

Aus dem Institut für Medizinische Genetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genomweite differentielle DNA Methylierung im Knochen von
neonatalen versus adulten C57BL/6-Mäusen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Sandya Bauer
aus Colombo/Sri Lanka

Datum der Promotion: 22. September 2017

Meinem Patenonkel Paul Veil

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/ Abstract	6
1.1	Zusammenfassung	6
1.2	Abstract	7
2	Einleitung	11
2.1	DNA Methylierung	11
2.2	Epigenetik	13
2.3	DNA Methylierungsmuster in Entwicklung und Alterung	14
2.4	DNA Methylierungsmuster im Knochen	15
2.4.1	Knochengewebe	15
2.4.2	Knochenentwicklung und -stoffwechsel	15
2.4.3	<i>WNT/Beta-Catenin</i> -Signalweg	16
2.4.4	Knochenalterung	17
2.4.5	DNA Methylierung im Knochen	18
2.4.6	Demethylierung mit 5-Azacidin	18
2.5	Differentielle Methylierung	18
2.6	Analyse von DNA Methylierung	19
2.7	„Reduced Representation Bisulfite Sequencing“ mit <i>MspI</i>	21
3	Zielstellung	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	Proben/ Gewebe	25
4.1.2	Chemikalien, Puffer und andere Reagenzien	25
4.1.3	Enzyme	26
4.1.4	Oligonukleotide	26
4.1.5	Kits	26
4.1.6	Verbrauchsmaterialien	27
4.1.7	Geräte	27
4.1.8	Datenbanken und Software	27
4.1.9	Zellkultur	28
4.2	Methoden	28
4.2.1	Präparation genomischer DNA aus C57BL/6-Mäusen	28
4.2.2	„Reduced Representation Bisulfite Sequencing“	29

4.2.3	Validierung der Umwandlungssicherheit mit Bisulfit	32
4.2.4	Optimierung des Enzymverdaus mit <i>Msp1</i>	32
4.2.5	Auswertung der RRBS-Datensätze	32
4.3	Validierung der TDMs	32
4.3.1	Validierung der TDMs mit „Ultradeep Bisulfit“ Sequenzierung	32
4.3.2	Alternative Validierung der TDMs mit <i>Msp1-Hpa2</i> -Verdau	34
4.3.3	Expression der TDM zugehörigen Gene	35
4.4	Zellkulturversuche	36
4.4.1	Behandlung mit 5-Azacidin	36
4.4.2	Validierung mit 5-Azacidin	37
4.4.3	Behandlung von nativen Osteoblastenzellen mit 5-Azacidin	37
4.4.4	Differenzierung von pCOBs	38
4.4.5	Mineralisierung	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Etablierung und Optimierung des RRBS-Protokolls mit <i>Msp1</i> nach Smith	39
5.1.1	Enzymverdau mit <i>Msp1</i>	39
5.1.2	Analytische Polymerasekettenreaktion	39
5.1.3	Validierung der Umwandlungssicherheit mit Bisulfit	40
5.1.4	Sequenzierung mit Illumina GAIIX	41
5.2	Auswertung der RRBS-Datensätze	41
5.3	Definition von differentiell methylierten Regionen (DMRs)	41
5.4	Lokalisation der Fragmente	42
5.5	Auswahlkriterien	42
5.6	Differentiell methylierte Fragmente	43
5.7	Validierung der differentiell methylierten Regionen	51
5.7.1	Bisulfit-PCR	51
5.7.2	<i>Msp1-Hpa2</i> -Verdau	52
5.7.3	Expression der ausgewählten Gene mit DMRs in Calvaria-Proben	53
5.8	Behandlung von MC3T3-E1 subclone4-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Azacidin	53
5.8.1	Vitalität von MC3T3-E1 subclone4-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin	53
5.8.2	DNA Methylierung von MC3T3-E1 subclone4-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin	54
5.8.3	Expression nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin	54
5.9	Untersuchung von primären calvarialen Osteoblastenzellen	54
5.9.1	Vitalität von pCOBs nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin	54
5.10	Zusammenschau der einzelner Ergebnisse	55
6	Diskussion	68
6.1	DNA Methylierung	68

6.1.1	Differentielle Methylierung in Promotorregionen im Knochen	70
6.1.2	Differentielle Methylierung ausserhalb von Promotorregionen im Knochen	75
6.1.3	Genexpression während der Differenzierung im Knochen	76
6.2	Analyse von DNA Methylierung	77
6.2.1	Analyse von DNA Methylierung mit NGS	77
6.2.2	Vergleich mit anderen Methoden	78
6.2.3	RRBS mit <i>Msp1</i>	78
6.2.4	Validierung der differentiell methylierten Regionen	80
6.2.5	Statistische Auswertung der Datensätze	81
6.3	Zusammenfassung und Ausblick	81
	Abbildungsverzeichnis	84
	Tabellenverzeichnis	84
	Literaturverzeichnis	85
	7 Anhang	96

1 Zusammenfassung/ Abstract

1.1 Zusammenfassung

DNA Methylierung ist eine epigenetische Veränderung, welche die Genexpression während Embryogenese, Entwicklung, Alterung und Kanzerogenese moduliert[26; 25]. Eine DNA Hypermethylierung führt in Promotorregionen innerhalb von CpG Inseln zu „Gensilencing“ [5; 64]. Lange war die Analyse von 5-Methylcytosin nur für einzelne ausgewählte Fragmente möglich. Seit kurzer Zeit ist durch NGS die genomweite Sequenzierung und somit auch die genomweite Analyse von Methylierungsmustern möglich geworden. Bekannte Methoden sind die MeDIP-, die MBD- und der Goldstandard die Bisulfit-Sequenzierung[26; 61]. Zur Verringerung der Menge an Sequenzen prägte besonders A. Meissner die „Reduced Representation Bisulfit“-Sequenzierung, bei der nach einem enzymatischen Verdau und einer Größenselektion gewünschte Regionen angereichert werden[43; 74; 75]. Für mehrere Gewebe sind bereits genomweite Methylierungsmuster, sog. Methyloome, erstellt worden, jedoch noch nicht für das Gewebe Knochen.

Wir haben Calvariae und Femora von neonatalen und adulten C57BL/6-Mäusen präpariert und eine „Reduced Representation Bisulfite“ Sequenzierung mit *Msp1*, einem Protokoll das von Smith et al. entwickelt wurde und CpG Inseln in Promotoren anreichert, durchgeführt. Nach einer Optimierung des Protokolls konnten die Calvaria Proben erfolgreich mit dem Illumina GAIIx sequenziert und Regionen differentieller Methylierung (DMRs) zwischen neonatalen und adulten Osteoblasten identifiziert werden. Insgesamt wurden 605 DMRs identifiziert; davon liegen 166 im Bereich eines Gens und neun innerhalb von Promotorregionen.

Cdh1, *Zfx3*, *Cct8l1*, *Il11*, *Fgfr1*, *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* und *Acn9* weisen zwischen neonatalen und adulten Calvariae differentielle Methylierung auf. *Cdh1*, *Zfx3*, *Cct8l1*, *Il11* und *Fgfr1* sind in den neonatalen Calvariae hypermethyliert; *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* und *Acn9* dagegen in den adulten. Bei *E-Cadherin*, *Zinkfingerprotein 3*, *Fgfr1* und *Interleukin 11* ist eine Beteiligung im Knochenstoffwechsel und der -entwicklung bereits bekannt. Unsere Ergebnisse legen eine Regulation dieser Gene im Knochenstoffwechsel über DNA Methylierung nahe. Bei *Cct8l1*, *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* und *Acn9* ist eine Rolle im Knochenstoffwechsel ebenfalls zu vermuten.

Es wurden weitere im Knochenstoffwechsel bekannte Gene, die DMRs im Exon oder Intron aufwiesen im Zellkulturlabor untersucht. Die Zelllinie MC3T3-E1 subclone4 und pCOBs wurden hierfür mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin demethyliert und anschließend Expressionsanalysen mittels qPCR durchgeführt. Diese ergab keine Änderungen der Expression mit zunehmender Demethylierung. Dies stützt die bereits in anderen Geweben festgestellte fehlende Auswirkung von DNA Methylierung in diesen Regionen auf die Genexpression.

Bei einer Expressionsanalyse während der Differenzierung von Osteoblasten im Zellkulturlabor zeigte sich eine signifikante Expressionszunahme von *Bmp8* und *rPheX*, die allerdings nicht durch DNA Methylierung reguliert zu sein scheint. Eine Validierung der DMRs mit „Ultradeep Bisulfite“ Sequenzierung war nicht erfolgreich. Die Bisulfit-PCR als erster Schritt konnte aufgrund der erschwerten Anlagerung der Primer an die Bisulfit-konvertierte DNA nicht etabliert werden.

1.2 Abstract

DNA methylation is an epigenetic mechanism which has an already well described influence on embryogenesis, development, aging and carcinogenesis[26; 25]. DNA hypermethylation usually appears in promotor regions within CpG islands and induces „genesilencing“ of the related gene[5; 64]. A common method to analyze 5-methylcytosine at single-base resolution is Bisulfite-Sequencing[26; 61]. Recently, genome-wide approaches of methylation analysis have become feasible by the development of NGS. Common methods are MeDIP-, MBD- and the gold standard Bisulfite-Sequencing. To improve high costs and throughput a method called „Reduced-Representation-Bisulfite-Sequencing“(RRBS) was developed. RRBS includes a preparation protocoll with an enzymatic digestion of the sample DNA and a size selection step to enrich selected fragments[43; 74; 75].

These methods led to a genome-wide mapping of DNA methylation patterns called methylomes. Methylomes for several tissues exist by now, though not for the tissue bone.

We harvested calvariae and femora of neonatal and adult C57BL/6-mice and performed RRBS with *Msp1*, a special protocol to enrich CpG islands first described by ZD Smith. After an optimization of the protocol neonatal and adult calvariae were successfully sequenced with the Illumina GAIIX. We have identified 605 differentially methylated regions (DMRs), of which 166 could be aligned to a gene.

9 DMRs were located in promotor regions -*Cdh1*, *Zfhx3*, *Cct8l1*, *Il11*, *Fgfr1*, *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* and *Acn9*. *Cdh1*, *Zfhx3*, *Cct8l1*, *Il11* and *Fgfr1* are hypermethylated in the neonatal; *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* and *Acn9* in the adult samples.

E-Cadherin, *Zfhx3*, *Fgfr1* und *Il11* have a previously described role in bone (re)modelling and development. Our result suggest a regulation of these genes by DNA promotor methylation. We also presume a role in bone metabolism of *Cct8l1*, *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* and *Acn9* and a regulation by DNA methylation.

Alternate genes that are involved in bone metabolism and development have DMRs in exonic and intronic regions and were further investigated. Therefore we treated cells of the cell line MC3T3-E1 subclone4 and pCOBs with different concentrations of 5-azacytidine in cell culture to cause a demethylation. Subsequent expression analysis by qPCR were performed to explore associations between methylation level and expression. We didn't find any associations between DNA methylation of intronic and exonic regions and expression. Previous investigations in other tissues match with our results.

Our expression analysis during the differentiation of osteoblasts in cell culture showed a significant increase of *Bmp8* und *rPheX*. Anyhow these genes doesn't seem to be regulated by DNA methylation.

A validation of our results by „Ultradeep-Bisulfite-Sequencing“ couldn't be successfully established. Primer annealing -the first step of the Bisulfite-PCR- was not feasible.

Abkürzungen

A	Base Adenosin
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous polyposis coli
bp	Basenpaare
C	Base Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CDS	kodierende Sequenz
CK1	Casein kinase 1
DMR	Differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EXONIC	im Exon liegend
ER-alpha	Östrogenrezeptor alpha
FZD1/4	frizzled family receptor 1/4
G	Base Guanin
GSK3-beta	Glycogen synthase kinase 3 beta
HCl	Salzsäure
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HPLC-Wasser	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie reines Wasser
Illumina GAIIX	Illumina Genome Analyzer Modell IIX
INTRONIC	im Intron liegend
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
mC	Methylcytosin
MC4	Zelllinie MC3T3-E subclone 4
MS-PCR	methylierungsspezifische PCR
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGS	„Next Generation“ Sequenzierung
P0	neonatal
P10	0 Tage alt
P10Wochen	10 Wochen alt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pCOBs	primäre calvariale Osteoblasten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE-Primer	paired-end Primer
PM	CpG-Promotormethylierung
qPCR	quantitative PCR; hier synonym zu RT-PCR gebraucht
Reverse Strand	Gegenstrang zum Sense Strand
RNA	Ribonukleinsäure
RRBS	„Reduced Representation Bisulfite Sequencing“
RT-PCR	„Real-time“ PCR; hier synonym zu qPCR gebraucht

Sense Strand	DNA Strang
SFRP1/2	Secreted frizzled-related protein 1/2
si-RNA	„small interfering“ RNA
SOST	Sclerostin
T	Base Thymin
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TCF7	Transkriptionsfaktor 7 (T-Zell-spezifisch, HMG-box)
TGF-beta	Transforming growth factor beta
t-DMR	gewebespezifische DMR
TSS	„Transcription start site“
U	Base Uracil
UCSC	University of California Santa Cruz
UTR	„untranslated region“
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WTX	Wilm's tumor genes on chromosome X

Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
Min./min.	Minuten
V	Volt
Sek./s	Sekunden

2 Einleitung

2.1 DNA Methylierung

1953 entschlüsselten Watson und Crick die Struktur der DNA. In den folgenden Jahren wurden immer mehr DNA Abschnitte sequenziert und 47 Jahre später die Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms abgeschlossen. Lange war man der Ansicht, dass die Basenabfolge des menschlichen Genoms einen Code für alle oder mindestens eine Vielzahl von biologischen Prozessen liefert, jedoch wurde im Laufe der Zeit immer deutlicher, dass die Basensequenz der DNA allein diese Erklärungen nicht liefern kann. In molekularbiologischen Untersuchungen konnten weitere Regulationsmechanismen identifiziert werden, die ebenfalls auf Prozesse wie Entwicklung und Genexpression einwirken, vermutlich vererblich und nicht in der Basensequenz kodiert sind. Diese Mechanismen werden heute unter dem Themengebiet der Epigenetik zusammengefasst[4].

1948 wurde erstmals von Hotchkins eine „anormale Base“ beschrieben, die er bei einer Fraktionierung von Basen mittels Papierchromatographie entdeckte. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit Cytosin wurde sie als „Epicytosin“ bezeichnet. Später konnte sie als 5-Methylcytosin identifiziert werden[3]. Heute ist 5-Methylcytosin als zentraler epigenetischer Regulationsmechanismus bekannt und wurde 2009 von Lister und Ecker sogar als die „5. Base“ bezeichnet[64].

5-Methylcytosin ist eine Cytosinbase, die eine Methylgruppe an der 5er Position des Pyrimidinrings besitzt. Diese Veränderung wird als DNA Methylierung bezeichnet. Die Reaktion von Cytosin zu Methylcytosin wird von den DNA-Methyltransferasen (*DNMTs*) katalysiert und benötigt den Cofaktor SAM (siehe Abbildung 2.1).

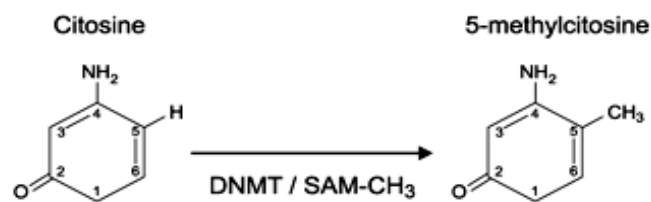


Abbildung 2.1:

Cytosinmethylierung

Enzymatische Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin durch eine *DNMT* mit dem Co-Faktor SAM[59].

Es gibt vier bekannte *DNMTs*, die unterschiedliche Funktionen ausfüllen: *DNMT1* erkennt hemi-methylierte DNA-Stränge und bewirkt hier eine symmetrische Methylierung.

rung des Gegenstranges z.B. in der Mitose. *DNMT2* wird mit der Methylierung von tRNA in Verbindung gebracht. *DNMT3a* und *DNMT3b* sind de novo-Methyltransferasen und somit ursächlich für die Etablierung von neuen DNA-Mustern. Nachgewiesen wurde beispielsweise eine Beteiligung bei der Embryonalentwicklung und beim genomischen Imprinting. *DNMT3L* ist ein Protein, das die Aktivität von *DNMT3a* und *DNMT3b* beeinflusst[107; 87; 80].

Bei der genomweiten Untersuchung von DNA Methylierungsmustern in *Arabidopsis thaliana*, einer Pflanze der Familie der Kreuzblütler, wurden die analysierten Methylcytosine den Kontexten „CG“, „CHG“ (wobei „H“ für A,C oder T steht) und „CHH“ zugeordnet. Das Resultat waren Methylierungsgrade von 24% in CG, 6,7% in CHG und 1,7% in CHH Sequenzen. Innerhalb von Genen wurde fast ausschließlich CG-Methylierung gefunden, in genomischen Regionen dagegen CG-, CHG- und CHH-Methylierung[18]. Folglich kommt DNA Methylierung in *A. thaliana* genomweit zum überwiegenden Teil und im Bereich der Gene sogar fast ausschließlich in der Sequenz CG vor.

Bei Säugetieren findet man ähnliche DNA Methylierungsmuster, auch hier kommt DNA Methylierung zum größten Teil innerhalb des CpG-Dinukleotids vor. „CpG“ beschreibt die palindromische Basenfolge Cytosin-Guanin, wobei „p“ für die Phosphatgruppe zwischen den zwei Nukleotiden steht. CpG-Sequenzen kommen häufig in sogenannten CpG Inseln vor. CpG Inseln sind definiert als Regionen mit über 500 Basenpaaren, die mehr als 55% CpG-Dinukleotide enthalten. CpG Inseln kommen häufig in Promotorregionen von Genen vor; beim Menschen haben 40 bis 50% der Gene CpG Inseln in ihren Promotorregionen. Einzeln vorkommende CpG-Dinukleotide sind oft methyliert. Insgesamt ist eine CpG-Methylierung von 3-6% normal und CpG-Dinukleotide innerhalb von CpG Inseln sind gewöhnlich nicht methyliert[26]. Eine Methylierung der CpG Inseln findet man dagegen bei inaktiven Genen. In embryonalen Stammzellen findet man vermehrt nicht-CpG-Methylierung[65].

Eine Hypermethylierung der CpG Inseln in Promotorregionen eines Gens führt zum „Genesilencing“. Genesilencing ist eine Verminderung der Transkription des betroffenen Gens. Man vermutet eine Verhinderung der Transkription durch die Anlagerung von Methyl-CpG-Binding-Proteine (MeCPs) an methylierte CpG-Dinukleotide. MeCP2 zum Beispiel besitzt eine methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) und eine „transcriptional repression domain“(TRD). TRD kann über eine Entfernung von mehreren 100 Basenpaaren die Gentranskription ausschalten. Außerdem führt dies zusätzlich zu einer erschwerten Bindung von Transkriptionsfaktoren[5]. M. Ehrlich hat z.B. in einem Review die Auswirkungen von DNA Methylierung auf die Herzentwicklung analysiert und festgestellt, dass DNA-Methylierung in Assoziation mit einer veränderten Expression einzelner Gene während der Entwicklung auftritt[25].

DNA Methylierung spielt in vielfältigen biologischen Prozessen wie der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei der Frau, beim genomischen Imprinting und in der Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle. Das genomische Imprinting ist ein Mechanismus, der einzelne Gene auf dem maternalen oder aber auf dem paternalen Allel ausschaltet. Ein wichtiger Bestandteil zur Inaktivierung von Genen beim genomischen Imprinting ist die DNA Methylierung. *H19* beispielsweise ist ein RNA-Gen, das dem genomischen Imprinting unterliegt. *H19* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11

(11p15), nahe dem *IGF2*-Gen (Insulin-like Growth Factor). *H19* ist auf dem maternalen Allel aktiv und auf dem paternalen Allel durch Hypermethylierung ausgeschaltet[84]. Imprintingdefekte, also eine fehlerhafte Inaktivierung von Genen auf dem paternalen oder maternalen Allel führt zu genetischen Erkrankungen. Beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom liegt ursächlich eine Mutation auf dem *H19*- und *IGF2*-Gen zugrunde. Dies führt zu einer fehlerhaften DNA Methylierung beim genomischen Imprinting. Phänotypisch wirkt sich diese Erkrankung durch Fehlbildung in Bezug auf die Größe aus. Charakteristisch sind eine prä- und postnatale Übergröße mit Makroglossie, Viszeromegalie der abdominalen Organe, Hemihyperplasie, deformierten und tief liegenden Ohren, Lippenkiefergaumenspalte und eine Prädisposition für embryonale Tumoren[52].

Auch bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Malignomen ist häufig DNA Methylierung involviert. Genomweit ist bei Malignomen häufig insgesamt ein Verlust von DNA Methylierung und in Promotorregionen besonders von antiproliferativ wirkenden Tumorsuppressorgenen eine zunehmende CpG Methylierung -mit der Folge einer Inaktivierung dieser Tumorsuppressorgene- nachgewiesen[26]. Besonders gut erforscht ist die Hypermethylierung des Promotors des *MGMT*-Gens (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) beim häufigsten Hirntumor des Erwachsenenalters, dem Glioblastom *MGMT*. ist ein DNA Reparaturenzym, das dem Anhängen von Alkylgruppen an die Base Guanin mit letaler Auswirkung auf die Zelle entgegenwirkt. Die Promotorregion von *MGMT* ist in manchen entarteten Zellen hypermethyliert und das Gen inaktiv. Das Glioblastom wird u.a. mit Temozolomid, einem DNA-alkylierenden Chemotherapeutikum, behandelt. *MGMT* wirkt diesem Chemotherapeutikum entgegen und schwächt somit dessen Wirkung ab. Eine Promotor-Hypermethylierung und somit Inaktivierung von *MGMT* führt zu einem verbesserten Ansprechen auf Temozolomid und einer verlängerten Überlebenszeit des Patienten[103].

2.2 Epigenetik

DNA Methylierung kommt häufig in einem komplexen Zusammenspiel mit anderen epigenetischen Veränderungen vor. Epigenetik/Epigenotyp wurde zu Beginn von C.H. Waddington als Komplex, der zwischen Genotyp und der Ausprägung des Phänotyps liegt, beschrieben und wird heute definiert als „vererbliche Informationen, die nicht in der DNA-Sequenz codiert sind“[101]. Der Begriff wird mittlerweile ausgedehnt verwendet als „die molekulare Vermittlung epigenetischer Regulation der Genexpression“[36]. Zu den epigenetischen Veränderungen zählen DNA Methylierung, Histonmodifikationen und kleine RNAs.

Ein zentraler Mechanismus in der Epigenetik ist das sog. Chromatinremodelling. Der strukturelle Grundbestandteil des Chromatins ist das Nukleosom, das aus 146 Basenpaaren besteht, die um ein Oktamer von Histonproteinen gewickelt sind. Die unterschiedlichen Histonmodifikationen verändern in Interaktion den Chromatinzustand zwischen der eng gepackten Heterochromatin- und der lockereren Euchromatinstruktur. Der Heterochromatinzustand erschwert die Transkription und der Euchromatinzustand erleichtert z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Dies nennt man die „Histoncode

Hypothese“[49].

Histonmodifikationen sind die posttranslationale Methylierung, Deacetylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung von spezifischen Aminosäureresten der Histonproteine. Gut untersucht ist die Acetylierung durch Histonacetyltransferasen (*HATs*), die zu einer Öffnung der Chromatinstruktur und Transkription führen, und die Deacetylierung durch Histondeacetylasen (*HDACs*), die zu einer Hemmung der Transkription führen[111]. Seltener sind auch kleine RNA-Moleküle an diesem Regulationsmechanismus beteiligt. Diese werden small interfering RNAs (siRNAs) und microRNAs (miRNAs) genannt. Die Interaktion dieser kleinen, ca. 21-23 Nukleotide großen RNAs mit Genpromotoren wird RNA-Interference (RNAi) genannt. RNAi kann ebenfalls durch Interaktion mit DNA Methylierung am Ausschalten des betroffenen Gens (Genesilencing) beteiligt sein[113].

Ein Beispiel des Zusammenspiels der epigenetischen Mechanismen zur Regulation der Transkription beschreiben Bird und Wolffe. Eine Verbindung zwischen Promotorhypermethylierung und *HDACs* wird z.B. über das Protein *Sin3A* vermittelt. *Sin3A* weist Interaktionen mit der Proteindomäne von MeCP2 und *HDACs* auf, die beide zu einer Verminderung der Transkription führen[5].

Insgesamt ist dieses komplexe Zusammenspiel aber noch nicht ganz verstanden und bedarf weiterer Untersuchungen[75; 75].

2.3 DNA Methylierungsmuster in Entwicklung und Alterung

Das Genom von reifen Spermien und Eizellen von Säugetieren ist sehr stark methyliert. In der frühen Keimzellentwicklung entsteht eine Demethylierung, die bei Mäusen am 13.-14. Tag abgeschlossen ist. Wenige Tage später erfolgt eine Remethylierung. In der frühen Embryonalentwicklung erfolgt erneut eine Demethylierung[84]. Kürzlich wurden erstmals DNA Methylierungsmuster von humanen Embryos in der frühen Embryonalentwicklung untersucht. Es stellte sich heraus, dass in humanen Embryos die genomweite Demethylierung bereits im 2-Zell-Stadium vollständig ausgeprägt ist. In der frühen Embryonalentwicklung nimmt die inverse Korrelation zwischen Promotormethylierung und Genexpression nun stetig zu und erreicht ihren Höhepunkt direkt nach der Implantation[32].

Auch das genomische Imprinting ist bedeutsam bei der frühen Entwicklung. In der gesunden paternalen Keimzelle ist der Promotor des *H19* Gen hypermethyliert. Es wird angenommen, dass ein besonderer Schutzmechanismus nötig ist, um eine Demethylierung dieser Region im Rahmen der genomweiten Demethylierung in dieser Region zu verhindern[84].

Maegawa et al. analysierten DNA Methylierungsmuster von 3 Monate und 35 Monate alten C57BL/6 Mäusen. Es wurden CpG Inseln von 3627 autosomalen Genen in Dünndarmproben mit Methylated-CpG-Island-Amplification-Microarrays (MCAM) untersucht. Das Ergebnis lieferte 774 Gene (20%) mit zunehmender und 466 Gene (13%) mit abnehmender Methylierung bei der Alterung. Diese unerwartet hohe Anzahl von Genen wurden mit Pyrosequenzierung validiert und 12 genomische Regionen mit differentieller Methylierung mit einem größer als zweifachen Methylierungsunterschied identifiziert. Ähnliche Methylierungsmuster wurden auch in anderen Mausgeweben gefunden. In der

Lunge wiesen 3 von 11 der genomischen Regionen ähnlich große Methylierungsänderungen auf; in der Leber dagegen 7 von 11 und in der Milz 6 von 11. Somit scheint eine Änderung der Methylierung in der Maus im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses vorzukommen. Darmgewebe wies eine besonders hohe Anzahl von DMRs im Alterungsprozess auf[69].

2.4 DNA Methylierungsmuster im Knochen

2.4.1 Knochengewebe

Knochen ist ein sehr komplexes Bindegewebe, das durch eine kalzifizierte extrazelluläre Matrix charakterisiert ist. Die mineralisierte Matrix ist das ganze Leben über Umbauprozessen unterworfen, die eine ständige Neubildung und Resorption durch Osteoblasten und Osteoklasten bedeuten. Dies ermöglicht eine Adaption an mechanische Belastung, Aufrechterhaltung des Skelettsystems sowie Regulierung des Calcium-Stoffwechsels. Ein Ungleichgewicht zwischen Knochenbildung und -abbau führt zu Veränderungen der Knochendichte. Eine pathologische Verringerung der Knochendichte führt beispielsweise zu Osteoporose. Die klinische Relevanz dieser Veränderung ist v.a. durch eine gesteigerte Frakturgefährdung gekennzeichnet[21].

2.4.2 Knochenentwicklung und -stoffwechsel

Es gibt zwei unterschiedliche Formen der Knochenentwicklung. Bei der chondralen Ossifikation entsteht primär eine Knorpelmatrix, die in Geflechtknochen und darauf in Lamellenknochen umgewandelt wird. Auf diesem Weg entstehen kurze und lange Röhrenknochen. Platte Knochen wie der Schädelknochen, die Calvaria, entstehen über die desmale Ossifikation, bei der direkt Knochengewebe gebildet wird. Geflechtknochen besteht aus zufällig sowie ohne Orientierung angeordneten Kollagenfasern. Im Lamellenknochen sind die Kollagenfasern parallel angeordnet und bilden ein komplexes System, das Havers System. Das Havers System besteht aus einem Zentralkanal, in dem Blutgefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe verlaufen, und umgebenden Speziallamellen aus Kollagenfasern[81].

Knochenumbauprozesse werden durch Osteoblasten, die Knochen bilden, und Osteoklasten, die Knochen abbauen, unterworfen. Osteoblasten sind osteogene Zellen mesenchymalen Ursprungs, Knochenvorläuferzellen, die im Bindegewebe im oder am Knochen liegen. Sie produzieren Kollagen und Proteoglykane für die Knochenmatrix. Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die von hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen und wahrscheinlich durch eine Fusion von Makrophagen und Monozyten entstehen und zudem viele Lysosomen enthalten[21].

Die osteoblastische Zelllinie entsteht aus mesenchymalen Stammzellen. Diese differenzieren zu Osteoblasten und entwickeln die Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu bilden und diese zu mineralisieren. Im folgenden sterben einige Osteoblasten durch Apoptose, andere lagern sich als „Lining Cells“ an der Oberfläche an. Die Osteoblasten, die in der Matrix eingeschlossen werden, entwickeln sich zu Osteozyten. Im Lamellenknochen machen Osteozyten 90% aller Zellen im Knochen aus. Die Osteozyten liegen in Lakunen und stehen

über viele lange Ausläufer, Dendriten genannt, miteinander in Kontakt. Die Dendriten sind über „Gap Junctions“ miteinander verbunden. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass Osteozyten eine fundamentale Rolle an Knochenumbauprozessen spielen[28].

Die desmale Ossifikation zur Bildung von Plattenknochen beginnt mit einer Kondensation von mesenchymalen Zellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten. Diese Differenzierung wird hauptsächlich durch *Runx2* reguliert. *Runx2* reguliert z.B. TypI-Kollagen, *Osteopontin*, *TGF-beta* und *Osteocalcin*. Die Osteoblasten bilden dann eine mineralisierte Matrix innerhalb von Ossifikationszentren. In der Calvaria vergrößern sich diese Zentren, fusionieren aber nicht komplett miteinander. Es bleiben Lücken zwischen den einzelnen Knochen, die Suturen, erhalten um ein Größenwachstum des Schädels zu ermöglichen. Die Zellen, welche die Suturen umgeben sind mesenchymale Zellen, von denen ein Anteil zu Präosteoblasten und anschließend zu Osteoblasten differenziert. Am Ende der Knochenbildung werden die meisten Osteoblasten apoptotisch oder entwickeln sich zu Osteozyten. Diese Prozesse werden durch viele Regulationsmechanismen organisiert. Besonders bedeutende Signalwege sind die *WNT*-, *BMP*-, *FGF*- und *TGF-beta*-Protein-Signalwege[81].

2.4.3 *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg

Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten werden durch vielfältige intrazelluläre Prozesse reguliert. Beteiligt sind mehrere Signalkaskaden. Die Osteoklasten werden stark durch das RANK/RANKL-System reguliert. Die größte Rolle bei der Knochenentwicklung und -formation spielt der *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg[100; 67]. *WNT*-Proteine sind sezernierte Glykoproteine, die über komplexe Signalwege breit gefächerte Wirkungen auf Zellen haben können. In der Embryogenese sind sie besonders an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt. Mutationen im „*wingless*“-Gen, das zusammen mit dem „*Int*“-Gen namensgebend für den Signalweg war, führen bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* zu Flügellosigkeit. *WNT*-Proteine sind beim Erwachsenen zur Erhaltung des Gewebes notwendig. Störungen im *WNT*-Signalweg beim Erwachsenen führen zu Degeneration und Malignomentstehung. Die Kontrolle über die Differenzierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu osteogenen Zellen beispielsweise wird wesentlich durch den *WNT*-Signalweg reguliert[66; 28].

Der *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg ist ein komplexer Mechanismus, dessen präzise Regulation notwendig für eine gesunde Knochenentwicklung und Umbauprozesse im Knochen sind. Zur Feinregulation der Intensität, der Amplitude und der Dauer des *WNT/Beta-Catenin*-Signalwegs sind epigenetische Regulationsmechanismen beteiligt. Ein Einfluss von Histonacetylierung und miRNAs ist bekannt. Am *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg beteiligte Gene, die durch DNA Methylierung mitreguliert werden sind *SOST* (Sclerostin) und *SFRP1* („Secreted frizzled-related Protein 1“)[100].

Eine Übersicht über den *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg zeigt Abbildung 2.2. Die Abbildung zeigt *WNT*, das extrazellulär durch Faktoren wie z.B. *SFRP1* oder *WIF1* gebunden und neutralisiert werden kann. *SOST* und *Dickkopf 1/2* sind Cofaktoren, die ebenfalls hemmend auf den *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg einwirken. *WNT* bindet an den *Frizzled*-Rezeptor an der Zelloberfläche und zerstört einen intrazellulären Komplex,

der die Faktoren AXIN1/2, APC, CK1, GSK3-beta und WTX beinhaltet. Dies führt zu einer Zunahme von *Beta-Catenin*, auch durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren TCF7 und LEF1[100].

