

**Positionsklonierung des Locus für das  
Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS) und Untersuchung  
des Epsilon-Sarkoglykan-Gens (*SGCE*)  
auf genomische Prägung**

Monika Grabowski  
München, Januar 2004

**Positionsklonierung des Locus für das  
Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS) und Untersuchung  
des Epsilon-Sarkoglykan-Gens (*SGCE*)  
auf genomische Prägung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Monika Grabowski**

Januar 2004

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 5. März 2003 von Prof. Dr. Thomas Meitinger und PD Dr. Tim-Matthias Strom betreut.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

München, den 26.01.2004

.....

Monika Grabowski

Dissertation eingereicht am:	30.01.2004
1. Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Cremer
2. Gutachter:	Prof. Dr. Heinrich Leonhardt
Sondergutachter:	PD Dr. Tim-Matthias Strom
Tag der mündlichen Prüfung:	02.09.2004

**meinen Eltern und Großeltern**

Ohne Begeisterung  
schlafen die besten Kräfte  
unseres Gemüts.  
Es ist Zunder in uns,  
der Funken will.

Herder

1	Einleitung .....	1
1.1	Humangenom .....	1
1.2	Strategien zur Identifikation von Krankheitsgenen.....	1
1.3	Das Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS) .....	2
1.3.1	Klinisch-genetische Heterogenität .....	2
1.3.2	Klinik des MDS .....	3
1.3.3	Kopplung des MDS auf Chr. 7q21 .....	4
1.4	Epigenetik .....	5
1.4.1	Etablierung und Aufrechterhaltung der Methylierung .....	5
1.4.1.1	Die Methylierung von Cytosinen.....	5
1.4.1.2	DNA-Methyltransferasen .....	5
1.4.1.3	Methylierungsmuster im Lebenszyklus.....	6
1.4.2	Funktionen und Eigenschaften der Methylierung .....	7
1.4.2.1	Transkriptionelle Stilllegung.....	7
1.4.2.2	5-Methyl-Cytosin als Mutations-Hotspot.....	8
1.4.2.3	Genregulation und Gendosis.....	8
1.5	Prägung .....	9
1.5.1	Promotormethylierung als zellulärer Lesemechanismus .....	9
1.5.2	Bedeutung der genomischen Prägung .....	12
1.5.2.1	Entwicklung, Wachstum und Verhalten .....	12
1.5.2.2	Uniparentale Disomien (UPD) .....	12
1.5.2.3	Imprintingsyndrome .....	13
1.5.3	Nachweis der genomischen Prägung .....	15
1.5.3.1	Differentielle Methylierung .....	15
1.5.3.2	Untersuchung auf Expressionsebene.....	16
1.5.3.3	Chromatininformation .....	16
1.5.3.4	Asynchrone Replikation.....	17
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	18
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Patientenmaterial .....	19
2.2	Chemikalien und andere Materialien .....	19
2.3	Kits .....	20
2.4	Puffer und Lösungen.....	20
2.5	Zellkultur .....	21
2.5.1	Kultivierung .....	21
2.5.2	Zellen einfrieren .....	21

2.5.3	Zellen auftauen .....	21
2.6	Isolations- und Präparationstechniken für Nukleinsäuren.....	21
2.6.1	DNA Isolationstechniken.....	21
2.6.1.1	DNA-Isolation aus EDTA-Blut.....	22
2.6.1.2	DNA-Isolation aus lymphoblastoiden Zelllinien .....	22
2.6.1.3	DNA-Isolation aus Gewebeproben .....	22
2.6.2	RNA Isolationstechniken.....	22
2.6.2.1	RNA-Isolation mit dem TRIZOL-Protokoll.....	23
2.6.2.2	RNA-Isolation mit DNase-Behandlung .....	23
2.6.2.3	Reverse Transkription .....	23
2.7	Gelelektrophorese.....	24
2.8	Bisulfitbehandlung von DNA .....	24
2.9	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR).....	25
2.9.1	Standard-PCR .....	25
2.9.2	RT-PCR .....	25
2.9.3	<i>Nested</i> PCR.....	26
2.9.4	Multiplex PCR.....	26
2.9.5	5`- <i>RACE</i> -PCR.....	27
2.9.6	Bisulfit-PCR .....	28
2.9.7	Reinigung von PCR-Produkten.....	29
2.10	DNA-Sequenzierung .....	29
2.10.1	Sequenzreaktion.....	29
2.10.2	Sequenzfällung .....	30
2.10.3	Sequenzanalyse .....	30
2.11	Klonierung von PCR-Produkten .....	30
2.11.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	31
2.11.2	Ligation .....	31
2.11.3	Transformation.....	31
2.11.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien .....	32
2.11.5	Restriktionsspaltung von Plasmiden.....	32
2.12	Radioaktive Hybridisierung von Northern-Blots.....	32
2.12.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden .....	32
2.12.2	Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsbedingungen.....	33
2.13	Datenbanken und Computerprogramme.....	34
2.13.1	Datenbanken und allgemeine Internetseiten .....	34
2.13.2	Genomanalyse.....	34
2.13.3	Computerprogramme.....	35

3	Ergebnisse .....	36
3.1	Positionsklonierung des Locus für das MDS .....	36
3.1.1	Kopplungsuntersuchung .....	36
3.1.2	Suche nach Kandidatengenen für das MDS.....	36
3.1.3	Vervollständigung eines neuen Gens .....	38
3.1.4	Identifikation von Mutationen im Epsilon-Sarkoglykan-Gen ( <i>SGCE</i> ).....	38
3.1.5	Charakterisierung des <i>SGCE</i> -Gens.....	41
3.1.5.1	Genomische Struktur von <i>SGCE</i> .....	41
3.1.5.2	Klonierung und Kartierung von <i>SGCE</i> .....	41
3.1.5.3	<i>SGCE</i> codiert für das Protein Epsilon-Sarkoglykan .....	42
3.1.6	Northern-Blot von <i>SGCE</i> .....	43
3.2	Untersuchung des <i>SGCE</i> -Gens auf genomische Prägung.....	45
3.2.1	Vererbung des MDS .....	45
3.2.2	Methylierungsstatus im Promotorbereich von <i>SGCE</i> .....	46
3.2.2.1	Promotoranalyse .....	46
3.2.2.2	Polymorphismus-Screening im Promotorbereich von <i>SGCE</i> .....	46
3.2.2.3	Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs in verschiedenen Geweben.....	47
3.2.3	Untersuchungen monoallelischer Expression auf Chr. 7q21.3.....	51
3.2.3.1	Expressionsanalyse durch RT-PCR an UPD7 cDNAs .....	51
3.2.3.2	RT-PCR-Sequenzierung bei genomisch Heterozygoten .....	55
4	Diskussion.....	60
4.1	Die Sarkoglykan-Proteinfamilie .....	60
4.1.1	Homologie der Sarkoglykane.....	60
4.1.2	Sarkoglykankomplexe.....	63
4.2	Mutationen im <i>SGCE</i> -Gen verursachen das MDS.....	65
4.3	Untersuchungen auf genomische Prägung.....	67
4.3.1	Bewertung der Bisulfitsequenzierungsmethode .....	67
4.3.1.1	Artefakte und Fehler der Bisulfitumwandlung.....	67
4.3.1.2	PCR-Artefakte .....	68
4.3.2	<i>SGCE</i> weist eine maternal methylierte Promotorregion auf .....	70
4.3.3	Bewertung der Methoden der Expressionsanalyse .....	71
4.3.4	Paternale Expression von <i>SGCE</i> und <i>PEG10</i> .....	72
4.3.4.1	RT-PCR von <i>SGCE</i> und anderen Genen auf 7q21.3 in UPD7.....	72
4.3.4.2	Expressionsanalyse in Zelllinien mit Polymorphismus .....	72
4.3.4.3	Expressionsanalyse in heterozygoten <i>SGCE</i> -Mutationsträgern.....	72
4.3.4.4	Expression kann gewebespezifisch variieren.....	73
4.3.5	Prägungsstatus in der Maus und im Menschen.....	74

4.3.6	Transmission des MDS.....	76
4.3.7	Uniparentale Disomien von Chromosom 7 (UPD7) .....	77
5	Zusammenfassung.....	79
6	Literatur .....	81
7	Abkürzungsverzeichnis .....	94
8	Abbildungsverzeichnis .....	97
9	Tabellenverzeichnis .....	99
	Anhang .....	100
	Danksagung .....	108
	Lebenslauf.....	109
	Publikationsliste.....	110



# 1 Einleitung

## 1.1 Humangenom

Die etwa 3 Milliarden ( $3 \times 10^9$ ) Basenpaare, die das haploide menschliche Genom ausmachen, wurden bis zum Jahr 2000 von zwei konkurrierenden Arbeitsgruppen, Celera (Venter et al. 2001) und dem „*Human Genome Sequencing Consortium*“ (HGSC) (Lander et al. 2001) weitgehend sequenziert. Im April 2003 wurde vom HGSC bekanntgegeben, dass die Sequenz von 99 % der gencodierenden Regionen fertiggestellt wurde (UCSC Genome Browser). Das menschliche Genom besteht zu ca. 50 % aus repetitiver DNA, zu der transposon-abgeleitete Sequenzen, Pseudogene, einfache Sequenzwiederholungen und tandem-repetitive Sequenzen zählen. Obwohl ein Drittel des humanen Genoms transkribiert wird, enthält es weniger als 3 % protein-codierende Sequenzen (Lander et al. 2001). Von den geschätzten 28000 - 34000 protein-codierenden Genen sind etwa 26000 bereits bekannt, teils vollständig, und teils mit partieller, vorhergesagter Sequenz. Die Anzahl der menschlichen Gene wurde mit verschiedenen Methoden (Reassoziationskinetik, cDNA-Bibliotheken mit ESTs, Vergleich der DNA-Basensequenz vom Pufferfisch mit der des Menschen (Crollius et al. 2000; Crollius et al. 2002)) abgeschätzt und innerhalb der letzten Jahre immer weiter nach unten korrigiert (Lander et al. 2001). Der Mensch besitzt nach heutigem Kenntnisstand etwa doppelt so viele Gene wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster*. Bisher wurden etwa 1200 Gene, die in monogenen Erkrankungen mutiert sind (OMIM-Datenbank), mit Hilfe verschiedener Klonierungsstrategien (positionsunabhängige Kandidatengenverfahren und Positionsklonierungen) identifiziert. Die für monogene Erkrankungen eingesetzten Strategien eignen sich in gewissem Umfang auch für komplexe und multifaktorielle Krankheiten.

