 5'-CpG-3'.

Hinsichtlich ihres bevorzugten Substrats lassen sich zwei Gruppen von Dnmts abgrenzen: Erstens die *de novo* Dnmts, die den Methylgruppentransfer an vollkommen unmethylierter DNA katalysieren, zweitens die sogenannten „Maintenance“ Dnmts, die eine höhere Affinität zu hemimethylierter DNA zeigen und für die postreplikative Übertragung des Methylierungsmusters des parentalen Strangs auf den Tochterstrang verantwortlich sind: Die drei aktiven Dnmts in Säugern sind Dnmt1, die als Maintenance-Methyltransferase gilt, und die *de novo* Enzyme Dnmt3a und Dnmt3b. Dnmt2 ist zwar hochkonserviert in verschiedenen Spezies, in den meisten Organismen konnte eine katalytische Aktivität aber bisher noch nicht nachgewiesen werden [13, 14, 96].

Eine Deletion jeglicher der drei aktiven Methyltransferasen bewirkt im Mausmodell den Tod der betroffenen Tiere in verschiedenen Entwicklungsstadien, weswegen ihnen eine fundamentale entwicklungsbiologische Rolle zuerkannt wird [130].

Zwar können embryonale Stammzellen und die Zellen der Blastozyste den Zellzyklus ohne merkliche Methylierung durchmachen, sobald allerdings die Differenzierung beginnt, erweist sich die DNA-Methylierung als unverzichtbar für die Überlebensfähigkeit [28].

In der Tat kommt es im Präimplantationsstadium sogar zu einer Demethylierungswelle, während derer das aus den Gameten stammende Methylierungsmuster, paternal aktiv und maternal passiv, gelöscht wird [108].

Nach der Implantation jedoch findet eine *de novo* Methylierung statt, wobei ein Gutteil der CpG-Dinukleotide, etwa 70%, mit Methylgruppen ausgestattet wird [20].

Als CpG-Inseln sind den Takai-Jones Kriterien zufolge Bereiche von mindestens 500bp definiert, in denen CpGs ihrer zu erwartenden Frequenz entsprechend angetroffen werden, d.h. das Verhältnis aus beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden ist $>0,6$ und der C+G-Gehalt $> 50\%$ [165].

Die Inseln befinden sich vorwiegend upstream von insgesamt schätzungsweise 60% aller Promotoren, vor allem von Housekeeping Genen, jedoch auch vor gewebespezifisch exprimierten Genen [5].

Abgesehen etwa von Genen, die dem Imprinting unterliegen, oder dem inaktiven X-Chromosom der Frau, kann die fehlende Methylierung der CpG-Inseln als weiteres wesentliches Charakteristikum vieler, wenn auch nicht aller CpG-Inseln gesehen werden [160, 143].

Wie diese Konstellation der zu einem Großteil unmethylierten CpG-Inseln angesichts der in der Ontogenese beobachteten Methylierungswelle zustande kommt, und welchen Beitrag eventuell existierende demethylierende Enzyme dazu leisten, bleibt nach wie vor unbeantwortet.

Die Mehrzahl der CpGs jedenfalls, die im sogenannten „Bulk-Chromatin“ außerhalb der Inseln zu finden sind, weisen Methylgruppen auf [19, 43].

Festzuhalten ist in diesem Zusammenhang auch, dass die einmal entwicklungsgeschichtlich etablierte Verteilung von Methyl-CpGs über das Genom hinweg nicht unveränderlich und Einflüssen durch Umweltfaktoren durchaus zugänglich zu sein scheint [50].

So konnte in einer großangelegten Untersuchung an monozygoten Zwillingen gezeigt werden, dass sich die älteren Zwillinge in ihren Methylierungsmustern um so mehr unterschieden, je weniger Zeit sie gemeinsam verlebt hatten und je mehr sich Aspekte in ihrer Umwelt unterschieden, während das Methylierungsprofil junger Zwillinge sich noch weitgehend gleich [56].

Und auch für transgenerationelle Effekte existieren Hinweise: Je nach Methylgruppendonorgehalt der Nahrung trächtiger Agouti-Mäuse unterschied sich der Methylierungsgrad des Agouti-Promoters und einhergehend damit die Fellfarbe der Nachkommen [175].

Ein Befund, der auf Hypothesen verweist, die eine ebenfalls vom frühen intrauterinen Ernährungsmilieu abhängige metabolische Prägung postulieren, die sich unter anderem der DNA-Methylierung als Mechanismus bedient [62, 136].

1.4.3 Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und transkriptionellem Status

Methylierung von CpG-Dinukleotiden in einem gegebenen DNA-Abschnitt geht mit einem transkriptionell inaktiven, heterochromatischen Chromatinzustand einher [19].

Dieser ist im wesentlichen über folgende Mechanismen vermittelt:

Einerseits wird diskutiert, dass die Methylgruppen direkt sterisch mit der Bindung von vorwiegend solchen Transkriptionsfaktoren interferieren, die in ihren Zielsequenzen

CpGs aufweisen, darunter beispielsweise Ap2, c-myc, CREB, E2F oder NFκB [166].

Die daraus resultierende Transkriptionshemmung durch Methylgruppen muss als ein Wechselspiel zwischen den in der jeweiligen Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren, der Promoterstärke, eventuell vorhandenen Enhancern und der jeweiligen Methylierungsdichte betrachtet werden [27].

Zum anderen kann eine bestimmte Proteinfamilie über ihre konservierte Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) spezifisch methylierte CpGs binden [26].

Bisher sind fünf Mitglieder dieser Methyl-CpG-Bindungsproteine bekannt, von denen jedoch nur MeCP2, MBD1 und MBD2 eine transkriptionelle Repressorfunktion zukommt [120, 124, 54].

MBD 4 ist ein Reparaturenzym mit Thymidinglykosylaseaktivität, dass an der Reduktion des durch Methylierung von Cytosinen in diesem Bereich erhöhten Mutationsrisikos beteiligt ist [112].

MBD3 bindet nicht an methylierte DNA, sondern beteiligt sich mit im Detail noch ungeklärter Funktion am NuRD-Korepressor-Komplex (Nucleosome Remodelling and Histone Deacetylation), mit dem zusammen MBD2 hinwiederum einen als MeCP1 bezeichneten Komplex bildet [71, 109, 123].

Ein Protein ohne MBD, Kaiso, bindet zwar methylierte CpGs, allerdings im Kontext eines Zinkfinger-Motivs. Ihm scheint ebenfalls eine Wirkung als transkriptioneller Repressor zuzukommen [137, 149].

Wie eine solche Repression durch Methyl-CpG-Bindeproteine zustande kommen kann, lässt sich anhand von MeCP2 veranschaulichen. Es kann direkt sterisch den Zugang transkriptioneller Aktivatoren zu Promotoren oder Enhancern behindern [83], aber auch indirekt reprimieren, z.B. durch Interaktion mit dem Histondeacetylasen beinhaltenden Sin3 Korepressorkomplex [81, 120].

Unter den zahlreichen Histonmodifikationen geht nämlich eine Azetylierung mit funktionell aktivem, offenem, eine Deazetylierung jedoch mit inaktivem, kompakt kondensiertem Chromatin einher [69].

Außer mit dem SWI/SNF Chromatin-Remodeling Komplex ist MeCP2 assoziiert mit einer Histonmethyltransferase, die spezifisch Histon H3 am Lysin 9 methyliert, wovon bekannt ist, dass es sich um eine transkriptionell repressive Modifikation handelt [61, 67].

Ein solcher „cross-talk“ zwischen DNA-Methylierung und dem histonmodifizierenden System findet jedoch in beide Richtungen und nicht nur über die MDB-Proteine statt: Auch Dnmts interagieren mit Histondeazetylasen [59, 60] und umgekehrt kann die DNA-Methylierung in Abhängigkeit zur Methylierung von Histonproteinen stehen [77, 80-95].

1.4.4 Funktionsebenen der DNA-Methylierung

Der Mechanismus der DNA-Methylierung ermöglicht es Zellen, durch selektive transkriptionelle Stilllegung einzelner Gene stabile, der jeweiligen Differenzierung entsprechende Genexpressionsprofile zu etablieren und die Gendosis einzustellen, wie etwa Phänomene wie die X-Inaktivierung und das genomische Imprinting zeigen [143, 160].

Das durch eine Dnmt3b-Mutation bedingte und unter anderem mit stark erhöhter chromosomaler Instabilität einhergehende ICF-Syndrom (Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial Abnormalities) deutet auf eine weitere Funktion der DNA-Methylierung hin, die in einer Verminderung der homologen Rekombination zwischen repetitiven Elementen und damit indirekt ebenfalls in der Stabilisierung des gewebespezifischen Genexpressionsprofils besteht [158].

In diesem Zusammenhang werden auch die Stilllegung von Transposons und die Verteidigung gegen virale Sequenzabschnitte mit der DNA-Methylierung in Verbindung gebracht [88, 182].

Sowohl in der Ontogenese als auch in der Ausdifferenzierung einzelner Organsysteme scheint dies geradezu überlebensnotwendig zu sein, wie im Mausmodell anhand des Dnmt-Knockouts und am Beispiel inaktivierender Mutationen von MeCP2 beim Menschen belegt ist. Letztere sind Ursache des Rett-Syndroms, einer tiefgreifenden neuro-psychiatrischen Entwicklungsstörung [130, 174].

Umgekehrt spielt das zelluläre DNA-Methylierungsmuster auch bei Dedifferenzierungsvorgängen wie etwa der Kanzerogenese eine Rolle:

Tumorzellen zeigen oft ein global niedrigeres Niveau von DNA-Methylierung als normale Körperzellen, was mit einer Re-Expression von stillgelegten Genen einhergehen kann, weisen aber lokale DNA-Hypermethylierung, z.B. an Promotoren von Tumorsuppressorgenen auf, die in der Folge inaktiviert werden können [11, 159].

1.4.5 DNA-Methylierung von Enhancern

Zunächst ist hervorzuheben, dass das durch verschiedene Gruppen bisher zusammengetragene Material zum Methylierungsstatus von Enhancern im Vergleich zur intensiv untersuchten DNA-Methylierung von Promotern spärlich ist. Bei der Untersuchung der Methylierung von Enhancern stehen die Neoplasien jedoch ebenfalls deutlich im Vordergrund.

Fragestellung	Material	Autoren
Einfluss der DNA-Methylierung des TCDD-sensitiven Enhancers von CYP1A1 auf dessen Induzierbarkeit durch Dioxin	Zelllinien und Gewebe: Prostatakarzinom, benigne Prostatahyperplasie	[131]
CYP1B1 Expression im Zusammenhang mit DNA-Hypomethylierung des Promoters/ Enhancers		[169]
DNA-Methylierung des HIF-Bindungsmotivs im 3'Enhancer von Erythropoietin (EPO) in Abhängigkeit vom neuronalen Zellphänotyp	Neuroblastom Zelllinien	[146]
DNA-Methylierung des intronischen Enhancer des RFX1-Gens (transkriptioneller Regulator für c-myc)	Gliom-Proben, Zelllinien, normale Glia, mononukleäre Zellen	[129]
Methylierungsstatus des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Promoters/Enhancers in Abhängigkeit zur MGMT-Expression	verschiedene humane Krebszelllinien, MGMT+/-	[119]
Methylierung des Promoters/Enhancers von Fas und dessen Expression	Kolonkarzinomproben	[135]
DNA-Methylierung des Enhancers des HPV16-Genprodukts E6 (humanes Papillomavirus) in Abhängigkeit von der Zahl der Virusgenome	Zervixkarzinom Zelllinien	[140]
Existenz eines DNA-Methylierungsmusters von HPV 16 in Zervixschleimhautzellen	Proben aus Zervixkarzinomen, CIN, asymptomatisch Infizierter	[82]
Methylierungsstatus des Enhancers von Genprodukt E6 bei HPV18 in Abhängigkeit von der Zahl der viralen Kopien	Proben asymptomatisch Infizierter, ZervixCA, Zelllinien	[8]
DNA-Methylierung des viralen Enhancers des HPV16-Genprodukts E6 (humanes Papillomavirus) und Tumorprogression	Zervixkarzinom Zelllinien CIN - Proben (zervikale intraepitheliale Neoplasie)	[7]
Effekte der DNA-Methylierung der LTR-Enhancer des Rous Sarcoma Virus	Hühnerfibroblastenlinie, div. Säuger Zelllinien	[70]
Methylierung des LMP1 und BCR2 Promoters/Enhancers beim EBV	Burkitt-Lymphom Zelllinien	[113]

Tabelle 1 Arbeiten zum DNA-Methylierungsstatus von Enhancern bei neoplastischen Prozessen

Fragestellung	Material	Autoren
Einfluss der DNA-Methylierung des CMV Promoters/Enhancers auf die Expression eines Transgens	Adenoviraler Vektor in Skelettmuskelzellen der Ratte	[29]
DNA-Methylierung und provirales Silencing am Beispiel des Enhancers des MML-Virus (Moloney Murine Leukemia Virus)	MEL-Zellen mit MML-Virus	[101, 102]
Methylierungsstatus des Upstream-Elements vom Intracisternal-A-Particle	murine Teratokarzinomzellen	[151]
Methylierungsstatus von LTR-Enhancern als Modulator der Expression des HI-Virus	HIV-infizierte murine Vero Zellen	[12]

Tabelle 2 DNA-Methylierung von Enhancern und Expression von Transgenen, provirales Silencing

Fragestellung	Material	Autoren
epigenetische Kontrolle der Oct-4 Genexpression durch dessen Promoter/Enhancer	embryonale Stammzellen, Trophoblastzellen, Zelllinien und Gewebe von Dnmt1KO Mäusen	[68]
Einfluss von Glukokortikoiden auf DNA-Demethylierung in der Ontogenese am Beispiel des Enhancers des TAT-Gens (Tyrosin-Aminotransferase)	Rattenhepatozyten Zelllinie, Kultur fetaler Rattenhepatozyten	[168]
Demethylierung des distalen myoD Enhancers im Laufe der Myogenese im Skelettmuskel	Myogene Zellen und Somitenzellen aus Mausembryos, Transgenes Mausmodell, nicht-myogene Zellen	[31]
Entwicklungsabhängige Methylierung des MLC-CAT- Enhancers der leichten Kette von Rattenmyosin und dessen Einfluss auf die Expression eines Transgens	Transgen in Skelettmuskulatur der Ratte	[64]

Tabelle 3 DNA-Methylierung von Enhancern in der Gewebsdifferenzierung und Entwicklung

Fragestellung	Material	Autoren
gewebsspezifische Stilllegung der Expression des B29-Gens in der Hypophyse durch dessen 3'-Enhancer	Zelllinien: Niere, Hypophyse, murine B-Zellen	[106]
Sauerstoff-regulierte Erythropoetin-Expression in Abhängigkeit von der CpG-Methylierung des 3'-Enhancers	Zelllinien mit und ohne EPO-Produktion, nicht exprimierendes Mausgewebe	[176]
Methylierung einer ETS-Site im intronischen Enhancer des Keratin-18 Gens partizipiert in gewebs-spezifischer Expression	transgenes Mausmodell für K18 (Herz, Leber, Milz), humanes Gewebe (Leber, Niere, Herz, Milz, Gehirn)	[171]
CpG-Methylierung des Enhancers des Proenkephalin Gens und Einfluss auf dessen Transkription	CV1-Zellen und Gliom Zelllinie	[37]

Tabelle 4 DNA-Methylierung von Enhancern und gewebsspezifische Expression von Genen

Fragestellung	Material	Autoren
DNA-Methylierung der Enhancer des IL 4 Locus in der TH2 Zelldifferenzierung	Naive T-Zellen, TH1 und TH2	[3]
Veränderungen des Methylierungsstatus des IFN-gamma-Enhancers in der T-Zell Differenzierung	naive und stimulierte T-Zellen	[128]
IL-2 Promoter-Enhancerregion und ihr Methylierungsstatus in Abhängigkeit von Kostimulation durch CD28	CD4+ T-Zellen mit/ohne kostimulatorische Signale	[167]
DNA-Methylierung des Perforin Enhancers/Promoters und Einfluss auf die Perforinexpression	NK-Zelllinie, T-Zelllinien und Fibroblasten	[104]
Differenzierung von primären hämatopoetischen Stammzellen in vitro und Methylierung des Chicken-Lysozym Gens mit Enhancer	myeloide Zellen aus transgenem Mausknochenmark, verschiedene Differenzierungsstadien	[163]
DNA-Methylierung des Enhancers des Chicken Lysozym Gens	transgenes Mausknochenmark, Zelllinien: Erythroblasten, Makrophagen, Progenitorzellen	[94]

Tabelle 5 DNA-Methylierung von Enhancern und Blutzelldifferenzierung

Fragestellung	Material	Autoren
Methylierungsstatus des Perforin-Promoters/Enhancers	CD4- und CD8, NK Zellen, Fibroblastenlinien	[103]
Interleukin-2 Gen Enhancer, Methylierung und Einfluss auf die Transkription	CD4 aus transgenen Mäusen, Fibroblastenlinien, Hepatozytenlinien	[30]
M-Lysozym-Gen Enhancer, Methylierung und Expression	Linien von Fibroblasten, myeloiden Vorläufern, T Zellen und Makrophagen	[2]

Tabelle 5 (fortgesetzt) DNA-Methylierung von Enhancern und Blutzeldifferenzierung

So dominieren bei einer Literaturrecherche in Medline mit den Suchbegriffen „Enhancer“ und „DNA-Methylierung“ unter den Suchergebnissen solche Arbeiten, die sich mit neoplastisch verändertem Gewebe befassen (Tabelle 1). Selten wurde allerdings ein Enhancer isoliert betrachtet, zumeist wurden die entsprechenden Promoter bei der Untersuchung in den Vordergrund gestellt.

Einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt bildet das provirale Silencing sowie der Einfluss der DNA-Methylierung auf die transkriptionelle Stilllegung transgener Expression (Tabelle 2). Prozesse der Gewebsdifferenzierung im Allgemeinen (Tabelle 3) und die Blutzeldifferenzierung im Besonderen (Tabelle 5) sind weitere Arbeitsbereiche, neben wenigen Arbeiten zur Rolle der Enhancermethylierung in der gewebs-spezifischen Expression von Genen (Tabelle 4).