Beta-Catenin stimuliert die Osteoblastendifferenzierung. Auch Östrogen und das Parathormon haben einen stimulierenden Einfluss auf den *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg[14; 100]. Ebenso wirkt mechanische Belastung und einige Zytokine[11; 100].

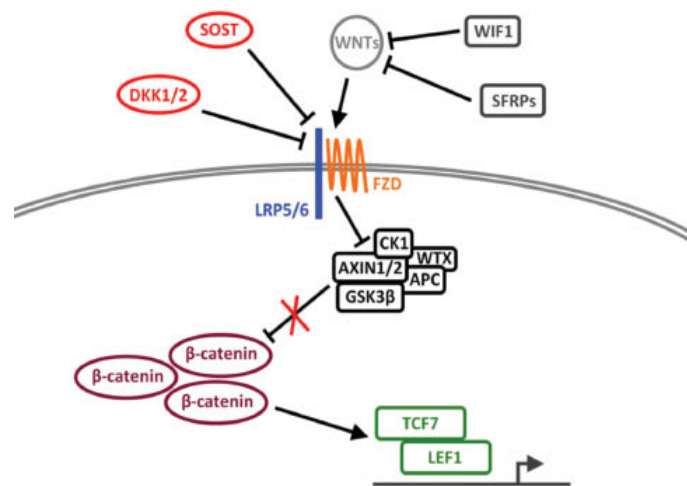


Abbildung 2.2:

Schematische Darstellung des *WNT/Beta-Catenin*-Signalwegs

In dieser Abbildung wird die Regulation über den *WNT/Beta-Catenin*-Signalweg als Übersicht dargestellt[100].

2.4.4 Knochenalterung

Die Alterung ist im Knochen assoziiert mit einer reduzierten Knochenbildung. Dies führt zu altersbedingtem Knochenverlust und Osteoporose. Die molekularen Pathomechanismen sind bisher ungeklärt. Bekannt ist eine Zunahme des Serumspiegels von Sclerosin im Alter. *Sclerosin* (*SOST*) ist ein Glykoprotein, das mit der *SOST*-related Sclerosing Bone Dysplasia und der Kraniodiaphysealen Dysplasia in Verbindung steht. Sclerosin ist ein Inhibitor des *WNT*-Signalwegs und der Knochenbildung. Roforth et al. untersuchten die Expression des Sclerosin Gens im Serum und Knochenbiopsaten von 20 jungen (mittleres Alter 30,0 Jahre) und alten (mittleres Alter 72,9 Jahre) Frauen. Im Serum konnte eine signifikante Erhöhung von Sclerosin nachgewiesen werden; im Knochengewebe zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen jung und alt. Bei Expressionsanalysen von weiteren 118 mit dem Knochenstoffwechsel assoziierten Genen wurde eine signifikante Zunahme der Expression von Genen des Notch-Signalwegs (*HES1*, *HEY1* und *JAG2*) und des *WNT*-Inhibitors *SFRP1* in den alten Proben nachgewiesen. Ein Zusammenhang zwi-

schen altersbedingter abnehmender Knochenbildung durch zunehmende Sclerosinspiegel ist somit nicht wahrscheinlich, dagegen sind Gene des Notch Signalwegs oder der *WNT*-Inhibitor *SFRP1* neue mögliche assoziierte Gene[85].

2.4.5 DNA Methylierung im Knochen

Eine genomweite Analyse von DNA Methylierungsmustern im Knochen wurde bisher noch nicht durchgeführt. Bei einzelnen für das Knochengewebe relevanten Genen konnten jedoch Assoziationen zwischen Promotormethylierung und Expression nachgewiesen werden. *Dlx5* und *Osterix* werden spezifisch im Knochen exprimiert und sind wichtige Regulatoren der Differenzierung der Osteoblasten. Die knochenspezifische Expression ist nicht vollständig geklärt. Bei einer Untersuchung der Promotormethylierung wurde eine Hypermethylierung des Promotors in nicht-osteogenen Zelllinien und ein nicht-methylierter Promotor in osteogenen Zelllinien gefunden. Durch Demethylierung von C2C12 Zellen konnte ausserdem künstlich eine Expression von *Dlx5* und *Osterix* herbeigeführt werden[58]. Vaes et al.[99] zeigten bei C2C12 Mauszellen ebenfalls eine Expression von für Osteoblasten spezifischen Genen wie *ALP*, *Osterix* und *Osteocalcin* nach Reduktion der Methylierung durch Inhibition von DNA-Methyltransferasen und Inhibition der DNA Methylierung mit 5-Aza-Deoxycytidin. Auch Kang et al.[99] konnten eine Korrelation zwischen Promotormethylierung und Expression der knochenspezifischen Gene *Osteocalcin* und *RUNX2* nachweisen.

2.4.6 Demethylierung mit 5-Azacidin

Zur Validierung von gewonnenen Methylierungsdaten wird gerne eine Demethylierung von Zellen in der Zellkultur durchgeführt[58; 99]. Hierbei wird die Expression ausgewählter Gene vor und nach Demethylierung untersucht. 5-Azacidin ist ein Analogon für die Base Cytosin. Bei Aufnahme von 5-Azacidin in die Zelle wird DNA Methylierung vermindert. Zugrunde liegt vermutlich eine Hemmung der *DNMTs*, die durch Bindung mit dem „falschen“ Substrat inaktiviert werden, und zudem ist nach Einbau von 5-Azacidin in die DNA eine Methylierung aufgrund dessen chemischer Struktur nicht mehr möglich. Der Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Schaefer et al. stellten eine Inhibition von *DNMT2*, der RNA-spezifischen *DNMT*, durch 5-Azacidin fest, die möglicherweise auch an der Wirkung der Substanz beteiligt ist[87].

2.5 Differentielle Methylierung

Differentielle Methylierung beschreibt Methylierungsunterschiede zwischen unterschiedlichen Geweben, unterschiedlichem Alter oder zwischen gesundem und krankem Gewebe. Die Regionen, in denen unterschiedliche Methylierungsmuster gefunden werden, werden allgemein „differentiell methylierte Regionen“(DMRs) genannt.

Maegawa et al. untersuchten differentielle DNA Methylierungsmuster in 3 Monate und 35 Monate alten C57BL/6-Mäusen in unterschiedlichen Geweben. Es wurden CpG Inseln von autosomalen Genen in Dünndarmproben und weiteren Geweben untersucht und 12

genomische Regionen mit differentieller Methylierung mit einem größer als zweifachen Methylierungsunterschiede in mehreren Geweben nachgewiesen. In der Lunge wiesen 3 von 11 der genomischen Regionen ähnliche Methylierungsänderungen auf, in der Leber 7 von 11 und in der Milz 6 von 11. Die untersuchten Regionen weisen alters- und gewebsspezifische Methylierungsmuster auf[69].

2.6 Analyse von DNA Methylierung

Als 1948 erstmalig die anormale Base „Epicytosin“ entdeckt wurde, gab es wenige Methoden diese genauer zu analysieren. Heute jedoch gibt es mehrere Möglichkeiten 5-Methylcytosin nachzuweisen. Mit „High-performance Capillar Electrophoresis“ (HPCE) oder „High-performance Liquid Chromatography“ (HPLC) kann man einfach und schnell das gesamtgenomische Vorkommen von 5-Methylcytosin im Verhältnis zu Cytosin bestimmen.

Einen sehr großen Schritt zur Analyse von Methylcytosin stellte die Verwendung des Natrium-Salzes Natriumhydrogensulfit, auch Natriumbisulfit genannt, dar. Natriumbisulfit hat die chemische Formel NaHSO_3 und katalysiert die hydrolytische Desaminierung von Cytosin zu Uracil. 5-Methylcytosin dagegen reagiert nicht mit Natriumbisulfit. Amplifiziert man die durch Bisulfit veränderte DNA nun in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wird das in Uracil umgewandelte Cytosin aufgrund seiner ähnlichen Struktur von der Polymerase als Thymin angesehen und entsprechend vervielfacht. Das unveränderte 5-Methylcytosin dagegen wird als Cytosin vervielfacht. Sequenziert man diese DNA-Fragmente, kann man die resultierenden Sequenzen mit den Originalsequenzen abgleichen und erhält ein C/T-Mismatch für Cytosin und ein C/C-Match Ergebnis für 5-Methylcytosin. Mit der Bisulfit-Sequenzierung kann man einzelne Methylcytosine in ausgewählten Regionen untersuchen. Eine graphische Darstellung dieser Methode zeigt Abbildung 2.3.

Außerdem kann mit Bisulfit-konvertierter DNA auch eine methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) durchgeführt werden. Für diese Methode werden Primerpaare erstellt, die möglichst viele Cs beinhalten. Nun geht man einmal davon aus, dass das Fragment keine Methylcytosine enthält und somit alle Cs in Ts umgewandelt werden und stellt ein Primerpaar passend für diesen Fall her. Es wird nun zusätzlich ein weiteres Primerpaar für den Fall, dass nur Methylcytosine vorhanden sind und somit nach Bisulfit Konversion alle Cs bestehen bleiben, erstellt. Man führt nun mit beiden Primerpaaren und der Bisulfit-konvertierten DNA eine PCR durch. Nun wird analysiert bei welcher der beiden Reaktionen ein Annealing der Primer möglich war und ein Produkt zustande kam. Diese Methode ermöglicht somit auch eine Untersuchung des Methylierungsgrades der Probe[26].

Die sog. Methylight-PCR basiert ebenfalls auf der Konversion von DNA mit Natriumbisulfit. Es werden Primerpaare die einen DNA-Abschnitt abdecken sowie fluoreszenzmarkierte Sonden, die an diesen Abschnitt binden, wenn er jeweils methyliert oder unmethyliert ist, erstellt. Hier erfolgt eine Auswertung mit einer quantitativen PCR[26; 24].

Vor einigen Jahren gab es tiefgreifende Neuerungen auf dem Gebiet der Sequenzie-

rung. Dank technischer Fortschritte wurde die Analyse sehr großer Mengen an DNA-Sequenzen innerhalb kurzer Zeit möglich. Einer der ersten Schritte war die Entwicklung von Microarrays. Microarrays zur Analyse von DNA Methylierung sind Chips, auf denen z.B. bekannte Bisulfit-konvertierte Oligonukleotide in einem bestimmten Raster auf eine Oberfläche aufgebracht werden. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente, die ebenfalls Bisulfit-konvertiert sind, werden auf den Chip aufgebracht. Erfolgt eine Hybridisierung kann die DNA anhand des vorbekannten Rasters zugeordnet werden[89].

Ein großer Entwicklungssprung folgte mit dem sog. „Next Generation Sequencing“ (NGS). Mit den neuen, hochentwickelten Geräten zur parallelen Sequenzierung von Millionen von DNA Abschnitten („High-throughput“-Sequenzierung) wurde die Sequenzierung des gesamten Genoms von Säugetieren innerhalb von wenigen Tagen durchführbar. Dies eröffnete ebenfalls neue Möglichkeiten zum Nachweis von DNA Methylierung. Folgende Methoden zur Analyse von DNA Methylierung werden bereits angewendet:

- Bisulfit Sequenzierung: Bisulfite Seq
- „Reduced Representation Bisulfite Sequencing“: RRBS
- Methyl-DNA Immunoprecipitation: MeDIP Seq (MeDIP Chip)
- „Methyl-Binding Domain“ Protein: MBD Seq (MBD Chip)

Die Bisulfit Sequenzierung ist heutzutage der Goldstandard der Analyse von DNA Methylierung. Sie basiert auf einer Bisulfit-Konversion und anschließender Sequenzierung des gesamten Genoms. Das „Reduced Representation Bisulfite Sequencing“ wird nach demselben Prinzip durchgeführt; allerdings wird hierbei nur ein bestimmter, reduzierter Prozentsatz des Gesamtgenoms analysiert. Diese Methode wurde besonders durch A. Meissner geprägt. Sie ermöglicht eine Methylierungsanalyse der einzelnen Base und ist genomweit einsetzbar[43; 74; 75].

Methyl-DNA-Immunopräzipitation beschreibt die Fällung von 5-Methylcytosinen mit Antikörpern. Nach Fragmentierung der DNA, können die Antikörper-markierten Fragmente mittels Microarray (MeDIP Chip) oder NGS (MeDIP Seq) analysiert werden[26].

Bei der MBD-Chip- und Seq-Methode werden methylierte CpG-Dinukleotide mit MeCP2-ähnlichen Methyl-Bindedomänen-Proteinen gebunden und ebenfalls mittels Microarray oder NGS analysiert.

Diese Verfahren eröffnen eine Vielzahl neuer Möglichkeiten und weisen unterschiedliche Charakteristika auf. Der Goldstandard, die Bisulfit Sequenzierung, ist mit hohen Kosten verbunden und liefert hierfür einen maximalen Durchsatz. Beim MeDIP-Seq und MBD-Seq wird vergleichsweise nur ein geringerer Durchsatz analysiert, wobei bei MeDIP-Seq spezifischer 5-Methylcytosin und beim MBD-Seq spezifischer methylierte CpG-Dinukleotide untersucht werden. Die unterschiedlichen Ansätze unterscheiden sich insgesamt in Kosten, Zeitaufwand und Durchsatz. Ausserdem bringen sie die Herausforderung mit sich sehr umfangreiche Datenmengen zu filtern und auszuwerten[61].

2.7 „Reduced Representation Bisulfite Sequencing“ mit *Msp1*

2009 beschrieben Smith et al. die Methode des „Reduced Representation Bisulfite Sequencing“ (RRBS) mit *Msp1* zum Nachweis genomweiter DNA Methylierungsmuster in CpG-reichen Sequenzen mit einem Illumina Genome Analyzer. RRBS ist eine Form der High-throughput Bisulfite Sequenzierung, bei der nicht das Gesamtgenom, sondern nur ausgewählte Regionen des Genoms sequenziert werden. Das Protokoll zur Sequenzierung besteht insgesamt aus 11 Schritten. Die Analyse der Methylcytosine erfolgt nach dem Prinzip der Bisulfite-Umwandlung bzw. der Bisulfite Sequenzierung. Eine Graphik mit einer Übersicht ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

Beim RRBS wird nach der Präparation der Proben und Isolierung der DNA ein Enzymverdau mit *Msp1* durchgeführt. *Msp1* ist ein Enzym, das die palindromische Sequenz C'CGG schneidet. Der Enzymverdau ermöglicht die Anreicherung von CpG-reichen Fragmenten. Theoretisch kann man bei einer Analyse der 333 104 Fragmente mit einer Länge von 40 bis 220 Basenpaaren des Mausgenoms bei einer Leselänge von 100 Basenpaaren insgesamt 1 506 712 CpG-Dinukleotide abdecken. Dies sind 7% aller CpGs, jedoch werden hierbei 13 883 CpG Inseln und damit 87% aller CpG Inseln erfasst. Nach *Msp1*-Verdau wird die Anreicherung von CpG Inseln technisch durch eine Größenselektion („Size Selection“) durchgeführt. Bei der „Size Selection“ führt man eine Gelelektrophorese mit einem Agarosegel durch, auf das ein Marker und die Proben aufgetragen werden. Anschließend wird der Marker mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht und parallel zu den Banden des Markers die Fragmente der gewünschten Länge aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Ausserdem erfolgt eine Reparatur der Fragmentenden und einer anschließenden Ligation von Adaptern, die für die Sequenzierung mit dem Illumina GA benötigt werden. Diese kann vor oder nach der Größenselektion im Protokoll angesiedelt werden. Nun erfolgt die Konversion der nicht-methylierten Cytosine zu Uracil mit Natriumbisulfite. Nach der Bisulfite-Konversion erfolgt die Amplifikation der Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einer Polymerase, die Uracil analog zu Thymin vervielfacht. Ein Aliquot wird nun auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels Elektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. In diesem Schritt wird die Qualität der Probe überprüft. Ist die Qualität zufriedenstellend folgt die Sequenzierung. Die Auswertung der DNA Methylierungsmuster erfolgt durch das Mapping, dem Zuordnen des Fragments zum korrespondierenden Abschnitt des Referenzgenoms, und dem Abgleich zwischen Cytosinbasen im Referenzgenom mit den erhaltenen methylierten oder durch Bisulfite umgewandelten nicht-methylierten Cytosinbasen[91].

3 Zielstellung

DNA Methylierung ist eine epigenetische Veränderung, deren große biologische Relevanz vor allem durch den direkten Einfluss auf die Genexpression bereits gut bekannt ist. Mehrere Gewebe wurden bereits genomweit auf DNA Methylierung untersucht[110]. Beim Knochen jedoch hat bisher nur die Analyse einzelner Promotorregionen stattgefunden.

Es wird heutzutage angenommen, dass Methylierungsmuster gewebespezifisch sind und eine Rolle bei der Differenzierung der Zellen spielen. Ebenso ist eine Veränderung der Methylierungsmuster im Verlauf von Entwicklung und Alterung bekannt.

Das Ziel dieser Dissertation ist die Annäherung an oder die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- DNA Methylierung hat über die Modulation der Genexpression einen bedeutenden Einfluss auf Entwicklung, Alterung und Stoffwechselfvorgänge. Für einige Gewebe wurden bereits mit NGS genomweite DNA Methylierungsmuster, sogen. Methylo-me, erstellt. Wir wollen hiermit das erste Methylo-m für das Gewebe Knochen der Maus erstellen[31].
- Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Knochengewebe, den Lamellen- und Geflechtknochen. Eine Untersuchung der beiden unterschiedlichen Knochengewebe verspricht eine bessere Einschätzung der Bedeutung von DNA Methylierungsmustern in Entstehung bzw. Differenzierung zu diesen Knochenarten geben. Möglicherweise lassen sich Assoziationen zwischen bestimmten Methylierungsmustern oder der Hypo- und Hypermethylierung einzelner Promotorregionen und jeweiliger Gewebeatart finden.
- Im Verlauf von Entwicklung und Alterung verändert sich das Knochengewebe. Mit der Alterung tritt eine verminderte Knochenbildung auf. In mehreren klinischen Studien wurde eine Zunahme der Konzentration des zirkulierenden Proteins Sclerostin, das mit einer Verminderung der Knochenbildung assoziiert ist, untersucht. Das Osteoporosemedikament Teriparatide bewirkt eine Verminderung der Sclerostinexpression[11]. Ebenso bestehen weitere Assoziationen zwischen der Alterung und Veränderung von weiteren Schlüsselsignalwegen[85]. Unser Interesse gilt hierbei mögliche Regulationsmechanismen dieser Signalwege durch DNA Methylierung in der Knochenalterung sowie auch in der Bildung der unterschiedlichen Knochenarten zu untersuchen.
- Ein klinisch bedeutsamer Aspekt ist die Erforschung von möglichen Ansatzpunkten, welche die Knochenbildung aktivieren oder verstärken. Die medikamentöse Verbesserung der Knochenbildung ist hochrelevant für eine Beschleunigung der Heilung nach unfallchirurgischen bzw. orthopädischen Operationen, Frakturheilung und zur Steigerung der Knochendichte bei Osteoporose.

Die Untersuchung der DNA-Promotormethylierung soll nun erstmals genomweit erfolgen. In einem zeitlich klar begrenzten Rahmen ist dies ausschließlich mit der Verwendung von NGS durchführbar. Wir wollen diesen neuen, sich in großer Geschwindigkeit weiterentwickelnden Fachbereich nutzen, um differentielle Methylierung im Knochen innerhalb dieses Projekts genomweit zu analysieren. Wir wählen das „Reduced Representation Bisulfite Sequencing“-Protokoll mit *Msp1* aus. Dieses Protokoll nutzt NGS und bietet einen sehr hohen Durchsatz, reduziert jedoch die Menge an DNA-Fragmenten, die sequenziert werden, und bedeutet somit bei Fokussierung auf relevante Promotorregionen eine immense Einsparung von Kosten bei den 2010 noch sehr teuren NGS-Methoden. Ein Nachteil von RRBS ist der hohe DNA-Verlust bei der Größenselektion und Aufreinigung aus dem Agarosegel. Um das Protokoll auch für Gewebe wie Mausknöchel, bei dem die Gewinnung von großen Mengen an DNA erschwert ist, nutzbar zu machen, wird eine Optimierung des Protokolls durchgeführt.

Wir untersuchen, ob die Methode RRBS zur Identifikation differentieller Methylierung für unsere und ähnliche Fragestellungen gut geeignet ist.

Nach Identifizierung von Genregionen, die differentielle Methylierung aufweisen, soll eine Validierung erfolgen. Wir planen hierfür den Einsatz von „Ultradeep Bisulfite Sequencing“, einer Methode die ebenfalls zum NGS zählt und mittels spezifischen Sequenzierprimern die gewünschte DNA-Region tief analysiert. Da diese sehr valide Bestätigung der identifizierten differentiell methylierten Regionen (DMRs) nicht erfolgreich durchführbar ist, wird alternativ ein vergleichender *Msp1-Hpa2*-Verdau und eine technische Validierung der DMRs durch Demethylierung von Osteoblasten-DNA durchgeführt. Die Osteoblasten werden mit stufenweise zunehmenden Konzentrationen 5-Azacytidin behandelt und anschließend die abnehmende DNA Methylierung durch einen methylierungsspezifischen Enzymverdau nachgewiesen sowie die korrelierende Veränderung der Expression der Gene analysiert.

Im weiteren wird die biologische Relevanz der Methylierungsunterschiede in unterschiedlichem sowie zeitlich unterschiedlich entwickeltem Gewebe weiter untersucht. Bisherige Publikationen, die DNA-Promotormethylierung im Knochen untersuchten, konnten bei einigen Genen eine Auswirkung von Veränderungen der DNA Methylierung auf die Expression zeigen, bei anderen Genen dagegen blieb die Expression unverändert[99; 58]. Aus diesem Grund wird eine Korrelation zwischen DNA Methylierung und Expression der DMR-zugehörigen Gene mittels RT-PCR geprüft.

Der letzte Abschnitt des Projekts soll die Auswirkung der neu identifizierten Regionen mit differentieller Methylierung auf den Knochenstoffwechsel und die Knochenmineralisierung besser beleuchten. Wir führen eine Behandlung osteogener Zelllinien sowie pCOBs mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin im Zellkulturlabor durch. Wir untersuchen abschließend die Auswirkung der Demethylierung der Osteoblasten nach unterschiedlicher Ausdifferenzierung auf die Expression (mittels RT-PCR) und das Mineralisierungsverhalten der Zellen (mittels Alizarin Rot-Färbung).

4 Material und Methoden

4.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi.

4.1.1 Proben/ Gewebe

- primäre Osteoblastenzellen (pCOBs) aus C57BL/6-Mäusen
- Calvariae von C57BL/6-Mäusen im Alter von 1-4 Tagen
- Femora von C57BL/6-Mäusen im Alter von 10 Tagen
- Calvariae von C57BL/6-Mäusen im Alter von 10 Tagen
- Femora von C57BL/6-Mäusen im Alter von 13 Wochen
- Calvariae von C57BL/6-Mäusen im Alter von 13 Wochen
- MC3T3-E1 subclone4 Zellen
- HEK Zellen

Die Tötung der C57BL/6-Mäuse erfolgte nach dem Beschluss T 0438/08 des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin vom 08.01.2009.

4.1.2 Chemikalien, Puffer und andere Reagenzien

Chemikalien

- Agarose SERVA for DNA electrophoresis -SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- Ethanol
- Isopropanol
- Wasser „Baker HPLC analyzed“ -J.T.Baker Chemical Company, Phillipsburg, New Jersey

Puffer

- Ladepuffer für Agarosegel (blau/orange; 6x) -Promega, Madison, Wisconsin
- Fast Digest-Enzympuffer -Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- NEBNext End Repair Reaction Buffer -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
- NEBNext dA-Tailing Reaction Buffer -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
- Ligation Buffer -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main

- ZymoTaq-Polymerase Reaction Buffer -Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau
- Elution Buffer -Qiagen, Hilden und Stratec Molecular GmbH, Berlin (vormals Invitex)
- TAE Puffer

Andere Reagenzien

- Ethidiumbromid
- Magnesiumchlorid
- HCl

4.1.3 Enzyme

- textitMsp1 Fast Digest -Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- NEBNext End Repair Enzyme Mix -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
- Klenow Fragment (3'→5'exo-) -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
- T4-DNA-Ligase -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
- ZymoTaq-Polymerase -Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau

4.1.4 Oligonukleotide

Primer

- PE(paired end)-Primer forward -Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg
- PE(paired end)-Primer reverse -Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg
- mit Primer3 hergestellte Primer -Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg
- Primer für die RT-PCR -Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg

Adapter

- Early Access Methylation Adapter Oligo -Illumina, San Diego, Kalifornien
- DNA Marker
- 50 bp DNA Ladder -Jena Bioscience, Jena

Mononukleotide

- dNTP-Mix
- 5-Azacytidin

4.1.5 Kits

- GeneMATRIX Universal DNA/RNA/Protein purification Kit -Roboklon GmbH, Berlin
- MSBVario Cleanup Kit -Stratec Molecular GmbH, Berlin (vormals Invitex)

- NEBNext DNA Sample Prep Master Mix Set 1 -New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
- Invisorb Spin DNA Extraction Kit -Stratec Molecular GmbH, Berlin (vormals Invitex)
- EpiTect Bisulfite Kit -Qiagen, Hilden
- Universal Methylated Mouse DNA Standard & Control Primers -Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau
- DNA Methylation Gold Kit -Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

- 50 µl- und 1,5 ml-Plastikgefäße von Eppendorf AG, Hamburg
- 10 ml- und 50 ml-Plastikröhrchen
- Eis
- Trockeneis
- Kulturflaschen
- Röhrchen
- Gefäße
- Pipettenspitzen

4.1.7 Geräte

- PCR-Geräte (Thermocycler)
- Wasserbad in Kühlraum
- Applied Biosystems (ABI) Sequenzierer
- Illumina GAIIx
- RT-PCR-Gerät ABI 7900
- Gelkammer für Agarosegele
- Vakuumtrockner
- Zentrifugen
- Heizblock
- Pipetten
- Schüttler
- UV-Transluminator
- Vortex-Gerät
- Stromversorgungsgeräte

4.1.8 Datenbanken und Software

- Primer 3
- Methprimer
- Novoalign
- Ensembl Genome Browser
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)
- UCSC Genome Browser

4.1.9 Zellkultur

Allgemein

- 6-, 12-, 24- und 96-Loch-Mikrotiterplatten
- Trizol
- Trypsin
- PBS
- P/S: Penicillin und Streptomycin
- Natriumpyruvat 100 mM -Biochrom GmbH, Berlin
- Ultraglutamine 1 200 mM in 0,85 % NaCl -Lonza Group, Basel
- FBS -Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
- Vollmedium Osteoblasten: alpha-MEM mit 10% FBS, 1% P/S, 1% Ultraglutamine 1, 1% Pyruvat)
- Stimulationsmedium für Osteoblasten: Vollmedium Osteoblasten plus Vitamin C und β -Glycerolphosphat[30]

Essays

- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)
- HCl
- Alizarin Rot
- ALP1-Puffer

Verbrauchsmaterialien

- 50 μ l- und 1,5 ml-Plastikgefäße von Eppendorf AG, Hamburg
- 10 ml- und 50 ml-Plastikröhrchen
- Pipetten
- Eis
- Trockeneis
- Schüttler

Geräte

- Plattenlesegerät (Mithras LB 940 Multimode Reader) - Berthold Technologies, Bad Wildbad
- Brutschrank bei 37 °C
- Schüttler

4.2 Methoden

4.2.1 Präparation genomischer DNA aus C57BL/6-Mäusen

Aus fünf 10 Tage und fünf 13 Wochen alten C57BL/6-Mäusen werden Calvariae und Femora präpariert und in 5 ml PBS Dulbecco aufgenommen. Zur vollständigen Ent-

fernung von anhaftenden Bindegewebsresten wie Muskelgewebe wird anschließend ein Collagenase-Verdau (5U/ml) über 30 Minuten bei 37 °C im Schüttler durchgeführt. Danach werden die Proben in Flüssigstickstoff schockgefroren und mittels Stösel pulverisiert. Genomische DNA wird über Säulenreinigung mithilfe des EURx-Kit (Roboklon) gewonnen.

Die DNA Konzentration wird mit dem Photometer gemessen und anhand der Ergebnisse ein Pool mit 4 µg DNA mit gleichen Anteilen jeder Probe gebildet. Man erhält somit zwei Pools aus DNA von fünf neonatalen und fünf adulten Calvariae sowie zwei weitere von fünf neonatalen und fünf adulten Femora.

4.2.2 „Reduced Representation Bisulfite Sequencing“

Bei der RRBS mit *Msp1* wird genomische DNA enzymatisch verdaut und durch Größen-selektion eine Anreicherung von Promotorregionen erzielt. Die einzelnen Schritte werden im folgenden ausführlicher beschrieben.

Enzymverdau mit *Msp1*

In einem ersten Schritt werden die Proben mit der Endonuklease *Msp1* bei 37 °C über 4 Stunden verdaut.

Reaktionsansatz:

- 4 µg DNA (= x µl DNA)
- 6 µl *Msp1* Fast Digest (von fermentas)
- 8 µl durchsichtigen Fast Digest-Puffer
- 66 -x µl HPLC-H₂O

Reparatur der Enden

Daraufhin folgt ein „End repair“-Schritt, durch den die Enden der doppelsträngigen DNA-Fragmente aufgefüllt und phosphoryliert werden. Anschließend werden Adenosin-Nukleotide (polyA) angehängt, um die Ligation mit den Adaptern, die mit Thymin enden, zu ermöglichen.

Wir verwenden hierzu das EndRepair Enzym Mix mit Puffer, eine Klenow-Polymerase(3' → 5' exo) und dATailing-Puffer von NEB und verfahren nach dem Protokoll des Herstellers.

Adapter Ligation

Wir verwenden die Early Access Methylation Adapter Oligos (Illumina), die gut für Methylierungsanalysen mit Bisulfid geeignet sind, da die Cytosine der Adaptern methyliert sind und somit nicht desaminiert werden können. Ligiert wird mit dem Enzym *T4 DNA Ligase* über Nacht bei 16 °C im Wasserbad.

Reaktionsansatz:

- 20 µl DNA
- 3 µl *T4 DNA Ligase* (NEB)

- 6 µl Ligation Buffer (5x)
- 2 µl Early Access Methylation Adapter Oligos (1:1-Verdünnung)

Selektion der DNA Fragmente nach Länge

Zur Selektion der gewünschten DNA-Fragmente werden die Proben auf ein 2,5%iges TAE-Gel aufgetragen und über 50 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt. Die erste Spur, auf welche der 50bp-Marker aufgetragen wird, wird mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Proben werden nicht angefärbt, um eine Verunreinigung durch Farbstoffe und Veränderung durch Bestrahlung mit UV-Licht zu vermeiden. Anschließend wird die erste Spur mit einem Skalpel abgetrennt und unter UV-Licht die Banden für 150, 250 und 350 Basenpaare mit einer Pipettenspitze markiert. Die Spur wird darauf wieder an das Gel gelegt und parallel zu den Markierungen 150 bis 250 und 250 bis 350 Basenpaare ausgeschnitten. Die Proben werden mithilfe des DNA Extraction Kits (Invitex) über ein Säulensystem gereinigt und mit 22 µl Elution Buffer eluiert.

Analytische Polymerase Ketten Reaktion

Um zu überprüfen, ob der *Msp1*-Verdau und die Selektion der Fragmentlängen erfolgreich war und die Qualität der DNA gut genug für die weiteren Analysen ist, wird eine Polymerase Ketten Reaktion mit dem nachfolgenden Reaktionsansatz durchgeführt. Verwendet werden paired end (PE)-Primer mit Sequenzen analog der Adaptersequenzen und die *ZymoTaq-Polymerase*.

Reaktionsansatz:

- 2 µl Aliquot der jeweiligen Probe
- 0,4 µl *ZymoTaq-Polymerase*
- 10 µl Puffer (2x)
- 2 µl PE-Primer-Mix (MWG)
- 0,5 µl dNTP-Mix
- 5,1 µl HPLC-Wasser

Das Thermocycler Programm besteht aus 6 Schritten:

1. 95 °C: 10 Min.
2. 95 °C: 30 Sek.
3. 68 °C: 40 Sek.
4. 72 °C: 60 Sek.
5. Schritte 2.-4. 34mal wiederholen
6. 72 °C: 7 Min.

Die Produkte werden auf ein 2,5%iges TAE-Gel, das mit Ethidiumbromid gefärbt ist, aufgetragen und mit einem Transluminator (mit UV-Licht) sichtbar gemacht.

Bisulfit Konversion

Eine Möglichkeit 5-Methylcytosin nachzuweisen ist eine Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit. Natriumbisulfit desaminiert Cytosin zu Uracil und hat keine verändernde Wirkung auf Methylcytosin. Die Bisulfit Konversion wird mit dem EpiTect-Kit von Qiagen durchgeführt, das eine Umwandlungssicherheit von ca. 99% aufweist. Die Proben werden mit einem Bisulfit Mix (Quiagen) gemischt und anschließend beim Durchlaufen vom folgendem Thermocyclerprogramm umgewandelt. Dieses Thermocyclerprogramm ist eine von Smith et al.[91] beschriebene Optimierung des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls, das eine ca. 99,8%ige Umwandlungssicherheit aufweist:

1. 99 °C: 5 Min.
2. 60 °C: 25 Min.
3. 99 °C: 5 Min.
4. 60 °C: 85 Min.
5. 99 °C: 5 Min.
6. 60 °C: 175 Min.
7. 95 °C: 5 Min.
8. 60 °C: 90 Min.
9. Schritt 7.-8. 6mal wiederholen
10. 20 °C: unendlich

Hierbei wird die Probe denaturiert und liegt nun als Einzelstrang-DNA vor. Die Proben werden anschließend mit 2x 20µl eluiert.