## 1.2 Strategien zur Identifikation von Krankheitsgenen

Um Krankheitsgene monogener, aber auch komplexer und multifaktorieller Erkrankungen zu isolieren, bieten sich verschiedene Klonierungsstrategien an.

Genaue Kenntnisse von der Pathophysiologie und Biochemie einer Erkrankung lieferten die Grundlage für die ersten Identifizierungen von Krankheitsgenen über funktionelle Klonierung (z. B. Phenylketonurie und Sichelzellanämie) (Collins 1995). Unterschiede in aufgereinigten Genprodukten von Patienten und Kontrollpersonen stellten die Ausgangssituation dar. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des aufgereinigten Proteins und mit Hilfe daraus resultierender degenerierter Oligonukleotide oder spezifischer Antikörper konnte das zugrundeliegende Gen aus cDNA bzw. cDNA-Expressionsbibliotheken isoliert werden. Neben veränderten Proteinen können auch Funktionstests und Komplementationsversuche Hinweise auf involvierte Proteine bzw. Gene liefern.

In einem anderen positionsunabhängigen Ansatz stehen Kandidatengene in einem vermuteten Zusammenhang mit einer genetisch bedingten Erkrankung. Gene werden aufgrund von charakteristischen Expressionsmustern oder Funktionen, aufgrund von Tiermodellen, die einem menschlichen Krankheitsbild ähneln (vergleichende Genetik) oder aufgrund von Homologien zu Genen, die bereits beim Menschen mit einer ähnlichen Krankheit in Verbindung stehen, zu Kandidatengenen.

Erfolgt die Identifikation eines Krankheitsgens über die Zuordnung zu einer chromosomalen Position durch die Beobachtung, dass die Krankheit mit genetischen Markern co-segregiert, so wird von positioneller Klonierung gesprochen. Die Grobkartierung erfolgt durch Kopplungsanalysen in betroffenen Familien mit Hilfe von polymorphen Markern, mit denen die Lokalisation des Krankheitslocus auf mehrere Megabasen oder Kilobasen eingegrenzt werden kann. Auch Patienten mit Translokationen oder Deletionen können Hinweise auf die Genlokalisierung geben.

Nachdem aus dem humanen Genomprojekt die annähernd vollständige Nukleotidsequenz des menschlichen Genoms zur Verfügung steht, lassen sich in einem durch Kopplungsanalysen eingegrenzten Bereich neben bereits bekannten Genen neue Kandidatengene mit Hilfe von Sequenz- und Genvorhersageprogrammen identifizieren, die in einem nachfolgenden Mutationsscreening überprüft werden. Dieses Vorgehen, die Kombination aus genetischer Kopplung in Verbindung mit einer Transkript- bzw. Genkarte des Menschen ist gegenwärtig die bevorzugte Methode zur Klonierung von monogenen Krankheitsgenen (Collins 1995).

### **1.3 Das Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS)**

#### **1.3.1 Klinisch-genetische Heterogenität**

Ein Myoklonus ("myo" Muskel, "clonus" Zuckung) ist eine plötzliche, schockartige, unwillkürliche Bewegung. Er wird durch spontane elektrische Entladungen aus dem Zentralnervensystem aktiviert, die über die peripheren Nerven weitergegeben werden und eine plötzliche Muskelkontraktion verursachen. Klassifiziert wird der Myoklonus als fokal (isoliert), segmental oder generalisiert, wenn der gesamte Körper betroffen ist (Fahn et al. 1991).

Eine Dystonie beschreibt den unnatürlichen Spannungszustand („tonus“) eines Muskels. Die dadurch entstehenden Muskelkontraktionen verursachen eine verdrehte oder abnormale Haltung. Sie können fokal z. B. nur Augenlider, Gesicht, Hals, Stimmbänder, Rumpf oder Arme betreffen, oder generalisiert auftreten.

Dystonien bilden eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Bewegungsstörungen. Verschiedene Loci wurden für erbliche Formen von Dystonien kartiert. Bisher konnten drei mutierte Gene identifiziert werden (Tab. 1-1): das Torsin A codierende Gen *DYT1* in der früh

auftretenden generalisierten Torsionsdystonie auf Chr. 9q34 (Ozelius et al. 1997), das Gen der GTP-Cyclohydrolase I (*GCH1*) in der dominanten dopa-responsiven Dystonie (DYT5) auf Chr. 14q22 (Ichinose et al. 1994) und das Gen für die Tyrosinhydroxylase (*TH*) in der rezessiven dopa-responsiven Dystonie auf Chr. 11p15.5 (Ludecke et al. 1995). Weitere Kandidatenregionen wurden auf Chr. 4p12 - 13, 5q31.1 - 31.3, 6q14 - 21 und 15q11 - 13, auf Chr. 19q13 für den früh einsetzenden Dystonie-Parkinsonismus (RPD) und auf Chr. Xq21 für die X-gekoppelte Torsionsdystonie (XLTD) beschrieben (Gasser et al. 1996).

Genprodukt	Locus	Erkrankung
Torsin A	9q34	früh auftretende generalisierte Torsionsdystonie (DYT1)
GTP-Cyclohydrolase I	14q22	dominante dopa-responsive Dystonie (DYT5)
Tyrosinhydroxylase	11p15.5	rezessive dopa-responsive Dystonie
?	19q13	früh einsetzender Dystonie-Parkinsonismus (RPD)
?	Xq21	X-gekoppelte Torsionsdystonie (XLTD)
?	4p12 - 13	Dystonie
?	5q31.1 - 31.3	Dystonie
?	15q11 - 13	Dystonie
?	6q14 - 21	Dystonie
Epsilon Sarkoglykan (in dieser Arbeit)	7q21.3	Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS)

**Tab. 1-1: Locusheterogenität der Dystonien.** Auflistung von bekannten mutierten Genen und Kandidatenbereichen für verschiedene Formen der Dystonie (Gasser et al. 1996).

### 1.3.2 Klinik des MDS

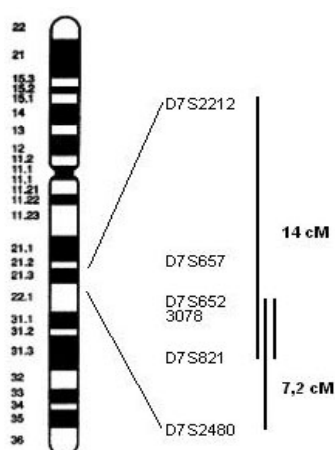
Im Jahre 1933 wurde von Lindenmulder der „familiäre essentielle Myoklonus“ als eine Kombination aus Dystonie und einem unwillkürlichen, „blitzartig“ schnellen Myoklonus definiert (Lindenmulder 1933). Diese Erkrankung ist heute als „hereditärer Myoklonus mit essentieller Dystonie“ oder Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS oder DYT11; OMIM 159900) bekannt. Das MDS ist eine seltene, nicht-degenerative neurologische Erkrankung. Der Phänotyp dieser Bewegungsstörung setzt sich aus einer variablen Kombination von Myoklonus und/oder Dystonie zusammen. MDS Patienten weisen bilaterale, alkoholsensitive myoklonische Zuckungen auf, die vor allem in den Armen und axialen Muskeln (Schulter-, Hals- und Rumpf-Muskeln) auftreten (Quinn et al. 1988; Gasser 1998). Die dystonischen Zustände, vor allem *Torticollis spasmodicus* (spastischer Schiefhals) und/oder Schreibkrampf treten bei vielen, aber nicht allen Patienten auf, und können gelegentlich das einzige Symptom des MDS sein (Kurlan et al. 1988; Gasser et al. 1996). Einige Patienten zeigen psychiatrische Auffälligkeiten wie Panikattacken und Angst- oder Zwangsneurosen (Kyllerman et al. 1990; Klein et al. 1999; Doheny et al. 2000). Es liegen keine anderen Zeichen oder Symptome neurologischer Fehlfunktionen vor. Muskelkraft und

Sinneswahrnehmungen sind normal. Magnetresonanzbilder des Gehirns sind unauffällig, ebenso wie elektrophysiologische Untersuchungen und die Nervenreizleitungsgeschwindigkeit (Lundemo et al. 1985).

Der Krankheitsbeginn des MDS liegt zwischen 18 Monaten und 18 Jahren und hat meist einen gutartigen Krankheitsverlauf. Die Symptome stabilisieren sich nach einigen Jahren mit periodischen Fluktuationen und können sogar spontan zurückgehen (Remission). Die myoklonischen Zuckungen, die typischerweise responsiv auf Alkohol sind, werden durch Aufregung oder Stress verstärkt und reduzieren sich im Ruhezustand und im Schlaf. Die Linderung der Symptome bei Einnahme von Alkohol ist dosisabhängig und zeigt einen Gewöhnungseffekt. Meist schlägt eine medikamentöse Behandlung mit Clonazepam an. In der Behandlung werden auch Benzotropine, Neuroleptika und Dopamin-Agonisten eingesetzt.

