

**Aus dem Institut für Stammzellforschung und regenerative Medizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. James Adjaye

**Der DNA-Methylierungsstatus von Pluripotenzmarkern in unrestringierten so-
matischen Stammzellen (USSC) aus Nabelschnurblut**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Christian Silvester Kriegs

2012

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Wernet

Korreferent: Prof. Dr. Reifenberger

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Santourlidis S, Wernet P, Ghanjati F, Graffmann N, Springer J, Kriegs C, Zhao X, Brands J, Araúzo-Bravo MJ, Neves R, Koegler G, Uhrberg M.

Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes.

Stem Cell Res. 2011 Jan;6(1):60-9.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung	10
2. Einleitung	11
2.1 Epigenetik	12
2.1.1 Die zentralen Mechanismen der Epigenetik	14
2.1.1.1 DNA-Methylierung	14
2.1.1.2 De-novo-Methylierung	17
2.1.1.3 Aufrechterhaltung und Steuerung des Methylierungsschemas von CGIs	17
2.1.1.4 Vermittlung des Inaktivierungsvorgangs von CGI-Promotoren durch CpG-Methylierung	19
2.1.1.5 Chromatinmodifikationen	21
2.1.1.6 Regulatorische RNAs	24
2.1.1.7 Polycomb-Group-Proteine und Thrithorax-Group-Proteine	25
2.1.2 Zusammenschau der Mechanismen, grundlegendes Funktionsprinzip	27
2.2 Stammzellendifferenzierung und Pluripotenz	29
2.3 Zelluläre Reprogrammierung	30
2.3.1 Variationen von Ausgangsmaterial, Faktoren und Methoden	31
2.4 Osteo-Differenzierung und Markerproteine	34
2.5 Wichtige Faktoren für Stammzeleigenschaften, Pluripotenz und Reprogrammierung	35
2.5.1 OCT4	35
2.5.2 SOX2	36
2.5.3 NANOG	36
2.5.4 Telomerase	37
2.5.5 Protoonkogene als Mediatoren der Dedifferenzierung: „Pluripotenz-Induktions-Booster“	38
2.5.6 Komplexe Interaktionen	38
3. Fragestellung	39
4. Ergebnisse	41
4.1. Real-Time-PCR	41
4.2. Natriumbisulfit-Sequenzierung	44
4.2.1 <i>NANOG</i>	44
4.2.2 <i>SOX2</i> und <i>SRR1</i>	48
4.2.3 <i>hTERT</i>	52
5. Diskussion	54
5.1 Transkription von <i>alkalischer Phosphatase</i> und <i>Osteokalzin</i>	54
5.2 Methylierungsschemata	55
5.2.1 <i>SOX2</i>	55
5.2.2 <i>NANOG</i>	57
5.2.3 <i>hTERT</i> , Telomerase und Telomere in der USSC	59
5.3 Einfluss von Kulturbedingungen und Probenherkunft	63
5.4 Besonderheiten der Histonsignatur und Fähigkeit zur Reaktivierung von Schlüsselfaktoren	64
6. Fazit	65
6.1 Die besonderen Eigenschaften der USSC gehen mit einem außergewöhnlichen CpG-Methylierungsschema einher	65
6.2 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten	69

6.3 Die wichtigste Herausforderung	70
7. Methodik	71
7.1 Verwendete Zellen	71
7.1.1 USSC und Osteo-Differenzierung	71
7.1.2 Auswahl der Zelllinien	72
7.2 Osteoblasten-RNA	73
7.3 Induzierte pluripotente Stammzellen aus Nabelschnurblut-USSC-iPSC	73
7.4 Erstellung von Primern mittels des Programms Primer-Designer	74
7.5 Anmerkung zu den praktischen Arbeiten: die Verwendung von „Kits“	75
7.6 Agarose-Gele	75
7.7 RNA-Präparation und cDNA-Gewinnung	76
7.8 Real-Time-PCR	76
7.8.1 Syber Green Real-Time-PCR	76
7.8.2 Alkalische Phosphatase	77
7.8.3 Osteokalzin	78
7.8.4 GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)	79
7.9 DNA Präparation	79
7.10 Natriumbisulfit-Konvertierung	79
7.11 Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Sequenzierung	81
7.11.1 <i>SOX2</i> Promoter:	81
7.11.2 <i>SRR1</i> :	83
7.11.3 <i>NANOG</i> -Promoter	85
7.11.4 <i>hTERT</i> -Promoter	87
7.12 Klonierung per TA-Cloning	89
7.13 Transformation und Umgang mit Bakterien	89
7.14 DNA-Minipreparationen	91
7.15 Sequenzierung	91
7.16 Material und Verbrauchsgüter	92
8. Beschreibung der eigenen Leistung	95
8.1 Theoretische Vorarbeit und Nachbereitung der Experimente	95
8.2 Praktische Arbeiten	95
9. Quellen	97
10. Eidesstattliche Versicherung	106
11. Danksagung	107

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Alu	Arthrobacter luteus
Aprt	Adenin-Phosphoribosyltransferase
AS	Antisense
BDNF	Brain-derived neurotropic factor
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CGI	CG- (Cytosin-Guanin) -Insel
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin (symbolisch für CG-Basenfolge)
CTCF	Transcriptional repressor CTCF
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + β -Glycerolphosphat
DNA	Desoxyribo-Nuclear-Acid, Desoxyribonukleinsäure
DNMT	De-novo-Methyltransferase
ESC	Embryonic stem cell, embryonale Stammzelle
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRU	Glucocorticoid responsive unit
H ₂ O	Wasser
h	Stunde
HP1	Heterochromatin-Protein 1
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
Igf2	Insulin-like growth factor2
iPS(C)	iPSC induced pluripotent stem cell (induzierte pluripotente Stammzelle)
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika

kb	kilobasen
Klf4	Krueppel-like factor 4
LIF	Leukemia inhibitory factor
MBD	Methyl-CpG bindende Domäne
MECP2	Methyl-CpG-Binding Protein 2
miRNA	microRNA
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
M	Mol
mM	Milimol
MLTF	Major late transcription factor (=USF, upstream stimulatory factor)
mRNA	Messenger-RNA
Myc	Myelocytomatose
MSC	Mesenchymal stem cell, mesenchymale Stammzelle
n	nano
nt	Nukleotide
NWG	Nachwuchswissenschaftler-Gruppe
OCT4	Octamer binding transcription factor 4
p	piko
p300	Histonacetyltransferase p300
PcG	Polycomb-Group
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PRC	Polycomb repressive complex
RITS	RNA-induced transcriptional silencing
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

siRNA	small interfering RNA
S	sense
sek	Sekunde
SOX2	sex determining region Y (SRY) -box 2
Sp1	Specificity Protein 1
SRR	Sox2 regulatory region
T	Thymin
TM	Schmelztemperatur
trxG	Thritorax-Gruppe
USSC	unrestringierte somatische Stammzelle

1. Zusammenfassung

Der DNA-Methylierungsstatus von Pluripotenzmarkern in unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) aus Nabelschnurblut

Die jüngsten Entwicklungen auf dem Gebiet der Stammzellforschung kündigen eine neue Ära biologischer und medizinischer Forschung an. Neue Erkenntnisse wecken die Hoffnung auf eine zeitnahe klinische Anwendung. Kerntransplantationsexperimente haben die prinzipielle Möglichkeit unter Beweis gestellt, Informationen die auf der DNA enthaltenen sind, einem alternativen Expressionsschema zu unterwerfen. So erzielter lebensfähiger Nachwuchs demonstrierte die Plastizität von Genaktivität. Es folgte eine Abklärung der Faktoren, welche den Differenzierungsgrad einer Zelle festlegen. Anhand der Detektion spezifischer Proteine aus embryonalen Stammzellen wurden drei zentrale Faktoren identifiziert: SOX2, OCT4 und NANOG bilden den Kern eines regulatorischen Netzwerks, das einen pluripotenten Status aufrechterhält. Tatsächlich konnte deren virale Expression bestimmte Zellen in den pluripotenten Zustand überführen. Diese Zellen werden folglich als IPS-(Induced Pluripotent Stem-) Zellen bezeichnet. Neben der Identifizierung der Faktoren sind deren Wirkung, Funktion und vor allem die Regulation ihrer Expression von Interesse. Sie bilden wichtige Parameter für das Verständnis von Entwicklungskapazität und Differenzierung einer Zelle. Die Gesamtheit der Faktoren, die Einfluss auf das genetische Expressionsprofil nehmen, wird unter dem Begriff „Epigenetik“ subsumiert. Die hier involvierten Mechanismen sind über ein komplexes Netzwerk untereinander verschaltet. Dabei wurde die regelmäßige Wirkung einiger Elemente identifiziert. So geht die Methylierung von bestimmten Cytosinresten im Promoterbereich verschiedener Gene mit einer Verminderung ihrer Transkription einher. Untersuchungen dieses Phänomens wurden bereits für eine Vielzahl verschiedener Zellentitäten durchgeführt. Dabei stehen insbesondere die Eigenschaften von Stammzellen im Fokus, so auch bei dieser Arbeit. Unter den verschiedenen Stammzellentitäten sticht die USSC (unrestricted somatic stem cell, unrestringierte somatische Stammzelle) aus Nabelschnurblut hervor. Diese Zellen verfügen über ein breites Entwicklungspotential und lassen sich in Kultur lange im unrestringierten Zustand halten. USSCs zeigten in bisherigen Tierexperimenten keine Neigung, Tumore auszubilden. Dies unterstreicht die Sicherheit dieser Zellen für klinische Anwendungen. Vorherige Arbeiten zeigten, dass die zentralen Stammzellfaktoren in der USSC nicht auf Proteinebene exprimiert werden. Weitere Untersuchungen ergaben für die Promotoren dieser Faktoren einen bivalenten Chromatinstatus, der sowohl repressive als auch aktivierende Elemente aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde das Methylierungsschema der Promotoren von *SOX2*, *NANOG*, *hTERT* und des Enhancers *SRR1* untersucht. *SRR1* nimmt als regulatorisches Element Einfluss auf die Expression von *SOX2*. Diese Regionen stellten sich in der USSC nahezu völlig unmethyliert dar. Dies entspricht dem Befund, der auch in embryonalen Stammzellen zu beobachten ist. Nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung zeigt die USSC einen deutlich ausgeprägten Osteoblasten-typischen Phänotyp. Dabei kommt es zur massiv erhöhten Transkription der Osteo-Marker Osteokalzin und alkalische Phosphatase. Das Methylierungsschema der Pluripotenzmarker ändert sich während dieser Ausdifferenzierung kaum. In anderen Zusammenhängen wurde beschrieben, dass die vorgefundene epigenetische Konfiguration eine Reaktivierung der Pluripotenzmarker erlaubt. Dies sind wichtige Einblicke in das molekulare Geschehen in der USSC. Sie tragen erheblich zur Erklärung des einzigartigen Differenzierungs- und Proliferationsverhaltens dieser Zelle bei. Diese Erkenntnisse sind maßgeblich für die Gestaltung zukünftiger Forschung.

2. Einleitung

Die erfolgreiche Klonierung von Säugetieren hat bis in die Breitenmedien hinein große Beachtung gefunden. Als prominentestes Beispiel erlangte das Schaf „Dolly“ Bekanntheit (Wilmut 1997). Im Zuge dieses Fortschritts zeichnet sich eine neue Ära biomedizinischer Forschung ab. Es besteht die Hoffnung, bestimmte Gewebe in beliebiger Menge zu gewinnen, die zudem über definierte immunologische Eigenschaften verfügen. Dies würde den Zugang zu völlig neuen Therapien und Ersatzverfahren eröffnen.

Anfängliche Kerntransplantationsexperimente verfolgten das Primärziel, die grundsätzliche Funktionalität bestimmter biologischer Vorgänge zu demonstrieren. So konnte gezeigt werden, wie ein somatisch differenzierter Zellkern seinen Status revidiert. Durch bestimmte Einflüsse wird seine Funktion grundlegend geändert. Er kann dann als Kern einer funktionstüchtigen Keimzelle, entsprechend einer Zygote, fungieren (Jaenisch und Gurdon in Allis 2006).

Ein umfassendes Verständnis der hier involvierten Vorgänge bereitet den Boden für die Ergründung des Zellschicksals im Allgemeinen. Dies ist die Grundlage für eine gezielte Beeinflussung zellulärer Identität. Auf diesem Gebiet wurden in letzter Zeit viele bahnbrechende Erkenntnisse gewonnen. Auf Grund der hier bereits erzielten Erfolge erscheint die „Epigenetik“ als Quintessenz der Stammzellforschung.

Seit den revolutionären Durchbrüchen auf dem Gebiet der systematischen DNA-Sequenzierung im Jahre 2001 (Venter 2001) verfügt die Wissenschaft über eine vollständige menschliche DNA-Sequenz, zusammengesetzt aus Proben verschiedener Spender. Dieser wissenschaftliche Fortschritt ist zweifelsohne ein Meilenstein. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern Rohdaten für wichtige weiterführende Überlegungen.

Allein reicht dies aber keinesfalls aus, um aus der Basenfolge gleichsam einen Quellcode zu entwickeln. Ein logischer, technischer Bauplan für den Organismus und die Funktion der Subpopulationen seiner Zellen lässt sich aus der reinen Sequenz nicht ableiten. Dies dürfte in der Fachwelt auch kaum erwartet worden sein. Trotz der Unkenntnis der vollständigen Sequenz wurden bereits im Vorfeld zahlreiche Experimente zum Verlauf des Zellschicksals unternommen. Diese Thematik wurde von der

Embryologie früh in ihrer zentralen Bedeutsamkeit erkannt. Hier ist die Entwicklung einer scheinbar gleichförmigen Masse an Zellen hin zu den komplexen Formen des Imago zu beobachten. Die Basensequenz des DNA-Moleküls durchläuft dabei keine nennenswerten Veränderungen.

Einen wichtiger Schritt auf dem Weg zum heutigen Verständnis der Genregulation erbrachte die Erkenntnis, dass die codierende Sequenz für ein Protein grundsätzlich in einen Kontext regulatorischer Faktoren eingebunden ist. Benachbarte Sequenzen nehmen zusammen mit nukleären Faktoren Einfluss auf deren Transkription (Jacob und Monod 1961). Der simple Mechanismus des Operons hat seine Bedeutung selbstverständlich nicht verloren. Auch heute noch stellt er ein Kernelement des Modells dar, mit dem die unterschiedlichen Grade der Genexpression erklärt werden. Um die Variantenvielfalt zu erklären, die in letzter Konsequenz die einzelnen Dimensionen der zellulären Identität bedingt, ist die Existenz weiterer Mechanismen zu postulieren.

Das molekulare Pendant zu den unterschiedlichen Funktionen und morphologischen Eigenschaften einer Zelle ist bis zum heutigen Tage nicht hinreichend verstanden. Es konnten aber klare Hinweise auf beteiligte Mechanismen gewonnen werden, die eine Annäherung an diese Fragestellung ermöglichen.

2.1 Epigenetik

Die Zuordnung von Genexpression und Zelldifferenzierung zu bestimmten Mechanismen ist heute wichtiger Bestandteil biologischer und medizinischer Forschung. Wie erwähnt nahmen systematische Überlegungen zu dieser Fragestellung in der Embryologie ihren Ursprung. So wurde der Begriff „Epigenetik“ von dem Embryologen Conrad Waddington geprägt, der sich der Bedeutung der Erblehre (Genetik) für die Entwicklung von Embryonen bewusst war. In seinem Buch „Introduction to modern Genetics“ leitet er aus dem griechischen Begriff „Epigenesis“, der bereits von Aristoteles geprägt wurde, den Begriff der Epigenetik ab (Holliday 2006). Darunter subsumiert er: „Das vollständige Entwicklungssystem, in seiner Zusammensetzung, aus miteinander in Verbindung stehenden Entwicklungswegen, durch welche die adulte Form des Organismus zustande kommt (Holliday 2006)“. In der folgenden Entwicklung hat dieser Begriff eine deutliche Einschränkung und Konkretisierung er-

fahren. D.E. Gottschling, ein zeitgenössischer Autor, liefert hierzu eine ausdrücklich persönliche Einschätzung: „Ich definiere epigenetische Phänomene als Veränderung des Phänotyps, die vererblich sind, aber keine DNA-Mutation beinhalten. Darüber hinaus muss die Veränderung des Phänotyps schalterartig sein, an oder aus, statt einer graduellen Reaktion, und sie muss auch dann vererbbar sein, wenn die Bedingungen, die zur eingangs erfolgten Schaltung geführt haben, verschwunden sind (Gottschling in Allis 2006).“

Vor dem Hintergrund, welchen Phänomenen man bereits einen expressionsmodulierenden Charakter beigemessen hat, der auf das Zellschicksal Einfluss nimmt, scheint diese Formulierung zu stringent. Variationsbreite und Bedeutung einzelner Mechanismen sind weiten Schwankungen unterworfen. Diese sind über zahlreiche Kreuzreaktionen miteinander verschaltet. Art und Intensität ihrer Einflussnahme auf den Phänotyp sind zudem von den verschiedensten Situationen abhängig. Das Kriterium der Erbllichkeit eines Phänomens lässt sich hier kaum fassen. Das gilt umso mehr, wenn seine Aufrechterhaltung unter bestimmten Bedingungen durch andere Mechanismen aktiv beseitigt wird. Gottschlings Definition unterliegt gewissen Einschränkungen, zumal es auf diesem Feld zu ständigen Neuerungen kommt. Sie fasst allerdings wichtige Kriterien zusammen, die für den Umgang mit diesem Begriff erforderlich sind. Zudem lässt sie den deutlichen wissenschaftlichen Fortschritt erkennen. Die drastische Konkretisierung resultiert aus den umfassenden Kenntnissen, die in den letzten Jahren auf diesem Feld gewonnen wurden. Es zeichnet sich ab, dass die „Erbmasse“ als Gesamtheit der Faktoren, welche die Ausgestaltung des Phänotyps und die Grenzen der jeweiligen Variationsbreite festlegt, hoch komplex und ausgesprochen dynamisch ist. Diesen Forschungsbereich handhabbar zu machen, um Erkenntnisse mittelfristig technisch verwerten zu können, ist eine erhebliche Herausforderung. Dabei ist es erforderlich, sich über die Aufklärung einzelner Mechanismen anzunähern. Im Fokus der Wissenschaft steht daher die Beschreibung von Ereignissen, die mit einiger Regelmäßigkeit das Expressionsverhalten von genetischer Information beeinflussen. Zur Operationalisierung einer so komplexen Fragestellung wie dem Zellschicksal ist die vornehmliche Fokussierung auf einen bekannten Mechanismus dienlich. Die Funktion dieses Mechanismus ist in einem Modell zu erfassen. Zellen, die hier als Modell dienen, sollten in vorhergehenden Untersuchungen möglichst genau beschrieben worden sein. Dabei sollte die untersuchte Zellpopulation mit

ihren Derivaten möglichst anschaulich bestimmte Eigenschaften zeigen, die vermutlich auf epigenetischen Charakteristika beruhen.

Entsprechend dieser Kriterien wurde hier die unrestringierte somatische Stammzelle (USSC) aus Nabelschnurblut als Modell gewählt. Die Untersuchungen fokussierten sich auf die CpG-Methylierungsschemata bestimmter Regionen, denen eine herausragende Aussagekraft für Stammzeleigenschaften und Zelldifferenzierung zukommt.

2.1.1 Die zentralen Mechanismen der Epigenetik

Bisherige Untersuchungen weisen vor allem zwei Mechanismen eine herausragende Bedeutung zu: Einerseits die Modifikation des Chromatins, vermittelt über Veränderungen der Histone, andererseits die Methylierung spezifischer Basen im DNA-Molekül, insbesondere im Promoterbereich bestimmter Gene.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich vornehmlich auf Besonderheiten der DNA-Methylierung.

Dieser Mechanismus kann nicht isoliert betrachtet werden. Seine gegenseitige Beziehung zu anderen epigenetischen Funktionen muss berücksichtigt werden. Die bedeutsamsten Elemente, die hier wirksam sind, werden daher im Folgenden beschrieben.

2.1.1.1 DNA-Methylierung

Im DNA-Genom höherer Lebewesen findet sich bei einer Vielzahl von Cytosin-Nukleotiden in Position des 5. C-Atoms eine zusätzliche Methylgruppe. Vor allem ist dies innerhalb der Basenfolge CG („CpG“) der Fall. Beim Menschen sind genomweit etwa 70 - 80 Prozent der CpGs methyliert (Ehrlich 1982, Bird 2002). Diese kovalente Modifikation hat eine nachweisbare Bedeutung für die Regulation der Genaktivität. Sie wird offenbar über mehrere miteinander in Interaktion stehende Mechanismen vermittelt (Bird 2002).

Bei Invertebraten findet sich eine mosaikartige Verteilung von methylierten Cytosin-Nukleotiden. Hier weist das Genom in seiner Gesamtheit einen hohen oder niedrigen Grad an Methylierung auf. Bei Vertebraten zeigt sich hingegen ein hoher Grad differenzierter Organisation derartiger Elemente (Tweedie 1997). Phylogenetische Be-

trachtungen legen den Schluss nahe, dass die Evolution der Wirbeltiere mit der Entwicklung komplexer Regulationsmechanismen der Genexpression einherging. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das Aufkommen der CpG-Methylierung als Steuerungselement (Tweedie 1997). So ist bei Säugetieren die Verteilung von CpG-Formationen innerhalb der gesamten DNA unregelmäßig. Weite Strecken sind aus stochastischer Sicht CpG-defizient. Die vorhandenen Cytosinreste sind dabei überwiegend methyliert. Diese Konfiguration wird durch einzelne Ansammlungen von CpGs unterbrochen, die an den 5`-Enden vieler menschlicher Gene zu finden sind (Bird 2011). Solche Elemente werden als „CpG-Inseln“ (CGIs) bezeichnet. Sie stellen einen integralen Bestandteil der Regulierung der Genexpression dar. Etwa 70% aller Promotoren im Genom von Wirbeltieren weisen eine solche CGI auf. Darunter fallen nahezu alle Gene, die der generellen Zellhomöostase dienen. Darüber hinaus finden sich CGIs bei einem Teil der Gene, die gewebespezifische Aufgaben wahrnehmen oder an der Entwicklung des Organismus beteiligt sind (Bird 2011). Diese Bereiche sind im Gegensatz zu den übrigen CpG-Nukleotiden weitestgehend unmethyliert. Wenige, aber bedeutsame CGIs werden im Zuge der Entwicklung methyliert, was eine dauerhafte Stilllegung des Promoters zur Folge hat (Bird 2002).

Im Vergleich mit non-CGI-Promotoren weisen CGI-Promotoren eine atypische Sequenz und andere Funktionsmodi auf. Bemerkenswert an CGI-Promotoren ist das deutlich verringerte Vorkommen von bestimmten adenin- und thymidinhaltenigen Motiven. Derartige Sequenzen werden als TATA-Boxen bezeichnet. Sie stellen ein funktionelles Kernelement vieler non-CGI-Promotoren dar. Man vermutet, dass CGI-Promotoren ein komplexes Zusammenspiel mit bestimmten Transkriptionsfaktoren eingehen. Hier wirkt die hohe CG-Konzentration als eigenständiges funktionelles Element. Gestützt wird diese Annahme durch die geringen Gemeinsamkeiten der individuellen Sequenzen dieser Promotoren, verglichen mit solchen ohne CGI. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CGI-Promotoren auch spezielle Hilfsmechanismen nutzen, um die Wirkung ubiquitärer Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen. Beispielsweise wird dem generellen Transkriptionsfaktor Sp1 eine Art Adapterfunktion zugesprochen: Er vermittelt die Adhäsion des TATA-binding Protein (TBP) an Promotoren, die nicht über dessen Standardzielsequenz, die TATA-Box, verfügen. In der Tat ließ sich für Sp1 eine Affinität zu aktiven CGI-Promotoren finden. Entsprechende

Beobachtungen wurden für weitere Faktoren ähnlicher Bedeutung getätigt (Deaton und Bird 2011, Landolin 2010).

Ein spezifisches Methylierungsschema wird in der Regel über mehrere Zellgenerationen konserviert. Die stabile Determination dieser DNA-Modifikation beruht auf molekularen Mechanismen, die einen prinzipiellen Fortbestand der Methylierung des überwiegenden Teils des Genoms garantieren. Darüber hinaus unterliegt das spezifische Schema der einzelnen CGIs einer besonderen Konservierung. Es liegt nahe, hier von einer semikonservativen Modifizierung, analog zur Replikation der DNA, auszugehen (Li und Bird in Allis 2006).

Diese Theorie wurde durch mehrere Experimente gestützt. Als bedeutsamer Faktor für diese Aufgabe ist bereits ein Enzym charakterisiert worden. Die sog. DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) der Säugetiere gilt als „Erhaltungs-Methyltransferase“. Dieses Enzym ist substratspezifisch für CpGs. Es zeigt eine klare Bevorzugung von DNA-Bereichen, bei denen lediglich einer der Stränge methylierte CpGs aufweist. Die Bedeutung dieses Enzyms in seiner entscheidenden Rolle für den Erhalt des spezifischen Methylierungsprofils wird durch Inaktivierungsexperimente in embryonalen Stammzellen von Mäusen gestützt. Hier kam es nach der Ausschaltung des Gens von *dnmt1* zum genomweiten Verlust von DNA-Methylierung, sowie zum Absterben der Embryonen an Tag 9,5 der embryonalen Entwicklung (Li und Bird in Allis 2006).

Interessanterweise unterliegt die Wiedergabetreue des Methylierungsschemas durch die DNMTs, zumindest in Zellkultur, gewissen Schwankungen. Hier lässt sich teilweise eine große Genauigkeit feststellen, etwa in kultivierten, normalen menschlichen Epithelzellen der Mammae (Ushijima 2003). Bei anderen Untersuchungen wurde eine nahezu stochastische Wiedergabe in anderen Zellen beschrieben (Xie 2011). Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Konsistenz der Schemata, über die Zellteilungen hinweg, nach Ort und Funktion des betroffenen Elements variiert. So bleibt bei bestimmten Zellen, wie den angesprochenen Mammae-Epithelzellen, die Schwankungsbreite des Methylierungsschemas im Bereich der Promotoren niedrig. Die Präzision dieses Vorgangs ist bei CGIs außerhalb von Promotoren hingegen reduziert (Ushijima 2003). Die deutliche Differenz, die sich hier im Vergleich einzelner Elemente bemerkbar macht, ist als Hinweis auf die systematische Wirkung bestimmter Mechanismen zu werten. Offenbar kommt es hier, abhängig von Ort und Funktion der CpGs zu einer differenzierten Konservierung der Expressionskontrolle.

So legen weitere Untersuchungen die Existenz umfassender, komplementärer Mechanismen zur Aufrechterhaltung und Vervollständigung von Methylierungsschemata nahe. Dabei wird vornehmlich den DNA-Methyltransferasen 3A und 3B die Funktion zugeschrieben, unabhängig von der Funktion von DNMT1 zur Konservierung dieser Muster beizutragen (Jones und Liang 2009). Auch die räumliche Eingrenzung der Aktivität von Methyltransferasen auf bestimmte Kernkompartimente stellt eine potentielle Einflussgröße für die Steuerung der CpG-Methylierung dar (Jones und Liang 2009).

2.1.1.2 De-novo-Methylierung

Neben der Aufrechterhaltung und Weitergabe bestimmter Methylierungsschemata ist die ursprüngliche Determination dieser Muster von entscheidender Bedeutung. Daher wurde deren Plastizität bei der Entwicklung eines individuellen Organismus untersucht. Gemäß dem aktuellen Erkenntnisstand kommt es zu umfassenden Demethylierungsvorgängen im Rahmen der frühen Gametogenese. In deren spätem Verlauf wird jedoch ein höherer Grad an Methylierung zurückerlangt. Unmittelbar nach der Fertilisation kommt es zum erneuten Verlust der CpG-Methylierung. Dies betrifft zuerst das paternale Genom. Anschließend verliert mit einer gewissen Latenz auch das maternale Genom seine CpG-Methylierung. Zwischen dem Acht- und dem Sechzehnzell-Stadium kommt es zur neuerlichen, progredienten Zunahme der CpG-Methylierung. Zum Ende des blastozystären Stadiums wird das Niveau somatischer Zellen wieder erreicht und bleibt fortan bestehen. Es wird angenommen, dass bei diesem Prozess aktive Demethylierungsvorgänge des Genoms stattfinden (Santos und Dean 2004).

2.1.1.3 Aufrechterhaltung und Steuerung des Methylierungsschemas von CGIs

Die generelle Methylierung von CpGs während des Morulastadiums spart die in der weiteren Embryogenese unmethylierten CGIs aus. Als Ursache wird vermutet, dass die Methylierung als Folge der Aktivität des assoziierten Gens unterbleibt. Fehlende CpG-Methylierung als Folge der Aktivität des assoziierten Gens wird darüber hinaus

als generelles Phänomen diskutiert (Bird 2002). So geht man davon aus, dass die GCIs aus ihrer Eigenschaft als Promoter heraus Transkriptionsfaktoren binden. Deren alleinige Präsenz wirkt abweisend auf die Methyltransferasen. Im Experiment wurden Mutationen an CGI -assoziierten Promotoren eingebracht, die eine Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 verhindern. In der Folge kam es neben dem Ausbleiben der Transkription des Gens zu einer Zunahme von dessen CGI-Methylierung. Dies wurde beispielhaft am housekeeping-Gen *aprt* (Adenin-Phosphoribosyltransferase) gezeigt. Welche spezifische Rolle dabei jeweils dem Ausbleiben der Faktorenbindung und dem Ausbleiben der Transkription zukommt, ist nicht geklärt (Macleod 1994). Darüber hinaus finden sich auch bei hochgradig gewebespezifisch transkribierten Genen CGIs. In der Mehrzahl der Gewebe weisen deren CpGs trotz fehlender Transkription keine Methylgruppen auf. Dies ist z.B. beim humanen Alpha-Globulin-Gen beobachtet worden. Hier haben weitere Untersuchungen Hinweise auf eine Beteiligung der Chromatinmodifikation zur Verhinderung inadäquater Transkription geliefert (Macleod 1994). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich die Einflussnahme von alternativen Regulierungsmechanismen herleiten. Deren Aktivität verhindert zwar die Methylierung der dem Gen zugehörigen CGI, unterbindet aber zugleich dessen Transkription.