Amplifikation

Im folgenden Schritt werden die Proben mittels PCR amplifiziert. Wir verwenden hierbei die *ZymoTaq-Polymerase*, die Uracil-insensitiv ist und Uracil aufgrund der ähnlichen Struktur wie Thymin behandelt. Reaktionsansatz:

- 2 µl Aliquot der jeweiligen Probe
- 0,4 µl *ZymoTaq-Polymerase*
- 10 µl Puffer (2x)
- 2 µl PE-Primer-Mix
- 0,5 µl dNTP-Mix
- 5,1 µl HPLC-Wasser

Das Thermocycler Programm besteht aus 6 Schritten:

1. 95 Grad C: 10 Min.
2. 95 Grad C: 30 Sek.
3. 68 Grad C: 40 Sek.
4. 72 Grad C: 60 Sek.
5. Schritte 2.-4. 34mal wiederholen
6. 72 Grad C: 7 Min.

Sequenzierung der Bisulfit-Proben

Die neonatalen Calvariae Proben mit Fragmenten der Länge 150 -250 und 250 -350 Basenpaaren sowie die Proben der adulten Calvariae mit den entsprechenden Fragmentlängen werden gepoolt. Darauf erfolgt eine Verdünnung und anschließend wird die Sequenzierung mit Illumina GAIIx durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer Vervielfältigung der DNA durch „Bridgeamplification“.

4.2.3 Validierung der Umwandlungssicherheit mit Bisulfit

Die Umwandlungssicherheit des von uns verwendeten Bisulfit Kits sowie dem angewandten elongierten Protokoll im Thermocycler wurde mit dem „Universal Methylated Mouse DNA Standard & Control Primers“ Kit von Zymoreasearch überprüft. Das Prinzip des Kits ist die Bisulfit Behandlung der Maus Standard DNA, bei der alle CpGs methyliert sind. Nach der Behandlung mit Bisulfit wird eine PCR mit den ebenfalls im Kit enthaltenen Primern (*mMLH1* Primer) durchgeführt und anschließend das Produkt sequenziert. Das Amplikon ist 304 Basenpaare lang. Die Umwandlungssicherheit der einzelnen Cytosine kann nun durch den Vergleich mit dem schon vorbekannten Methylierungsgrad vorgenommen werden. Wir verfahren bei Anwendung des Kits nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers.

4.2.4 Optimierung des Enzymverdaus mit *Msp1*

Der Enzymverdaus mit *Msp1* unter den Vorgaben des Herstellers war nur unvollständig möglich. Ein vollständiger Enzymverdaus ist wesentlich für die Qualität der RRBS-Methode. Aus diesem Grund wurde das Protokoll hierfür optimiert. Die DNA-Proben wurden mit unterschiedlicher Menge an Enzym (1µl, 2µl, 4µl) und über unterschiedlich lange Zeit (1h, 2h, 4h, 5h, 6h) im Heizblock bei 37 °C inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdaus wird visuell über das Auftragen auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid, die Auftrennung mittels Elektrophorese und Darstellung im Transluminator beurteilt. Die DNA-Proben konnten mit einer Erhöhung der Enzymmenge auf 2 µl/ 1 µg DNA und einer Verlängerung der Inkubationszeit des Enzymverdaus auf 4 Stunden bei 37 °C optimiert werden.

4.2.5 Auswertung der RRBS-Datensätze

Die bioinformatische Auswertung wurde mit der Software Novoalign und einem Script der AG Robinson, Medizinische Genetik Charité Berlin durchgeführt.

4.3 Validierung der TDMs

4.3.1 Validierung der TDMs mit „Ultradeep Bisulfite“ Sequenzierung

Eine Validierung der erhobenen Methylierungsdaten möchten wir mit Ultradeep Bisulfit Sequenzierung einzelner ausgewählter Regionen durchführen. Hierzu werden Primer mit

der online verfügbaren Software von MethPrimer [60] für ausgewählte Regionen hergestellt. Es wurde erneut DNA mit Bisulfit umgewandelt und über Gradientenbestimmung (PCR-Reaktionsansätze mit unterschiedlicher Annealingtemperaturen) versucht, die optimalen Bedingungen für die Sequenzierungsreaktion zu untersuchen. Im weiteren wurden verschiedene Polymerasen für diese Versuche verwendet sowie die Konzentration an dNTPs und Pufferzusammensetzung variiert.

Bisulfit-PCR

Zur geplanten Validierung der Ergebnisse mit Ultradeep Bisulfit Sequenzierung werden die Primer im Thermocycler inkubiert.

Es wurden folgende Primerpaare verwendet:

- *RUNX2* F: ATTATTGGGAATTGATAGGATGTTG
- *RUNX2* R: AACATTTTCATCCCTCACTAAAAAC

- *Col9a3* F: GTTTTAGTTTTGTTGTTGTTGGG
- *Col9a3* R: TAAAAAACTACCACAAATATCCTC

- *Lmx1b* F: GAAGAGTATAGTTAATAATGGGAGTT
- *Lmx1b* R: CTTAACAATTTTTAATCATTTTATCTCTAT

- *Nr2f2* F: ATATGGAGGGGTATGGAGTATTG
- *Nr2f2* R: AAAACCCCTCAACTACCACT

- *Nr4a2* F: GTTTGGTTAATTGAATATTTTTTTT
- *Nr4a2* R: TCAACAACCTTCCAACCTCTAAATC

- *Sept9* F: TTAAAAGGGAATAGTTAGATTTTAG
- *Sept9* R1: CATTATCTCTACCACACAAAAAAA
- *Sept9* R2: AACTACCTACTTAACCCACAATACC

- *Speg* F: GTTAATTAGGAGTAGAGTTATTTAGGAGTG
- *Speg* R: CCAAATTTAAACAAAACAAAATC

- *Tsc22d3* F: ATTTAGTTTGGTTGTTTTTTTTATG
- *Tsc22d3* R: CAAACTAACCCCTATATATACCCTTTC

- *Ube2e1* F: TTTTTATTTTTGTTAGATTAGGGAT
- *Ube2e1* R: CCAACACTTCCAAAACACTACTC

- *Zfp316* F: TTTTTATTTTTGTTAGATTAGGGAT
- *Zfp316* R: CCAACACTTCCAAAACACTACTC

- *Ankrd6* F: GTGAGGTTATGAAGGGAATTGT
- *Ankrd6* R: ATAAACACTAAATACTAAACACCCC

- *Pde9a* F: GAGGTTTGAGGTTTGTATTTTTTTG
- *Pde9a* R: ACTAACCCCTACCTTAACCAACCACT

- *Evi5* F: AATTTTATTATTTTTTGATTAATTGTTATTT
- *Evi5* R: TCTTCTTCTAAAACCTTAACCTCTAC

- *Scml4* F: TTAAAAGTTTTTTTGTGGGTTGTAGT
- *Scml4* R: AAAACCCACCAACCTAACATA

- *Col7a1* F: TTAGGGGGAGATAGGGAAGTTAG
- *Col7a1* R: CTAAACACAAAACCTCCATCACAAAC

Es werden DNA Proben aus HEK-Zellen gewonnen und anschließend mit Bisulfit konvertiert.

Es werden Master Mixe hergestellt und mit variierenden Parametern analog zum Protokoll, das in Kapitel 4.2.2 beschrieben wird, im Thermocycler inkubiert.

Um die Annealingtemperatur mit einer möglichst guten Reaktion zu untersuchen, wurden die Protokolle als Gradient durchgeführt d.h. mit mehreren identischen Probenansätzen und unterschiedlichen Annealingtemperaturen wie beispielsweise 58,7 °C, 59,6 °C, 60,5 °C, 61,4 °C, 62,3 °C und 63,3 °C bei den *DAPK1*-Primerpaar, deren chemisch bedingte Annealingtemperatur bei 59 °C liegt. Auch wurden Versuche mit einem sogenannten „touch down“ durchgeführt, bei dem beispielsweise 8 Zyklen dem Protokoll vorgeschaltet werden, bei denen die Annealingtemperatur des ersten Zyklus höher als der theoretisch erwartete Wert eingestellt wird und mit jedem Zyklus z.B. um 0,5 °C reduziert wird. Diese Variation soll die Bildung eines ersten Produktes verstärkt anregen.

Ebenso wird die Zusammensetzung des Mastermix variiert und Versuche mit bereits vorgefertigtem sowie mit selbst zusammengestelltem Puffer für ein Mastermix mit 2mM und 4mM MgCl₂ Konzentration durchgeführt.

Außerdem werden zusätzlich unterschiedliche Polymerasen verwendet, ebenfalls mit dem Ziel eine gute Polymerasekettenreaktion zu erzielen. Wir führen Versuche mit der *PfuTurbo C Hotstart Polymerase*, *Fusion Hotstart Polymerase*, *Ampli Taq Polymerase* und *Ampli Taq Gold Polymerase* durch.

Eine Verlängerung der Elongationszeit, die theoretisch für besonders lange Fragmente notwendig wäre, auf bis zu 90 Sekunden, wurde ebenfalls zu einer möglichen Optimierung getestet.

Da eine Vervielfachung der mit Bisulfit behandelten DNA und den mit MethPrimer hergestellten Primern nicht erreicht werden konnte, entfallen die weiteren Schritte zum „Ultradeep Bisulfite Sequencing“.

4.3.2 Alternative Validierung der TDMs mit *Msp1-Hpa2*-Verdau

Erneut werden Calvariae von jeweils 3 weiblichen C57/BL6-Mäuse im Alter von P0, P10 und P10 Wochen analog zu den Vorversuchen präpariert. Die jeweils 3 Calvariae werden mit Flüssigstickstoff schockgefroren, gepoolt, gepottert und anschließend in 2 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt, um DNA und RNA analysieren zu können.

Die DNA der Proben wurde extrahiert und anschließend jeweils 2 Aliquots mit jeweils 300 ng DNA der unterschiedlich reifen Proben mit *Msp1* und *Hpa2* verdaut.

Beispielhaft für Probe P0:

30 µl-Reaktionsansatz für *Msp1*:

- x Aliquot 1 der Probe P0 (entsprechend 300 ng DNA)
- 25-x µl H₂O
- 2 µl *Msp1* Fast Digest
- 3 µl 10x Fast Digest Buffer

Es folgt die Inkubation über 2 h bei 37 Grad C im Heizblock.

30 µl-Reaktionsansatz für *Hpa2*:

- x Aliquot 2 der Probe P0 (entsprechend 300 ng DNA)
- 25,5-x µl H₂O
- 1,5 µl *Hpa2* Fast Digest
- 3 µl 10x Fast Digest Buffer

Es folgt die Inkubation über 1h bei 37 °C im Heizblock.

Nach Inkubation werden 10 µl der Proben auf ein 0,8%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen, bei 120 Volt für 30 Minuten und im Transluminator die Bandenmuster dargestellt.

Optimierung des *Msp1-Hpa2*-Enzymverdau

Zur Optimierung des Enzymverdau wurden unterschiedliche DNA-Mengen analog in 30 µl Reaktionsansätzen verdaut und ein Vergleich der Banden unter denselben Bedingungen mittels Gelelektrophorese vorgenommen. Der Verdau wurde mit je 200 ng, 500 ng und 1 µg DNA durchgeführt. Eine optimale Vergleichbarkeit wurde bei ca. 300 ng erreicht.

4.3.3 Expression der TDM zugehörigen Gene

Die RNA, der jeweils 3 weiblichen C57/BL6-Mäuse im Alter von P0, P10 und P10 Wochen wird mit Trizol nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Folgende Primer werden hierfür mit Primer3[98; 53] hergestellt:

- *Arrb2*: LEFT PRIMER: AGACACCAACCTGGCTTCC, RIGHT PRIMER: ACCACCAGCTTCACCTTGAC (Produktgröße: 99)
- *Axud1*: LEFT PRIMER: AGAAGCTGGAGATGCTGAGG, RIGHT PRIMER: CCTCCTCTACAGAGGCGTCA (Produktgröße: 108)
- *Ccnd2*: LEFT PRIMER: GGAGAAGCTGTCCCTGATCC, RIGHT PRIMER: TTCAGTTGCAATCATCGAC (Produktgröße: 104)
- *Efnb1*: LEFT PRIMER: AAATCCGCTTCACCATCAAG, RIGHT PRIMER: CTC CAGTCCCTCCAAGCTC (Produktgröße: 119)
- *Fgfr2*: LEFT PRIMER: TCCGAGTATGAGTTGCCAGA, RIGHT PRIMER: GACTACTTGCCCGAAGCAAC (Produktgröße: 99)

- *Ghrhr*: LEFT PRIMER: CCTACACACACGGGCTCAGT, RIGHT PRIMER: GCACTGT-CAGGCAGGAAGTT (Produktgröße: 105)
- *Nov*: LEFT PRIMER: CCAACAACCAGACTGGCATT, RIGHT PRIMER: TT-CGGCTCAAACCTTCTCTCC (Produktgröße: 94)
- *Phex*: LEFT PRIMER: TGCACTCCCATATGTTGTGG, RIGHT PRIMER: CT-CCAGCATGTCAATGAAGG (Produktgröße: 118)
- *Pitx2*: LEFT PRIMER: CGTGTGGACCAACCTTACG, RIGHT PRIMER: AAG-CCATTCTTGCACAGCTC (Produktgröße: 111)

4.4 Zellkulturversuche

4.4.1 Behandlung mit 5-Azacidin

Zur Untersuchung der Bedeutung von DNA Methylierung für Osteoblasten sowie einer technischen Validierung einer Auswirkung von Veränderungen des DNA Methylierungsmusters auf den Osteoblastenstoffwechsel werden MC3T3-E1 subclone4(MC4)-Zellen, einer mineralisierenden Osteoblasten Zelllinie, und native Osteoblasten aus neonatalen Calvariae von C57/BL6-Mäusen mit 5-Azacytidin, einem demethylierenden Agens, behandelt.

Behandlung von MC3T3-E1 subclone4 Zellen mit 5-Azacidin

Ein Stock mit MC3T3-E1 subclone4 Zellen wurde in Osteoblasten-Vollmedium aufgenommen, über mehrere Passagen vermehrt und anschließend in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Platten werden bis zu einer Konfluenz von 50% im Brutschrank inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacytidin über 24 h im Brutschrank behandelt. Danach werden die Zellen 2 mal mit PBS gespült, mit frischem Medium benetzt und über 3 Tage weiter inkubiert. Um die Toxizität von 5-Azacytidin zu untersuchen, wird die Vitalität und die noch vorhandene DNA-Menge der Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacytidin gemessen. Der pH-Wert des Mediums wurde durch die Zugabe von 5-Azacytidin nicht verändert. Dies wurde mit pH-Wert-Teststreifen belegt.

Vitalität nach 5-Azacidin Behandlung

Mit einem MTT-Essay wird die Vitalität der Zellen untersucht. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird von mitochondrialen Dehydrogenasen, die Rückschlüsse auf die Vitalität und Zellzahl zulassen, zu Formazan umgesetzt. Formazan kann mit Isopropanol mit 0,04 N HCl gelöst werden und im Plattenlesegerät bei einer Lochenlänge von =570nm gemessen werden.

Wir verfahren nach folgendem Protokoll:

- Abziehen des Mediums
- Zugabe von 200 µl Lösung aus frischem Medium und MTT-Lösung (5mg/ml) im Verhältnis 1:9

- Inkubation bei 37 °C für ca. 2 Stunden
- Abziehen des Mediums
- Zugabe von 100 µl Isopropanol mit 0,04 N HCl
- Lösung der Kristalle durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Pipette
- Messung im Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm gegen eine Referenzwellenlänge von $\lambda = 690$ nm

Es werden die Auswirkungen der Konzentrationen von 0, 5, 10, 15, 20 und 40 µM 5-Azacidin nach 4, 5, 7 und 8 Tagen auf die Vitalität der Zellen untersucht. Zusätzlich werden MTT-Essays von Zellen, die mit 0, 1, 2, 3, 4 und 5 µM 5-Azacidin inkubiert wurden, nach 7 Tagen angefertigt.

DNA-Menge nach 5-Azacidin Behandlung

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkung von 5-Azacidin auf die Zellzahl wird die vorhandene DNA-Menge von identischen 24-Loch-Platten mit MC4-Zellen mit einem „Pico Green“-Essay bestimmt. Die Zielsetzung ist eine bessere Interpretation der MTT-Essays zu ermöglichen, die nicht nur von der Vitalität sondern auch von der Zellzahl abhängig ist.

- Abziehen des Mediums
- Zugabe von 35 µl *ALP1*-Puffer/Well
- Messung im Plattenlesegerät

4.4.2 Validierung mit 5-Azacidin

Es werden weitere 12-Loch-Platten mit MC3T3-E1 subclone4 Zellen ausgesät und analog inkubiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin behandelt. Es werden jeweils 3 identische solcher Platten ausgesät, um die DNA Methylierung, Expression und Mineralisierung der Zellen zu analysieren. Dieser Versuchsaufbau wird in Triplets angesetzt.

DNA Methylierung

Um die Veränderung der DNA Methylierung darzustellen wird die DNA der behandelten Zellen extrahiert und anschließend ein *Hpa2-Msp1*-Verdau durchgeführt.

Expression

Aus den Proben wird nun die RNA extrahiert. Die Untersuchung der Expression einzelner Gene wird mittels qPCR durchgeführt.

4.4.3 Behandlung von nativen Osteoblastenzellen mit 5-Azacidin

Es werden nun native Osteoblastenzellen aus neonatalen C57/BL6-Mauscalvariae (pCOBs) gewonnen und direkt in 12-Well-Platten ausgesät. Die Platten werden ebenfalls bis zur

einer 50%igen Konfluenz im Brutschrank bei 37 °C in Stimulationsmedium für Osteoblasten inkubiert und anschließend mit 0,2, mit 0,4 und mit 0,8 µM 5-Azacytidin über 24 Stunden behandelt, das Medium gewechselt und über 3 Tage weiter inkubiert.

Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der Auswirkung der Demethylierung durch 5-Azacytidin auf die nativen Osteoblastenzellen erfolgt analog zum Versuchsaufbau zur technischen Validierung mit 5-Azacytidin. Es werden Konzentrationen von 0, 0,2, 0,4 und 0,8 µM 5-Azacytidin verwendet und nach 7 Tagen analysiert. Ausserdem wurde ein Well am Tag 0 untersucht.

4.4.4 Differenzierung von pCOBs

Die Differenzierung der pCOBs wird nach der Publikation von Grünhagen et al.[30] durchgeführt. pCOBs werden auf 12-Wellplatten ausgesät und über 12 Tage in Alpha-Mem, 10% fetalem Kalbsserum, Penicillin/Streptomycin und Osteoblastenstimulationsmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Durchführung von Expressionsanalysen folgt die Isolierung der RNA.

4.4.5 Mineralisierung

Das Mineralisierungsverhalten der pCOBs wird mit einer Alizarin Rot Färbung untersucht. Alizarin Rot ist ein Farbstoff, der Calcium rot färbt und als früher Marker der Mineralisierung bekannt ist. Die Alizarin Rot Färbung kann visuell beurteilt und quantitativ mit einem Photometer gemessen werden. Die Zellen werden in den Wells der Lochplatte belassen und nach folgendem Protokoll gefärbt:

- 2 mal spülen mit PBS
- für 15 Minuten fixieren mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur
- 2 mal mit PBS gespült
- für 20 Minuten mit 2%iger Alizarin Rot Lösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert
- 2 mal mit PBS gespült

Das Ergebnis wird visuell und mit dem Plattenlesegerät quantitativ ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung und Optimierung des RRBS-Protokolls mit *Msp1* nach Smith

Das RRBS Protokoll wurde anhand der Vorlagen von Smith et al. etabliert[91].

Eine Übersicht über die einzelnen Schritte unseres Protokolls im Detail ist in Abbildung 5.1 zu sehen.

Das Protokoll erfordert einen zeitlichen Arbeitsaufwand von 3 Tagen. Für die erfolgreiche Durchführung des Protokolls ist eine Ausgangsmenge von mindestens 5 µg DNA notwendig.

Folgende Schritte des Protokolls enthalten Optimierungen oder dienen der Qualitätssicherung der Methode:

5.1.1 Enzymverdau mit *Msp1*

Zur Reduktion der zu sequenzierenden DNA wird ein Enzymverdau mit *Msp1* durchgeführt. Die DNA Stränge werden in unterschiedlich lange Fragmente geschnitten und über eine Auftrennung dieser Fragmente mittels Gelelektrophorese nach Länge können ausgewählte Fragmentlängen aus dem Agarosegel „ausgeschnitten“ werden. Um dies zu erreichen, ist ein erfolgreicher, vollständiger Enzymverdau erforderlich. Der Enzymverdau des 5µg DNA-Pools mit *Msp1* wurde auf 4 Stunden verlängert und -zur Vermeidung der geringen Temperaturschwankungen im Heizblock- im Thermocycler durchgeführt. Die Untersuchung zur Erfassung der optimalen Bedingungen für den Enzymverdau zeigt Abbildung 5.2 und 5.3.

5.1.2 Analytische Polymerasekettenreaktion

Nachdem der Enzymverdau und die Größenselektion mittels Gelelektrophorese erfolgt ist, wird ein Schritt zur Kontrolle der bisher durchlaufenen Schritte durchgeführt. Dieser Schritt ist die „Analytische PCR“. Ziel ist eine Prüfung der Qualität der erhaltenen Probe, um eine Sequenzierung mit fehlerhaften oder sogar fehlenden DNA-Fragmenten zu vermeiden.

Auf Abbildung 5.4 ist das Ergebnis der „Analytischen PCR“ der neonatalen Proben zu sehen. Die Taschen des 2,5%igen TAE-Gels wurden von links nach rechts mit einem 50 bp-Marker, Calvaria neonatal 150 -250 bp, Calvaria neonatal 250 -350 bp, Femur neonatal 150 -250 bp, Femur neonatal 250 -350 bp beladen. Anschließend wird eine elektrophoretische Auftrennung mit 100 Volt über ca. 30 Minuten durchgeführt.

Abbildung 5.5 zeigt das Ergebnis der „Analytischen PCR“ der adulten Proben. Die Taschen des 2,5%igen TAE-Gels wurden von links nach rechts mit einem 50 bp-Marker, Calvaria adult 150 -250 bp, Calvaria adult 250 -350 bp, Femur adult 150 -250 bp, Femur adult 250 -350 bp beladen. Anschließend wird eine elektrophoretische Auftrennung mit 100 Volt über ca. 30 Minuten durchgeführt.

Bei den neonatalen sowie adulten Proben erzielen wir die erwünschten Resultate. Im Detail ermöglicht dieser Schritt die Beurteilung von Effektivität und Qualität der Adapterligation. Das Vorhandensein von PCR-Produkten und die Länge dieser Produkte lassen auf eine erfolgreiche Adapterligation schließen. Ebenso lässt sich der Erfolg des enzymatischen Verdaus mit *Msp1* beurteilen. Ein Qualitätsmerkmal hierfür stellen Mikrosatellitenbanden innerhalb der Banden dar, die bei den Fragmentlängen liegen, die durch den *Msp1*-Verdau besonders stark angereichert werden. Diese Mikrosatellitenbanden sind bei uns nicht zu erkennen. Desweiteren lässt sich ablesen, ob die „Size Selection“ präzise durchgeführt wurde. Ein Hinweis auf ein unpräzises Ausschneiden der gewünschten Fragmentlängen wären Banden, die außerhalb dieses Bereichs liegen. Solche Banden sind bei uns nicht zu sehen. Es wurde eine ausreichende Qualität erreicht, um die Proben mit NGS zu sequenzieren.

5.1.3 Validierung der Umwandlungssicherheit mit Bisulfit

Die Bisulfit Konversion erfolgte mit dem Qiagen-Kit. Der Hersteller gibt eine ca. 99,8%ige Umwandlungssicherheit von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil an.

Die aus der Bisulfit-PCR mit der „Universal Methylated Mouse DNA Standard und Control Primers“ von Zymoresearch gewonnenen Produkte werden mit einem ABI-Sequenzierer analysiert und anschließend mit der bei einer 100%igen Umwandlung zu erwartenden Sequenz verglichen.

Die Ausgangs-DNA ist in allen CpGs methyliert und an allen einzelnen Cytosinen nicht methyliert. Die zu erwartende Sequenz nach 100% erfolgreicher Bisulfit Umwandlung ist:

- ATTGGGAAGG TTAAGGCGGA GGGAAATTTG GTTTCGGGGA
 GAAGTGCAT CGTAGTCGGG AGGTTTTTTT AGTTTCGCGG
 GTCGGGTGAG AATAGGTGGC GTCGGTTCGA TTAGGCGTTT
 TGTGTCGGGG CGCGAGGATT TGGAGCGAAT TGTTGCGTTT
 CGGTGGGTCG TTTTTTTTTT TTTTTTGTTT TTTCGGGCGG
 TCGTACGTCG GGTCGGTTCGG GTAACGGAGA GGGAGTCGTT
 AGGAATGTGG TTTTGGGGAT TGTTTCGTTC GGGG

Die Sequenzierung mehrerer mit dem Qiagen Epiect Bisulfit Kit vorbehandelter Produkte ergab folgende Ergebnisse. „N“ ist eine Base, die nicht zugeordnet werden kann und ein kleingeschriebener Buchstabe (also a, c, t, g) sind Basen, die nicht ganz sicher zugeordnet werden können. Im Folgenden sind beispielhaft die Sequenzen von drei Produkten aufgelistet:

- NNNNNNGcG AtCGTANTCG GGAGGtTTTT TTAGTTTCGC
 GGGTCGGGTG ANAATAGGTG GCGTCGGTTC GATTAGGCGT

- ```

TTTGTGTCGG GCGCGAGGA TTTGGAGCGN ATTGTTGCGT
TTCGGTGGGT CGTTTTTTTT TTTTTNNNN NTNNNNGNG
• NNNNNNNGN NCGTANTCGG GAGGNTTTTT TAGTTTCGCG
GGTCGGGTGA GAATAGGTGG CGTCGGTTCG ATTAGGCGTT
TTGTGTCGGG GCGCGAGGAT TTGGAGCGNA TTGTTGCGT
TCGGTGGGTC GTTTTTTTTT TTTTTNTTT TNNNNGNNN
NNNNNNNNNN NNNNNNNGN NNANNNNNNN NNNNNNNNN
NNNNNNNNNN NTNNNNNNNN NNNNNNTTTN GGGG
• GNNNNNNNN NGANCGTANT CGGGAGGNTT TTTTAGTTTC
GCGGGTCGGG TGAGAATAGG TGGCGTCGGT TCGATTAGGC
GTTTTGTGTC GGGGCGCGAG GATTTGGAGC GNATTGTTGC
GTTTCGGTGG GTCGTTTTTT TTTTTTTTN TTTTNNNG
NNNNNNNNNN NNNGNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNN
NNNNNNNNNN NNNNTNNNN NNNNNNNNNN TTNGGGN

```

Es zeigt sich eine 100%ige Umwandlung aller nicht methylierten Cytosine. Die Methylcytosine bleiben alle unverändert.

#### 5.1.4 Sequenzierung mit Illumina GAIIx

Es wurde jeweils ein Aliquot der vier präparierten Proben sequenziert. Ein Aliquot wurde jeweils in einer sog. „lane“ analysiert. Es wurde eine Leselänge von 100 bp gewählt. Die Calvariae ergaben -wie gewünscht- eine Vielzahl von Fragmenten, die stets mit der Basensequenz „CGG“ beginnen. Die Sequenzierung der Femur-Proben ergab keine verwertbaren Ergebnisse.

## 5.2 Auswertung der RRBS-Datensätze

Die Auswertung wurde durch die AG Robinson, Medizinische Genetik, Universitätsmedizin Charité durchgeführt.

Das Mapping, die Zuordnung der erfolgreich sequenzierten Fragmente der Calvariae zu bekannten Genomabschnitten, wurde mit der Software Novoalign von Novocraft durchgeführt. Novoalign ist besonders für bisulfit-behandelte Proben geeignet, da es in der Lage ist die Base Cytosin beim Mapping entweder als Cytosin oder Thymin anzusehen. Wir verwenden hierzu die Mausgenom-Datenbank NCBI37/mm9 vom Juli 2007.

## 5.3 Definition von differentiell methylierten Regionen (DMRs)

Differentielle Methylierung beschreibt den unterschiedlichen Methylierungsgrad zweier Fragmente.

Wir wählen als untere Grenze für das Vorliegen von differentieller Methylierung eine Differenz zwischen beiden Fragmenten von mindestens 0,3. Ausserdem erscheint eine

weitere Einteilung in „leichte“ und „starke“ differentielle Methylierung sinnvoll, um eine Korrelation des Grades der Methylierung und der biologischen Auswirkungen besser einordnen zu können. Die Einteilung des Methylierungsgrades erfolgt anhand den in der folgenden Tabelle aufgeführten Kriterien.

Einteilung DMRs

| Einteilung | Grad | Differenz |
|------------|------|-----------|
| keine      | 0    | <0,3      |
| leicht     | I    | 0,3-0,5   |
| stark      | II   | >0,5      |

## 5.4 Lokalisation der Fragmente

Desweiteren erfolgt eine Einteilung der gemappten Fragmente nach Lokalisation. Wir unterscheiden:

- Intergenic
- Intronic
- CDS
- Exonic
- Upstream
- Downstream
- 3'-UTR
- 5'-UTR

Intergenic beschreibt die Lage des Fragments zwischen Genen und können folglich keinem Gen zugeordnet werden. „Intronic“ bedeutet eine Lage innerhalb eines Introns eines Gens; „Exonic“, „CDS“, „3'-UTR“ und „5'-UTR“ liegen im Exon. Die CDS („Coding DNA Sequence“) beschreibt Protein-kodierende Bereiche innerhalb des Exons, 5'-UTR die nicht translatierte Region im 5'-Ende des Exons und die 3'-UTR die nicht translatierte Region im 3'-Ende des Exons. Die Fragmente, die unter EXONIC eingeordnet werden, weisen eine überlappende Lage über die CDS, 3'- und 5'-UTR auf. UPSTREAM bedeutet vor Beginn des Gens, vor der TSS und beinhaltet die Promotorregionen. Dieser Bereich ist für unsere Untersuchungen besonders bedeutend, da CpG Inseln gehäuft in Promotorregionen vorkommen und über die Promotorhypermethylierung eine Inaktivierung des nachfolgenden Gens verursacht werden kann. „Downstream“ ist die Lage in Leserichtung nach dem Gen.

## 5.5 Auswahlkriterien

Um eine ausreichende Aussagekraft und Qualität zu erreichen, werden zusätzlich folgende Bedingungen an eine DMR gestellt:

- es müssen mindestens jeweils 5 reads pro Fragment für neonatal und für adult vorliegen
- oder insgesamt mindestens jeweils 10 CpGs pro Fragment für neonatal und für adult repräsentiert sein

Die Fragmente, die „Intergenic“ liegen, werden nicht näher untersucht und darum im Weiteren nicht aufgeführt.

## 5.6 Differentiell methylierte Fragmente

Differentiell methylierte Fragmente (TDMs) sind DNA-Abschnitte an gleicher Lokalisation, die bei zwei unterschiedlichen Proben wie Femur und Calvaria oder alt und jung eine unterschiedliche mittlere Methylierung aufweisen. Es finden sich 166 TDMs, welche die in der vorhergehenden Unterkapiteln genannten Kriterien erfüllen. Diese sind in Tabelle 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 und 5.6 aufgeführt. In den Tabellen wird die Genregion, in der das Fragment liegt (Type), die Lokalisation des Fragments (Fragment), die Quotienten aus methylierten CpGs durch Gesamt-CpGs des jeweiligen Fragments von Probe A und Probe B (mean-methy-A und mean-methy-B), die Differenz aus mean-methy-A und mean-methy-B (Differenz A-B) und dem Gensymbol in UCSC-Nomenklatur des zugehörigen Gens (Genesymbol) dargestellt. 28 Fragmente fallen in den Bereich der Coding DNA Sequence (CDS), 1 Fragment liegt Downstream (DOWNSTREAM), 36 der Fragmente liegen „EXONIC“(nach Definition), 86 innerhalb von Intronen (INTRONIC), 9 der Fragmente liegen Upstream (UPSTREAM), 2 in 3'-UTR(3UTR)- und 4 in 5'-UTR (5-UTR)-Regionen. Insgesamt liegen 70 DMRs (EXONIC+CDS+5'-UTR+3'-UTR) im Exon. Der Großteil der in der Gesamtauswertung aufgeführten Fragmente liegt außerhalb der Region eines Gens (INTERGENIC) und wird nicht mit aufgeführt.

128 (77,1%) der Fragmente weisen mit einer Differenz von 0,3 bis 0,5 leicht unterschiedliche Methylierungsgrade auf, 38 (22,9%) mit einer Differenz von >0,5 starke Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Proben. Nur neun Fragmente liegen in der Promotorregion eines Gens und repräsentieren somit den besonders interessierenden Genabschnitt. Diese sind im folgenden in Tabelle 5.7 mit Bezeichnung des zugehörigen Methylierungsgrades aufgelistet.