### 1.3.3 Kopplung des MDS auf Chr. 7q21

Das MDS wurde von Nygaard et al. durch eine genomweite Kopplungsuntersuchung in einer Familie auf Chr. 7q21 - q31 in einen Bereich von 28 cM kartiert (Nygaard et al. 1999). Kopplungsanalysen mit polymorphen CA-Repeat-Markern in vier Familien ergaben eine Kopplung in eine Region von 7,2 cM zwischen den Markern D7S652 und D7S2480 (Asmus et al. 2001). Diese Untersuchung ergab einen Multipoint-LOD-Score von 5,99 für die Region Chr. 7q21. Im Laufe dieser Dissertation erschien eine Publikation, in der die Kopplung des MDS in vier anderen Familien in ein Intervall von 14 cM zwischen den Markern D7S2212 und D7S821 beschrieben wurde (Klein et al. 2000b). Der überlappende Bereich der beiden letzten Kopplungsanalysen von 3,2 Mb wurde für diese Arbeit als Krankheitslocus definiert (Abb. 1-1) und für eine Identifikation des krankheitsverursachenden Gens untersucht.



**Abb. 1-1: Kopplung des MDS auf Chr. 7q21.3-22.1 durch Multipoint-LOD-Score-Analysen in ein Intervall von 14 bzw. 7,2 cM. Der sich überschneidende Bereich zwischen den Markern D7S652 und D7S821 wurde als Krankheitslocus definiert.**

Eine auf Chr. 11q23 liegende Dopamin D2 Rezeptor-Mutation, die von Klein et al. (1999) in einer Familie als mit dem MDS assoziiert beschrieben wurde, konnte in allen sechs Indexpatienten durch Sequenzierung ausgeschlossen werden. Auch in der Literatur konnte diese Mutation nicht als krankheitsverursachend für das MDS bestätigt werden (Klein et al. 2000a; Grimes et al. 2001; Klein et al. 2002).

## 1.4 Epigenetik

An die Identifizierung eines krankheitsverursachenden Gens schließen sich üblicherweise funktionelle Studien an, um das Gen in einen Wirkungszusammenhang zu stellen. Neben genetischen Faktoren (Promotoren, Enhancer, Silencer und Transkriptionsfaktoren) können auch epigenetische Modifikationen die Regulation der Genexpression beeinflussen.

Unter Epigenetik versteht man den klonal vererbaren Einfluss auf Chromosomen oder Genfunktionen, der nicht von einer Veränderung der DNA-Basensequenz begleitet wird (Li 2002). Die beiden bekanntesten epigenetischen Modifikationen sind die Positionseffekte von Heterochromatin („*Position Effect Variegation*“) und die genomische Prägung durch DNA-Methylierung („*Genomic Imprinting*“) (Li 2002). In weiblichen Säugetieren findet die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen durch epigenetische Effekte statt (Heard et al. 1997; Avner et al. 2001).

### 1.4.1 Etablierung und Aufrechterhaltung der Methylierung

#### 1.4.1.1 Die Methylierung von Cytosinen

Säugetiere besitzen die Möglichkeit, ihr Genom epigenetisch durch die kovalente Bindung einer Methylgruppe an den Kohlenstoff C-5 eines Cytosinrings zu modifizieren. Die Cytosin-Methylierung erfolgt in Vertebraten vorwiegend symmetrisch an beiden DNA-Strängen des 5'-CpG-3'-Palindroms (Gruenbaum et al. 1982; Bestor et al. 1983; Alberts et al. 1994). Im menschlichen Genom sind etwa 70 - 80 % der CpG-Dinukleotide (CpGs) methyliert, das entspricht ~ 3 % aller Cytosine im Genom (Ehrlich et al. 1982).

#### 1.4.1.2 DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) durch kovalente Addition einer Methylgruppe an das Kohlenstoffatom C-5 der Base Cytosin durchgeführt (Abb. 1-3, S. 8) (Reik et al. 2001). Als Methylgruppendonor für DNMTs dient das S-Adenosyl-L-Methionin (Alberts et al. 1994). Bisher sind die DNMTs 1, 2, 3A, 3B und 3L bekannt.

Für die *de novo* Methylierung, d. h. die Etablierung der Cytosin-Methylierung sind DNMT3A und 3B notwendig (Okano et al. 1998a).

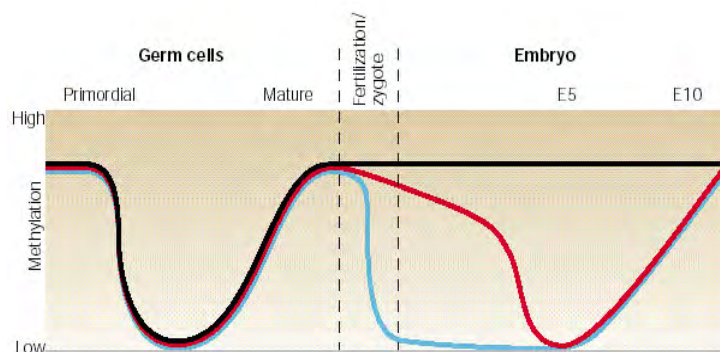
Die DNA-Methyltransferase DNMT1 ist für die Aufrechterhaltung der Cytosin-Methylierung zwischen den Zellgenerationen zuständig. Nach der Replikation der DNA kopiert DNMT1 das Methylierungsmuster hemi-methylierter DNA auf den neu synthetisierten Strang und sorgt für eine stabile Weitergabe des Methylierungsmusters an die Tochterzellen (Leonhardt et al. 1992; Chuang et al. 1997). In der S-Phase liegt DNMT1 an Stellen der Replikation mit dem Proteinkomplex der Replikationsmaschinerie assoziiert vor (Leonhardt et al. 1992; Cardoso et al. 1997; Chuang et al. 1997).

Für DNMT2 und 3L wurde in Säugern noch keine Methylierungsaktivität nachgewiesen (Okano et al. 1998b). Es gibt Hinweise dafür, dass Dnmt3L in der Maus essentiell für die Etablierung der genomischen Prägung ist, und während der Oogenese eine Rolle bei der *de novo* Methylierung von Einzelkopiesequenzen in differentiell methylierten Regionen spielt (Bourc'his et al. 2001).

Die DNA-Methylierung ist reversibel. Eine passive Demethylierung tritt auf, wenn das vorhandene Methylierungsmuster nach der Replikation von DNMT1 nicht aufrecht erhalten werden kann (Cardoso et al. 1999). Über die aktive enzymatische Demethylierung von 5-Methyl-Cytosin (5mC) ist wenig bekannt. Von Fremont et al. (1997) wurde eine 5-Methyl-Cytosin-DNA-Glykosylaseaktivität beobachtet. Die spezifische Entfernung von Methylgruppen in Form von Methanol durch ein Polypeptid, das ein Methyl-CpG-bindendes Motiv enthält, wird diskutiert (Bhattacharya et al. 1999; Cedar et al. 1999).

#### 1.4.1.3 Methylierungsmuster im Lebenszyklus

Eizelle und Spermium tragen verschiedene, geschlechtsspezifische Methylierungs- und Prägungsmuster zur Zygote bei. Nach der Fertilisation ereignen sich Remodifikationsprozesse der Methylierung, von der die Methylierung geprägter Gene ausgeschlossen bleibt (Abb. 1-2).



**Abb. 1-2: Methylierungs-Reprogrammierung** unterschiedlicher Sequenzen auf der horizontalen Zeitachse aus Reik und Walter (2001). Die gesamte genomische Methylierung und Prägung wird in der Keimbahn gelöscht und neu etabliert. Das Methylierungsmuster geprägter Gene liegt geschlechtsspezifisch unterschiedlich vor (methyliert schwarze Linie, unmethyliert graue Linie). Nach der Fertilisation findet eine generelle Demethylierung (des paternalen Genoms in blau aktiv, des maternalen Genoms in rot passiv) und darauffolgend eine *de novo* Methylierung statt. Von dieser Reprogrammierung sind geprägte Gene ausgeschlossen.

In der Zygote findet eine aktive Demethylierung des paternalen Genoms und eine passive Demethylierung des maternalen Genoms statt (Mayer et al. 2000). Nach der Implantation erfolgt eine *de novo* Methylierung des Genoms (Reik et al. 2001).

Von der *de novo* Methylierung der epigenetischen Reprogrammierung nach der Befruchtung sind CpG-Inseln autosomaler Haushaltsgene und geprägte Gene ausgeschlossen (Kafri et al. 1992; Razin et al. 1995). Möglicherweise schützen spezifische Chromatin- oder Sequenzeigenschaften bestimmte Regionen vor der Demethylierung und *de novo* Methylierung in der Zygote (Cross et al. 1995; Constanica et al. 1998).

Die DNA-Methylierungsmuster und die elterlichen Prägungsmuster werden in den somatischen Zellen des sich entwickelnden Organismus weitgehend beibehalten. DNMT1 colokalisiert während der S-Phase mit Regionen der Replikation und dient dem Erhalt von Methylierungen, indem es nach der Replikation das Methylierungsmuster der hemimethylierten DNA ergänzt (Leonhardt et al. 1992; Cardoso et al. 1997; Bachman et al. 2001) (Kap. 1.4.1.2).

In der Keimbahn wird zur Erstellung einer eigenen, geschlechtsspezifischen Prägung das elterliche Prägungsmuster umgeprägt. Dazu findet in der embryonalen Keimbahn eine genomweite Demethylierung statt, wenn die Keimzellen in die Genitalleiste einwandern, durch die die parentale Prägung vollständig gelöscht wird (Howlett et al. 1991; Brandeis et al. 1993; Tada et al. 1998; Hajkova et al. 2002). Bei der Maus geschieht das zwischen dem Tag 12 und 13 nach der Befruchtung (Mayer et al. 2000; Hajkova et al. 2002). Die neue, geschlechtsspezifische Prägung wird über eine *de novo* Methylierung in späteren Entwicklungsstadien etabliert (Abb. 1-2) (Brandeis et al. 1993).