Als weiteres Element der Expressionskontrolle sind Demethylierungsvorgänge im Verlauf zellulärer Differenzierung beobachtet worden. So verliert die Promoterregion des Interleukin-2-Gens ihre Methylierung, wenn dieses im Rahmen der T-Zell-Differenzierung exprimiert wird. In diesem Falle ist die Demethylierung als funktionelle Voraussetzung der Expression des Gens experimentell belegt (Bruniquel und Schwartz 2003, Li und Bird in Allis 2006).

Darüber hinaus ist ein weiteres Beispiel dynamischer Einflussnahme auf die Genexpression, vermittelt durch einen Demethylierungsvorgang der DNA, beschrieben worden. Die Beteiligung dieses Vorgangs konnte für die Glucocorticoid-induzierte Expression des Tyrosin-Aminotransferase-Gens gezeigt werden. Hier erwies sich im Experiment, dass ein Kontakt zu Glucocorticoiden die Demethylierung eines spezifischen Enhancers bewirkt, der sogenannten GRU (glucocorticoid responsive unit). In der Folge kommt es zu einer stärkeren Expression des Gens bei erneutem Glucocorticoidkontakt. Die Demethylierung des Enhancers bestand in der Folge dauerhaft. Die biologische Bedeutung dieses Vorgangs ist jedoch fraglich, da es bei natürlicher

Entwicklung zur Demethylierung dieser Region kommt, bevor das Gen hormonell induzierbar wird (Bird 2002, Thomassin 2001).

Außerdem wird die Einflussnahme äußerer Faktoren auf die CpG-Methylierung vermutet. Hinweise dazu liefern Untersuchungen über epigenetische Faktoren der Karzinogenese. Hier wird die maligne Entartung als Folge von Veränderungen des globalen und promoterspezifischen Methylierungsschemas beschrieben. Als deren Ursache werden unter anderem bestimmte Ernährungsweisen angenommen. Wie die Wirkung solcher Einflüsse auf die Epigenetik vermittelt wird, ist noch zu klären (Ara-saradnam 2008).

2.1.1.4 Vermittlung des Inaktivierungsvorgangs von CGI-Promotoren durch CpG-Methylierung

Es ist bisher nicht abschließend gelungen, die Mechanismen experimentell zu ermitteln, welche die Inaktivierung eines Gens mit hypermethylierter CGI herbeiführen. Bisherige Untersuchungen liefern allerdings Hinweise auf die Beteiligung einiger definierbarer Funktionselemente. Es liegt nahe, als molekulares Pendant die direkte Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren anzunehmen. Dabei könnte die räumliche Umgestaltung der DNA-Abschnitte durch die Präsenz der Methylgruppen diesen Effekt bedingen. Für diesen Zusammenhang gibt es tatsächlich experimentelle Hinweise. Eine solche Regulationsweise konnte unter in vitro Bedingungen für den Transkriptionsfaktor MLTF gezeigt werden. Dessen Fähigkeit zur Bindung spezifischer DNA-Sequenzen verringert sich durch die Methylierung zweier CpGs erheblich (Watt und Molloy 1988). Die Bestätigung der biologischen Relevanz vergleichbarer Prozesse, erwies sich anhand von Untersuchungen der Expression des *Igf2* Gens. Das *Igf2* Gen wird über den Schwellenfaktor CTCF von seinem Enhancer abgeschirmt. Durch Methylierung der CpGs an der Bindestelle des Schwellenfaktors wird die Bindung von CTCF verhindert. Dies erlaubt dem Enhancer die Aktivierung der Expression von *Igf2* (Bell und Felsenfeld 2000, Bird 2002). Der exakte Mechanismus und die Rolle weiterer putativ involvierter Faktoren sind noch zu klären. Die bisherigen Ergebnisse machen deutlich, dass hier DNA-Methylierung direkt das Bindevverhalten einzelner Faktoren verändert. Auch deren Relevanz für die Genexpression konnte in diesem Falle gezeigt werden (Bird 2002).

Über die Abweisung stimulierender Faktoren hinaus wird die Aktivität von Genen auch über die Bindung repressierender Faktoren eingeschränkt. Einige dieser Repressoren binden spezifisch methylierte CpGs als Zielstruktur. An diese DNA-Elemente gebunden, vermitteln sie ihren negativen Einfluss auf die Transkription. Für dieses Geschehen gibt es umfangreiche und deutliche experimentelle Belege (Li und Bird in Allis 2006). Hervorzuheben ist außerdem, dass sich die Wirkung dieses molekularen Vorgangs bzw. dessen Störung einem klinischen Geschehen zuordnen lässt. Dies ist beim Rett-Syndrom der Fall, das durch eine Mutation des Faktors MECP2 hervorgerufen wird (Jellinger 2003).

Unter Verwendung methylierter DNA-Abschnitte als Sonde wurden Bandshift-Assays durchgeführt. So wurden Proteine isoliert, die eine spezifische Affinität zu hochgradig methylierten Gensequenzen aufwiesen. Dabei konnte ein weitestgehend konstantes Element identifiziert werden, die Methyl-CpG bindende Domäne (MBD). Über die Suche nach Strukturanaloga in Datenbanken konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die als methylierungsabhängige Faktoren in Frage kommen (Li und Bird in Allis 2006). Folgeexperimente haben gezeigt, dass die Affinität dieser Proteine zu methylierten DNA-Bereichen durch Zusatzfaktoren mitbedingt wird. Das schließt spezifische DNA-Sequenzen ein, zu denen einzelne Mbd-Proteine eine besondere Affinität aufweisen. So verfügt etwa MBD1 neben seiner methyl-CpG-spezifischen Domäne über Bindungsstellen für unmethylierte DNA. Lediglich MBD2 scheint ausschließlich methylierte CpGs zur Zielstruktur zu haben (Li und Bird in Allis 2006).

Besonders intensiv untersucht wurde das bereits erwähnte MeCP2-Gen. Dieses Gen weist bei Patienten mit Rett-Syndrom Mutationen auf, die zum Funktionsverlust der MBD des Proteins führen (Kriaucionis und Bird 2003, Klose 2005). Klinisch zeichnet sich das Rett-Syndrom durch eine normale Entwicklung bis zum 8. - 16. Lebensmonat aus, dann treten massive, neuronale Beeinträchtigungen auf. Es kommt zur Retardierung motorischer Fähigkeiten, abnormalem Atemverhalten und Mikrozephalie. Offenbar ist MeCP2 zur regulären Stilllegung von Genen während der physiologischen Entwicklung des Nervensystems erforderlich. Gestützt wird diese Annahme durch die Identifizierung des Brain-derived neurotropic Factor (Bdnf) als erstes Zielgen von MeCP2, das für Säugetiere entdeckt wurde (Li und Bird in Allis 2006). Bdnf wird eine wichtige Rolle bei der Umwandlung neuronaler Aktivität in strukturelle Veränderungen zugeschrieben (Li und Bird in Allis 2006).

MeCP2 ist ein bedeutsamer epigenetischer Faktor, der unter den bisher untersuchten methyl-CpG-bindenden Proteinen die höchste Spezifität für methylierte CpG-Nukleotide zeigt. Zusätzlich kennzeichnet MeCP2 die Affinität zu CpG-reichen Regionen, in deren Umgebung sich weitere AT-reiche Sequenzen befinden (Klose 2005). Darüber hinaus sind für MeCP2 viele zusätzliche Funktionen postuliert worden: Einflussnahme auf die Chromatinplastizität, auf alternative Spleißvorgänge und neben der Repression auch die Aktivierung von spezifischen Genen. Die vielfältigen Interaktionskapazitäten dieses Moleküls lassen auf eine wichtige Rolle in einem dynamischen Netzwerk von Faktoren schließen. Hier wird offenbar durch die Einbindung der unterschiedlichsten Komponenten das Expressionsverhalten mehrerer Gene untereinander koordiniert (Hansen 2010).

Neben MeCP2 existieren weitere Proteine mit MBD, deren genomische Bindungsstellen nur sehr wenige Überschneidungen aufweisen. All diesen Proteinen wird eine umfangreiche Interaktion mit Cofaktoren zur Entfaltung ihrer spezifischen Wirkung zugeschrieben (Li und Bird in Allis 2006, Klose 2005). An dieser Stelle soll keine weitere detaillierte Darstellung der einzelnen methyl-CpG-bindenden Proteine erfolgen. Dies würde den Rahmen der Abhandlung sprengen. Die beschriebene weitläufige, funktionelle Einbindung von MeCP2 darf als beispielhaft für das komplexe Wirken der Mehrzahl der MBD-Proteine gelten.

2.1.1.5 Chromatinmodifikationen

Eine weitere Achse epigenetischer Steuerung von zentraler Bedeutung ist die dynamische Aktivität des Chromatins. Je nach Zustand der spezifischen Histone, die einem DNA-Abschnitt anliegen, wird die Expression eines Gens gefördert oder vermindert. Die Steuerung der Histonfunktion wird in erster Linie durch die enzymatische Modifikation von Aminosäureresten dieser Proteine bewirkt. Hier spielen Methylierungs- und Acetylierungsvorgänge die wichtigste Rolle. Dabei ist eine regelhafte Korrelation spezifischer Histonkonfigurationen mit der Ausprägung von Genaktivität erkennbar (Kouzarides 2007).

Eine gesteigerte Transkription ist generell mit einem „offenen“ Chromatinschema assoziiert. Dabei ist die Anlagerung der DNA an das Histonoctamer verringert, die am Transkriptionsvorgang beteiligten Enzyme erhalten verbesserten Zugang zu ihrem Wirkungsort. So geht die Acetylierung von Lysin 9 auf Histon 3 (acH3K9) und von Lysin 8 auf Histon 4 (acH4K8), mit der Aktivierung der betroffenen Gene einher. Der selbe Effekt wird durch eine Methylierung von Lysin 4 auf Histon 3 erreicht (meH3K4) (Jenuwein und Allis 2001, Kouzarides 2007).

Eine Einschränkung der Zugänglichkeit der DNA -und damit die Verringerung der Transkription- wird durch die Formierung von Heterochromatin erreicht. Dabei geht die dauerhafte Stilllegung mit der Formierung von konstitutivem Heterochromatin einher. Konstitutives Heterochromatin zeigt eine Dimethylierung von Lysin 9 auf Histon H3 (dimeH3K9) (Bannister 2001, Nakayama 2001, Noma 2001).

Fakultatives Heterochromatin ist durch die Trimethylierung von Lysin 27 auf Histon H3 gekennzeichnet (trimeH3K27) (Plath 2003).

Diese Steuerung der Chromatinplastizität lässt sich unter den Begriff der Epigenetik subsumieren, da ihr Informationsgehalt in vielen Fällen über mehrere Zellgenerationen hinweg konstant gehalten wird. Dem zugrunde liegt die stabile Weitergabe der Histonmodifizierung. Dabei gibt es Hinweise für eine zufällige Verteilung intakter Histonoctamere auf die Tochterstränge. Andererseits wird auch die Theorie diskutiert, dass eine Aufteilung der Octamere in Heterodimere erfolgt (Cheung und Lau 2005). In letzterem Fall wird die gleichmäßige Verteilung der Heterodimere auf die Tochterstränge angenommen. Dies entspricht einer semikonservativen Übertragung der regulatorischen Information, die in Form der Proteinmodifikationen gespeichert ist. Unabhängig davon, welcher der beiden Mechanismen die biologische Realität besser beschreibt, sind für die Aufrechterhaltung der spezifischen Chromatinkonstellation Zusatzfaktoren nötig. Solche Faktoren konnten bisher nur ansatzweise detektiert werden. Für die semikonservative Weitergabe der Information, äquivalent zu DNMT1 im Falle der CpG-Methylierung, geht man von der Existenz mehrerer Untermechanismen aus (Cheung und Lau 2005). Eine maßgebliche Beteiligung an diesem Vorgang wurde für das Protein HP1 nachgewiesen. Es wirkt offenbar in einem Mechanismus, der zur Beibehaltung der Methylgruppen-Konstellation auf dem Histon H3K9 auf einem Tochterstrang bei der DNA-Replikation führt. Darüber hinaus wurde beo-

bachtet, dass in vielen Fällen auch die spezifische Methylierung von H3K4me3 bei der DNA-Replikation erhalten bleibt. Diese Erkenntnisse erlauben den Schluss, dass Histonmodifizierungen tatsächlich als permanenter, epigenetischer Mechanismus die Weitergabe genetischer Information determinieren (Cheung und Lau 2005, Kouzarides 2007).

Dies wird jedoch durch den Nachweis des Vorkommens von Demethylasen relativiert. Einige Autoren stellen wegen der ausgeprägten Dynamik der Veränderungen die Frage nach dem Charakter der Histonmodifizierung als epigenetischem Mechanismus im engeren Sinne (Kouzarides 2007). Umfassende Beobachtungen zeigen, dass die Kontrollaktivität der Histone unter dem Einfluss anderer zellulärer Informationsträger steht. So haben sich Hinweise auf die Beteiligung von regulatorischen RNA-Molekülen ergeben. Sie tragen maßgeblich zur Formierung eines multimeren Komplexes, RITS (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing), bei. Dabei ermöglicht die beteiligte siRNA dem Komplex, seine Zielregion zu identifizieren. So wird der inhibitorische Effekt exakt auf bestimmte Elemente ausgerichtet (Verdel 2004). Auch eine langfristige Stilllegung durch Chromatinmodifikation wird der Wirkung von RNAi zugeschrieben. Dieser Effekt wurde sogar anhand der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin in zentromerischen Regionen von Chromosomen beobachtet. Obwohl diese Chromatinkonfiguration offenbar langfristig besteht, ist sie auf das Vorhandensein von regulatorischen RNAs angewiesen (Verdel 2009).

Aus diesen und weiteren Erkenntnissen wird ersichtlich, dass RNAis und Chromatinformation dauerhafter gegenseitiger Beeinflussung unterliegen. Offenbar bedarf bereits die Aufrechterhaltung der Heterochromatinstruktur einer ständigen RNAi-abhängigen Nachbearbeitung. Diese Beobachtungen zeigen die hohe prinzipielle Flexibilität von Heterochromatin. Entgegen der lange gehegten Annahme, Chromatin sei ein weitestgehend statisches Konstrukt, machen diese Erkenntnisse seine Funktion als dynamisches Element der Expressionskontrolle deutlich (Verdel 2009).

2.1.1.6 Regulatorische RNAs

Nachdem regulatorische RNA-Moleküle als Einflussgröße auf die Genexpression erkannt wurden, stellt sich die Frage nach ihrer Bedeutung als epigenetischer Mechanismus. Bemerkenswert ist, dass einige Untersuchungen eine hohe Konstanz der Expression bestimmter RNAs festgestellt haben. Diese Beobachtungen rechtfertigen durchaus eine Bezeichnung als epigenetischer Mechanismus. So haben Experimente an *C. elegans* gezeigt, dass RNAi-basierte Stilllegungsmechanismen über Generationen von Individuen hinweg weitergegeben werden. Dies ist geht einher mit der Etablierung restriktiver Chromatinformationen (Burton 2011).

Die Wirkungsweise von RNAi wird maßgeblich über zwei verschiedene Wege vermittelt. Dabei wirkt der RNA-Induced Silencing Complex (RISC) über Basenpaarung der siRNA zu einer Ziel-mRNA, die so zum Substrat endonukleolytischen Abbaus wird. Der andere zentrale Weg, über den siRNAs die Stilllegung eines Gens vermitteln, verhindert bereits die Transkription. Hier lenkt die siRNA den RNA-Induced Transcriptional Silencing Complex (RITS) an seine Zielsequenz, wo er die Etablierung einer inhibitorischen Chromatinkonfiguration induziert (Martienssen und Moazed in Allis 2006).

Darüber hinaus wurde ein bemerkenswerter Zusammenhang zwischen CGIs und deren Methylierung mit der Entstehung von RNAi gezeigt. So findet sich bei CpG-reichen Promotoren eine generelle Verminderung der Nukleosomenkonzentration. Dies kann als prinzipielle Prädisposition zur aktiven Transkription aufgefasst werden (Ramirez-Carrozzi 2009). Derartige Regionen finden sich aber nicht nur im Promoterbereich einzelner Gene, wo eine Transkription zur Gewinnung von mRNAs stattfindet. Tatsächlich findet sich im humanen Genom die Hälfte aller CGIs außerhalb bekannter Promotoren. Sie liegen im intergenischen Bereich oder intragenisch in der codierenden Sequenz. Ferner lies sich zeigen, dass diese CGIs tatsächlich als transkriptioneller Startpunkt fungieren. Es liegt nahe, dass hier regulatorisch relevante RNAs entstehen (Illingworth 2010). Die Bedeutung dieser Annahme wird durch die nachgewiesene, gewebeabhängige Methylierung der betroffenen CGIs gestützt. Dabei unterliegt die Expression der resultierenden Transkripte offenbar einer höheren Gewebespezifität als die Regulation beschriebener Promotoren. Die Steuerung der

Transkription, die von dieser Klasse von Startpunkten ausgeht, erfolgt offenbar in vielen Fällen durch die Methylierung der CGIs. Besonders deutlich tritt dies im Falle intragenischer CGIs auf, die häufiger methyliert werden als vergleichbare intergenische Sequenzen (Illingworth 2010). Zur Bedeutung dieser Sequenzen für zelluläre Differenzierung und Dedifferenzierung liegen bisher nur eingeschränkte Erkenntnisse vor. Nach diesen Informationen jedoch sollten sie bei zukünftiger epigenetischer Forschung nicht vernachlässigt werden.

2.1.1.7 Polycomb-Group-Proteine und Trithorax-Group-Proteine

Die Dynamik von CpG-Methylierung und Chromatinmodifikationen wird über andere epigenetische Mechanismen verschaltet und gesteuert. Neben der Vermittlung des Wechselspiels bahnen diese Systeme auch den Effekt der Expressionskontrolle. Dabei spielt die selektive Stilllegung von Promotoren durch Proteine der Polycomb-Gruppe (polycomb group proteins (PcG)) eine wichtige Rolle. PcG-Proteine finden sich vornehmlich an den Promotoren von Genen. Dort reprimieren sie die Expression des Gens. Die Wirkung der PcG-Proteine erscheint sowohl für Stammeigenschaften als auch für die Karzinogenese bedeutsam (Sauvageau 2008). Die Bindung dieser Proteine an DNA erfolgt präferentiell an CpG-reiche Regionen. Bisherige Untersuchungen haben dabei zur Identifizierung zweier verschiedener Proteinkomplexe geführt. Polycomb-repressive complex 1 und 2 haben bei der Reduktion von Genaktivität voneinander abgrenzbare Rollen inne. Zur primären Stilllegung wirkt dabei vor allem die Summe von Faktoren, die sich im polycomb-repressive complex 2 (PRC2) finden. Der Polycomb-repressive complex 1 führt anschließend zur Festigung der reduzierten Genaktivität. Hier ist vor allem die Etablierung eines entsprechenden Chromatinschemas von Bedeutung (Grossniklaus und Paro in Allis 2006). PcG-Proteine finden sich an CpG-haltigen Promotoren, die gemäß ihres Chromatinstatus sowohl transkriptionell aktiv als auch inaktiv erscheinen. Daher ist anzunehmen, dass sie ein dynamisches Regulationselement darstellen. Ihre Einflussnahme auf die Genaktivität wird in einigen Fällen zu einem späteren Zeitpunkt durch weitere Mechanismen gefestigt. Diese Stabilisierung der Genrepression erfolgt dann sowohl durch CpG-Methylierung als auch über Histonmodifikationen (Mikkelsen 2007, Deaton und Bird 2011).

Zur Wirkung des PRC2-Komplexes, weiteren reprimierenden Aktivitäten den Weg zu bahnen, liegen mehrere Beobachtungen vor. Besonders deutlich konnte dies bei CpG-haltigen Promotoren gezeigt werden. Hier wurde beobachtet, dass eine Bindung von PRC2 die Wahrscheinlichkeit um den Faktor 4,5 erhöht, dass dieser Promoter Ziel von de novo Methylierung wird. Zusätzlich führt die Repression von Genen durch PRC2 zur Trimethylierung von Lysin 27 auf Histon H3. Dies entspricht einem vertiefenden Schritt der Inaktivierung (Mohn 2008).

Weitere Experimente legen nahe, dass die Bindung von PRC2 an CpG-reichen Promotoren bereits durch deren fehlende Aktivität begünstigt wird. Demnach bedingt eine niedrige Transkription die Bindung dieser Faktoren und festigt so den inaktiven Status (Mendenhall 2010, Deaton und Bird 2011). Diese Erkenntnisse zeigen die PcG-Proteine als wichtige Determinante des spezifischen Expressionsprofils einer Zelle. Sie erscheinen als zentral für die Wandlung ausbleibender Transkription in dauerhafte Stilllegung. Ihre biologische Relevanz hat sich bereits in mehreren Studien bestätigt. So zeigten sie eine gravierende Bedeutung für die Orchestrierung der Genaktivität bei der Hämatopoese und der Tumorentstehung. Dabei hat sich der PRC2-Komplex als kompliziertes Konstrukt erwiesen, dessen Einzelkomponenten dicht mit anderen Prozessen verschaltet sind (Sauvageau 2008, Majewski 2008).

Als funktionelle Gegenspieler der PcG-Proteine treten die Proteine der Trithorax-Gruppe (trxG) in Erscheinung. Proteine dieser Gruppe die fördern die Transkription bestimmter Gene. Es handelt sich hier um eine sehr umfangreiche Gruppe von Faktoren. Ebenso umfangreich sind die vermuteten Mechanismen, über die trxG-Proteine ihre Wirkung entfalten. Neben Chromatinmodifikationen werden hier weitläufige Interaktionen mit der Transkriptionsmaschinerie diskutiert. Die Trithorax-Gruppe ist eine Summe vielgestaltiger Faktoren. Entsprechend schwer fassbar ist ihre funktionelle Rolle, bisherige Informationen sind lückenhaft. Aus den vorhandenen Erkenntnissen lässt sich eine erhebliche biologische Bedeutung ableiten. Es steht außer Frage, dass hier umfangreiche weitere Forschungsarbeit zu leisten ist (Kingston und Tamkun in Allis 2006).

2.1.2 Zusammenschau der Mechanismen, grundlegendes Funktionsprinzip

Die Gesamtheit der hier beschriebenen Regulationselemente der Genexpression bildet den Kern der Epigenetik nach aktuellen Erkenntnissen. Bemerkenswert ist die hohe Vernetzung der einzelnen Mechanismen untereinander. Die einzelnen Steuerungselemente bestehen aus einer Vielzahl von Unterkomponenten verschiedener Art. Proteine, Nukleinsäuren und anderen Substanzen tragen als komplexes Netzwerk zu den einzelnen funktionellen Achsen wie CpG-Methylierung oder Histonmodifikation bei. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt liegen nur begrenzte Informationen über deren Interaktionen vor. Darüber hinaus wird die Aufklärung der Einzelmechanismen durch deren Dynamik erschwert. Es sind hier deutliche Unterschiede je nach Gewebeart, Differenzierungsgrad oder momentanem Funktionszustand einer Einzelzelle zu erwarten.

Beim Studium der verschiedenen Autoren lassen sich auffällige Gemeinsamkeiten erkennen. Dies zeigt sich bei der Zusammenschau vieler Abhandlungen, die sich mit unterschiedlichen epigenetischen Mechanismen befassen. Dabei gelangen die Autoren für den jeweils behandelten Vorgang in einem gewissen Sinne zu ähnlichen Schlüssen.

Hier lässt sich ein grundlegendes Prinzip für die Dynamik und Wirkstärke von Kontrollmechanismen der Genexpression feststellen.

Dieses Prinzip wird am deutlichsten durch Deatons und Birds Vergleich der CPG-Methylierung mit einem Lichtschalter. Dieser Schalter wird durch eine Feder im ein- oder ausgeschalteten Zustand stabilisiert (Deaton und Bird 2011). Ein entsprechendes Verhalten wird auch den Histon- oder PcG-Protein-vermittelten Regulationsprozessen zugeschrieben. Auffallend ist, dass viele Mechanismen eine Blockade des betreffenden Gens allein dann nicht bewirken, wenn es einer aktiven Transkription unterliegt. Die Bedeutung des Transkriptionsvorgangs als Schutz vor inaktivierender Aktivität zeigt sich am deutlichsten im Falle der PCG-Proteine. Eine gleichartige Tendenz findet sich bei allen anderen epigenetischen Prozessen ebenfalls.

Umgekehrt bildet eine Restriktion der Genaktivität durch parallel ablaufende Prozesse die Voraussetzung für die Stilllegung durch einen anderen Mechanismus. So funktioniert beispielsweise die Etablierung der Histonmethylierung H3 Lys 9 als Voraussetzung für die DNA-Methylierung in *Neurospora crassa* (Tamaru 2001).

Gelöst im Nukleoplasma finden sich die einzelnen relevanten Moleküle, die Verantwortung für einen bestimmten Modus der Genregulation tragen. Wir fassen diese in „funktionelle Achsen“ zusammen. Eine solche Achse mündet jeweils in einer bestimmten Art der Interaktion mit der DNA: Durch die Bindung bestimmter Proteine kommt es zur verstärkten oder verringerten Adhäsion an Histone. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anlagerung sonstiger regulatorischer Proteine. Alternativ erfolgt die chemische Modifizierung der DNA im Falle der CpG Methylierung. In unterschiedlicher Ausprägung folgen die Mechanismen, die in diesen Achsen angeordnet sind, dem Verhalten des federgestützten Schalters: Ab einer bestimmten Einflussnahme auf ihre Aktivität wird die Genrepression stabilisiert. Bei vermindertem Auftreten der negativen Einflussgrößen unter einen bestimmten Punkt unterbleibt sie völlig. Es kommt dann zur verstärkten Genexpression. Dabei kann eine Achse, wenn sie massiv ausgelenkt wird, die anderen Achsen auf ihren Kurs bringen. Dies spielt offenbar bei der zellulären Reprogrammierung eine Rolle, ebenso bei physiologischen Differenzierungsprozessen.

Dabei darf aber nicht verkannt werden, dass allein schon die Unterteilung in Achsen, entsprechend dem Effekt auf das DNA-Molekül, eine erhebliche Vereinfachung darstellt. Wir beurteilen natürliche Sachverhalte vornehmlich gemäß den Verfahren, über die versucht wird, sie zu eruieren. Hier stellen DNA-Sequenzierung und ChIP (Chromatin-Immuno-Präzipitations)-Verfahren, mit deren Abwandlungen die wichtigsten Instrumente dar. Offenbar sind die epigenetischen Mechanismen jedoch über verschiedene Wege intensiv miteinander verschaltet. Schlüsselenzyme wie DNMT1 verfügen insbesondere bei Säugetieren über ausgeprägte Domänen zur Vermittlung dieser Interaktionen (Jurkowski 2011).

An diesem Netzwerk, das den Veränderungen in unmittelbarem Kontakt zur DNA vorgeschaltet ist, wirken demnach Faktoren, die eine genaue Steuerung ermöglichen. Der Apparat, der die Aktivität bestimmter Gene letztlich reguliert, funktioniert dann entsprechend dem Kippschalterprinzip. Ab einem spezifischen Schwellenwert, der sich aus der Zusammenschau der Subsysteme ergibt, verstärkt er die Tendenz. *Entweder* steigert er die Aktivität *oder* er verstärkt die Repression des Gens. In der Folge entstehen die charakteristischen Modifikationen der epigenetischen Informationsträger, die sich über die verfügbaren Maßnahmen detektieren lassen.

Trotz der Unzulänglichkeit der Verfahren und der Beschränktheit aktueller Erkenntnisse erlauben die verfügbaren Methoden eine systematische Aufklärung epigenetischer Sachverhalte. Unabhängig von den Prozessen, die sich im Vorlauf der zellulären Schaltung abspielen, stellen die an der DNA detektierbaren Veränderungen wichtige und handhabbare Indikatoren dar. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen dieser Methoden lassen sich wertvolle Informationen zum Funktionszustand einzelner Gene gewinnen. Auch wenn hier nur Facetten eines vielschichtigen Systems abgebildet werden, liefert etwa die genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung wegweisende Einblicke in die Epigenetik. Voraussetzung ist die überlegte Auswahl der untersuchten Zielregionen.

2.2 Stammzellendifferenzierung und Pluripotenz

Um epigenetische Prozesse zu verstehen, ihre technische und therapeutische Nutzung zu ermöglichen, bedarf es einer biologischen Versuchsplattform. Dafür eignen sich Stammzellen, die in den verschiedensten Subformen Einzug in die Forschung gehalten haben. Hier verwendete Stammzellen kommen teils natürlich vor, werden aber auch *in vitro* generiert.

Zellen, deren Kapazität dazu ausreicht, als Keimzelle einen vollständigen Organismus hervorzubringen, werden als totipotent bezeichnet. Dieser Zustand verliert sich bereits nach wenigen Zellteilungen.

Aus der inneren Zellmasse der Blastula lässt sich eine besondere Zellentität gewinnen. Diese Zellen haben zwar ihre Totipotenz verloren, verfügen jedoch über die Kapazität, in alle bekannten Gewebe des Körpers zu differenzieren. Diese Zellen werden ESCs (embryonal stem cells) genannt. Ihre Kapazität zur Differenzierung wird als Pluripotenz bezeichnet. ESCs weisen ein nahezu unbegrenztes Wachstumspotential in Kultur auf. Ihre Fähigkeit zur Differenzierung bleibt dabei erhalten (Surani und Reik in Allis 2006). Sie sind daher als primitivste Stammzellentität anzusehen, ihre Eigenschaften können als Referenz für pluripotente Zellen betrachtet werden.