Aus den hier tabellarisch dargestellten Ergebnissen der Literaturrecherche geht außerdem hervor, dass sich die überwiegende Mehrzahl der bisher zur DNA-Methylierung von Enhancern vorliegenden Arbeiten der Untersuchung methylierter DNA in Zelllinien bedient. Die Hyper- oder Hypomethylierung von gewebs-spezifischen regulatorischen Sequenzbereichen in deren natürlichem Gewebekontext wurde bisher nur extrem selten untersucht. Zum Methylierungsstatus von Enhancern in ihrem angestammten Chromatinkontext in einem spezifischen Zelltyp, bei dem es sich nicht um eine immortalisierte Linie oder *in vitro* manipulierte Zellen, sondern um direkt aus einem Gewebsverband entnommene Zellen handelt, liegt unserem aktuellen Kenntnisstand zufolge bisher noch keine Arbeit vor.

1.4.6 DNA-Methylierung und POMC

Im Bereich des Pro-Opiomelanocortin Gens befinden sich zwei umschriebene CpG-Inseln [63].

Einerseits in der Umgebung des in zahlreichen Geweben schwach aktiven 3'-Promoters, der sich im zweiten Intron kurz vor Exon 3 befindet [122].

Zum anderen liegt der Bereich bei ca -300bp, der die hochgradig gewebesrestringierten, regulatorischen Elemente des 5' Promoters enthält, in eine zweite CpG-Insel eingebettet.

Diese Region kurz vor dem Exon 1 ist, wie bereits dargelegt, Hauptausgangspunkt für die Initiation der Transkription von Pro-Opiomelanocortin in den kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens sowie auch in POMC exprimierenden Neuronen im Hypothalamus [122].

Bereits seit einiger Zeit ist bekannt, dass ein ebenfalls etwa auf der Höhe von -300bp gelegener Bereich, der ein Spaltmotiv für das HpaII-Restriktionsenzym enthält, empfänglich für eine differentielle Methylierung ist: Dieser Bereich zeigt eine variable DNA-Methylierung in Pro-Opiomelanocortin exprimierenden und nicht exprimierenden Geweben [93].

Eine intensivere Analyse des Methylierungsmusters dieses Bereichs mittels der bisulfit-gestützten Sequenzierung in verschiedenen exprimierenden und nicht exprimierenden Geweben, Tumoren sowie Zelltypen führte ausgehend von diesen früheren Untersuchungen zu dem Befund, dass dieser Bereich hypermethyliert ist in normalem, nicht exprimierendem Gewebe bzw. Zelllinien, jedoch hypomethyliert in solchen Zellen, die POMC und dessen Folgepeptide exprimieren [121].

Hierbei handelt es sich in sofern um eine Besonderheit, als dass es sich diesen Befunden zufolge bei POMC um eines der ersten somatisch exprimierten Gene handelt, von dem bekannt ist, dass es eine hypermethylierte CpG-Insel in normalerweise dieses Gen nicht exprimierenden Geweben aufweist. Dies stellt eine Ausnahme von der grundlegenden Vorstellung dar, dass die CpG-Inseln in allen somatischen Geweben unmethyliert vorliegen [122, 19].

Hierraus geht hervor, dass die transkriptionelle Regulation von POMC im Prinzip zugänglich ist für die Mechanismen der DNA-Methylierung. Des weiteren unterstreichen diese Befunde, dass sich sowohl die gewebes-spezifische Regulation, als auch das Gesamtniveau der POMC Expression durch das Methylierungsmuster des 5'-Promoters beeinflusst zeigen.

Daraus kann im Hinblick auf das Phänomen Adipositas die Hypothese abgeleitet werden, dass die hypothalamische Gendosis einiger Individuen auch durch einen fixierten höheren Methylierungslevel vermindert sein könnte, welcher dann einhergehend mit einer entsprechend niedrigeren Expressionkapazität für POMC eine verminderte Übermittlung peripherer Sättigungssignale bedeuten würde [121].

1.5 Fragestellung

Die Entdeckung des mit früh einsetzender Adipositas einhergehenden Pro-Opiomelanocortin Mangelsyndroms beim Menschen untermauert die entscheidende Rolle der aus POMC hervorgehenden Peptide für die zentrale Energiehomöostase.

Über diese relativ seltenen POMC Defekte hinaus existieren aus mehreren, unabhängig voneinander an verschiedenen Populationen durchgeführten QTL-Scans hervorgehende Daten, die auf eine Assoziation von Leptinspiegeln bzw. Körperfettmasse und dem POMC Locus deuten.

Funktionell bedeutsame Polymorphismen im eigentlichen POMC Gen konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden, so dass Veränderungen in den nicht kodierenden Bereichen von POMC für diese Befunde verantwortlich sein könnten, indem sie das Niveau der hypothalamischen POMC Expression beeinflussen.

Letzere ist hochgradig gewebs-spezifisch reguliert, wie die Entdeckung der konservierten Enhancerelemente nPE1 und nPE2, die als essentiell für die Expression im Hypothalamus charakterisiert werden konnten, zeigt.

Da sich diese regulatorischen Elemente auf genetischer Ebene als hochkonserviert erwiesen haben und zugleich aus Untersuchungen des DNA-Methylierungsstatus des POMC Promoters in Hypophyse wie Hypothalamus Hinweise darauf existieren, dass das POMC Gen prinzipiell für eine epigenetische Regulation auf der Ebene der DNA-Methylierung zugänglich ist, stellt sich die Frage, ob eine epigenetische Alteration in Form eines differentiellen DNA-Methylierungsmusters im Bereich der gewebs-spezifischen regulatorischen Elemente für die erläuterten Befunde verantwortlich sein könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu klären, ob die konservierten, hypothalamus-spezifischen Enhancer für eine differentielle, gewebs-spezifische DNA-Methylierung empfänglich sind, und zu ermitteln, wie ein möglicherweise vorliegendes Methylierungsmuster aussehen könnte. Dabei konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung peripherer Blutzellen und Arcuatuseuronen beim Menschen und bezieht angesichts der starken phylogenetischen Konservierung des Enhancerpaares einen Speziesvergleich Mensch-Maus mit ein.

Diese Arbeit nimmt insofern einen besonderen Blickpunkt ein, als dass das DNA-Methylierungsmuster von *Enhancern* weder in neoplastisch veränderten noch transformierten Zellen, sondern in ihrem natürlichen Chromatin- und Expressionskontext dargestellt werden soll.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die menschlichen Hypothalamusschnitte wurden uns Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe van Landeghem, Institut für Neuropathologie der Charité Berlin, zur Verfügung gestellt. Die menschlichen peripheren Blutzellen dagegen wurden von freiwilligen gesunden Personen (Labormitarbeitern) gewonnen. Die untersuchten peripheren murinen Blutzellen stammen von der Arbeitsgruppe Professor Köhrle, Institut für experimentelle Endokrinologie, Charité Berlin.

2.1.1 Geräte

Laserdissektionsgerät	MicroBeam [®] , P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried
Sequencer	Leica AS LMD [®] , Leica Microsystems, Wetzlar ABI 373 [®] und ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Software	DNA Sequencing Analysis 5.2, Applied Biosystems Foster City, CA, USA
Thermocycler	UNO [®] - Thermoblock, Biometra, Göttingen Mastercycler [®] Gradient, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg
Photometer	Bio-Photometer [®] , Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	APT Line BD 23 [®] , Firma Binder, Tuttlingen
Heizblock	Techne Dri - Block [®] DB3, Techne, Jahnsdorf
Thermoschüttler	Thermomixer Compact [®] , Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Kern 70, Firma Kern, Balingen
Mikrotom	Kryostat HM 500, Mikrom , Walldorf

2.1.2 Chemikalien

Hydrochinon	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumbisulfit	MERCK, Darmstadt
Natronlauge	MERCK, Darmstadt
Hochvisköses Mineralöl	Trinity Biotech, Wicklow, Irland

Sea plaque Agarose	Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA
SDS	MERCK, Darmstadt
Tris	MERCK, Darmstadt
HCl	MERCK, Darmstadt
EDTA	Calbiochem., San Diego, CA, USA
Betain	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
MgCl ₂	BIOLINE, Randolph, MA, USA
Agarose	NEEO Ultra Agarose, Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumacetat	MERCK, Darmstadt
Ethanol	MERCK, Darmstadt
Methanol	MERCK, Darmstadt
H ₂ O ₂	MERCK, Darmstadt
dNTPs	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

EcoRI	New England Biolabs, Schwalbach
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	BIOLINE, Randolph, MA, USA

2.1.4 Enzympuffer

EcoRI-Puffer (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
NH ₄ ⁺ -reaction buffer	BIOLINE, Randolph, MA, USA

2.1.5 Primer

TIB MOLBIOL, Berlin

2.1.6 Kits

DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Blood Mini [®] ; Qiagen, Hilden
Sequenzierkit	ABI PRISM [®] Big Dye Terminator v 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Gel-Extraktionskit	QIAQuick [®] Gel-Extraction Kit, Qiagen, Hilden

2.1.7 Immunhistochemie

Primärantikörper	Arbeitsgruppe Prof. Brabant, MH Hannover
Sekundärantikörper	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Streptavidin-HRP	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Swine serum	DAKO, Carpinteria, CA, USA
HRP-DAB-Substr Buffer	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Chromogen DAB	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Hämatoxylin	MERCK, Darmstadt

2.1.8 Sonstige Lösungen und Puffer

PBS	Biochrom, Berlin
Lyselösung	20µg/ml Proteinase K 10mM TRIS-HCl 10mM EDTA 1% SDS
Tris-EDTA-Puffer, pH 8	10mM Tris-HCl, pH 7,4 0,1mM EDTA, pH 8 ad H ₂ O
10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), pH 8	Tris 0,89 M E ₃ BO ₃ 0,89 M EDTA 0,02 M

2.2 Prinzipien der Methoden und Versuchsablauf

2.2.1 Isolierung von DNA aus Vollblut

Die dem Protokoll für das QIAmp DNA Blood Mini[®] Kit folgende DNA-Gewinnung aus peripheren Blutzellen erforderte zunächst einen Lyseschritt: Dazu wurden 300 µl Vollblut mit 300µl QIAgen-Lysepuffer AL zu 30µl Proteinase K in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei 56°C für 10 min inkubiert.

Anschließend wurde die DNA von den Zellresten getrennt: Dazu wurden 300 µl Ethanol (100%) hinzugefügt und die Lösung in ein QIAmp Zentrifugensäulchen überführt. An dessen Membran aus Silicagel konnte die DNA adsorbieren, während sich durch das einminütige Zentrifugieren bei 8000 rpm (rounds per minute) die Zellreste in einem Auffanggefäß darunter sammelten.

Zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte mit dem QIAgen-Puffern AW1 bei 8000 rpm für eine Minute und AW2 14000 rpm für drei Minuten schlossen sich an.

In einem abschließenden Elutionsschritt konnte die DNA in 75µl 80°C warmem destillierten Wasser aufgefangen werden, das zunächst auf die Membran des Zentrifugensäulchens pipettiert wurde und durch einen abschließenden einminütigen Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm die DNA aus der Säule löste. Die anschließende Bestimmung des DNA-Gehalts des Eluats erfolgte photometrisch.

2.2.2 Prinzip und Anwendung der Bisulfitmethode

Der Ausgangspunkt der Methode besteht in einer oxidativen Desaminierung nicht methylierten Cytosins zu Uracil im Milieu einer Natriumbisulfitlösung, die sich aus den Komponenten Natriumbisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), Hydrochinon (1,4-Benzendiol) und Natronlauge (Endkonzentration von NaOH 0,3 M) zusammensetzt und eine Reaktion ermöglicht, die aus drei Schritten besteht (Abbildung 7).

Die Addition einer SO_3 -Gruppe an die 5,6-Doppelbindung eines unmethylierten Cytosins (1 \Rightarrow 2) schafft zunächst die Bedingungen für eine spontane Hydrolyse der Aminogruppe an C-4 (2 \Rightarrow 3), was ein sulfoniertes Uracil hervorbringt. Uracil wird anschließend wiedergewonnen durch Desulfonieren unter alkalischen Bedingungen (3 \Rightarrow 4) [155].

Dabei macht man sich zunutze, dass 5-Methylcytosin im Gegensatz zu unmethyliertem Cytosin weniger anfällig für nukleophile Angriffe an der 5,6-Doppelbindung ist und daher in diesem Reaktionsmilieu nicht modifiziert wird. Dies ist ein Unterschied, den man in einer sich der Amplifikation der Zielsequenz anschließenden Sequenzierung sichtbar machen kann.

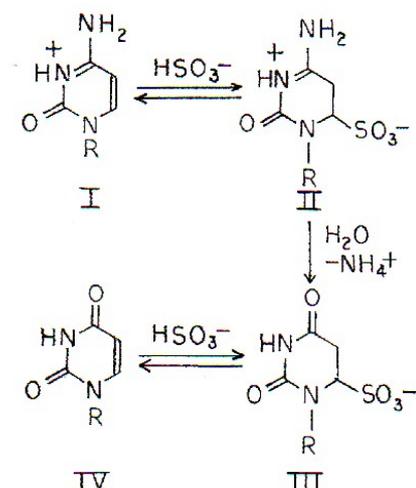


Abbildung 7 Bisulfitumwandlung

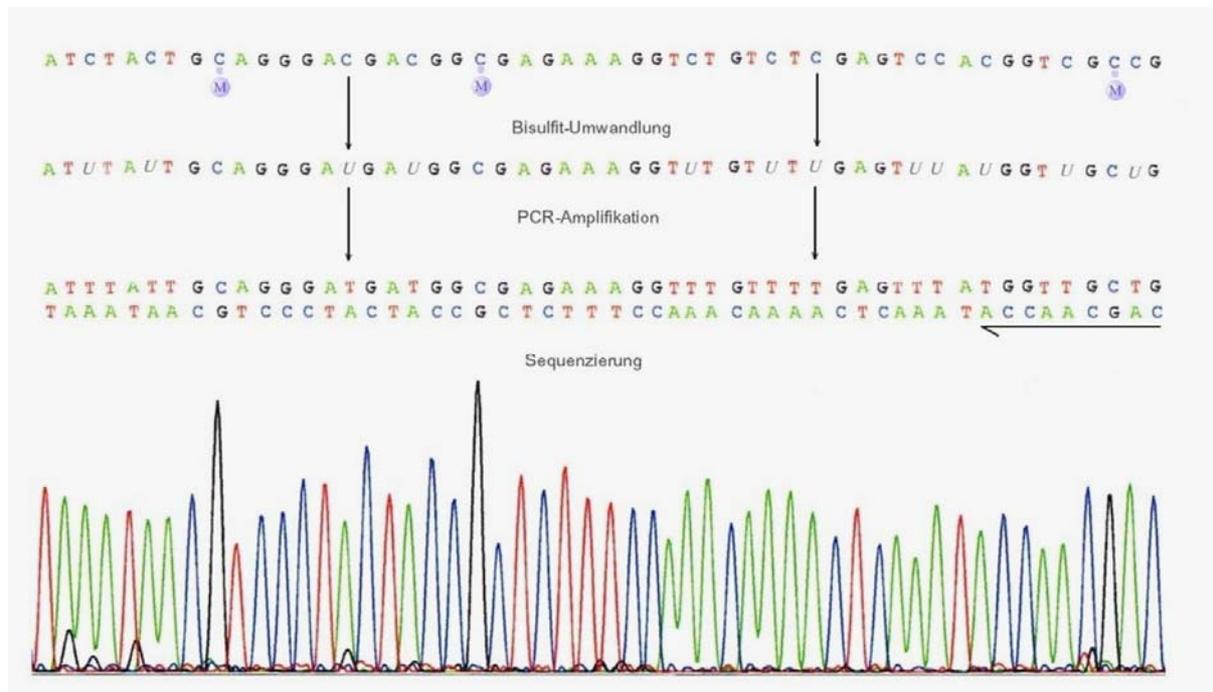


Abbildung 8 Übersicht zum Prinzip der Bisulfit- Umwandlung und sich anschließender Schritte

Ursprünglich nicht methylierte, zu Uracil transformierte Cytosine werden als Thymin gelesen, 5-Methylcytosine werden als Cytosine erkannt [65].

Allerdings lassen sich nur solche unmethylierten Cytosine umwandeln, die in einzelsträngigen DNA Bereichen lokalisiert sind [155], weswegen es erforderlich ist, die DNA-Probe entsprechend aufzubereiten und zu denaturieren.

Maximal 300ng der leukozytären DNA wurden zunächst einem enzymatischen Verdau unterzogen: EcoR1, ein Restriktionsenzym mit der Zielsequenz 5' ... G⁺AATTC ... 3' bzw. 3'...CTTAA⁺G...5' spaltete bei 37°C während zwei Stunden die DNA in kürzere Fragmente, die sich im Folgenden leichter denaturieren und in der Bisulfitlösung umwandeln lassen, da die räumliche Trennung der komplementären Stränge nach der Denaturierung ausgeprägter ist.

Ersteres geschah in Form einer fünfminütigen Hitzedenaturierung bei 95°C, an die sich eine zweite alkalische Denaturierung mit 2M Natronlauge über 15 min bei 50°C anschloss.

Damit eine optimale Ausbeute an modifizierten DNA-Fragmenten auch bei kleinsten Ausgangsmengen gewährleistet ist, der Verlust von DNA während des Überführens der DNA minimal bleibt und ein Reannealing der DNA zum Doppelstrang weitgehend

abgewendet wird, wurde die so aufgeschlossene DNA (zwischen 300 und 600 ng) in 50µl LMP (*low melting point*) Sea Plaque Agarose eingebettet.

Aus dem Agarose-DNA-Gemisch wurden Beads geformt (*engl.* Kügelchen, Perlen), die jeweils nicht mehr als 100ng DNA enthielten, indem 10µl des Gemisches durch eine Phase aus schwerem, hochviskösem Mineralöl, mit dem die eisgekühlte Bisulfitlösung überschichtet wurde, in die untere Bisulfitphase abgesenkt wurden.