20 Fragmente und damit 12 % der 166 differentiell methylierten Fragmente sind bisher schon im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel bekannt. Jedoch findet sich nur bei 4 dieser Gene die DMR in der Promotorregion -nämlich bei *Cdh1*, *Fgfr1*, *Il11* und *Zfx3*. Die Gene sind im Folgenden gelistet:

- Progressive Ankylosis - *Ank*
- Arrestin, Beta 2 - *Arrb2*
- Cysteine-serine-rich Nuclear Protein 1 - *Axud1* / *Csrnp1*
- Bone Morphogenetic Protein 8a - *Bmp8a*
- Cyclin D2 - *Ccnd2*
- E-Cadherin - *Cdh1*
- Ephrin B1 - *Efnb1*

| Type | Fragment                  | mean-methy-A | mean-methy-B | Differenz A-B | Gensymbol            |
|------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------------|
| CDS  | chr1:75385311-75385423    | 1.000000     | 0.333333     | 0.666667      | <i>Speg</i>          |
| CDS  | chr10:79198008-79198135   | 0.965909     | 0.588235     | 0.377674      | <i>Hcn2</i>          |
| CDS  | chr9:106787755-106787855  | 0.821429     | 0.340000     | 0.481429      | <i>Rbm15b</i>        |
| CDS  | chr4:123000175-123000313  | 0.939815     | 0.468615     | 0.471200      | <i>Oxct2a, Bmp8a</i> |
| CDS  | chr19:40400986-40401104   | 0.947368     | 0.583333     | 0.364035      | <i>Sorbs1</i>        |
| CDS  | chr5:24080017-24080130    | 1.000000     | 0.571429     | 0.428571      | <i>Abcf2</i>         |
| CDS  | chr15:102986319-102986449 | 0.928571     | 0.514593     | 0.413978      | <i>Smug1</i>         |
| CDS  | chr17:35972417-35972534   | 0.869048     | 0.489583     | 0.379465      | <i>Tubb5</i>         |
| CDS  | chr14:64648625-64648749   | 0.952381     | 0.595238     | 0.357143      | <i>Rp11l</i>         |
| CDS  | chrX:7248334-7248462      | 0.769231     | 0.416667     | 0.352564      | <i>Pfp2</i>          |
| CDS  | chr15:78589629-78589754   | 0.937500     | 0.590909     | 0.346591      | <i>Mfng</i>          |
| CDS  | chr15:99409485-99409597   | 0.844444     | 0.500000     | 0.344444      | <i>Aqp2</i>          |
| CDS  | chr1:169396583-169396680  | 0.666667     | 0.333333     | 0.333334      | <i>Lrrc52</i>        |
| CDS  | chr9:119881442-119881539  | 0.800000     | 0.475000     | 0.325000      | <i>Csrmp1</i>        |
| CDS  | chr6:124808825-124808950  | 0.776744     | 0.457143     | 0.319601      | <i>Gpr162</i>        |
| CDS  | chr9:56737927-56738025    | 0.000000     | 0.300000     | -0.300000     | <i>Cspg4</i>         |
| CDS  | chr2:35949823-35949931    | 0.046875     | 0.450704     | -0.403829     | <i>Lhx6</i>          |
| CDS  | chr7:133699803-133699928  | 0.500000     | 0.840805     | -0.340805     | <i>Eif3c</i>         |
| CDS  | chr3:128921270-128921378  | 0.060150     | 0.432000     | -0.371850     | <i>Pitx2</i>         |
| CDS  | chr17:46574070-46574169   | 0.000000     | 0.355556     | -0.355556     | <i>Slc22a7</i>       |
| CDS  | chr18:80408475-80408578   | 0.500000     | 0.857143     | -0.357143     | <i>Naa10, Tmdl4a</i> |
| CDS  | chr11:4964130-4964242     | 0.000000     | 0.447619     | -0.447619     | <i>Gas2l1</i>        |
| CDS  | chr2:56964302-56964414    | 0.083333     | 0.594017     | -0.510684     | <i>Nr4a2</i>         |
| CDS  | chr5:124567025-124567148  | 0.000000     | 0.516981     | -0.516981     | <i>Arl6ip4</i>       |
| CDS  | chr7:77502936-77503082    | 0.083333     | 0.638889     | -0.555556     | <i>Nr2f2</i>         |
| CDS  | chr15:54580714-54580822   | 0.500000     | 0.827586     | -0.327586     | <i>Nov</i>           |
| CDS  | chr11:34107946-34108050   | 0.166667     | 0.748485     | -0.581818     | <i>Foxi1</i>         |
| CDS  | chr5:144016490-144016598  | 0.000000     | 0.769558     | -0.769558     | <i>Emxf1, Zfp316</i> |

Tabelle 5.1: Differentiell methylierte Fragmente 1

| Type       | Fragment                 | mean-methy-A | mean-methy-B | Differenz A-B | Gensymbol       |
|------------|--------------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|
| DOWNSTREAM | chr5:21316240-21316338   | 0.100000     | 0.450000     | -0.350000     | Slc26a5         |
| EXONIC     | chrX:149203815-149203938 | 0.750000     | 0.250000     | 0.500000      | Shroom2         |
| EXONIC     | chr2:32191640-32191740   | 1.000000     | 0.305556     | 0.694444      | Dnm1            |
| EXONIC     | chr4:33172476-33172596   | 1.000000     | 0.666667     | 0.333333      | Gabbr2          |
| EXONIC     | chr17:31984191-31984305  | 0.916667     | 0.375000     | 0.541667      | Sik1            |
| EXONIC     | chr2:165893077-165893193 | 0.928571     | 0.416667     | 0.511904      | Ncoa3           |
| EXONIC     | chr18:38150658-38150758  | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | Arap3           |
| EXONIC     | chr15:78714428-78714528  | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | Gga1            |
| EXONIC     | chr10:74636829-74636949  | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | Bcr             |
| EXONIC     | chr10:19993509-19993607  | 0.694444     | 0.200000     | 0.494444      | Mtap7, AK043723 |
| EXONIC     | chr4:153719420-153719527 | 1.000000     | 0.533333     | 0.466667      | Prdm16          |
| EXONIC     | chr3:51051668-51051809   | 0.933333     | 0.500000     | 0.433333      | Ccrn4l          |
| EXONIC     | chr16:18566231-18566331  | 0.821429     | 0.388889     | 0.432540      | Wdvcf           |
| EXONIC     | chrX:7340063-7340209     | 0.848485     | 0.418182     | 0.430303      | Tfcb, Tcfcb     |
| EXONIC     | chr8:3537005-3537105     | 0.986842     | 0.560606     | 0.426236      | Prnpla6         |
| EXONIC     | chr7:134720992-134721092 | 1.000000     | 0.575000     | 0.425000      | Phkg2, Zfp553   |
| EXONIC     | chr11:61299648-61299750  | 0.978022     | 0.590909     | 0.387113      | Mfap4           |
| EXONIC     | chr14:75219208-75219308  | 1.000000     | 0.618182     | 0.381818      | Lrch1           |
| EXONIC     | chr11:75416981-75417081  | 0.857143     | 0.481481     | 0.375662      | Patpna          |
| EXONIC     | chr7:137321334-137321434 | 1.000000     | 0.625000     | 0.375000      | Fgfr2           |
| EXONIC     | chr4:140319321-140319417 | 0.600000     | 0.233333     | 0.366667      | Padi4           |
| EXONIC     | chr6:115865960-115866083 | 1.000000     | 0.644444     | 0.355556      | Ift122          |
| EXONIC     | chr17:27857276-27857384  | 0.860606     | 0.523810     | 0.336796      | Spdef           |
| EXONIC     | chr17:56135330-56135428  | 0.666667     | 0.333333     | 0.333334      | Fsd1            |
| EXONIC     | chr6:127080421-127080528 | 0.828125     | 0.500000     | 0.328125      | Ccnd2           |
| EXONIC     | chr6:39420303-39420407   | 0.924638     | 0.609195     | 0.315443      | Dennd2a         |
| EXONIC     | chr11:6115111-6115211    | 0.958333     | 0.644737     | 0.313596      | Npc1l1          |
| EXONIC     | chr5:137850956-137851099 | 0.657143     | 0.351351     | 0.305792      | Zan             |

Tabelle 5.2: Differentiell methylierte Fragmente 2

| Type     | Fragment                  | mean-methy-A | mean-methy-B | Differenz A-B | Gensymbol       |
|----------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|
| EXONIC   | chr11:69235215-69235314   | 0.524390     | 0.219697     | 0.304693      | <i>Dnahc2</i>   |
| EXONIC   | chr5:93348756-93348877    | 0.365079     | 0.666667     | -0.301588     | <i>Shroom3</i>  |
| EXONIC   | chr8:24145675-24145784    | 0.111111     | 0.433333     | -0.322222     | <i>Ank1</i>     |
| EXONIC   | chr5:140564700-140564822  | 0.482456     | 0.814815     | -0.332359     | <i>Mad11</i>    |
| EXONIC   | chr14:55032722-55032897   | 0.254237     | 0.727273     | -0.473036     | <i>Slc7a7</i>   |
| EXONIC   | chr6:115927868-115927972  | 0.333333     | 0.833333     | -0.500000     | <i>Pltrnd1</i>  |
| EXONIC   | chr9:106363667-106363770  | 0.268817     | 0.813333     | -0.544516     | <i>Pcbp4</i>    |
| EXONIC   | chr11:70249871-70249977   | 0.200000     | 0.842105     | -0.642105     | <i>Arrb2</i>    |
| EXONIC   | chr1:74951372-74951472    | 0.000000     | 0.700000     | -0.700000     | <i>Ccdc108</i>  |
| INTRONIC | chr17:31588150-31588251   | 1.000000     | 0.300000     | 0.700000      | <i>Pde9a</i>    |
| INTRONIC | chr13:102476115-102476219 | 0.958333     | 0.266667     | 0.691666      | <i>Pik3r1</i>   |
| INTRONIC | chr14:19159561-19159661   | 0.866667     | 0.183673     | 0.682994      | <i>Ube2e1</i>   |
| INTRONIC | chr2:91475734-91475834    | 1.000000     | 0.333333     | 0.666667      | <i>F2</i>       |
| INTRONIC | chr3:109664639-109664739  | 1.000000     | 0.385714     | 0.614286      | <i>Ntng1</i>    |
| INTRONIC | chr10:42669673-42669783   | 0.753731     | 0.142857     | 0.610874      | <i>Scml4</i>    |
| INTRONIC | chr10:68731227-68731352   | 0.982456     | 0.380952     | 0.601504      | <i>Rhobtb1</i>  |
| INTRONIC | chr5:126021978-126022078  | 1.000000     | 0.400000     | 0.600000      | <i>Tmem132b</i> |
| INTRONIC | chr11:117093579-117093678 | 0.881481     | 0.333333     | 0.548148      | <i>Sep 09</i>   |
| INTRONIC | chr2:33472228-33472346    | 0.903743     | 0.282828     | 0.620915      | <i>Lmx1b</i>    |
| INTRONIC | chr2:165291941-165292053  | 1.000000     | 0.428571     | 0.571429      | <i>Slc13a3</i>  |
| INTRONIC | chr6:72680576-72680680    | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Tcf7l1</i>   |
| INTRONIC | chr6:55335157-55335257    | 0.931034     | 0.388889     | 0.542145      | <i>Ghrhr</i>    |
| INTRONIC | chr7:29830311-29830474    | 0.769231     | 0.250000     | 0.519231      | <i>Ryrr1</i>    |
| INTRONIC | chr10:85071333-85071450   | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Btbd11</i>   |
| INTRONIC | chr4:45266800-45266927    | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Frrmpd1</i>  |
| INTRONIC | chr5:37376909-37377038    | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Wfs1</i>     |
| INTRONIC | chr8:24242395-24242538    | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Ank1</i>     |
| INTRONIC | chr4:46648174-46648315    | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Tbc1d2</i>   |

Tabelle 5.3: Differentiell methylierte Fragmente 3

| Type     | Fragment                  | mean-methy-A | mean-methy-B | Differenz A-B | Gensymbol               |
|----------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|-------------------------|
| INTRONIC | chr15:83226740-83226850   | 1.000000     | 0.515152     | 0.484848      | <i>Pacsin2</i>          |
| INTRONIC | chr13:52960382-52960485   | 0.976190     | 0.500000     | 0.476190      | <i>Auh</i>              |
| INTRONIC | chr4:117521924-117522024  | 1.000000     | 0.531853     | 0.468147      | <i>Slc6a9</i>           |
| INTRONIC | chr1:113158375-113158473  | 1.000000     | 0.666667     | 0.333333      | <i>Slc39a11</i>         |
| INTRONIC | chr2:165936465-165936565  | 0.897436     | 0.434783     | 0.462653      | <i>Sulf2</i>            |
| INTRONIC | chr7:108030506-108030606  | 0.960000     | 0.500000     | 0.460000      | <i>Arhgef17</i>         |
| INTRONIC | chr10:80429256-80429364   | 0.869565     | 0.413043     | 0.456522      | <i>Gng7</i>             |
| INTRONIC | chr1:118304147-118304251  | 1.000000     | 0.545455     | 0.454545      | <i>C1qtnf1</i>          |
| INTRONIC | chr15:31166908-31167008   | 0.950000     | 0.520000     | 0.430000      | <i>Dap</i>              |
| INTRONIC | chr4:122941730-122941838  | 1.000000     | 0.571429     | 0.428571      | <i>Pabpc4</i>           |
| INTRONIC | chr1:87593761-87593861    | 0.923077     | 0.500000     | 0.423077      | <i>Sp100</i>            |
| INTRONIC | chr18:66129362-66129467   | 1.000000     | 0.583333     | 0.416667      | <i>Cplx4</i>            |
| INTRONIC | chr8:126183894-126184018  | 1.000000     | 0.583333     | 0.416667      | <i>Rhou</i>             |
| INTRONIC | chr17:8720752-8720853     | 1.000000     | 0.619047     | 0.380953      | <i>Pde10a</i>           |
| INTRONIC | chr14:78342784-78342919   | 0.904762     | 0.500000     | 0.404762      | <i>Epsti1</i>           |
| INTRONIC | chr14:29184043-29184143   | 0.708333     | 0.305556     | 0.402777      | <i>Erc2</i>             |
| INTRONIC | chr11:110308393-110308493 | 0.922535     | 0.520202     | 0.402333      | <i>Map2k6, AK143961</i> |
| INTRONIC | chr14:48786117-48786247   | 1.000000     | 0.607143     | 0.392857      | <i>Peli2</i>            |
| INTRONIC | chr12:29517317-29517432   | 0.972973     | 0.593220     | 0.379753      | <i>Tssc1</i>            |
| INTRONIC | chr2:164388430-164388545  | 0.639344     | 0.245283     | 0.394061      | <i>Wfdc2</i>            |
| INTRONIC | chr16:56211634-56211734   | 0.960000     | 0.583333     | 0.376667      | <i>Impg2</i>            |
| INTRONIC | chr2:135569143-135569250  | 0.758065     | 0.382353     | 0.375712      | <i>Plcb4</i>            |
| INTRONIC | chr4:106635401-106635497  | 0.750000     | 0.375000     | 0.375000      | <i>Ssbp3</i>            |
| INTRONIC | chr4:152814991-152815109  | 0.928571     | 0.555556     | 0.373015      | <i>Ajap1</i>            |
| INTRONIC | chr3:130282583-130282706  | 0.950000     | 0.577778     | 0.372222      | <i>Col25a1</i>          |
| INTRONIC | chr7:31311645-31311822    | 0.761905     | 0.404255     | 0.357650      | <i>Gapdhs, Arhgap33</i> |
| INTRONIC | chr8:38617109-38617232    | 0.952381     | 0.590278     | 0.362103      | <i>Sgcz</i>             |
| INTRONIC | chr4:140364521-140364621  | 0.916667     | 0.571429     | 0.345238      | <i>Pach3</i>            |
| INTRONIC | chr8:87245959-87246083    | 0.955556     | 0.611111     | 0.344445      | <i>Nfix</i>             |

Tabelle 5.4: Differentiell methylierte Fragmente 4

| Type     | Fragment                  | mean-methy-A | mean-methy-B | Differenz A-B | Gensymbol        |
|----------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|------------------|
| INTRONIC | chr5:36165305-36165419    | 0.900000     | 0.556944     | 0.343056      | <i>Abim2</i>     |
| INTRONIC | chr19:38257874-38257995   | 0.911765     | 0.571429     | 0.340336      | <i>Pdeb3</i>     |
| INTRONIC | chr17:10688686-10688801   | 0.944444     | 0.608696     | 0.335748      | <i>Pacrg</i>     |
| INTRONIC | chr8:46904545-46904668    | 1.000000     | 0.671429     | 0.328571      | <i>Sorbs2</i>    |
| INTRONIC | chr12:73452376-73452481   | 0.987500     | 0.660714     | 0.326786      | <i>Rtn1</i>      |
| INTRONIC | chr10:60239497-60239602   | 0.822581     | 0.500000     | 0.322581      | <i>Unc5b</i>     |
| INTRONIC | chr3:55140985-55141085    | 0.983333     | 0.666667     | 0.316666      | <i>Dclk1</i>     |
| INTRONIC | chr13:54850351-54850462   | 0.722222     | 0.407407     | 0.314815      | <i>Gprin1</i>    |
| INTRONIC | chr11:85328251-85328360   | 1.000000     | 0.690476     | 0.309524      | <i>Bcas3</i>     |
| INTRONIC | chr8:87269340-87269497    | 0.678862     | 0.370370     | 0.308492      | <i>Nfix</i>      |
| INTRONIC | chr2:60676903-60677085    | 0.845833     | 0.541667     | 0.304166      | <i>Rbms1</i>     |
| INTRONIC | chr11:74981665-74981770   | 0.000000     | 0.311224     | -0.311224     | <i>Hic1</i>      |
| INTRONIC | chr11:77597866-77598027   | 0.037500     | 0.371429     | -0.333929     | <i>Myo18a</i>    |
| INTRONIC | chr11:113672466-113672580 | 0.232143     | 0.559322     | -0.327179     | <i>Sdk2</i>      |
| INTRONIC | chrX:34138747-34138858    | 0.166667     | 0.502304     | -0.335637     | <i>Pgrmc1</i>    |
| INTRONIC | chrX:34415022-34415119    | 0.110000     | 0.461538     | -0.351538     | <i>Ube2a</i>     |
| INTRONIC | chr11:60957192-60957315   | 0.185185     | 0.528455     | -0.343270     | <i>Tnfrsf13b</i> |
| INTRONIC | chr5:138063799-138063907  | 0.022727     | 0.375000     | -0.352273     | <i>Fbxo24</i>    |
| INTRONIC | chr5:126092857-126092956  | 0.388889     | 0.750000     | -0.361111     | <i>Tmem132b</i>  |
| INTRONIC | chr11:97687929-97688038   | 0.090909     | 0.446154     | -0.355245     | <i>Lasp1</i>     |
| INTRONIC | chr11:75473050-75473214   | 0.333333     | 0.714286     | -0.380953     | <i>Myo1c</i>     |
| INTRONIC | chr8:13245379-13245462    | 0.548672     | 0.961538     | -0.412866     | <i>Adprhl1</i>   |
| INTRONIC | chr18:76084761-76084882   | 0.192708     | 0.614035     | -0.421327     | <i>Zbtb7c</i>    |
| INTRONIC | chrX:155693769-155693933  | 0.000000     | 0.433333     | -0.433333     | <i>Rps6ka3</i>   |
| INTRONIC | chr4:140632311-140632364  | 0.368421     | 0.800000     | -0.431579     | <i>Necap2</i>    |
| INTRONIC | chrX:153720943-153721072  | 0.375000     | 0.821429     | -0.446429     | <i>Pher</i>      |
| INTRONIC | chr14:31711557-31711663   | 0.333333     | 0.807229     | -0.473896     | <i>Itih4</i>     |
| INTRONIC | chr19:16442639-16442745   | 0.333333     | 0.812500     | -0.479167     | <i>Gnaq</i>      |
| INTRONIC | chr2:158513566-158513769  | 0.120000     | 0.600000     | -0.480000     | <i>Ppp1r16b</i>  |

Tabelle 5.5: Differentiell methylierte Fragmente 5



| Type     | Fragment                  | mean-methy-A | mean-methy-B | Differenz A-B | Gensymbol      |
|----------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| INTRONIC | chr10:32571087-32571208   | 0.333333     | 0.816667     | -0.483334     | <i>Nkain2</i>  |
| INTRONIC | chr3:145920869-145920978  | 0.000000     | 0.500000     | -0.500000     | <i>Lpar3</i>   |
| INTRONIC | chr8:114345433-114345586  | 0.092308     | 0.600000     | -0.507692     | <i>Cfllp1</i>  |
| INTRONIC | chr2:68798789-68798894    | 0.232143     | 0.745690     | -0.513547     | <i>Lass6</i>   |
| INTRONIC | chr6:140472123-140472243  | 0.187500     | 0.750000     | -0.562500     | <i>Plekha5</i> |
| INTRONIC | chr4:136280783-136280903  | 0.000000     | 0.577778     | -0.577778     | <i>Ephb2</i>   |
| INTRONIC | chr2:112604580-112604690  | 0.000000     | 0.600000     | -0.600000     | <i>Ryr3</i>    |
| INTRONIC | chr14:122336952-122337077 | 0.000000     | 0.645833     | -0.645833     | <i>Uba2</i>    |
| INTRONIC | chr1:34594941-34595075    | 0.000000     | 0.944444     | -0.944444     | <i>Cfc1</i>    |
| UPSTREAM | chr8:109126463-109126584  | 1.000000     | 0.428571     | 0.571429      | <i>Cdh1</i>    |
| UPSTREAM | chr8:111237711-111237831  | 0.823529     | 0.375000     | 0.448529      | <i>Zfllac3</i> |
| UPSTREAM | chr5:25020825-25020943    | 1.000000     | 0.500000     | 0.500000      | <i>Cct8l1</i>  |
| UPSTREAM | chr7:4729874-4729974      | 0.642857     | 0.221154     | 0.421703      | <i>Ili1</i>    |
| UPSTREAM | chr5:109122288-109122386  | 0.607143     | 0.233333     | 0.373810      | <i>Fgfr1</i>   |
| UPSTREAM | chrX:5977127-5977235      | 0.033333     | 0.366579     | -0.333246     | <i>Shroom4</i> |
| UPSTREAM | chr10:79101087-79101182   | 0.000000     | 0.333333     | -0.333333     | <i>Shc2</i>    |
| UPSTREAM | chr9:55937460-55937571    | 0.083333     | 0.529412     | -0.446079     | <i>Pstpip1</i> |
| UPSTREAM | chr6:6905026-6905140      | 0.362069     | 0.833333     | -0.471264     | <i>Acn9</i>    |
| UTR3     | chr17:26792504-26792610   | 1.000000     | 0.666667     | 0.333333      | <i>Ergic1</i>  |
| UTR3     | chr18:25636890-25636995   | 0.111111     | 0.768277     | -0.657166     | <i>Celf4</i>   |
| UTR5     | chr10:126516442-126516554 | 0.000000     | 0.511379     | -0.511379     | <i>Agap2</i>   |
| UTR5     | chrX:96331923-96332056    | 0.000000     | 0.588889     | -0.588889     | <i>Efrub1</i>  |
| UTR5     | chr5:108259217-108259347  | 0.285714     | 0.909952     | -0.624238     | <i>Ube2d2</i>  |
| UTR5     | chrX:137134994-137135109  | 0.000000     | 0.763441     | -0.763441     | <i>Tsc2d3</i>  |

Tabelle 5.6: Differentiell methylierte Fragmente 6

| Gensymbol      | Beschreibung                                               | PM<br>neonatal | PM<br>adult |
|----------------|------------------------------------------------------------|----------------|-------------|
| <i>Cdh1</i>    | E-Cadherin                                                 | ↑              |             |
| <i>Zfx3</i>    | Zinkfinger Homebox 3                                       | ↑              |             |
| <i>Cct8l1</i>  | Chaperonin Containing TCP1, Subunit 8                      | ↑              |             |
| <i>Il11</i>    | Interleukin 11                                             | ↑              |             |
| <i>Fgfr1</i>   | Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1                   | ↑              |             |
| <i>Shroom4</i> | Shroom Familienmitglied 4                                  |                | ↑           |
| <i>Shc2</i>    | Src Homology 2 Domain-Containing-Transforming Protein C2   |                | ↑           |
| <i>Pstpip1</i> | Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1 |                | ↑           |
| <i>Acn9</i>    | Succinate Dehydrogenase Complex Assembly Factor 3          |                | ↑           |

Tabelle 5.7: Differentiell methylierte Promotorregionen

- Fibroblast Growth Factor Receptor 2 - *Fgfr2*
- Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1 - *Fgfr1*
- Growth Hormone Releasing Hormone Receptor - *Ghrhr*
- Interleukin 11 - *Il11*
- Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 - *Lrp1*
- Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4 - *Ltbp4*
- Nephroblastoma Overexpressed Gene - *Nov*
- Phosphate Regulating Gene with Homologies to Endopeptidases on the X-Chromosome - *Phex*
- Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2 - *Pitx2*
- Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 2 - *Ror2*
- TSC22 Domain family, Member 3 - *Tsc22d3*
- Vitamin D Receptor - *Vdr*
- Zinkfinger Homebox 3 - *Zfx3*

14 Fragmente werden zur Validierung der RRBS-Methode und weiteren Untersuchungen im Zellkulturlabor herangezogen und sind in der folgenden Tabelle ?? aufgelistet:

Zur Validierung ausgewählte DMRs

| Gen                   | Lokalisation DMR | Hypermethylierung |
|-----------------------|------------------|-------------------|
| <i>Nr2f2</i>          | CDS/Exon         | adult             |
| <i>Scml4</i>          | Intron           | neonatal          |
| <i>Tsc22d3</i>        | 5'UTR/Exon       | adult             |
| <i>Arrb2</i>          | Exonic/Exon      | adult             |
| <i>Axud1 / Csrnp1</i> | CDS/Exon         | neonatal          |
| <i>Bmp8a</i>          | CDS/Exon         | neonatal          |
| <i>Ccnd2</i>          | Exonic/Exon      | neonatal          |
| <i>Efnb1</i>          | 5'UTR/Exon       | adult             |
| <i>Fgfr2</i>          | Exonic/Exon      | neonatal          |
| <i>Ghrhr</i>          | Intron           | neonatal          |
| <i>Nov</i>            | CDS/Exon         | adult             |
| <i>Phex</i>           | Intron           | adult             |
| <i>Pitx2</i>          | CDS/Exon         | adult             |
| <i>Runx2</i>          | Kontrolle        |                   |

Die ersten 3 Gene wurden wegen ihrer sehr starken Methylierungsunterschiede, die folgen den mit Betonung auf ihre Rolle im Knochenstoffwechsel ausgewählt. Die diesen Genen zugehörigen DMRs liegen jedoch alle nicht innerhalb von Promotorregionen. Die DMRs in den Promotorregionen konnten aufgrund der zeitlich verschobenen Auswertung dieser Regionen nicht mehr in die Validierung und weitere Untersuchung mit einbezogen werden.

## 5.7 Validierung der differentiell methylierten Regionen

### 5.7.1 Bisulfit-PCR

Der erste Schritt zur Validierung der DMRs mit Ultradeep Bisulfit Sequenzierung ist die Vervielfältigung einzelner DNA-Abschnitte mittels Bisulfit-PCR. Um optimale Bedingungen für diese Reaktion herzustellen wurden folgende Parameter variiert und die jeweiligen Reaktionen miteinander verglichen:

- Zusammensetzung des Puffers
- Veränderung der Zusammensetzung des Mastermixes
- Veränderung der Zyklusanzahl der PCR
- Veränderung der Temperaturen bei der PCR
- Verwendung unterschiedlicher Polymerasen
- Design von mehreren unterschiedlichen Primerpaaren mit Methprimer
- Verwendung unterschiedlicher Thermocycler in unterschiedlichen Räumlichkeiten
- Testversuch mit Primerpaaren aus der Publikation von Xiao-Lei et al.[33]
- Verwendung von DNA, die auf unterschiedliche Weise extrahiert wurde (DNA Roboter, DNA Extraktionskit von Qiagen)
- Durchführung der Bisulfit PCR mit den Primern des „Universal Methylated Mouse DNA Standard & Control Primers“ von Zymo Research, selbst erstellten Primern für die Promotorregion von *Runx2* und der Verwendung des Methylation Gold-Kits

von Zymo Research

Trotz Veränderung sämtlicher o.g. Einflussfaktoren auf die PCR konnte keine Vervielfältigung der mit Bisulfit-umgewandelten DNA erzielt werden. Der einzige erfolgreiche Durchgang erfolgte beim im letzten Punkt beschriebenen Versuch mit den Primern des „Universal Methylated Mouse DNA Standard & Control Primers“-Kit. Die Primer sind passend zur Bisulfit-umgewandelte DNA der Promotorregion des Gens *Dlx5* hergestellt. Desweiteren wurde parallel ein Reaktionsansatz mit *Runx2* hergestellt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 5.6. In der ersten Tasche wurde ein Marker Mix, in der zweiten das PCR-Produkt der *Runx2*-Reaktion mit einer Länge von 246 bp und in der dritten das PCR-Produkt der *Dlx5*-Reaktion mit einer erwarteten Länge von 176 bp aufgetragen. Diese Reaktion war einmalig erfolgreich, bereits eine Wiederholung mit unveränderten Reaktionsbedingungen ergab kein Produkt. Die einzigen nicht variierten Einflussfaktoren sind die Methprimer-Software, mit der die Primer hergestellt wurden, sowie das verwendete Mausreferenzgenom. Insgesamt war bei uns der erste Schritt der PCR, nämlich das Erreichen einer erfolgreichen Anlagerung der Primer an die Bisulfit-konvertierte DNA und die Generierung eines ersten Produktes, nicht erfolgreich durchführbar.

### 5.7.2 *Msp1-Hpa2*-Verdau

Mit dem vergleichenden Enzymverdau mit *Hpa2* und *Msp1* können Veränderungen von DNA Methylierungsmustern des Gesamtgenoms dargestellt werden. Der Enzymverdau mit *Hpa2* und *Msp1* wird mit den Proben P0, P10 und P10Wochen durchgeführt. Es werden jeweils zwei Aliquots einmal mit *Msp1* und *Hpa2* enzymatisch verdaut. Um einen vollständigen Verdau zu erzielen, muss das Aliquot, das mit *Msp1* verdaut wird länger inkubiert werden. *Hpa2* kann nur nicht-CpG-methylierte Basenfolgen 5'...C'CGG...3' schneiden. Dagegen ist *Msp1* in der Lage 5'...C'CGG...3' und 5'...C'cmGG...3' zu schneiden.

Ein vergleichender Enzymverdau wurde zur Optimierung in einem Vorversuch mit unterschiedlichen DNA-Mengen mit 200 ng, 500 ng und 1 µg durchgeführt. Ein optimaler Verdau und eine optimale Visualisierung konnte mit dem Verdau von 200 ng DNA in einem 30 µl-Ansatz und dem anschließenden Auftragen von einem 10 µl Aliquot plus Ladepuffer in eine Geltasche erzielt werden. Es wurde ein 0,8 %iges TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid verwendet und eine Gelelektrophorese mit 120 V über 30 Minuten durchgeführt.

Das Bild der Gelelektrophorese des vergleichenden Enzymverdaus mit P0-, P10- und P10Wochen-Proben ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Es ergibt ein unverändertes Bandenmuster zwischen der P0-, P10- und P10Wochen-Probe mit Fragmenten von ca. 100 bp-Länge bis 10 kbp-Länge. Dagegen sind beim *Hpa2*-Verdau die kleinsten dargestellten Fragmente ca. 250 bp lang. Bei der P10-Probe sind etwas mehr unterschiedliche Fragmentlängen mit auch etwas kürzeren Fragmenten als bei der P0-Probe erkennbar. Bei der P10Wochen-Probe sind im Vergleich zur P10-Probe noch zusätzlich gering kürzere Fragmentlängen erkennbar.

Dies spricht für eine Zunahme der Schnittstellen beim Enzymverdau mit *Hpa2* bei den 10 Tage alten calvarialen Osteozyten im Vergleich zu den neonatalen Calvariae und eine weitere diskrete Zunahme bei weiterer Alterung bis zu 10 Wochen. Die Zunahme der Schnittstellen lässt auf eine leichte gesamtgenomische Abnahme der CpG-Methylierung im Verlauf der Entwicklung zwischen dem 1. und dem 10. Lebenstag und einer weiteren leichten Abnahme bis zu 10 Wochen schließen. Der im Verlauf unveränderte Verdau mit *Msp1* dient als Kontrolle.

### 5.7.3 Expression der ausgewählten Gene mit DMRs in Calvaria-Proben

Die Ergebnisse der mit qPCR gewonnen Expressionsdaten der Calvaria-Proben von P0, P10 und P10Wochen alten Mäusen sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Es zeigt sich eine ca. 4-fache Zunahme der Expression von *rPhex* von P0 zu P10 und ein Abfall der Expression von P10 auf P10Wochen. Außerdem eine ca. 2-fache Erhöhung der Expression von *Arrb2* von P10 auf P10Wochen nachweisbar. *Nov* und *Pitx2* zeigen eine deutliche Verminderung der Expression nach 10 Tagen und 10 Wochen. *Ghrhr* ist in 10 Tage alten murinen Calvaria Proben vermindert im Vergleich mit Tag 0 und ist in 10 Wochen alten Proben wieder leicht angestiegen. *Axud*, *Bmp8*, *Ccnd2*, *Efnb1*, *Fgfr2* und *Runx2* zeigen kaum Veränderungen.