Auf dieser Basis wurden Versuche zum Differenzierungsverhalten hin zu verschiedenen somatischen Zelltypen durchgeführt. Eine Ausdifferenzierung von Stammzellen lässt sich durch Veränderung der Kulturbedingungen herbeiführen. Auf der Grundla-

ge natürlicher und synthetischer Stammzellen wurden zudem umfangreiche Versuche zum physiologischen Vorgang der Differenzierung durchgeführt. Dabei wurde versucht, deren molekulare Grundlagen zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Forschung dienen bei der Planung zukünftiger und der Beurteilung bisheriger Forschung als Referenzwerte (Krueger 2010).

2.3 Zelluläre Reprogrammierung

Die Suche nach Determinanten zellulärer Differenzierung lieferte Schlüsselerkenntnisse zu Verständnis und Kontrolle des Zellschicksals. Dies ermöglichte schließlich die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs).

Anhand eines systematischen Screenings von 24 Faktoren, die sich vormals als besonders typisch für embryonale Stammzellen erwiesen hatten, wurde letztlich die Kombination von OCT3/4, SOX2, c-Myc und Klf4 ermittelt. Diese Faktoren wurden mittels synthetischer, viraler Vektoren in murinen Fibroblasten exprimiert. Die so entstehenden Zellen weisen verschiedene Eigenschaften auf, die charakteristisch für embryonale Stammzellen sind. Dazu zählen morphologische Kriterien und die Genese von Tumoren bei Transplantation in immundefiziente Mäuse. Diese Zellen tragen bei Verbringung in Embryonen zur Entstehung von Geweben bei, die allen drei Keimblättern entspringen (Takahashi und Yamanaka 2006). Zusätzlich verschieben sich molekulare Charakteristika in Richtung des embryonalen Zustandes. Es lässt sich sowohl eine Histonkonfiguration nachweisen, die einer ES-Zelle entspricht, als auch eine endogene Transkription der einmalig transfizierten Stammzellfaktoren. Die CpGs der Promotoren von Nanog und Oct4 verlieren überwiegend ihre Methylierung. Dies wird als Ausdruck ihrer Aktivierung gewertet. Diese induzierte Wandlung von Zelleigenschaften wird als Reprogrammierung der Zellen in einen pluripotenten Zustand bezeichnet (Takahashi und Yamanaka 2006, Wernig 2007). In einem weiteren Schritt wurde dieses Procedere auf menschliche Hautfibroblasten übertragen. Auch hier gelang es, reprogrammierte Zellen zu generieren. In beiden Fällen war die Erfolgsrate jedoch sehr niedrig (Takahashi und Yamanaka 2006, Takahashi 2007).

2.3.1 Variationen von Ausgangsmaterial, Faktoren und Methoden

Bereits bei den ersten Experimenten zur Generierung von iPSCs fiel die niedrige Effizienz dieser Maßnahme auf. Lediglich ein sehr geringer Teil der Zellen, die dem Verfahren unterzogen wurden, spiegelte anschließend die Eigenschaften embryonaler Zellen wider. Es kam hingegen zur vielfachen Bildung unspezifisch veränderter Zellkolonien (Takahashi 2007). Daher stellt sich die Frage, welche Eigenschaften eine Zelle zur Reprogrammierung prädisponieren. Offenbar sind nur bestimmte Zellen dafür empfänglich, eine umfassende Reprogrammierung zu durchlaufen. Hier ist anzunehmen, dass diese Eignung durch die epigenetische Konfiguration bedingt wird. Es wurde bereits früh vermutet, dass der gewünschte Weg vornehmlich von gewebeeigenen Stamm- und Vorläuferzellen beschritten wird. Etwa 0,067% der Zellen in muriner Haut können dieser Entität zugeordnet werden. Die physiologische Konfiguration dieser somatischen Stammzellen erlaubt bereits verschiedenartige Differenzierungen (Takahashi und Yamanaka 2006, Dyce 2004).

Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Ursprungsgewebe und Zellarten zur Generierung von pluripotenten Zellen verwendet. Dabei waren deutliche Unterschiede in der Reaktion auf die Maßnahmen zu beobachten, die zum Zwecke der Reprogrammierung angewandt wurden. Diese Differenz zeigte sich etwa bei der retroviralen Übertragung der vier grundlegenden Faktoren. Hier erwiesen sich Keratinozyten, im direkten Vergleich zu Fibroblasten, als 100-fach effizienter und doppelt so schnell empfänglich für Reprogrammierung (Aasen 2008).

Weitere Experimente bestätigten die Korrelation von erhöhter Zellteilungs- und Differenzierungskapazität bestimmter Zellen, zu einer verhältnismäßig effizienten Reprogrammierung. Bei somatischen Stammzellen sind diese prädestinierenden Eigenschaften auf Grund ihrer physiologischen Funktion besonders ausgeprägt. Ihre herausragende Eignung zur Reprogrammierung wurde in weiteren Untersuchungen näher beschrieben. So konnte zur Induktion von ESC-Eigenschaften in neuronalen Stammzellen auf die externe Zufuhr von SOX2 verzichtet werden. Gleichzeitig reduzierte sich die Zahl der hier zu transfizierenden Faktoren auf zwei. Dabei führte OCT4, zuzüglich c-Myc oder Klf4, bereits zum Erfolg (Kim 2008). Für diesen Effekt wird unter anderem eine gewisse endogene Produktion von SOX2 durch diese Zellart verantwortlich gemacht. Tatsächlich ließen sich diese Zellen in folgenden Experimenten allein durch die äußere Zufuhr von OCT4 in einen ESC-artigen Zustand überfüh-

ren. Dies ging allerdings mit einer Verringerung der Reprogrammierungseffizienz um den Faktor 10 einher (Kim 2009). Die Faktoren c-Myc und Klf4 werden mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Die Möglichkeit, von ihrer forcierten Expression abzusehen, stellt somit einen Sicherheitsgewinn dar. Bei der Auswahl von Zellen für Reprogrammierungsexperimente ist dies zu berücksichtigen. Die Fortschritte auf diesem Gebiet rücken die IPS-Technologie näher zur klinischen Applikation (Kim 2009, Okita 2007).

Im Rahmen aktueller Entwicklungen wird zunehmend darauf hin gearbeitet, die Reprogrammierung der Zellen so schonend und sicher wie möglich zu gestalten. Zu diesem Zweck wird der Verzicht auf virale Vektoren angestrebt. Insbesondere soll eine Integration des transfizierten DNA-Abschnitts in das Zielgenom möglichst vermieden werden. Dabei wird über systematische Screeningmethoden nach kleinen Molekülen gesucht, die mit den verschiedenen Signalwegen der Zelle in Interaktion treten. Auf diese Weise soll die Induktion der zelleigenen Gene für Pluripotenzfaktoren hervorgerufen werden. Deren externe Zufuhr als DNA-Vektor oder Protein wäre dann nicht mehr nötig (Ichida 2009).

Ein weiterer Ansatz verfolgt das Ziel, eine Reprogrammierung über Fusionsproteine zu ermöglichen. Diese synthetischen Proteine bestehen aus grundlegenden Pluripotenzfaktoren, an deren C-Terminus eine weitere Aminosäuresequenz angefügt wurde. Durch diese Modifikation wird das rekombinante Protein dazu befähigt, die Membran der Zielzelle zu penetrieren. Sobald es ins Zellinnere gelangt ist, entfaltet es seine Wirkung als Pluripotenzfaktor (Zhou 2009). Schließlich wurden auch miRNAs, deren Bedeutung im zellulären Geschehen immer deutlicher zutage tritt, zur gezielten Genese von IPS eingesetzt (Han 2011).

Letztlich ist die Frage nach den exakten Eigenschaften der iPSCs ungeklärt. Wie beschrieben, kommt es je nach Ausgangszellart, Faktorengemisch und Applikationsform zu einer unterschiedlichen Programmierungseffizienz (Hanna 2009). Welche Bereiche des Genoms effizient und nachhaltig reprogrammiert werden, ist nicht bekannt. Das unterschiedliche Ansprechen auf diese Maßnahmen ist möglicherweise als Hinweis auf molekulare Zustände zu werten, die in der reprogrammierten Zelle fortbestehen. Es liegt nahe, dass für einzelne klinische Applikationen spezifische Protokolle benötigt werden. Dabei wären Ausgangszellart und Reprogrammierungsmethode genau zu definieren. Außerdem wären molekulare Parameter für das fertige

Produkt exakt zu bestimmen. Eine gewisse Wiederholgenauigkeit dieser Vorgänge ist erforderlich, um die Risiken für Patienten kalkulierbar zu machen. Dies erfordert eine systematische Aufklärung des molekularen Geschehens, das der Reprogrammierung und dem spezifischen Differenzierungsverhaltens der iPSCs zu Grunde liegt (Patel und Yang 2010).

An stark vereinfachten Tiermodellen, z.B. für Sichelzell-Anämie, wurden bereits beachtliche Erfolge demonstriert. Für die praktische Nutzung der iPSCs ist jedoch ein erheblich detaillierteres Verständnis erforderlich (Hanna 2007).

Zur Annäherung an die klinische Applikation und zur Suche nach aufschlussreichen Modellen für die Forschung ist daher die Auswahl optimaler Zellen erforderlich. Deren Eignung zur Reprogrammierung ist ebenso wichtig wie ihr ansprechen auf bestimmte Differenzierungsmethoden. Zu diesem Zweck muss eine breite Palette natürlich vorkommender Stammzellen auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

Die unrestringierte, somatische Stammzelle (USSC) aus Nabelschnurblut hat bei bisherigen Untersuchungen große Hoffnung geweckt. Sie erscheint als überaus brauchbare Zellentität für Forschung und zukünftige Anwendung.

Menschliche USSCs sind mit vertretbarem Aufwand aus frischem Nabelschnurblut zu gewinnen. Daher ist eine standardmäßige Gewinnung nach einer Entbindung wirtschaftlich und technisch unproblematisch. Der niedrigen Konzentration dieser Zellen im Nabelschnurblut steht eine gute Kultivierbarkeit der Zellen gegenüber. Bemerkenswert ist die hohe Zahl an Passagen bzw. Kulturzyklen, die von den Zellen durchlaufen werden kann, ohne dass es zu spontaner Differenzierung kommt. Dabei behalten die Zellen ungewöhnlich konstant eine hohe Telomerlänge, verglichen mit MSCs 30jähriger Spender.

USSCs weisen in ihrem natürlichen Zustand ein breites Potential an verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten auf. Die USSC hat ihre Fähigkeit zur Differenzierung in die verschiedensten Gewebe in vivo und in vitro unter Beweis gestellt (Kögler 2004). Die Induktion der Differenzierung lässt sich dabei exakt steuern. Dazu ist ein hoher, aber beherrschbarer technischer Standard ihrer Handhabung erforderlich (Kögler 2006).

Diese Eigenschaften machen die USSC aus Nabelschnurblut zu einem ernstzunehmenden Kandidaten für therapeutische Anwendungen. Ihr unrestringierter Zustand legt eine klinische Anwendung ohne vorherige Reprogrammierung nahe. Zukünftige

Experimente haben zu klären, wie die USSC auf verschiedene Reprogrammierungsverfahren reagiert. Es ist möglich, dass sie durch ihre physiologische Konfiguration bereits auf schonende Verfahren gut anspricht.

Zudem lassen sich am Differenzierungsverhalten der USSC die molekularen Grundlagen von zellulärer Identität und deren Plastizität studieren.

2.4 Osteo-Differenzierung und Markerproteine

In vitro lässt sich die USSC in verschiedene Differenzierungswege lenken. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen deren Derivate, die eine Osteo-Differenzierung durchlaufen haben. Dieser Vorgang dient hier als Modell für den Übergang der USSC in ein spezifisches Gewebe. Durch die Anreicherung des Kulturmediums mit Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat sowie Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat (DAG) kommt es zur Osteo-Differenzierung der USSC. Dabei bilden die Zellen morphologische und funktionelle Eigenschaften aus, die dem physiologischen Zustand von Osteoblasten entsprechen. Hier kommt es zur Bildung von Kalziumphosphatablagerungen, die bereits makroskopisch zu erkennen sind. Außerdem exprimieren die Zellen eine Reihe von knochenspezifischen Faktoren. Vorherige Untersuchungen haben einen Anstieg der Transkription von alkalischer Phosphatase, Osteokalzin, Osteopontin, Bone-sialo-Protein und Kollagen Typ I nachgewiesen (Kögler 2004).

Als Indikator für den Grad der Differenzierung wurden hier die Markerproteine Osteokalzin und alkalische Phosphatase gewählt.

Osteokalzin ist ein Kalzium-bindendes, hochgradig knochenspezifisches Protein (Hauschka 1989). Im Knochengewebe stellt es neben den Kollagenen eines der häufigsten Proteine dar. Es wird zudem ins Blut sezerniert, wo es hormonale Wirkung entfaltet. Sein Effekt beschränkt sich dabei nicht auf das Knochengewebe, sondern zeigt offenbar einen Einfluss auf den Glucosemetabolismus. Dabei steigert Osteokalzin den Energieumsatz und reduziert die Fettmasse des Körpers (Yamaguchi 2011). Alkalische Phosphatase ist ein membrangebundenes Enzym, das Monophosphates-ter bei einem alkalischen pH-Optimum hydrolysiert. Es wird angenommen, dass dieses Enzym zur Mineralisierung des Knochens beiträgt (Mahmoodian 1996). Bei der alkalischen Phosphatase des Knochens handelt es sich um ein Protein, das vor-

nehmlich auf Osteoblasten lokalisiert ist. Bei erhöhtem Knochenstoffwechsel ist es vermehrt im Serum nachzuweisen (Epstein 1988).

Die phänotypische Differenzierung der Osteoblasten wird in drei Phasen unterteilt: Proliferation, Reifung der extrazellulären Matrix und Mineralisierungsphase. Während jedem dieser Abschnitte kommt es zur verstärkten Expression bestimmter Markerproteine (Koizumi 1997).

Alkalische Phosphatase wird ab Mitte der Reifungsphase der extrazellulären Matrix intensiv exprimiert. Beim Eintritt der Zelle in die Mineralisierungsphase reduziert sich jedoch die Transkription von alkalischer Phosphatase deutlich. In diesem fortgeschrittenen Stadium kommt es zur vermehrten Expression von Osteokalzin. Dieses Protein ist daher als später Marker der Knochenbildung anzusehen (Koizumi 1997).

2.5 Wichtige Faktoren für Stammzeleigenschaften, Pluripotenz und Reprogrammierung

Die molekularen Grundlagen embryonaler Stammzellen waren bereits Gegenstand intensiver Forschung. Dabei wurde erkannt, dass der Zustand der Pluripotenz in erheblichem Maße auf der Aktivität eines regulatorischen Netzwerks basiert. Als dessen zentrale Elemente wurden NANOG, OCT4 und SOX2 identifiziert. Diese Schlüsselfaktoren nehmen auf eine Vielzahl von Zielgenen Einfluss und sind darüber hinaus untereinander verschaltet. Dabei induzieren diese Proteine unter anderem gegenseitig ihre Expression. Neben einer Vielzahl von Genen sind an diesem Netzwerk auch mehrere miRNAs beteiligt (Boyer 2005).

Wie beschrieben, haben diese Schlüsselfaktoren ihre Wirksamkeit bereits bei der Induktion von zellulärer Pluripotenz gezeigt.

Im Folgenden werden die wichtigsten bisher identifizierten und verwendeten Faktoren kurz vorgestellt.

2.5.1 OCT4

OCT4 hat seine zentrale Bedeutung für zelluläre Pluripotenz in zahlreichen Experimenten unter Beweis gestellt. Sein natürliches Vorkommen ist auf die embryonale Phase beschränkt. Hier findet es sich vornehmlich in der inneren Zellmasse des Tro-

phoblasten (Pan 2002). Dieses Protein bindet viele regulatorische Stellen im Genom, großteils im Verbund mit anderen Faktoren. Außerdem ist es zur Formierung von Heterodimeren mit SOX2 in der Lage. Die Expression von OCT4 muss zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz in einem bestimmten Bereich konstant gehalten werden. Wird diese Konzentration über- oder unterschritten, kommt es zur Differenzierung der Zelle (Pan 2002, Boyer 2005). Darüber hinaus haben sich Hinweise auf die Rolle von OCT4 bei der Entstehung von Dysplasien ergeben. Dieser Zusammenhang konnte experimentell bei ektopter Expression gezeigt werden. Unterstützt wird diese Beobachtung durch das natürliche Vorkommen von OCT4 in Malignomen (Hochedlinger 2005).

2.5.2 SOX2

SOX2 fungiert vornehmlich in neuronalen Stammzellen und ESCs zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz. Ferner spielt es bei der Entstehung vom Epiblast und später bei der Entwicklung des extraembryonischen Ektoderms eine Rolle (Avilion 2003). Seinen Beitrag zur Pluripotenz liefert SOX2 dabei im Rahmen des Netzwerkes der Pluripotenzfaktoren. Neben verschiedenen weiteren regulatorischen Funktionen steuert SOX2 hier vornehmlich die Expression von OCT4 (Yuan1995, Masui 2007). Die Expression von SOX2 steht unter dem Einfluss regulatorischer Elemente, wie dem Enhancer *SRR1*. Die Wirkstärke der Enhancerfunktion von *SRR1* wird durch epigenetische Modifikationen dieses Elements gesteuert (Sikorska 2008).

2.5.3 NANOG

NANOG ist ein wichtiger Stabilisator der Pluripotenz von Stammzellen, sein Einfluss ist zum Erhalt des undifferenzierten Status notwendig (Chambers 2003, 2007). Offenbar ist Nanog in den STAT3 Signalweg eingebunden, der die pluripotenz erhaltende Wirkung von LIF (Leukemia inhibitory factor) in vitro vermittelt. NANOG weist neben der Bindungsaffinität zu einer Vielzahl von Zielgenen eine enge Verschaltung mit den anderen zentralen Pluripotenzfaktoren auf (Pan 2007).

2.5.4 Telomerase

Telomerase ist ein Enzymkomplex, dessen Aufgabe in der Regeneration der Telomere durch Anfügen von TTAGGG-Repeats besteht. Diese Aktivität ist primär erforderlich, da in Folge der semikonservativen Replikation der DNA jede Zellteilung mit einer Verkürzung dieser Bereiche einhergeht. Darüber hinaus stellen die Telomere ein Funktionselement zur Steuerung von Schicksal und Tod der Zelle dar. So sind sie an der Einleitung der Apoptose beteiligt. Auch auf Entstehung und Wachstum von Tumoren nimmt die Telomeraseaktivität Einfluss (Flores u. Blasco 2010). Die Telomerase besteht aus einer Untereinheit mit Reverse-Transkriptase-Aktivität, die von hTERT codiert wird, einer RNA-Matrize (hTR) und einem Telomerase-assoziierten Protein, codiert durch hTEP1. Dazu kommt eine Vielzahl anderer Faktoren, die Einfluss auf die Funktion dieses Apparates nehmen (Guilleret 2002). Für die Steuerung der Expression von hTERT wird einer großen CGI besondere Bedeutung beigemessen. Sie überspannt den Transkriptionsstartpunkt von ca. -1800 bp bis +2200 bp. Für die Methylierung weiter Teile dieser CGI wurden komplexe regulatorische Funktionen beschrieben. Besonders auffällig ist, dass offenbar die *Hypemethylierung* bestimmter Areale zur effektiven Transkription von hTERT benötigt wird (Guilleret und Benhattar 2004).

Entgegen der gängigen Beobachtung, dass die Methylierung eines Promoters eine verminderte Aktivität seines Gens bedingt, unterliegt die Expression von hTERT offenbar besonderen Regulationsprozessen. Es wird vermutet, dass hier methylierungsabhängige Repressoren eine Rolle spielen. Deren inhibitorischer Effekt auf die Expression dieses Gens setzt eine Bindung an bestimmte CpG-reiche Abschnitte voraus. Dies wird durch die Methylierung der relevanten Regionen verhindert (Guilleret und Benhattar 2004). Außerdem wird eine Beteiligung zusätzlicher Faktoren angenommen, die unabhängig von CpG-Methylierung wirken (Guilleret und Benhattar 2004). Allerdings ist die epigenetische Steuerung des *hTERT*-Promoters, insbesondere in Hinsicht auf Wirkung und Zustandekommen seiner CpG-Methylierung, Gegenstand kontroverser Diskussionen (Zinn 2007, Kyo 2008).

2.5.5 Protoonkogene als Mediatoren der Dedifferenzierung: „Pluripotenz-Induktions-Booster“

Die beiden Faktoren c-Myc und Klf4 sind mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Sie sind daher als potentielle Risikofaktoren bei der Herstellung von Zellen zu sehen, die zur Implantation in Patienten vorgesehen sind. Allerdings haben sie in vielen Experimenten ihre unterstützende Wirkung bei der Induktion von Pluripotenz unter Beweis gestellt. Die Rolle dieser Faktoren im Rahmen der Reprogrammierung besteht offenbar in der Induktion einer weitreichenden Chromatinmodifikation. In Folge wird es den anderen eingesetzten Faktoren ermöglicht, an ihre Zielgene zu binden. So können die autoregulativen Regelkreise zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz in Gang gesetzt werden. Daher ist den Protoonkogenen c-Myc und Klf4 im Rahmen der Reprogrammierungsexperimente nicht der Wert eines zentralen Transkriptionsfaktors beizumessen. Sie dienen viel mehr als unterstützende und beschleunigende Faktoren, als „Pluripotenz-Induktions-Booster“ (Takahashi und Yamanaka 2006, Takahashi 2007, Okita 2007).

2.5.6 Komplexe Interaktionen

Die nähere Untersuchung dieser Schlüsselfaktoren und ihrer Interaktion ließ ihr Zusammenspiel als funktionelle Einheit weiter deutlich werden. Mittels fortschrittlicher Methoden wurden Bindestellen von Faktoren ermittelt, die das Expressionsprofil von ESCs in vivo bedingen. Dabei wurden per CHIP-Seq-Technik 3583 Genloci ermittelt, die als relevant für die Pluripotenz erscheinen. Diese Elemente zeigten eine gemeinsame Okkupation durch NANOG, SOX2 und OCT4 in 43,4 % der Fälle. Diesem zentralen Netzwerk stehen als zweite, funktionell separate Gruppe die regulatorischen Elemente c-Myc und n-Myc gegenüber. In einem nächsten Schritt wurde die Fähigkeit des NANOG-OCT4-SOX2-Clusters zur Beeinflussung entfernt liegender Zielsequenzen nachgewiesen. So wurde gezeigt, dass dieser Cluster Kernelement eines umfassenden Netzwerks ist. Dieser Komplex entfaltet seine breite Wirkung unter Beteiligung einer Vielzahl von variablen Cofaktoren. Das gesamte Netzwerk ist um die Kernfaktoren angeordnet und beeinflusst maßgeblich den Differenzierungsgrad der Zelle. Um die vielschichtigen, verzweigten Wirkungsweisen dieses Komplexes be-

grifflich zu fassen, wird er auch als „Enhancosom“ bezeichnet (Chen 2008). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt unter anderem die Untersuchung des Promoters von *hTERT*. Dieses Gen zählt zwar nicht zum Kernnetzwerk, liegt aber im Wirkungsbereich des Enhancosomen. Es wurde beobachtet, dass dieses Netzwerk die Bindung des transkriptionalen Koaktivators p300 an bestimmte Sequenzen vermittelt. P300 kann wiederum im Verbund mit c-Myc am *hTERT*-Promotor wirken und eine Induktion von Telomerase herbeiführen (Chen 2008, Faiola 2005).

3. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, einen Beitrag zur Aufklärung der außergewöhnlichen Eigenschaften der USSC zu liefern. Dies erfolgte anhand der Untersuchung von wichtigen regulatorischen Elementen, den Promotoren von Pluripotenzfaktoren.

Zu diesem Zweck standen USSCs in undifferenziertem Zustand so wie nach 14 tägiger Induktion einer Osteo-Differenzierung zur Verfügung. Anhand dieses Modells waren neue Erkenntnisse zur epigenetischen Konfiguration entscheidender Pluripotenzfaktoren zu gewinnen.

USSCs zeigen umfassende Gemeinsamkeiten mit ESCs, etwa die Fähigkeit zur Ausbildung von Zelltypen aller drei Keimblätter. Die genaue Herkunft und die physiologische Funktion der USSC sind weitestgehend unbekannt. Es besteht daher großes Interesse an der Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Zellen (Kögler 2004). In der aktuellen Literatur finden sich verschiedene Herangehensweisen, um Ursachen von Pluripotenz und Differenzierungskapazitäten einer Zelle zu ergründen. Solche Daten stehen für ESC sowie einige weitere Zellentitäten zur Verfügung. Hier ergibt die Zusammenschau konsistente Eckpunkte, die es erlauben, molekulare Befunde annäherungsweise in Bezug zu zellulären Eigenschaften zu setzen. Umso lohnenswerter scheint es, entsprechende Daten auch von USSCs zu erheben. Anhand dieser Parameter sollten weitere Hinweise auf die Ursachen der einzigartigen Eigenschaften dieser Zellen gewonnen werden. Als zusätzliches Ziel sollte der Fundus an Vergleichswerten erweitert werden. So dienen diese Daten zur Einordnung anderer Stammzellen und deren abgeleiteter Entitäten.

Die Ausdifferenzierung der USSCs erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Die resultierenden Zellen zeigten makroskopisch und mikroskopisch Charakteristika kultivierter Osteoblasten. Mögliche Unterschiede zwischen den bereitgestellten Zelllinien waren von Interesse. Darüber hinaus waren weitere Informationen zum Funktionszustand der Zellen hilfreich. Gewünscht war eine sinnvolle Ergänzung zur umfassenden Beurteilung des untersuchten Modells. Es bot sich an diese Fragestellungen anhand der Transkription aussagekräftiger Markergene zu eruieren. Als adäquate Methode wurde die Real-Time-PCR gewählt. Dabei wurden die Transkripte der Osteo-Marker Osteokalzin und alkalische Phosphatase in ihrer Konzentration bestimmt. Zur Normierung wurde das ubiquitär vorkommende Enzym GAPDH verwendet. Es diente zum Ausgleich ggf. auftretender Differenzen der generellen cDNA-Konzentration in den gemessenen Proben.

Mehrere vorherige Untersuchungen näherten sich den molekularen Charakteristika der USSC auf Proteinebene an. Hier standen bereits die zentralen Stammzellfaktoren OCT4, NANOG und SOX2 im Focus. Dabei konnte keine Expression dieser Faktoren nachgewiesen werden (Kluth 2010). Ebenso wenig fanden sich Hinweise auf ein Vorhandensein von Telomerase auf Proteinebene (Aktas 2010). Diese Befunde werfen die Frage auf, ob diese Faktoren in USSCs tatsächlich dauerhaft inaktiviert sind. Außerdem ist zu klären, wie die Repression dieser Faktoren bewerkstelligt wird, die sich in dem Befund auf Proteinebene manifestiert. Es bot sich daher an, die epigenetische Regulierung der zentralen Stammzellfaktoren genau zu untersuchen. Daher wurde die epigenetische Konfiguration der entsprechenden Promotoren zum zentralen Gegenstand der Untersuchung gewählt.

Wie eingangs beschrieben, finden sich mehrere voneinander abgrenzbare aber in Zusammenhang stehende Systeme zur Regulierung der Genaktivität. Die vorliegende Arbeit wurde als Bestandteil eines Projektes angefertigt, in dessen Rahmen auch Histonmodifikationen untersucht wurden. Zur Grundlage dieser Dissertationsschrift dient aber vornehmlich die Darstellung von Methylierungsschemata. Wie eingangs beschrieben, ist die biologische Bedeutung der CpG-Methylierung zentral. Im Experiment fungiert sie als wichtiger epigenetischer Indikator. Diese Untersuchung erfolgte in Bereichen des Genoms, denen eine hohe Relevanz für das Differenzierungspotential und dessen Dynamik beigemessen wird. Zu CpG-Methylierungsmustern und

deren Veränderung lassen sich über verschiedene Methoden Ergebnisse gewinnen. Das Verfahren, das zu diesem Zweck die genauesten Resultate erbringt, ist die genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung. Dabei wird eine Darstellung des Methylierungszustandes der einzelnen CpG-Nukleotide erreicht. Von dieser Methode wurde hier vornehmlich Gebrauch gemacht, um die fraglichen Regionen zu charakterisieren.

4. Ergebnisse

4.1. Real-Time-PCR

In einem ersten Schritt wurden per Real-Time-PCR die Expressionsraten verschiedener Osteo-Marker gemessen. Hier zeigten die untersuchten Zellen teils deutliche Differenzen.

Die Dauer der Kultivierung und die angewandten Maßnahmen zur Induktion der Osteo-Differenzierung waren bei den verwendeten Zellen identisch. Die 14-tägig inkubierten Zellen zeigten eine Morphologie, wie sie für Osteoblasten typisch ist. Durch die fortgeschrittene Kalzifizierung und das harte, die Zellen umgebende Material gestaltete sich ihre Gewinnung für die DNA- und RNA-Präparation aufwendig. Es erforderte einen erheblichen mechanischen Krafteinsatz, sie vom Boden der Kulturschale zu lösen. Trotz augenscheinlicher Gleichartigkeit variierte die Ausprägung der Transkription von zentralen osteoblastären Identifikationsfaktoren. Dabei ließen sich teilweise erhebliche Differenzen zwischen den einzelnen Zelllinien feststellen.

Zunächst erfolgte eine vergleichende Messung der Transkription des Osteoblastenmarkers *Osteokalzin*, per Real-Time-PCR. Hier zeigte sich eine deutliche Zunahme der Konzentration entsprechender Transkripte bei USSCs, die 14 Tage unter Osteo-Differenzierungs-Bedingungen inkubiert wurden, im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen aus Nabelschnurblut (**Abb. 1A**).

Der Grad der Zunahme der Transkription von *Osteokalzin*-mRNA, ist zwischen den Paaren von USSC und differenzierter Zelle relativ gleichförmig. Lediglich bei Zelllinie 335 zeigte sich dieser Effekt etwas deutlicher. Hier lag der gemessene Wert über dem der Osteoblasten, die als Positivkontrolle dienten. Bei Zelllinie 8/51 konnte

ebenfalls eine intensive Steigerung beobachtet werden. Dort blieb die Transkription aber unter dem entsprechenden Wert der Osteoblasten.