Während der darauf folgenden siebenstündigen Inkubation bei 50°C ereignete sich die angestrebte Umwandlungsreaktion. Waschschritte mit Tris-EDTA-Puffer pH 8, Natronlauge (0,2M), erneut Tris-EDTA und schließlich Wasser dienten einerseits dem Entfernen von störenden Reaktionskomponenten im Hinblick auf die sich anschließende PCR, andererseits der alkalischen Rückgewinnung von Uracil (siehe Abbildung 7).

2.2.3 Immunhistochemische Färbung der Kryoschnitte

Zur selektiven DNA-Isolierung aus Neuronen des Nucleus arcuatus wurden aus den menschlichen Hypothalami Kryoschnitte von 10µm Dicke angefertigt und auf einen zur Lasermikrodissektion geeigneten, mit Polyethylenfolie beschichteten Objektträger aufgebracht. Die anschließende Fixierung erfolgte mit Ethanol (70%), anschließend trockneten die Schnitte an der Luft.

Zuerst war es erforderlich, eine eventuell endogen vorhandene Peroxidaseaktivität in den Schnitten zu blockieren, um die Spezifität der immunhistochemischen Färbung zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurde nach einem Waschschritt mit aqua dest ein Methanol/H₂O₂-Gemisch (750µl H₂O, 50µl Methanol) für eine 10-minütige Inkubation eingesetzt.

Um nämlich die für die Fragestellung interessanten β-MSH produzierenden Zellen des Nucleus arcuatus selektiv darzustellen, wurden die Schnitte einer dem ABC-Prinzip (Avidin Biotin Complex) folgenden immunhistochemischen Färbemethode unterzogen, bei der die Signalgebung ebenfalls auf der Aktivität einer Peroxidase beruht.

Als Vorteil dieser zu den indirekten Färbeverfahren gehörenden Methode im Vergleich zu direkten Färbungen, bei denen ein enzymmarkierter Primärantikörper direkt mit dem Gewebsantigen interagiert, gilt eine höhere Sensitivität [126].

Zunächst bindet ein Primärantikörper an das darzustellende Gewebsantigen. Dieser wird von einem Sekundärantikörper erkannt, der in einer anderen Spezies als der Primärantikörper gegen Antigen der Spezies, aus der der Primärantikörper stammt, gebildet wurde.

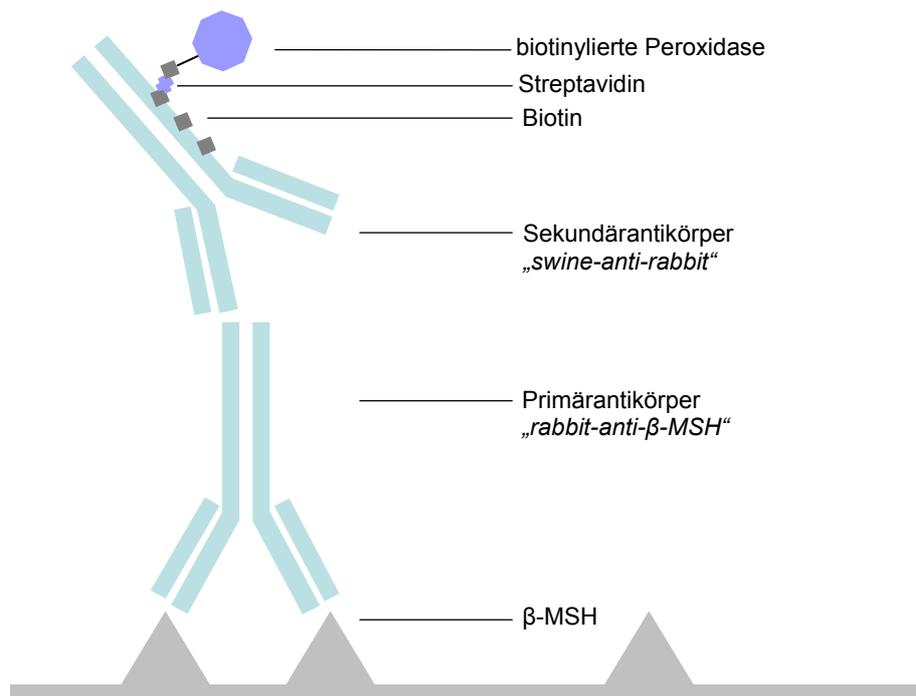


Abbildung 9 Darstellung des Prinzips der immunhistochemischen Färbung β -MSH-produzierender Neurone

Bei einem solchen indirekten Verfahren können mehrere sekundäre Antikörper mit mehreren verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers interagieren und es lässt sich die Signalintensität steigern, da letztlich mehr Enzymmoleküle pro Zielstruktur angelagert sind.

Diese Anlagerung des Enzyms an den Sekundärantikörper findet statt über den bereits erwähnten (Strept-)Avidin-Biotin Komplex. Sie macht sich die hohe Affinität des Streptavidins zu Biotin zunutze: Der Sekundärantikörper ist biotinyliert und daher in der Lage, Streptavidin-HRP (Horse Reddish Peroxidase) zu binden.

Eine der Zugabe der Antikörper vorangehende 20-minütige Inkubation mit Serum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, hier Schweineserum, diente dazu, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Spezifität der Färbung weiter zu erhöhen.

Über Nacht schloss sich bei 4°C die Inkubation mit dem Primärantikörper „rabbit-anti- β -MSH“ an.

Nach einem Waschschrift mit PBS zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper folgte der biotinylierte Sekundärantikörper „swine-anti-rabbit“ 60 Minuten bei Raumtemperatur. Wieder wurden die nicht gebundenen Antikörper mit PBS entfernt.

Streptavidin-HRP (Horse Reddish Peroxidase) lagerte sich an die biotinylierten Sekundärantikörper an, und nach einem weiteren PBS-Bad wurde ein Chromogen zugegeben, das, indem es durch die Peroxidase umgewandelt wird, die Bindungsverhältnisse, und damit die Orte erhöhter β -MSH Konzentration, sichtbar macht (750 μ l Dako – Substrat Puffer DAB und 15 μ l Chromogen DAB für 2 Minuten). Nach anschließendem Waschen mit PBS und aqua dest folgte schließlich die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

2.2.4 Laser-Mikrodissektion

Bei der Gewinnung morphologisch uniformer, reiner Zellpopulationen, wie hier β -MSH positiver Zellen aus Gewebeschnitten, stellt die Komplexität des Zielgewebes ein Hindernis dar. Dieses wurde mit Hilfe der sogenannten LMPC-Technologie (Laser Microdissection Pressure Catapulting) angegangen [152].

Dabei ist ein gepulster, im UV-A Bereich arbeitender Laser mit einem Mikroskop gekoppelt, so dass unter visueller Kontrolle die immunhistochemisch kenntlich gemachten β -MSH produzierenden Zellen des Nucleus arcuatus aufgesucht und ausgeschnitten werden können.

Der Schneidevorgang mittels Laserlicht ist ein schneller, fotoablativer Prozess, der, da er ohne eine Gewebserhitzung einhergeht, eine unkontrollierte Denaturierung des Zellmaterials vermeidet. So kann optimales Ausgangsmaterial für die empfindliche Bisulfitmethode bereitgestellt werden [85].

Am Ende der Schneideaktion wird die auf einem mit einer Membran aus Polyethylen-naphthalat versehenen Objektträger befindliche Zelle mit Hilfe eines einzelnen defokussierten Laserpulses aus der Objektebene katapultiert und in einem Microtube mit Lyselösung aufgefangen.

Es handelt sich dabei um ein kontaktloses Transferverfahren, bei dem Kontaminationen minimiert werden können, da einerseits durch die Fotoablation eine klare Grenze zwischen den selektierten β -MSH positiven Zellen und dem umstehenden unerwünschtem Gewebe gezogen ist und andererseits nur Licht für den Transfer verwendet wird [32].

2.2.5 Aufbereitung der lasermikrodissezierten DNA

Direkt nach der laservermittelten Zellentnahme gelangte das im Microtube gesammelte Material in Kontakt mit Lyselösung, die 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1% SDS sowie

20µg/ml Proteinase K enthielt und unter Aufschluss der Zellstruktur gleichzeitig der Inaktivierung von DNAsen diente.

3µl der so gewonnenen Zellsuspension und 6µl 80°C heiße *low melting point* Agarose wurden vermischt, anschließend mit schwerem, hochviskösem Mineralöl überschichtet und für 30 Minuten auf 95°C erhitzt, wonach für weitere 30 Minuten auf Eis gekühlt eine Konsolidierung der Agarose-Zellmischung in Form von Beads stattfand.

Die Beads inkubierten zur Vervollständigung des Aufschlusses der Zellen über Nacht bei 37°C in Lyselösung, mit der die Mineralölphase unterschichtet war.

Anschließend wurden die Zellen mit TE gewaschen und schrittweise gegen 100µl des Puffers, den das nachfolgend eingesetzte Restriktionsenzym benötigt, equilibriert.

100µl Restriktionsenzym-puffer und 20 internationale Einheiten des Restriktionsenzym ECOR-1 wurden nach Entfernen der zuvor eingesetzten Lösungen dem Material beigegeben und ein weiteres Mal bei Körpertemperatur über Nacht inkubiert, was analog zu den Denaturierungsschritten bei der Bisulfitumwandlung der DNA aus den peripheren Blutzellen eine Aufspaltung der Nukleinsäure in kleinere Fragmente bewirkte.

Dem enzymatischen Verdau schlossen sich eine alkalische Denaturierung mit NaOH 0,4 M und 0,1 M sowie eine Hitzedenaturierung an, während der die wiederum mit Mineralöl überschichteten Beads auf 95°C erhitzt wurden.

Nach Abkühlung auf Eis erfolgte die Unterschichtung der Mineralölphase mit Bisulfitlösung, wobei die Beads sich in der unteren Phase befanden.

Die weiteren Schritte der Bisulfittransformation mit alkalischer Rückgewinnung erfolgten wie bereits dargestellt.

2.2.6 Nested-PCR

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt es, durch sich zyklisch wiederholende Reaktionsabfolgen Nukleinsäuresegmente gezielt enorm zu vervielfältigen, was die Grundlage für die weitere Analyse der isolierten und der Bisulfitmethode unterzogenen DNA bildet.

In einem ersten Schritt kommt es bei hoher Temperatur zur Denaturierung der DNA, im Weiteren zu einer Anlagerung der Oligonukleotid-Primer bei niedrigerer Temperatur, der Annealingtemperatur.

In einem Elongationsschritt synthetisiert die thermostabile und Magnesium als Kofaktor benötigende Taq-Polymerase ausgehend von der freien 3'-OH-Gruppe den komplementären Strang mit Desoxynukleotiden.

Die Nested-PCR nun ist eine Methode, die dazu dient, die von den Primern determinierte Spezifität einer Polymerasekettenreaktion noch weiter zu erhöhen.

Zu diesem Zweck wird nach erfolgreicher Amplifikation eines Templates in einer ersten PCR dieses zum Ausgangspunkt einer zweiten PCR gemacht, deren Primerpaar im Vergleich zur ersten Reaktion weiter innen im Zielsegment liegt.

Liegt nur ein Primer bei der zweiten PCR im Vergleich zur ersten Reaktion weiter innen im Zielsegment, kann man auch von einer Semi-Nested-PCR sprechen, die gleichermaßen eine hochspezifische Amplifikation der interessanten Sequenz ermöglicht [150].

Sollte nämlich im ersten Ansatz ein anderes als das interessierende Segment amplifiziert worden sein, so ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass dieses ein zweites Mal unter Verwendung anderer Primer amplifiziert werden sollte.

Die verwendeten Primer wurden selbst ermittelt und von der Firma TiB Molbiol, Berlin synthetisiert (siehe Tabelle 7).

Beim Konstruieren passender Primer gilt es zu beachten, dass die Primerpaare möglichst die gleiche Gesamtzahl von Nukleotiden aufweisen und außerdem ein ausgewogenes Verhältnis AT:CG besitzen.

Die Primer für das humane nPE1 wurden für die sich der ersten PCR (Fragment 1) anschließende zweite Polymerasekettenreaktion der Nested-PCR so gesetzt, dass sich statt eines größeren zwei kürzere Fragmente (Fragment 2 und 3 benannt) ergaben, was sich im Hinblick auf die sich direkt anschließende Sequenzierung als vorteilhafter erwies.

Reaktion		<i>Sense</i>	<i>antisense</i>	Größe
hnPE1				
erste PCR	Fragment 1	Fow in	Rev out	714 bp
zweite PCR	Fragment 2	Fow in	Rev 7	401 bp
	Fragment 3	Fow 6	Rev out	338 bp
hnPE2				
erste PCR		Fow out	Rev out	458 bp
zweite PCR		Fow in	Rev out	368 bp
mnPE1				
erste PCR		Fow out	Rev out	717 bp
zweite PCR		Fow in	Rev in	530 bp

Tabelle 6 PCR-Reaktionen, Fragmentbezeichnung mit Primerkombination, Größe des PCR-Produkts

		Primerbezeichnung	Accession Number	Sequenz	
<i>Human</i>	hnPE1	<i>Sense</i>	POMCnPE1fow-out	NT_022184	5'- GTGTATGTATATGTATAGATATA-3'
			POMCnPE1fow-in		5'- GTTTTTTGAGTTGTTGTATAGTA-3'
			nPE1-5fow		5'- GTTTTGTGATGTATTTATTAATGG-3'
			nPE1-6fow		5'- TTTATTTTAATTGTTGGTTGGAG-3'
	<i>anti-sense</i>	POMCnPE1rev-out		5'- CCCTTTTTTACAATAAAAACTT -3'	
		POMCnPE1rev-in		5'- ACCATATAAAACCACATATATTC -3'	
		nPE1-7rew		5'- CTCCAACCAACAATTAATAATAA -3'	
<i>Human</i>	hnPE2	<i>Sense</i>	POMC-k2fow-out	NT_022184	5'-TTGATTTTGTGGATTTTGAGG-3'
			POMC-k2fow-in		5'-AGATTATGTAGATTTTGGTTTAG-3'
	<i>anti-sense</i>	POMC-k2rev-out		5'-AAATTACTAATACCCCAATAAC-3'	
		POMC-k2rev-in		5'-AACCTAAAACCTAAAACACTACAA-3'	
<i>Murin</i>	mnPE1	<i>Sense</i>	mPOMCnPE1fow-out	NC_00078	5'-GGT TTAGTGTTATTTATTTGGGATAG-3'
			mPOMCnPE1fow-in		5'-TTTTTAGTTTTGTTGTGGAGTAGGTT-3'
		<i>anti-sense</i>	mPOMCnPE1rev-in		5'-CAAATAAACTTCTAAAAATACAATCT-3'
			mPOMCnPE1rev-out		5'-TACAAAACCTATTAACATCCCACTC-3'

Tabelle 7 Primer für die Amplifikation der konservierten Elemente

Eine Übersicht über die genaue Lokalisation der Primer bieten die Abbildungen 10a, 10b und 11 im Ergebnisteil.

Zu jedem Primerpaar wurde mittels PCR-Ansätzen im Gradientencycler und nachfolgender Kontrolle der Ausbeute mittels Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte die passende Annealing Temperatur ausgewählt.

Für die Semi-Nested-PCR ergaben sich so folgende PCR Bedingungen:

1	95°C	5 min	}	40 Zyklen
2	95°C	45 s		
3	x°C	45 s		
4	72°C	1 min		
5	72°C	8 min		

Die Annealing Temperaturen betragen jeweils:

hnPE1		
Fragment 1 und 3	x = 55,5°C	
Fragment 2	x = 53,2°C	
hnPE2	x = 50,3°C	
mnPE1	x = 55,5°C	

Es wurden für die Nested-PCR folgende Komponenten auf Eis pipettiert:

28,9	µl	H ₂ O
10	µl	Betain
5	µl	NH ₄ Puffer
1,5	µl	MgCl ₂
0,5	µl	dNTP
1+1	µl	Primer – forward bzw. Primer – reverse
0,1	µl	Taq Polymerase
2	µl	Template

2.2.7 Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden zusammen mit Loading-Dye auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid als interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen und so nach ihrer Auftrennung im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Um ausschließlich die reine, der Bisulfitmethode unterzogene und nachgehend amplifizierte DNA für das weitere Vorgehen zu asservieren, wurden die Banden, die sich im entsprechenden Größenbereich darstellten, ausgeschnitten und weiter gereinigt.

2.2.8 Gel-Extraktion

Die mit dem QIAquick[®] Gel-Extraction Kit durchgeführte Aufreinigung des Materials folgte den Angaben des Herstellers. Nachdem pro 100mg Gewicht des Agarosegelblocks 100µl QG Solubilization Buffer zugefügt waren und sich bei 50°C-Inkubation im Thermoschüttler das Gel-Fragment gelöst hatte, konnte die Lösung auf die Membran einer QIAquick[®] Säule überführt und eine Minute bei 10 000 rpm zentrifugiert werden. Während die DNA an der Membran adsorbierte, wurden Gel- und Pufferreste im unter der Membran gelegenen Sammelgefäß aufgefangen und verworfen. Ein Waschschrift, bei dem 750µl QG Wash Buffer auf die Membran pipettiert und hindurchzentrifugiert wurden, schloss sich einem letzten Zentrifugationsschritt zur Entfernung überschüssiger Flüssigkeit aus der Membran an.

Mit 30µl vorgewärmtem Wasser erfolgte die DNA-Elution in einem letzten Zentrifugationsschritt, wie die vorangegangenen eine Minute bei 10 000 rpm.

2.2.9 Sequenzierung

In einem letzten Schritt galt es herauszufinden, welche CpGs noch als CG in der Basenfolge erhalten geblieben, also ursprünglich methyliert waren, und welche CpGs ausgehend von unmethylierten Cytosinen nunmehr ein Thymin aufwiesen, wozu sich eine Sequenzierung ohne vorherige Klonierung anbot.