## 5.8 Behandlung von MC3T3-E1 subclone4-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Azacidin

Zur Untersuchung der Auswirkung von einer Veränderung der Methylierung auf die Expression wählen wir die Zelllinie „MC3T3-E1 subclone4“. Es werden Zellkulturversuche durchgeführt, bei denen eine künstliche Demethylierung mit 5-Azacidin durchgeführt wird, und anschließend eine Analyse der Expression und dem Mineralisierungsverhalten der Zellen erfolgt. Diese Untersuchungen werden stets als Triplikate mit jeweils vier Wells, die mit derselben Konzentration behandelt werden, durchgeführt.

### 5.8.1 Vitalität von MC3T3-E1 subclone4-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacidin

Die Vitalität der MC3T3-E1 subclone4-Zellen wird mit einem MTT-Essay untersucht. MC3T3-E1 subclone4-Zellen sind eine osteoblastische Zelllinie, die in der Lage ist zu mineralisieren. Die Zellen werden mit Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  5-Azacidin behandelt. Es werden drei 24-Well-Platten bepflanzt. Die erste wird am Tag 4, die zweite am Tag 7 und die dritte am Tag 8 nach Behandlung untersucht. Die Auswertung der MTT-Essays erfolgt photometrisch mit einer Wellenlänge  $\lambda$  von 570 nm. Testweise erfolgte auch eine Messung mit einer Wellenlänge  $\lambda$  von 490 nm, die exakt dieselben Ergebnisse wie bei der Messung mit  $\lambda = 570$  nm ergab.

Bei den MC3T3-E1 subclone4-Zellen zeigen sich unter den sechs unterschiedlichen Konzentrationen am Tag 4, 7 und 8 keine Vitalitätsunterschiede. Es lässt sich lediglich eine Zunahme der Vitalität zwischen den untersuchten Lochplatten zwischen Tag 4 und 7 bzw.

8 erkennen. Die Vitalitätsuntersuchung wurde auch mit pCOBs nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacitidin durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich im folgenden Kapitel. Hier konnten wir eine kontinuierliche Abnahme der Vitalität mit steigender Konzentration an 5-Azacitidin nachweisen. Die Beständigkeit der Vitalität trotz Demethylierung mit 5-Azacitidin lässt einen Schutz der MC3T3-E1 subclone4-Zellen -am ehesten durch die Veränderungen bei der Umwandlung zur Zelllinie- vermuten.

### **5.8.2 DNA Methylierung von MC3T3-E1 subclone4-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacitidin**

Um die Veränderung der DNA Methylierung darzustellen wird die DNA der behandelten Zellen extrahiert und anschließend -wie in Kapitel 5.7.2 beschrieben- ein *Hpa2-Msp1*-Verdau durchgeführt.

Die MC3T3-E1 subclone4-Zellen wurden mit Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  5-Azacitidin behandelt. Der Verdau des Aliquots mit *Msp1* ergab bei allen Proben einen vollständigen Verdau mit Fragmentlängen von ca. 100 bp bis 10 kbp. Beim *Hpa2*-Verdau ergab sich eine Zunahme der Verteilung über unterschiedliche Fragmentlängen mit zunehmendem Vorhandensein von auch kürzeren Fragmenten. Dies spricht für eine Zunahme der Schnittstellen von *Hpa2* und somit -trotz unveränderter Vitalität- einer zunehmenden CpG-Demethylierung mit zunehmender Konzentration 5-Azacitidin.

### **5.8.3 Expression nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacitidin**

In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse der quantitativen PCR dargestellt. Es stellt sich in keinem Gen eine signifikante Veränderung der Expression nach Behandlung mit den Konzentrationen von 0 bis zu 40  $\mu\text{M}$  5-Azacytidine dar.

## **5.9 Untersuchung von primären calvarialen Osteoblastenzellen**

### **5.9.1 Vitalität von pCOBs nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacitidin**

Die Vitalität der pCOBs wird mit einem MTT-Essay untersucht. Die Zellen werden mit Konzentrationen von 0 bis 160  $\mu\text{M}$  5-Azacitidin behandelt und nach fünf Tagen untersucht. Die Vitalität der Zellen nimmt mit steigender Konzentration 5-Azacitidin kontinuierlich ab. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  stellt sich eine Reduktion auf 80% dar. Im Bereich zwischen 10 bis 40  $\mu\text{M}$  findet eine Reduktion auf Werte zwischen 40 und 60% statt. Bei Konzentrationen von 80 und 160  $\mu\text{M}$  ist die Vitalität auf ca. 30% und niedriger vermindert. In Abbildung 5.10 wird die Vitalitätsveränderung durch die Behandlung mit 5-Azacitidin veranschaulicht.

### Expression während der Differenzierung von pCOBs

Abbildung 5.11 zeigt die Expression von *Arrb2*, *Axud1*, *Bmp8*, *Ccnd2*, *Efnb1*, *Fgfr2*, *Ghrhr*, *Nov*, *Pitx2*, *rPhex* und *Runx2* in pCOBs während der Differenzierung. Es wurde eine qPCR mit Proben von Tag 0, 3, 6, 9 und 12 durchgeführt. Signifikante Zunahmen (>100-fach) in der Expression von Tag 0 bis zum 12. Tag zeigen *Bmp8* und *rPhex*. Weitere Gene, deren Expression während der Osteoblasten Differenzierung zunimmt sind *Arrb2* und *Ghrhr*. Diese weisen eine ca. 10-fache, weniger signifikante Erhöhung auf.

### Mineralisierung von pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacitidin

In Abbildung 5.12 ist die Untersuchung des Mineralisierungsverhaltens mit Alizarin Rot Färbung von pCOBs am Tag 9 dargestellt. Es wurde je ein Well mit Konzentrationen von 0 nM, 200 nM, 400 nM und 800 nM 5-Azacitidin behandelt. Ein Well wird als Negativkontrolle am Tag 0 mit Alizarin Rot inkubiert. Es stellt sich eine kontinuierliche Abnahme der Mineralisierung der pCOBs nach 9 Tagen mit zunehmender 5-Azacitidin Konzentration dar.

### Expression von pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacitidin

Die Untersuchung der Expression bei pCOBs nach 0 und 7 Tagen unter Behandlung mit 0nM, 200nM, 400nM und 800nM 5-Azacitidin zeigt sich keine signifikanten Zu- oder Abnahmen der Expression der Gene *Arrb2*, *Axud1*, *Bmp8*, *Ccnd2*, *Efnb1*, *Fgfr2*, *Nov*, *rPhex*, *Pitx2*, *Runx2*, *Nr2f2*, *Scml4* und *Tsc22d3*. Die Ergebnisse der qPCR sind in Abbildung 5.13 dargestellt.

## 5.10 Zusammenschau der einzelner Ergebnisse

In Tabelle 5.8 wird eine Übersicht über die Ergebnisse mit Betonung des Zusammenhangs der Untersuchung von DNA Methylierung, Lokalisation und Expression der untersuchten Gene dargestellt.

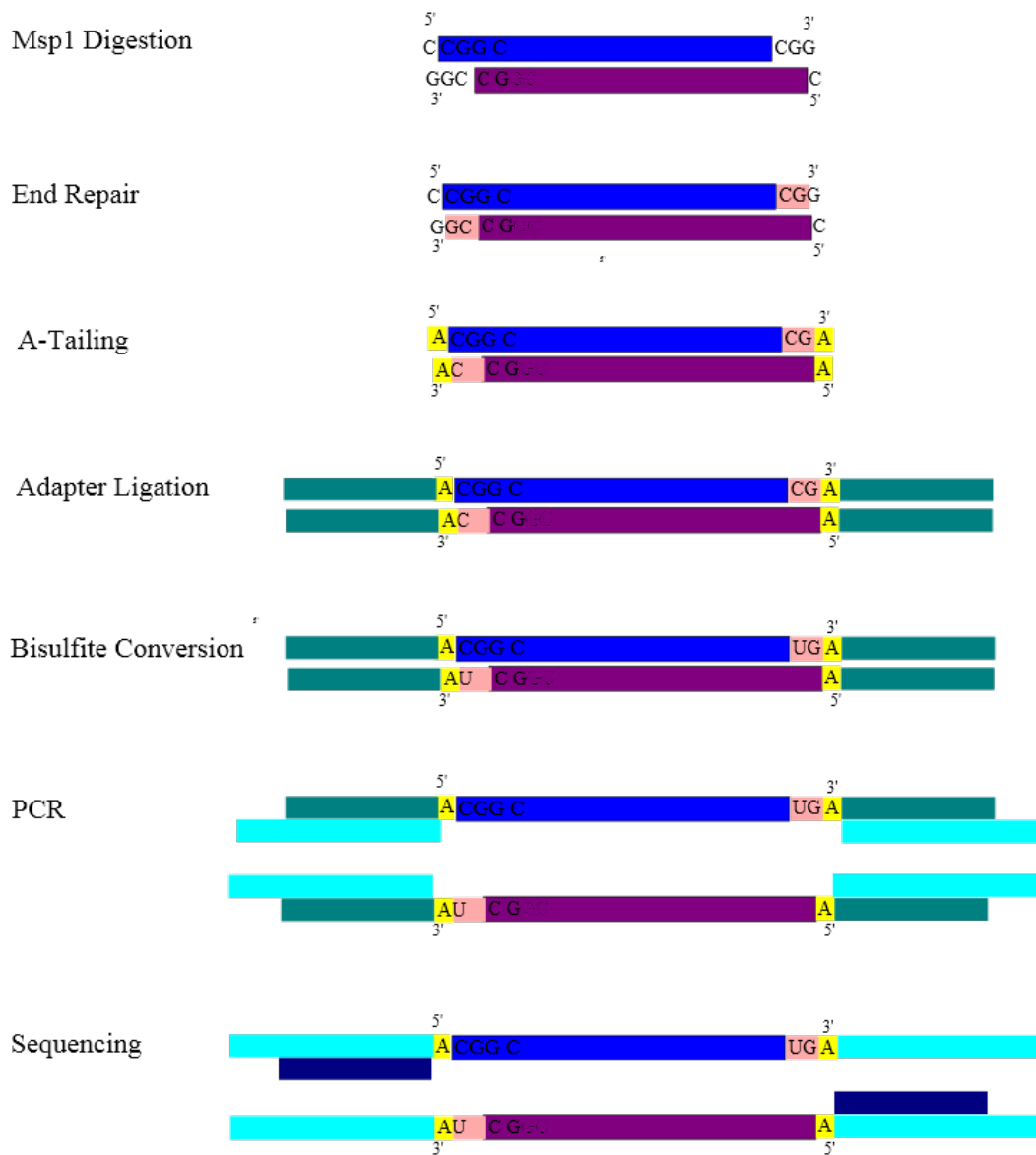
Die Gene *Efnb1*, *Nov* und *Pitx2* zeigen mit zunehmendem Alter eine Zunahme der Methylierung und eine Abnahme der Genexpression. *Efnb1* liegt in der 5'UTR, *Nov* und *Pitx2* im kodierenden Bereich des Exons. Dagegen ist bei den Genen *Arrb2*, *Axud1*, *Bmp8*, *Ccnd2*, *Fgfr2*, *Ghrhr*, *Nr2f2*, *rPhex*, *Scml4* und *Tsc22d3* keine inverse Korrelation zwischen DNA Methylierung und Expression erkennbar. *Arrb2* und *Phex* weisen eine Zunahme der Methylierung und eine Zunahme der Expression mit der Alterung auf, wobei *Arrb2* im Exon und *Phex* im Intron liegt. Dagegen weisen *Nr2f2* und *Tsc22d3*, die in der codierenden Sequenz und in der 5' UTR des Exons liegen, eine Zunahme der Methylierung und keine Veränderung der Expression auf. *Bmp8*, *Ccnd2*, *Fgfr2* und *Ghrhr* zeigen eine Abnahme der DNA Methylierung in den adulten Proben, die von einer Abnahme der Genexpression begleitet sind. Bei *Axud1* und *Scml4* trifft man ebenfalls eine Verminderung der Methylierung mit zunehmendem Alter an, jedoch keine Veränderung der Genexpression.

| Gensymbol      | Lokalisation | X-Chrom | Differenz<br>neo zu adult | Methyl<br>neo zu adult | Methylierung<br>neo zu adult | Expression<br>P10 zu P0 | Expression<br>P10W zu P0 | Expression<br>MC4 Aza | Expression<br>pCOBs Aza |
|----------------|--------------|---------|---------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| <i>Armb2</i>   | EXONIC       |         | -0,64                     | ↑                      | ↑                            | -                       | ↑                        | -                     | -                       |
| <i>Arud1</i>   | CDS          |         | 0,33                      | (↓)                    | (↓)                          | -                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Bmp8</i>    | CDS          |         | 0,47                      | (↓)                    | (↓)                          | -                       | (↓)                      | -                     | -                       |
| <i>Cend2</i>   | EXONIC       |         | 0,33                      | (↓)                    | (↓)                          | (↓)                     | ↑                        | -                     | -                       |
| <i>Efnb1</i>   | UTR5         | x       | -0,59                     | ↑                      | ↑                            | (↓)                     | ↑                        | -                     | -                       |
| <i>Fgfr2</i>   | EXONIC       |         | 0,38                      | (↓)                    | (↓)                          | (↓)                     | ↑                        | -                     | -                       |
| <i>Ghrhr</i>   | INTRONIC     |         | 0,54                      | ↓                      | ↓                            | ↓                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Nov</i>     | CDS          |         | -0,57                     | ↑                      | ↑                            | ↓                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Nr2f2</i>   | CDS          |         | -0,56                     | ↑                      | ↑                            | -                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Pitax2</i>  | CDS          |         | -0,34                     | (↑)                    | (↑)                          | ↓                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Phex</i>    | INTRONIC     | x       | -0,45                     | (↑)                    | (↑)                          | ↑                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Scml4</i>   | INTRONIC     |         | 0,61                      | ↓                      | ↓                            | -                       | -                        | -                     | -                       |
| <i>Tsc22d3</i> | UTR5         | x       | -0,76                     | ↑                      | ↑                            | -                       | -                        | -                     | -                       |

Tabelle 5.8: Korrelationen zwischen Methylierung, Expression und Lokalisation



Es ist somit keine Korrelation zwischen DNA Methylierung und Genexpression erkennbar. Es wurden DMRs untersucht, die in unterschiedlichen Regionen des Exons und im Intron liegen. Die Expressionsveränderungen in Zusammenhang mit der Veränderung der DNA Methylierung in diesen Lokalisationen zeigen keine Korrelationen zueinander auf. Die Theorie des Gensilencing scheint nicht für DMRs in diesen Lokalisationen zu gelten. Die Identifizierung weiterer DMRs in Promotorregionen und die Untersuchung von einer Korrelation zwischen DNA Methylierung und Genexpression in diesen Regionen ist nötig, um den Einfluss von DNA Methylierung auf den Knochen besser zu verstehen. Die auf einem X-Chromosom gelegenen DMRs *Efnb1*, *Phex* und *Tsc22d3* sind ausserdem möglicherweise eingeschränkt beurteilbar, da bei unseren weiblichen Mäusen eines der beiden X-Chromosomen im Rahmen der X-Inaktivierung hypermethyliert ist.



PE-PCR-Primer for: 5' AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG  
 PE-PCR-Primer rev: 5' CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CGG TCT CGG CAT TCC TGC TGA ACC GCT CTT

PE-Sequenzier-Primer --> Sequenzen???

Adpater -->Sequenzen???

Abbildung 5.1:  
 Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte unseres RRBS-Protokolls  
 Beginnend mit dem ersten Schritt des *Msp1*-Verdau bis zur Sequenzierung

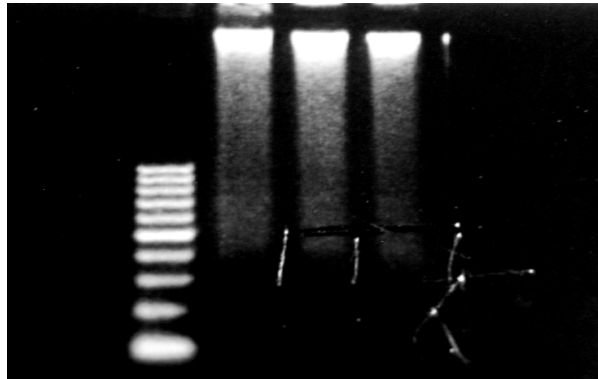


Abbildung 5.2: **Optimierung des *Msp1*-Verdaus**

Optimierung des *Msp1*-Verdaus nach unterschiedlicher Aufreinigung und unterschiedlich langen Inkubationszeiten. 2,5% TAE-Gel mit Ethidiumbromid; Lane1: 50 bp-Marker, Lane2: 1µg DNA nach 4h Verdau, Lane3 und 4: 3µg DNA nach 4h Verdau und anschließender Phenol-Chloroform-Reinigung

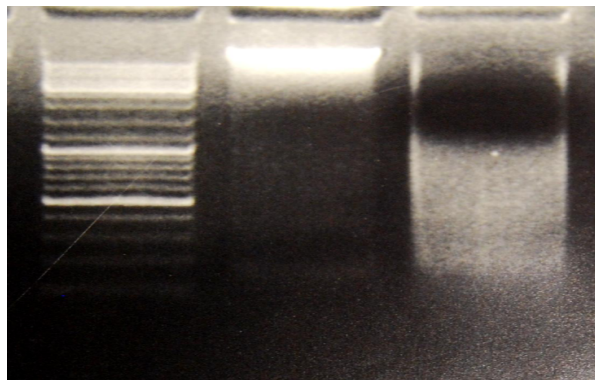


Abbildung 5.3: **Optimierung des *Msp1*-Verdaus**

Optimierung des *Msp1*-Verdaus nach Aufreinigung mit dem EURx-Kit von Roboklon. 2,5%-TAE-Gel mit Ethidiumbromid; Lane1: 1kb-Marker, Lane2: 500ng unverdaute DNA, Lane 3: 1µg DNA mit dem EURx-Kit aufgereinigte und *Msp1* verdaute DNA

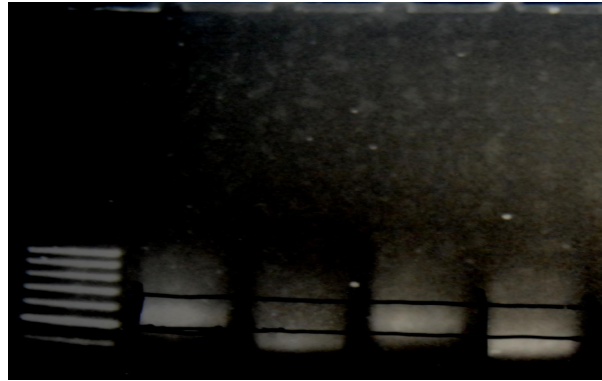


Abbildung 5.4: **Analytische PCR der neonatalen Proben**

Analytische PCR der neonatalen Proben aufgetragen auf ein 2,5%-Agarosegel mit Ethidiumbromid; Lane1: 50 bp-Marker, Lane2: Calvaria 150-250 bp, Lane3: Calvaria 250-350 bp, Lane4: Femur 150-250 bp, Lane5: Femur 250-350 bp

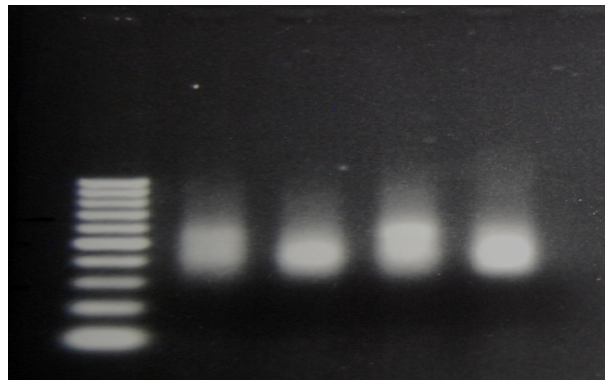


Abbildung 5.5: **Analytische PCR der adulten Proben**

Analytische PCR der neonatalen Proben aufgetragen auf ein 2,5%-Agarosegel mit Ethidiumbromid; Lane1: 50 bp-Marker, Lane2: Calvaria 150-250 bp, Lane3: Calvaria 250-350 bp, Lane4: Femur 150-250 bp, Lane5: Femur 250-350 bp

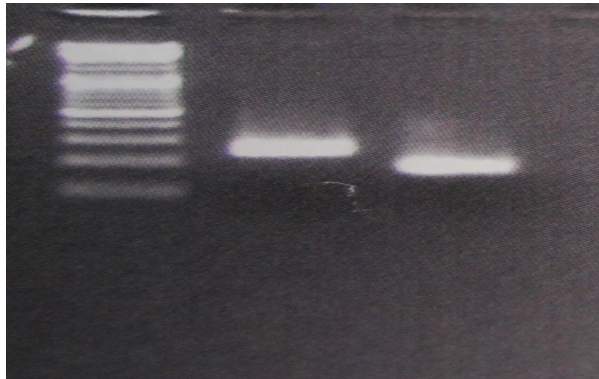


Abbildung 5.6: **Bisulfit-PCR**

Die Abbildung zeigt die Darstellung der einzigen erfolgreich durchgeführten Bisulfit-PCR. 2,5%-Agarosegel mit Ethidiumbromid; Lane1: Marker Mix, Lane2: PCR Produkt *Runx2*, Lane3: PCR Produkt *Dlx5*

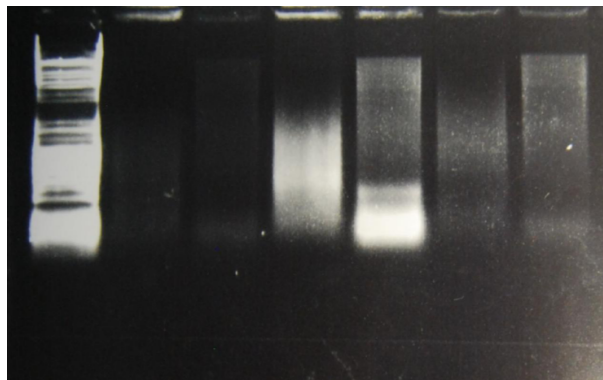


Abbildung 5.7: ***Msp1-Hpa2*-Verdau von P0, P10 und P10 Wochen alten Calvaria Proben**

Vergleichender methylierungsspezifischer Enzymverdau mit Osteoblasten aus Calvariae von 0 Tage alten, 10 Tage alten und 10 Wochen alten C57BL/6-Mäusen



Abbildung 5.8:  
Expression ausgewählter Gene der Calvaria Proben  
In dieser Abbildung wird die Expression der gewählten Gene der Calvaria Proben von  
P0, P10 und P10Wochen alten C57BL/6-Mäusen dargestellt.

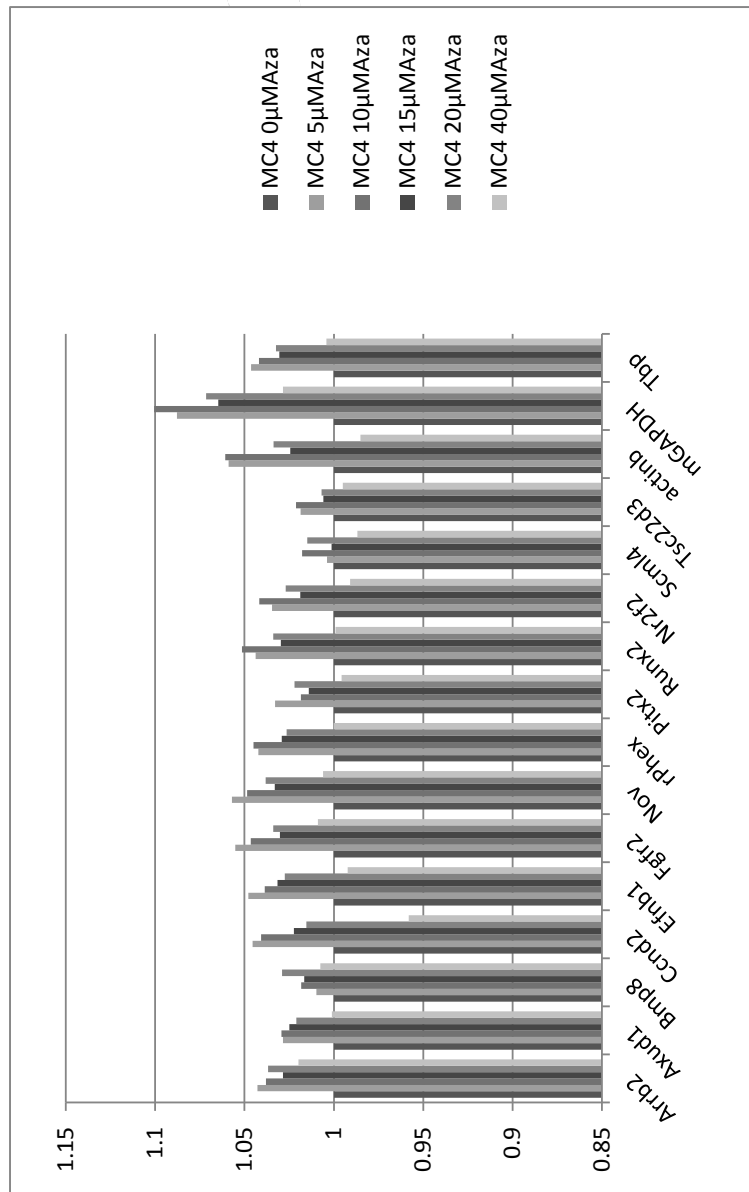


Abbildung 5.9:  
 Expression von MC3T3-E1 subclone4-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen  
 Konzentrationen 5-Azacytidin  
 In dieser Abbildung wird die Expression der gewählten Gene nach Behandlung mit den  
 Konzentrationen 0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM und 40 µM 5-Azacytidin dargestellt.

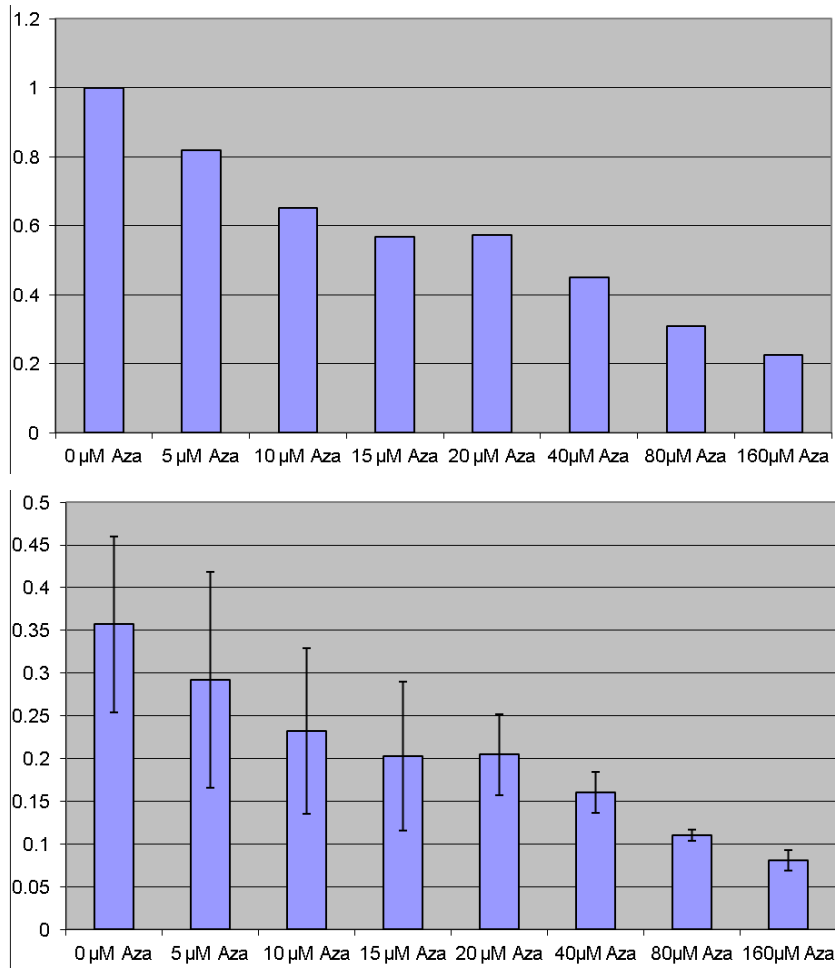


Abbildung 5.10:  
 Vitalität der pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacytidin  
 In dieser Abbildung wird die Vitalität von pCOBs nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacytidin gezeigt. Die Vitalität wurde mit einem MTT-Essay untersucht.



Abbildung 5.11:  
Expression der ausgewählten Gene während der Differenzierung von pCOBs  
In dieser Abbildung wird die Expression der ausgewählten Gene in pCOBs am Tag 0, 3,  
6, 9 und 12 dargestellt.

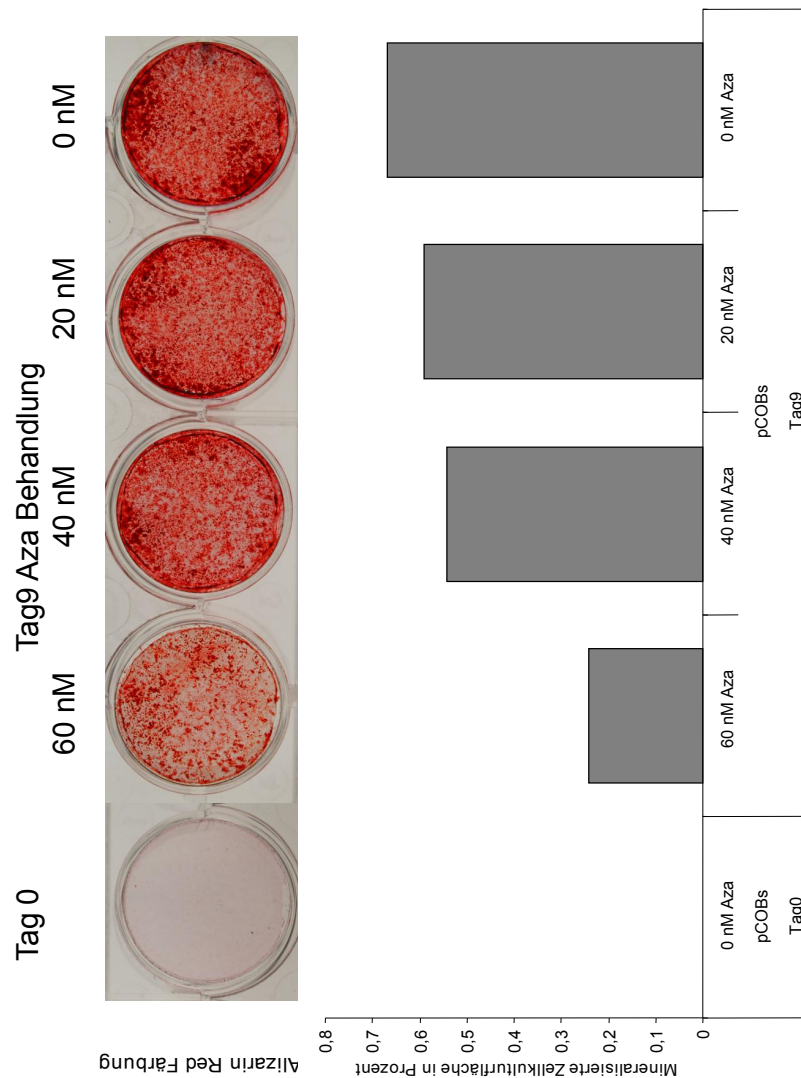


Abbildung 5.12:  
 Mineralisierung von pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacytidin  
 Alizarin Rot Färbung zur Untersuchung des Mineralisierungsverhalten von pCOBs nach  
 Behandlung mit 5-Azacytidin.

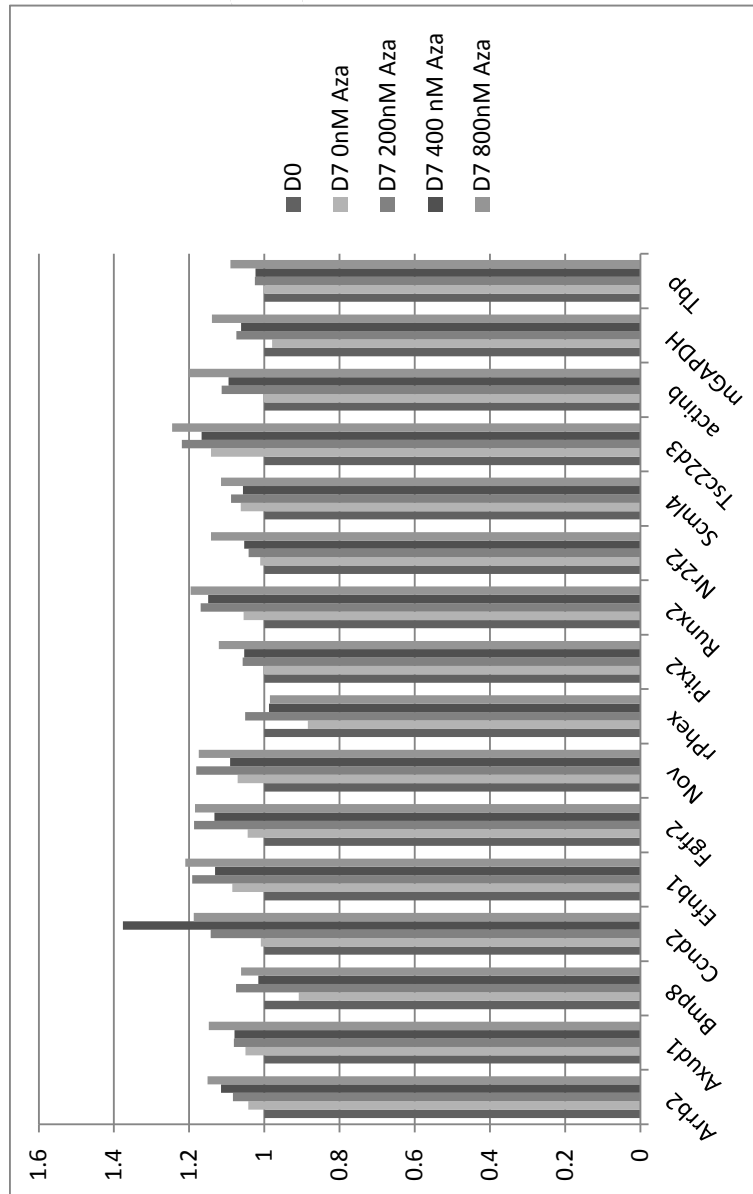


Abbildung 5.13:  
 Expression von pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacytidin  
 Die Abbildung zeigt die Expression von pCOBs am Tag 0 (D0) und am Tag 7 (D7) nach Behandlung mit 0, 200nM, 400nM und 800nM 5-Azacytidin. Die Daten wurden mit qPCR gewonnen.