## **1.4.2 Funktionen und Eigenschaften der Methylierung**

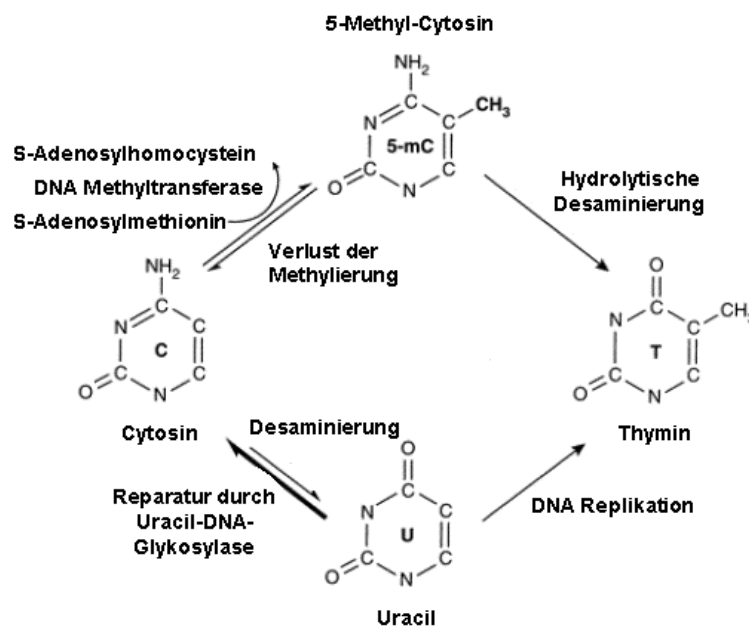
### **1.4.2.1 Transkriptionelle Stilllegung**

Vor über 20 Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression entdeckt. 1979 führten Taylor und Jones (1979) Experimente in Mauszelllinien mit dem Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin durch und zeigten, dass Gene im methylierten Zustand stillgelegt werden (Kap. 1.5.1), und dass diese Stilllegung von Genen reversibel ist, wenn die Methylierung verloren geht.

Die Methylierung von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden führt zu einer Stilllegung von Fremd-DNA wie Transposons und retroviraler DNA, die im Säugergenom akkumuliert sind („*Genome Defense System*“) (Yoder et al. 1997; Walsh et al. 1998). Die meisten CpGs, die im Säugergenom methyliert sind, liegen in diesen „parasitären“ DNA-Elementen oder Retrotransposons. Die Suppression der Expression und Aktivität von Retrotransposons grenzt ihre Ausbreitung im Genom ein und schützt so die Genomintegrität (Yoder et al. 1997). Nach Auffassung von Bird (1995) führt die Aktivität vieler Transposonpromotoren zu einem hohen Pegel an „*transcriptional noise*“, der die eigentliche Genexpression stört. Durch die DNA-Methylierung der Transposons wird diese störende Transkription unterdrückt.

### 1.4.2.2 5-Methyl-Cytosin als Mutations-Hotspot

Die Base Cytosin kann spontan zu Uracil desaminiert werden, das in der nächsten Replikation als Thymin gelesen wird (Abb. 1-3). Das Reparatursystem der Zelle erkennt Uracil in der DNA sehr effektiv und behebt den Fehler mit Hilfe der Uracil-DNA-Glykosylase (Jones et al. 1992). Die Desaminierung von 5-Methyl-Cytosin bildet die Base Thymin, die auch in der DNA vorkommt. Eine solche Basenfehlpaarung wird nur ineffizient durch die Thymin-DNA-Glykosylase detektiert und behoben (Jiricny 1996). Methylierte CpG-Dinukleotide neigen aufgrund der ineffektiven Reparatur bei Desaminierung zu einer Transition nach TpG und stellen Mutations-Hotspots dar. Diese Transitionen sind an ca. 30 % aller krankheitsverursachenden Punktmutationen in der Keimbahn beteiligt und sind für viele somatische Mutationen verantwortlich, die zur Krebsentstehung führen können (Cooper et al. 1988; Rideout et al. 1990; Jones et al. 1992). Wegen der häufigen Transition methylierter Cytosine nach Thymin sind CpG-Dinukleotide im Säuger genom mit einem statistischen Vorkommen von 1 : 60 - im Vergleich zu einem errechneten statistischen Verhältnis von 1 : 16 wie es beispielsweise in Bakterien vorliegt - unterrepräsentiert (Cooper et al. 1989).



**Abb. 1-3: Mögliche Transitionen von Cytosin.** Der Übergang von Cytosin nach Thymin kann über die Desaminierung von 5-Methyl-Cytosin geschehen, oder über Desaminierung von Cytosin nach Uracil, das in einer nachfolgenden DNA-Replikation als Thymin gelesen wird.

### 1.4.2.3 Genregulation und Gendosis

Die Cytosin-Methylierung reguliert als epigenetische Modifikation die Genexpression und stellt den bekanntesten Mechanismus der Prägung dar. Bei der genomischen Prägung bewirkt die Methylierung nur eines Alleles eine selektive, monoallelische Genexpression, die



für bestimmte Gewebe zu bestimmten Entwicklungsphasen spezifisch sein kann. Die differentielle Methylierung und damit die Stilllegung eines Allels ist abhängig davon, ob das Allel vom Vater oder von der Mutter vererbt wurde. Die unterschiedliche mütterliche bzw. väterliche Prägung der Allele geschieht in der Keimbahn und wird durch die Gameten dem Embryo weitergegeben (Kap. 1.4.1.3).

## **1.5 Prägung**

Die genomische Prägung spielt eine Rolle in Entwicklung und Wachstum und bewirkt eine differentielle Expression von paternalem und maternalem Allel. Etwa 50 Gene sind nach dem momentanen Kenntnisstand (<http://cancer.otago.ac.nz/IGC/Web/home.html>) im Menschen geprägt. Aufgrund von Imprintingdefekten, Phänotypen uniparental-disomer Mäuse und Subtraktionsbibliotheken wird vermutet, dass im Genom etwa 100 bis 200 Loci der genomischen Prägung unterliegen könnten (Hayashizaki et al. 1994; Blagitko et al. 2000).

### **1.5.1 Promotormethylierung als zellulärer Lesemechanismus**

Der Markierungsmechanismus der genomischen Prägung ist die differentielle Methylierung von DNA, über die die Expression geprägter Gene reguliert wird. Die Umsetzung des DNA-Methylierungssignals auf Transkriptionsebene geschieht in der Zelle über verschiedene „Lesemechanismen“. Eine Übersicht geben Jaenisch und Bird (2003) und Reik und Walter (2001).

Ein weitverbreiteter Mechanismus zur transkriptionellen Stilllegung eines Allels ist die Promotormethylierung geprägter Gene (Abb. 1-4 A, S. 10). Methyliert werden einzelne CpG-Dinukleotide oder ganze CpG-Inseln, die von der Promotorregion bis in das erste Exon und Intron 1 des geprägten Gens hinein lokalisiert sein können (Constancia et al. 1998).

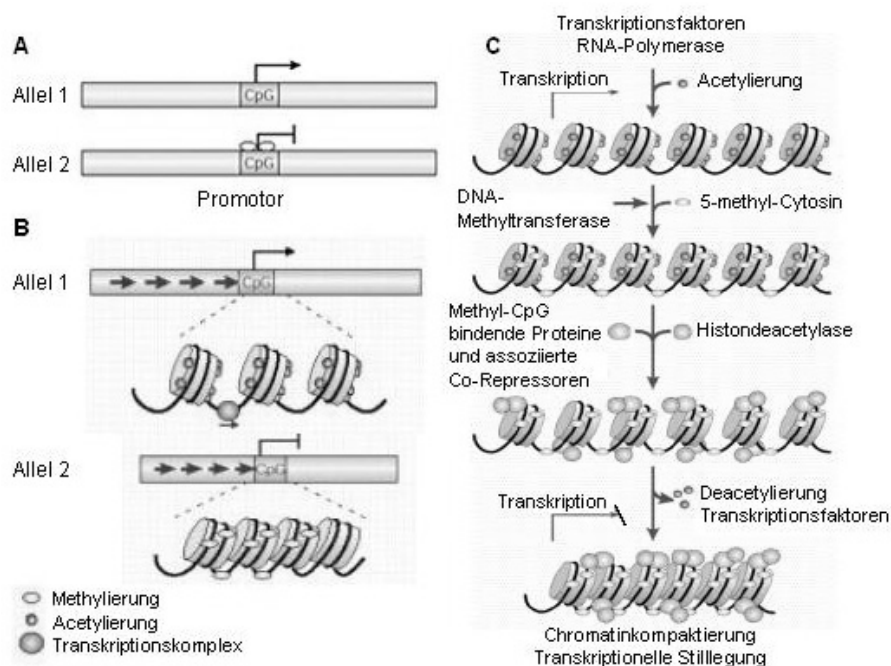
Als CpG-Inseln werden DNA-Abschnitte von 0,2 - 5 kb mit einem GC-Gehalt von mindestens 50 % und einer signifikanten Häufung von CpG-Dinukleotiden (>30 CpG/ 500 Nukleotide) definiert (Gardiner-Garden et al. 1987; Antequera et al. 1993). Sie sind häufig am 5'-Ende von Säuger-Genen in deren Promotorregion lokalisiert (Larsen et al. 1992). Alle Haushaltsgene, nahezu alle geprägten Gene und 40 % der Gene mit spezifischer Expression weisen CpG-Inseln auf (Larsen et al. 1992; Reik et al. 2001). CpG-Inseln sind im Gegensatz zu anderweitig im Genom vorkommenden CpG-Dinukleotiden meist unmethyliert (Gardiner-Garden et al. 1987). Ausnahmen bilden die CpG-Inseln auf dem inaktiven X-Chromosom, die differentiell methylierten Regionen (DMRs) geprägter Gene und veränderte Methylierungsmuster in Tumoren und gewebespezifischen Genen.