Im Vergleich zu einer Klonierung des Fragments und nachgehender Sequenzierung weist dieses Vorgehen nämlich den Vorteil auf, dass der Methylierungsstatus unabhängig von einem möglicherweise bei der Klonierung entstehenden Bias dargestellt werden kann.

Der Grundgedanke der Sequenzierung beruht darauf, dass von einem gewünschten Nukleinsäureabschnitt Kopien unterschiedlicher Länge hergestellt werden, bei denen jeweils die letzte Base detektiert und identifiziert werden kann. Trennt man die Fragmente nach der Länge, so kann man jeder Position in der Basenfolge eine bestimmte Base zuordnen.

Zunächst erfolgte also eine Amplifikation der zu sequenzierenden Basenreihe in einer Sequenzier-PCR, bei der der Polymerase fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide

angeboten wurden. Dies bewirkte einen Kettenabbruch an jeweils unterschiedlicher Stelle, so dass ein Gemisch aus an fluoreszenzmarkierten Fragmenten unterschiedlicher Länge entstand.

Folgende Komponenten für die Sequenzier-PCR wurden pipettiert:

- 1 μ l Primer
- 3 μ l Puffer
- 2 μ l PCR-Produkt
- 3 μ l H₂O
- 3 μ l Big Dye Terminator v 1.1./3.1

Diesem Programm folgend wurde die Sequenzier-PCR durchgeführt:

95°C	1 min	}	30 Zyklen
95°C	30 s		
55°C	15 s		
60°C	4 min		
60°C	7 min		

Zur Reinigung der Proben wurden diese mit 2 μ l Natriumacetat 1,5 M und 20 μ l Ethanol (100%) gefällt und bei 10000rpm für 30 Minuten zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand verworfen, 250 μ l Ethanol (70%) zugegeben, und ein zweiter Zentrifugierschritt 15 Minuten bei 10 000 rpm durchgeführt.

Schließlich wurde auch der so entstandene Überstand abgesaugt und die Probe getrocknet, daraufhin bei -20°C gelagert.

Anschließend erfolgte die Elution der Probe mit 30 μ l H₂O und der Transfer in ein 96-Well Plate für den Sequencer, von wo aus die Proben elektrophoretisch in polymergefüllte Kapillaren injiziert wurden.

An diese Kapillaren wurde eine Spannung angelegt, die die DNA gemäß der höheren Wanderungsgeschwindigkeit kürzerer Fragmente auftrennte.

Die Detektion erfolgte mittels eines Argon-Lasers, der die unterschiedlichen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxynukleotide zu Lichtemission anregte.

Das einfallende Fluoreszenzlicht wurde aufgefangen und jeweils der markierten Base zugeordnet, der durch die zweite Information, welche Länge die gerade abgetasteten

Fragmente hatten, auch ihre Position innerhalb der Basenfolge zugewiesen werden konnte.

Die Sequenz der Zielsegmente wurde unter Zuhilfenahme des Programms „DNA Sequencing Analysis 5.2“ der Firma Applied Biosystems zur Darstellung gebracht und die darin befindlichen CpGs auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Methylierungsmuster der hypothalamus-spezifischen Enhancer des Pro-Opiomelanocortin Gens untersucht.

Dabei wurde zum einen DNA aus menschlichen peripheren Blutzellen als Grundlage verwendet, zum anderen ein Speziesvergleich zur Maus hergestellt, indem auch aus murinen peripheren Blutzellen stammende DNA auf Cytosin-Methylierung im Bereich der konservierten Enhancer hin analysiert wurde.

Schließlich konnte auch der Methylierungsstatus von DNA, die direkt aus dem POMC exprimierenden Zielgewebe gewonnen wurde, dargestellt werden. Hierzu wurden β -MSH exprimierende Arcuatuseuronen aus einer Serie von Gefrierschnitten menschlicher Hypothalami isoliert.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen den Bereich der phylogenetisch konservierten Enhancer bei Mensch und Maus und veranschaulichen die genaue Position der für die Amplifikation der DNA-Fragmente verwendeten Primer.

h-npE1 ...ATATATATATATGTATATATATA

TATA **CG** TGTATGTATATGTATAGATATA TATAG AGT TATGG **G**TTTTTTGAGTTGTTGTA POMCnPE1fow-out

TAGTA GGT TATT GTGTATTAGTTTGTTTAGTTT GGTGTTTTT TTTGGGGTAATGGG POMCnPE1fow-in

ATTGA GGGTATAGT GGGGG TTTT **CG**GGT **CG**TA GGT GGGTTGTTG GATT **CG**TTGT

TTTGGTTGTTTTATT TTTTGGAGTAGTAGGTATGAAAT GGA AGATGGGTATTTAA **CG**

GG GC **CG**GG GGTG GAGAG GGAGATTGAGTTGAGTGTGTA AAA AGGTTATTTTA

AGTTTTTTTA **CG**TAGTTATTGTTGGGT TGGAGGAAGGAGGAT **CG**TT **CG**GAAGTTTT

TGAATGT **CG**TTTTGTGATGATTTATTAATGGATGTG TATTAGTGG **CG**TTTTTTTGGT nPE1-5fow

TATTAC **CG**TTATTTTTTTTATTTTAATTGTTGGTTGGGAATTT **CG**TATTTTTTTGGAAAAG nPE1-6fow bzw. nPE1-7rew

TAGTAGTTATGTT **CG**AGTTTTAATAAAGGTTTGT TTTTATAAAAAGGATTATTATGATT

AT **CG**TTGAGTTAGAATGGTGGT **CG**TTGGTATTGAGTTTGT TTG GAAGAG **CG**GTAG

TAG GGA **CG**TTATTTAGTAGAGTTTGGTGTGTTGTTATGTTATAATATTTTAGTAAA

GATATATTTTTAG GAAGTTATTTGGATTGTAGAG **CG**TT AAGTTTTTATTGTGAAAA POMCnPE1rev-in

AAGGGTTTGGGATAAGGGAGTG **G**TTTTAAAAGAATATATGTGGTTTTATATGGT AAT... POMCnPE1rev-out

Abbildung 10a nPE1 beim Menschen, mit Primern (umrahmt) und der Lokalisation der untersuchten CpG-Dinukleotide (rot). Grau unterlegt sind alle Thymine, an deren Stelle vor der Bisulfidkonversion unmethylierte Cytosine standen

h-npE2 ... TATATATATATATTTGTAGAAATGGGGTTTATTATATTATT
 TAGGTTTTTTTTTATTTTGGATTTGTTTTGGATTTGAGG GTGTT GATAAATTTGTTTTA POMC-k2fow-out
 GGGAGGGGATGGATTTGGTTTTTTTATTTGTGTTTTGCGTATTTAGATTATGTAGA
 TTTTGGTTTAGGTTGTGTGATTAATGCGCGTATTAGTGGAT AAAAGTAGTTTTAA GGGT POMC-k2fow-in
 TTTTTTACGAGGTTTTTTGGTTGGAATAAAGTAAA TTAATAATTTTATTAAAGGTTAATT
 GAAATTTTTTTTATTAGTTTTTGTATAAATTGATTTTTTTGTTTTGAGGTTAAATC
 GAAGGTTGGTGAAGTAGTTTAGTTGTAGTGTGTATGAGAGAAGTTAATGAAAA GGT
 TGAGATTGGGAGGGCGTGTGTA GGGGTGAAGCGGGGTAGT GGGATTCGTTTGAA
 TTGTA GGTTATTTGGGGTATTAGTAATTTTTTTTGTAGTGTTTTAGGTTTAGGT POMC-k2rev-in und
 TTTTTTGGAGGTAGTTTTTGTGTGTTTTGTAAATTATATTAGGTTTTTTTAGAGGGAT POMC-k2rev-out
 GTTAATTAGGGTTTTATTG...

Abbildung 10b nPE2 beim Menschen mit Primern, CpG-Dinukleotiden und außerhalb von CpG-Dinukleotiden vorkommenden Cytosinen

m-npE1
 ...GATTTGTTTTAATTTATAATAAGATTTTGGTATATAGAGAGAGTAATGGGTTTTTAG mPOMCnPE1fow-out
 TTTTGTGTGGAGTAGGTTACGATGAGTTGTTTTGTCCGGTTTAGTGTATTATTATT mPOMCnPE1fow-in
 GGGATAGTAGGATAGAGGCGGTTTTGAATTTAGTTCCGTTGTTTGATTTGAAGTT
 CCGGTTGTTCCGTTTTTTGTGTAGTAGGATGA AAATAATAGAGGATATTAGGCCGT
 AGGGATAGGGATTGAGTTGAGTGTGTGTA AAAA GGTTATTTAAGTTTTATTGT GGGG
 ATAGTAGTAGGTTGGTAAGTTGAGTTTT GAATGTTTTTTTCCGTGATGTATTA CGTTA
 ATGGATGTGTATTAATAGTGTTTTTTTGGTTATCGTATCGTTCCGTTTTTTTA GGTTT
 TGTTGGAGAA TTTTGTATTTTGA GGAAGGGTAGTAGTTAGTGTTTAAA GGTTTTAGA
 ATGGGGTTATTGTGGTTATTATTGAGTTATATTAGTGATTATTGGTATTTGAGTTTAGT
 TTGGAGTAAGTGGTTTTAGGGA CGTTATTGGGAGAGTTGGTGCGAGTTTAA CGTTT
 AGGATATTTTAAATAAGATTGTATTTTAGGAAGTTATTGATTGTTTAGAAAATAAA mPOMCnPE1rev-in
 TTTTTATTTTAAAAGAGAGTTTTGGGTTAAGGTAAGTTGGG AAAGGGTATAAAAGGTT
 TTGCCGAGGAATA CGTTTACGTTTTGATTTAGGGAATAAGAGTGGGATGTTTTAATAGT mPOMCnPE1rev-out
 TTTGTAATTA CGTTACGTTACGTTATTGCGATGGTATTAGTGTTCGTTGTAGGAGTGATG
 TAGAGGTTGTGATTTAGGT...

Abbildung 11 npE1 der Maus mit Primern (gerahmt), analysierte CpG-Dinukleotide (rot) und Positionen der unmethylierten Cytosine außerhalb der CpGs (grau unterlegt)

Das murine nPE2 enthält lediglich ein einzelnes CpG-Dinukleotid, weswegen es bei den hier durchgeführten Versuchen vernachlässigt wurde.

Ebenso wurde auf die Darstellung des Methylierungsmusters von hnPE2 im Hypothalamus verzichtet; zum einen wegen des geringeren CpG-Gehalts im Vergleich zu nPE1, zum anderen, da nPE1 die Mehrzahl der Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren enthält und zudem gerade die für die hypothalamische Transkriptionsregulation interessanten Faktoren CREB und STAT3 Bindungsmotive im Bereich von nPE1 besitzen.

3.1 DNA aus humanen peripheren Blutzellen

Zunächst wurde die DNA aus menschlichen peripheren Blutzellen im Hinblick auf ihr Methylierungsmuster mit der Frage, ob die konservierten Enhancerelemente für eine DNA-Methylierung empfänglich sind, untersucht.

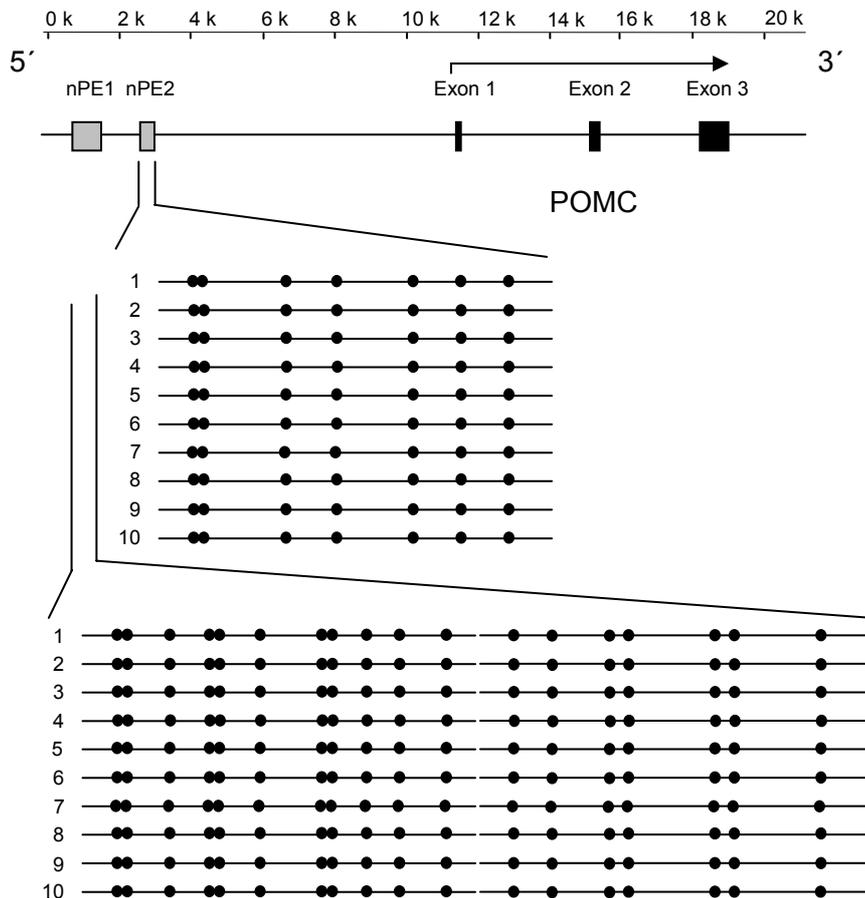


Abbildung 12 grafische Darstellung der Methylierung von nPE1 und nPE2 in menschlichen peripheren Blutzellen mit Lagebeziehungen der Enhancer. Jeder Kreis stellt ein CpG-Dinukleotid dar, die schwarze Füllung der Kreise zeigt an, dass die CpGs Methylcytosin enthielten. Nicht ausgefüllte Kreise würden den grafischen Konventionen der Darstellung entsprechend unmethylierte Cytosine anzeigen.

Die grafische Darstellung des Methylierungsstatus der untersuchten Personen zeigt, dass alle im Bereich der Enhancer liegenden CpG-Dinukleotide methylierte Cytosine enthielten, da diese bei ansonsten vollständiger Bisulfitumwandlung der Cytosine, die sich außerhalb des CpG-Kontextes fanden, nach der Sequenzierung noch immer deutlich als Cytosine erschienen. Bei den humanen Enhancerelementen handelte es sich um 18 CpG-Dinukleotide in nPE1, sowie um 7 CpGs in nPE2 (siehe Abbildung 12).

Als ergänzende Parameter sind das Alter sowie die BMIs der untersuchten Personen aufgeführt (siehe Tabelle 8).

Person	BMI (kg/m ²)	Alter (J)
1	19,8	23
2	23,8	23
3	22,6	17
4	20,7	19
5	20,0	21
6	31,1	56
7	18,9	28
8	31,1	49
9	21,6	28
10	26,4	36

Tabelle 8 BMI Spektrum und Alter der Personen, von denen die peripheren Blutzellen stammten

3.2 murine DNA aus peripheren Blutzellen

Um festzustellen, ob der Methylierungsstatus der konservierten Enhancerelemente der Maus dem menschlichen Muster ähnelt, wurden danach periphere Blutzellen, die aus Mäusen gewonnen wurden, auf Methylgruppen an den CpG - Dinukleotiden in nPE1 hin untersucht.

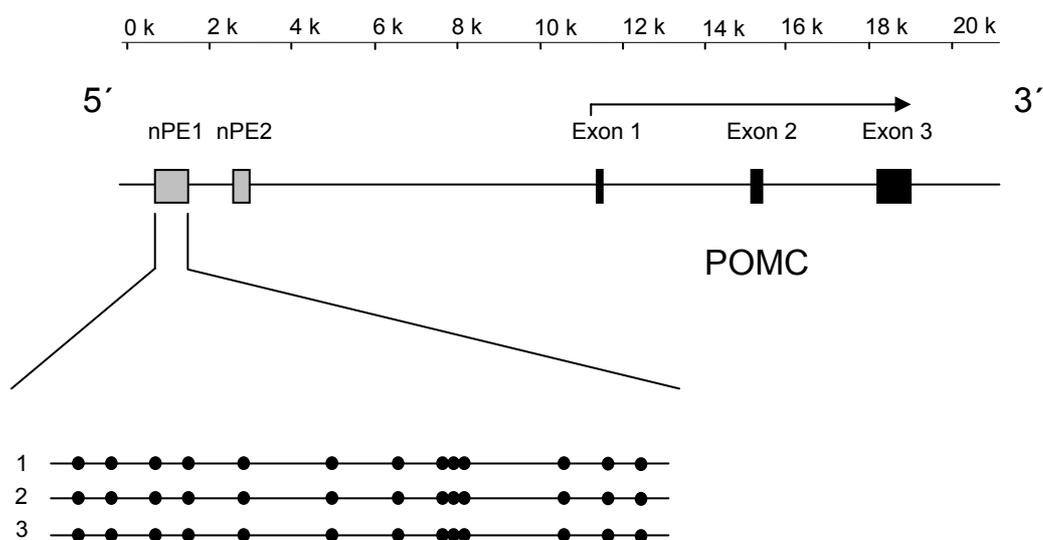


Abbildung 13 Darstellung der Methylierung von nPE1 in murinen peripheren Blutzellen

Bei allen drei untersuchten Tieren fand sich eine den Befunden bei menschlicher DNA in peripheren Blutzellen entsprechende Methylierung jedes einzelnen CpG-Dinukleotids, das umfasst für nPE1 13 CpGs.

Dieser Befund zeigt, dass der DNA-Methylierungsstatus der untersuchten Bereiche in menschlichen Blutzellen demjenigen in murinen Blutzellen gleicht, was grafisch in der Abbildung 13 dargestellt ist.

Um diese Ergebnisse weiter in Relation zu setzen, und die Hypothese zu überprüfen, dass die konservierten Bereiche in exprimierenden Geweben hypomethyliert sein könnten, gingen wir im Folgenden der Frage nach, wie das DNA-Methylierungsmuster in solchen Zellen beschaffen sein könnte, die definitiv Pro-Opiomelanocortin exprimieren.