# 6 Diskussion

## 6.1 DNA Methylierung

### Erstellung von Methylomen und Transkriptomen

DNA Methylierung in Promotorregionen ist ein hochrelevanter, stets modifizierbarer Mechanismus zur Regulation der Genexpression. Es gibt mittlerweile Methylom-Datenbanken, in denen analysierte Methylierungsmuster gespeichert sind[4; 31; 83]. Diese können abgerufen und mit Veränderungen in der Genexpression korreliert werden. Erschwert ist die Erstellung von Methylom-Datenbanken durch die stetige Veränderung von Methylierungsmustern während der Entwicklung, Alterung oder Karzinogenese. Im Vergleich zu Datenbanken für DNA Sequenzen ist hier weitaus wichtiger Methylierungsmuster an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten zu untersuchen, um die bestimmten Methylierungsmuster während einer Entwicklungsperiode und gewebsspezifisch unterscheiden zu können. Chatterjee et al.[16] haben beispielsweise 2014 erstmals eine Analyse von DNA Methylierungsmustern mit RRBS für Hirn und Leber des Zebrafisches durchgeführt. Es wurden dabei getrennte Methylome für weibliche und männliche Zebrafische erstellt. Ziel der Autoren ist ein besseres Verständnis und eine Vergleichbarkeit mit den bisher gewonnenen Daten von Leber und Hirn bei Säugetieren. Wichtig erschien auch die Erstellung eines ersten Datensatzes, um einen Vergleich der Methylierungsmuster nach experimentellen Versuchen zu ermöglichen[16].

Huse et al.[41] haben die humane Leber untersucht. Aufgrund der noch wenig vorhandenen Daten zur Beziehung zwischen DNA Methylierungsmustern und Genexpression in der menschlichen Entwicklung, wurde humanes fetales und adultes Lebergewebe genauer betrachtet. Es wurde jeweils ein Methylom und ein Transkriptom der Proben erstellt. Eine Untersuchung der Abhängigkeit von der Region der Methylierung zeigt einen Einfluss der DNA Methylierung vor der TSS -also in der Promotorregion- oder innerhalb des ersten Exons auf die Expression. In der Leber zeigt sich bei fast der Hälfte der CpGs ein signifikanter Methylierungsunterschied zwischen fetalen und adulten Proben. Eine Abnahme der Methylierung in diesen Regionen von fetal (hypermethyliert) zu adult (hypomethyliert) zeigt eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und der Genexpression. Im umgekehrten Fall einer Hypomethylierung in der fetalen Leber und einer Hypermethylierung in der adulten zeigte sich keine Abnahme der Genexpression. Diese Ergebnisse lassen eine unterschiedliche Funktion der DNA Methylierung in der fetalen und adulten Leber vermuten[41].

## Differentielle DNA Methylierung

Bei unserer Analyse mit RRBS wurden 166 DMRs zwischen adulten und neonatalen *Calvariae* identifiziert.

90% und somit der Hauptanteil der 166 DMRs, die Genen zugeordnet werden können, liegen innerhalb des Gens, davon 52% im Intron und 39% im Exon. Upstream, in der Promotorregion liegen lediglich 5% aller DMRs. Dies ist erstaunlich, da wir differentielle Methylierung v.a. in Promotorregionen erwarten. Meissner et al.[75] haben in einer Analyse festgestellt, dass der Großteil der methylierten Regionen entweder stark hypermethyliert oder deutlich hypomethyliert ist und besonders die CpG-reichen Regionen im Promotor meist hypomethyliert sind. Insbesondere hier haben wir Veränderungen durch Hypermethylierung bei der Alterung vermutet. Aus diesem Grund liegt ebenfalls der Fokus unserer Analyse mit RRBS auf den CpG Inseln der Promotorregionen[5].

## Einfluss durch individuelle Unterschiede

Zur Beurteilung der biologischen Relevanz unserer identifizierten DMRs spielen auch intra- und interindividuelle Muster und Veränderungen eine wichtige Rolle. Bjornsson et al.[6] haben intraindividuelle Muster innerhalb von Familien unterschiedlicher Nationalitäten untersucht und familiäre und somit wohl genetisch determinierte intraindividuelle Muster festgestellt. Eine Studie an eineigenen Zwillingen zeigt, dass die genetisch identischen Individuen in den ersten Lebensjahren auch nahezu identische epigenetische Muster aufweisen, in den späteren Lebensjahren jedoch deutliche Unterschiede aufweisen[27].

Eine weitere Unsicherheit entsteht durch interindividuelle Unterschiede. Bock et al.[8] haben deren Einfluss auf das Mapping epigenetischer Muster analysiert. Die unmethylierten CpGs, die insgesamt den Großteil im Genom ausmachen, weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Dagegen sind interindividuelle Variationen der einzelnen methylierten CpGs ohne klare Muster vorhanden. Die Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit der Untersuchung längerer Fragmente zur Identifizierung von DMRs und nicht derjenigen einzelner CpGs. Die interindividuellen Unterschiede der Methylierung einzelner CpGs stellen aufgrund unserer Ausschlusskriterien (Repräsentation von mindestens 10 CpGs pro Fragment) wenig Einfluss dar. Auch die Fragmente, die aufgrund von 5 vorhandenen reads pro Fragment ausgewählt wurden ist aufgrund unserer Poolbildung aus jeweils 5 Individuen einer Probe die Identifikation einer DMR aufgrund individueller Unterschiede unwahrscheinlich.

## DNA Methylierung anderer Gewebe

Zhang et al.[69] stellten einen Vergleich der Methylierungsmuster zwischen sieben unterschiedlichen Geweben der Maus an. Es konnten 397 gewebespezifisch differentiell methylierte Regionen (t-DMRs) identifiziert werden. Dies entspricht einem Anteil von 4% an allen CpG Inseln. Während des Alterungsprozesses gibt es eine größere Anzahl an DMRs. Beim Vergleich von Darmgewebe von 3 Monate und 35 Monate alten C57BL/6 Mäusen wurde der Methylierungsgrad von 3627 CpG Inseln analysiert. Die Ergebnisse zeigen 774 (21%) mit einer Zunahme sowie 466 (13%) mit einer Abnahme der Methylierung bei

alten Mäusen. Dies entspricht insgesamt 1 240 (34%) DMRs. Song et al.[93] untersuchte ebenfalls t-DMRs und kam ebenfalls zu der Vermutung, dass ca. 5% aller CpG Inseln t-DMRs sind.

Die Ergebnisse von Huse et al.[41] zeigen, dass in der Leber bei Alterung ausgeprägt differentielle Methylierung vorkommt und diese z.T. auch Auswirkungen auf die Expression hat. Bei der nichtalkoholischen Fettleber, die ein hohes Risiko für die Entwicklung von Leberzirrhose und einem Hepatozellulären Karzinom birgt, wurden ebenfalls signifikante Veränderungen der DNA Methylierungsmuster und assoziierter Veränderung der Transkription beobachtet[88].

Mill et al.[76] beschreiben epigenetische Veränderungen bei Depressionen; einer Erkrankung, die durch eine Kombination von genetischen und umweltbedingten Faktoren ausgelöst wird. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen und der Alzheimer Demenz wurden Veränderungen der DNA Methylierung, in neueren Studien insbesondere auch der 5-Hydroxymethylierung der Base Cytosin festgestellt[51]. Im präklinischen Stadium wird bereits S-Adenosyl-Methionin (SAM), einem Methylgruppendonor, als „second-line“ Therapie bei Depressionen und der Alzheimer Demenz getestet[45]. Beim M. Parkinson besteht neben weiteren Therapieoptionen ein großes Interesse bereits im frühen Stadium eine Diagnose zu sichern. Hierfür werden ebenfalls DNA Methylierungsmuster untersucht[42].

Auch in den Gefäßen spielt DNA Methylierung eine wichtige Rolle. DNMTs sind bedeutend für die Aufrechterhaltung der endothelialen Zellintegrität, der Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäße und lösen im Tiermodell Arteriosklerose aus[34]. Die Arteriosklerose ist eine in unserer Gesellschaft sehr häufige, multifaktoriell bedingte und altersassoziierte Erkrankung der Gefäße. Die Pathogenese der Arteriosklerose ist mit DNA Methylierung assoziiert. Bekannt ist eine differentielle Methylierung von *ER-alpha* zwischen gesunden und arteriosklerotisch veränderten Gefäßen. *ER-alpha* inhibiert u.a. die Zellproliferation. Möglich ist eine protektive Wirkung z.B. durch eine Verminderung der Zellproliferation von glatten Muskelzellen nach Verletzung der Gefäßwand[23].

Auch bei der Knochenalterung wurden bereits Veränderungen der DNA Methylierung beschrieben. Die Osteoporose ist ebenfalls eine altersassoziierte und multifaktoriell bedingte Erkrankung und es erscheint sehr wahrscheinlich, dass auch hier ein Einfluss auf deren Pathogenese durch Veränderungen der DNA Methylierung besteht[85; 100].

### 6.1.1 Differentielle Methylierung in Promotorregionen im Knochen

In unserer Untersuchung konnten neun DMRs in Promotorregionen zwischen neonatalen und adulten Calvariae identifiziert werden. Die Promotorregionen von *Cdh1*, *Zfx3*, *Cct8L1*, *Il11* und *Fgfr1* sind in den neonatalen Calvariae hypermethyliert und in den adulten hypomethyliert. Sollte im Knochen die Korrelation zwischen Promotormethylierung und Genexpression ebenso vorliegen wie in der Leber[41], würde bei diesen Genen die Genexpression im neonatalen Gewebe unterdrückt und im adulten dagegen eine Genexpression stattfinden.

Die Promotorregionen der Gene *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* und *Acn9* weisen bei den neonatalen Calvariae eine Hypomethylierung auf und bei den adulten eine Hypermethylierung.

Nach der gängigen Theorie des Genesilencing würde das eine Genexpression in der neonatalen Calvaria und eine Abnahme der Expression in der adulten Calvaria bedeuten. Huse et al.s Ergebnisse in der Leber[41] sprechen gegen eine inhibierende Wirkung der Hypermethylierung im neonatalen Gewebe auf die Genexpression.

Besonders interessant wäre es hier nun einen Vergleich zwischen Calvaria und Femur-somit Platten- und Röhrenknochen- anstellen zu können, um Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Gene auf die unterschiedliche Knochenentwicklung der beiden Knochenarten zu erhalten.

Im Folgenden werden die Funktion der einzelnen Gene sowie deren Bedeutung in Knochenstoffwechsel und -entwicklung diskutiert:

### ***Cdh1* /E-Cadherin**

E-Cadherin gehört zur Familie der Cadherine. Die Cadherine sind an der Zell-Zell-Adhäsion, Mobilität und Proliferation von epithelialen Zellen beteiligt. E-Cadherin ist an der Feinabstimmung der Zelladhäsion, -migration und der Dynamik der intrazellulären Signalkaskaden von epitheliale Gewebe in der Embryonalentwicklung beteiligt. Bekannt ist diese Rolle in der Brust, den Speicheldrüsen, Haarfollikeln, der Lunge und im Dünndarm[47]. Bisher bekannt ist, dass eine Verminderung der Genexpression durch Promotorhypermethylierung beim Prostata-Karzinom zu einer Verminderung der Genexpression und stärkerer Invasivität führt. Keil et al.[47] haben nun ergänzend die DNA Methylierung des Promotors von *Cdh1* während der Entwicklung der Prostata und deren Bedeutung untersucht. Besonders wurde die Ausbildung der Ausführungsgänge untersucht, bei denen ein invasives Wachstum in das umgebende Gewebe erfolgt und eine ähnliche Situation wie beim Karzinom vorliegt.

In einer Zellsubpopulation, die mittels Durchflusszytometrie als basale epitheliale Zellen charakterisiert werden konnten, fehlt E-Cadherin. Ausserdem wird eine Zunahme der Promotormethylierung in urogenitalen Sinusepithelzellen während der Ausbildung der Vorsteherdrüse aufgezeigt. Somit scheint die Hypermethylierung in diesen Zellen eine wesentliche Rolle in der Morphogenese der Prostata zu spielen[47].

Eine ähnliche Rolle ist sehr gut bei der Knochenentwicklung denkbar. Unsere Ergebnisse ergaben eine Hypermethylierung am Tag der Geburt. Somit ist wohl zu diesem Zeitpunkt die Unterdrückung von E-Cadherin wichtig.

Mutationen im E-Cadherin-Gen sind mit einer Karzinomentstehung assoziiert, beispielsweise beim Magen- und Mamma-Karzinom. Es wird angenommen, dass ein Funktionsverlust des Gens zu einer erhöhten Proliferation führt[2; 17; 35].

### ***Zfx3* /Zinkfingerprotein 3**

Die Zinkfingerproteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der muskulären und neuronalen Differenzierung spielen. *Zfx3* kann hierbei als Aktivator oder als Repressor auftreten und ist als Regulator der muskulären Differenzierung bekannt. Außerdem besteht eine Assoziation mit dem Prostatakarzinom und der Arteriosklerose.

Mabuchi al. wiesen ein Zusammenspiel zwischen *Runx3* und *Zfx3* -auch *Atf1* genannt-

nach, die zu einer Erhöhung der Promotoraktivität von *CDKN1A* führen. Dies führt zu einer Stimulation von *TGF-beta*[68]. Dies bedeutet, dass eine Hypermethylierung des Promotors und eine Ausschaltung der Expression des Gens -wie wir es am Tag der Geburt der Mauscalvaria finden- letztlich eine Hemmung von *TGF-beta* bewirkt. Eine Deletion von *Zfx3* in der Prostata der Maus verursacht neoplastische Veränderungen[95]. Dies legt nahe, dass eine Promotorhypermethylierung des Gens ähnliche Auswirkungen hat. Indirekt festigt dies die Vermutung, dass die Ausschaltung des Gens durch Hypermethylierung an bestimmten Entwicklungspunkten, die Knochenbildung moduliert und danach wieder abgebaut wird.

### ***Cct8l1***

*Cct8l1* ist ein Pseudogen, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist[46]. Die von uns nachgewiesene DMR im Promotor des Gens, legt eine Beteiligung im Knochenstoffwechsel nahe. Eine Validierung der Ergebnisse und weitere Untersuchungen zur besseren Beurteilung diesbezüglich sind notwendig.

### ***I11/Interleukin 11***

Interleukin 11 ist ein Zytokin. Es gehört zur Gruppe der gp130-Familie der Zytokine, die alle mindestens ein Molekül des Transmembran-Signal-Rezeptors IL6ST (auch gp130 genannt) enthalten. Bei Bindung an seinen Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Zellproliferation führt.

Die Regulation der Osteoblasten-Differenzierung durch Interleukin 11 ist bereits beschrieben worden. Bekannt ist ein Einfluss über den *AP-1*- und *Smad*-Signalweg. Eine Regulation über Promotormethylierung wurde bisher nicht untersucht[72].

Die Differenzierung zum Osteoblasten wird durch mechanischen Stress und das Parathormon angeregt; dagegen durch Alterung und hohe Glukokortikoidspiegel gehemmt. Mechanischer Stress und das Parathormon bewirken eine Zunahme der Interleukin 11 Expression durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Erhöhung des Calciumspiegels führt zu einer vermehrten Expression von fosB. fosB lagert sich in einem Komplex mit JunD an den Promotor von *I11* an und wirkt hier als Transkriptionsfaktor. Beide Mechanismen stimulieren auch die Phosphorylierung von *Smad1*. Das phosphorylierte *Smad1* bindet ebenfalls an den Interleukin 11 Promotor, bildet einen Komplex mit FosB/JunD und erhöht noch stärker die Transkription von Interleukin 11[72].

Die hohe Interleukin 11-Konzentration unterdrückt die Expression von WNT-Inhibitoren wie Dickkopf 1 und 2 und führt damit indirekt zu einer Stimulation des WNT-Signalweges. Der WNT-Signalweg führt zur Stimulation der Differenzierung der Osteoblasten[72].

Unsere Ergebnisse zeigen eine differentielle Methylierung des Promotors von Interleukin 11. Die Hypermethylierung wird am 1. Lebenstag nachgewiesen, eine Hypomethylierung dagegen bei den adulten Calvariae. Es liegt die Vermutung sehr nahe, dass die Regulation der Interleukin 11 Expression auch durch Promotormethylierung erfolgt, die z.B. dazu führt, dass die Transkriptionsfaktoren nicht mehr erfolgreich an den Promo-



tor binden können und ein „Genesilencing“ bewirken. Eine dynamische Regulation der Osteoblasten Differenzierung mit einer Hemmung sowie Stimulation in unterschiedlichen Entwicklungsstadien wird offensichtlich auch über differentielle Methylierung des Interleukin 11-Promotors verwirklicht[72].

Bisher beschrieben ist auch die Anregung der Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen und Megakaryozyten-Vorläuferzellen, was letztlich zu einer Zunahme der Thrombozytenproliferation führt. Bekannt ist auch die Beteiligung an der Proliferation von Hepatozyten als Reaktion auf einen Leberschaden.

### ***Fgfr1***

Die FGF-Familie besteht aus 18 Signalproteinen, die an vier Tyrosinkinase-Rezeptor-Moleküle (Fgfr) binden und diese aktivieren. Die Fgfs sind in der frühen Embryonalphase in den meisten Geweben differenziell exprimiert und sind wichtige Modulatoren der frühen Entwicklung und Organbildung. Bei der Knochenentwicklung sind die Fgfs essentielle Regulatoren. In adulten Geweben sind sie für die Größenregulation, Erhaltung, Reparatur und Regeneration zuständig[81].

*Fgfr1* zählt zur „Fibroblast Growth Factor Receptor“ Familie. Die Mitglieder der Familie unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Liganden sowie ihrer Verteilung im Gewebe. *Fgfr1* unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern dadurch, dass es keine zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne besitzt. Erstmals wurde *Fgfr1* im humanen Knorpel gefunden. Aufgrund seiner Struktur wird vermutet, dass er die Fgf-Rezeptoraktivität moduliert[104; 81].

Eine mit dem Protein assoziierte Erkrankung ist das Wolf-Hirschhorn Syndrom. Dieses beruht auf einer Deletion des kurzen Arms von Chromosom 4. Es ist verbunden mit Minderwuchs, einer deutlichen Entwicklungsverzögerung und unterschiedlichen Fehlbildungen[39].

*Fgfr1* ist neonatal hypermethyliert. Bei einem Genesilencing durch die Hypermethylierung wäre die Expression zu diesem Zeitpunkt folglich ausgeschaltet. In der Annahme, dass *Fgfr1* an den Fgf-Rezeptor zwar binden, diesen aber nicht aktivieren kann und somit wohl inhibiert, wäre eine Ausschaltung des Gens in diesem Stadium des aktiven Knochenwachstums erklärbar. Ebenso würde eine Hypomethylierung und damit gesteigerte Expression im Erwachsenenalter und eine Inhibierung des Fgf/Fgfr-Signalweges passen. Die Expression dieses Gens während der Ossifikation und dessen genaue Rolle ist ein guter Ansatzpunkt zum besseren Verständnis der Knochenentwicklung und theoretisch ein guter Ansatzpunkt zur Therapie, da die Ausschaltung des Gens z.B. durch si-RNAs eine Verbesserung der Mineralisation bewirken könnte[1]. Eine weitere Möglichkeit ist die Synthese eines monoklonalen Antikörpers gegen *Fgfr1*. Diese Eingriffsmöglichkeit wird beim *WNT*-Inhibitor Sclerostin bereits genutzt. Der monoklonale Antikörper „AMG 785“ gegen Sclerostin zeigte in einem Experiment mit Ratten mit postmenopausaler Osteoporose sowie einer Studie mit gesunden Männern und postmenopausalen Frauen bereits eine Verbesserung der Knochendichte und eine Inhibition von Sclerostin[82; 62].

### ***Shroom4***

*Shroom4* ist ein Mitglied der Shroom- oder APX-Familie. *Shroom4* ist in mehreren Geweben während der Embryonalentwicklung exprimiert. *Shroom4* kommt häufig zusammen mit MyosinII vor und ist an der Bildung des Aktinzytoskeletts beteiligt. *Shroom4* ist auch an der neuralen Entwicklung beteiligt und Mutationen führen zu geistigen Entwicklungsstörungen[106]. Eine aktive Beteiligung an der Regulation der Knochenentwicklung ist bisher nicht bekannt.

### ***Shc2***

Die „Src Homology and Collagen“(Shc) Proteine sind molekulare Adaptoren in Signalwegen, die durch eine Vielzahl von Rezeptoren an der Zelloberfläche beeinflusst werden. Alle Mitglieder der Shc-Familie sind in hypertrophierenden Chondrozyten vorhanden und wurden auch erstmals in Zusammenhang mit der Knochenentwicklung der Maus beschrieben[37].

### ***Pstpip1***

*Pstpip1* ist ein Protein und Mitglied der „Pombe Cdc Homology“ Familie, die als Regulatoren von Zytoskelett-Membran-Interaktionen bekannt sind. *Pstpip1* wird in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist eine Komponente der Leukozyten, die Zellmigration und Endozytose regeln[19]. Mutationen im Gen führen beim Menschen zum PAPA-Syndrom, das durch pyogene Arthritis, Pyoderma gangraenosum und Akne gekennzeichnet ist[102]. Assoziationen mit dem Knochenstoffwechsel sind nicht bekannt.

### ***Acn9***

*Acn9* ist ein Protein, das im Mitochondrium lokalisiert ist. *Acn9* ist in die Gluconeogenese involviert. Eine Rolle im Zusammenhang mit dem Gewebe Knochen wurde bisher nicht beschrieben[22].

### **Aussage**

In vielen Publikationen ist die Assoziation zwischen Promotorhypermethylierung und Genesilencing, also eine Verminderung der Expression, beschrieben worden. Jedoch führt eine Promotorhypermethylierung nicht in allen Fällen zum Genesilencing[5]. Huse et al.[41] hatten eine Verminderung der Expression des Gens in der menschlichen Leber im fetalen, hypermethylierten Gewebe nachgewiesen und eine zunehmende, invers korrelierende Expression im adulten, hypomethylierten Gewebe. Im Falle der Hypermethylierung beim Erwachsenen und Hypomethylierung des Fetus war jedoch trotz Hypermethylierung kein Genesilencing in der adulten Leber nachweisbar. Gut untersucht ist ein Genesilencing von Tumorsuppressorgenen bei der Karzinogenese. Dies tritt meist bei Erwachsenen und somit mit zunehmender Alterung auf. Somit ist eine fehlende Auswirkung einer Promotorhypermethylierung im adulten Gewebe durchaus nachgewiesen. Jedoch ist die

Karzinogenese ein unphysiologischer Zustand, bei dem ein Wiedererwachen von Signalkaskaden, die in der Entwicklung wichtig sind, beobachtet wird[47].

Es ist folglich möglich, dass bei den identifizierten Genen mit differentieller Promotormethylierung nicht immer eine Auswirkung auf die Genexpression besteht.

### 6.1.2 Differentielle Methylierung ausserhalb von Promotorregionen im Knochen

*Arrb2*, *Axud1*, *Bmp8a*, *Ccnd2*, *Efnb1*, *Fgfr2*, *Ghrhr*, *Nov*, *Phex* und *Pitx2* sind bereits als im Knochenstoffwechsel relevant beschrieben worden und weisen in unseren Ergebnissen differentielle Methylierung auf. Die DMRs dieser Gene liegen alle ausserhalb von Promotorregionen. Beim Großteil dieser Gene haben unsere Expressionsanalysen keine Veränderung der Expression nach Demethylierung mit 5-Azacidin gezeigt. Ein Zusammenhang zwischen der nicht-promotorassozierten DNA Methylierung und der Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Diese im Knochenstoffwechsel beteiligten Gene scheinen nicht über DNA Methylierung reguliert zu werden.

Es zeigt sich jedoch eine 4-fache Zunahme der Expression von *rPhex* von den P0- zu P10-Calvariaosteoblasten und anschließend ein leichter Abfall bis nach P10 Wochen. Auch *Arrb2* weist eine sehr diskrete Erhöhung der Expression von den P10- zu den P10 Wochen-Osteoblasten auf. Diese Expressionsänderungen sind jedoch nicht signifikant und lassen keinen Rückschluss auf bestimmte Regulationsmechanismen zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu.

Dagegen zeigen sich eine deutliche Abnahme der Expression von *Nov* und *Pitx2* zwischen den P0- und P10 Wochen-Calvariaosteoblasten. *Pitx2* weist eine Differenz zwischen dem Methylierungsgrad der neonatalen Probe (A) und der adulten Probe (B) von -0,37 und *Nov* von -0,33 auf. Dies zeigt, dass die DMRs bei den neonatalen Proben beider Gene hypomethyliert und bei den adulten hypermethyliert sind. Die Beobachtung ist konkordant mit der Theorie des Genesilencing[44]. Die Tatsache, dass die DMRs nicht in der Promotorregion liegen, steht dieser Vermutung eher entgegen.

Die Untersuchung mit 5-Azacidin ergibt keine Veränderung der Genexpression der untersuchten Gene. In bisherigen Studien konnte im Knochen eine Zunahme der Expression mit Demethylierung von hypermethylierten Regionen erzielt werden[58; 99]. Allerdings handelte es sich bei diesen Regionen um Bereiche innerhalb der Promotoren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine differentielle Methylierung in diesen Lokalisationen keine direkte Korrelation mit der Genexpression aufweist.

Besonders bezüglich *Nov* und *Pitx2* ist diese bewährte weitere Analyse allerdings nicht geeignet, um ein Genesilencing durch DNA Methylierung auszuschließen. Denn im Ausgangsstadium liegt neonatal eine Hypomethylierung der DMR vor und somit ist durch Demethylierung mit 5-Azacidin keine Veränderung zu erwarten. Eine stützende Aussage zur Bestätigung, dass die DNA Methylierung tatsächlich keine Veränderung der Expression bewirkt, wird nur bei den Genen *Scml4*, *Axud1*, *Bmp8a*, *Ccnd2*, *Fgfr2* und *Ghrhr* gewährleistet, da diese in den neonatalen Proben eine Hypermethylierung aufweisen.

*Nov* und *Pitx2* weisen eine differentielle Methylierung auf, die nicht in Promotorregionen

nen liegt; allerdings trotzdem eine invers korreliernde Expression im Sinne eines Genesilencing aufweist und deren Korrelation wird nicht durch die Validierung mit 5-Azacidin ausgeschlossen. Die Gene liegen beide im Exon innerhalb der kodierenden Sequenz. *Nov* besitzt fünf Exons und die sequenzierte DMR liegt nahe dem 5'-Ende des 4. Exons auf dem „Sense“-Strang. Die DMR in *Pitx2* liegt im vierten und damit letzten Exon des Gens, ebenfalls am Beginn der kodierenden Sequenz des Exons in 5'-Richtung auf dem „Sense“-Strang. Bei Huse et al. war bei der Erstellung eines Methylomes und Transkriptoms zusätzlich eine Modulation der Genexpression durch Methylierungsunterschiede im ersten Exon des Gens aufgefallen[41]. Da bei uns jeweils die letzten Exons des Gens differentiell methyliert sind, stützt diese Publikation nicht die These, dass bei *Nov* und *Pitx2* eine Regulation der Expression durch Methylierung erfolgt. Doch liefert sie einen Anhaltspunkt, dass auch eine Regulation über differentielle Methylierung im Exon und nicht nur in Promotorregionen möglich ist.

### ***Nov***

*Nov* wird in Osteoblasten exprimiert, bindet *Bmp2* und wirkt inhibitorisch auf die *Bmp2* Expression. *Bmp2* ist ein Stimulator der Osteoblastendifferenzierung durch die Induktion der Expression von *Runx2*, *Osterix*, *Alp* und *Osteocalcin*. Die Studie von Minamizato et al. legt eine Ausschaltung der Osteoblastendifferenzierung durch *Nov* über eine Interaktion mit dem Bmp- und Notch-Signalweg nahe. Rydziel et al. beschreiben einen störenden Einfluss auf den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg und eine verursachte Osteopenie durch eine übermäßige Expression von *Nov*[78; 86]. Eine deutlich erhöhte Expression besteht weder in den neonatalen, noch in den adulten Proben. Ein Genesilencing von *Nov* in den adulten Proben ist nicht nachvollziehbar. Eine signifikante Veränderung der Expression während der Differenzierung können wir ebenso nicht verzeichnen.

### ***Pitx2***

*Pitx2* ist ein Regulator in mehreren Geweben. Shiratori et al. beschreiben die Expression im Mausknochen und vermuten eine Regulation von einer Seitenassymetrie zwischen rechts und links[90].

## **6.1.3 Genexpression während der Differenzierung im Knochen**

Bei der Analyse von pCOBs, die in der Zellkultur ausdifferenziert und am Tag 0, 3, 6, 9 und 12 untersucht wurden, war eine signifikante Zunahme der Expression von *Bmp8* und *PheX* vom Tag 0 bis zum Tag 12 aufgefallen. Dagegen war in der Expression der 10 Tage und 10 Wochen-alten C57BL/6-Mauscalvariae nur noch eine geringe Expression von *Bmp8* zu verzeichnen. Bei den 10 Tage alten Calvariae besteht hingegen eine etwas höhere, jedoch nicht signifikant gesteigerte Expression von *PheX* als bei den neonatalen Proben und auch bei den 10 Wochen alten.

## ***Bmp8***

Wir konnten bei *Bmp8a* eine Hypermethylierung in den neonatalen Calvaria-Proben und eine Erniedrigung der Methylierung in den adulten Proben nachweisen. Dies legt eine Suppression der Expression in den neonatalem Knochengewebe nahe.

In einer Studie zur Untersuchung der Wirkung von Dexamethason (einem Glukokortikoid) auf die Genexpression im Knochengewebe wurden 111 Gene analysiert. Bei 6 dieser Gene, zu welchen auch *Bmp8a* zählt, ist eine signifikante Veränderung beschrieben. Da Dexamethason als Nebenwirkung die Osteoblastenfunktion inhibiert und vermutlicherweise auf diesem Weg zum Verlust von Knochengewebe führt, wurde von der Erniedrigung der Expression von *Bmp8a* nach Dexamethason-Gabe auf eine protektive Rolle von *Bmp8a* auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose von Osteoblasten geschlossen[54].

Bei einer Untersuchung der differentiellen Expression bei der Einleitung der Knorpelbildung im Röhrenknochen am Mausmodell von Cameron et. al. war die Expression von *Bmp8a* in Relation zur Bmp-Familie am stärksten verändert. Von 11,5 dpc („days post conception“) auf 13,5 dpc war die *Bmp8a*-Expression in Tibia und Fibula um das 50fache erhöht. Eine Beteiligung von *Bmp8a* an der Knorpelbildung lässt keinen Rückschluss auf die Bildung von Plattenknochen zu, da bei der desmalen Ossifikation eine Knorpelbildung nicht vorkommt[12]. Jedoch legt die bei uns in der Zellkultur nachgewiesene Expressionserhöhung während der Differenzierung vom Tag 0 bis zum Tag 12 nahe, dass *Bmp8* an der Knochenbildung beim Röhren- und Plattenknochen beteiligt ist.

Eine Expressionsveränderung durch Demethylierung der MC3T3-E1 subclone4-Zellen und pCOBs mit 5-Azacidin konnten wir jedoch nicht feststellen. Die Lokalisation der DMR ausserhalb des Promotors spricht ebenso dafür, dass die Expression von *Bmp8* nicht über DNA Methylierung reguliert wird.

## ***PheX***

*PheX* ist eine Endopeptidase, die von Osteoblasten exprimiert wird. *PheX* spaltet *Fgf23*, das die Phosphatausscheidung in der Niere anregt, im Blutkreislauf zirkuliert und den Fgf/Fgfr-Signalweg im Knochen aktiviert. Die Mutation von *PheX* führt somit zu einem erhöhten *Fgf23*-Spiegel. Mutationen von *PheX* führen insgesamt zu Defekten bei der Knochenmineralisierung und einer Hypophosphatämie[71]. Der Fgf/Fgfr-Signalweg dient in der frühen Embryonalentwicklung dem Knochenwachstum und der Entwicklung[81].

## **6.2 Analyse von DNA Methylierung**

### **6.2.1 Analyse von DNA Methylierung mit NGS**

Dieses Projekt veranschaulicht die neuen Möglichkeiten, die durch die „Next Generation“ Sequenzierung gewonnen worden sind. Während in den Vorprojekten stets eine prozentuell kaum erwähnenswerte Anzahl an Genpromotoren im Knochenstoffwechsel untersucht wurde, konnte hier erfolgreich eine Methode etabliert werden, mit der die Analyse von > 80% aller CpG Inseln in Promotorregionen und viele weitere Regionen in einem Ansatz erfasst werden.