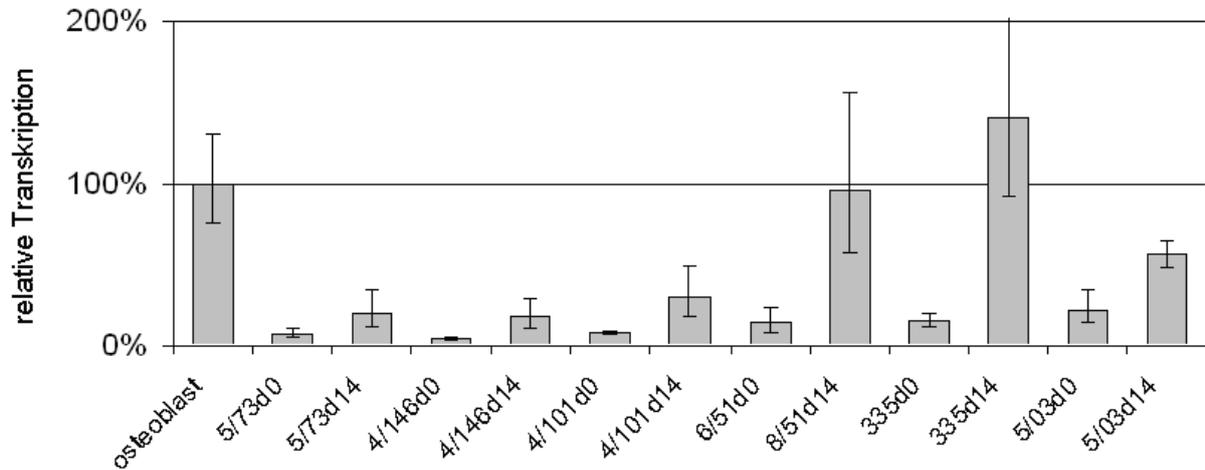


Abb. 1A: Relative Transkription von *Osteokalzin* in verschiedenen USSC-Linien sowie in deren Derivaten nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung und in Osteoblasten, gemessen per Real-Time-PCR. 100% entspricht der Transkriptionsrate von Osteoblasten.

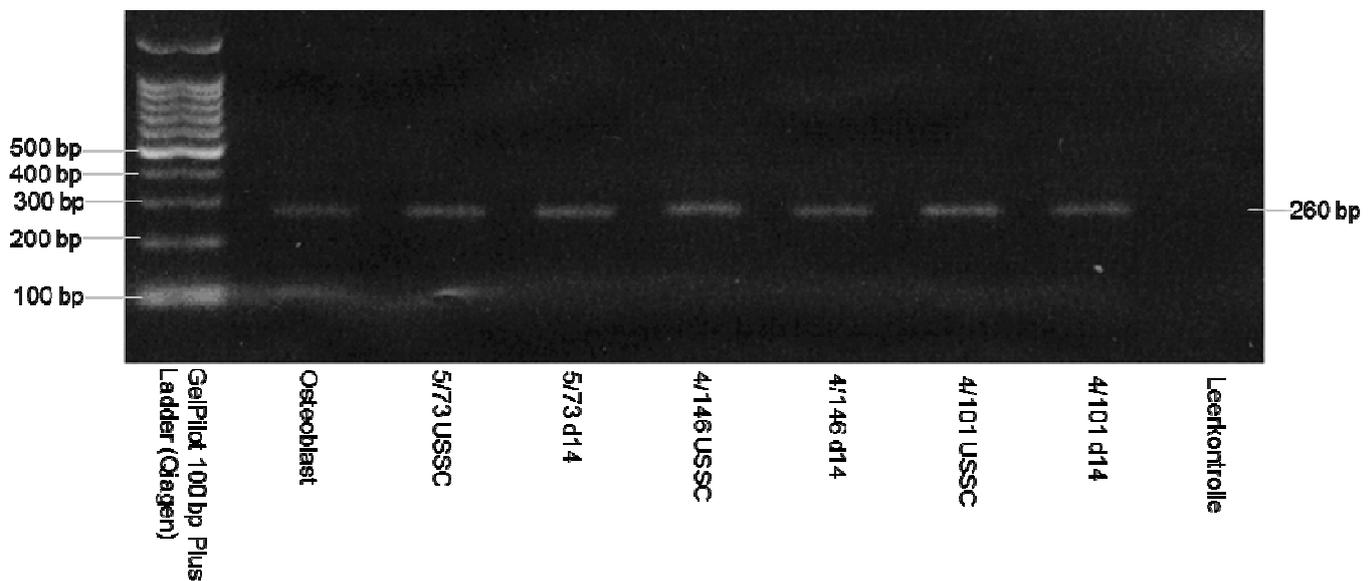


Abb. 1B: PCR-Produkte verschiedener cDNA-Präparationen, amplifiziert mit den Primern für *Osteokalzin*, die auch für die Real-Time-PCR zum Einsatz kamen, aufgetragen auf Agarosegel. d14 entspricht 14-tägiger Osteo-Differenzierung.

Die Tendenz zu einer erhöhten Transkription von *Osteokalzin* nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung ließ sich auch im optischen Vergleich der PCR-Produkte erkennen. Auf dem gezeigten Gel ist das Resultat einer solchen PCR-Reaktion zu sehen. Dabei

wurden gleiche Mengen cDNA mit den Primern amplifiziert, die auch bei der Real-Time-PCR zum Einsatz kamen (**Abb. 1B**). Die eher niedrigen Unterschiede zwischen den Banden, sind wahrscheinlich in erster Linie durch die relativ hohe Sättigung der PCR-Reaktion zu erklären, die hier nach 32 Replikationszyklen erreicht wurde.

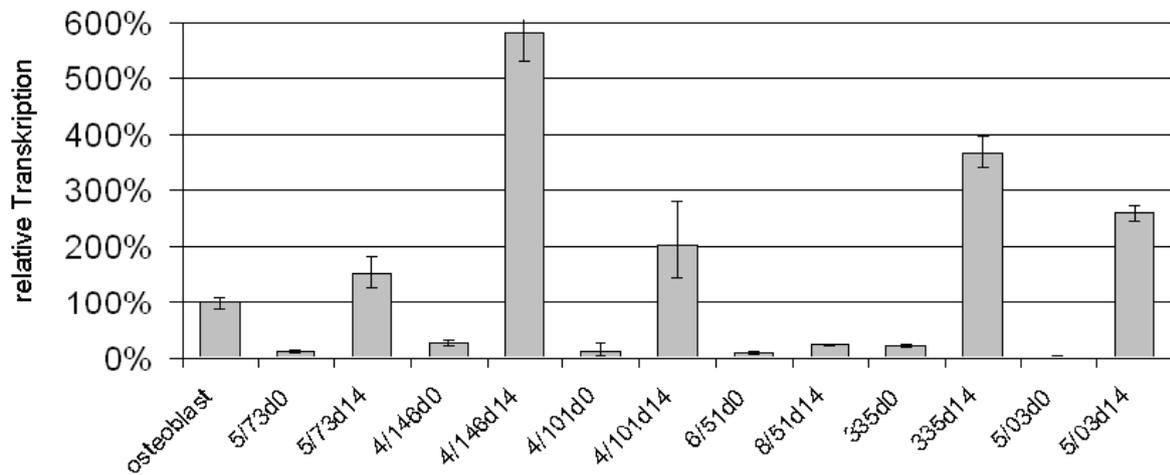


Abb. 1C: Relative Transkription von *alkalischer Phosphatase* in verschiedenen USSC-Linien, sowie in deren Derivaten nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung und in Osteoblasten, gemessen per Real-Time-PCR. 100% entspricht der Transkriptionsrate von Osteoblasten.

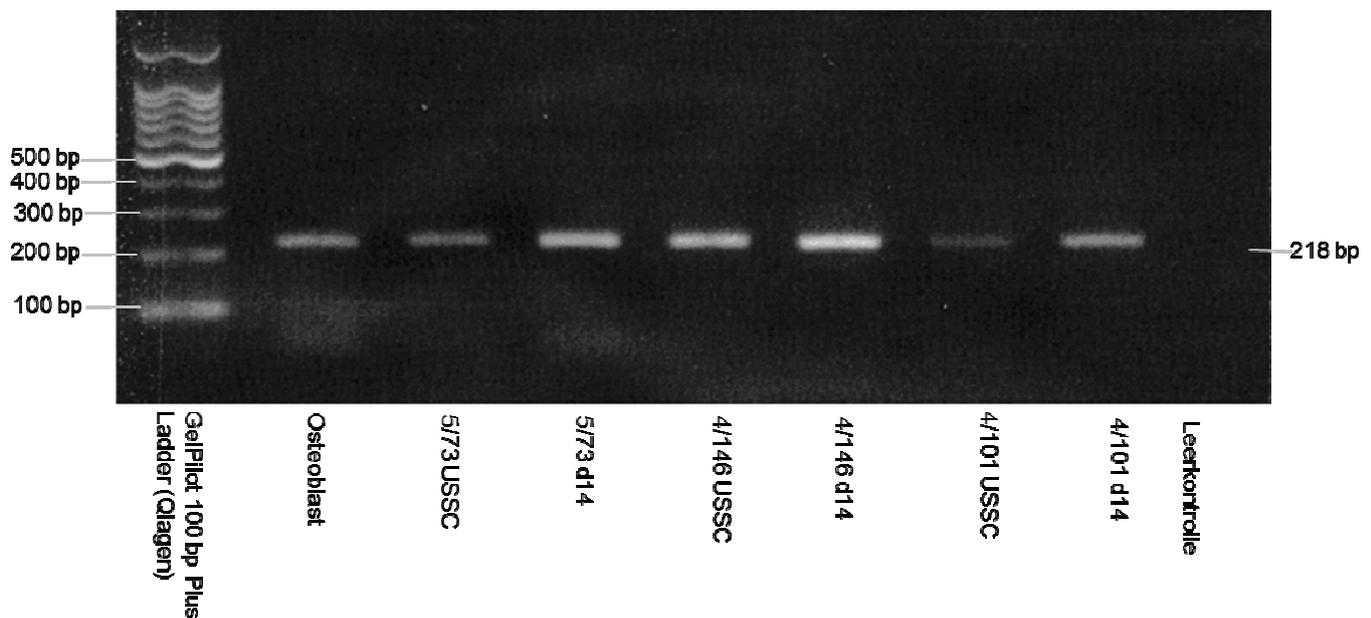


Abb. 1D: PCR-Produkte verschiedener cDNA-Präparationen, amplifiziert mit den Primern für *alkalische Phosphatase*, die auch für die Real-Time-PCR zum Einsatz kamen, aufgetragen auf Agarosegel. d14 entspricht 14-tägiger Osteo-Differenzierung.

Auf Basis selbiger cDNA-Präparationen wurde darüber hinaus das Gen für *alkalische Phosphatase*, ein weiterer Marker der Osteoblastendifferenzierung, auf seine Transkription überprüft. Bereits auf dem Gel zeigten sich bei Verwendung gleicher Mengen cDNA deutliche Unterschiede der sichtbaren Banden (**Abb. 1D**). Ebenso machte

die Real-Time-PCR die Zunahme deutlich, der die Transkript-Konzentration infolge der induzierten Differenzierung unterliegt (**Abb. 1C**). Die Transkription von *alkalischer Phosphatase* ließ die deutlichsten relativen Unterschiede bei den Zelllinien 5/73, 4/146 und 4/101 erkennen. Besonders bei Zelllinie 4/146 kam es zu einer außergewöhnlich intensiven Steigerung der Transkription. Es zeigte sich weiterhin, dass die Zunahme dieses Markers den bei Osteoblasten gemessenen Wert mehrfach deutlich übersteigt. Eine gleichartige Dynamik ließ sich nicht bei der parallel durchgeführten Messung der Osteokalzin-cDNA feststellen.

4.2.Natriumbisulfit-Sequenzierung

4.2.1 NANOG

Zwischen der Alu-Retrotransposon Region, die außerhalb der Genregulation liegt und dem Transkriptionsstart des NANOG-Gens befinden sich vier einzelne CpGs.

Um aufzuklären, wie dieses epigenetische Kontrollelement im Falle der USSC aus Nabelschnurblut konfiguriert ist, wurde anhand der Zelllinien 5/73 und 4/146 eine Natriumbisulfit-Sequenzierung des Promotorbereichs vorgenommen (**Abb. 2A**).

Zur Vereinfachung werden im Folgenden die CpGs in diesem Bereich mit den Buchstaben **A** bis **D** bezeichnet. Dabei stellt A das am weitesten vom Transkriptionsstart entfernt gelegene (in der Abbildung ganz links) und D das am nächsten daran befindliche CpG (in der Abbildung ganz rechts) dar. Die beiden inneren CpGs sind ebenfalls in dieser Folge benannt.

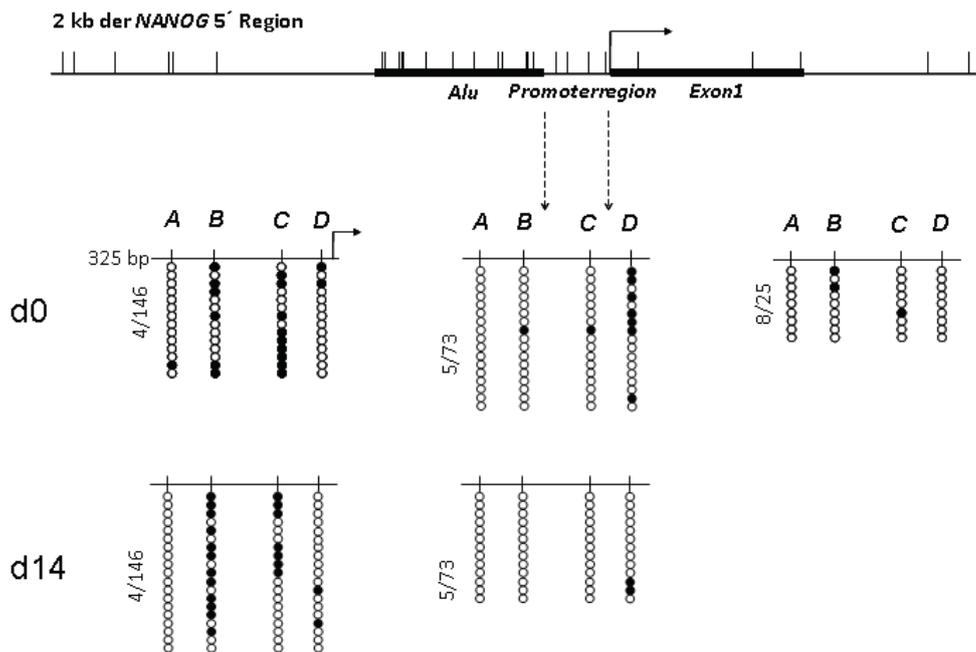


Abb. 2A: DNA-Methylierung des *NANOG*-Promoters im Verlauf

Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *NANOG*-5' Region mit der relativen Position eines *Alu*-Elements, Transkriptionsstartpunkt (durchgezogener Pfeil), erstes Exon und CpG-Dinukleotide (senkrechte Striche). Die gestrichelten Pfeile umgrenzen die Region, die durch genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung erfasst wurde. Im unteren Teil der Abbildung findet sich in der oberen Reihe die Darstellung der Methylierungsschemata der USSC-Linien (d0), in der unteren Reihe eine entsprechende Darstellung nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung. Weiße Kreise entsprechen unmethylierten CpG-Dinukleotiden, ausgefüllte Kreise methylierten CpG-Dinukleotiden. Bezeichnung **A** bis **D** siehe Text.

Zelllinie 4/146

Bei Zelllinie 4/146 konnte aus den USSCs in 14 Fällen der betreffende Genabschnitt dargestellt werden. Aus dem Material selbiger Zelllinie nach 14 Tagen Osteo-Differenzierung ließen sich 19 dieser Sequenzen gewinnen.

Im undifferenzierten Zustand zeigen die Zellen ein methylierungsarmes Schema, das eine gewisse Heterogenität aufweist. So stellte sich in 9 der 14 Proben **C** als methyliert dar. Auch **B** wies in 6 Fällen, also knapp der Hälfte der gewonnenen Sequenzen, diese Modifikation auf. Die beiden „äußeren“ CpGs im beschriebenen Bereich sind hingegen fast durchgehend unmethyliert. Auffällig sind zwei von drei Fällen, in denen eines dieser beiden CpGs methyliert ist. Hier sind jeweils auch die beiden „inneren“ CpGs so modifiziert.

Nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung zeigt sich -wie auch beim USSC-Status der Zellen- ein heterogenes Bild. Die Methylierung betrifft auch hier vornehmlich die beiden „inneren“ CpGs. Dabei ist **B** in 10 von 19 Fällen methyliert, **C** in 7 von 19 Fällen, also je etwa der Hälfte der gewonnenen Sequenzen. In 5 der Fälle, in denen **C** methyliert ist, trifft dies auch auf **B** zu. **A** ist in keinem Falle methyliert, **D** in zweien. Hier ist, im Gegensatz zum USSC-Status, keine Korrelation der Methylierung der beiden inneren zu den äußeren CpGs zu vermuten.

Wenngleich die Aussagekraft aufgrund der Zahl der gewonnen Sequenzen weiterer Überprüfung bedarf, deutet sich hier eine gewisse Systematik an: Im USSC-Status findet sich ein heterogenes Schema, das in der Gesamtintensität der Methylierung keine bedeutende Veränderung aufweist. Methylierte CpGs finden sich in nennenswertem Umfang nur in den Positionen **B** und **C**. Bei der Osteo-Differenzierung kommt es zu einer Verschiebung des am häufigsten methylierten Nukleotids von Position **C** auf Position **B**.

Zelllinie 5/73

Aus DNA-Präparationen von Zelllinie 5/73 wurden per Natriumbisulfit-Sequenzierung 17 Datensätze für die fragliche Region im USSC-Status gewonnen. 13 weitere ließen sich nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung erheben.

Im undifferenzierten Zustand war eine sehr geringe Methylierung der erfassten CpGs festzustellen. Lediglich in Position **D** fanden sich in 7 der 17 Sequenzen entsprechende Modifikationen. In einem dieser Fälle sind zudem die inneren CpGs betroffen (**B** und **C**). Darüber hinaus findet sich hier überhaupt keine Methylierung.

Innerhalb der 13 Sequenzen, die nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung gewonnen wurden, finden sich keine methylierten CpGs. Eine Ausnahme bilden zwei Sequenzen, die in Position **D** diesen Befund erbrachten.

Bemerkenswert ist, dass diese Daten im Laufe der Ausdifferenzierung eher eine Abnahme der Methylierung des entsprechenden Promoters zeigen. In der osteoblastenartig differenzierten Zelle weist der Promoter nahezu gar keine Methylierung auf.

Zusätzlich erhobene Daten: Pluripotenz-induzierte Zellen aus USSCs

Zusätzlich zu den beschriebenen Zellen im undifferenzierten und Osteodifferenzierten Zustand, wurde die Untersuchung des *NANOG*-Promoters auf besondere iPSC-Zellen ausgeweitet. Diese waren aus Nabelschnurblut-USSCs generiert worden. Dies geschah unter ektopter Expression der Faktorenkombination OCT4, SOX2, C-Myc und Klf4 mittels retroviraler Transfektion (Zaehres, 2010).

Die beiden untersuchten Zelllinien wurden mit iPSC V und iPSC X bezeichnet, die Ergebnisse sind in **Abb. 2B** dargestellt.

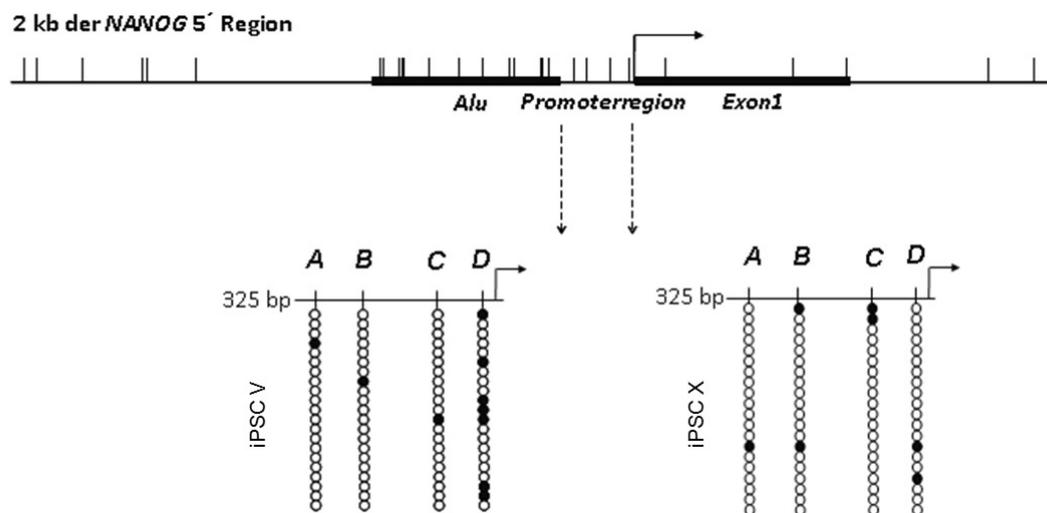


Abb. 2B: DNA-Methylierung des *NANOG*-Promoters bei iPSCs aus USSCs

Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *NANOG*-5'-Region mit der relativen Position eines Alu-Elements, Transkriptionsstartpunkt (durchgezogener Pfeil), erstes Exon und CpG-Dinukleotide (senkrechte Striche). Die gestrichelten Pfeile umgrenzen die Region, die durch genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung erfasst wurde. Hier wird das Methylierungsschema für iPSCs dargestellt, die aus USSCs generiert wurden. Weiße Kreise entsprechen unmethylierten CpG-Dinukleotiden, ausgefüllte Kreise methylierten CpG-Dinukleotiden. Bezeichnung **A** bis **D** siehe Text.

Zu iPSC V wurden 21 Sequenzen gewonnen. Es zeigte sich ein nahezu unmethylierter *NANOG*-Promoter. Lediglich beim CpG in Position **D** war in sieben Fällen, einem Drittel der gewonnenen Daten, eine Methylierung nachweisbar.

Im Falle von iPSC X konnten 20 Sequenzen generiert werden. Hier ließ sich ein verschwindend geringer Methylierungsgrad feststellen. Die methylierten CpGs waren ohne erkennbare Systematik etwa gleichmäßig auf die einzelnen Positionen verteilt.

4.2.2 *SOX2* und *SRR1*

Hier erfolgte die Aufklärung der Methylierungsschemata der Promoterregionen von *SOX2* und dessen *SRR1*-Enhancer. In die Untersuchung wurden die Zelllinien 4/146 und 4/101 einbezogen, jeweils im unrestringierten Zustand, sowie nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung. Der *SRR1*-Enhancer erstreckt sich etwa über den Bereich von 4100 bp bis 3700 bp upstream des Transkriptionsstarts von *SOX2*. Diese Region beinhaltet vier CpGs. Der Enhancer *SRR1* wurde analog zum Promoter an den jeweiligen Zeitpunkten untersucht, basierend auf der selben DNA-Probe. Hier wurden Daten der Zelllinie 4/146, 4/101 (eingeschränkt) und 5/73 gewonnen (**Abb. 3**).

Zelllinie 4/146

Es wurden 12 Sequenzen des Promotorbereichs der USSC gewonnen. 14 Sequenzen von diesem Abschnitt ließen sich aus den Zellen nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung gewinnen.

Während des USSC-Zustandes fehlte eine CpG-Methylierung fast völlig. Lediglich eine der 12 Sequenzen wies eine derartige Modifikation auf. Diese befand sich am zweiten CpG aus 5´-Richtung, innerhalb der Vierergruppe aus dicht liegenden CpGs, die dem Transkriptionsstart am nächsten steht.

Interessanterweise findet sich unter den 14 Sequenzen, die nach 14 tägiger Differenzierung gewonnen werden konnten, ein ebenfalls völlig unmethylierter Promoter. Eine Ausnahme bildete die besagte Vierergruppe von CpGs. In vier dieser Sequenzen war exakt das C-Nukleotid methyliert, das diesen Befund auch im undifferenzierten Zustand der Zelle aufweist. Daneben ließen sich nur noch in zwei weiteren Fällen

CpG-Methylierungen feststellen. Hier sind andere Nukleotide betroffen, die ebenfalls in der genannten Vierergruppe liegen.

Vom *SRR1*-Enhancer, ließen sich aus Zellen im USSC-Status 18 Sequenzen gewinnen. Nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung konnten für die Zelllinie 4/146 insgesamt 10 Sequenzen dieses Bereichs erhoben werden.

Unter allen gewonnenen Daten wies hier vornehmlich das am weitesten upstream gelegene Nukleotid eine gelegentliche Methylierung auf.

Bei der USSC war diese Modifikation bei einem Drittel der Sequenzen feststellbar. Außerdem kam es mit einer Häufigkeit von 4 unter 18 Sequenzen zur Methylierung des nächstgelegenen CpGs.

Nach erfolgter Differenzierung, zeigten drei der zehn erhobenen Sequenzen am weitest upstream gelegenen CpG eine Methylierung. Darüber hinaus war nur noch ein einziges weiteres CpG so modifiziert. Nach diesen Daten nahm die Methylierung im Laufe der 14-tägigen Differenzierung also tendenziell ab.

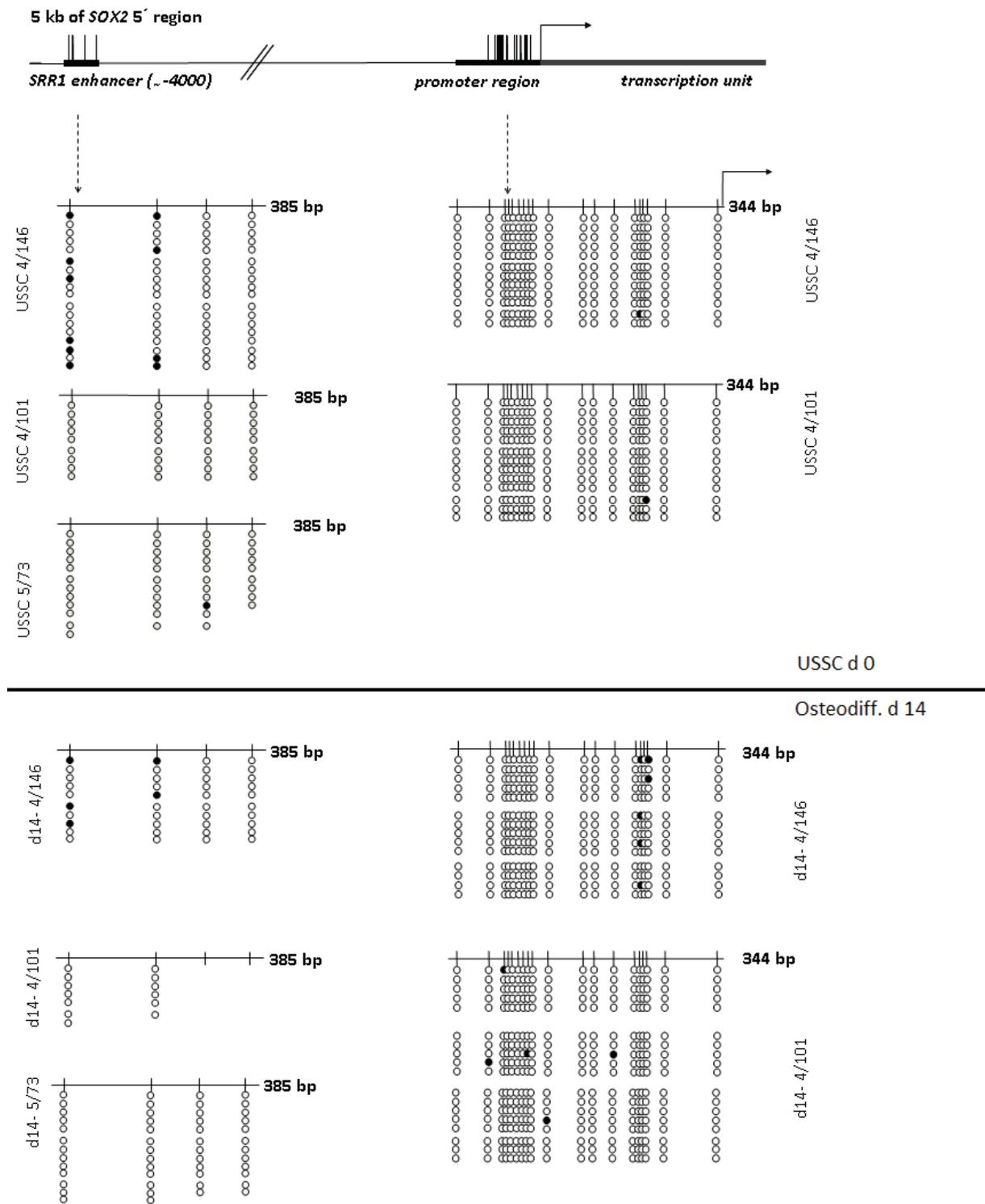


Abb. 3: Methylierungsstatus der *SOX2*-Promoterregion und des korrespondierenden *SRR1*-Enhancers in USSCs und nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung. Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *SOX2*-5'-Region in Zusammenschau mit der relativen Position des korrespondierenden *SRR1*-Enhancers, der Promoterregion, des Transkriptionsstarts (durchgezogener Pfeil), und aller CpG-Dinukleotide (senkrechte Striche). Im oberen Teil der Abbildung ist der Zustand für USSCs wiedergegeben, im unteren Teil nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung.

Zelllinie 4/101

Vom Promoterbereich der Zelllinie 4/101 ließen sich im unrestringierten Zustand 13 Sequenzen gewinnen. Nach erfolgter Differenzierung gelang dies in 18 Fällen.

Innerhalb aller 13 Promotersequenzen der USSC findet sich ein einziges methyliertes CpG. Dies ist an der am weitesten downstream gelegenen Position innerhalb der erwähnten „Vierergruppe“ zu finden.