3.3 DNA aus humanen POMC produzierenden Arcuatusneuronen

Die Ergebnisse der Immunohistochemie für die selektive Darstellung von β -MSH in den Arcuatusneuronen illustriert die Abbildung 14. Sie zeigt einen Kryoschnitt aus dem Bereich des menschlichen Hypothalamus, in dem die Neuronengruppe des Nucleus arcuatus anzutreffen ist.

Die Aufnahme wurde während der Laser-Mikroskopie ohne Deckglas gemacht und hat daher im Vergleich zu Aufnahmen mit Deckglas eine etwas geringere Auflösung.

Trotzdem erkennt man deutlich die Arcuatusneuronen, die Pro-Opiomelanocortin exprimieren. Diese stellen sich zytoplasmatisch rot-braun dar und heben sich deutlich vom umgebenden glialen und neuronalen Gewebe ab.

Der in der unteren Abbildung zu sehende Gewebsdefekt, der durch den Einsatz der Laser-Mikrodissektion entstanden ist, zeigt, wie die durch die Anwendung der immunhistochemischen Färbung identifizierten Zellen präzise demarkiert und anschließend mittels eines defokussierten Laserpulses einzeln aus dem Gewebeverband katapultiert werden konnten.

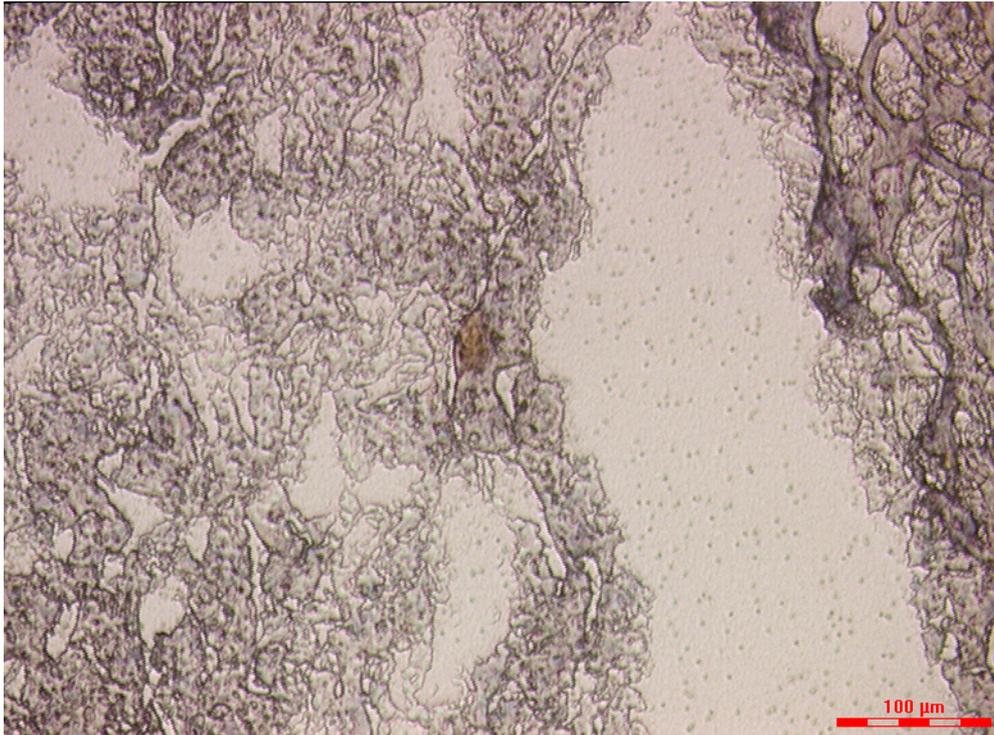


Abbildung 14 Immunhistochemische Darstellung von β -MSH und damit auch Pro-Opiomelanocortin exprimierenden Neuronen des Nucleus arcuatus hypothalami im Kryoschnitt (*oben*), Beispiel für die Zellaservierung mittels LMPC-Technologie (*unten*)

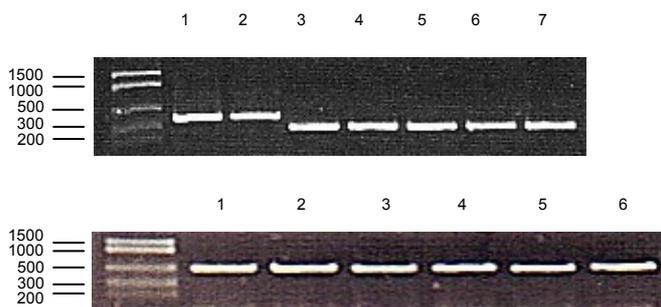


Abbildung 15 Beispiel für die PCR-Produkte:

oberes Gel: hnpE1,
Banden 1-2 Fragment 2 [401 bp],
Banden 3-7 Fragment 3 [338 bp],

unteres Gel: mnpE1 [530 bp].

Für alle fünf untersuchten Nuclei arcuati wie auch für die DNA aus den peripheren Blutzellen ließ sich in der Folge nach Amplifikation der aus den dargestellten Zellen gewonnenen DNA ein PCR Produkt gewinnen, das in Form einer scharfen Bande im angestrebten Größenbereich des Gels sichtbar wurde.

Auch die der Bisulfitbehandlung nachfolgende DNA-Sequenzierung ergab ein entsprechend sauberes Elektropherogramm, aus dem beispielhaft an dieser Stelle ein Ausschnitt wiedergegeben wird.

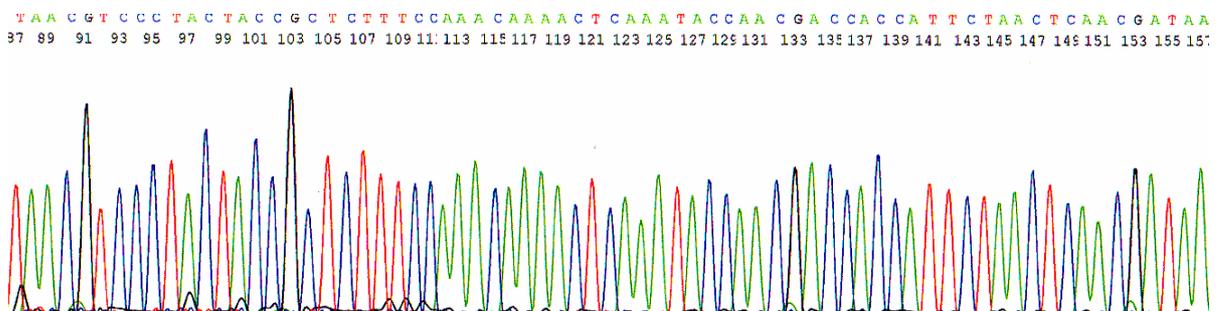


Abbildung 16 Ein im Elektropherogramm-Modus wiedergegebener Sequenzabschnitt aus hnPE1

Eine Zusammenfassung des DNA-Methylierungsstatus in hypothalamischen POMC exprimierenden Arcuatusneuronen im Bereich der Enhancer des Pro-Opiomelanocortin Gens ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Grafik zur DNA-Methylierung der fünf untersuchten Individuen verdeutlicht, dass auch hier eine DNA-Hypermethylierung festgestellt werden konnte, die wie bereits bei humanen peripheren Blutzellen beobachtet alle CpG-Dinukleotide im untersuchten Bereich erfasst.

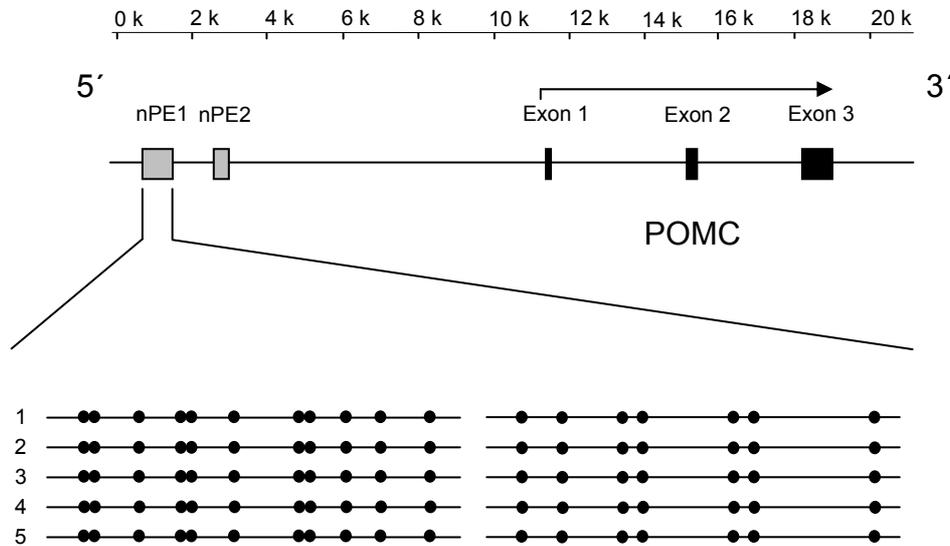


Abbildung 17 grafische Darstellung des Methylierungsstatus von nPE1 in hypothalamischen, POMC exprimierenden Arcuatuseuronen, alle CpG-Dinukleotide im untersuchten Bereich waren methyliert

Aus den Akten der Verstorbenen wurden die jeweiligen Body Mass Indices ermittelt, diese sind zusammen mit dem Alter in der Tabelle 9 dargestellt.

Es zeigt sich, dass drei Personen mit ihrem BMI im Bereich des Übergewichts, davon zwei an der Grenze zur Adipositas lagen. Bei Person 1 bestand Adipositas permagna.

Person	BMI (kg/m ²)	Alter (J)
1	40,6	67
2	29,8	81
3	23,8	58
4	29,1	83
5	24,5	78

Tabelle 9 BMI-Spektrum sowie Alter der Verstorbenen, von denen die Arcuatuseuronen stammten

In der vorliegenden Arbeit wurde das DNA-Methylierungsmuster des hypothalamus-spezifischen Enhancerkomplexes des Pro-Opiomelanocortin Gens zell-spezifisch charakterisiert. Zusammenfassend stellt sich dieses wie folgendermaßen dar:

In humanen peripheren Blutzellen sowie in den menschlichen, POMC exprimierenden Arcuatusneuronen erwies sich jedes einzelne CpG-Dinukleotid im Bereich der untersuchten Sequenzabschnitte als methyliert.

Erwartungen einer tendenziellen DNA-Hypomethylierung des Sequenzbereichs im natürlichen Expressionskontext von POMC in den hypothalamischen Arcuatusneuronen finden sich nicht bestätigt.

Der Einbezug eines Speziesvergleichs zur Maus ergab, dass murine periphere Blutzellen ebenso wie humane Blutzellen eine komplette Methylierung aller CpG-Dinukleotide im Enhancerbereich nPE1 aufweisen. Ein Ergebnis, das nahe legt, dass die hypothalamus-spezifischen Enhancerelemente nicht nur auf Sequenzebene hochgradig phylogenetisch konserviert sind.

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Immunhistochemie, Laser-Mikrodissektion

Für die zell-spezifische Darstellung der DNA-Methylierung in POMC exprimierenden Neuronen ist neben der Spezifität der zur Anwendung gekommenen immunhistochemischen Methoden die gezielte Selektion der angefärbten Zellen mittels Laser-Mikrodissektion wesentlich.

Die hohe Spezifität des verwendeten polyklonalen β -MSH Antiserums ist über ein Radioimmunoassay abgesichert worden, in dem die β -MSH Antikörper auf Kreuzreaktivität getestet wurden: mit α -MSH, γ -MSH, sowie ACTH und dem teilweise aminosäuresequenzhomologen Vorläufer von β -MSH, β -LPH (Lipotropin).

In keinem dieser Versuche zeigte sich eine signifikante Bindung der β -MSH Antikörper, auch nicht zu β -LPH, was zeigt, dass die Antikörper tatsächlich die genaue Konformation des β -MSH erkennen [18].

Einen Vorsprung im Vergleich zu vielen der bisher vorliegenden Untersuchungen zur differentiellen DNA-Methylierung von Enhancern/Promotern, die sich auf Gewebeproben oder Zelllinien beziehen, stellt es dar, dass durch die Lasermikrodissektion in Kombination mit der immunhistochemischen Darstellung tatsächlich gezielt solche Zellen auf ein differentielles DNA-Methylierungsmuster hin untersucht werden konnten, die POMC in einem natürlichen Kontext exprimieren.

Letzteres träfe auf immortalisierte hypothalamische Neurone nicht zu, die zwar im Gegensatz zu konventionellen Gewebeproben eine reine Zellpopulation darstellen, sich aber auch aus einem weiteren Grund nicht für unsere Fragestellung geeignet hätten. Seit geraumer Zeit ist nämlich bekannt, dass Zelllinien ihr DNA-Methylierungsmuster über mehrere Zellgenerationen hinweg stark verändern können. Eine eindeutige Ursache hierfür ist nicht bekannt, man vermutet jedoch, dass das veränderte DNA-Methylierungsprofil durch Selektionseffekte im Rahmen der Zellkultur bedingt sein könnte [11, 4].

4.1.2 Bisulfit-gestützte DNA-Sequenzierung

Von den zur Beurteilung des Methylierungsstatus von CpG-Loci zum Einsatz kommenden Methoden stellt die in dieser Arbeit angewandte Bisulfitsequenzierung den Goldstandard einer gen-spezifischen Herangehensweise dar.

Einer der entscheidenden Vorteile dieser Methode gegenüber früheren, beispielsweise auf methylierungssensitiven Restriktionsenzymen beruhenden Verfahren ist das größere Auflösungsvermögen aufgrund der Tatsache, dass unabhängig von vorhandenen Schnittstellen für ein Restriktionsenzym jedes CpG im Genom und so auch im Bereich der Zielsequenz untersucht werden kann.

Eine Einschränkung besteht bei der Bisulfitkonversion jedoch in der stets möglichen inkompletten Umwandlung, beispielsweise bei unvollständiger Denaturierung der DNA-Stränge. Unter optimalen Bedingungen erlaubt die Bisulfitmethode eine Konversion von nicht methylierten Cytosinen in Uracil bzw. Thymin von 99,9%, wie anhand einer Zelllinie, die defizient für alle aktiven DNA-Methyltransferasen ist, demonstriert werden konnte [111].

Eine unvollständige Konversion als Fehlerquelle kann allerdings in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Da im Gegensatz zu den CpGs sämtliche Cytosine außerhalb von CpG-Dinukleotiden in allen Elektropherogrammen durch die Bisulfit-Konversion bedingt als Thymin erschienen, beruht die unveränderte Präsenz der CpGs in den konvertierten Basenfolgen tatsächlich auf einer durchgängigen CpG-Methylierung in den untersuchten Enhancerbereichen.

4.2 Bedeutung der DNA-Methylierung regulatorisch bedeutsamer Regionen außerhalb von CpG-Insel Promotoren

Die Mehrzahl der bisher vorliegenden Untersuchungen zu Methylierungsprofilen von regulatorischen DNA-Elementen konzentrieren sich auf CpG-Inseln. Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Abschnitte erfüllen allerdings nicht die Definition einer CpG-Insel.

Kann der Methylierungsstatus solcher regulatorischer DNA-Abschnitte wie nPE1 und nPE2, deren Ausdehnung und CpG-Dichte nicht der Definition einer CpG-Insel genügt, *prinzipiell* Einfluss auf die transkriptionelle Regulation eines Gens nehmen ?

Bemerkenswerterweise sind auch Regionen mit niedrigerer CpG-Dichte Orte einer transkriptionellen Regulation durch DNA-Methylierung, viele Promotoren genügen nämlich nicht der Definition einer CpG-Insel und zeigen nichtsdestotrotz ein gewebespezifisches DNA-Methylierungsmuster, das hochgradig mit der transkriptionellen Aktivität korreliert.

Beispielhaft seien die Gene Oct 4, IL-2 (Interleukin 2), SRY (Sex-determining Region of Y) und RANKL (Receptor Activator of NF- κ B) genannt, deren DNA-Methylierungs- bzw. Demethylierungsstatus gut mit der jeweiligen Expression korreliert, obwohl keines der genannten Gene von einer CpG-Insel flankiert wird [68, 30, 125, 87].

Darüber hinaus konnte auch an dem in der hier vorgelegten Arbeit zentralen Zelltyp, an Neuronen also, nachgewiesen werden, dass die DNA-Methylierung bestimmter CpG-Dinukleotide des BDNF Promoters (Brain Derived Neurotrophic Factor) in einem Bereich, der nicht die Definition einer CpG-Insel erfüllt, in der Lage war, die aktivitätsabhängige Transkription von BDNF in Neuronen zu unterdrücken [107].

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass auch CpG-Dinukleotide in Bereichen, die den Kriterien für eine CpG-Insel nicht genügen, durchaus durch DNA-Hypermethylierung oder Hypomethylierung einen Einfluss auf das nachgeschaltete Gen haben können.

Dies bedeutet im Hinblick auf die hier vorgestellten Ergebnisse, dass *prinzipiell* die Möglichkeit besteht, dass zum Beispiel eine Hypermethylierung der POMC Enhancer zur einer transkriptionellen Inaktivierung des POMC Gens beitragen könnte.

4.3 Einflüsse eines DNA-Methylierungsprofils über große Entfernung

In diesem Zusammenhang bietet sich die Betrachtung eines weiteren für die Wertung der Ergebnisse bedeutsamen Sachverhalts an, nämlich der mit 10 kb relativ großen Entfernung der untersuchten Enhancerelemente vom Promoterbereich, und der Frage, ob ein gegebener Methylierungsstatus *grundsätzlich* überhaupt über eine solch große Distanz hinweg funktionelle Effekte ausüben könnte.

Die ersten Hinweise auf funktionelle Effekte auf die Genexpression durch hypermethylierte Regionen als Enhancer/Silencer auch über größere Entfernungen

hinweg ergaben sich unter Verwendung eines Modellkonstrukts, das einen wenige Methylgruppen tragenden CpG-Cluster in seiner Promoterregion aufwies. Die Transkription des nachgeschalteten Gens konnte durch den methylierten Cluster unterdrückt werden. Dies geschah jedoch nur, sofern er durch eine weiter entfernte, dicht hypermethylierte Region unterstützt wurde. Hierzu ist allerdings anzumerken, dass die Entfernung zwischen Promoter und Silencer nur etwa 1 kb betrug [73].