## 6.2.2 Vergleich mit anderen Methoden

Ning Li et al. führten mit humanen mononukleären Blutzellen eine gesamtgenomische Bisulfit Sequenzierung durch und verwendeten die gewonnenen Methylierungsdaten als Referenz. Vom selben Spender wurden weitere Blutzellen entnommen und Methylierungsmuster mit methylierungsspezifischer DNA-Immunoprecipitation (MeDIP-Seq) und Methyl-Bindedomänen (MBD-Seq) Sequenzierung untersucht. Beim Menschen ergab das bei 45 Basenpaare Leselänge 3 Gigabasenpaare. Diese Menge wurde als minimale und kosteneffiziente Möglichkeit DNA Methylierungsmuster zu analysieren angesehen. Im Vergleich sind beide Methoden ähnlich geeignet hierfür. Beim RRBS ist beim Menschen bei einer Leselänge von 51 Basen eine Sequenzierung von nur 5,5 Megabasen notwendig, um 10% aller CpG-Dinukleotide und eine Repräsentation von 83% aller CpG Inseln zu erhalten. Außerdem spricht für RRBS die optimale Auflösung, bei der jede Base einzeln untersucht wird[61; 91].

## 6.2.3 RRBS mit *Msp1*

Theoretisch liefert RRBS mit *Msp1* bei einer Leselänge von 100 Basenpaaren eine Abdeckung von 13 883 und somit 87% aller murinen CpG Inseln. Die Methode ist mittlerweile etabliert und wird gerne zur Erstellung eines Methylomes z.B. zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten verwendet[41].

Alle Methoden zur Analyse von DNA Methylierung bringen Vor- und Nachteile mit sich. Beim RRBS wird der bedeutendste Vorteil des NGS, nämlich die „High-Throughput“-Sequenzierung und die Möglichkeit in einem Ansatz genomweit zu sequenzieren genutzt. Der Nachteil, der dadurch entstehenden hohen Kosten und die Generierung sehr großer Datenmengen, wird durch die Reduktion der Fragmente und die Anreicherung der für die Methylierungsanalyse interessanten Promotorregionen deutlich verbessert.

Ein Nachteil des RRBS ist das komplexe Protokoll, das zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung erforderlich ist. Bei der Sequenzierung mit Illumina GA ist zunächst eine Fragmentierung der DNA-Proben notwendig. Beim RRBS erfolgt zur Auswahl bestimmter Fragmente aus dem Gesamtgenom eine Größenselektion mittels Elektrophorese im Agarosegel mit anschließender Aufreinigung aus dem Agarosegel. Desweiteren müssen die Fragmentenden „repariert“ werden und mehrfach die Base Adenin angehängt werden, um die für die Sequenzierung notwendigen Adapter an die Enden der Fragmente ligieren zu können. Die Adapter sind notwendig für die „Bridgeamplification“, einem wichtigen Schritt bei der Illumina-Sequenzierung. Zur Analyse von DNA Methylierungsmustern ist zusätzlich die Bisulfit-Behandlung mit mehreren weiteren nachfolgenden Reinigungsschritten unumgänglich. Diese vielen Schritte bringen neben dem hohen personellen Arbeitsaufwand eine erhöhte Anfälligkeit für Fehler sowie einen Verlust von DNA mit sich.

### Proben

Besonders relevant für RRBS ist der vollständige Enzymverdau der DNA der Probe mit *Msp1*. Hierfür muss bereits eine sehr saubere Aufreinigung der DNA aus dem Gewebe

erfolgen. Die Selektion der Fragmente im TAE-Gel erfordert besonders viele zusätzliche Reinigungsschritte, die ebenfalls einen hohen Verlust von DNA bedingen. Wir benötigen für das RRBS Protokoll eine DNA-Mindestmenge von 5 µg DNA einer Probe. Die Calvaria einer C57BL/6-Maus liefert maximal 1 µg DNA. Es ist somit häufig die Präparation mehrerer Tiere und die Bildung eines Pools notwendig, um eine ausreichende Menge an Proben-DNA zu erreichen.

Bei unseren Calvaria- und Femurproben ist die Präparation von jeweils 5 Tieren notwendig. Die DNA-Menge von neonatalen und adulten Calvariae ist dabei ähnlich, da die Calvaria neonataler Mäuse zwar in der Größenrelation wesentlich kleiner, dafür aber sehr zellreich ist. Schwieriger bis nahezu unmöglich wird das Erreichen dieser Grundmenge dagegen bei spezifischen Fragestellungen, bei denen nur wenige Proben zur Verfügung stehen, oder Geweben, die sehr zellarm oder anatomisch sehr klein sind.

Eine Sequenzierung der Femur-Proben war nicht erfolgreich. Es besteht der Verdacht, dass die Ursache hierfür durch die Schwierigkeit ausreichend Probenmaterial in guter Qualität zu gewinnen mitbedingt war. Die Auswertung der Analytischen PCR spricht dagegen für eine ausreichende Menge und Qualität und legt eine Ursache anderer Art nahe.

### **Analytische PCR**

Eine weitere Schwierigkeit der Methode ist den Erfolg der einzelnen Schritte und die Qualität der Probe vor Sequenzierung zu überprüfen. Smith et al.[91] verwenden zur Kontrolle der erfolgreichen Adapterligation, grober Abschätzung des Enzymverdaus und erfolgreicher Fragmentlängen Selektion die „Analytische PCR“. Die erwarteten Satellitenherde nach der Gelelektrophorese bei ca. 120, 150 und 250 Basenpaaren sind in unseren Ergebnissen nicht erkennbar. Das Fehlen der Satellitenherde spricht für eine etwas verminderte Qualität der Library, da die Fragmente nicht exakt der theoretisch zu erwartenden und gewünschten Verteilung von CpG-reichen Fragmenten nach *Msp1*-Verdau entspricht. Eine mögliche Ursache ist ein unvollständiger Verdau mit *Msp1*. Dies ist jedoch aufgrund der durchgeführten Optimierung des Enzymverdaus mit *Msp1* unwahrscheinlich. Ebenso möglich wäre das Auftragen einer zu großen DNA-Menge auf das Elektrophoresegel oder eine zu kleinflächige Auftrennung, sodass die durchaus vorhandenen Satellitenherde nicht erkennbar sind.

### **Größenselektion**

Im Vergleich mit dem Resultat der „Analytischen PCR“ von Smith et al. fällt ausserdem auf, dass bei uns auch etwas kürzere und längere Fragmente ober- und unterhalb des bei der Größenselektion ausgeschnittenen Bereichs dargestellt werden. Die präzise Extraktion der Fragmente aus dem TAE Gel ist ein schwieriger Schritt. Trotz sehr sauberen Arbeitens ist die exakte Selektion bei exakt 150, 250 und 350 bp mit der Methode nicht möglich. Bei unsauberem Arbeiten ist gar eine Verunreinigung mit Fragmenten nicht gewünschter Längen denkbar.

Insgesamt schmälert die zusätzliche Sequenzierung von gering kürzeren und längeren

Fragmenten die Qualität der Methode nicht. Die Folge ist ein etwas höherer Durchsatz bei der Sequenzierung. Eine Konsequenz bei der Schwierigkeit die Fragmentlängen präzise auszuschneiden, ergibt sich jedoch wenn die Fragmente zu eng ausgeschnitten werden. Fehlen die Fragmentlängen um 150 und um 350 bp, wird eine geringere Anzahl von CpG Inseln untersucht als im Protokoll von Smith et al.[91] dargestellt und von uns angezielt. Die Größenselektion ist somit ein Schritt, bei dem sauberes Arbeiten hochrelevant ist und zum Erreichen des gewünschten Ergebnisses nicht zu eng, sondern eher großzügig ausgeschnitten werden muss.

Eine möglicher Verbesserungsversuch bezüglich der Größenselektion wäre eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel. Dies könnte besonders eine Verbesserung der Aufreinigung der Fragmente aus dem Gel ermöglichen. Ebenso ist eine Verbesserung der Präzision beim Ausschneiden der gewünschten Fragmentlängen mit dem Skalpell denkbar. Diese Veränderung könnte eine geringe bis mäßige Verbesserung dieses Schrittes bewirken. Eine deutliche Verbesserung ist jedoch nicht zu erwarten.

#### 6.2.4 Validierung der differentiell methylierten Regionen

Trotz Veränderung nahezu aller Parameter bei der PCR und mit einem Versuch mit bereits erfolgreich verwendeten und publizierten Bisulfit-Primern war es nicht möglich ein erfolgreiches Annealing bei der PCR zu erreichen und ein Produkt mit der Bisulfit-PCR zu erhalten. Das Annealing der Primer ist allgemein ein kritischer Schritt bei der PCR. Sind mehrere Basen zwischen Primern und DNA-Sequenz nicht übereinstimmend, erfolgt in der Regel kein Annealing. Erschwert ist ein Annealing z.B. auch bei einer mehrfach repetitiven einzelnen Base innerhalb des Primers. Bei der Bisulfit-PCR besteht einmal das Problem, dass die Basen nicht exakt zueinander passen, da in der Bisulfit-konvertierten DNA auch die Base Uracil vorliegt, und zudem finden sich innerhalb der Promotoren zusätzlich vermehrt Cytosin und Guanin. Außerdem erfolgt durch die Bisulfit-Konversion eine Umwandlung aller nichtmethylierten Cytosine zu Uracil, das der Base Thymin ähnlich ist und somit zu einem sehr hohen prozentuellen Anteil an Thymin führt.

Alle diese Faktoren führen zu einem erschwerten Annealing bei einer Bisulfit-PCR, die den ersten Schritt zur Validierung mit der „Ultradeep-Bisulfite“-Sequenzierung darstellt.

Heute ist durch die Entwicklung von Kits dieser kritische Schritt des Annealings bei der Bisulfit-PCR unkompliziert geworden und die Validierung mit Ultradeep-Bisulfit-Sequenzierung keine Limitation mehr. Der genaue Inhalt der speziellen Zusatzsubstanzen für eine effektive Bisulfit-PCR, die diese Kits enthalten, ist offiziell nicht bekannt.

Wir haben als alternative Validierung einen *Msp1-Hpa2*-Verdau durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich genomweite Änderungen der CpG-Methylierung zu visualisieren. Allein die Methylierung eines bestimmten Gens kann man auf diesem Wege nicht bestätigen.



## 6.2.5 Statistische Auswertung der Datensätze

Unsere DMRs wurden nach den in Kapitel 5.3 beschriebenen Kriterien definiert und ausgewählt.

Die bioinformatische Auswertung ergab 605 differentiell methylierte Fragmente. 451 dieser Fragmenten konnten bekannten Genen zugeordnet werden, 154 wurden als hypothetisches Protein, unklassifizierbar oder als cDNA zugeordnet.

Zhang et al.[110] beschreiben in ihrer Publikation Möglichkeiten der Auswertung und Zusammenfassung von Methylierungsdaten. Sie kommen zum Rückschluss, dass Methylierungsdaten auf eine andere Art ausgewertet werden müssen als die meisten biologischen Daten wie z.B. diejenigen der Genexpression. Die Ursache liegt erstens darin, dass Methylierung entweder in einer Skala von 0 zu 1 oder 0 bis 100% gemessen werden kann und außerdem nach einer bimodalen Verteilung erfolgt.

Zur weiteren statistischen Auswertung der Daten haben wir vergleichend folgende Möglichkeiten erwogen:

1. Auswertung mit t-test: Bedingung  $p < 0,001$
2. mindestens 5 reads je gemapptem Fragment, sodass jedes CpG, das mit einbezogen wird mindestens 5 mal analysiert wurde
3. die Analyse von mindestens 10 CpGs je gemapptem Fragment
4. Kombination von 2. und 3.

Bei der Anwendung des t-Tests erhält man lediglich ca. 10 DMRs. Ein Grund hierfür liegt sicher in der erhöhten Varianz, da bei der Präparation von *Calvariae* ein Mischgewebe mit mesenchymalen Zellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten vorliegt und keine 100%ig reine Zellkultur aus Osteoblasten erhalten wird. Ein weiterer Grund liegt in unserer Analyse. In der vorbeschriebenen Publikation wurden jeweils 8 Aliquots der Proben auf dem Illumina Genome Analyzer untersucht. Wir haben uns zunächst auf die Analyse eines Aliquots auf nur einer „lane“ entschieden. Somit wurde eine weit geringere Anzahl der jeweiligen Fragmente sequenziert. Bei Smith et al.[91] wurden dagegen die 8 Aliquots der Probe auf 8 „lanes“ aufgetragen.

Bei Anwendung der Kriterien 2. und 3. erhält man jeweils mehr differentiell methylierte Fragmente. Bei einer Kombination von Kriterium 2. und 3. erhält man 166 DMRs.

## 6.3 Zusammenfassung und Ausblick

### Zusammenfassung

Das RRBS-Protokoll konnte erfolgreich etabliert und ein Durchlauf mit NGS von adulten und neonatalen *Calvariae* durchgeführt werden.

RRBS zeigt sich als sehr vielversprechende Methode. Man erhält durch die Sequenzierung von einer kleinen ausgewählten Menge an DNA eine Abdeckung von 87% und somit einem Großteil aller CpG Inseln. Die technische Umsetzung des Vorbereitungsprotokolls ist aufwändig und beinhaltet sehr viele Aufbereitungs- und Reinigungsschritte, welche mit einem hohen DNA Verlust verbunden sind. Auch die Anfälligkeit für Fehler wächst.

Für das ausgewählte Ziel der Erstellung eines Methyloms für ein Gewebe, aus dem eine ausreichende Menge an DNA gewonnen werden kann, ist die Methode sehr gut geeignet.

Die Zielstellung ein erstes Methylom für das Gewebe Knochen der Maus zu erstellen wurde erreicht. Etwas limitiert wird dieser Erfolg durch die leider nicht erfolgreiche Analyse der Femora und somit eine Einschränkung auf die Calvaria. Wir nehmen an, dass nicht alle DMRs, die es zwischen neonatalen und adulten Calvariae gibt, identifiziert werden konnten, da erstens die Methode RRBS gewählt wurde und bewusst nicht komplett gesamtgenomisch, sondern mit Fokus auf CpG Inseln sequenziert wurde. Zweitens kann aufgrund der reduzierten Analyse von jeweils nur einem Aliquot der Proben, die Abdeckung etwas niedriger als 87% sein.

Wir konnten mit der Methode 166 DMRs zwischen den neonatalen und adulten Calvariae identifizieren. Gewünscht war eine weitere Identifizierung von DMRs zwischen neonatalen und adulten Femora sowie DMRs jeweils zwischen neonatalen und adulten Calvariae und Femora, die leider nicht durchgeführt werden konnte. Unter den 166 DMRs liegen neun DMRs innerhalb von Promotorregionen -nämlich *E-Cadherin*, *Zfx3*, *Cct8l1*, *Interleukin 11*, *Fgfr11*, *Shroom4*, *Shc2*, *Pstpip1* und *Acn9*. Diese spielen z.T. bereits bekannte Rollen im Knochenstoffwechsel und in der -entwicklung. Hier konnten wir nun einen neuen, meist bisher noch unbekanntem Regulationsmechanismus der Expression dieser Gene identifizieren.

Zwei weitere möglicherweise über DNA Methylierung regulierten Gene mit im Exon liegenden DMRs konnten mit *Nov* und *Pitx2* analysiert werden. Diese weisen eine inverse Korrelation zwischen DNA Methylierung und Expression auf.

Desweiteren konnten bei der Expressionsanalyse während der Differenzierung eine signifikante Expressionszunahme von *Bmp8* und *Phex* mit zunehmender Differenzierung festgestellt werden. Diese beiden Proteine scheinen jedoch nicht über DNA Methylierung reguliert zu werden.

Eine unerwartete Schwierigkeit war die Validierung der identifizierten DMRs. Die nun nicht spezifisch für einzelne Regionen erfolgte Validierung der DMRs vermindert leider die Aussagekraft unserer Ergebnisse. Zur Beurteilung der definitiven Rolle im Knochenstoffwechsel ist diesbezüglich eine Validierung der einzelnen DMRs erforderlich. Alternativ haben wir zur besseren Interpretation einen vergleichenden *Msp1-Hpa2*-Verdau durchgeführt, um die genomweite Veränderung der CpG Methylierung zu drei unterschiedlichen Entwicklungspunkten darzustellen.

## Ausblick

Die Untersuchung von DNA Methylierungsmustern spielt weiterhin eine wichtige Rolle zur Beurteilung der Regulation von Stoffwechselforgängen, Entwicklung, Alterung und Tumorentstehung.

Immer wichtiger wird zudem eine Identifizierung von therapeutischen Angriffspunkten, insbesondere für die Tumorthapie. Besonders in der Hämatologie gibt es bereits etablierte Therapieverfahren, deren Fokus DNA Methylierung ist[48]. Die Weiterentwicklung und Optimierung sowie das Auffinden von neuen Ansatzpunkten ist hochaktuell. Zahnow

et al. beschreiben die z.B. neuerdings durchgeführten Kombinationstherapien, die synergistisch DNA Methylierung und die Histonkonformation angreifen, um epigenetische Veränderungen noch effizienter zu modulieren[109; 108].

Für Knochenerkrankungen ist besonders die Steigerung der Mineralisierung wichtig. Bei uns führt die gesamtgenomische Demethylierung zu einer Verschlechterung der Mineralisierung.

Mit der Analyse von DMRs kann die Identifizierung von neuen Regulationsmechanismen im Knochenstoffwechsel und neuen an der Regulation beteiligten Proteinen erfolgen. Beispielsweise kann als neuer Ansatzpunkt für eine Verbesserung der Mineralisierungsfähigkeit der Zellen das nun identifizierte *Fgfr11* weiter untersucht werden. Besonders auch die Untersuchung von DMRs zwischen gesundem und krankhaft verändertem Knochengewebe erscheint als vielversprechender neuer Ansatz.

Von 2010 bis heute hat sich die „Next Generation“ Sequenzierung in fast ebenso schneller Weise weiterentwickelt. Mit der Entwicklung der Halbleitertechnik ist nun die Sequenzierung des gesamten Genoms in noch kürzerer Zeit, kostengünstiger und in deutlich kleineren Geräten möglich. Diese Entwicklung bedeutet auch eine Vereinfachung der Bisulfit-Sequenzierung und führte u.a. zur Erstellung von kommerziellen Kits, die eine Durchführung der Bisulfit-PCR zur Validierung heute einfach machen.

Der nächste Schritt, der nun folgen wird, ist die Erstellung von Methylomen und korrespondierenden Transkriptomen für mehrere Entwicklungsstufen der Knochenentwicklung und -alterung. Bei einigen anderen Gewebe ist dies bereits schon früher erfolgt[110].

Wir konnten in diesem Projekt nun erstmals eine genomweite Analyse von DNA Methylierung im Knochen durchführen. Wir konnten hierbei einige neue DMRs zwischen neonatalem und adultem Gewebe identifizieren. Die Ergebnisse stützen die These, dass die Untersuchung von DNA Methylierung wichtig zum Verständnis des Knochenstoffwechsels insbesondere während Entwicklung und Alterung ist. Um die Bedeutung der DMRs verstehen zu können, ist die Untersuchung ihres Einflusses auf die Genregulation und die biologische Rolle dieses Regulationsmechanismus notwendig.

## Abbildungsverzeichnis

|      |                                                                                     |    |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1  | Methylierung von Cytosin . . . . .                                                  | 11 |
| 2.2  | Schematische Darstellung des <i>WNT/Beta-Catenin</i> -Signalwegs . . . . .          | 17 |
| 2.3  | Prinzip des RRBS . . . . .                                                          | 22 |
| 5.1  | Die einzelnen Schritte unseres RRBS-Protokolls . . . . .                            | 58 |
| 5.2  | <i>Msp1</i> Verdau Optimierung . . . . .                                            | 59 |
| 5.3  | <i>Msp1</i> Verdau Optimierung . . . . .                                            | 59 |
| 5.4  | Analytische PCR der neonatalen Proben . . . . .                                     | 60 |
| 5.5  | Analytische PCR der adulten Proben . . . . .                                        | 60 |
| 5.6  | Bisulfit-PCR . . . . .                                                              | 61 |
| 5.7  | <i>Msp1-Hpa2</i> -Verdau von P0, P10 und P10 Wochen alten Calvaria Proben . . . . . | 61 |
| 5.8  | Expression ausgewählter Gene der Calvaria Proben . . . . .                          | 62 |
| 5.9  | Expression von MC3T3-E1 subclone4-Zellen nach 5-Azacitidin . . . . .                | 63 |
| 5.10 | Vitalität der pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacitidin . . . . .                      | 64 |
| 5.11 | Expression der ausgewählten Gene während der Differenzierung von pCOBs . . . . .    | 65 |
| 5.12 | Mineralisierung von PCOBs nach Behandlung mit 5-Azacitidin . . . . .                | 66 |
| 5.13 | Expression von pCOBs nach Behandlung mit 5-Azacitidin . . . . .                     | 67 |

## Tabellenverzeichnis

|     |                                                                            |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 | Differentiell methylierte Fragmente 1 . . . . .                            | 44 |
| 5.2 | Differentiell methylierte Fragmente 2 . . . . .                            | 45 |
| 5.3 | Differentiell methylierte Fragmente 3 . . . . .                            | 46 |
| 5.4 | Differentiell methylierte Fragmente 4 . . . . .                            | 47 |
| 5.5 | Differentiell methylierte Fragmente 5 . . . . .                            | 48 |
| 5.6 | Differentiell methylierte Fragmente 6 . . . . .                            | 49 |
| 5.7 | Differentiell methylierte Promotorregionen . . . . .                       | 50 |
| 5.8 | Korrelationen zwischen Methylierung, Expression und Lokalisation . . . . . | 56 |

# Literaturverzeichnis

- [1] ALIABADI, Hamidreza Montazeri M. ; MAHDIPOOR, Parvin ; BISOFFI, Marco ; HUGH, Judith C. ; ULUDAG, Hasan: Single and Combinational siRNA Therapy of Cancer Cells: Probing Changes in Targeted and non-Targeted Mediators after siRNA Treatment. In: *Molecular pharmaceuticals* (2016), November. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802596>. – ISSN 1543–8392
- [2] ANNUNZIATO, Stefano ; KAS, Sjors M. ; NETHE, Micha ; YÜCEL, Hatice ; DEL BRAVO, Jessica ; PRITCHARD, Colin ; BIN ALI, Rahmen ; GERWEN, Bas van ; SITEUR, Bjørn ; DRENTH, Anne Paulien P. ; SCHUT, Eva ; VEN, Marieke van d. ; BOELENS, Mirjam C. ; KLARENBEK, Sjoerd ; HUIJBERS, Ivo J. ; MILTENBURG, Martine H. ; JONKERS, Jos: Modeling invasive lobular breast carcinoma by CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing of the mammary gland. In: *Genes & development* 30 (2016), Juni, Nr. 12, 1470–1480. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340177>. – ISSN 1549–5477
- [3] AZHIKINA, T. L. ; SVERDLOV, E. D.: Study of tissue-specific CpG methylation of DNA in extended genomic loci. In: *Biochemistry (Mosc)*. 70(5) (2005), Mai. <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v70/full/70050722.html>
- [4] BERNSTEIN, Bradley E. ; STAMATOYANNOPOULOS, John A. ; COSTELLO, Joseph F. ; REN, Bing ; MILOSAVLJEVIC, Aleksandar ; MEISSNER, Alexander ; KELIS, Manolis ; MARRA, Marco A. ; BEAUDET, Arthur L. ; ECKER, Joseph R. ; FARNHAM, Peggy J. ; HIRST, Martin ; LANDER, Eric S. ; MIKKELSEN, Tarjei S. ; THOMSON, James A.: The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. In: *Nature biotechnology* 28 (2010), Oktober, Nr. 10, 1045–1048. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1010-1045>. – DOI 10.1038/nbt1010-1045. – ISSN 1546–1696
- [5] BIRD, Adrian P. ; WOLFFE, Alan P.: Methylation-Induced Repression—Belts, Braces, and Chromatin. In: *Cell* 99 (2014), August, Nr. 5, 451–454. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81532-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81532-9). – DOI 10.1016/s0092-8674(00)81532-9
- [6] BJORNSSON, Hans T. ; SIGURDSSON, Martin I. ; FALLIN, M. D. ; IRIZARRY, Rafael A. ; ASPELUND, Thor ; CUI, Hengmi ; YU, Wenqiang ; RONGIONE, Michael A. ; EKSTRÖM, Tomas J. ; HARRIS, Tamara B. ; LAUNER, Lenore J. ; EIRIKSDOTTIR, Gudny ; LEPPERT, Mark F. ; SAPIENZA, Carmen ; GUDNASON, Vilmundur ; FEINBERG, Andrew P.: Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. In: *JAMA* 299 (2008), Juni, Nr. 24, 2877–2883. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.299.24.2877>. – DOI 10.1001/jama.299.24.2877. – ISSN 1538–3598
- [7] BOCHEVA, Georgeta ; BOYADJIEVA, Nadka: Epigenetic regulation of fetal bone development and placental transfer of nutrients: progress for osteoporosis. In: *Interdisciplinary toxicology* 4 (2011), Dezember, Nr. 4, 167–172. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319250>. – ISSN 1337–9569
- [8] BOCK, Christoph ; WALTER, Jörn ; PAULSEN, Martina ; LENGAUER, Thomas: Inter-individual variation of DNA methylation and its implications for large-scale epigenome mapping. In: *Nucleic acids research* 36 (2008), Juni, Nr. 10, e55+. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn122>. – DOI 10.1093/nar/gkn122. – ISSN 1362–4962
- [9] BONEWALD, Lynda F.: The amazing osteocyte. In: *J Bone Miner Res* 26 (2011), Februar, Nr. 2, 229–238. <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.320>. – DOI 10.1002/jbmr.320

- [10] BOYLE, Patrick ; CLEMENT, Kendell ; GU, Hongcang ; SMITH, Zachary ; ZILLER, Michael ; FOSTEL, Jennifer ; HOLMES, Laurie ; MELDRIM, Jim ; KELLEY, Fontina ; GNIRKE, Andreas ; MEISSNER, Alexander: Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling. In: *Genome Biology* 13 (2012), Oktober, Nr. 10, R92+. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r92>. – DOI 10.1186/gb-2012-13-10-r92. – ISSN 1465-6906
- [11] BURGERS, Travis A. ; WILLIAMS, Bart O.: Regulation of Wnt/-catenin signaling within and from osteocytes. In: *Bone* 54 (2013), Juni, Nr. 2, 244-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.02.022>. – DOI 10.1016/j.bone.2013.02.022. – ISSN 1873-2763
- [12] CAMERON, Trevor L. ; BELLUOCIO, Daniele ; FARLIE, Peter G. ; BRACHVOGEL, Bent ; BATEMAN, John F.: Global comparative transcriptome analysis of cartilage formation in vivo. In: *BMC developmental biology* 9 (2009), März, Nr. 1, 20+. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213x-9-20>. – DOI 10.1186/1471-213x-9-20. – ISSN 1471-213X
- [13] CARVIN, Christopher D. ; PARR, Rebecca D. ; KLADDE, Michael P.: Siteselective in vivo targeting of cytosine5 DNA methylation by zincfinger proteins. In: *Nucleic Acids Research* 31 (2003), November, Nr. 22, 6493-6501. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg853>. – DOI 10.1093/nar/gkg853
- [14] CENTRELLA, Michael ; MCCARTHY, Thomas L.: Estrogen receptor dependent gene expression by osteoblasts - direct, indirect, circumspect, and speculative effects. In: *Steroids* 77 (2012), Februar, Nr. 3, 174-184. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093482>. – ISSN 1878-5867
- [15] CHAN, Simon W-L W. ; ZILBERMAN, Daniel ; XIE, Zhixin ; JOHANSEN, Lisa K. ; CARRINGTON, James C. ; JACOBSEN, Steven E.: RNA silencing genes control de novo DNA methylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (2004), Februar, Nr. 5662. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1095989>. – DOI 10.1126/science.1095989. – ISSN 1095-9203
- [16] CHATTERJEE, Aniruddha ; STOCKWELL, Peter A. ; HORSFIELD, Julia A. ; MORISON, Ian M. ; NAKAGAWA, Shinichi: Base-resolution DNA methylation landscape of zebrafish brain and liver. In: *Genomics data* 2 (2014), Dezember, 342-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2014.10.008>. – DOI 10.1016/j.gdata.2014.10.008. – ISSN 2213-5960
- [17] CHRISTGEN, Matthias ; STEINEMANN, Doris ; KÜHNLE, Elna ; LÄNGER, Florian ; GLUZ, Oleg ; HARBECK, Nadia ; KREIPE, Hans: Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. In: *Pathology, research and practice* 212 (2016), Juli, Nr. 7, 583-597. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233940>. – ISSN 1618-0631
- [18] COKUS, Shawn J. ; FENG, Suhua ; ZHANG, Xiaoyu ; CHEN, Zugen ; MERRIMAN, Barry ; HAUDENSCHILD, Christian D. ; PRADHAN, Sriharsa ; NELSON, Stanley F. ; PELLEGRINI, Matteo ; JACOBSEN, Steven E.: Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. In: *Nature* 452 (2008), März, Nr. 7184, 215-219. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06745>. – DOI 10.1038/nature06745. – ISSN 1476-4687
- [19] COOPER, Kate M. ; BENNING, David A. ; HUTTENLOCHER, Anna: The PCH family member proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 targets to the leukocyte uropod and regulates directed cell migration. In: *Molecular biology of the cell* 19 (2008), August, Nr. 8, 3180-3191. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480402>. – ISSN 1939-4586
- [20] CRAIG, David W. ; PEARSON, John V. ; SZELINGER, Szabolcs ; SEKAR, Aswin ; REDMAN, Margot ; CORNEVEAUX, Jason J. ; PAWLOWSKI, Traci L. ; LAUB, Trisha ; NUNN, Gary ; STEPHAN, Dietrich A. ; HOMER, Nils ; HUENTELMAN, Matthew J.: Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing. In: *Nature methods* 5 (2008), Oktober, Nr. 10, 887-893. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1251>. – DOI 10.1038/nmeth.1251. – ISSN 1548-7105

- [21] DELGADO-CALLE, Jesús ; RIANCHO, José A.: The role of DNA methylation in common skeletal disorders. In: *Biology* 1 (2012), Nr. 3, 698–713. <http://dx.doi.org/10.3390/biology1030698>. – DOI 10.3390/biology1030698. – ISSN 2079–7737
- [22] DENNIS, R. A. ; McCAMMON, M. T.: Acn9 is a novel protein of gluconeogenesis that is located in the mitochondrial intermembrane space. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 261 (1999), April, Nr. 1, 236–243. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103055>. – ISSN 0014–2956
- [23] DONG, Chunming ; YOON, Woohyun ; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, Pascal J.: DNA methylation and atherosclerosis. In: *The Journal of nutrition* 132 (2002), August, Nr. 8 Suppl. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163701>. – ISSN 0022–3166
- [24] EADS, C. A. ; DANENBERG, K. D. ; KAWAKAMI, K. ; SALTZ, L. B. ; BLAKE, C. ; SHIBATA, D. ; DANENBERG, P. V. ; LAIRD, P. W.: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. In: *Nucleic acids research* 28 (2000), April, Nr. 8, e32–00. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.8.e32>. – DOI 10.1093/nar/28.8.e32. – ISSN 1362–4962
- [25] EHRLICH, Melanie: Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. In: *J. Cell. Biochem.* 88 (2003), April, Nr. 5, 899–910. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.10464>. – DOI 10.1002/jcb.10464
- [26] ESTELLER, Manel: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. In: *Nat Rev Genet* 8 (2007), April, Nr. 4, 286–298. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2005>. – DOI 10.1038/nrg2005. – ISSN 1471–0056
- [27] FRAGA, Mario F. ; BALLESTAR, Esteban ; PAZ, Maria F. ; ROPERO, Santiago ; SETIEN, Fernando ; BALLESTAR, Maria L. ; HEINE-SUÑER, Damia ; CIGUDOSA, Juan C. ; URIOSTE, Miguel ; BENITEZ, Javier ; BOIX-CHORNET, Manuel ; SANCHEZ-AGUILERA, Abel ; LING, Charlotte ; CARLSSON, Emma ; POULSEN, Pernille ; VAAG, Allan ; STEPHAN, Zarko ; SPECTOR, Tim D. ; WU, Yue-Zhong Z. ; PLASS, Christoph ; ESTELLER, Manel: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Juli, Nr. 30, 10604–10609. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0500398102>. – DOI 10.1073/pnas.0500398102. – ISSN 0027–8424
- [28] GALLI, C. ; PASSERI, G. ; MACALUSO, G. M.: Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. In: *Journal of dental research* 89 (2010), April, Nr. 4, 331–343. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200416>. – ISSN 1544–0591
- [29] GARDLIK, Roman: Inducing pluripotency using in vivo gene therapy. In: *Medical hypotheses* 79 (2012), August, Nr. 2, 197–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2012.04.034>. – DOI 10.1016/j.mehy.2012.04.034. – ISSN 1532–2777
- [30] GRÜNHAGEN, Johannes ; BHUSHAN, Raghu ; DEGENKOLBE, Elisa ; JÄGER, Marten ; KNAUS, Petra ; MUNDLOS, Stefan ; ROBINSON, Peter N. ; OTT, Claus-Eric E.: MiR-497195 cluster microRNAs regulate osteoblast differentiation by targeting BMP signaling. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 30 (2015), Mai, Nr. 5, 796–808. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407900>. – ISSN 1523–4681
- [31] GU, Hongchang ; SMITH, Zachary D. ; BOCK, Christoph ; BOYLE, Patrick ; GNIRKE, Andreas ; MEISSNER, Alexander: Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. In: *Nat. Protocols* 6 (2011), März, Nr. 4, 468–481. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.190>. – DOI 10.1038/nprot.2010.190. – ISSN 1750–2799
- [32] GUO, Hongshan ; ZHU, Ping ; YAN, Liying ; LI, Rong ; HU, Boqiang ; LIAN, Ying ; YAN, Jie ; REN, Xiulian ; LIN, Shengli ; LI, Junsheng ; JIN, Xiaohu ; SHI, Xiaodan ; LIU, Ping ; WANG,