Bei den 18 Sequenzen, die den Zustand der Zelle nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung widerspiegeln, finden sich insgesamt fünf methylierte CpGs. Diese sind diffus auf den untersuchten Bereich verstreut. Kein einziges dieser modifizierten Nukleotide befindet sich in der „Vierergruppe“.

Die Sequenzierung der *SRR1*-Enhancer-Region lieferte neun Sequenzen zu den unrestringierten Zellen, in denen die vier untersuchten CpGs enthalten waren. Entsprechende Sequenzen konnten für den differenzierten Zustand nur bruchstückhaft gewonnen werden. Dabei wurden in sechs Fällen die ersten beiden Nukleotide upstream und in einem weiteren Fall nur das erste CpG dargestellt.

Sowohl im USSC- als auch im Osteo-differenzierten Zustand zeigte sich im *SRR1*-Enhancer dieser Zelllinie kein einziges CpG methyliert.

Zelllinie 5/73

Bei Zelllinie 5/73 wurde lediglich der Zustand des Enhancers *SRR1* untersucht. Es gelang, für den USSC-Status neun vollständige und drei unvollständige Sequenzen zu erheben. Letztere beinhalten nicht alle CpGs. Hier zeigte sich ein einziges CpG methyliert. Darüber hinaus wiesen diese Sequenzen keinerlei derartige Modifizierungen auf.

Vom entsprechenden Enhancer konnten nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung 12 vollständige Sequenzen gewonnen werden. Eine weitere Sequenz beinhaltete nur die ersten beiden CpGs. Alle Sequenzen aus Zellen dieses Differenzierungsgrades zeigten hier keinerlei Methylierung.

4.2.3 hTERT

Hier wurde der Bereich von -656 bp bis -417 bp relativ zum Transkriptionsstart von *hTERT* einer detaillierten Analyse per Natriumbisulfit-Sequenzierung unterzogen. Dieser Abschnitt beinhaltet eine Vielzahl sehr dicht liegender CpGs.

Der Bereich wurde anhand der Zelllinie 4/146 untersucht, das Ergebnis ist in **Abb. 4A** dargestellt.

Zelllinie 4/146

17 Sequenzen des Bereichs im USSC-Status konnten gewonnen werden. Dabei wiesen 11 eine Methylierung des dritten CpGs auf, vom Transkriptionsstart an in 5' Richtung gezählt. Darüber hinaus fand sich fast gar keine CpG-Methylierung. Lediglich wenige, eingesprengte, methylierte CpGs sind zu erkennen.

In sieben der Sequenzen wurde bei der Sequenzierung eine Position, an der ein Cytosin zu erwarten wäre, als Adenin identifiziert. Es handelt sich hier ggf. um einen Sequenzierfehler.

Aus den Zellen, die eine 14-tägige Osteo-Differenzierung durchlaufen hatten, wurden 20 Sequenzen gewonnen. Dabei war in acht Fällen die Methylierung des drittnächsten CpGs zum Transkriptionsstart nachweisbar. Eine Methylierung dieser Position war im USSC-Zustand ebenfalls aufgefallen. Darüber hinaus war, wie im Falle der USSC, eine minimale, diffuse Methylierung festzustellen.

In 13 Fällen wurde statt eines Cytosins ein Arginin detektiert. Die Position dieses Arginins entsprach der Stelle, die bei den Sequenzen der USSC eine ebensolche Auffälligkeit gezeigt hatte.

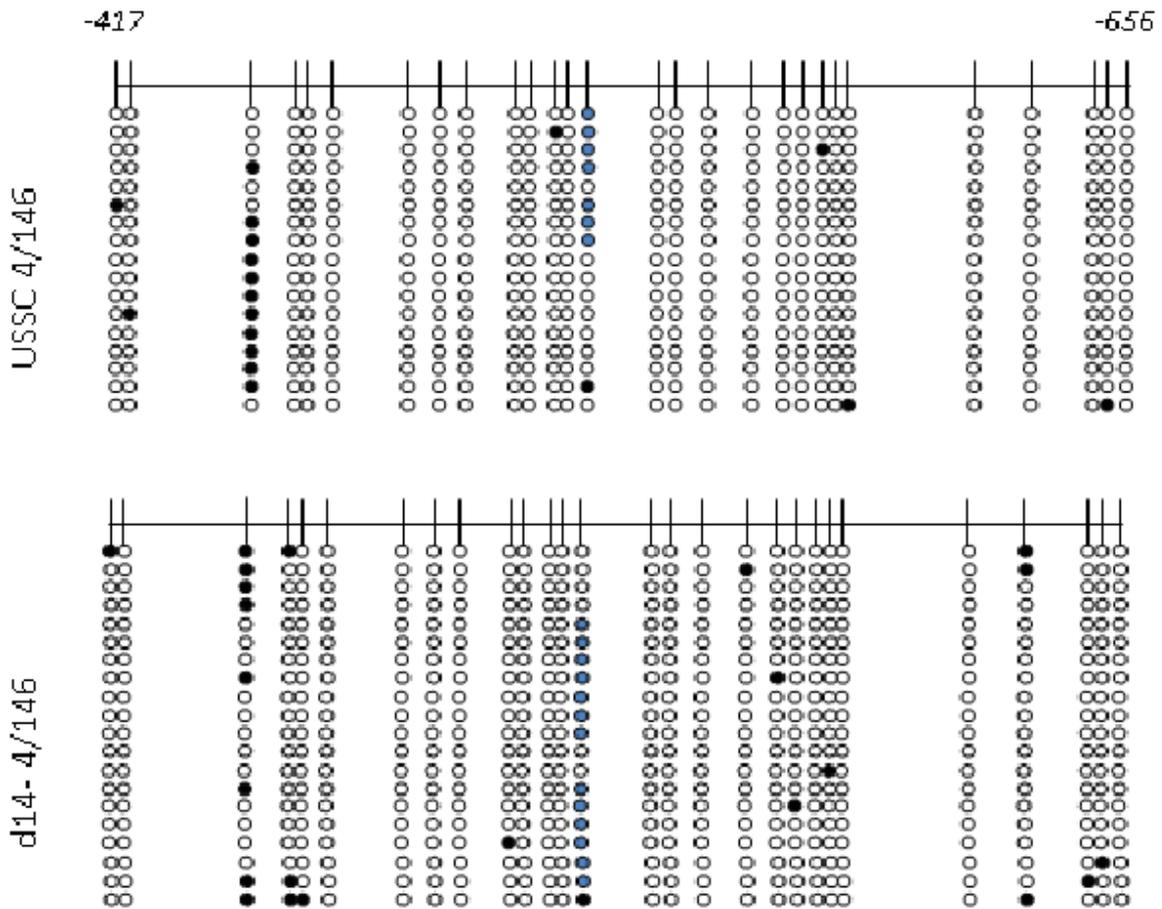


Abb. 4A: Methylierungsschema, Ausschnitt aus der CpG-Insel des *hTERT*-Promoters, in USSCs und nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung. Die 5' Region, die sich von -417 bp bis -656 bp bezogen auf den Transkriptionsstart erstreckt, wurde hier einer Detailanalyse per genomischer Natriumbisulfit-Sequenzierung unterzogen. Dabei repräsentiert das obere Diagramm den Zustand der USSC, während das untere die entsprechende Sequenz nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung wiedergibt. Hier ist jedes unmethylierte CpG-Dinukleotid durch einen weißen Kreis bezeichnet, jedes methylierte durch einen schwarzen Kreis und Adenin an der Stelle von Cytosin durch einen blauen Kreis.

5. Diskussion

5.1 Transkription von *alkalischer Phosphatase* und *Osteokalzin*

Weder makroskopisch noch mikroskopisch zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien im jeweiligen Differenzierungszustand. Dies gilt sowohl für die hier untersuchten USSCs als auch für die Zellen, die eine 14-tägige Osteo-Differenzierung durchlaufen hatten. Bei den Transkriptionswerten von *alkalischer Phosphatase* und *Osteokalzin* waren jedoch durchaus Unterschiede feststellbar. *Osteokalzin* steht als relativ später Marker für die fortgeschrittene Entwicklung von Osteoblasten. Er kennzeichnet hier die Phase der Mineralisierung. Bei der Real-Time-PCR, zeigte *Osteokalzin* zwar einen deutlichen Anstieg seiner Transkription während der Osteo-Differenzierung. Seine Transkriptionsrate verblieb dabei aber in den meisten Fällen unterhalb des Niveaus von Osteoblasten (Koizumi 1997).

Ein sehr viel deutlicherer Anstieg der Transkription, ließ sich bei *alkalischer Phosphatase* feststellen. Dabei wurde bei mehreren der untersuchten Zelllinien sogar die Transkriptionsrate in Osteoblasten überstiegen. Die vermehrte Transkription von *alkalischer Phosphatase* ist typisch für die zweite Hälfte der Reifungsphase der extrazellulären Matrix (Koizumi 1997). Die präferentielle Transkription dieses Faktors kann als Hinweis für eine Affinität der Zellen zu diesem Funktionszustand aufgefasst werden. Demnach würden USSCs nach 14 tägiger Osteo-Differenzierung unter diesen Kulturbedingungen zum Transkriptionsprofil der späten, mittleren Phase der Osteoblastenreifung tendieren.

Die Zelllinie 4/146, bei der sich der deutlichste Transkriptionsanstieg von *alkalischer Phosphatase* zeigen ließ, ist dafür bekannt, in Kultur tendenziell stärker zur Ausdifferenzierung zu neigen. So verliert sie die Fähigkeit, ihren undifferenzierten Zustand aufrecht zu erhalten, nach einer signifikant niedrigeren Zahl an Reproduktionszyklen als andere USSC-Linien. Man könnte die deutliche Veränderung als Hinweis für eine starke Antwort auf die Maßnahmen zur induzierten Differenzierung verstehen.

Es stellt sich die Frage, ob die vermehrte Transkription von *alkalischer Phosphatase* ein Zeichen für die deutlichere Affinität zum ausdifferenzierten Zustand ist. Es ist möglich, dass dieses Ansprechen auf Differenzierungsmaßnahmen als Charakteristikum von Stammzellen auftritt, die ihre Pluripotenz beschleunigt verlieren.

Die USSC wurde im Rahmen von in-vitro-Differenzierungsexperimenten untersucht, die Hinweise zur Bewertung dieses Sachverhalts lieferten. Die starke Expression des Markers der mittleren Stufe der phänotypischen Entwicklung des Osteoblasten scheint nicht auf eine Arretierung in diesem Zustand hinzuweisen. Eine funktionelle Integration wird dadurch offenbar nicht behindert. Bei der Implantation von USSCs in den Knochen von Versuchstieren konnte gezeigt werden, wie diese Zellen zur Knochenbildung und –heilung beitragen (Kögler 2004). Die Zellen verharren hier also nicht in einem bestimmten Entwicklungszustand, sondern übernehmen die Funktion von physiologischem Gewebe.

5.2 Methylierungsschemata

5.2.1 SOX2

Hier erfolgte die Aufklärung der Methylierungsschemata der Promoterregion von *SOX2* und dessen *SRR1*-Enhancer. Diese Regionen nehmen erheblichen Einfluss auf die Expressionskontrolle dieses Gens. *SOX2* und dessen Enhancer *SRR1* sind in neuronalen Stammzellen aktiviert. Ihre epigenetische Modifikation ist Teil der molekularen Dynamik, die zur Ausdifferenzierung dieser Zellen führt (Sikorska 2008). *SOX2* ist im Zusammenhang mit der USSC nicht nur interessant, weil es sich um einen der Schlüsselfaktoren zellulärer Pluripotenz handelt. Die USSC hat in vorherigen Experimenten ihr Potential zur Ausdifferenzierung in Richtung von Neuronen deutlich unter Beweis gestellt (Kögler 2004).

Bei der vorliegenden Untersuchung zeigte sich ein extrem niedriges Ausmaß der Methylierung des *SOX2*-Promoters. Dieser Befund war sowohl im Falle der USSC als auch nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung dieser Zellen feststellbar. Das ist vor allem angesichts der Tatsache bemerkenswert, dass bei Untersuchungen auf Proteinebene keine Expression dieses Stammzellfaktors nachweisbar war (Kluth 2010).

Bei der Ausdifferenzierung von Neuronen war eine Korrelation der *SOX2*-Expression mit der epigenetischen Konstellation des Promoters und des Enhancers *SRR1* festgestellt worden. Hier zeigte sich, dass eine geringgradige Methylierung sowohl des Enhancers als auch des Promoters mit einer starken Expression von *SOX2* einhergeht (Sikorska 2008). Es hätte nun die Möglichkeit bestanden, dass ein Ausbleiben

der Expression auf Proteinebene, entweder mit einer Hypermethylierung des Promotors und des Enhancers oder eines der beiden Elemente, einhergehen würde. Tatsächlich zeigten sich hier beide Elemente nahezu völlig unmethyliert. Dieser Befund präsentiert sich sowohl bei der USSC als auch nach 14-tägiger Osteodifferenzierung. Lediglich ein rudimentäres Auftreten von methylierten CpGs an einer spezifischen Position beim *SOX2*-Promoter der Zelllinie 4/146 konnte beobachtet werden. Dieses Phänomen sollte im Rahmen zukünftiger Arbeiten auf seine Relevanz überprüft werden. Auch die beschriebenen Veränderungen in der „Vierergruppe“ von CpGs müssen bei weiteren Untersuchungen beachtet werden. Auffälligkeiten an dieser Position sind zwar bei Zelllinie 4/101 nicht feststellbar; allerdings zeigt sich im Falle dieser Zelllinie nicht die überdurchschnittliche Differenzierungsneigung von Zelle 4/146.

Hinweise, die eine differenzierte Betrachtung der Methylierungsschemata nahe legen, finden sich in der Literatur. Dort wird eine abgestufte Expressionsintensität von *SOX2* beschrieben. Dabei korreliert die Methylierung von *SRR1* mit einer reduzierten Expression von *SOX2* (Sikorska 2008).

Weitere Versuche haben zu klären, ob dies auch eine biologische Relevanz bei der Reaktivierung des Gens hat. Es wäre denkbar, dass eine Reaktivierung durch Veränderung anderer Einflussfaktoren herbeiführbar ist. Diese hypothetischen Faktoren könnten bei den hier vorliegenden Zellen eine Expression auf Proteinebene verhindern. Es stellt sich die Frage, ob eine Reaktivierung durch deren Wegfall bei methylierten CpGs in *SRR1* vermindert ist. Dem gegenüber könnte eine Reaktivierung beim unmethylierten Zustand sofort eine hohe Expression von *SOX2* herbeiführen. Der hier beobachtete Zustand wäre dann als Ausdruck einer Bereitschaftshaltung für eine effiziente Expression dieses Gens zu werten.

Bei Zelllinie 4/146 findet sich eine leichte Präferenz zur Methylierung von Position **A** des *SRR1*-Enhancers. In der Literatur ist dieses Phänomen, soweit ersichtlich, nicht explizit beschrieben. In den gezeigten Abbildungen lässt sich allerdings in einem Fall augenscheinlich eine geringgradige Präferenz für die Methylierung des CpGs in Position **A** finden. Dies betrifft die beginnende Remethylierung von astrozytären Zellen. Deren *SOX2*-Expression wurde durch die Inkubation mit bFGF (basic fibroblast growth factor) erst zum Anstieg gebracht und fiel anschließend wieder ab (Sikorska

2008). Das Absinken der Expression ging mit der Remethylierung von SRR1 einher. Dabei war die genannte Position tendenziell intensiver betroffen (Sikorska 2008).

5.2.2 NANOG

Bei einer Vielzahl moderner Publikationen zu Pluripotenz und Differenzierungspotential von Stammzellen wird versucht, den Funktionszustand der Zellen durch regelhafte Parameter zu erfassen. Dabei nimmt das Methylierungsschema der Promoterregionen bestimmter Schlüsselfaktoren eine wichtige Rolle ein. So untersuchen einige Arbeiten zur Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPSCs vornehmlich die Promotoren von *OCT4* und *NANOG*. Deren Demethylierung wird als epigenetisches Korrelat zur erfolgreichen Überführung der Zelle in einen ESC-artigen Zustand gewertet (Takahashi und Yamanaka 2006, Takahashi 2007).

(Die Beschreibung der *OCT4*-Promoter-CpG-Methylierung wurde im Rahmen der gemeinsamen Arbeit für eine Publikation (Santourlidis 2010) von meiner Kommilitonin Judith Springer vorgenommen. Auf diese Ergebnisse wird hier nicht näher eingegangen.)

Zwischen der Alu-Retrotransposon-Region, die außerhalb der Genregulation liegt, und dem Transkriptionsstart des *NANOG*-Gens, befinden sich vier einzelne CpGs. Diese werden im Laufe der zellulären Differenzierung methyliert. Die damit einhergehende Inaktivierung des Gens ist offenbar eine Voraussetzung für die Ausdifferenzierung in stabile somatische Gewebe. In-vitro-Untersuchungen bestätigten den repressiven Effekt auf die Genexpression, der durch die Methylierung dieser CpGs hervorgerufen wird (Hattori 2007).

Auch die regulatorischen CpGs des *NANOG*-Promoters stellten sich trotz der Abwesenheit dieses Faktors auf Proteinebene (Kluth 2010) weitestgehend unmethyliert dar.

Der Nanog-Promoter war Untersuchungsgegenstand beim Vergleich verschiedener Stufen der Spermio-genese und bei Keimzelltumoren. Hier fand sich eine *NANOG*-Expression, die durch eine verstärkte Methylierung des Promoterbereichs reduziert wurde. Die Intensität, mit der die Methylierung die Expression beeinflusst, ließ dabei graduelle Abstufungen erkennen (Nettersheim 2011).

Weiter stellt sich die Frage nach der Signifikanz der Details des Methylierungsschemas. Bei Zelllinie 4/146 ist eine verstärkte Konzentration der wenigen methylierten CpGs auf die beiden inneren, bei 5/73 auf eine der äußeren Positionen zu erkennen. Bei der erwähnten Arbeit zur Spermio-genese und *NANOG*-Promotermethylierung findet sich auf den Abbildungen tatsächlich eine relativ konstante Schematik. Teilweise sind dort Ähnlichkeiten zu den hier gefundenen Schemata zu erahnen. Der Autor geht nicht näher auf die Details des Musters ein (Nettersheim 2011). Auch ist fraglich, ob die insgesamt etwas intensivere Methylierung des Promotors von Zelllinie 4/146 mit der eingeschränkten relativen Kultivierbarkeit dieser Zelle in Zusammenhang steht.

Die Daten zu induzierten pluripotenten Zellen aus USSCs, die hier erhoben wurden, zeigen eine extrem niedrige Methylierung des Promoterbereichs von *NANOG*. Dies untermauert den Stammzellcharakter der so gewonnenen Zellen. Deren Ähnlichkeit zu embryonalen Stammzellen wurde in anderen Untersuchungen bestätigt. So zeigten sich entsprechende Parallelitäten zu ESCs anhand weiterer Parameter, wie dem globalen Transkriptionsprofil oder dem Vorhandensein bestimmter microRNAs (Zaehres 2010).

Die geschilderte Erhebung der CpG-Methylierung lieferte somit neue, unerwartete Erkenntnisse zur Epigenetik der zentralen Stammzellfaktoren in der USSC. Dabei lassen sich für *SOX2* und *NANOG* bestimmte Gemeinsamkeiten erkennen. Es kommt nach dem verwendeten Differenzierungsprotokoll zur deutlichen phänotypischen Ausdifferenzierung. Dies ist sowohl im makroskopischen und mikroskopischen Bild als auch bei der Transkription der untersuchten Osteo-Marker erkennbar.

In der USSC sind die untersuchten Promotoren der Pluripotenzfaktoren nur sehr geringgradig methyliert. Nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung kommt es allerdings nicht zu einer Zunahme der CpG-Methylierung dieser Elemente. Möglicherweise ist dieses Resultat dem eingeschränkten Zeitfenster geschuldet, das hier betrachtet wurde. So ist es möglich, dass dieser Steuerungsschritt zu einem späteren Zeitpunkt auftritt. Festzuhalten ist, dass eine umfassende Methylierung der untersuchten Elemente keine Voraussetzung für die Herausbildung des Osteo-Phänotyps ist.

5.2.3 hTERT, Telomerase und Telomere in der USSC

Bisher lagen keine Kenntnisse zur CpG-Methylierung des *hTERT*-Promoters in USSCs vor. Die hier gewonnenen Daten geben einen neuen Einblick in eine der relevantesten Regionen für die Regulierung dieses Gens. Die gewählte Region umfasst etwa 240 bp in einem Bereich hoher CpG-Dichte, von -417 bp bis -656 bp upstream des Transkriptionsstarts. Hier zeigen sich neben dicht gruppiert stehenden, einige solitäre CpGs. Die Regulierung der Telomeraseaktivität, erscheint nach bisherigen Untersuchungen ausgesprochen komplex. Als Promoterregion von *hTERT* im weitesten Sinne wird die gesamte CpG-reiche Region von -650 bp bis +150 bp relativ zum Transkriptionsstart aufgefasst. Dieser Bereich weist offenbar eine funktionelle Untergliederung auf, die eine Abgrenzung zweier Einheiten erlaubt. Einerseits spielt offenbar das direkte Umfeld des Transkriptionsstarts von etwa -150 bp bis +150 bp eine Rolle. Von besonderem Interesse ist auch eine weitere regulatorische Region, die sich von -650 bp bis -400 bp erstreckt. Beide Elemente sind Ziel von DNA-Methylierungsvorgängen, die jeweils einer eigenen Dynamik folgen. Ihre Bedeutung ist Gegenstand kontroverser Diskussion (Zinn 2007, Guileret und Benhattar 2004). Einige Studien kommen zu dem Ergebnis, dass eine Hypomethylierung der gesamten Region oder bestimmter Teile essentiell für die Telomeraseexpression sind. Andere Untersuchungen stellen diesen Zusammenhang in Frage (Kyo 2008). Auch die Notwendigkeit der Hypermethylierung der CpGs im Bereich von -500 bp bis +450 bp, besonders in Hinblick auf den Bereich von -500 bp bis +1 bp, als Voraussetzung für die Telomeraseexpression wird diskutiert (Guileret und Benhattar 2004). In einer umfassenden, detaillierten Untersuchung konnte die positive Korrelation von Hypermethylierung zu Telomeraseexpression für den Bereich von -650 bp bis -400 bp bestätigt werden. Für den Bereich von -150 bp bis +150 bp zum Transkriptionsstart wurde hingegen eine verringerte Methylierung bei Telomerase-positiven Zellen gefunden. Die intensive Methylierung im Bereich von -650 bp bis -400 bp zeigte sich dabei vor allem bei malignen Zellen (Zinn 2007). Es besteht die Möglichkeit, dass die Hypermethylierung des *hTERT*-Promoters Folge eines ausgeprägten Methylierungsdrucks ist, der in Malignomzellen reaktiv zur Entartung und ungehemmten Proliferation zustande kommt (Dessain 2000). Die breite Faktenlage machte eine Beschränkung auf besonders interessante Regionen erforderlich. Bei der Auswahl wurden die spezifischen Eigenschaften der USSC berücksichtigt. Die USSC zeigt sich als weitestge-

hend undifferenzierte, proliferationsfreudige Zellentität. Sie zeigt aber keine Neigung zur malignen Entartung. Daher bestand ein besonderes Interesse, die Region von ca. -650 bp bis -400 bp detailliert auf ihre Methylierungskonfiguration zu untersuchen.

Die im sequenzierten Bereich beobachtete rudimentäre CpG-Methylierung ließ ein erkennbares Schema vermissen. Das Ergebnis befähigt vorerst zu dem Schluss, dass diese Region in USSC nahezu unmethyliert ist und diesen Status auch nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung beibehält. Lediglich die hervortretende überdurchschnittliche Methylierung des einzeln stehenden CpGs an dritter Stelle upstream des Transkriptionsstarts, fiel auf. Hier stellt sich die Frage nach der funktionellen Relevanz. Auch bei diesem Befund ließ sich keine nennenswerte Änderung im Verlauf der Ausdifferenzierung feststellen. Hier stellt sich wiederum die Frage nach der Bedeutung des engen Zeitfensters, das hier betrachtet wurde.

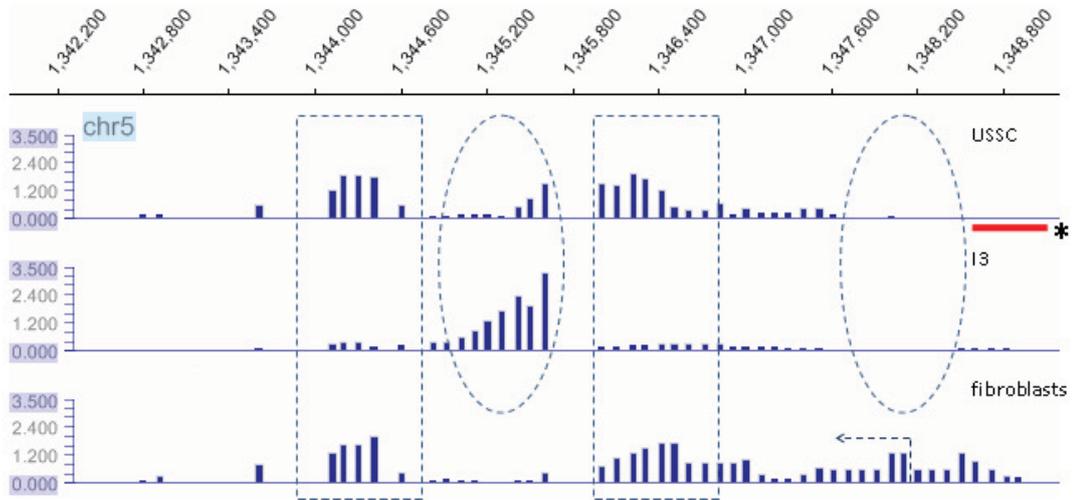
Ob das hier gezeigte Methylierungsschema kennzeichnend für nichtmaligne Stammzellen ist, denen ein malignitätsassoziiertes Methylierungsdruck fehlt, müssen zukünftige Untersuchungen klären (Dessain 2000). Die unterschiedlichen Befunde, die für diesen Abschnitt der fraglichen CpG-Insel vorliegen, machen dessen funktionale Abklärung weiterhin interessant. So ist etwa zu erheben, ob in Abhängigkeit vom hier vorliegenden Methylierungsschema bestimmte Faktoren gebunden oder abgewiesen werden (Guileret und Benhattar 2004).

Zur Aufklärung der Rolle von CpG-Methylierung bei der Regulierung von *hTERT* in Stammzellen wie der USSC sind umfassende weitere Untersuchungen erforderlich. Die Konfiguration der fraglichen CGI wäre dabei für eine Vielzahl unterschiedlicher Proben darzustellen (z.B. Tumorzellen, ESC usw.). Es wäre möglich, auf diese Weise eine Korrelation zwischen dem Methylierungsschema und Eigenschaften wie Pluripotenz, maligner Kapazität oder Differenzierungsneigung zu ergründen. Um dieses Ziel zu erreichen, wären umfassende Untersuchungen verschiedenster Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unter Verwendung diverser Differenzierungsprotokolle notwendig. Hier könnten moderne Hochdurchsatztechniken, wie verschiedene „next-generation-sequencing“-Methoden ihre Fähigkeiten unter Beweis stellen. Solche Verfahren wären zur Bewältigung des hier zu erwartenden Probenaufkommens

geeignet. Aktuelle Entwicklungen zielen darauf ab, diese Technik gezielt zur Aufklärung des CpG-Methylierungsschemas einzusetzen (Krueger 2012).

Die Größe und Komplexität des *hTERT*-Gens erschwert die systematische Aufklärung seiner Funktion. Es liegt daher nahe, neben der Natriumbisulfit-Sequenzierungen andere Methoden zur Anwendung zu bringen. Im Rahmen der Arbeiten für die Publikation, zu der die hier gezeigten Daten beigetragen haben, wurde auf die MeDIP-Technik zurückgegriffen. Hier wird eine Untersuchung von CGIs mittels Antikörpern gegen methylierte CpGs und folgender Hybridisierung gegen DNA-Chips vorgenommen. Die so gewonnenen Daten bestätigten die per Natriumbisulfit-Sequenzierung gewonnenen Erkenntnisse. Dabei ist allerdings das grobe Auflösungsvermögen dieses Verfahrens zu berücksichtigen. Sowohl für den hier untersuchten Bereich, als auch für weitere Abschnitte der CGI im *hTERT*-Promoter, deutet sich eine gewisse Parallelität der Methylierungsschemata der USSC zu denen der ESC an. Allerdings ließen andere Bereiche der CGI eine größere Kongruenz der USSC zum Zustand von ausdifferenzierten Fibroblasten erkennen (Santourlidis 2010), dargestellt in **Abb. 4B**. Auf Basis dieser Erkenntnisse lässt sich der USSC ein intermediärer Zustand der Methylierung dieser Region zuweisen. Dessen Einflussnahme auf die Funktion des Gens und ggf. anderer Gene bedarf weiterer Klärung.