Im Rahmen einer im Zusammenhang mit dem humanen Epigenomprojekt durchgeführten Untersuchung des Methylierungsprofils von fast 900 Genen in verschiedenen Geweben konnten hingegen auch bis zu 100 kb entfernt vom nächsten Gen gelegene, differentiell methylierte ECRs (Evolutionary Conserved Regions) aufgedeckt werden. Diese wurden allerdings nicht funktionell charakterisiert, sondern lediglich beschrieben [47].

Als ein auch auf funktioneller Ebene untersuchtes Beispiel hochgradig zell-spezifischer Expressionsregulation durch den DNA-Methylierungsstatus weit entfernt vom Gen gelegener Enhancer, für eine ganz ähnliche Konstellation wie in der hier vorliegenden Arbeit also, sei daher der IL-4 (Interleukin 4) Locus genannt.

Für den Interleukin 4 Locus konnte gezeigt werden, dass bis zu -12kb vom Promoter entfernte ECRs, die im Rahmen der Differenzierung von T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen (T-Helferzellen) eine differenzielle DNA-Methylierung erfahren, als Enhancer für die Interleukin-4 Expression fungieren und so zur Veränderung des Expressionsprofils der stimulierten T-Zellen beitragen [3].

Zusammenfassend könnten also grundsätzlich auch die hypothalamus-spezifischen Enhancer durchaus über die nicht unerhebliche Entfernung von 10 kb durch ihren DNA-Methylierungsstatus in die transkriptionelle Aktivität von POMC regulierend eingreifen.

4.4 Veränderlichkeit des DNA-Methylierungsprofils postmitotischer Zellen

An dieser Stelle ist einschränkend zu bemerken, dass die Ergebnisse bezüglich des DNA-Methylierungsstatus in dieser Arbeit unter anderem an Neuronen erhoben wurden. Bis auf wenige Ausnahmen, die unter anderem rhinencephale Gebiete umfassen, gelten die menschlichen Neuronen, und somit auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten hypothalamischen Arcuatoneuronen, als postmitotische Zellen, die im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen keine weiteren Zellteilungen durchlaufen, so

dass man die Frage stellen könnte, ob das DNA-Methylierungsprofil postmitotischer Zellen in ähnlicher Weise Veränderungen unterliegt wie in solchen Zellverbänden, die während ihres Alterungsvorgangs weiterhin Zellteilungen durchlaufen. Dies ist ebenfalls von besonderem Interesse im Hinblick auf die im Folgenden diskutierte Altersabhängigkeit von DNA-Methylierungsprofilen.

In der Tat zeigen Neurone eine große Plastizität in ihrem Methylierungsmuster, sie sind nämlich nicht nur zur *de novo* DNA-Methylierung befähigt, das DNA-Methylierungsmuster neuronaler Promotoren zeigt sogar eine Abhängigkeit von elektrophysiologischen Parametern. Dies unterstreicht beispielsweise die Beobachtung, dass der DNA-Methylierungsgrad des BDNF Promoters (Brain Derived Neurotrophic Factor) sich als abhängig von der Depolarisationsfrequenz der jeweiligen Neuronen erweist [107].

4.5 DNA-Methylierung: Primäres oder sekundäres Phänomen im Rahmen der transkriptionellen Genregulation ?

Die überwiegende Mehrzahl der zur DNA-Methylierung vorliegenden Arbeiten können keine Aussage darüber machen, an welcher Stelle des Silencings eines Gens genau die Methylierung der DNA ansetzt und in welchem Zusammenhang der Befund einer Hypermethylierung regulatorischer DNA-Abschnitte zu sehen ist:

Zieht die wie auch immer bedingte Inaktivität eines Gens eine Hypermethylierung regulatorischer Abschnitte sozusagen als molekulares Sicherheitsschloss nach sich oder steht vielmehr die Methylierung an erster Stelle der Stilllegung eines gegebenen Gens ?

Zahlreiche Autoren sind sich darin einig, dass ersteres eher den tatsächlichen Vorgängen bei der transkriptionellen Regulation eines Gens entspricht, dass also die DNA-Methylierungslevel eine Tendenz zeigen, sich dem transkriptionellen Status Quo anzugleichen. Die Hypermethylierung der DNA eines regulatorischen Elements würde demzufolge mehr dazu dienen, einen einmal etablierten transkriptionellen Zustand zu befestigen, als diesen zu verändern [6, 10, 21].

In diesem Zusammenhang wird als Beispiel gerne der hypomethylierte Status der CpG-Inseln herangezogen. Der genaue Mechanismus, der es den CpG-Inseln erlaubt, trotz

eines von umliegenden methylierten Regionen ausgehenden Methylierungsdrucks ohne Methylgruppen zu verbleiben, bleibt nach wie vor im Dunklen [45].

Zumindest *ein* wesentlicher Aspekt scheint tatsächlich die aktive Transkription des betroffenen Abschnitts zu sein, wobei vermutlich der An- oder Abwesenheit von Transkriptionsfaktoren eine wesentlichere Rolle im Primärgeschehen der Transkriptionsregulation zuzuschreiben ist als der DNA-Methylierung [36, 50].

Darauf deuten auch die Ergebnisse von Versuchen unter Anwendung der als Goldstandard geltenden Bisulfitsequenzierungsmethode hin. In diesen wurde die Kinetik der DNA-Methylierung untersucht, die mit dem Silencing eines in Vorläuferzellen der erythrozytären Reihe eingebrachten Transgens einherging. Über die Zellpassagen hinweg ließ sich beobachten, dass eine Methylierung des zugehörigen Promoters ein spätes Ereignis in der Stilllegung des Transgens darstellte und der Inaktivierung des Gens folgte [159].

Auch den Ergebnissen anderer Gruppen zufolge, denen methodisch ein ähnlich hohes Niveau zugrundeliegt, finden Histon-Deazetylierung und H3-K9-Trimethylierung im selben Zeitfenster statt wie die Geninaktivierung und gehen der DNA-Methylierung voraus [6, 118, 161].

Bezogen auf die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Enhancer würden die hier dargelegten Überlegungen und Ergebnisse die Spekulation erlauben, dass der Befund einer DNA-Hypermethylierung der Enhancer in hypothalamischen Neuronen ein Niveau niedriger Transkriptionsaktivität von POMC befestigen könnte, prinzipiell also auch als Folge einer solchen niedrigen Aktivität betrachtet werden könnte.

4.6 Evolutionäre Konservierung des DNA-Methylierungsstatus zwischen Mensch und Maus

Im Gegensatz zur gut dokumentierten evolutionären Konservierung von DNA-Bereichen zwischen verschiedenen Spezies liegen bisher nur vergleichsweise wenige Untersuchungen zur Konservierung von DNA-Methylierungsmustern über Speziesgrenzen hinweg vor, um das Ergebnis der übereinstimmenden DNA-Hypermethylierung in peripheren Blutzellen bei Mensch und Maus in den untersuchten Enhancerbereichen in Beziehung zu setzen.

Zu diesen zählt ein Speziesvergleich der DNA-Methylierung willkürlich gewählter orthologer Loci im Bereich von 5'-untranslatierten Regionen (UTRs) und evolutionär konservierten Bereichen (ECRs) aus verschiedenen menschlichen und murinen Geweben. Dieser unterstreicht, indem sich hier nur 4% der untersuchten Regionen als voneinander abweichend hyper- oder hypomethyliert erwiesen, dass das DNA-Methylierungsmuster der beiden untersuchten Spezies wohl stammesgeschichtlich stabiler ist, als bisher angenommen [47].

Dies konnte - ebenfalls im Rahmen eines Vergleichs Mensch-Maus und anhand verschiedener Gewebe - für eine Reihe konservierter Regionen mit hochgradig gewebespezifischer Expression gezeigt werden. Diese TDMs (Tissue-specific Differentially Methylated Regions), die ähnlich wie die hypothalamus-spezifischen Enhancer ihre Funktion darin zu haben scheinen, das zell-spezifische Expressionsprofil der jeweiligen Zellpopulation mit zu befestigen, konnten auch auf ihre funktionelle Bedeutung hin charakterisiert werden [86].

Mit diesen Befunden übereinstimmend existieren aus einer großangelegten Analyse von Histonmodifikationsmustern hervorgehende Anhaltspunkte dafür, dass auch das Histonmuster an orthologen Loci zwischen Mensch und Maus weitgehende Entsprechungen aufweist [15].

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse legen in der Zusammenschau nahe, dass regulatorisch bedeutsame Sequenzbereiche wohl aufgrund ihrer physiologischen Bedeutsamkeit auch in ihrem epigenetischen Profil im Laufe der Stammesgeschichte bewahrt werden und dass die hypothalamus-spezifischen Enhancer des POMC Gens ebenfalls zu diesen Bereichen zu zählen sind.

4.7 DNA-Hypermethylierung des hypothalamus-spezifischen Enhancers in humanen POMC exprimierenden Arcuatusneuronen

Über den Kontext des Melanocortinsystems hinaus gliedert sich die vorliegende Arbeit gedanklich in solche Ansätze ein, die ein ähnliches Ziel wie das Epigenomprojekt verfolgen, nämlich zell-spezifische DNA-Methylierungsprofile zu erfassen und dadurch die Erkenntnisse über das Zustandekommen eines zell-spezifischen Genexpressionsmusters zu erweitern, also die transkriptionelle Regulation von hochgradig zell-spezifisch exprimierten Genen in Abgrenzung zu Housekeeping Genen

besser zu verstehen. Dabei stehen im Mittelpunkt des Interesses die bereits erwähnten regulatorischen TDMs.

Bisher sind nur wenige, zumeist mit CpG-Inseln assoziierte, differentiell methylierte regulatorische Elemente in einer begrenzten Anzahl von Geweben bekannt. Trotzdem geht man davon aus, dass das für eine Zelle charakteristische Genexpressionsrepertoire, zumindest zum Teil, durch eben diese TDMs, also durch Regionen, deren DNA-Methylierungsprofil von Zelltyp zu Zelltyp variiert, kontrolliert wird [156].

In ersten, systematischen, groß angelegten Untersuchungen im Rahmen des Epigenomprojekts zeigte sich, zum einen in einer Charakterisierung des DNA-Methylierungsprofils des MHC-Locus (major histocompatibility complex), zum anderen einer Erhebung des DNA-Methylierungsstatus von mehr als 40000 CpG-Dinukleotiden auf den Chromosomen 6, 20, 22, beides in verschiedenen Geweben, dass sich bis zu 22% der untersuchten Gene als von TDMs flankiert erwiesen, also empfänglich waren für gewebsspezifisch differentielle DNA-Methylierung im Bereich ihrer 5'-UTRs.

Dabei glich sich das jeweilige Methylierungsprofil im Bereich der TDMs um so mehr, je größer die Ähnlichkeiten waren, die das Expressionprofil der untersuchten Gewebe aufwies. Der Nachweis einer inversen Korrelation zwischen DNA-Methylierungsstatus im Bereich einer TDM und der Transkription des zugeordneten Gens konnte in dieser Untersuchung bei etwa 30% der gewebespezifisch heterogen methylierten Bereiche erbracht werden [141, 47].

Die Gruppe der Gene, die bisher als funktionell bedeutsame TDMs aufweisend charakterisiert werden konnten, umfasst so verschiedene Mitglieder wie Oct-4, SRY, Endothelinrezeptor B, Maspin, oder die keimbahn-spezifisch exprimierte MAGE-Genfamilie (Melanoma Antigen) [157, 43].

Entscheidend für die in dieser Arbeit verfolgte Fragestellung ist nun, dass auch das Pro-Opiomelanocortin Gen zu der Gruppe von Genen zählt, die für diese Form der Regulation empfänglich zu sein scheinen. Solche Gene weisen gewebespezifische DNA-Methylierungsprofile in ihren 5'-UTRs auf, und für sie gilt *nicht* die geläufige Vorstellung, dass CpG-Inseln nicht nur vor Housekeeping Genen, sondern auch vor allen gewebespezifischen Genen unmethyliert sind [121, 22].

Dies unterstreichen die in der Tabelle 10 zusammengestellten Ergebnisse zum DNA-Methylierungsstatus des 5'-POMC Promoters in POMC exprimierenden und nicht exprimierenden Geweben bzw. Zelllinien.

Hypermethylierter 5'-POMC Promoter	Hypomethylierter 5'-POMC Promoter
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Gewebeproben</u> aus Lunge, Leber, Milz, Leukozyten, Pancreas, Testes ▪ <u>Zelllinien</u>, die kein POMC exprimieren: HeLa-Zellen ▪ <u>Neuroendokrine Tumoren</u> ohne POMC-Expression: Hormonell inaktives Hypophysenadenom, Insulinom, pankreatisches Karzinoid ohne Cushing-Syndrom, 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Tumoren</u> einhergehend mit einem ACTH-abhängigen Cushing-Syndrom: Bronchialkarzinoid und pankreatisches Karzinoid, kortikotrophes Adenom ▪ <u>Zelllinien</u>, die POMC exprimieren: DMS-79-Zellen

Tabelle 10 Übersicht über die gewebs-spezifische DNA-Methylierung des 5'-POMC-Promoters des Pro-Opiomelanocortin Gens [122] in verschiedenen Tumoren, Gewebeproben und Zelllinien

Aber nicht nur diese Befunde, sondern auch Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe legen die Erwartung einer tendenziellen Hypomethylierung des für die hypothalamische Expression von POMC essentiellen Enhancerkomplexes in Arcuatusneuronen im Vergleich zu POMC nicht exprimierenden peripheren Blutzellen nahe:

Unter Verwendung des auch in dieser Arbeit angewandten Protokolls und ausgehend von vergleichbaren Zellzahlen gelang es für dasselbe Gen, ein auch hypomethylierte Abschnitte aufweisendes in sich reproduzierbares Methylierungsprofil in hypothalamischen Neuronen aufzudecken. Es zeigte sich nämlich, dass ein DNA-Methylierungsmuster im Bereich des basalen 5'-Promoters in humanen hypothalamischen Arcuatusneuronen existiert. Dieses erweist sich insofern als komplex, als dass die erste CpG-Insel im Bereich des 5'-Promoters zu 50% methylierte CpGs aufweist, gefolgt von einem im Vergleich dazu hypomethylierten Bereich. Die zweite CpG-Insel hingegen besitzt bis zum Start von Exon 3 eine dichte Cytosin-Methylierung [Kühnen, personal communication].

Auch Befunde aus den Pilotuntersuchungen zum Epigenomprojekt würden die Erwartung einer tendenziellen DNA-Hypomethylierung des Enhancerkomplexes in Arcuatusneuronen im Vergleich zu peripheren Blutzellen eher unterstützen.

Weitere wichtige Charakteristika der gewebs-spezifischen Expressionsregulation durch DNA-Methylierung scheinen nämlich darin zu bestehen, dass die TDMs stark überrepräsentiert sind in evolutionär konservierten Regionen (ECRs), jedoch unterrepräsentiert in CpG-Inseln. Eine Beobachtung, die auch mit unabhängig davon gewonnenen RLGS Ergebnissen (Restriction Landmark Genomic Scanning) übereinstimmt. Außerdem wurden die ECRs übereinstimmend mit möglichen Enhancerfunktionen oft in großer Entfernung vom Genstart angetroffen [40, 156].

Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enhancer liegen ja in dem von der Gruppe Low als relevant charakterisierten Bereich von -9 bis -13kb upstream des POMC-Gens als einzige hochgradig stammesgeschichtlich konservierte, nichtrepetitive Abschnitte zwischen hochgradig repetitiven Bereichen und zeigen insgesamt eine äußerst geringe Inter- und Intraspeziesvariabilität, erfüllen also alle bisher genannten Aspekte von für eine gewebs-spezifisch differentielle DNA-Methylierung hochgradig empfänglichen regulatorischen DNA-Bereichen.

In der hier vorgelegten Untersuchung zeigte sich ganz entgegengesetzt zu den erläuterten Erwartungen in den hypothalamischen Arcuatusneuronen im Vergleich zu den peripheren Blutzellen keine gewebs-spezifische Hypomethylierung der Enhancerbereiche, sondern im Gegenteil eine hochgradige dichte DNA-Methylierung. Welche genaue funktionelle Bedeutung diesem Befund zukommt, lässt sich aus den rein deskriptiven Ergebnissen unserer Untersuchung nicht ableiten, eine funktionelle Charakterisierung ist unter Belassung des natürlichen Expressions- und Chromatinkontexts unter anderem aufgrund der grossen Entfernung zwischen Enhancer und Promoter, vor allem aber wegen der Problematik der Erstellung von auch in Kontakt mit der zellulären DNA-Methylierungsmaschinerie nachweisbar stabil methylierter bzw. demethylierter transgener Konstrukte methodisch nicht möglich.

Dass der DNA-Methylierung der hochkonservierten hypothalamischen Enhancer, die die Transkription eines prinzipiell für die Regulation über TDMs empfänglichen Gens steuern, eine funktionelle Bedeutung zukommt, ist allerdings durchaus vorstellbar, insbesondere unter Berücksichtigung der in den folgenden Abschnitten erläuterten Aspekte.

4.8 Einfluss des Alters auf das DNA-Methylierungsmuster

Einen in diesem Zusammenhang wichtigen Aspekt zur Wertung der Ergebnisse stellt der Einflussfaktor des Alters dar, da das Alter der Verstorbenen, in deren Arcuatuseuronen eine Hypermethylierung der Enhancerelemente beschrieben wurde, zwischen 58 und 83 Jahren lag.

Es existieren nämlich Anhaltspunkte dafür, dass DNA-Methylierungsprofile im Rahmen ihrer besonderen Formbarkeit durch Umwelteinflüsse auch altersabhängigen Veränderungen unterworfen sind.

Das zeigt auch die bereits einleitend erwähnte Untersuchung der Methylierungsprofile monozygoter Zwillinge, die eindrücklich dokumentiert, dass sich die Methylierungsmuster der Zwillingspaare mit zunehmendem Alter mehr und mehr unterscheiden [56].