Die Chromatinstruktur ist dynamisch und kann durch Prozesse wie DNA-Methylierung, Histon(de)acetylierung, Histonmethylierung, Methyl-CpG-bindende Proteine und ATP-

abhängige, chromatin-umformende Proteinkomplexe verändert werden („*Chromatin-Remodelling*“) (Li 2002; Narlikar et al. 2002).

Unmethylierte, transkriptionell aktive DNA bildet eine „offene“ Chromatinstruktur aus, deren Nukleosomen acetylierte Histone H3 und H4 enthalten (Abb. 1-4 A, B, C Allel 1/oben) (Grandjean et al. 2001; Gregory et al. 2001).

Zur epigenetischen Stilllegung werden Cytosine in CpG-Dinukleotiden von DNA-Methyltransferasen methyliert. Diese Methylierung kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren blockieren, oder über Schritte der Chromatinumformung eine transkriptionelle Stilllegung bewirken. Methylierte DNA wird von Methyl-CpG-bindenden Protein-Komplexen und Co-Repressoren gebunden, die bereits selbst eine Chromatinkondensation bewirken und zudem Histondeacetylasen rekrutieren können. Histondeacetylasen entfernen die Acetylreste am N-terminalen Ende der Histone H3 und H4 und ermöglichen eine sterisch dichter-gepackte Chromatininformation, die unzugänglich für Transkriptionsfaktoren ist und die Genexpression unterdrückt (Abb. 1-4 C) (Jeppesen et al. 1993). (Kass et al. 1997).

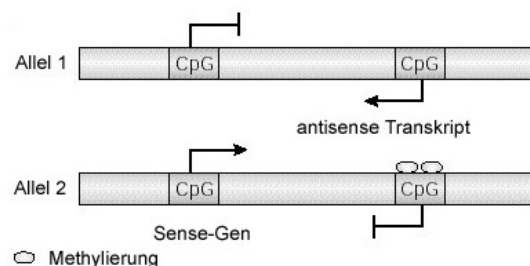


**Abb. 1-4: Promotormethylierung und Chromatin-Remodelling.** A) Die Promotormethylierung blockiert die Transkription des Gens auf Allel 2 (Reik et al. 2001). B) Auf dem transkriptionell aktiven Allel 1 liegt eine offene Chromatininformation vor, während auf dem methylierten Allel 2 die Transkription durch eine komprimierte Chromatinstruktur unterdrückt wird (Reik et al. 2001). C) Zu einer kompakten Chromatinstruktur und transkriptionellen Stilllegung tragen neben der DNA-Methylierung auch die Histondeacetylierung und die Bindung Methyl-CpG-bindender Proteine sowie Co-Repressoren bei (Robertson et al. 2000).

Histone können an ihrem aminoterminalen Ende durch die H3-K9 Histonmethyltransferase methyliert werden (Rea et al. 2000). Die Histonmethylierung dient als Bindungssignal für das Heterochromatinprotein 1 (HP1) und bewirkt in Verbindung mit einer DNA-Methylierung und Histondeacetylierung im Chromatin eine längerfristige Stilllegung (Bachman et al. 2001; Burgers et al. 2002).

Es existieren weitere „Lesemechanismen“ zur Umsetzung der genomischen Prägung in der Zelle. Dabei ist die Methylierung einer differentiell methylierten Region nicht immer mit einer transkriptionellen Stilllegung von Genen dieses Allels assoziiert. Etwa 15 % der geprägten Gene werden über ihre *Antisense*-Transkripte reguliert, die der genomischen Prägung unterliegen (Reik et al. 2001). Die *Antisense*-RNA ist entgegengesetzt zur Transkription des *Sense*-Gens orientiert, hat ihren Ursprung in Introns von *Sense*-Genen und kann auch mit dessen Promotor überlappen (Lee et al. 1999; Smilnich et al. 1999; Lyle et al. 2000). *Antisense*-Transkripte sind nicht-codierende RNAs, denen eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird (Reik et al. 2001). Die komplementären *Sense*- und *Antisense*-Transkripte hybridisieren zu doppelsträngiger RNA und destabilisieren sich (Sleutels et al. 2002). Nach der „*Silencing-Hypothese*“ verhindert das *Antisense*-Transkript auf dem unmethylierten Allel die Expression des überlappenden *Sense*-Gens über posttranskriptionelle RNA-Interferenz (Reik et al. 1997a; Hammond et al. 2001; Reik et al. 2001; Sleutels et al. 2002) (Abb. 1-5 Allel 1).

Die Stilllegung des *Antisense*-Transkripts erfolgt über Methylierung von CpG-Dinukleotiden in dessen Promotorregion und ermöglicht die Expression des *Sense*-Gens auf dem methylierten Allel (Abb. 1-5, Allel 2).



**Abb. 1-5: Geprägte Antisense-Transkripte**, modifiziert nach Reik und Walter (2001), regulieren die Genexpression: Im unmethylierten Zustand ist das Antisense-Transkript, das mit dem Sense-Gen überlappt, aktiv und bildet mit dem Sense-Transkript eine doppelsträngige RNA. Über RNA-Interferenz wird die Expression des Sense-Gens verhindert. Durch Methylierung und Stilllegung des Antisense-Transkripts auf Allel 2 wird das Sense-Gens exprimiert.

In Abhängigkeit vom Methylierungszustand der DNA können verschiedene genkontrollierende Faktoren (Transkriptionsfaktoren, Enhancer, Repressoren, Methyl-CpG-bindende Proteine) binden und mit dem Promotor oder der Transkriptionsmaschinerie interagieren (Drewell et al. 2000; Reik et al. 2001; Drewell et al. 2002). Durch

Grenzelemente, das sind DNA-Sequenzen, die zwischen zwei genkontrollierenden Elementen (Promotor und Enhancer oder Repressor) liegen, kann deren Kommunikation oder Interaktion verhindern werden (Reik et al. 2001). Die Funktion der Grenzelemente wird durch die Bindung spezifischer Faktoren, z. B. des Faktors CTCF (CCCTC Bindefaktor, Zinkfingerprotein) an die unmethylierte DNA vermittelt (Bell et al. 2000; Hark et al. 2000; Kanduri et al. 2000; Szabo et al. 2000).

## **1.5.2 Bedeutung der genomischen Prägung**

Geprägte Gene spielen eine wichtige Rolle in Entwicklung, Wachstum und Verhalten. Eine von der Norm abweichende Expression geprägter Gene kann zu Erbkrankheiten und Imprintingsyndromen sowie einer Reihe von Tumorerkrankungen führen. Fehlerhafte oder unausgeglichene Prägungs- und Expressionsmuster geprägter Gene können durch uniparentale Disomien (UPD), Deletionen, Duplikationen, Mutationen und durch Defekte bei der Auslöschung, Etablierung und Erhaltung der Methylierung zustandekommen.

### **1.5.2.1 Entwicklung, Wachstum und Verhalten**

Maternales und paternales Genom werden gemeinsam für ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung benötigt, da sie funktionell nicht äquivalent sind. In Säugern wurde das Phänomen der Prägung 1984 mit der Beobachtung entdeckt, dass sich parthenogenetische Embryonen nicht normal entwickeln (Surani et al. 1984). Daraus ergibt sich der Zwang zur sexuellen Fortpflanzung (Jaenisch 1997).

Die normale menschliche Entwicklung benötigt ein Zusammenspiel von Genexpressionen in spezifischen Geweben in engen Zeitrahmen (Jaenisch 1997). Durch Prägung kann die Gendosis reguliert werden, und entwicklungs- und gewebespezifisch eine differentielle Expression von elterlichen Allelen stattfinden (Strachan et al. 1996). Die Genexpression wird von genetischen und epigenetischen Faktoren kontrolliert.

Eine fehlerhafte Prägung kann Entwicklung, Wachstum und Verhalten stören (Cattanach et al. 1985; Hurst et al. 1997). Imprintingdefekte beeinflussen auch die Gehirnentwicklung und -funktion, und können zu neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie Autismus, Epilepsie und Schizophrenie beitragen (Isles et al. 2000).

### **1.5.2.2 Uniparentale Disomien (UPD)**

Ein Kind erbt normalerweise ein Chromosom von der Mutter, und das andere vom Vater. Bei der uniparentalen Disomie (UPD) werden beide Chromosomen eines Chromosomenpaares ausschließlich von der Mutter oder vom Vater vererbt (maternale UPD bzw. paternale UPD) (Engel 1980).

Die häufigste Ursache für eine UPD sind chromosomale Segregationsfehler („Nondisjunction“) während der ersten oder zweiten Meioseteilung (Kotzot 1999).

Entstehungsmechanismen von UPD sind die Gametenkomplementation und Postfertilisierungsfehler (Spence et al. 1988; Robinson 2000).

Bei uniparentalen Disomien ist die Expression geprägter Gene gestört, und es kann zu Störungen in Wachstum, Entwicklung und Verhalten und im Extremfall zum Tod des Embryos kommen (Tilghman 1999). Mausexperimente mit uniparentalen Disomien von Cattanaach und Kirk (1985) brachten erste Erkenntnisse über die Auswirkungen von UPD auf die Entwicklung.

### 1.5.2.3 Imprintingsyndrome

Auf Chr. 15q11 - q13 liegt eine Ansammlung unterschiedlich geprägter Gene, die bei Störungen zu zwei verschiedenen Syndromen, zum Angelman-Syndrom (AS) bzw. zum Prader-Willi-Syndrom (PWS) führen (Nicholls et al. 1998).

Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (OMIM 176270) zeigen neonatal einen niedrigen Muskeltonus („*Floppy Baby*“) und dadurch bedingte Ernährungsprobleme, in späterer Kindheit Hyperphagie, die Adipositas bewirkt, Kleinwüchsigkeit, mäßig ausgeprägte geistige Behinderung und Hypogonadismus (Prader et al. 1956). Das PWS kommt in 1:10000 - 15000 Geburten vor, dabei sind die Ursachen in 70 % der Fälle Deletionen, bei 25 % eine maternale UPD15 und bei ca. 1 % Methylierungsdefekte (Zeschknig et al. 1997). Es wird angenommen, dass verschiedene paternal exprimierte Gene am PWS beteiligt sein können (Mann et al. 1999). Mikrodeletionen führten zu den Kandidatengenen *SNRPN* („*Small Ribonucleoprotein N*“), das zur gewebespezifischen Prozessierung von mRNA beiträgt, seinem bicistronischen Partner *SNURF* („*SNRPN Upstream Reading Frame*“) und dem Necdin-Gen *NDN*. In der Kandidatenregion von PWS liegen zudem das protein-codierende Gen *ZNF127* (Zinkfinger 127) und fünf paternal exprimierte Transkriptionseinheiten: *IPW*, *PAR 1* und *5*, *PARSN* und *ZNF127AS* (Buiting et al. 1995; Saitoh et al. 1997; Nicholls et al. 1998).

Das Angelman-Syndrom (OMIM 105830) erscheint als schwere motorische und geistige Behinderung mit fehlender Sprachentwicklung, Mikrozephalie, Wachstumsstörungen, Hyperaktivität, Krämpfen, heller Pigmentierung, unkontrollierten Bewegungen, ataktischem Gang und inadäquaten Lachanfällen, und war früher als „*Happy Puppet*“-Syndrom bekannt (Angelman 1965). Das AS tritt in 1:20000 Geburten auf, wobei in 70 % der Fälle Deletionen vorliegen, in 20 % Genmutationen, in 4 % Methylierungsdefekte oder Imprintingmutationen und in 2 % eine paternale UPD15 identifiziert wurde (Kishino et al. 1997). Beim AS wurde ein Funktionsdefekt des maternal exprimierten Gens Ubiquitin-Protein-Ligase 3A (*UBE3A/E6-AP*) entdeckt, das bei der Protein-Degradierung und Prozessierung eine Rolle spielt (Kishino et al. 1997; Matsuura et al. 1997). An der Regulation von *UBE3A* könnten andere Gene direkt oder indirekt beteiligt sein (Saitoh et al. 1997; Mann et al. 1999).

Die Chromosomenregion 11p15.5 umfasst weitere der Prägung unterliegende Gene. Epigenetische Veränderungen, Mutationen oder eine paternale UPD 11 werden im Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS; OMIM 130650) gefunden (Reik et al. 1997b; Engel et al. 2000; Maher et al. 2000). Die klinischen Merkmale des BWS sind prä- und postnatales übermäßiges Wachstum (übergroße Zunge, Eingeweidenübergröße), Hemihypertrophie, urogenitale Anomalien, erhöhtes Risiko für bestimmte Tumoren und geistige Behinderung (Elliott et al. 1994). Die Genetik von BWS ist komplex. Bei familiären Fällen wurden in 40 % der Fälle Mutationen im Gen *CDKN1C* (cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1C) gefunden, während in sporadischen Fällen vor allem eine paternale UPD 11p15.5 oder ein Verlust der Prägung von *IGF2* oder anderer geprägter Gene beobachtet wurde (Engel et al. 2000; Maher et al. 2000). In einigen BWS-Patienten fehlte die Methylierung in einer differentiell methylierten Region im Gen *KCNQ1* auf Chr. 11p15.5, das für einen spannungsgesteuerten Kaliumkanal codiert (Smilnich et al. 1999; Engel et al. 2000).

Das Silver-Russel-Syndrom (SRS; OMIM 180860) umfasst prä- und postnatale Wachstumsstörungen und Dysmorphiezeichen, vor allem eine laterale Asymmetrie und Kleinwüchsigkeit. Die Manifestation der typischen SRS-Charakteristika schwankt enorm zwischen den einzelnen Patienten. In etwa 10 % der SRS-Patienten wurde eine maternale UPD 7 diagnostiziert (Kotzot et al. 1995), was auf eines oder mehrere geprägte Gene auf Chromosom 7 schließen lässt. Die molekulare Etiologie des SRS ist noch unklar. Es wird vermutet, dass das SRS entweder durch eine fehlende paternale Expression eines wachstumsfördernden Gens hervorgerufen wird, oder durch einen Überschuss eines maternal exprimierten wachstumshemmenden Gens (Hannula et al. 2001a). Sowohl die Region 17q23 - 24, als auch die Bereiche 7p11.2 - 13 und 7q31 - qter sind Kandidatenregionen für SRS, in denen als mögliche Kandidatengene geprägte wachstumsregulierende Gene vermutet werden (Hitchins et al. 2001).

Die erbliche Osteodystrophie Albright (AHO; OMIM 300800) ist eine autosomal dominante Störung, die durch Kleinwüchsigkeit, Adipositas, Kurzfingerigkeit, subkutane Verknöcherungen und geistige Behinderung gekennzeichnet wird. Mutationen im gewebespezifisch paternal geprägten Gen *GNAS1* („*Guanine Nucleotide-binding Protein alpha-stimulating Activity Polypeptide 1*“) auf Chr. 20q13.2 verursachen die hormonresistente Form der AHO, den Pseudohypoparathyroidismus Typ 1a (Germain-Lee et al. 2002).

Transienter neonataler Diabetes mellitus (TNDM; OMIM 601410) ist ebenfalls ein Imprintingsyndrom und äußert sich in intrauteriner Wachstumsretardierung, Dehydrierung und Insulinmangel. Einige Patienten weisen eine paternale UPD in der Region von Chr. 6q24 auf, in welcher eine differentiell methylierte Region und mindestens zwei geprägte Gene *HYMAI* und *ZAC* lokalisiert sind (Arima et al. 2001).

## 1.5.3 Nachweis der genomischen Prägung

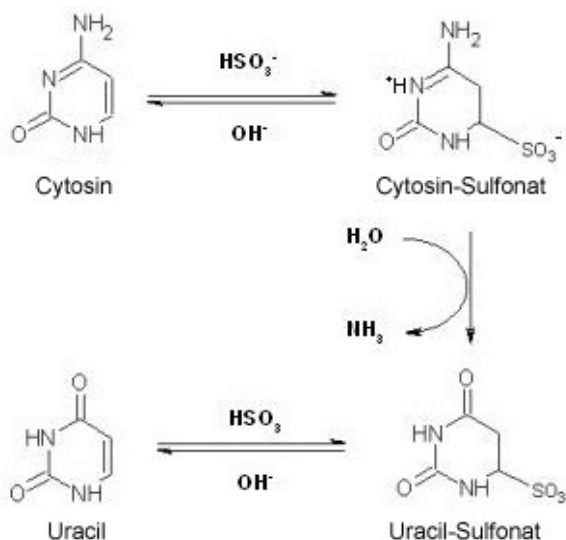
### 1.5.3.1 Differentielle Methylierung

Methylierungsuntersuchungen werden oftmals zur Identifizierung neuer oder zur Bestätigung vermuteter geprägter Gene eingesetzt (Kelsey et al. 1998). Geprägte Gene besitzen differentiell methylierte Regionen (DMRs), die ein unterschiedliches Methylierungsmuster zwischen paternalem und maternalem Allel aufweisen. DMRs bestehen meistens aus CpG-reichen Sequenzen oder CpG-Inseln und sind oft mit tandem-repetitiven Elementen assoziiert (Constancia et al. 1998).

Der Nachweis differentiell methylierter CpG-Dinukleotide kann über einen Verdau mit methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen und Detektion der Fragmente vorgenommen werden (Kawai et al. 1993; Lisitsyn et al. 1993; Hayashizaki et al. 1994; Peters et al. 1999).

Eine andere Methode ist die genomische Bisulfitsequenzierung, bei der genomische DNA selektiv chemisch umgewandelt und anschließend sequenziert wird (Frommer et al. 1992; Feil et al. 1994a; Grunau et al. 2001). Mit der Bisulfitsequenzierung können alle CpG-Dinukleotide in einer Sequenz auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht werden. Natriumbisulfit desaminiert alle unmethylierten Cytosine und wandelt sie in Uracile um (Abb. 1-6) (Frommer et al. 1992; Feil et al. 1994a; Hayatsu 1996; Grunau et al. 2001).

Die DNA wird dazu alkalisch denaturiert, dann findet unter Inkubation mit Natriumbisulfit eine reversible Addition des Bisulfitions an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings statt. Es entsteht Cytosin-Sulfonat, das durch hydrolytische Desaminierung weiter in Uracil-Sulfonat umgewandelt wird (Abb. 1-6, Schritt 2). Im alkalischen Schritt werden die modifizierten Basen (Uracil-Sulfonate) zu Uracil desulfoniert. Dann wird die Reaktion neutralisiert. Alle unmethylierten Cytosine werden durch chemische Umwandlung in Uracile konvertiert. Bei methylierten Cytosinen erfolgt der nukleophile Angriff durch das Bisulfitanion nicht oder nur sehr langsam, und die 5mC bleiben unverändert.



**Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Bisulfitbehandlung von DNA, leicht verändert nach (Hayatsu 1996):**

1. Addition des Bisulfitions an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings.
2. Cytosin-Sulfonat wird durch hydrolytische Desaminierung in Uracil-Sulfonat umgewandelt.
3. Uracil-Sulfonat wird im alkalischen Schritt zu Uracil desulfoniert.