A



B

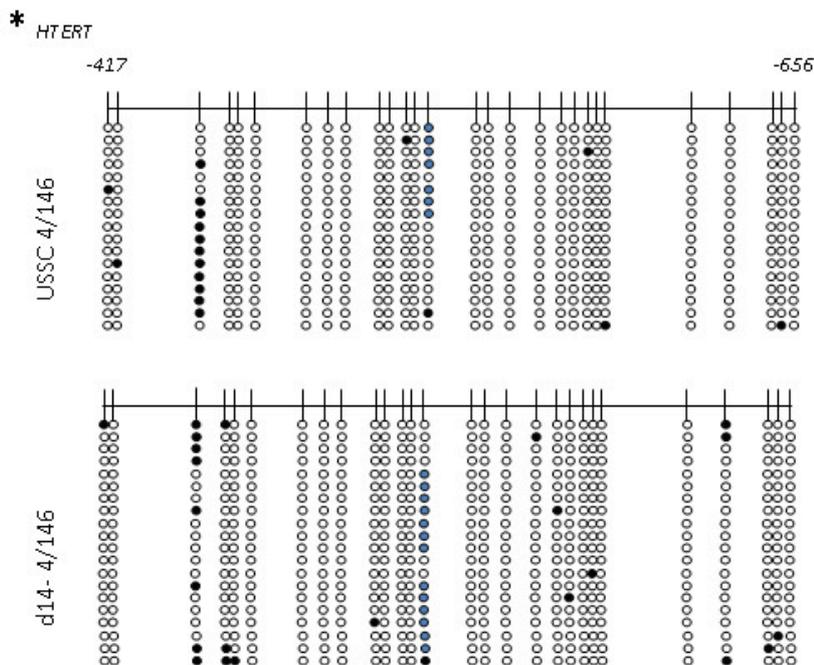


Abb. 4B: DNA-Methylierungsprofil der CpG-Insel des hTERT-Gens in USSC, I3 ESC und Fibroblasten, erhoben mittels NimbleGen Array-Technik (A). Zu dieser Darstellung sind die hier erhobenen CpG-Methylierungsschemata in Bezug gesetzt (B). Gestrichelte Kästen heben Ähnlichkeiten im DNA Methylierungsprofil zwischen USSC und terminal differenzierten Fibroblasten hervor. Gestrichelte Ellipsen bezeichnen Ähnlichkeiten zwischen USSC und I3 ESCs. Ein gestrichelter Pfeil markiert den Transkriptionsstartpunkt. Die 5'-Region, die sich von -417 bp bis -656 bp bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt erstreckt, wird durch die massive Linie unterhalb des USSC Panels dargestellt (Quelle: Santourlidis 2010). Dieser Bereich wurde bei der vorliegenden Arbeit einer Detailanalyse per genomischer Natriumbisulfit-Sequenzierung unterzogen und ist hier im Vergleich dargestellt (B) (entspricht Abb. 4A). Dabei repräsentiert das obere Diagramm den Zustand der USSC, während das untere die entsprechende Sequenz nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung wiedergibt. Hier ist jedes unmethylierte CpG-Dinukleotid durch einen weißen Kreis bezeichnet, jedes methylierte durch einen schwarzen Kreis und Adenin an der Stelle von Cytosin durch einen blauen Kreis.

Der Telomerasekomplex spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Pluripotenz und Proliferationsfähigkeit. Welche molekularen Prozesse dem zu Grunde liegen, ist daher eine interessante Fragestellung für weitere Forschung. Die USSC nimmt bei solchen Untersuchungen eine besondere Rolle ein. So wurde bei der USSC eine außergewöhnliche Länge der Telomere beobachtet. Außerdem zeigt die USSC eine bemerkenswerte Fähigkeit, ihre Telomerlänge über viele Zellteilungen hinweg zu erhalten (Kögler 2004). Da der Versuch, Telomerase auf Proteinebene zu detektieren, negativ ausfiel, stellt sich die Frage, wie die außergewöhnliche Stabilität der Telomere in USSCs aus Nabelschnurblut erreicht wird (Aktas 2010).

Trotz ihres ausgeprägten Differenzierungspotentials trägt die USSC nicht zur Entstehung von Tumoren bei. Für diese Eigenschaft sind die hier gefundenen Besonderheiten der CGI-Methylierung bedeutsam. Die spezifische Methylierung der CGI vom *hTERT*-Promoter, ist ein wichtiges Merkmal von Malignomen. Dort ist der Bereich, der im Focus der vorliegenden Arbeit steht, vielfach hypermethyliert. Dabei weisen die malignen Zellen eine hohe Telomerase-Expression auf (Guilleret und Benhattar 2004). Wie hier gezeigt, findet sich bei der USSC hingegen eine minimale Methylierung dieses Bereichs.

So wird aus den vorliegenden Ergebnissen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen ersichtlich. Hier sollte die Rolle von Telomerase und deren epigenetische Konfiguration in der USSC weiter ergründet werden. Eine intensive weitere Erforschung dieser Thematik verspricht nicht nur ein besseres Verständnis der Grundlage zellulärer Pluripotenz. Darüber hinaus ist hier ein wichtiger Beitrag zur Beantwortung der Frage zu erwarten, unter welchen Bedingungen es zur malignen Entartung von (Stamm-) Zellen kommt.

5.3 Einfluss von Kulturbedingungen und Probenherkunft

Um die erhobenen Ergebnisse richtig zu werten, dürfen zusätzliche Einflüsse durch Kulturbedingungen und Herkunft der Zellen nicht gänzlich vernachlässigt werden. In früheren Untersuchungen wurden Veränderungen der DNA-Methylierung als Folge von längerer Kultivierung der Zellen beschrieben (Antequera 1990). Daher wurde versucht, diesen Effekt bei den vorliegenden Experimenten möglichst zu vermeiden. So wurden die Zellen lediglich auf Dauer von vier Kulturpassagen inkubiert, bevor die

Nukleinsäuren extrahiert wurden. Die Zellen wurden dafür aus frischen Nabelschnurblutpräparationen gewonnen.

Als Erklärung für geringfügige Schwankungen im Methylierungsprofil kann ein frühes Auftreten dieses Kultureffektes angenommen werden. Andererseits ist zu bedenken, dass es sich bei der USSC in der Kultur entsprechend ihrer Herkunft um eine gemischte Zellpopulation handelt. Deren einzelne Bestandteile können graduelle Unterschiede aufweisen (mündliche Mitteilung S. Santourlidis).

5.4 Besonderheiten der Histonsignatur und Fähigkeit zur Reaktivierung von Schlüsselfaktoren

Insgesamt bleibt die CpG-Methylierung der untersuchten Promotoren auf ein Maß beschränkt, das keine Stilllegung über diesen Mechanismus erwarten lässt. Es stellt sich daher die Frage, welche der anderen epigenetischen Elemente hier wirken.

Zur Klärung dieses Sachverhalts trugen andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe bei, in deren Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde. Sie klärten die Histonsignatur der fraglichen Promoter-Bereiche auf.

Im Falle des *SOX2*-Promoters, wurde die Präsenz von dimeH3K4 ermittelt, eine aktivierende Konfiguration. Gleichzeitig war hier trimeH3K27 feststellbar, letzteres ist mit einer Repression des Gens assoziiert. Ein ähnlicher Befund wurde für den *NANOG*-Promoter nachgewiesen (Santourlidis 2010).

Dieser Mischzustand von Histonmarkern, die verstärkend und bremsend auf die Genexpression wirken, wird als bivalente Histonsignatur bezeichnet. Aus dieser Konfiguration heraus ist es den betroffenen Genen möglich, entweder in den aktiven oder inaktiven Zustand überzutreten. Dies geschieht in Abhängigkeit von zusätzlichen Faktoren (Bernstein 2006).

Darüber hinaus war bei keinem der Promotoren die Konfiguration dimeH3K9 in nennenswertem Maße zu finden. Deren Auftreten gilt als Merkmal dauerhaft stillgelegter Gene.

Von dieser Arbeitsgruppe wurde zudem mittels eines rekombinanten Plasmids eine Überexpression von OCT4 in USSCs durchgeführt. Dies hatte eine rasche und intensive Reaktivierung von *SOX2* zur Folge. Dieser Befund spricht für die These, dass sich die Promotoren der Pluripotenzfaktoren in der USSC in einem Bereitschaftszu-

stand befinden. Ihre Reaktivierung durch zusätzliche Faktoren ist grundsätzlich möglich (Santourlidis 2010).

6. Fazit

6.1 Die besonderen Eigenschaften der USSC gehen mit einem außergewöhnlichen CpG-Methylierungsschema einher

Das zentrale Ergebnis dieser Untersuchung ist der unerwartet niedrige Grad der DNA-Methylierung bestimmter regulatorischer Schlüsselemente in USSCs. Dies betrifft die Promotoren von *SOX2* und *NANOG* sowie den Enhancer *SRR1*, der auf die Expression von *SOX2* wirkt. Eine geringfügige Methylierung wurde auch bei einem wesentlichen Abschnitt des *hTERT*-Promoters festgestellt.

Mit Ausnahme von *hTERT* ist diesen Elementen gemein, dass ein geringer Anteil methylierter CpGs mit einem hohen Grad der Expression des betroffenen Gens einhergeht (Sikorska 2008, Hattori 2007, Guilleret und Benhattar 2004). Nach vorherigen Untersuchungen liegt jedoch keiner dieser Faktoren auf Proteinebene vor (Kluth 2010, Aktas 2010).

Eine bivalente HistonSignatur ist für die untersuchten Promotoren bei anderen Stammzellentitäten als regulatorisches Motiv grundsätzlich bekannt. Sie ist typisch für entwicklungspezifische Gene in Stammzellen. Dabei finden sich typischerweise ebenfalls unmethylierte CpGs der Promotoren (Han 2011). Der Nachweis dieser Konfiguration in der USSC ist gut mit deren breitem Differenzierungspotential in Verbindung zu bringen. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass an Genen, die eine bivalente Histonmodifikation aufweisen, zwar eine Initiation der Transkription stattfindet. Dabei kommt es jedoch zu keiner regelhaften Elongation. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt unter anderem durch die Aktivität von Proteinen der Polycomb-Gruppe vermittelt wird (Guenther 2007, Han 2011).

Die hier gefundene bivalente Histonmodifikation erlaubt auf spezifische Signale hin eine bedarfsgerechte Genexpression. Welche Mechanismen im Einzelnen dafür verantwortlich sind, die Blockierung beizubehalten oder aufzuheben, ist nicht geklärt (Han 2011). Die erhobenen Befunde lassen somit erkennen, dass die zu beobach-

tenden phänotypischen Übereinstimmungen von USSC mit ESC auf molekularer Ebene ihre Entsprechung haben.

Die epigenetischen Eigenschaften zentraler Pluripotenzfaktoren stellen wichtige Koordinaten des Zellschicksals dar. Die hier gefundenen Methylierungsschemata untermauern die Bedeutung der USSC als primitive Zellentität mit breitem Differenzierungsspektrum.

Der geringe Methylierungsgrad des *SOX2*-Promoters sowie des *SRR1*-Enhancers, stellt eine mögliche Erklärung für die gute Differenzierbarkeit der USSC in neuronaler Richtung dar (Kögler 2004). Es ist zu vermuten, dass eine Reaktivierung dieses Markers dabei eine Rolle spielt. Die Frage nach einem putativen Aktivator verbleibt und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass ein schwach methylierter *SOX2*-Promoter Voraussetzung für die neuronale Differenzierung ist. Diese Annahme wird wiederum durch die zugleich gefundene, bivalente Histonkonfiguration gestützt (Santourlidis 2010). Vorherige Untersuchungen postulieren die Notwendigkeit der Expression von *SOX2* für den neuronalen Differenzierungsweg (Ferri 2004). Das Ausbleiben der Expression dieses Markers auf Proteinebene in der USSC (Kluth 2010), impliziert demnach eine Reaktivierung dieses Gens bei der Neuro-Differenzierung der USSC. Die hier beschriebene Konfiguration der regulatorischen Schlüsselemente von *SOX2* passt hervorragend als molekulares Korrelat in diesen Zusammenhang.

Der Befund des *NANOG*-Promoters wirft die Frage auf, ob das gefundene Methylierungsschema nur einen Indikator für den Differenzierungsgrad der Zelle darstellt. Alternativ wäre eine funktionelle Bedeutung dieses Elements anzunehmen. Auch ohne Expression von *NANOG* auf Proteinebene könnte hier eine regulatorische Wirkung generiert werden. Denkbar wäre eine Steuerung der Genese regulatorischer RNAs über die CpG-Methylierung (vergl. Illingworth 2010). Auch durch die methylierungsabhängige Bindung bestimmter Faktoren könnte der *NANOG*-Promoter Einfluss auf weitere Signalwege nehmen. *NANOG* ist in weitläufige Verschaltungen eingebunden. Dies gibt Anlass zur detaillierten Abklärung der Funktion des Gens und seiner assoziierten Elemente (vergl. Han 2011). Entsprechende Untersuchungen sind auch für die einzelnen Regionen von *hTERT* anzustellen. Wie beschrieben, sind die einzelnen Abschnitte der CGI dieses Gens Gegenstand kontroverser Diskussion. Dies gilt ins-

besondere für den hier untersuchten Abschnitt dieser Region. Obwohl umfangreiches Datenmaterial zur Charakterisierung dieses DNA-Bereichs vorliegt, ist seine Funktion bisher ungewiss (Zinn 2007, Guileret und Benhattar 2004).

Zu klären bleibt, welche Rolle diese Elemente im physiologischen Geschehen der USSC spielen.

Aus der Zusammenschau der hier dargestellten Ergebnisse sowie den weiteren Erkenntnissen, die durch die Forschungsgruppe gewonnen wurden, ergeht die Frage nach der Identität und Rolle zusätzlicher Faktoren.

Bei Reprogrammierungsexperimenten wurde gezeigt, dass ein transkriptionspermissives Methylierungsschema der Gene von Pluripotenzfaktoren, tendenziell erst im späten Verlauf der Reprogrammierung etabliert wird. Die Zellen erlangen bereits zu einem früheren Zeitpunkt ihre Selbsterneuerungskapazität (Han 2011, Mikkelsen 2008). Dies weist auf eine Steuerung der Zelleigenschaften -inklusive der Pluripotenz- als direkte Wirkung der Transkriptionsfaktoren hin. In einem weiteren Schritt bewirken diese Proteine die Etablierung entsprechender epigenetischer Modifikationen (Mikkelsen 2008). Daher steht die Aufklärung der Faktoren an, die in diesem Zusammenhang für die USSC bedeutsam sind. Zur Ergründung der Modi ihrer Einflussnahme auf Pluripotenz und Differenzierung muss dabei ein sehr globaler Ansatz verfolgt werden. Es reicht nicht, den Fokus auf die Epigenetik der anerkannten Pluripotenzfaktoren zu beschränken, es ist viel mehr erforderlich, ihre Zielgene und deren Produkte zu untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, fügen sich gut in bisherige Erkenntnisse ein. Dabei zeigen sie jedoch auf, wie begrenzt das Erklärungsvermögen der These der „regulatorischen Kerneinheit der Pluripotenz“, aus den genannten Faktoren ist. Dieser Umstand ist in der Literatur ebenfalls beschrieben worden (Zwaka 2008).

Die Aufrechterhaltung und Beendigung des Zustandes der Pluripotenz unterliegt der Kontrolle bestimmter Transkriptionsfaktoren. Deren Expression und Degradierung ist von entscheidender Bedeutung (Dejosez 2012). Es ist daher erforderlich, die entsprechenden Proteine zu identifizieren, Informationen über deren Expressionskontrolle, Funktion und Halbwertszeit zu gewinnen. Man darf vermuten, dass die lange, aber begrenzte Kultivierbarkeit der USSC durch einen oder mehrere selbststimulie-

rende Regelkreise bedingt ist. Diese könnten aus der Zeit der Entstehung dieser Zelle stammen und in Kultur allmählich zum Erliegen kommen. In der Folge käme es dann zur Ausdifferenzierung. Auf die in vitro oder in vivo empfangenen Signale zur spezifischen Differenzierung hin würden diese Regelkreise sofort unterbrochen.

Gegenstand zukünftiger Forschung könnte die Identifikation solcher Regelkreise sein. Wenn sich deren Existenz experimentell bestätigt, wäre in einem nächsten Schritt ihre Interaktion mit dem Kernnetzwerk der Pluripotenz zu klären.

Die großen Erwartungen an die zeitnahe, einfache Verwendung embryonaler Stammzellen werden durch spektakuläre Erfolge genährt, die durch SCNT-Techniken an Säugetieren erzielt wurden (Wilmuth 1997). Um diese Erfolge für die Humanmedizin nutzbar zu machen, wurde bereits ein intensiver Aufwand betrieben. Bisher ist es aber offenbar nicht gelungen, patientenspezifische humane ESC-Linien durch Kerntransplantation zu gewinnen. Hinzu kommt, dass der technische Aufwand durch den Verbrauch von Oozyten, die reproduktionsmedizinisch gewonnen werden müssen, erheblich ist (Hwang 2005, wobei diese Publikation im Wesentlichen nicht korrekt ist). Neben zukunftsweisenden Ansätzen für die regenerative Medizin brachte diese Forschung auch Probleme und Risiken zutage, die mit der Anwendung von embryonalen Stammzellen einhergehen. Über die ethische Problematik des Verbrauchs von Embryonen hinaus verbleiben technische Schwierigkeiten. Sowohl Kontaminationsrisiken als auch das Risiko der malignen Entartung spielen eine Rolle. Die Gefährdung durch Tumore ist bei der Anwendung immunkompetenter Zellen mit ungeklärtem Proliferations- und Differenzierungsverhalten erheblich. Als eine der bedeutsamsten Eigenschaften der USSC tritt ihre außerordentliche Handhabungssicherheit hervor. Besonders das Fehlen einer Neigung, Tumore zu bilden, macht diese Zellen interessant (Jeltsch 2010). Das Entartungsrisiko von Stammzellen, die zur Implantation in den Patientenkörper vorgesehen sind, ist eines der wichtigsten Hindernisse für ihre therapeutische Anwendung (Tang 2012). Daher rangiert die USSC näher an der klinischen Anwendung als viele andere Stammzellentitäten, deren Neigung zur Malignität ungeklärt oder ungünstig ist (Okita und Yamanaka 2006, Tang 2012, Jeltsch 2010).

In nahezu allen relevanten Belangen tritt die USSC aus Nabelschnurblut als hoffnungsvolle Kandidatin für Forschung und Anwendung hervor.

Bisherige Untersuchungen haben das breite Differenzierungspotential der USSC dargestellt, aktuelle Projekte nähern sich bereits der klinischen Verwendung dieser Zellen. Dabei werden die Unterstützung der Hämatopoese und diverse regenerative Applikationen als nahe Ziele verfolgt (Jeltsch 2010).

6.2 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten

Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, die molekulare Grundlage der Symbiose von Stammzeleigenschaften und benignem Wachstumsverhalten der USSC zu ergründen. Es war nicht zu erwarten -gerade bei einer Zellentität, die eine hochgradige Resistenz gegen maligne Entartung unter Beweis gestellt hat- weitestgehend unmethylierte Promoterregionen der zentralen Pluripotenzgene zu finden. Diese Beobachtung legt nahe, dass die USSC über ausgeprägte, komplementäre Steuerungsmechanismen verfügt. Diese Faktoren bewirken vermutlich, dass diese Zelle über eine ungewöhnliche Konfiguration der Pluripotenz- und Differenzierungsfaktoren verfügt. Durch das Zusammenwirken mehrerer Mechanismen werden Proliferationsfähigkeit und Entwicklungsbreite in der USSC mit Entartungsresistenz auf einem spezifischen Niveau ausbalanciert.

Diese Charakteristika weisen der USSC wichtige Modelleigenschaften zu. Sie bietet sich an, um grundlegende medizinische und biologische Erkenntnisse von höchster klinischer Relevanz zu generieren. Durch Vergleiche mit anderen Zellen lässt sich die Grenze zwischen benigner, aber regenerationsfreudiger Stammzelle und ebenfalls ausgesprochen proliferativer, maligner Tumorzelle ziehen.

Aus den hier gewonnenen Daten darf man die Vermutung ableiten, dass eine unterbliebene CpG-Methylierung der beschriebenen Elemente, nicht notwendigerweise mit einer ausgeprägten Tumorgenität einhergeht.

Eine Applikation solcher Erkenntnisse kann auf verschiedenste Weise erfolgen, hier drei nahe liegenden Beispiele:

- Generierung diagnostischer Kriterien für die Pathologie. Definition eindeutiger epigenetischer Marker, die für Malignität kennzeichnend sind. Dies könnte in Zukunft zuverlässige und rasche Diagnosen ermöglichen.

- Ermittlung von Schwellenwerten über messbare, molekulare Determinanten. Deren Einhalten ist Sicherheitsvoraussetzung, wenn Stammzellen in den Körper eines Patienten transplantiert werden.

- Einflussnahme auf die relevanten Mechanismen, nicht zuletzt durch spezielle kleine Moleküle oder synthetische Faktoren. Deren Verwendung als Pharmaka, etwa zur Tumortherapie, ist naheliegendes Ziel. Eine klare Festlegung von epigenetischen Kennmarken erlaubt die systematische Einbindung in den Entwicklungsprozess, etwa als Screeninginstrument.

6.3 Die wichtigste Herausforderung

Die zentrale Aufgabe zukünftiger Forschung ist demnach die Aufklärung der Rolle weiterer regulatorischer Elemente. Am Beispiel der hier gewonnenen Erkenntnisse zeigt sich die Kernproblematik des gesamten Forschungsgebiets. Die Epigenetik der verschiedenen Stammzellen und ihrer Differenzierung beruht auf einem extrem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren. Um hier zu verwertbaren Resultaten zu gelangen, ist eine Zusammenschau vom Funktionszustand der beteiligten Subsysteme erforderlich. Zudem müssen deren Interaktionen aufgeklärt werden. Zur Verdeutlichung dieses Ziels nehme man sich ein aktuelles, umfassendes Review zur Epigenetik vor, so etwa Han 2011, „The Epigenetic Landscape of Pluripotent Stem Cells“. Für weitreichende, valide Ergebnisse ist die Abklärung aller hier erwähnten Mechanismen parallel erforderlich. Diese Arbeit ist für die verschiedensten Untergruppen von Stammzellen unter einer Vielzahl von Bedingungen vorzunehmen.

Es ist zu erahnen, wie umfassend sich der experimentelle Aufwand für derartige Untersuchungen gestalten wird. Darüber hinaus ergeben sich hohe Anforderungen an die Bioinformatik. Deren Aufgabe besteht nicht nur in der sinnvollen Auswertung der enormen Datenmenge. Die Bioinformatik hat auch die Aufgabe, die Ergebnisse in einer für den Menschen fassbaren Darstellungsweise zu präsentieren.

Hier wird deutlich, dass die Stammzellforschung einer umfassenden Verzahnung mit anderen für die Biotechnologie relevanten Gebieten bedarf. Dabei werden Robotik und Informatik den Forschungsprozess in bisher ungekanntem Maße verändern.

Die vorliegende Arbeit und die beschriebenen Verfahren haben somit den Charakter eines Prototyp-Projekts. Die hier gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen die Konzeptionierung zukünftiger Forschungsprojekte.

7. Methodik

7.1 Verwendete Zellen

7.1.1 USSC und Osteo-Differenzierung

Die Gewinnung des Nabelschnurblutes erfolgte in Einvernehmen mit den Müttern. Die Präparation des Nabelschnurblutes erfolgte gemäß dem von Kögler 1996 beschriebenen Verfahren (Kögler 1996). Hier wird im Wesentlichen die zügige Verarbeitung und Vermeidung von Kontamination erläutert, die als wichtige Determinanten dieses Prozesses gelten.

Die USSCs wurden nach dem hierzu etablierten Protokoll aufgereinigt und kultiviert (Kögler 2004). Nach der sterilen Gewinnung des Nabelschnurblutes erfolgte die Aufreinigung der mononukleären Zellen per Gradientenseparation mit anschließender Lyse der Erythrozyten durch Ammoniumchlorid. Anschließend erfolgte die Inkubation in speziellen Medien und unter definierten Kulturbedingungen (Kögler 2004).

Zur Osteo-Differenzierung wurden die Zellen zu $8000/\text{cm}^2$ ausplattiert, 70% der Flüssigkeit wurden mit 10^{-7} M Dexamethason angereichert, anschließend wurden $50\mu\text{M}$ Ascorbinsäure-2-Phosphat, so wie 10mM Dexamethason, Ascorbinsäure, und beta-Glycerolphosphat (DAG) beigefügt (Kögler 2004).

Die Gewinnung der Zellen wurde durch die von Frau Prof. Dr. Kögler geleitete Arbeitsgruppe durchgeführt. Für die vorliegende Arbeit wurden die Zellen in den Petrischalen bereitgestellt, in denen der letzte Schritt der Kultivierung erfolgt war.

7.1.2 Auswahl der Zelllinien

Die verwendeten Zellen waren expandierte Primärkulturen von USSCs aus Nabelschnurblut. Es handelte sich hier um charakterisierte Zelllinien. Die Zelllinien wurden gewonnen, indem Nabelschnurblut in eine Kulturflasche gegeben wurde, worauf hin sich einzelne, abgrenzbare Kolonien auf deren Boden bildeten. Aus den einzelnen Kolonien wurden jeweils einige Zellen gepickt und zur Anzucht einer neuen Kultur verwendet, die den Grundstock der Zelllinie bildete. Die Zelllinien unterschieden sich tendenziell in ihrem Differenzierungsverhalten, wie die Wissenschaftler um Herrn PD. Dr. Santourlidis feststellten. Die Ursachen für die unterschiedliche Differenzierungsneigung sind bisher nicht detailliert ergründet.

Die Angaben zur Differenzierungsneigung und Kultivierbarkeit der einzelnen Zelllinien wurden nicht systematisch erfasst. Es handelt sich hier um Erfahrungswerte, die sich aus der Kommunikation innerhalb der Arbeitsgruppe ergaben. Diese Angaben wurden mir von Herrn PD. Dr. Simeon Santourlidis mitgeteilt.

Primär wurden Daten erhoben, die für die eingangs genannte gemeinsame Veröffentlichung verwendet werden sollten. Dazu wurde vornehmlich ein umfassender Datensatz für eine Zelllinie generiert. Die gute und zügige Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene funktionelle somatische Gewebe macht diese Zellen für die Implantation in Körpergewebe interessant. Dort ist eine rasche Integration in physiologisches Gewebe zu erwarten. Die Differenzierungsneigung ist bei der Zelllinie 4/146 am deutlichsten ausgeprägt, obwohl sie im undifferenzierten Zustand normale Charakteristika der USSC zeigt. Zudem wurde spekuliert, dass sich hier differenzierungsspezifische epigenetische Veränderungen besonders deutlich darstellen würden. Daher wurde diese Zelllinie als primäres Untersuchungsobjekt gewählt.

Der Aspekt, einzelne Zellpopulationen miteinander zu vergleichen ergab sich als zusätzlicher Gegenstand. Entsprechend der Möglichkeiten wurden vornehmlich drei Zelllinien untersucht. Deren Eigenschaften waren in vorherigen Experimenten beobachtet worden (mündliche Mitteilung S. Santourlidis). Die quantitativen Real-Time-PCR-Ergebnisse standen für diese Zellpopulationen mit den vorherigen Beobachtungen im Einklang. Die hier dargestellten Daten sind das Ergebnis, das mit den verfügbaren Mitteln sicher zu gewinnen war. Diese Zusammenhänge sind hier tabellarisch dargestellt (**Tab. 1**).

Zell- linie	D.N.	NANOG PM	SRR1 M	SOX2 PM	hTERT PM	TZ alkalische Phosphatase	TZ Osteo- kalzin
4/146	++	+ - / + -	(+) - - / - -	- - / - -	(+) - - / (+) - -	+++ +	+ -
4/101	+ -	n.e.	- - / - -	- - / - -	n.e.	++	+ -
5/73	+ -	- - / - -	- - / - -	n.e.	n.e.	+	+ -

Tab. 1: Übersicht über die wichtigsten verwendeten Zelllinien und deren tendenzielle Eigenschaften. DN: Differenzierungsneigung, NANOG PM: NANOG-Promoter-Methylierung, SRR1 M: SRR1-Methylierung, SOX2 PM: SOX2-Promoter-Methylierung, hTERT PM: hTERT-Promoter-Methylierung. Die Werte vor bzw. nach den Bruchstrichen kennzeichnen den Zustand vor bzw. nach 14-tägiger Osteo-Differenzierung. TZ Osteokalzin: Transkriptionsratenzunahme von Osteokalzin während der Differenzierung, TZ alkalische Phosphatase: Transkriptionsratenzunahme alkalischer Phosphatase während der Differenzierung, n.e.: nicht erhoben.

7.2 Osteoblasten-RNA

Die für die Real-Time-PCR-Messungen verwendete RNA bzw. cDNA wurde in allen Fällen im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Eine Ausnahme stellt die zur Kontrolle verwendete Osteoblasten-RNA dar. Diese wurde von Frau Dr. rer. nat. Monika Hertent fertig präpariert in RLT-Puffer, bereitgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daraus cDNA hergestellt. Bei der verwendeten Probe handelt es sich um RNA aus Osteoblasten, der 3. Passage aus Kieferknochenspänen, die in der 2. Passage schon per Real-Time-PCR, als Osteokalzin-positiv, charakterisiert worden waren. Spender: weiblich, Alter 18 Jahre, Ethikvotum-NR. 2505/04. Der Autor dankt Frau Dr. Hertent, Orthopädische Klinik, Uniklinikum Düsseldorf, für die Überlassung dieser Probe.

7.3 Induzierte pluripotente Stammzellen aus Nabelschnurblut-USSC-iPSC

Im Wesentlichen wurden pMX-basierte, retrovirale Vektoren verwendet, die komplementäre Sequenzen der humanen DNA von Oct4, SOX2, Klf4, and c-Myc trugen. Hier fand eine Cotransfektion durch Helferplasmide mit Verpackungsdefekt statt, wobei Fugene 6 transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany) zum Einsatz kam. Einzelheiten siehe Zaehres, 2010. Für die vorliegende Arbeit wurde bereits präparierte DNA dieser Zellen bereitgestellt und nach dem hier beschriebenen Protokoll der genomischen Natriumbisulfit-Sequenzierung behandelt.

7.4 Erstellung von Primern mittels des Programms Primer-Designer

Das Programm Primer-Designer ist eine Anwendung, die es dem Experimentator ermöglicht, adäquate Primer für seine spezifischen Belange zu finden. Zu diesem Zwecke lässt sich die Sequenz, in der sich das zu amplifizierende Fragment befindet, mit dem Programm aufrufen. Anschließend wird der Bereich systematisch nach geeigneten Stellen abgesucht, die als Bindungsstelle eines komplementären Primers geeignet sind. Dabei wird die Affinität der gewählten komplementären Sequenzen mit der resultierenden Schmelztemperatur der Primer-Dimere dargestellt. Ebenso wird deren Neigung zur Ausbildung von Haarnadel-Strukturen angegeben. Entsprechend dieser Kriterien erfolgt die Auswahl der letztlich verwendeten Primer. Der Experimentator wählt aus den verschiedenen Alternativen, die den gesuchten Bereich umfassen, nach eigenem Ermessen passende Primer-Paare. Auf Grund der besonderen Schwierigkeit, die fragile Natriumbisulfit-konvertierte DNA zur Klonierung zu amplifizieren, wurde mit nested-PCR-Methoden gearbeitet.