In welcher Weise sich jedoch das Alter eines Organismus auf dessen DNA-Methylierungsprofil auswirkt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert.

Der Alterungsvorgang ist nämlich nicht nur mit einer Hyper-, sondern auch mit einer tendenziellen Hypomethylierung in Verbindung gebracht worden. Einschränkend ist hierzu allerdings anzumerken, dass sich im Gegensatz zur Hypermethylierung von promotorassoziierten CpG-Inseln die meisten Veränderungen hin zur Hypomethylierung in Bereichen ereignen, die sich außerhalb von bekannten regulatorischen Sequenzbereichen in repetitiven Abschnitten befinden, und dass es sich um einen im Hinblick auf seine funktionelle Bedeutung weiterhin unklaren Befund handelt [162, 46, 142].

Für regulatorisch bedeutsame DNA-Abschnitte, wie sie der hier vorgelegten Arbeit zugrunde liegen, ist hingegen eine altersassoziierte DNA-Hypermethylierung ausführlich dargestellt und auch funktionell charakterisiert. Im Mittelpunkt stehen dabei Tumorsuppressorgene und deren Promotoren [49].

Darüber hinaus existieren jedoch Belege dafür, dass es sich bei der altersassoziierten DNA-Hypermethylierung regulatorischer Sequenzbereiche, einem Phänomen, das auch in der hier vorgelegten Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann, um einen universellen Vorgang handelt, der in zahlreichen Geweben, wie beispielsweise Kolonepithel, Mediamyozyten oder Urothelzellen, eventuell in gewebs-spezifischem Ausmaß, und ebenfalls außerhalb einer neoplastischen Transformation angetroffen wird [75, 76, 1, 23, 138].

Dem entgegen konnte ein aus der Darstellung der Methylierungsprofile der Chromosomen 6, 20 und 22 hervorgehender Vergleich zweier Altersgruppen mit einem Durchschnittsalter von 26 bzw. 68 Jahren an den gleichen Loci und in den gleichen Geweben keine statistisch signifikanten DNA-Methylierungsunterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen [47].

Festzuhalten bleibt trotzdem, dass gegenüber unmethylierten Sequenzabschnitten ein gewisser Methylierungsdruck existiert, und das sowohl für *de novo* integrierte als auch für endogene DNA-Abschnitte [45].

Dabei kann ein solcher Methylierungsdruck, d.h. eine mit der Zeit eintretende DNA-Hypermethylierung zunächst gering methylierter DNA-Abschnitte, auch als Anhäufung von Methylierungsfehlern über die Zeit hinweg betrachtet werden: Wie an einer homogenen Zellkultur über 20 Zellgenerationen gezeigt werden konnte, weisen ursprünglich unmethylierte Bereiche eine mehr als zwei mal so hohe Fehlmethylierungsrate auf wie methylierte [172].

Zusammenfassend kann man also durchaus davon ausgehen, dass das zelluläre DNA-Methylierungsprofil altersabhängigen Veränderungen unterworfen ist, die DNA-Abschnitte mit regulatorischer Bedeutsamkeit eher in Form einer DNA-Hypermethylierung zu betreffen scheint.

Person	BMI (kg/m ²)	Alter (J)
1	40,6	67
2	29,8	81
3	23,8	58
4	29,1	83
5	24,5	78

Tabelle 11 Body Mass Indices sowie Alter der Verstorbenen, von denen die Arcuatusneurone stammten

Betrachtet man nun die Body Mass Indices der Verstorbenen (Tabelle 11), von denen die auf ihr DNA-Methylierungsmuster hin untersuchten Arcuatusneurone stammten, so wiesen diese zumeist deutliches Übergewicht auf, zwei Personen lagen dabei an der Grenze zur Adipositas. Bei einer Person lag Adipositas permagna vor, nur der BMI eines der Verstorbenen lag im normalgewichtigen Bereich.

Dass nun der BMI älterer Individuen häufiger im Bereich des Übergewichts angesiedelt ist als bei jüngeren Personen, überrascht keineswegs. Dies konnte eindrucksvoll durch eine Untersuchung, die den Body Mass Index einer französischen Population von der Geburt bis zum Alter von 87 Jahren dokumentiert, belegt werden. Sie zeigt, dass es bei beiden Geschlechtern zu einem wachstumsunabhängigen Anstieg des Body Mass Indexes zwischen 20 und 65 Jahren kommt, der weitgehend parallel zur Zunahme des in anderen Erhebungen dokumentierten Anstiegs der Körperfettmasse verläuft. Dabei handelt es sich um einen auch in anderen Industrienationen übereinstimmend zu beobachtenden Effekt, der bei weniger wohlhabenden Populationen ebenfalls zu beobachten ist, hier jedoch vergleichsweise verzögert und nicht ganz so ausgeprägt eintritt [145].

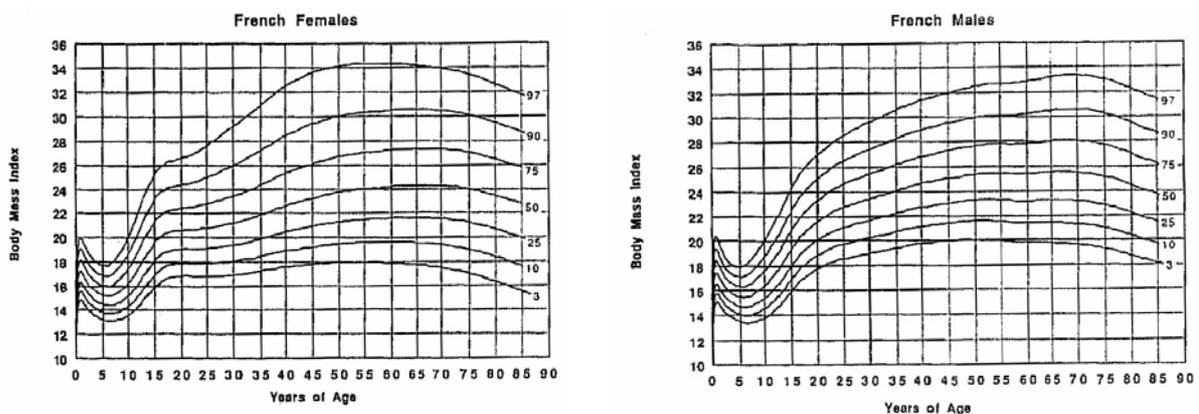


Abbildung 18 BMI-Perzentilenkurven französischer Männer und Frauen [145].

Zieht man nun in der Zusammenschau den Alterungsvorgang als eine mögliche Ursache für eine DNA-Hypermethylierung regulatorisch bedeutsamer DNA-Abschnitte in Betracht und berücksichtigt weiterhin die Befunde über die höheren Body Mass Indices bei älteren Individuen im Vergleich zu jüngeren Personen, so ist eine funktionelle Relevanz der nachgewiesenen dichten DNA-Methylierung im Bereich des konservierten hypothalamus-spezifischen Enhancerkomplexes, die im Zusammenhang mit Umweltfaktoren entstanden sein könnte, durchaus vorstellbar.

Könnte nicht die hypothalamische POMC-Expressionskapazität alternder Individuen durch einen höheren Grad an DNA-Methylierung beispielsweise im Bereich der hypothalamus-spezifischen Enhancer für POMC herabgesetzt sein, was konsekutiv zu einer Dämpfung peripherer Sättigungssignale beitragen würde und eine Gewichtszunahme im Alter mitbegünstigen würde ?

4.9 Perspektiven

Trotz der evidenten funktionellen Bedeutung des Enhancerkomplexes nPE1/nPE2 für die zell-spezifische Transkription von Pro-Opiomelanocortin in hypothalamischen, POMC exprimierenden Neuronen und der Tatsache, dass das Pro-Opiomelanocortin Gen nicht nur prinzipiell zu den Genen zählt, die beispielsweise auf hypophysärer Ebene oder in neuroendokrinen Tumoren durch gewebes-spezifisch differentiell methylierte Regionen (TDMs) reguliert werden können, sondern auch durch unsere Arbeitsgruppe in humanen Arcuatusneuronen im Bereich des 5'-Promoters von POMC ein komplexes DNA-Methylierungsmuster mit hypomethylierten Abschnitten nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bereich des hypothalamus-spezifischen Enhancerkomplexes eine dichte DNA-Methylierung, die sich nicht von der Methylgruppendichte in ebenfalls untersuchten peripheren Blutzellen unterschied. Ein Befund, der an Arcuatusneuronen vorwiegend älterer, übergewichtiger Individuen erhoben wurde und sich möglicherweise im Zusammenhang mit der Einwirkung von Umweltfaktoren im Rahmen des Alterungsprozesses entwickelt haben könnte.

Welche funktionelle *in vivo* Relevanz hat dieses Ergebnis ? Ausblickend bieten sich im wesentlichen zwei Richtungen an, um dieser Frage weiter nachzugehen:

Zum einen müssen in jedem Falle mehr jüngere Individuen im Hinblick auf ihr hypothalamisches Methylierungsmuster der gewebes-spezifischen Enhancer hin untersucht werden, idealerweise in Form einer Gegenüberstellung von Untergruppen mit deutlich unterschiedlichem Durchschnittsalter. Auch stärker auseinander liegende BMIs der untersuchten Individuen würden die Aussagekraft der Untersuchung erhöhen. Zum anderen wäre der nächste logische Schritt, die Enhancer einer funktionellen Charakterisierung zu unterziehen. Eine solche würde es erlauben, den Einfluss der DNA-Methylierung des hypothalamus-spezifischen Enhancerpaars auf die Expression von POMC zu messen. Wie bereits erwähnt ist es bisher jedoch methodisch nicht möglich, gezielt demethylierte Konstrukte in ein transgenes Modell einzuführen, die – einmal in zellulärem Milieu – auch zuverlässig und nachweisbar ihren Methylierungsstatus beibehalten und so Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen POMC-Enhancermethylierung und POMC-Transkription zulassen würden.

Eine weiterführende Frage von großem Interesse wäre es daher, den DNA-Methylierungsstatus der Enhancerkonstrukte in den Arcuatusneuronen solcher

transgener Tiere zu analysieren, die die Arbeitsgruppe Low bei der Aufdeckung der funktionellen Relevanz des Enhancerkomplexes nPE1/2 für die hypothalamus-spezifische POMC-Expression verwendete und diesen zur jeweiligen POMC-Expression in Beziehung zu setzen.

5 Zusammenfassung

Die mittels QTL-Scans erfasste Assoziation zwischen Markern im Bereich des Pro-Opiomelanocortin Locus und dem Körpergewicht, ohne dass im Gen selbst gelegene, funktionell bedeutsame Polymorphismen identifiziert werden konnten, rückt die transkriptionelle Regulation dieses für die Energiehomöostase entscheidenden Gens in den Mittelpunkt. Die funktionelle Charakterisierung der hypothalamus-spezifischen Enhancerelemente des POMC Gens, nPE1 und nPE2, weist diese als für die hypothalamische transkriptionelle Regulation entscheidend aus. Da sich diese jedoch als interindividuell hochgradig konserviert erwiesen haben und zudem aus der Untersuchung der POMC Transkription in der Hypophyse hervorgehende Hinweise existieren, dass POMC für eine Regulation auf der Ebene der DNA-Methylierung zugänglich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die konservierten hypothalamus-spezifischen Enhancer für ein gewebs-spezifisch differentielles DNA-Methylierungsmuster empfänglich zeigen.

Unter Anwendung der Bisulfitkonversionsmethode mit anschließender DNA-Sequenzierung gelang es, den DNA-Methylierungsstatus der hypothalamus-spezifischen Enhancer in mittels Lasermikrodissektion gewonnenen, immunhistochemisch identifizierten, POMC exprimierenden Arcuatusneuronen aus Kryoschnitten menschlicher Hypothalami darzustellen. Des Weiteren wurden periphere humane und murine Blutzellen bezüglich ihres DNA-Methylierungsprofils untersucht.

In humanen peripheren Blutzellen sowie in menschlichen, POMC exprimierenden Arcuatusneuronen erwies sich jedes einzelne CpG-Dinukleotid im Bereich der untersuchten Sequenzabschnitte als methyliert, was die Erwartungen einer tendenziellen Hypomethylierung der Enhancer in ihrem natürlichen Expressionskontext nicht bestätigt. Welche funktionelle Bedeutung diesem Befund zukommt, ist auf der Grundlage einer rein deskriptiven Darstellung nicht zu eruieren. Eine funktionelle Relevanz der nachgewiesenen Hypermethylierung, die im Zusammenhang mit Umweltfaktoren altersassoziiert entstanden sein könnte, ist durchaus vorstellbar.

Der Einbezug eines Speziesvergleichs zur Maus ergab, dass murine ebenso wie humane Blutzellen eine komplette Methylierung aller CpG-Dinukleotide im Enhancerbereich nPE1 aufweisen, ein Ergebnis, das nahelegt, dass die Enhancerelemente nicht nur auf Sequenzebene, sondern auch bezüglich ihres DNA-Methylierungsmusters hochgradig phylogenetisch konserviert sind.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Ahuja N, Issa JP.** Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 2000;15:835-842.
- 2 **Ammerpohl O, Schmitz A, Steinmüller L, Renkawitz R.** Repression of the mouse M-lysozyme gene involves both hindrance of enhancer factor binding to the methylated enhancer and histone deacetylation. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5256-5260.
- 3 **Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A.** Regulation of TH2 differentiation and IL4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006;24:607-656.
- 4 **Antequera F, Boyes J.** High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990;62:503-514.
- 5 **Antequera F, Bird A.** Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11995-11999.
- 6 **Bachman KE, Park BH, Rhee I, et al.** Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003;3:89-95.
- 7 **Badal V, Chuang LS, Tan EH, et al.** CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: Genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003;77:6227-6234.
- 8 **Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, et al.** The human papillomavirus 18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 2004;324:483-492.
- 9 **Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S.** Genetics of body weight regulation. *Nature* 2000;404:644-651.
- 10 **Baylin S.** Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol* 2002;12:331-337.
- 11 **Baylin S, Bestor TH.** Altered methylation patterns in cancer cell genomes: Cause or consequence ? *Cancer Cell* 2002;1:299-305.

- 12 **Bednarik DP, Mosca JD, Raj NB.** Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1987;61:1253-11257.
- 13 **Bestor TH.** Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* 1988;74:9-12.
- 14 **Bestor TH.** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000;9:2395-2402.
- 15 **Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, et al.** Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 2005;120:169-181.
- 16 **Berthoud HR.** Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:393-428.
- 17 **Berthoud HR, Sutton GM, Townsend RL, Patterson LM, Zheng H.** Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* 2006;89:517-524.
- 18 **Biebermann H, Castañeda TR, van Landeghem F, et al.** A role for β -melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell Metab* 2006;3:141-146.
- 19 **Bird A.** The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8.
- 20 **Bird A.** Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 1995;11:94-100.
- 21 **Bird A, Wolffe AP.** Methylation induced repression – belts, braces and chromatin. *Cell* 1999;99:451-454.
- 22 **Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
- 23 **Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, Gabrielson E.** Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol* 2001;159:831-835.

-
- 24 **Bouret SG, Draper SJ, Simerley RB.** Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 2004;304:108-110.
 - 25 **Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S.** Direct regulation of pituitary pro-opiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 2000;106:1417-1425.
 - 26 **Boyes J, Bird A.** DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 1991;64:1123-1134.
 - 27 **Boyes J, Bird A.** Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992;11:327-333.
 - 28 **Brero A, Easwaran HP, Nowak D, et al.** Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. *J Cell Biol* 2005;169:733-743.
 - 29 **Brooks AR, Harkins RN.** Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 2004;6:395-404.
 - 30 **Bruniquel D, Schwartz RH.** Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* 2003;4:235-240.
 - 31 **Brunk BP, Goldhamer DJ, Emerson JP.** Regulated demethylation of the myoD distal enhancer during skeletal myogenesis. *Dev Biol* 1996;177:490-503.
 - 32 **Burgemeister R.** New aspects of laser microdissection in research and routine. *J Histochem Cytochem* 2005;53:409-412.
 - 33 **Callinan PA, Feinberg AP.** The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 2006;15:95-101.
 - 34 **Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, et al.** Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fatt mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000;26:97-102.

-
- 35 **Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA.** Pro-opiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138:4489-4492.
- 36 **Clark SJ, Melki J.** DNA methylation and gene silencing in cancer: Which is the guilty party ? *Oncogene* 2002;21:5380-5387.
- 37 **Comb M, Goodman HM.** CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3975-3982.
- 38 **Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, et al.** A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on chromosome 2. *Nat Genet* 1997;15:273-275.
- 39 **Cone RD.** Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 2005;8:571-578.
- 40 **Costello JF, Smiraglia DJ, Plass C.** Restriction landmark genomic scanning. *Methods* 2002;27:144-149.
- 41 **Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al.** Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411:480-484.
- 42 **Delplanque J, Barat-Houari M, Dina C, et al.** Linkage and association studies between the pro-opiomelanocortin gene and obesity in caucasian families. *Diabetologia* 2000;43:1554-1557.
- 43 **De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T.** DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line-specific and tumour-specific genes with a CpG rich promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:7372-7335.
- 44 **De Souza FS, Santangelo AM, Bumaschny V, et al.** Identification of neuronal enhancers of the pro-opiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting. *Mol Cell Biol* 2005;25:3076-3086.
- 45 **Doerfler W, Hohlweg U, Müller K, et al.** Foreign DNA integration – perturbations of the genome – oncogenesis. *J Biol Chem* 2001;945:276-288.

-
- 46 **Dunn BK.** Hypomethylation: One side of a larger picture. *Ann NY Acad Sci* 2003; 983:28-42.
- 47 **Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al.** DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 2006;38:1378-1385.
- 48 **Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA.** Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457-463.
- 49 **Esteller M.** CpG-Island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5437-5440.
- 50 **Esteller M.** The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006;27:1121-1125.
- 51 **Fan W, Boston BH, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD.** Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385:165-168.
- 52 **Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, et al.** Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *N Eng J Med* 2003;348:1085-1095.
- 53 **Felsenfeld G, Groundine M.** Controlling the double helix. *Nature* 2003;421:448-453.
- 54 **Feng Q, Zhang Y.** The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 2001;15:827-832.
- 55 **Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
- 56 **Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al.** Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *PNAS* 2005;102:10604-10609.
- 57 **Friedman JM, Halaas JR.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-770.