- Xiaoye ; WANG, Wei ; WEI, Yuan ; LI, Xianlong ; GUO, Fan ; WU, Xinglong ; FAN, Xiaoying ; YONG, Jun ; WEN, Lu ; XIE, Sunney X. ; TANG, Fuchou ; QIAO, Jie: The DNA methylation landscape of human early embryos. In: *Nature* 511 (2014), Juli, Nr. 7511, 606–610. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13544>. – DOI 10.1038/nature13544. – ISSN 0028–0836
- [33] GUO-SHUN ZHOU, Xiao-Lei Z.: 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation. In: *Cytotechnology* (2009), Juni. <http://www.springerlink.com/content/v0466t160h7111t3/>
- [34] HAI, Zhang ; ZUO, Wang: Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 456 (2016), Mai, 69–74. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944567>. – ISSN 1873–3492
- [35] HALLOWELL, Nina ; BADGER, Shirlene ; RICHARDSON, Sue ; CALDAS, Carlos ; HARDWICK, Richard H. ; FITZGERALD, Rebecca C. ; LAWTON, Julia: An investigation of the factors affecting high-risk individuals' decision-making about prophylactic total gastrectomy and surveillance for hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). In: *Familial cancer* (2016), Juni. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27256430>. – ISSN 1573–7292
- [36] HATCHWELL, Eli ; GREALLY, John M.: The potential role of epigenomic dysregulation in complex human disease. In: *Trends in genetics : TIG* 23 (2007), November, Nr. 11, 588–595. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.010>. – DOI 10.1016/j.tig.2007.08.010. – ISSN 0168–9525
- [37] HAWLEY, Steve P. ; WILLS, Melanie K. ; RABALSKI, Adam J. ; BENDALL, Andrew J. ; JONES, Nina: Expression patterns of ShcD and Shc family adaptor proteins during mouse embryonic development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 240 (2011), Januar, Nr. 1, 221–231. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21117147>. – ISSN 1097–0177
- [38] HENDERSON, Ian R. ; JACOBSEN, Steven E.: Epigenetic inheritance in plants. In: *Nature* 447 (2007), Mai, Nr. 7143, 418–424. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05917>. – DOI 10.1038/nature05917. – ISSN 1476–4687
- [39] HIRSCHHORN, K. ; COOPER, H. L. ; FIRSCHEIN, I. L.: Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. In: *Humangenetik* 1 (1965), Nr. 5, 479–482. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5895684>. – ISSN 0018–7348
- [40] HO, Kok L. ; MCNAE, Iain W. ; SCHMIEDEBERG, Lars ; KLOSE, Robert J. ; BIRD, Adrian P. ; WALKINSHAW, Malcolm D.: MeCP2 Binding to DNA Depends upon Hydration at Methyl-CpG. In: *Molecular Cell* 29 (2015), April, Nr. 4, 525–531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.028>. – DOI 10.1016/j.molcel.2007.12.028. – ISSN 10972765
- [41] HUSE, Susan M. ; GRUPPUSO, Philip A. ; BOEKELHEIDE, Kim ; SANDERS, Jennifer A.: Patterns of gene expression and DNA methylation in human fetal and adult liver. In: *BMC genomics* 16 (2015), Nr. 1. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2066-3>. – DOI 10.1186/s12864-015-2066-3. – ISSN 1471–2164
- [42] JAKUBOWSKI, Jennifer L. ; LABRIE, Viviane: Epigenetic Biomarkers for Parkinson's Disease: From Diagnostics to Therapeutics. In: *Journal of Parkinson's disease* (2016), Oktober. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27792016>. – ISSN 1877–718X
- [43] JEDDELOH, Jeffrey ; GREALLY, John ; RANDO, Oliver: Reduced-representation methylation mapping. In: *Genome Biology* 9 (2008), September, Nr. 8, 231+. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-231>. – DOI 10.1186/gb-2008-9-8-231. – ISSN 1465–6906



- [44] JONES, P. L. ; WOLFFE, A. P.: Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. In: *Seminars in cancer biology* 9 (1999), Oktober, Nr. 5, 339–347. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547342>. – ISSN 1044–579X
- [45] KARAS KUŽELIČKI, Nataša: S-Adenosyl Methionine in the Therapy of Depression and Other Psychiatric Disorders. In: *Drug development research* (2016), September. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27594595>. – ISSN 0272–4391
- [46] KAWAI, J. ; SHINAGAWA, A. ; SHIBATA, K. ; YOSHINO, M. ; ITOH, M. ; ISHII, Y. ; ARAKAWA, T. ; HARA, A. ; FUKUNISHI, Y. ; KONNO, H. ; ADACHI, J. ; FUKUDA, S. ; AIZAWA, K. ; IZAWA, M. ; NISHI, K. ; KIYOSAWA, H. ; KONDO, S. ; YAMANAKA, I. ; SAITO, T. ; OKAZAKI, Y. ; GOJOBORI, T. ; BONO, H. ; KASUKAWA, T. ; SAITO, R. ; KADOTA, K. ; MATSUDA, H. ; ASHBURNER, M. ; BATALOV, S. ; CASAVANT, T. ; FLEISCHMANN, W. ; GAASTERLAND, T. ; GISSI, C. ; KING, B. ; KOCHIWA, H. ; KUEHL, P. ; LEWIS, S. ; MATSUO, Y. ; NIKAIDO, I. ; PESOLE, G. ; QUACKENBUSH, J. ; SCHRIML, L. M. ; STAUBLI, F. ; SUZUKI, R. ; TOMITA, M. ; WAGNER, L. ; WASHIO, T. ; SAKAI, K. ; OKIDO, T. ; FURUNO, M. ; AONO, H. ; BALDARELLI, R. ; BARSH, G. ; BLAKE, J. ; BOFFELLI, D. ; BOJUNGA, N. ; CARNINCI, P. ; BONALDO, M. F. ; BROWNSTEIN, M. J. ; BULT, C. ; FLETCHER, C. ; FUJITA, M. ; GARIBOLDI, M. ; GUSTINCICH, S. ; HILL, D. ; HOFMANN, M. ; HUME, D. A. ; KAMIYA, M. ; LEE, N. H. ; LYONS, P. ; MARCHIONNI, L. ; MASHIMA, J. ; MAZZARELLI, J. ; MOMBAERTS, P. ; NORDONE, P. ; RING, B. ; RINGWALD, M. ; RODRIGUEZ, I. ; SAKAMOTO, N. ; SASAKI, H. ; SATO, K. ; SCHÖNBACH, C. ; SEYA, T. ; SHIBATA, Y. ; STORCH, K. F. ; SUZUKI, H. ; TOYO-OKA, K. ; WANG, K. H. ; WEITZ, C. ; WHITTAKER, C. ; WILMING, L. ; WYNshaw-BORIS, A. ; YOSHIDA, K. ; HASEGAWA, Y. ; KAWAJI, H. ; KOHTSUKI, S. ; HAYASHIZAKI, Y. ; RIKEN GENOME EXPLORATION RESEARCH GROUP PHASE II TEAM AND THE FANTOM CONSORTIUM: Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. In: *Nature* 409 (2001), Februar, Nr. 6821, 685–690. <http://dx.doi.org/10.1038/35055500>. – DOI 10.1038/35055500. – ISSN 0028–0836
- [47] KEIL, Kimberly P. ; ABLER, Lisa L. ; MEHTA, Vatsal ; ALTMANN, Helene M. ; LAPORTA, Jimena ; PLISCH, Erin H. ; SURESH, M. ; HERNANDEZ, Laura L. ; VEZINA, Chad M.: DNA methylation of E-cadherin is a priming mechanism for prostate development. In: *Developmental biology* 387 (2014), März, Nr. 2, 142–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.020>. – DOI 10.1016/j.ydbio.2014.01.020. – ISSN 1095–564X
- [48] KENEALY, Melita ; PATTON, Nigel ; FILSHIE, Robin ; NICOL, Andrew ; HO, Shir-Jing J. ; HERTZBERG, Mark ; MILLS, Tony ; PROSSER, Ian ; LINK, Emma ; COWAN, Linda ; ZANNINO, Diana ; SEYMOUR, John F.: Results of a phase II study of thalidomide and azacitidine in patients with clinically advanced myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and low blast count acute myeloid leukemia (AML). In: *Leukemia & lymphoma* (2016), Juni, 1–10. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268068>. – ISSN 1029–2403
- [49] KIEFER, Julie C.: Epigenetics in development. In: *Dev. Dyn.* 236 (2007), April, Nr. 4, 1144–1156. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21094>. – DOI 10.1002/dvdy.21094. – ISSN 1058–8388
- [50] KIM, Kyoung Min M. ; LIM, Sung-Kil K.: Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. In: *Current opinion in pharmacology* 16 (2014), Juni, 133–141. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24907412>. – ISSN 1471–4973
- [51] KLEIN, Hans-Ulrich U. ; DE JAGER, Philip L.: Uncovering the Role of the Methylome in Dementia and Neurodegeneration. In: *Trends in molecular medicine* 22 (2016), August, Nr. 8, 687–700. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423266>. – ISSN 1471–499X
- [52] KO, Jung Min M.: Genetic syndromes associated with overgrowth in childhood. In: *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 18 (2013), September, Nr. 3, 101–105. <http://dx.doi.org/10.6065/apem.2013.18.3.101>. – DOI 10.6065/apem.2013.18.3.101. – ISSN 2287–1012

- [53] KORESSAAR, Triinu ; REMM, Mairo: Enhancements and modifications of primer design program Primer3. In: *Bioinformatics* 23 (2007), Mai, Nr. 10, 1289–1291. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>. – DOI 10.1093/bioinformatics/btm091. – ISSN 1460–2059
- [54] KÓSA, János P. ; KIS, Adrián ; BÁCSI, Krisztián ; BALLA, Bernadett ; NAGY, Zsolt ; TAKÁCS, István ; SPEER, Gábor ; LAKATOS, Péter: The protective role of bone morphogenetic protein-8 in the glucocorticoid-induced apoptosis on bone cells. In: *Bone* 48 (2011), Mai, Nr. 5, 1052–1057. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277400>. – ISSN 1873–2763
- [55] LAIRD, Alexander ; THOMSON, John P. ; HARRISON, David J. ; MEEHAN, Richard R.: 5-hydroxymethylcytosine profiling as an indicator of cellular state. In: *Epigenomics* 5 (2013), Dezember, Nr. 6, 655–669. <http://dx.doi.org/10.2217/epi.13.69>. – DOI 10.2217/epi.13.69. – ISSN 1750–192X
- [56] LAO, Victoria V. ; DARWANTO, Agus ; SOWERS, Lawrence C.: Impact of Base Analogues within a CpG Dinucleotide on the Binding of DNA by the Methyl-Binding Domain of MeCP2 and Methylation by DNMT1. In: *Biochemistry* 49 (2010), November, Nr. 47, 10228–10236. <http://dx.doi.org/10.1021/bi1011942>. – DOI 10.1021/bi1011942
- [57] LAURENT, Louise ; WONG, Eleanor ; LI, Guoliang ; HUYNH, Tien ; TSIRIGOS, Aristotelis ; ONG, Chin Thing T. ; LOW, Hwee Meng M. ; KIN SUNG, Ken Wing W. ; RIGOUTSOS, Isidore ; LORING, Jeanne ; WEI, Chia-Lin L.: Dynamic changes in the human methylome during differentiation. In: *Genome research* 20 (2010), März, Nr. 3, 320–331. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.101907.109>. – DOI 10.1101/gr.101907.109. – ISSN 1549–5469
- [58] LEE, Ji Yun Y. ; LEE, Yu Mi M. ; KIM, Mi Jin J. ; CHOI, Je Yong Y. ; PARK, Eui Kyun K. ; KIM, Shin Yoon Y. ; LEE, Sam Poong P. ; YANG, Jae Sup S. ; KIM, Dong Sun S.: Methylation of the mouse Dlx5 and Osx gene promoters regulates cell type-specific gene expression. In: *Molecules and cells* 22 (2006), Oktober, Nr. 2, 182–188. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085970>. – ISSN 1016–8478
- [59] LEHRBACH, Dárcio Matenhauer M. ; NITA, Marcelo Eidi E. ; CECCONELLO, Ivan: Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. In: *Arquivos de gastroenterologia* 40 (2003), Nr. 4, 256–261. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264049>. – ISSN 0004–2803
- [60] LI, Long-Cheng C. ; DAHIYA, Rajvir: MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 18 (2002), November, Nr. 11, 1427–1431. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>. – DOI 10.1093/bioinformatics/18.11.1427. – ISSN 1367–4803
- [61] LI, Ning ; YE, Mingzhi ; LI, Yingrui ; YAN, Zhixiang ; BUTCHER, Lee M. ; SUN, Jihua ; HAN, Xu ; CHEN, Quan ; ZHANG, Xiuqing ; WANG, Jun: Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology. In: *Methods* (2010), April. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.04.009>. – DOI 10.1016/j.ymeth.2010.04.009. – ISSN 10462023
- [62] LI, Xiaodong ; OMINSKY, Michael S. ; WARMINGTON, Kelly S. ; MORONY, Sean ; GONG, Jianhua ; CAO, Jin ; GAO, Yongming ; SHALHOUB, Victoria ; TIPTON, Barbara ; HALDANKAR, Raj ; CHEN, Qing ; WINTERS, Aaron ; BOONE, Tom ; GENG, Zhaopo ; NIU, Qing-Tian T. ; KE, Hua Zhu Z. ; KOSTENUK, Paul J. ; SIMONET, W. S. ; LACEY, David L. ; PASZTY, Chris: Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24 (2009), April, Nr. 4, 578–588. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049336>. – ISSN 1523–4681

- [63] LIN, Jane M. ; COLLINS, Patrick J. ; TRINKLEIN, Nathan D. ; FU, Yutao ; XI, Hualin ; MYERS, Richard M. ; WENG, Zhiping: Transcription factor binding and modified histones in human bidirectional promoters. In: *Genome Research* 17 (2007), Juni, Nr. 6, 818–827. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.5623407>. – DOI 10.1101/gr.5623407. – ISSN 1088–9051
- [64] LISTER, Ryan ; ECKER, Joseph R.: Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. In: *Genome research* 19 (2009), Juni, Nr. 6, 959–966. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.083451.108>. – DOI 10.1101/gr.083451.108. – ISSN 1088–9051
- [65] LISTER, Ryan ; PELIZZOLA, Mattia ; DOWEN, Robert H. ; HAWKINS, R. D. ; HON, Gary ; TONTI-FILIPPINI, Julian ; NERY, Joseph R. ; LEE, Leonard ; YE, Zhen ; NGO, Que-Minh M. ; EDSALL, Lee ; ANTOSIEWICZ-BOURGET, Jessica ; STEWART, Ron ; RUOTTI, Victor ; MILLAR, A. H. ; THOMSON, James A. ; REN, Bing ; ECKER, Joseph R.: Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. In: *Nature* 462 (2009), November, Nr. 7271, 315–322. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08514>. – DOI 10.1038/nature08514. – ISSN 1476–4687
- [66] LOGAN, Catriona Y. ; NUSSE, Roel: THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (2004), Nr. 1, 781–810. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>. – DOI 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126. – ISSN 1081–0706
- [67] LONG, Fanxin: Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (2012), Januar, Nr. 1, 27–38. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189423>. – ISSN 1471–0080
- [68] MABUCHI, Motoshi ; KATAOKA, Hiromi ; MIURA, Yutaka ; KIM, Tae-Sun S. ; KAWAGUCHI, Makoto ; EBI, Masahide ; TANAKA, Mamoru ; MORI, Yoshinori ; KUBOTA, Eiji ; MIZUSHIMA, Takashi ; SHIMURA, Takaya ; MIZOSHITA, Tsutomu ; TANIDA, Satoshi ; KAMIYA, Takeshi ; ASAI, Kiyofumi ; JOH, Takashi: Tumor suppressor, AT motif binding factor 1 (ATBF1), translocates to the nucleus with runt domain transcription factor 3 (RUNX3) in response to TGF-beta signal transduction. In: *Biochemical and biophysical research communications* 398 (2010), Juli, Nr. 2, 321–325. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599712>. – ISSN 1090–2104
- [69] MAEGAWA, Shinji ; HINKAL, George ; KIM, Hyun Soo S. ; SHEN, Lanlan ; ZHANG, Li ; ZHANG, Jiexin ; ZHANG, Nianxiang ; LIANG, Shoudan ; DONEHOWER, Lawrence A. ; ISSA, Jean-Pierre P.: Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. In: *Genome research* 20 (2010), März, Nr. 3, 332–340. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.096826.109>. – DOI 10.1101/gr.096826.109. – ISSN 1549–5469
- [70] MARINI, Francesca ; CIANFEROTTI, Luisella ; BRANDI, Maria Luisa L.: Epigenetic Mechanisms in Bone Biology and Osteoporosis: Can They Drive Therapeutic Choices? In: *International journal of molecular sciences* 17 (2016), Nr. 8. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529237>. – ISSN 1422–0067
- [71] MARTIN, Aline ; LIU, Shiguang ; DAVID, Valentin ; LI, Hua ; KARYDIS, Anastasios ; FENG, Jian Q. ; QUARLES, L. D.: Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. In: *FASEB journal* 25 (2011), August, Nr. 8, 2551–2562. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507898>. – ISSN 1530–6860
- [72] MATSUMOTO, Toshio ; KURIWAKA-KIDO, Rika ; KONDO, Takeshi ; ENDO, Itsuro ; KIDO, Shinsuke: Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. In: *Endocrine journal* 59 (2012), Nr. 2, 91–101. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931225>. – ISSN 1348–4540

- [73] MEISSNER, A.: DNA Methylation dynamics during in vivo differentiation of blood and skin stem cells. <http://ac.els-cdn.com/S1097276512005448/1-s2.0-S1097276512005448-main.pdf?tid=13c8a316-a914-11e2-a46c-0000aacb36238;acdnat=1366391627adabc90921f7556b0b6f9f18dd47c24e>
- [74] MEISSNER, Alexander ; GNIRKE, Andreas ; BELL, George W. ; RAMSAHOYE, Bernard ; LANDER, Eric S. ; JAENISCH, Rudolf: Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. In: *Nucleic acids research* 33 (2005), Nr. 18, 5868–5877. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki901>. – DOI 10.1093/nar/gki901. – ISSN 1362–4962
- [75] MEISSNER, Alexander ; MIKKELSEN, Tarjei S. ; GU, Hongcang ; WERNIG, Marius ; HANNA, Jacob ; SIVACHENKO, Andrey ; ZHANG, Xiaolan ; BERNSTEIN, Bradley E. ; NUSBAUM, Chad ; JAFFE, David B. ; GNIRKE, Andreas ; JAENISCH, Rudolf ; LANDER, Eric S.: Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. In: *Nature* 454 (2008), August, Nr. 7205, 766–770. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07107>. – DOI 10.1038/nature07107. – ISSN 1476–4687
- [76] MILL, J. ; PETRONIS, A.: Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. In: *Molecular psychiatry* 12 (2007), September, Nr. 9, 799–814. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001992>. – DOI 10.1038/sj.mp.4001992. – ISSN 1359–4184
- [77] MILOSAVLJEVIC, Aleksandar: Putting epigenome comparison into practice. In: *Nat Biotech* 28 (2010), Oktober, Nr. 10, 1053–1056. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1010-1053>. – DOI 10.1038/nbt1010-1053. – ISSN 1087–0156
- [78] MINAMIZATO, Tokutaro ; SAKAMOTO, Kei ; LIU, Tingjiao ; KOKUBO, Hiroki ; KATSUBE, Ken-ichi ; PERBAL, Bernard ; NAKAMURA, Seiji ; YAMAGUCHI, Akira: CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. In: *Biochemical and biophysical research communications* 354 (2007), März, Nr. 2, 567–573. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17250806>. – ISSN 0006–291X
- [79] MORTAZAVI, Ali ; WILLIAMS, Brian A. ; MCCUE, Kenneth ; SCHAEFFER, Lorian ; WOLD, Barbara: Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. In: *Nat Meth* 5 (2008), Juli, Nr. 7, 621–628. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1226>. – DOI 10.1038/nmeth.1226. – ISSN 1548–7105
- [80] OKANO, M. ; BELL, D. W. ; HABER, D. A. ; LI, E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. In: *Cell* 99 (1999), Oktober, Nr. 3, 247–257. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141>. – ISSN 0092–8674
- [81] ORNITZ, David M. ; MARIE, Pierre J.: Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. In: *Genes & development* 29 (2015), Juli, Nr. 14, 1463–1486. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220993>. – ISSN 1549–5477
- [82] PADHI, Desmond ; JANG, Graham ; STOUCH, Brian ; FANG, Liang ; POSVAR, Edward: Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (2011), Januar, Nr. 1, 19–26. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593411>. – ISSN 1523–4681
- [83] RAKYAN, Vardhman K. ; DOWN, Thomas A. ; BALDING, David J. ; BECK, Stephan: Epigenome-wide association studies for common human diseases. In: *Nature reviews. Genetics* 12 (2011), Juli, Nr. 8, 529–541. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3000>. – DOI 10.1038/nrg3000. – ISSN 1471–0064
- [84] REIK, W. ; DEAN, W. ; WALTER, J.: Epigenetic reprogramming in mammalian development. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (2001), August, Nr. 5532, 1089–1093.

<http://dx.doi.org/10.1126/science.1063443>. – DOI 10.1126/science.1063443. – ISSN 0036–8075

- [85] ROFORTH, Matthew M. ; FUJITA, Koji ; MCGREGOR, Ulrike I. ; KIRMANI, Salman ; MCCREARY, Louise K. ; PETERSON, James M. ; DRAKE, Matthew T. ; MONROE, David G. ; KHOSLA, Sundeep: Effects of age on bone mRNA levels of sclerostin and other genes relevant to bone metabolism in humans. In: *Bone* 59 (2014), Februar, 1–6. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184314>. – ISSN 1873–2763
- [86] RYDZIEL, Sheila ; STADMEYER, Lisa ; ZANOTTI, Stefano ; DURANT, Deena ; SMERDEL-RAMOYA, Anna ; CANALIS, Ernesto: Nephroblastoma overexpressed (Nov) inhibits osteoblastogenesis and causes osteopenia. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (2007), Juli, Nr. 27, 19762–19772. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17500060>. – ISSN 0021–9258
- [87] SCHAEFER, Matthias ; HAGEMANN, Sabine ; HANNA, Katharina ; LYKO, Frank: Azacytidine Inhibits RNA Methylation at DNMT2 Target Sites in Human Cancer Cell Lines. In: *Cancer Research* 69 (2009), Oktober, Nr. 20, 8127–8132. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-0458>. – DOI 10.1158/0008-5472.can-09-0458
- [88] SCHIÖTH, Helgi B. ; BOSTRÖM, Adrian ; MURPHY, Susan K. ; ERHART, Wiebke ; HAMPE, Jochen ; MOYLAN, Cynthia ; MWINYI, Jessica: A targeted analysis reveals relevant shifts in the methylation and transcription of genes responsible for bile acid homeostasis and drug metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. In: *BMC genomics* 17 (2016), Juni. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27301979>. – ISSN 1471–2164
- [89] SHI, Huidong ; MAIER, Sabine ; NIMMIRICH, Inko ; YAN, Pearly S. ; CALDWELL, Charles W. ; OLEK, Alexander ; HUANG, Tim Hui-Ming H.: Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications. In: *Journal of cellular biochemistry* 88 (2003), Januar, Nr. 1, 138–143. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461783>. – ISSN 0730–2312
- [90] SHIRATORI, Hidetaka ; YASHIRO, Kenta ; IWAI, Naomi ; OKI, Shinya ; MINEGISHI, Katsura ; IKAWA, Yayoi ; KANATA, Kohei ; HAMADA, Hiroshi: Self-regulated left-right asymmetric expression of Pitx2c in the developing mouse limb. In: *Developmental biology* 395 (2014), November, Nr. 2, 331–341. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224222>. – ISSN 1095–564X
- [91] SMITH, Zachary D. ; GU, Hongcang ; BOCK, Christoph ; GNIRKE, Andreas ; MEISSNER, Alexander: High-throughput bisulfite sequencing in mammalian genomes. In: *Methods* 48 (2009), Juli, Nr. 3, 226–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.05.003>. – DOI 10.1016/j.ymeth.2009.05.003. – ISSN 10462023
- [92] SMITH, Zachary D. ; MEISSNER, Alexander: DNA methylation: roles in mammalian development. In: *Nat Rev Genet* 14 (2013), März, Nr. 3, 204–220. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3354>. – DOI 10.1038/nrg3354. – ISSN 1471–0056
- [93] SONG, Fei ; SMITH, Joseph F. ; KIMURA, Makoto T. ; MORROW, Arlene D. ; MATSUYAMA, Tomoki ; NAGASE, Hiroki ; HELD, William A.: Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), März, Nr. 9, 3336–3341. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408436102>. – DOI 10.1073/pnas.0408436102
- [94] SPADA, F.: DNA methylation-mediated epigenetic control. <http://www.molecularbrain.com/content/pdf/1756-6606-4-5.pdf>
- [95] SUN, Xiaodong ; FU, Xiaoying ; LI, Jie ; XING, Changsheng ; FRIERSON, Henry F. ; WU, Hao ; DING, Xiaokun ; JU, Tongzhong ; CUMMINGS, Richard D. ; DONG, Jin-Tang T.: Deletion of atbf1/zfhx3 in mouse prostate causes neoplastic lesions, likely by attenuation of membrane and

- secretory proteins and multiple signaling pathways. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 16 (2014), Mai, Nr. 5, 377–389. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934715>. – ISSN 1476–5586
- [96] TAYLOR, Kristen H. ; KRAMER, Robin S. ; DAVIS, J. W. ; GUO, Juyuan ; DUFF, Deiter J. ; XU, Dong ; CALDWELL, Charles W. ; SHI, Huidong: Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. In: *Cancer research* 67 (2007), September, Nr. 18, 8511–8518. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-1016>. – DOI 10.1158/0008-5472.can-07-1016. – ISSN 0008-5472
- [97] TOMINAGA, K.: Genetics of cellular senescence. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (2002), April, Nr. 8, 927–936. [http://dx.doi.org/10.1016/s0047-6374\(02\)00030-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0047-6374(02)00030-1). – DOI 10.1016/s0047-6374(02)00030-1. – ISSN 00476374
- [98] UNTERGASSER, Andreas ; CUTCUTACHE, Ioana ; KORESSAAR, Triinu ; YE, Jian ; FAIRCLOTH, Brant C. ; REMM, Mairo ; ROZEN, Steven G.: Primer3—new capabilities and interfaces. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), Juni, Nr. 15, gks596–e115. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks596>. – DOI 10.1093/nar/gks596. – ISSN 1362-4962
- [99] VAES, Bart L. T. ; LUTE, Carolien ; WONING, Sebastian P. d. ; PIEK, Ester ; VERMEER, Jenny ; BLOM, Henk J. ; MATHERS, John C. ; MÜLLER, Michael ; GROOT, Lisette C. P. G. M. ; STEEGENGA, Wilma T.: Inhibition of methylation decreases osteoblast differentiation via a non-DNA-dependent methylation mechanism. In: *Bone* 46 (2010), Februar, Nr. 2, 514–523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2009.09.033>. – DOI 10.1016/j.bone.2009.09.033. – ISSN 87563282
- [100] VRTAČNIK, Peter ; MARC, Janja ; OSTANEK, Barbara: Epigenetic mechanisms in bone. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52 (2014), Mai, Nr. 5, 589–608. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24353145>. – ISSN 1437-4331
- [101] WADDINGTON, C. H.: The epigenotype. 1942. In: *International journal of epidemiology* 41 (2012), Februar, Nr. 1, 10–13. <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyr184>. – DOI 10.1093/ije/dyr184. – ISSN 1464-3685
- [102] WANG, Donghai ; HÖING, Susanne ; PATTERSON, Heide Christine C. ; AHMAD, Umtul M. ; RATHINAM, Vijay A. ; RAJEWSKY, Klaus ; FITZGERALD, Katherine A. ; GOLENBOCK, Douglas T.: Inflammation in mice ectopically expressing human Pyogenic Arthritis, Pyoderma Gangrenosum, and Acne (PAPA) Syndrome-associated PSTPIP1 A230T mutant proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2013), Februar, Nr. 7, 4594–4601. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293022>. – ISSN 1083-351X
- [103] WICK, Wolfgang ; WELLER, Michael ; BENT, Martin van d. ; SANSON, Marc ; WEILER, Markus ; DEIMLING, Andreas von ; PLASS, Christoph ; HEGI, Monika ; PLATTEN, Michael ; REIFENBERGER, Guido: MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. In: *Nat Rev Neurol* 10 (2014), Juli, Nr. 7, 372–385. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100>. – DOI 10.1038/nrneurol.2014.100
- [104] WIEDEMANN, M. ; TRUEB, B.: Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. In: *Genomics* 69 (2000), Oktober, Nr. 2, 275–279. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.2000.6332>. – DOI 10.1006/geno.2000.6332. – ISSN 0888-7543
- [105] WILSON, A. ; POWER, B. ; MOLLOY, P.: DNA hypomethylation and human diseases. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1775 (2007), Januar, Nr. 1, 138–162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.08.007>. – DOI 10.1016/j.bbcan.2006.08.007. – ISSN 0304419X

- [106] YODER, Michael ; HILDEBRAND, Jeffrey D.: Shroom4 (Kiaa1202) is an actin-associated protein implicated in cytoskeletal organization. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 64 (2007), Januar, Nr. 1, 49–63. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009331>. – ISSN 0886–1544
- [107] YOKOMINEA, T. ; HATAA, K. ; TSUDZUKIC, M. ; SASAKIA, H.: Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family: a possible link between existence of DNMT3L and genomic imprinting. In: *Cytogenet Genome Res* 113 (2006), Nr. 1-4, 75–80. <http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?typ=fulltext38;file=CGR200611314075>
- [108] YUASA, Y.: DNA methylation in cancer and ageing. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (2002), November, Nr. 12, 1649–1654. [http://dx.doi.org/10.1016/s0047-6374\(02\)00100-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0047-6374(02)00100-8). – DOI 10.1016/s0047-6374(02)00100-8. – ISSN 00476374
- [109] ZAHNOW, C. A. ; TOPPER, M. ; STONE, M. ; MURRAY-STEWART, T. ; LI, H. ; BAYLIN, S. B. ; CASERO, R. A.: Inhibitors of DNA Methylation, Histone Deacetylation, and Histone Demethylation: A Perfect Combination for Cancer Therapy. In: *Advances in cancer research* 130 (2016), 55–111. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27037751>. – ISSN 0065–230X
- [110] ZHANG, Yan ; LIU, Hongbo ; LV, Jie ; XIAO, Xue ; ZHU, Jiang ; LIU, Xiaojuan ; SU, Jianzhong ; LI, Xia ; WU, Qiong ; WANG, Fang ; CUI, Ying: QDMR: a quantitative method for identification of differentially methylated regions by entropy. In: *Nucleic acids research* 39 (2011), Mai, Nr. 9, e58. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr053>. – DOI 10.1093/nar/gkr053. – ISSN 1362–4962
- [111] ZHANG, Yi ; REINBERG, Danny: Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. In: *Genes & Development* 15 (2001), September, Nr. 18, 2343–2360. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.927301>. – DOI 10.1101/gad.927301. – ISSN 1549–5477
- [112] ZHAO, Xin ; XU, Dan ; LI, Yi ; ZHANG, Jiangyan ; LIU, Tingting ; Ji, Yinli ; WANG, Jufang ; ZHOU, Guangming ; XIE, Xiaodong: MicroRNAs regulate bone metabolism. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 32 (2014), Mai, Nr. 3, 221–231. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24311309>. – ISSN 1435–5604
- [113] ZHOU, Xiaofeng ; YANG, Pan-Chyr C.: MicroRNA: A Small Molecule with a Big Biological Impact. In: *MicroRNA* 1 (2012), Nr. 1. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048083>. – ISSN 2211–5366

## 7 Anhang



## Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei der gesamten AG Robinson -im besonderen meinem Doktorvater „Nick“ Robinson, „Rici“ Ott, Johannes Grünhagen und Marten Jäger-, der AG Kornak, der AG Hecht, der AG Seemann und dem Sekretariat des Instituts für das freundliche Miteinander, die Geduld, die Unterstützung in schwierigen Situationen und die Einführung in die molekularbiologische Forschung.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie und meinen Paten, die mich bis heute begleitet haben.

## **Lebenslauf**

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

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

# Erklärung

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Miriam Sandya Bauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genomweite differentielle DNA Methylierung im Knochen von neonatalen versus adulten C57BL/6-Mäusen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe Uniform Requirements for Manuscripts (URM) des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Hildesheim, den 08.11.2016