Die ausgewählten Primer wurden online per Eingabe in eine Programmmaske bei dem Unternehmen Thermo Fisher bestellt. Geliefert wurden Behälter, in denen sich die Primer in gefriergetrocknetem Zustand befanden. Sie wurden nach Herstellerangaben gelöst. Von den so gewonnenen Stammlösungen wurden die zur Anwendung vorgesehenen Primerlösungen durch Verdünnung hergestellt.

Alle verwendeten Primer wurden mittels genomischer DNA aus CD34+ Zellen auf ihre Funktion getestet. Dazu wurde nach dem gewählten Protokoll verfahren, das auch bei der eigentlich vorgesehenen Verwendung der Primer zur Anwendung kam. Das Produkt des Probelaufes wurde zur Auswertung, besonders mit Blick auf die Spezifität der Primer, auf ein Agarosegel aufgetragen. Hier wurde anhand von Größenmarkern seine Länge bestimmt. Erst wenn sich hier ein klares, eindeutiges Signal zeigte, das von seiner Größe her dem vorgesehenen Produkt entsprach, wurden die so ermittelten PCR-Bedingungen als tauglich für das weitere Vorgehen erachtet.

7.5 Anmerkung zu den praktischen Arbeiten: die Verwendung von „Kits“

Für den Großteil der hier durchgeführten Verfahren standen sogenannte „Kits“ zur Verfügung. Dies sind von industriellen Herstellern vorgefertigte Experimentiersätze. Sie enthalten üblicherweise in einem einzelnen Karton alle Reagenzien und Einwegmaterialien, die zur Durchführung eines Versuchs benötigt werden. Die einzelnen Komponenten sind aufeinander abgestimmt, die Anwendung ist erprobt. Die zu gebrauchenden Gerätschaften und zusätzlich zu verwendenden Materialien sind in üblichen Labors zu finden. Diesen Kits liegt zudem ein Handbuch bei, das neben einer groben technischen Erklärung des Verfahrens ein detailliertes Protokoll zur Verwendung beinhaltet. Die Verfügbarkeit dieser Teilesätze vereinfacht gerade weniger erfahrenen Experimentatoren den Einstieg in die praktischen Arbeiten enorm. Sie erhalten die Möglichkeit, gängige Verfahren mit hoher Erfolgswahrscheinlichkeit und reduziertem Aufwand durchzuführen. Die Entwicklung und marktmäßige Verfügbarmachung von Kits ist demnach ein bedeutsamer Fortschritt der molekularbiologischen Forschung. Auch wenn dies wenig spektakulär erscheint, wurde so die alltägliche Praxis auf diesem Gebiet enorm verbessert. So trugen diese innovativen Produkte auch zum Gelingen der hier geschilderten Untersuchungen bei. Zu Details dieser Verfahren siehe Manuals der entsprechenden Kits, die beim Hersteller und online erhältlich sind.

7.6 Agarose-Gele

Die Agarosegele wurden aus TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer und Agarose hergestellt, zum Erhitzen dieser Komponenten diente ein herkömmlicher Mikrowellenofen. Nach dem Kochen wurde nach kurzer Abkühlphase Ethidiumbromid als Markersubstanz in die flüssige Agarosemasse gegeben, um die DNA später unter UV-Licht sichtbar zu machen. Der Umgang mit den ethidiumbromidhaltigen Gelen und sonstigen Komponenten erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen, die konsequent eingehalten wurden. Jegliche Verbrauchsmaterialien, die mit Ethidiumbromid in Kontakt gekommen waren, wurden in gesonderten Abfallbehältern entsorgt, wiederverwendbare Gegenstände getrennt von sonstiger Laborausstattung gelagert.

7.7 RNA-Präparation und cDNA-Gewinnung

Die Präparation der RNA erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

Bei dem RNeasy Mini Kit handelt es sich im wesentlichen um einen Experimentiersatz, der neben den benötigten Pufferlösungen spezielle „Säulen“ beinhaltet. Dies sind Einsätze für Eppendorf-Reaktionsgefäße, in denen sich eine Silicia-Membran befindet. Hier wird die RNA während der Präparation gebunden und später wieder eluiert. Das Protokoll des Herstellers erlaubt die Entleerung dieser Säulen bei einigen Schritten mittels Zentrifuge oder mittels eines Vakuumgerätes. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gebrachten Kits wurde ausschließlich mit der Zentrifuge gearbeitet.

Die Verarbeitung der RNA erfolgte umgehend nach Extraktion, um eine Degradierung der Nukleinsäuren möglichst zu vermeiden. Zudem wurde bei der Ausführung des Protokolls, auf besonders zügiges Arbeiten geachtet. Dabei wurde zur Inaktivierung von RNAsen und zur Denaturierung der Proteine dem RLT-Puffer 2-Mercapto-Ethanol zugesetzt. Die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen wurden befolgt.

Umgehend nach RNA-Präparation wurde die cDNA-Synthese durchgeführt.

Zur First-strand-cDNA-Synthese wurden ca.1.5 µg RNA verwendet, in Kombination mit oligo(dT) und Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Daraus ergab sich ein Volumen von 50 µl, das bei 42° C für 1 h inkubiert wurde.

cDNA-Präparate wurden grundsätzlich bei –20° C gelagert, ein Auftauen nach Möglichkeit verhindert.

7.8 Real-Time-PCR

7.8.1 Syber Green Real-Time-PCR

Im Rahmen des Projekts wurden zum Vergleich der Expression der beschriebenen Schlüsselfaktoren per Real-Time-PCR spezifische Primer für die betroffenen Regionen entworfen. Dies geschah unter Verwendung des Programms Primer Designer. Die Primer wurden von Thermo Fisher geliefert, auf die Arbeitskonzentration verdünnt und unter den vorher bestimmten Bedingungen sorgfältig auf Funktionstüchtig-

keit und Spezifität getestet. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Produkte auf Agarose-Gel aufgetragen, hier zeigten sich in allen Fällen deutliche Banden ohne nennenswerte Nebenbanden. Dies wurde als Beweis der Funktionstüchtigkeit der Primer gemäß spezifischem PCR-Protokoll gewertet.

Zur Messung der jeweiligen cDNA-Konzentrationen kam der Real time PCR SYBR® Green PCR Mastermix (Fermentas) zur Anwendung. Hier wurden jeweils 25ng template cDNA verwendet.

Dieses Verfahren beruht auf der Bindung des Reagenz SYBR-Green an doppelsträngige DNA. Dieser Komplex besitzt ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum von Licht bestimmter Wellenlänge. Daher verändert sich die Reaktion auf Laserlicht proportional zur Doppelstrang-DNA-Konzentration im Gefäß. Dies wird von einem Detektor im Gerät registriert und als Datensatz gespeichert.

Zusammensetzung der hier verwendeten Reaktionsgemische, je Ansatz insgesamt 25 µl:

9,0 µl H₂O

12,5 µl Sybr Green Mastermix

1 µl Primer S

1 µl Primer AS

1,5 µl cDNA

Dabei kamen folgende Primer mit ihren jeweiligen spezifischen Amplifikationsbedingungen zum Einsatz:

7.8.2 Alkalische Phosphatase

Nachdem ein erstes Primerpaar erfolglos getestet wurde (sAlkPhmRNA), kam ein zweites zum Einsatz, das sowohl auf dem Probelgel als auch bei der Real-Time-PCR eine gute Funktion bewies. Darauf beziehen sich die hier angegebenen Daten:

2sAlkPhmRNA: ACCAAAGTCTCGCGCCCAC

asAlkPhmRNA: CCACGGAGGCTTCAGGGC

Errechneter TM-Wert: 58,1 ° C

Länge des überspannten Bereiches: 218 bp

Primerlänge: 19 und 18 nt

Tatsächliche, experimentell ermittelte und sowohl für das Probegel, als auch für die Real-Time-PCR eingesetzte Bedingungen:

Denaturierungsphase 13 min bei 95°C, anschließend 31 Zyklen zu je 55 sek bei 95° C, 35 sek bei 58° C und 25 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 3min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4° C.

Bei der Real-Time-PCR entfiel die abschließende Kühlungsphase, hier wurden insgesamt jeweils 40 Replikationszyklen durchlaufen.

7.8.3 Osteokalzin

sOsteocmRNA: CAGGTGCGAAGCCCAGCG

asOsteocmRNA: GGCCAGCAGAGCGACACCC

Errechneter TM-Wert: 61,1 ° C

Länge des überspannten Bereiches: 260 bp

Primerlänge: 18 und 19 nt

Tatsächliche, experimentell ermittelte und sowohl für das Probegel, als auch für die Real-Time-PCR eingesetzte Bedingungen:

Denaturierungsphase 13 min bei 95°C, anschließend 31 Zyklen zu je 55 sek bei 95°C, 30 sek bei 61° C und 25 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 4min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4° C.

Bei der Real-Time-PCR entfiel die abschließende Kühlungsphase, hier wurden insgesamt jeweils 40 Replikationszyklen durchlaufen.

7.8.4 GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)

Die Primer, die zur Konzentrationsmessung der RNA dieses Enzyms verwendet wurden, sind die einzigen, die nicht im Rahmen dieser Arbeit entworfen wurden. Diese Primer wurden Mitte des Jahres 2008 von Wissenschaftlern der NWG Uhrberg zur Verfügung gestellt. Sie gelten dort als erprobt zur Normierung von Real-Time-PCR-Messungen. Der TM-Wert wurden beträgt 58°C, die Amplifikate messen 452 bp.

Zu diesen Primern existieren erprobte Verfahrensbedingungen, die unverändert zum Einsatz gebracht wurden: Denaturierungsphase 14 min bei 95°C, anschließend 40 Zyklen zu je 55 sek bei 95°C, 30 sek bei 58°C und 30 sek bei 72°C.

Alle diese Reaktionen wurden in dreifacher Ausführung mittels ABI 7700 Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) wurde mittels SDS 2.3 Software vorgenommen. Die relativen Unterschiede der Genexpression wurden mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als internem Standard berechnet.

7.9 DNA Präparation

Zur DNA-Extraktion aus den Zellen, wurde das QIAamp® DNA Blood Mini kit (Qiagen) verwendet. Es wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll verfahren. Dabei wurde zuerst eine Lyse der Zellen herbeigeführt, verbunden mit einer Proteolyse mittels eines vom Hersteller gelieferten Enzyms (Proteinase K). Nach Ausfällen der restlichen Proteinbestandteile mit Ethanol erfolgte dann die Übertragung der Lösung auf die Säulen, um dort die DNA zu binden. Nach Reinigung der DNA von verbliebenen Zellbestandteilen und Lösungskomponenten erfolgten Elution und anschließende Lagerung der DNA bei -20° C.

7.10 Natriumbisulfit-Konvertierung

Die Natriumbisulfit-Konvertierung erfolgte mittels EpiTect® kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Dieses Verfahren ist das Kernstück der Aufklärung von

Methylierungsschemata der DNA. Durch die Behandlung der DNA mit Natriumhydrogensulfit kommt es zur Umwandlung von unmethylierten Cytosin-Nukleotiden in Uracil, während die methylierten Cytosinreste keine Veränderung erfahren. Bei der anschließenden PCR-Amplifikation werden die Uracil-Nukleotide auf den neugebildeten DNA-Strängen durch Thyminde ersetzt und bei der Sequenzierung als solche wiedergegeben. Demnach kann vom Vorhandensein eines Cs statt eines Ts bei der letztlich gewonnenen Sequenz der Rückschluss auf ein methyliertes Cytosin getroffen werden. Cytosine, welche die Einwirkung des Natriumbisulfits auf Grund ihrer schützenden Methylgruppen unverändert überstanden haben, sind in diesen Sequenzen weiterhin als C zu erkennen.

Die Natriumbisulfit-Konvertierung von DNA geht zu einem gewissen Grad mit deren Fragmentierung und Degradierung einher. Dies ist eine Folge der Aggressivität der Natriumhydrogensulfitlösung und des niedrigen pH-Werts, die sich nicht nur gegen die vorgesehene Zielstruktur richten. Als Besonderheit des EpiTect-Kits nennt der Hersteller die herausragende Schonung DNA. Während der Konvertierungsreaktion und der anschließenden Rückgewinnung der DNA über ein Elutionsverfahren mittels Siliciasäule kommt es demnach zu verhältnismäßig wenig Materialverlust. Erreicht wird dies über eine genaue Abstimmung der Komponenten und ausgereifte Pufferlösungen. Trotzdem ist eine besonders schonende Behandlung, der so modifizierten DNA unerlässlich, um mit einiger Sicherheit dauerhaft gute Ergebnisse zu erzielen. Dementsprechend wurde diese DNA ausschließlich bei -20°C gelagert, ein Auftauen nach Möglichkeit verhindert.

Die Amplifikation der zu untersuchenden genomischen Abschnitte der Natriumbisulfit-konvertierten DNA machte eine sorgfältige Auswahl spezifischer Primer erforderlich. Wie eingangs beschrieben, wurden die Primer daher mittels DNA aus CD34+ Zellen auf ihre Funktionstüchtigkeit getestet. Auf Grund der Fragilität der konvertierten DNA bedeutet die Verarbeitung eine erhebliche Anforderung an die Gestaltung der Primer. Zudem muss bei diesem Verfahren präzise und zügig gearbeitet werden. Eine zuverlässige Amplifikation wurde schließlich durch ein nested-PCR-Verfahren erreicht. Die hier zum Einsatz gebrachten Primer für NANOG, SOX2, SRR1 und hTERT so wie die PCR-Bedingungen sind anbei dargestellt.

7.11 Primer und PCR-Bedingungen für die genomische Sequenzierung

7.11.1 SOX2 Promoter:

Erster Schritt der nested-PCR:

S1konvSOX2Pr: TAGTGGTTGGTAGGTTGGTTTT

AS1konvSOX2Pr: TTCTTTCTCTCTCCTCTTCTTT

Errechneter TM-Wert: 50,7° C

Länge des überspannten Bereiches: 344 bp

Primerlänge: 22 und 25 nt

Zweiter Schritt der nested-PCR:

S2konvSOX2Pr: GTGGTTGGTAGGTTGGTTTTG

AS2konvSOX2Pr: CTTTCTCTCTCCTCTTCTTTCTCTC

Errechneter TM-Wert: 51° C,

Überspannter Bereich 340 nt

Primerlänge: 21 und 25 nt

Tatsächliche, experimentell ermittelte und zur Sequenzierung verwendete PCR-Bedingungen, Resultat im Test dargestellt in **Abb.5** :

1. PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95° C, anschließend 20 Zyklen zu je 55 sek bei 95° C, 40 sek bei 53° C und 30 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4°C.
2. PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95° C, anschließend 35 Zyklen zu je 55 sek bei 95° C, 40 sek bei 51° C und 30 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4° C.

Zusammensetzung der Reaktionsgemische:

17,1 μ l H₂O

2,5 μ l 10x Puffer

1 μ l Primer S (10 pmol)

1 μ l Primer AS (10 pmol)

1 μ l dNTPs (250 μ Mol)

0,3 μ l Hot Star Taq-Polymerase

1,5 μ l konvertierte DNA

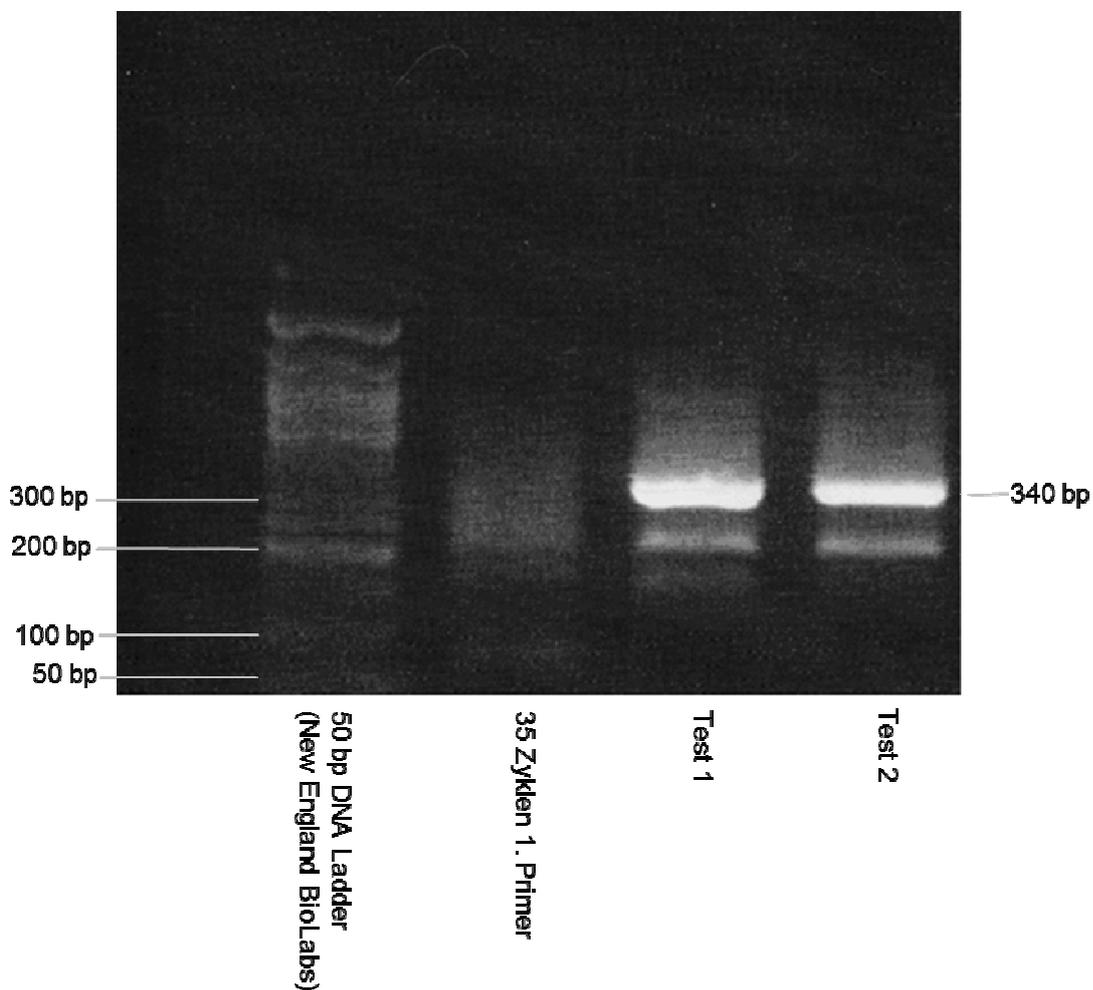


Abb. 5: PCR-Produkte des Primer-Tests für die genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung des SOX2 Promoters. Für den Test wurde Natriumbisulfit-konvertierte DNA aus CD 34+ Zellen verwendet. Hier wird das Resultat nach 35 Amplifikationszyklen mit dem 1. (äußeren) Primer der nested-PCR dargestellt als auch zwei Tests nach dem beschriebenen Protokoll. Dabei wurden zwei verschiedene Natriumbisulfit-konvertierte DNA-Sorten verwendet (entsprechend Test 1 und 2).

Für die zweite Reaktion der nested-PCR wurden 2 µl des im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnten Reaktionsgemischs der ersten PCR verwendet, dementsprechend wurden dem Ansatz 0,5 µl weniger Wasser beigefügt. Des Weiteren wurden für die zweite PCR-Reaktion die gleichen Bestandteile wie für die erste verwendet.

7.11.2 SRR1:

Erster Schritt der nested-PCR:

S1konvSOXSRR1: tggagtttatagttgatatttttag

AS1konvSOXSRR1: aaactaaccaaacatcttactattat

Errechneter TM-Wert: 45 ° C

Länge des überspannten Bereiches: 389 bp

Primerlänge: 26 und 26 nt

Zweiter Schritt der nested-PCR:

S2konvSOXSRR1: gagtttatagttgatatttttagaa

AS2konvSOXSRR1: actaaccaaacatcttactattataa

Errechneter TM-Wert: 45 ° C,

Überspannter Bereich: 385 nt

Primerlänge 26 und 26 nt

Tatsächliche, experimentell ermittelte und zur Sequenzierung verwendete PCR-Bedingungen, Resultat im Test dargestellt in **Abb.6** :

1. PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95° C, anschließend 25 Zyklen zu je 55 sek bei 95° C, 45 sek bei 45° C und 30 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4°C.
2. PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95° C, anschließend 34 Zyklen zu je 55 sek bei 95° C, 45 sek bei 45° C und 30 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4° C.

Zusammensetzung der Reaktionsgemische:

- 17,8 µl H₂O
- 2,5 µl 10x Puffer
- 1 µl Primer S (10 pmol)
- 1 µl Primer AS (10 pmol)
- 1 µl dNTPs (250 µMol)
- 0,2 µl Hot Star Taq-Polymerase
- 1,5µl konvertierte DNA

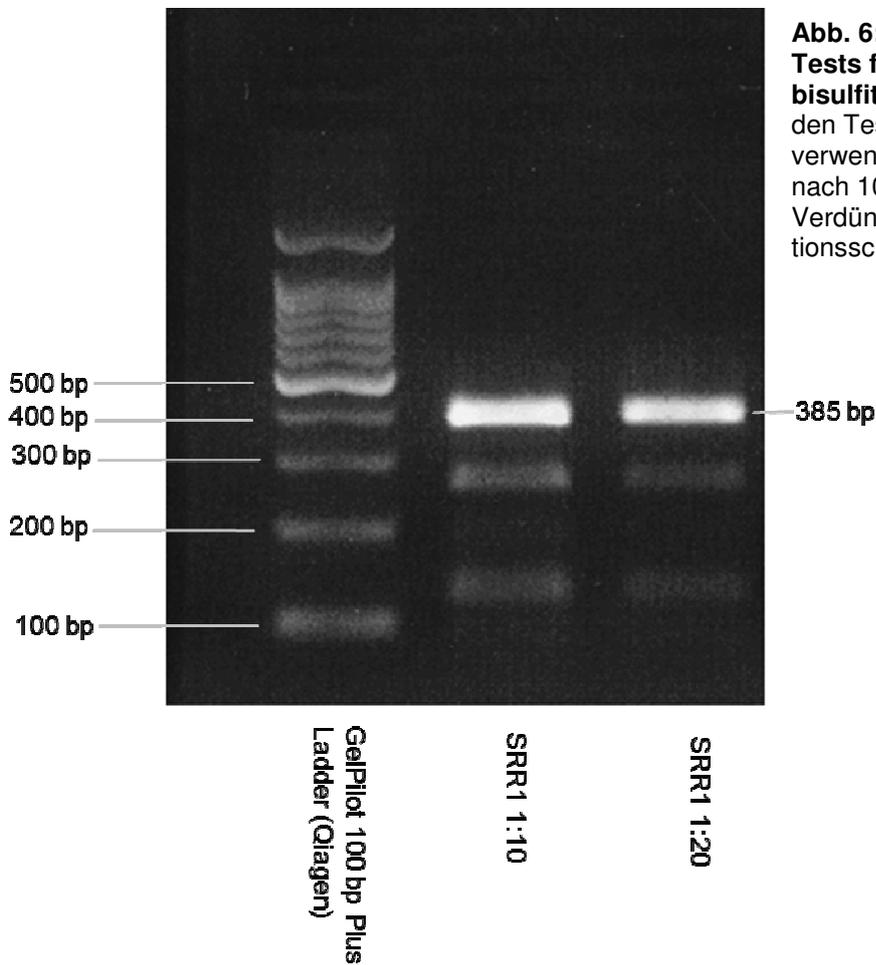


Abb. 6: PCR-Produkte des Primer-Tests für die genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung von *SRR1*. Für den Test wurde DNA aus CD 34+ Zellen verwendet. Hier wird sowohl das Resultat nach 10-facher als auch nach 20-facher Verdünnung nach dem ersten Amplifikationsschritt dargestellt.

Für die zweite Reaktion der nested-PCR wurden 2 µl des im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnten Reaktionsgemischs der ersten PCR verwendet, dementspre-

chend wurden dem Ansatz 0,5 µl weniger Wasser beigefügt. Des weiteren wurden für die zweite PCR-Reaktion die gleichen Bestandteile wie für die erste verwendet.

7.11.3 NANOG-Promoter

Erster Schritt der nested-PCR:

S1NanogPrkonv: GTTTTATTTTATTTTGTGGAATTA

AS1NanogPrkonv: CATAAAACAACCAACTCAATC

Errechneter TM-Wert: 47° C

Länge des überspannten Bereiches: 325 bp

Primerlänge: 25 und 21 nt

Zweiter Schritt der nested-PCR:

S2NanogPrkonv: TTATTTTGTGGAATTATATTTTG

AS2NanogPrkonv: ACAACCAACTCAATCCAAC

Errechneter TM-Wert: 47,6° C,

Überspannter Bereich: 312 nt

Primerlänge: 25 und 20 nt

Tatsächliche experimentell ermittelte und zur Sequenzierung verwendete PCR-Bedingungen, Resultat im Test dargestellt in **Abb.7**:

1.PCR: Denaturierungsphase 14 min. bei 95° C, anschließend 23 Zyklen zu je 50 sek. 95° C, 45 sek bei 47° C und 25 sek. bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7 min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4°C.

2.PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95° C, anschließend 34 Zyklen zu je 50 sek bei 95° C, 45 sek bei 47° C und 25 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4°C.

Zusammensetzung der Reaktionsgemische:

17,2 μ l H₂O
2,5 μ l 10x Puffer
1 μ l Primer S (10 pmol)
1 μ l Primer AS (10 pmol)
1 μ l dNTPs (250 μ Mol)
0,3 μ l Hot Star Taq-Polymerase
2,0 μ l konvertierte DNA

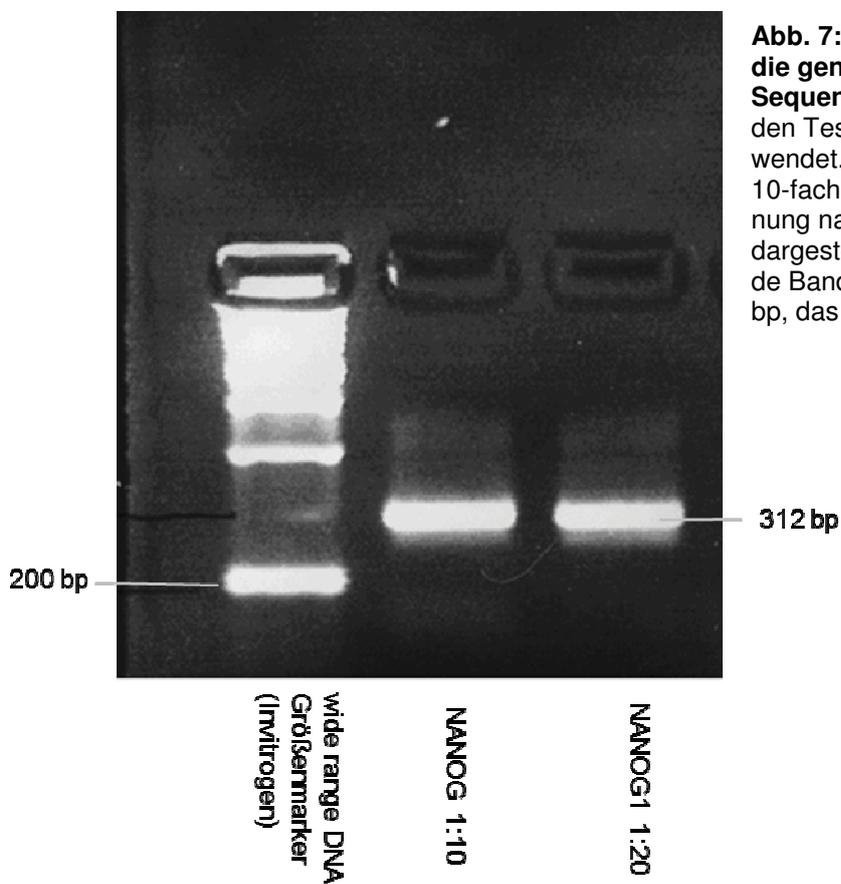


Abb. 7: PCR-Produkte des Primer-Tests für die genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung des *NANOG*-Promoters. Für den Test wurde DNA aus CD 34+ Zellen verwendet. Hier wird sowohl das Resultat nach 10-facher als auch nach 20-facher Verdünnung nach dem ersten Amplifikationsschritt dargestellt. Die massive vorne (unten) liegende Bande des Größemarkers liegt bei 200 bp, das deutliche Amplifikat misst 312 bp.

Für die zweite Reaktion der nested-PCR wurden 2 μ l des im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnten Reaktionsgemischs der ersten PCR verwendet, dementsprechend wurden dem Ansatz 0,5 μ l weniger Wasser beigelegt. Des Weiteren wurden für die zweite PCR-Reaktion die gleichen Bestandteile wie für die erste verwendet.

7.11.4 hTERT-Promoter

Erster Schritt der nested-PCR:

S1HTERTPrkonv: GGGTTTGTGTTAAGGAGTTTA

AS1HTERTPrkonv: ACCATAATATAAAAACCCTAA

Errechneter TM-Wert: 51,4° C

Länge des überspannten Bereiches: 268 bp

Primerlänge: 21 und 25 nt

Zweiter Schritt der nested-PCR:

S2HTERTPrkonv: GGTTTGTGTTAAGGAGTTTAAGT

AS2HTERTPrkonv: ATATAAAAACCCTAAAAACAATAC

Errechneter TM-Wert: 51,3°C,

Überspannter Bereich 262 nt

Primerlänge: 23 und 25 nt

Tatsächliche, experimentell ermittelte und zur Sequenzierung verwendete PCR-Bedingungen, Resultat im Test dargestellt in **Abb8**:

1. PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95° C, anschließend 20 Zyklen zu je 50 sek bei 95° C, 45 sek bei 51° C und 30 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 3 min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4° C.