-
- 58 **Frühbeck G.** Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006;393:7-20.
- 59 **Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T.** DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000;24:88-91.
- 60 **Fuks F, Burgers WA.** Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J* 2001;276:2536-2544.
- 61 **Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, et al.** The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003;278:4035-4040.
- 62 **Gallou-Kabani C, Junien C, Vigé A, Gross MS.** Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. New perspectives against the epidemic. *Diabetes* 2005;54:1899-1906.
- 63 **Gardiner-Garden M, Frommer M.** Transcripts and CpG islands associated with the pro-opiomelanocortin gene and other neurally expressed genes. *J Mol Endocrinol* 1994;12:365-382.
- 64 **Grieshammer U, McGrew MJ, Rosenthal N.** Role of methylation in maintenance of positionally restricted transgene expression in developing muscle. *Development* 1995;121:2245-2253.
- 65 **Hajkova P, El-Maarri O, Engemann S, et al.** DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Methods in Molecular Biology* 2002;200:143-154.
- 66 **Hake SB, Allis CD.** Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The "H3 barcode hypothesis". *PNAS* 2006;103:6428-6435.
- 67 **Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, et al.** Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 2005;37:254-264.

-
- 68 **Hattori N, Nishino K, Ko YG, et al.** Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 2004;279:17063-17069.
- 69 **Hebbes T, Thorne AW, Crane-Robinson C.** A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 1988;7:1395-1403.
- 70 **Hejnar J, Plachy J, Geryk J, et al.** Inhibition of the rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription by in vitro methylation: Different sensitivity in permissive chicken cells versus mammalian cells. *Virology* 1999;255:171-181.
- 71 **Hendrich B, Bird A.** Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998;18:6538-6547.
- 72 **Hixson JE, Almasy L, Cole S, et al.** Normal variation in leptin levels is associated with polymorphisms in the pro-opiomelanocortin gene, POMC. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3187-3191.
- 73 **Hug M, Silke J, Georgiev O, et al.** Transcriptional repression by methylation: Cooperatively between a CpG Cluster in the promoter and remote CpG-rich regions. *FEBS Lett* 1996;379:251-254.
- 74 **Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al.** Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997;88:131-141.
- 75 **Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, et al.** Methylation of the estrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet* 1994;7:536-540.
- 76 **Issa JP.** CpG-Island Methylation in Aging and Cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:101-118.
- 77 **Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE.** Control of CpNpG DNA methylation by the Kryptonite histone H3 methyltransferase. *Nature* 2002;416:556-560.
- 78 **Jackson RS, Creemers JWM, Ohagi S, et al.** Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997;16:303-306.

-
- 79 **Jaenisch R, Bird A.** Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33:245-254.
- 80 **Johnson L, Cao X, Jacobsen S.** Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol* 2002;12:1360-1367.
- 81 **Jones P, Veenstra GJ, Wade PA, et al.** Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-191.
- 82 **Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, et al.** Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 2004;78:12762-12772.
- 83 **Kaludov N, Wolffe AP.** MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: Selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1921-1928.
- 84 **Keesey RE, Hirvonen MD.** Body weight set points: Determination and adjustment. *J Nutr* 1997;127:1875-1883.
- 85 **Kerjean A, Vieillefond A, Thiounn N, et al.** Bisulfite genomic sequencing of microdissected cells. *Nucleic Acids Res* 2001;21:106-109.
- 86 **Kitamura E, Igarashi J.** Analysis of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) in humans. *Genomics* 2007;89:326-337.
- 87 **Kitazawa R, Kitazawa S.** Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of RANKL gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis. *Mol Endocrinol* 2006;21:148-158.
- 88 **Kochanek S, Renz D, Doerffler W.** Transcriptional silencing of human Alu sequencens and inhibition of protein binding in the B box regulatory elements by 5'-CG-3' methylation. *FEBS Lett* 1995;360:115-120.
- 89 **Krude H, Biebermann H, Luck W, et al.** Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998;19:155-157.

-
- 90 **Krude H, Grüters A.** Implications of pro-opiomelanocortin (POMC) mutations in humans: The POMC deficiency syndrome. *TEM* 2000;11:15-22.
- 91 **Krude H, Biebermann H, Schnabel D, et al.** Obesity due to pro-opiomelanocortin deficiency: Three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;8:4633-4640.
- 92 **Kwon MS, Seo YS, Shim EJ, et al.** The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience* 2006;142:1281-1292.
- 93 **Lavender P, Clark AJL, Besser GM, Rees LH.** Variable methylation of the 5'-flanking DNA of the human pro-opiomelanocortin gene. *J Mol Endocrinol* 1991;6:53-61.
- 94 **Lefevre P, Melnik S, Wilson N, Riggs AD, Bonifer C.** Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo. *Mol Cell Biol* 2003;23:4386-4400.
- 95 **Lehnertz B, Ueda Y, Derjick AA, et al.** Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 2003;13:1192-1200.
- 96 **Lei H, Oh SP, Okano M, et al.** De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996;122:3195-3205.
- 97 **Levin BE.** Factors promoting and ameliorating the development of obesity. *Physiol Behav* 2005;86:633-639.
- 98 **Li E, Bestor TH, Jaenisch R.** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992;69:915-926.
- 99 **Li G, Mobbs CV, Scarpace PJ.** Central pro-opiomelanocortin gene delivery results in hypophagia, reduced visceral adiposity, and improved insulin sensitivity in genetically obese Zucker rats. *Diabetes* 2003;52:1951-1957.

-
- 100 **Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ.** Identification of DNA elements cooperatively activating pro-opiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1992;12:3978-3990.
- 101 **Lorincz MC, Schubeler D, Goeke SC, et al.** Dynamic analysis of proviral induction and de novo methylation: Implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2000;20:842-850.
- 102 **Lorincz MC, Schubeler D, Groundine M.** Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. *Mol Cell Biol* 2001;21:7913-7922.
- 103 **Lu Q, Wu A, Ray D, et al.** DNA methylation and chromatin structure regulate T cell perforin gene expression. *J Immunol* 2003;170:5124-5132.
- 104 **Lu Q, Richardson B.** Methods for analyzing the role of DNA methylation and chromatin structure in regulating T lymphocyte gene expression. *Biol Proceed Online* 2004;6:189-203.
- 105 **Maes HH, Neale MC, Eaves LJ.** Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997;27:325-351.
- 106 **Malone CS, Kuraishy AI, Fike FM, et al.** B29 gene silencing in pituitary cells is regulated by its 3' enhancer. *J Mol Biol* 2006;362:173-183.
- 107 **Martinowich K, Daisuke H, Wu H, et al.** DNA methylation-related chromatin remodeling in activity dependent BDNF gene regulation. *Science* 2003;302:890-893.
- 108 **Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T.** Demethylation of the zygotic paternal genome in the mouse zygote. *Nature* 2000;403:501-502.
- 109 **Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP.** Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 1989;58:499-507.

-
- 110 **Mensink G, Lampert T, Bergmann E.** Übergewicht und Adipositas in Deutschland 1984 - 2003. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 2005;48:1348-1356.
- 111 **Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R.** Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res 2005;33:5868-5877.
- 112 **Millar CB, Guy J, Sansom OJ, et al.** Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. Science 2002;297:403-405.
- 113 **Minarovits J, Hu LF, Minarovits-Kormuta S, Klein G, Ernberg I.** Sequence-specific methylation inhibits the activity of the Epstein-Barr virus LMP 1 and BCR2 enhancer-promoter regions. Virology 1994;200:661-667.
- 114 **Miyamoto E.** Molecular mechanism of neuronal plasticity: Induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. J Pharmacol Sci 2006;100:433-442.
- 115 **Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, et al.** Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. Diabetes 1998;47:294-297.
- 116 **Morikawa Y, Uekawa E, Yasuda T, Senba E.** Fasting-induced activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol 2004;16:105-112.
- 117 **Münzberg H, Luo L, Nilni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C.** Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic pro-opiomelanocortin gene expression by leptin. Endocrinology 2003;144:2121-2131.
- 118 **Mutskov V, Felsenfeld G.** Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. EMBOJ 2004; 23:138-149.
- 119 **Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, et al.** Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine DNA

- methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* 2003;22:8835-8844.
- 120 **Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al.** Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding Protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;398:386-389.
- 121 **Newell-Price J, King P, Clark AJ.** The CpG island promoter of the human pro-opiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. *Mol Endocrinol* 2001;15:338-348.
- 122 **Newell-Price J.** Pro-opiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for cushing's syndrome and beyond. *J Endocrinol* 2003;177:365-372.
- 123 **Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, et al.** MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999;23:58-61.
- 124 **Ng HH, Jeppesen P, Bird A.** Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 2000;20:1394-1406.
- 125 **Nishino K, Hattori N, Tanaka S, Shiota K.** DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J Biol Chem* 2004;279:22306-22313.
- 126 **Noll S, Schaub-Kuhnen S.** Praxis der Immunhistochemie. München und Jena: Urban und Fischer Verlag, 2000.
- 127 **Novina CD, Sharp PA.** The RNAi revolution. *Nature* 2004;430:161-164.
- 128 **Northrop JK, Thomas RM, Wells AD, Shen H.** Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J Immunol* 2006;177:1062-1069.
- 129 **Ohashi Y, Ueda M, Kawase T, Kawakami Y, Toda M.** Identification of an epigenetically silenced gene, RFX1, in human glioma cells using restriction landmark genomic scanning. *Oncogene* 2004;23:7772-7779.

-
- 130 **Okano M, Bell D, Haber DA, Li E.** Dna methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-257.
- 131 **Okino ST, Pookot D, Li LC, et al.** Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:7420-7428.
- 132 **Ollmann MM, Wilson BD.** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997;278:135-138.
- 133 **Owerbach D, Rutter WJ, Roberts LJ, et al.** The pro-opiocortin (adrenocorticotropin/ β -lipotropin) gene is located on chromosome 2 in humans. *Somatic Cell Genetics* 1981;7:359-369.
- 134 **Park JH, Cosgrove MS, Youngman E, Wolberger C, Boeke JD, et al.** A core nucleosome surface crucial for transcriptional silencing. *Nat Genet* 2002;32:273-279.
- 135 **Petak I, Danam RP, Tillman DM, et al.** Hypermethylation of the gene promoter and enhancer region can regulate Fas expression and sensitivity in colon carcinoma. *Cell Death Differ* 2003;10:211-207.
- 136 **Plagemann A.** Perinatal nutrition and hormone dependent programming of food intake. *Hormone Research* 2006;65:83-89.
- 137 **Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, et al.** The p120 catenin partner kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 2001;15:1613-1618.
- 138 **Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, et al.** Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999;43:985-991.
- 139 **Pritchard LE, Turnbull AV, White A.** Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: Impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 2002;172:411-421.

-
- 140 **Rajeevan MS, Swan DC, Duncan K, et al.** Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods* 2006;138:170-176.
- 141 **Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, et al.** DNA-Methylation Profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the human epigenome project. *PLOS Biology* 2004;12:e 405.
- 142 **Richardson B.** Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2003;2:245-261.
- 143 **Riggs AD, Pfeiffer GP.** X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 1992;8:169-174.
- 144 **Robert Koch Institut.** Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Ergebnisse des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 2007;50:736-743.
- 145 **Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, et al.** Body Mass Index variations: Centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:13-21.
- 146 **Rossler J, Stolze I, Frede S, et al.** Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem* 2004;93:153-161.
- 147 **Rotimi CN, Comuzzie AG.** The quantitative trait locus on chromosome 2 for serum leptin levels is confirmed in african-americans. *Diabetes* 1999;48:643-644.
- 148 **Rubinstein M, Mortrud M.** Rat and mouse pro-opiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocrinology* 1993;4:373-380.
- 149 **Ruzov A, Dunican DS, Prokhortchouk A, et al.** Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. *Development* 2004;131:6185-6194.
- 150 **Sambrook J, Russel DW.** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

-
- 151 **Satyamoorthy K, Park K, Atchison ML, Howe CC, et al.** The intracisternal A-particle upstream element interacts with transcription factor YY1 to activate transcription: Pleiotropic effects of YY1 on distinct DNA promoter elements. *Mol Cell Biol* 1993;13:6621-6628.
- 152 **Schütze K, Becker B, et al.** Tissue microdissection, laser pressure catapulting. In: Bowtell D, Sambrook J, eds. *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory press, 2003:331-356.
- 153 **Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, et al.** Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997;46:2119-2123.
- 154 **Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-671.
- 155 **Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE.** Nucleic acid reactivity and conformation II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem* 1973;248:4060-4064.
- 156 **Shiota K, Yasushi K, Ohgane J, et al.** Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 2002;7:961-969.
- 157 **Shiota K.** DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res* 2004;105:325-334.
- 158 **Smeets DFCM, Moog U, Weemaes CM, et al.** ICF Syndrome: a new case and review of the literature. *Hum Genet* 1994;94:240-246.
- 159 **Stirzaker C, Song JZ.** Transcriptional Gene Silencing promotes DNA Hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3871-3877.
- 160 **Stoger R, Kubicka P, Liu CG, et al.** Maternal-specific methylation of the imprinted mouse IGF2R locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 1993;73:61-71.

-
- 161 **Strunnikova M, Schagdarsurenging U, Kehlen A, et al.** Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A Promoter. *Mol Cell Biol* 2005;25:3923-3933.
- 162 **Suzuki T, Fujii M, Ayusawa D.** Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts. *Exp Gerontol* 2002;37:1005-1014.
- 163 **Tagoh H, Melnik S, Lefevre P, et al.** Dynamic reorganization of chromatin structure and selective DNA demethylation prior to stable enhancer complex formation during differentiation of primary hematopoietic cells in vitro. *Blood* 2004;103:2950-2955.
- 164 **Takahashi H, Hakamata Y.** Complete nucleotide sequence of the human corticotropin lipoprotein precursor gene. *Nucleic Acids Research* 1983;11:6847-6858.
- 165 **Takai C, Jones PA.** Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3740-3745.
- 166 **Tate PH, Bird AP.** Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:226-231.
- 167 **Thomas RM, Gao L, Wells AD.** Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol* 2005;174:4639-4646.
- 168 **Thomassin H, Flavin M, Espinás ML, Grange T.** Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *MBO J* 2001;20:1974-1983.
- 169 **Tokizane T, Shiina H, Igawa M, et al.** Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5793-5801.
- 170 **Ueyama E, Morikawa Y, Yasuda T, Senba E.** Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding. *Neurosci Lett* 2004;371:40-44.

-
- 171 **Umezawa A, Yamamoto H, Rhodes K, et al.** Methylation of an ETS site in the intron enhancer of the keratin 18 gene participates in tissue-specific repression. *Mol Cell Biol* 1997;17:4885-4894.
- 172 **Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, et al.** Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res* 2003;13:868-874.
- 173 **Wabitsch M, Hebebrand J, Zwiauer K, Kiess W.** Adipositas bei Kindern und Jugendlichen. Grundlagen und Klinik. Berlin und Heidelberg: Springer Verlag, 2006.
- 174 **Wan M, Lee SS, Zhang X, et al.** Rett syndrome and beyond: Recurrent spontaneous familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 2000;65:1520-1529.
- 175 **Waterland RA, Jirtle RL.** Transposable Elements: Targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 2003;23:5293-5300.
- 176 **Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M.** Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem* 1998;253:771-777.
- 177 **Whitfeld ET, Seeburg PH, Shine J.** The pro-opiomelanocortin gene: Organization, sequence and interspersions with repetitive DNA. *DNA* 1982;1:133-143.
- 178 **WHO.** Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical support series 894. Geneva: World Health organization, 2000.
- 179 **Xu AW, Ste-Marie L, Kaelin CB, Barsh GS.** Inactivation of STAT3 in POMC neurons causes decreased POMC expression, mild obesity and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology* 2006;148:72-80.
- 180 **Yasween L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U.** Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat med* 1999;5:1066-1070.

-
- 181 **Yeo GSH, Farooqi IS, Aminian S, et al.** A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 1998;20:111-112.
- 182 **Yoder JA, Walsh CP.** Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;12:335-340.
- 183 **Young JI, Otero V, Cerdán MG, et al.** Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 1998;18:6631-6640.

7 Anhang

Verwendete Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACTH	Adrenokortikotrophes Hormon
AgRP	Agouti-related Peptide
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BMI	Body Mass Index
CART	Cocaine- and Amphetamine-regulated Transcript
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CREB	cAMP Response Element Binding
Dnmt	DNA-Methyltransferase
dNTPs	Desoxynukleotidphosphat
ECR	Evolutionär konservierte Region
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HRP	Horse Reddish Peroxidase
ICF	Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial Abnormalities
IL-2	Interleukin 2
LMP	Low Melting Point
LMPC	Laser Microdissection Pressure Catapulting
LPH	Lipotropin
MAGE	Melanoma Antigen Genfamilie
MBD	Methyl-CpG-Bindungsdomäne
MCR4	Melanocortinrezeptor 4

MHC	Major Histocompatibility Complex
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
NPY	Neuropeptid Y
NuRD	Nucleosome Remodelling and Histone Deacetylation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC1/2	Prohormonkonvertase 1 bzw 2
POMC	Pro-Opiomelanocortin
QTLs	Quantitative Trait Locus Scan
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B
RISCs	RNA Induced Silencing Complexes
RLGS	Restriction Landmark Genomic Scanning
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	Small Interfering RNA
SRY	Sex-determining Region of Y
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
TDM	Tissue-specific Differentially Methylated Region
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Th	T-Helferzelle
UTR	Untranslatierte Region

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. med. Heiko Krude, der mir das Thema angeboten und anvertraut hat, Dr. med. Peter Kühnen für ausgezeichnete Betreuung und Zusammenarbeit im Labor sowie PD Dr. med. Frank van Landeghem für die Bereitstellung der hypothalamischen Kryoschnitte.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Antje Auler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Beschreibung der Methylierung der hypothalamus-spezifischen Enhancer des Pro-Opiomelanocortin Gens“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.