Die modifizierte, bisulfitbehandelte DNA wird in einem anschließenden PCR-Ansatz amplifiziert. Das PCR-Produkt kann direkt sequenziert oder vorher subkloniert werden. In der Sequenzanalyse der Bisulfitfragmente erscheinen alle unmethylierten Cytosine der nativen DNA als Thymine, während die methylierten Cytosine in der Sequenz als Cytosine erhalten bleiben (Frommer et al. 1992).

Bei der genomischen Bisulfitsequenzierung von DMRs werden methylierte und unmethylierte Allele erhalten. Zur Unterscheidung der maternalen und paternalen Allele können DNAs verwendet werden, die eine Sequenzvariante mit bekanntem parentalem Ursprung im untersuchten DNA-Abschnitt vorweisen. Außerdem ist bei der Verwendung von DNA-Material mit uniparentaler Herkunft beispielsweise eines Chromosoms (maternale und paternale UPD) die elterliche Herkunft der untersuchten Allele gesichert.

### 1.5.3.2 Untersuchung auf Expressionsebene

Die genomische Prägung bewirkt eine monoallelische, differentielle Expression abhängig vom elterlichen Ursprung und kann auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Zum Nachweis stehen vergleichende und allelspezifische, quantitative oder qualitative Expressionsanalysen zur Verfügung (Kelsey et al. 1998). Der Vergleich von cDNAs parthenogenetischer oder uniparentaler Embryonen oder Zelllinien mit normaler cDNA zeigt Expressionsunterschiede auf (Kaneko-Ishino et al. 1995; Mizuno et al. 2002). Eine elternspezifische Expression lässt sich nachweisen, wenn die parentalen Allele durch eine Sequenzvariante in der cDNA unterschieden und der elterlichen Herkunft zugeordnet werden können. Dazu eignet sich die PCR-Amplifikation von cDNAs (RT-PCR), an die sich eine Sequenzierung zur Detektion der Allele anschließt.

### 1.5.3.3 Chromatininformation

Die ständig sich ändernde Chromatinstruktur und Chromatinzugänglichkeit („*Chromatin-Remodelling*“) spielt eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Genen *in vivo* (Kap. 1.5.1). Ein ATP-abhängiger Proteinkomplex (*Chromatin Accessibility Complex* „CHRAC“) steuert die Nukleosomenbewegung entlang der DNA und verändert die Histon-DNA-Interaktion (Becker 2002; Eberharter et al. 2002). Die Chromatinkonformation wird außerdem durch DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und verschiedene Proteine verändert (Li 2002; Narlikar et al. 2002).

Transkriptionell aktive DNA-Abschnitte zeigen eine „offene“ Chromatinstruktur, deren Nukleosomen acetylierte Histone enthalten (Abb. 1-4, S. 10). Diese chromosomalen Regionen sind zugänglicher für Transkriptionsfaktoren und Desoxyribonuklease 1 (DNase I - hyper-sensitive Stellen) (Reik et al. 2001). Die unterschiedliche Sensitivität der Allele geprägter Gene für DNase I spiegelt über die Chromatinstruktur den Transkriptionsstatus wider. Mit einer differentiell methylierten DNA-Region geprägter Gene ist oft eine



allelspezifisch unterschiedliche Histonacetylierung assoziiert (Lau et al. 2001). Zusammen mit einer DNA-Methylierung kann die Histondeacetylierung über eine sterisch engere Chromatininformation die transkriptionelle Stilllegung von Genen bewirken (Kass et al. 1997; Grandjean et al. 2001; Gregory et al. 2001).

Die Histonacetylierung kann mit der Chromatin-Immunopräzipitation („ChIP“) nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Antikörpern gegen acetylierte Histone werden Chromatinfragmente mit Histonacetylierung vom übrigen Chromatin getrennt und mit PCR-Techniken detektiert (Orlando et al. 1997).

#### 1.5.3.4 Asynchrone Replikation

Die Replikation von DNA in der S-Phase geschieht nicht gleichzeitig an allen Stellen des Genoms oder eines Chromosoms, sondern wird eingeteilt in transkriptionell aktives, frühreplizierendes und hochkondensiertes, spätreplizierendes Chromatin (Alberts et al. 1994).

In weiblichen Säugern ist das aktive X-Chromosom frühreplizierend, und das inaktive, methylierte X-Chromosom spätreplizierend (Kitsberg et al. 1993). Auch in geprägten Regionen wurde beobachtet, dass die DNA asynchron in der S-Phase des Zellzyklus repliziert wird. In Chromosomenregionen, in denen maternal und paternal exprimierte Gene vermischt liegen (z. B. in der PWS/AS-Region), wird das paternale Allel generell früher repliziert als das maternale (Kitsberg et al. 1993; Knoll et al. 1994).

Experimentell können die Replikationszeitpunkte mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Interphasekernen untersucht werden. Durch eine BrdU-Markierung wachsender Zellen und mit fluoreszenzmarkierten Sonden für die geprägten genomischen Regionen ist in Interphasekernen die asynchrone Replikation als ein einzelnes und ein doppeltes Hybridisierungssignal zu beobachten.

## **1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Das Ziel der Arbeit bestand darin, anhand molekulargenetischer Untersuchungen das krankheitsverursachende Gen für das Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS) in den vorliegenden MDS-Familien zu identifizieren.

Außerdem sollte die Vererbung dieses Gens und die molekularen Ursachen seiner allelspezifischen Expression analysiert werden, um einen Beitrag zur Erforschung der genetischen Ursachen des MDS zu leisten.

Mit einem positionellen Klonierungsansatz sollte das krankheitsverursachende Gen für das MDS identifiziert werden. Kopplungsanalysen des MDS auf Chr. 7q21 - 22 waren dafür eine wesentliche Voraussetzung. In der Kandidatenregion sollten mit Hilfe eines Annotationsprogramms bekannte und neue Gene identifiziert und eine vollständige Transkriptkarte von diesem Bereich erstellt werden. Neu vorhergesagte Gene mussten experimentell verifiziert und vervollständigt werden. Eine Mutationsanalyse der identifizierten Kandidatengene für das MDS sollte vorgenommen werden.

Die Vererbung des MDS erfolgte nach einem dominanten Erbschema, das jedoch keine vollständige Penetranz besitzt. Familienstammbaumanalysen zeigten, dass die Transmission der Erkrankung abhängig vom Geschlecht des krankheitsübertragenden Elternteils ist. Daher sollte eine mögliche genomische Prägung des in MDS-Patienten mutierten Gens in genomischer DNA und auf transkriptioneller Ebene untersucht werden.

Die differentielle Methylierung von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden ist ein epigenetischer Mechanismus zur Prägung von Genen und kann der Identifizierung geprägter Gene dienen. Die Etablierung der genomischen Bisulfitsequenzierung war die Voraussetzung, um den Methylierungsstatus von CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich von *SGCE* in Lymphoblasten und Gehirngewebe zu analysieren.

Die maternale Prägung des *SGCE*-Gens sollte auf Expressionsebene verifiziert werden. Eine monoallelische Expression des *SGCE*-Gens wurde in cDNA von genomisch heterozygoten *SGCE*-Mutationsträgern untersucht. Die differentielle Expression der elterlichen Allele sollte in cDNAs uniparentaler Disomien von Chromosom 7 überprüft werden. Da einige geprägte Gene physikalisch gekoppelt vorliegen, wurden benachbarte Gene auf monoallelische Expression analysiert.

Um einen besseren Einblick in die Vererbung des MDS zu bekommen, sollte der Fall einer maternalen Transmission näher untersucht werden, der im Widerspruch zu einer maternalen Prägung des Krankheitsgens steht.

## 2 Material und Methoden

Die Mehrheit der hier in Kurzform dargestellten Standardmethoden und -lösungen sind detailliert in Sambrook et al. (1989) beschrieben.

### 2.1 Patientenmaterial

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Patientenmaterial wurde entweder im Rahmen der genetischen Diagnostik und Beratung der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern aus Kliniken und Praxen zugesandt, oder stammte aus der DNA-Datenbank der Abteilung Medizinische Genetik, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München. Von einigen Patientenblutproben wurden lymphoblastoide Zelllinien etabliert. EBV-transformierte lymphoblastoide UPD7 Zellen aus Zelllinien wurden vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt (Blagitko et al. 2000). Aus der „German Brain Bank“ (<http://www.brain-net>) waren Gehirn-DNA-Proben und Gehirngewebe verfügbar.

### 2.2 Chemikalien und andere Materialien

Anorganische und organische Grundchemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad „p.a.“ und wurden vor allem von den Firmen Sigma und Merck sowie den angegebenen Firmen bezogen. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, New England Biolabs und Stratagene bezogen und nach Vorschrift eingesetzt. T4 DNA-Ligase und DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) stammten von der Firma Boehringer Mannheim.

<b><u>Produkt</u></b>	<b><u>Firma</u></b>
β-Mercaptoethanol	Merck
Dextransulfat	Amersham Biosciences
DMSO	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Eisessig (100 % Essigsäure)	Merck
Ethanol absolut (99,8 %)	Merck
Ethanol vergällt (96 %)	Warenlager der GSF Neuherberg
Hefeextrakt	Fluka BioChemika
Humane cot-1-DNA	Gibco BRL
Hydrochinon	Sigma
LiChrosolv-H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumbisulfit Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Sigma
Natronlauge NaOH	Merck

PBS	Gibco BRL bzw. PAA
POP6-Matrix für Sequenzierautomaten	Applied Biosystems
Puffer für Sequenzierautomaten	Applied Biosystems
Salzsäure (32 % HCl)	Merck
Sephadex G50	Amersham Biosciences
Tri-Natrium-Citrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Tris	USB

### 2.3 Kits

Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech
<i>First-strand</i> cDNA Synthese Kit	Amersham Biosciences
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
RNase-free DNase Set	QIAGEN
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN
Rapid-Ligation Kit (pGEM-T-Vektorsystem)	Promega
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems
Marathon Ready <i>RACE</i> PCR Kit	Clontech

### 2.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardlösungen nach Sambrook et al. (1989) mit bidestilliertem Wasser angesetzt und je nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Danach wurde gegebenenfalls der pH-Wert eingestellt.