2.PCR: Denaturierungsphase 14 min bei 95°C, anschließend 33 Zyklen zu je 55 sek bei 95° C, 40 sek bei 51° C und 30 sek bei 72° C, dann eine einzelne Elongationsphase von 7min bei 72° C, abschließend Kühlung des Reagenz auf 4° C.

Zusammensetzung der Reaktionsgemische:

17,2 μ l H₂O

2,5 μ l 10x Puffer

1 μ l Primer S (10 pmol)

1 μ l Primer AS (10 pmol)

1 μ l dNTPs (250 μ Mol)

0,3 μ l Hot Star Taq-Polymerase

2,0 μ l konvertierte DNA

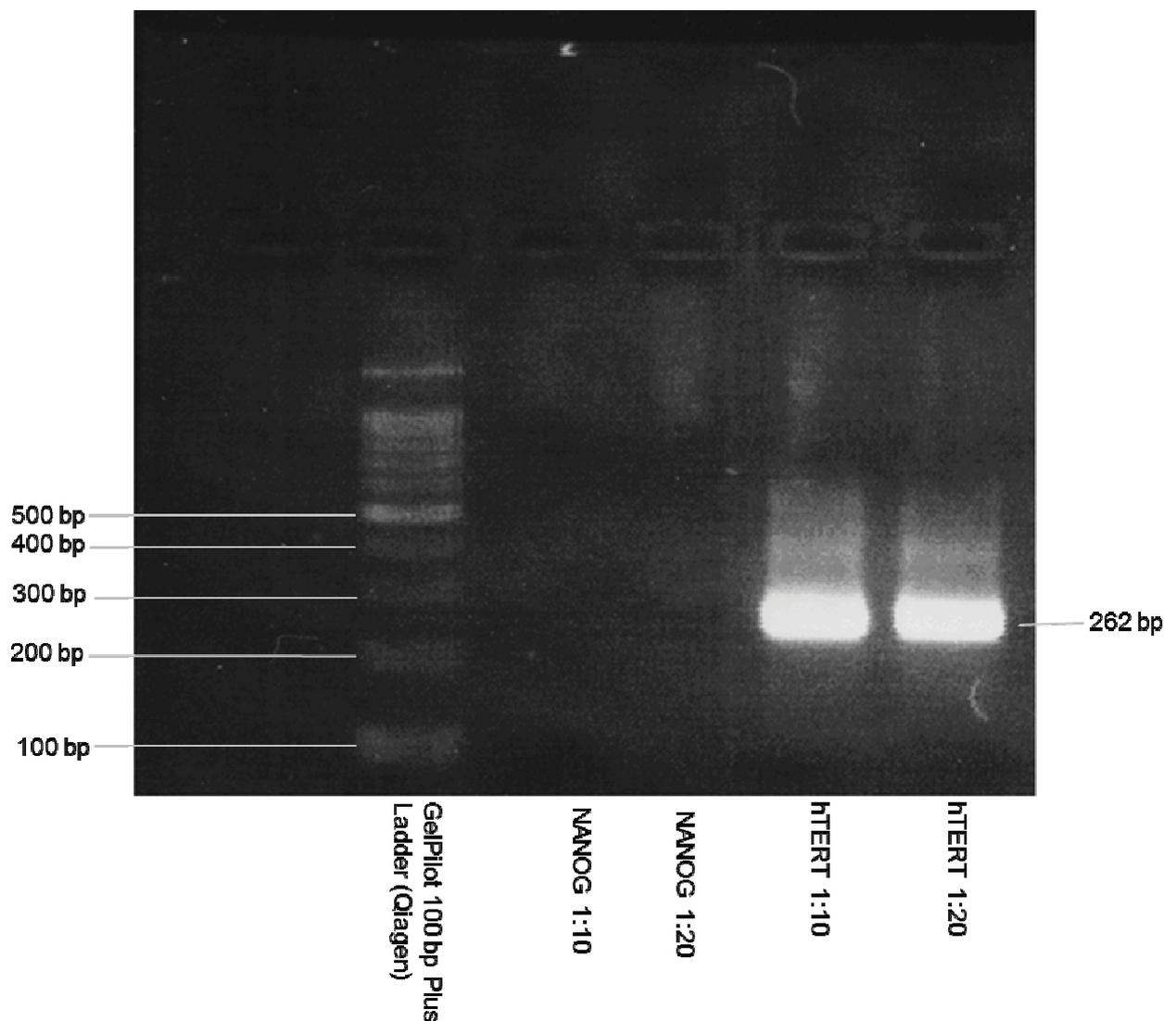


Abb. 8: PCR-Produkte des Primer-Tests für die genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung des *hTERT*-Promotors. Für den Test wurde DNA aus CD 34+ Zellen verwendet. Hier wird sowohl das Resultat nach 10-facher als auch nach 20-facher Verdünnung, nach dem ersten Amplifikationsschritt dargestellt. Zwischen der Quiagen GelPilot 100 bp plus DNA-Größenmarkierung und den *hTERT*-Amplifikaten sieht man das Resultat eines Tests von *NANOG*-Promoter-Primern, der sichtlich fehlgeschlagen ist.

Für die zweite Reaktion der nested-PCR wurden 2 µl des im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnten Reaktionsgemischs der ersten PCR verwendet, dementsprechend wurden dem Ansatz 0,5 µl weniger Wasser beigelegt. Des Weiteren wurden für die zweite PCR-Reaktion die gleichen Bestandteile wie für die erste verwendet.

7.12 Klonierung per TA-Cloning

Das PCR-Produkt wurde umgehend per TA Cloning® Kit (Invitrogen) kloniert. Bei diesem Verfahren macht man sich zunutze, dass die meisten Taq-Polymerasen, bei der Elongation des neu entstehenden DNA-Stranges ein einzelnes überhängendes Adenin-Nukleotid hinterlassen. Spezielle Vektoren, die ein komplementäres, überhängendes Thymidin tragen, können diese Stelle zur Bindung nutzen. Diese Bindung wird anschließend durch eine Ligase gefestigt. Ligase, Vektor und Puffer sind aufeinander abgestimmt in dem Kit enthalten. Voraussetzung für die erfolgreiche Klonierung ist eine möglichst umgehende Verarbeitung des frisch amplifizierten PCR-Produktes. Begründet ist dies in der raschen Degradation der überhängenden DNA-Enden.

Als brisant erwies sich die Exzision der DNA aus dem Gel per Skalpell bei Identifizierung der Lage der DNA-Banden unter UV-Licht: Bestand die Exposition dieser Strahlung zu lange, ließen sich keine brauchbaren Sequenzen mehr generieren, da die DNA offenbar degradiert war. Schnelleres Arbeiten konnte nicht so genau erfolgen und führte zu größeren Gel-Blöcken. Diese mussten in mehreren Schritten in dem Auflösungspuffer gelöst und sukzessive auf die Säulen des Gel-Extraktionskits geladen werden.

Nach erfolgreicher Ligation ist der fertige, rekombinante Vektor wieder verhältnismäßig stabil und kann bei -20°C gelagert werden.

7.13 Transformation und Umgang mit Bakterien

Die mitgelieferten Top 10 F' E-coli-Zellen wurden mit den rekombinanten Plasmiden per Temperaturschock transformiert. Hier wurde exakt nach Herstellerangaben vorgefahren. Die Bakterien gelten nach der Transformation als gentechnisch veränderte Organismen, ihre Handhabung hat in einem Labor der Sicherheitsstufe 1 zu erfolgen.

Die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen wurden genau eingehalten. Insbesondere wurde ein Entweichen der Bakterien in die Umwelt konsequent verhindert.

Der Zwischenschritt über das Bakterium, das hier transformiert wird, ist zur Generierung von Ergebnissen über genomische Natriumbisulfit-Sequenzierung unabdingbar. Im Amplifikat sind konvertierte DNA-Moleküle verschiedener Zellen enthalten, die an den fraglichen Stellen unterschiedliche Methylierungsschemata aufweisen. Zur Sequenzierung ist aber gerade hier ein spezifisches Signal nötig, dass entweder einem Cytosin- oder einem Thymidin-Nukleotid zuzuordnen ist. Falls die Bakterien mehr als ein einzelnes Plasmid aufnehmen, unterdrücken sie die vielfache Transkription der anderen zugunsten eines einzelnen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass bei der Rückgewinnung des Plasmids aus einer Bakterienkolonie nur eine einzelne Sequenz in nennenswertem Umfang erhalten wird. Dies ist eine Voraussetzung, um ein klares Signal im Detektor des Sequenzers zu generieren.

Zur Identifikation von Bakterienkolonien, die ein erfolgreich rekombiniertes Plasmid tragen, wurden penicillinhaltige Nährböden verwendet. Hier sind ausschließlich die Bakterien zu wachsen imstande, die eines der Plasmide aufgenommen haben, unabhängig vom Vorhandensein eines Inserts. Weiter wurden die Kulturplatten mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) getränkt. Diese Substanz wird von β -Galactosidase hydrolysiert, eines der Reaktionsprodukte ist ein blauer Farbstoff.

Die Cloning Site, also die Aufnahmestelle für das Insert in den verwendeten Vektor, liegt innerhalb eines β -Galactosidase-Gens. Die Integration des Inserts in den Vektor unterbricht daher die Sequenz dieses Gens und verhindert die Expression des Enzyms. Wird ein Plasmid ohne Insert in das Bakterium aufgenommen, kommt es zur Expression funktionstüchtiger β -Galactosidase. Es resultiert die Blaufärbung der Kolonie in der Kulturschale. Die Kolonien, die hingegen aus Bakterien gebildet werden, die ein erfolgreich rekombiniertes Plasmid tragen, bleiben weiß. Sie eignen sich folglich zur Plasmidpräparation.

7.14 DNA-Minipreparationen

Es wurden jeweils 24 Kolonien mit Mikropipettenspitzen aufgenommen und in 2,5 ml Nährmedium in Falcon-Tubes inkubiert. Nach ca. 12 bis 16 Stunden wurden die bakteriengesättigten Lösungen zur Plasmidpräparation per Qiuagen Miniprep-Kit verwendet. Bei diesem Verfahren werden die nicht-DNA-Bestandteile der Bakterien abgeschieden und die DNA auf eine Säule geladen. Dort wird sie gereinigt und anschließend eluiert. Auch hier kam bei allen Schritten das Zentrifugationsverfahren zum Einsatz, es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Details können dem Manual des Herstellers entnommen werden.

7.15 Sequenzierung

Der Sequenzierungsvorgang erfolgte schließlich unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), verwendet gemäß Protokoll. Dabei wurde der M13-as primer als Sequenzierprimer verwendet.

Kern dieser Methode ist ein Kettenabbruch-Sequenzierverfahren unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Terminator-Nukleotiden. Der M13-antisense-Primer ist auf eine Bindestelle im Vektor abgestimmt. Bei der Synthese des komplementären DNA-Strangs kommt es durch den Einbau dieser chemisch modifizierten Nukleotide zum Ende der Elongation. Dabei wird gleichzeitig das Fragment mit einem dem Nukleotid entsprechenden Farbstoff markiert. Dieser kann beim abgestuften Durchlauf der Fragmente durch die Kapillare des Auswertungsgeräts sichtbar gemacht werden. Durch die sukzessive Detektion dieser Signale wird die Sequenz zusammengesetzt.

Entgegen aller anderen hier beschriebener Verfahren wurde die Arbeit mit dem Sequenziergerät nicht vom Autor dieser Arbeit durchgeführt. Hier wurde das finale Produkt mittels des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit aufbereitet. Die Platten mit dem Gemisch wurden nach Ablauf der Reaktion zentrifugiert und der Sequenzierabteilung des ITZ übergeben. Hier wurden sie freundlicherweise in das Sequenziergerät vom Typ DNA analyzer 3700 (Applied Biosystems) verbracht. Anschließend wurde die Sequenzen als Datensatz auf einen USB-Stick bereitgestellt. Die Auswertung erfolgte dann im Rahmen dieser Arbeit mittels der Programme ClustalW und Microsoft Word.

Die Einweisung in die geschilderten Verfahren, geschah durch die freundliche Unterstützung von PD. Dr. Simeon Santourlidis und Dr. Rui Neves, sowie den anderen Teilnehmern der von Prof. Dr. Uhrberg geleiteten NWG Uhrberg, denen der Autor an dieser Stelle für ihre Unterstützung dankt. Die praktische Arbeit im Labor erfolgte im Wesentlichen zwischen dem 17.03.2008 und dem 21.12.2009. Die Arbeiten wurden umfassend in einem Laborjournal dokumentiert. Weitere schriftliche Informationen, wie etwa die Bestellscheine der Primer, wurden ebenfalls archiviert.

7.16 Material und Verbrauchsgüter

Allgemeine Geräte und Verbrauchsgüter

Material	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH
Mikropipetten	Eppendorf
Mikropipetten: Pipetman	Gilson
Mikropipettenspitzen: Tip One	Starlab
Mikrowellenofen	CLATRONIC MWG 737
Pipettierhilfe: Pipetboy	INTEGRA Bioscience
RNase freies Wasser	Qiagen
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml: Steripette	Costar
Thermocycler: GeneAmpPCR System 9700 und 2700	Applied Biosystems
Vortex: VF2	Janke & Kunkel
Vortex: Reax top	Heidolph
Waage: GS max. 320g	Kern
Zentrifuge: Mikro 20	Hettich
Zentrifuge: RC 5B plus	Sorvall
Zentrifuge: Universal 30 RF	Hettich

RNA-Isolation

Material	Hersteller
β -Mercaptoethanol (99%)	Sigma
RNeasy Mini Kit	Qiagen

Reverse Transkription

Material	Hersteller
M-MLV reverse Transkriptase (200 U/ μ l) und 5x Puffer	Promega
Oligo (dT) 15 Primer (300 μ g/ml)	Promega

Real-time-PCR

Material	Hersteller
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Fermentas
Platten: Tubeplates mit 96 SoftTubes	Biozym
Plattendeckel: ultra clear strips	AB Gene
Thermo Cycler für Real-Time PCR: ABI Prism Sequence Detector7700	Applied Biosystems

Genomische DNA-Isolation

Material	Hersteller
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen

Natriumbisulfit-Konvertierung

Material	Hersteller
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen

PCR

Material	Hersteller
50 bp DNA Ladder	New England BioLabs
Agarose	PeqLab
dNTPs (10 mM)	PeqLab
Elektrophoresebad: Owl Separation Systems	Pharmacia Biotech
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Sigma
GelPilot 50bp Ladder	Qiagen
GelPilot 100bp Plus Ladder	Qiagen
HotStar Taq (5 U/μl) und 10 x Puffer	Qiagen
Stromquelle für Elektrophorese: PowerPack 300	BioRad
wide range Ladder	Invitrogen

Klonierung

Material	Hersteller
15ml PP-Röhrchen: BioOne	Greiner
Ampicillin	Sigma
Brutschrank	WTB Binder
Hitzeblock: HBT 130	HLC
Inkubator: Certomat H	Sartorius
LB Broth Base	Invitrogen
Select Agar	Invitrogen
Shaker: Certomat MO	Sartorius
SOC-Medium	Invitrogen
T4-DNA Ligase und 5x Puffer	Qiagen
TA Cloning Kit with pCR 2.1 Vector and One Shot TOP10F' Chemically Competent E. coli	Life Technologies
X-Gal	Sigma

Plasmidisolation

Material	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen

Sequenzierung

Material	Hersteller
Sequenziergerät: DNA Analyzer 3700	Applied Biosystems
Sequencing RR-100 BigDye Terminator und 5x Puffer	Applied Biosystems

8. Beschreibung der eigenen Leistung

8.1 Theoretische Vorarbeit und Nachbereitung der Experimente

Kurz nach meinem ersten Staatsexamen begann ich meine Dissertation am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika. Hier gewann ich Herrn Prof. Dr. Wernet als meinen Doktorvater. Er verschaffte mir die Möglichkeit zur Mitarbeit an einem kürzlich angelaufenen Projekt. Im Fokus dieser Arbeitsgruppe standen Experimente mit der USSC aus Nabelschnurblut. Dabei arbeitete ich in der Nachwuchswissenschaftlergruppe (NWG) Uhrberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Uhrberg. Von den hier beschäftigten Wissenschaftlern, erhielt ich stete Unterstützung, sowohl bei den praktischen Arbeiten, als auch bei der theoretischen Annäherung an den Forschungsgegenstand.

Als primärer Betreuer wurde mir Herr PD. Dr. Simeon Santourlidis zugewiesen. Er vermittelte mir in die wichtigsten theoretischen Aspekte des laufenden Projekts. Für die gesamte Dauer meiner Arbeit an der Dissertation, war Herr PD. Dr. Santourlidis mein primärer Ansprechpartner.

Nach einer gewissen Einarbeitungszeit trug ich aktiv zur Diskussion mit den anderen beteiligten Wissenschaftlern bei, tauschte Quellentexte aus und diskutierte meine Ergebnisse. So beteiligte ich mich an der Entstehung des theoretischen Überbaus der durchgeführten Arbeiten. In die Entscheidungen zur generellen Konzeption der Arbeit und die Planung der einzelnen Experimente, war ich auf diese Weise eingebunden.

8.2 Praktische Arbeiten

Alle in meiner Dissertation dargestellten Ergebnisse (mit Ausnahme der per Nimble-Gene erzeugten Globalanalyse (oberer Teil von **Abb. 4B** (A))) beruhen auf eigenständig durchgeführten Experimenten. Selbstverständlich führte ich die Vor- und Nachbereitung der Experimente persönlich durch.

Die Primer für die genannten PCR-Schritte entwarf ich nach Einweisung in das Programm (s.o.) selbstständig. Die Primer sowie alle weiteren wichtigen Proben, mit denen ich arbeitete, verwahrte und verwaltete ich in eigener Regie. Sämtliche hier beschriebenen PCR-Verfahren führte ich persönlich durch.

Wie beschrieben verwendete ich für einen Großteil der Experimente vorgefertigte Kits. Sämtliche notwendigen Pipettierschritte und das gesamte Verfahren, so wie es im Handbuch der verwendeten Kits beschrieben ist, wurden von mir persönlich durchgeführt.

Bei der real-time PCR nahm ich neben der Gestaltung der Primer auch alle praktischen Arbeiten vor. Die erhaltenen Daten trug ich in eine vom Institut vorgefertigte Excel Tabelle (Microsoft Excel) ein, die automatisch zur Visualisierung in Form der hier abgebildeten Balkendiagramme führte. Die letztendliche Ausgestaltung der Abbildung erfolgte mittels des Programms Powerpoint.

Bei der Natriumbisulfit-Konvertierung und anschließenden Sequenzierung, unter Einbeziehung aller Zwischenschritte wie der Klonierung, wurden alle Arbeiten von mir persönlich verrichtet. Die Sequenzen wurden mittels des Programms ClustalW zueinander in Bezug gesetzt. Mittels Microsoft Word visualisierte ich die Änderungen der Sequenz durch Natriumbisulfit-Konvertierung. Anschließend fertigte ich auf Basis dieser Daten die Grafiken an, die anhand von weißen und schwarzen Punkten den Methylierungszustand der CpG-Nukleotide anschaulich machen. Dies erfolgte mittels des Programms Microsoft Powerpoint.

Alle in dieser Dissertationsschrift gezeigten Powerpoint-Präsentationen fertigte ich selber an. Einzelne Stilelemente tauschte ich mit PD. Dr. Santourlidis aus, um für die Publikation (Santourlidis 2010) die bestmöglichen Resultate zu erhalten.

Meine Arbeit am Institut wurde durch die Erwähnung meines Namens in der Autorenliste der gemeinsamen Publikation (Santourlidis 2010), als deren Erstautor mein Betreuer fungierte, gewürdigt. Der Version meiner Dissertationsschrift, die den Referenten vorgelegt wird, liegt diese Publikation in gedruckter Form bei. Meine eigenen Leistungen sind darin farblich hervorgehoben.

9. Quellen

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008 Nov;26(11):1276-84.

Aktas, M., Buchheiser, A., Houben, A., Reimann, V., Radke, T., Jeltsch, K., Maier, P., Zeller, W.J, Kogler G., 2010. Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy.* 12 (3), 338-48.

Antequera, F., Boyes, J., Bird, A., 1990. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62 (3), 503-14.

Arasaradnam RP, Commane DM, Bradburn D, Mathers JC, A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Epigenetics.* 2008 Jul-Aug;3(4):193-8.

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126-40.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410 (6824), 120-4.

Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature.* 2000 May 25;405(6785):482-5.

Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16 (1), 6-21.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122 (6), 947-56.

Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol.* 2003 Mar;4(3):235-40.

Burton NO, Burkhart KB, Kennedy S. Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19683-8.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113 (5), 643-55.

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., Smith, A., 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450 (7173), 1230-4.

Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1106-17.

Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*. 2005 Mar;19(3):563-73.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011 May 15;25(10):1010-22.

Dejosez M, Zwaka TP. Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:737-65

Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res*. 2000 Feb 1;60(3):537-41.

Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 9;316(3):651-8.

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 1982 Apr 24;10(8):2709-21

Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocr Rev*. 1988 Nov;9(4):437-49.

Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lymar E, Farina A, Martinez E. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(23):10220-34.

Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett*. 2010 Sep 10;584(17):3826-30.

Gottschling D E in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Grossniklaus U und Paro R in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):77-88.

Guilleret, I., Benhattar, J., 2004. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 325 (3), 1037-43.

Guilleret, I., Yan, P., Grange, F., Braunschweig, R., Bosman, F.T., Benhattar, J., 2002. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer.* 101 (4), 335-41.

Han JW, Yoon YS. Epigenetic Landscape of Pluripotent Stem Cells. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Jul 15;17(2):205-23

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 2007 Dec 21;318(5858):1920-3.

Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature.* 2009 Dec 3;462(7273):595-601.

Hansen JC, Ghosh RP, Woodcock CL. Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life.* 2010 Oct;62(10):732-8.

Hattori, N., Imao, Y., Nishino, K., Hattori, N., Ohgane, J., Yagi, S., Tanaka, S., Shiota, K., 2007. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells* 12 (3), 387-96.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989 Jul;69(3):990-1047.

Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell.* 2005 May 6;121(3):465-77.

Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics.* 2006 Apr-Jun;1(2):76-80.

Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, Kim SJ, Park SW, Kwon HS, Lee CK, Lee JB, Kim JM, Ahn C, Paek SH, Chang SS, Koo JJ, Yoon HS, Hwang JH, Hwang YY, Park YS, Oh SK, Kim HS, Park JH, Moon SY, Schatten G. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science.* 2005 Jun 17;308(5729):1777-83.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of TGF-beta signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell.* 2009 Nov 6;5(5):491-503.

Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP. Orphan CpG islands identify numerous

conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* 2010 Sep 23;6(9). pii: e1001134.

JACOB F, MONOD J Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 1961 Jun;3:318-56.

Jaenisch R, Gurdon J in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics.* Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Jellinger KA. Rett Syndrome -- an update. *J Neural Transm.* 2003 Jun;110(6):681-701.

Jeltsch KS, Radke TF, Laufs S, Giordano FA, Allgayer H, Wenz F, Zeller WJ, Kögler G, Fruehauf S, Maier P. Unrestricted somatic stem cells: interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential. *Cytotherapy.* 2011 Mar;13(3):357-65.

Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293 (5532), 1074-80. Jenuwein und Allis 2001

Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 2009 Nov;10(11):805-11.

Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 2011 Jan 24;12(2):206-22. doi: 10.1002/cbic.201000195.

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 2008 Jul 31;454(7204):646-50.

Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell.* 2009 Feb 6;136(3):411-9.

Kingston R E und Tamkun J W in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics.* Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell.* 2005 Sep 2;19(5):667-78.

Kluth, Simone Maria, Buchheiser, Anja, Houben, Amelie Pia, Geyh, Stefanie, Krenz, Thomas, Radke, Teja Falk, Wiek, Constanze, Hanenberg, Helmut, Reinecke, Petra, Wernet, Peter and Kögler, Gesine. *Stem Cells and Development.* October 2010, 19(10): 1471-1483. doi:10.1089/scd.2010.0070.

Kögler, G., Callejas, J., Hakenberg, P., Enczmann, J., Adams, O., Daubener, W., Krempe, C., Gobel, U., Somville, T., Wernet, P., 1996. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. *J. Hematother.* 5 (2), 105-116.

Kögler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Müschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti, E.J., Almeida-Porada, G., Müller, H.W., Zanjani, E., Wernet, P., 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 200 (2), 123-35.

Kögler, G., Sensken, S., Wernet, P., 2006. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol.* 34 (11), 1589-95.

Koizumi M, Maeda H, Yoshimura K, Yamauchi T, Kawai T, Ogata E. Dissociation of bone formation markers in bone metastasis of prostate cancer. *Br J Cancer.* 1997;75(11):1601-4.

Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128 (4), 693-705.

Kriaucionis S, Bird A. DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R221-7.

Krueger WH, Swanson LC, Tanasijevic B, Rasmussen TP. Natural and artificial routes to pluripotency. *Int J Dev Biol.* 2010;54(11-12):1545-64.

Krueger F, Kreck B, Franke A, Andrews SR. DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nat Methods.* 2012 Jan 30;9(2):145-51.

Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* 2008 Aug;99(8):1528-38.

Landolin JM, Johnson DS, Trinklein ND, Aldred SF, Medina C, Shulha H, Weng Z, Myers RM. Sequence features that drive human promoter function and tissue specificity. *Genome Res.* 2010 Jul;20(7):890-8.

Li E und Bird A in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics.* Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* 1994 Oct 1;8(19):2282-92.

Mahmoodian F, Gosiewska A, Peterkofsky B. Regulation and properties of bone alkaline phosphatase during vitamin C deficiency in guinea pigs. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Dec 1;336(1):86-96.

Majewski IJ, Blewitt ME, de Graaf CA, McManus EJ, Bahlo M, Hilton AA, Hyland CD, Smyth GK, Corbin JE, Metcalf D, Alexander WS, Hilton DJ. Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity. *PLoS Biol.* 2008 Apr 15;6(4):e93.

Martienssen R und Moazed D in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., Ko, M.S., Niwa, H., . 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 9 (6), 625-35.

Mendenhall EM, Koche RP, Truong T, Zhou VW, Issac B, Chi AS, Ku M, Bernstein BE. GC-rich sequence elements recruit PRC2 in mammalian ES cells. *PLoS Genet.* 2010 Dec 9;6(12):e1001244.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007 Aug 2;448(7153):553-60.

Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature.* 2008 Jul 3;454(7200):49-55.

Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell.* 2008 Jun 20;30(6):755-66.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., Grewal, S.I., 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292 (5514), 110-3.

Nettersheim D, Biermann K, Gillis AJ, Steger K, Looijenga LH, Schorle H. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics.* 2011 Jan;6(1):114-22.

Noma, K., Allis, C.D., Grewal, S.I., 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293 (5532), 1150-5.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007 Jul 19;448(7151):313-7.

Okita K, Yamanaka S. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006 Jan;1(1):103-11.

Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 2002 Dec;12(5-6):321-9.

Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007 Jan;17(1):42-9.

Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2010 Sep;6(3):367-80.

Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., Zhang, Y., 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300 (5616), 131-5.

Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, Black JC, Hoffmann A, Carey M, Smale ST. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell.* 2009 Jul 10;138(1):114-28.

Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction.* 2004 Jun;127(6):643-51.

Santourlidis S, Wernet P, Ghanjati F, Graffmann N, Springer J, Kriegs C, Zhao X, Brands J, Araúzo-Bravo MJ, Neves R, Koezler G, Uhrberg M. Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes. *Stem Cell Res.* 2011 Jan;6(1):60-9.

Sauvageau M, Sauvageau G
Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance. *PLoS Biol.* 2008 Apr 29;6(4):e113.

Sikorska, M., Sandhu, J.K., Deb-Rinker, P., Jezierski, A., Leblanc, J., Charlebois, C., Ribocco-Lutkiewicz, M., Bani-Yaghoub, M., Walker, P.R., 2008. Epigenetic modifications of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation. *J Neurosci Res.* 86 (8), 1680-93.

Surani M A und Reik R in Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics.* Cold Spring Harbor Laboratory; Auflage: 1 (31. Oktober 2006). ISBN-10: 0879697245. ISBN-13: 978-087969724

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature.* 2001 Nov 15;414(6861):277-83.

Tang C, Weissman IL, Drukker M. The safety of embryonic stem cell therapy relies on teratoma removal. *Oncotarget.* 2012 Jan;3(1):7-8.

Tweedie S, Charlton J, Clark V, Bird A. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol.* 1997 Mar;17(3):1469-75.

Thomassin H, Flavin M, Espinás ML, Grange T. Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *EMBO J.* 2001 Apr 17;20(8):1974-83

Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.* 2003 May;13(5):868-74.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.

Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*. 2004 Jan 30;303(5658):672-6.

Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol*. 2009;53(2-3):245-57.

Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988 Sep;2(9):1136-43.

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):318-24.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells*. 2007 Spring;9(1):3-7.

Xie H, Wang M, de Andrade A, Bonaldo Mde F, Galat V, Arndt K, Rajaram V, Goldman S, Tomita T, Soares MB. Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res*. 2011 May;39(10):4099-108.

Yamaguchi T, Sugimoto T. Bone metabolism and fracture risk in type 2 diabetes mellitus [Review]. *Endocr J*. 2011;58(8):613-24.

Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*. 1995 Nov 1;9(21):2635-45.

Zaehres H, Kögler G, Arauzo-Bravo MJ, Bleidissel M, Santourlidis S, Weinhold S, Greber B, Kim JB, Buchheiser A, Liedtke S, Eilken HM, Graffmann N, Zhao X, Meyer J, Reinhardt P, Burr B, Waclawczyk S, Ortmeier C, Uhrberg M, Schöler HR, Cantz T, Wernet P. Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol*. 2010 Sep;38(9):809-18, 818.e1-2.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 May 8;4(5):381-4.

Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG.

hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):194-201.

Zwaka TP., What comes after iPS? *Nature Reports Stem Cells* Published online: 3 April 2008 | doi:10.1038/stemcells.2008.54

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wernet für die Überlassung des Themas, Herrn PD Dr. Simeon Santourlidis für die exzellente Betreuung.