Häufig verwendete Standardlösungen sind: DTT (Dithiothreitol) (1 M), EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0), Salzsäure (1 M HCl), Kaliumchlorid-Lösung (1 M KCl), Magnesiumchlorid-Lösung (1 M  $\text{MgCl}_2$ ), MOPS-Puffer (pH 7,0), Natriumacetat (3 M NaOAc, pH 5 - 5,4), Natriumchlorid-Lösung (5 M NaCl), Natronlauge (10 M NaOH), 10x PBS, 20 % SDS, 20x SSC, 10x TBE (pH 8), 1x TE-Puffer (pH 7,2; 7,4 oder 8) und Tris-HCl (1 M).

Spezielle Lösungen und Puffer sind in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils aufgeführt.

## **2.5 Zellkultur**

Die Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinien erfolgte durch Transformation von Leukozyten mit Epstein-Barr-Virus (EBV) nach einem modifizierten Protokoll von Neitzel (1986).

### **2.5.1 Kultivierung**

Zellkultur-Medium: RPMI 1640 mit Glutamax (PAA Laboratories), 10 % FCS (PAA Laboratories) und ca. 1 % Penicillin/Streptomycin (ca. 100 U/ml EK; Gibco BRL)

Lymphoblastoide Zelllinien wurden in Zellkultur-Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 80 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig vom Zellwachstum erfolgte in Abständen von 1 - 3 Tagen eine Zugabe von Medium oder später ein Austausch von Medium durch Zentrifugation der Zellsuspension (2 min bei 1000 U/min) und Resuspension des Zellpellets in frischem Medium.

### **2.5.2 Zellen einfrieren**

Einfriermedium: 10 ml RPMI 1640 mit Glutamax (PAA Laboratories), 20 % FCS (PAA Laboratories), 20 % DMSO sterilfiltriert

Nach Anreicherung der Zellen in einer großen Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) wurden diese 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert, das Zellpellet in 500 µl Zellkultur-Medium resuspendiert, in ein Kryotube übergeführt und mit 500 µl Einfriermedium vermischt. Zuerst wurden die Zellen bei -70°C bis zu einer Woche in einer Styroporbox gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert wurden.

### **2.5.3 Zellen auftauen**

Die Reaktivierung eingefrorener Zellen erfolgte durch rasches Auftauen bei 37°C, Waschen der Zellen mit 10 ml warmem Zellkultur-Medium oder PBS (5 min bei 1200 U/min) und Resuspension in 2 ml Zellkultur-Medium. Die Zellen wurden zuerst in Kulturflaschen von 25 cm<sup>2</sup> ausgesät, und später in größere Kulturflaschen von 75 - 125 cm<sup>2</sup> übergeführt.

## **2.6 Isolations- und Präparationstechniken für Nukleinsäuren**

### **2.6.1 DNA Isolationstechniken**

Die bereitgestellte DNA aus der genetischen Beratungsstelle und Diagnostik der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern und der Abteilung Medizinische Genetik, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde aus EDTA-Vollblut nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988) aus peripheren Blutleukozyten isoliert.

Die Isolation von DNA aus lymphoblastoiden Zelllinien oder Gewebe wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) nach den Protokollen des Herstellers (speziell für Blut oder Gewebeprobe) durchgeführt.

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte eine Extinktionsmessung bei 260 nm ( $1OD_{260}$  entspricht 50 µg DNA/ml). Die Reinheit wurde über das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gemessen und lag im Bereich von 1,7 - 1,9.

#### 2.6.1.1 DNA-Isolation aus EDTA-Blut

Lyse-Puffer: 155 mM  $NH_4Cl$ , 10 mM  $KHCO_3$ , 0,1 mM EDTA, pH7,4

SE-Puffer: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0 mit NaOH

5 - 10 ml EDTA-Blut wurden mit 40 - 45 ml Lyse-Puffer vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und bei 1500 U/min 10 min bei 7°C zentrifugiert. Das Pellet kernhaltiger Zellen wurde in 5 ml SE-Puffer nach Zugabe von 25 µl Pronase E (Sigma; 20 mg/ml) und 250 µl SDS (20 %) üN bei 37°C proteolytisch aufgeschlossen. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von 2 - 3 ml 5 M NaCl, intensives Vortexen und Zentrifugation bei 2500 U/min für 15 min bei RT. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die darin enthaltene DNA mit 2 Vol. Ethanol absolut gefällt. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol und Trocknung wurde die DNA in 100 - 1000 µl TE-Puffer (pH 8) gelöst.

#### 2.6.1.2 DNA-Isolation aus lymphoblastoiden Zelllinien

Unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN) wurden bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen aus lymphoblastoiden Zelllinien in PBS mit Proteinase K (QIAGEN) und RNase A in AL-Puffer bei 56°C für 10 min lysiert. Nach Zugabe von Ethanol wurde die Probe auf die QIAamp DNA Mini Säule aufgebracht, mit den Puffern AW-1 und AW-2 gewaschen, die DNA trocken zentrifugiert und mit  $ddH_2O$  von der Membran eluiert. Es wurden etwa 6 - 30 µg DNA isoliert.

#### 2.6.1.3 DNA-Isolation aus Gewebeprobe

25 mg Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert und in Puffer ATL mit Proteinase K (QIAGEN) bei 56°C im Schüttelinkubator üN lysiert. Es erfolgte eine RNase A-Inkubation für 2 min bei RT und nach Zugabe von AL-Puffer eine Inkubation für 10 min bei 70°C. Die Probe wurde mit Ethanol gemischt, auf die QIAamp DNA Mini Säule aufgebracht und mit den Puffern AW-1 und AW-2 gewaschen. Danach wurde die DNA trocken zentrifugiert und mit  $ddH_2O$  von der Membran eluiert. Aus 25 mg Gehirngewebe wurden 6 - 10 µg DNA isoliert.

### 2.6.2 RNA Isolationstechniken

DEPC  $H_2O$ : 0,01 % (v/v) DEPC-Lösung aus Diethylpyrocarbonat (97 %, Roth) in  $dH_2O$ , autoklaviert

Allgemeine Vorschriften für das Arbeiten mit RNA finden sich in Sambrook et al. (1989). Alle verwendeten Substanzen und Lösungen müssen RNase-frei sein.

Zur Beurteilung der RNA-Qualität und -Quantität wurde ein Aliquot der isolierten RNA (1 - 2 µl) auf ein 0,7 % -iges Agarose-Gel aufgetragen und auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm (1 OD<sub>260</sub> entspricht 40 µg RNA/ml). Die Reinheit isolierter RNA wurde über das Absorptionsverhältnis A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> gemessen und lag im Bereich von 1,6 - 1,8.

#### 2.6.2.1 RNA-Isolation mit dem TRIZOL-Protokoll

Die Präparation von Gesamt-RNA unter Anwendung des TRIZOL-Reagenz (Gibco BRL) basiert auf einer sauren Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski et al. 1987).

Nach Homogenisierung der zu präparierenden Probe in TRIZOL-Reagenz (1 ml/100 mg Gewebe bzw. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen) entsprach die Vorgehensweise bei der RNA-Isolierung dem Protokoll des Herstellers. Die erwartete Ausbeute von 25 µg variierte um ± 50 %.

#### 2.6.2.2 RNA-Isolation mit DNase-Behandlung

Bei der Präparation von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) wurde zusätzlich eine DNase-Behandlung (RNase-free DNase Set, QIAGEN) durchgeführt.

5 x 10<sup>6</sup> - 1 x 10<sup>7</sup> Zellen aus der Zellkultur wurden in mit β-Mercaptoethanol-versetztem RLT-Puffer durch Auf- und Abziehen in einer Injektionsnadel (Durchmesser 0,9 mm) homogenisiert und lysiert. Nach Zugabe von 1 Vol. 70 % Ethanol wurde die Probe auf die Säule des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) gebracht und mit Puffer RW-1 gewaschen. Dann erfolgte eine DNase I - Behandlung in RDD-Puffer auf der Membran, an die sich Waschschritte mit Puffer RW-1 und zweimal mit RPE-Puffer anschlossen. Nach dem Zentrifugieren wurde die RNA in RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert. Es wurden 30 - 100 µg RNA isoliert.

#### 2.6.2.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription präparierter RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde der *First-strand* cDNA Synthese Kit (Amersham Biosciences) verwendet. Etwa 3 µg Gesamt-RNA dienten als Ausgangsmenge. Die denaturierte RNA wurde auf Eis mit dem Erststrang-Reaktionsmix (1x RT-Puffer, dNTPs, Reverse Transkriptase), DTT-Lösung und dem als Primer dienenden NotI-d(T)<sub>18</sub> -Oligomer (0,2 µg) vermischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Je 90 ng der synthetisierten Erststrang-cDNA konnten direkt in eine RT-PCR-Reaktion eingesetzt werden (Kap. 2.9.2).

## **2.7 Gelelektrophorese**

SeaKem Agarose (Biozym)

Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma)

Längenstandard 1 kb-Leiter (Gibco BRL) oder Längenstandard V (Roche Diagnostics)

Orange G Probenauftragspuffer: 0,05 % (w/v) Orange G (Sigma) in 25 % (w/v) Ficoll™PM400 (Amersham Biosciences) in TE-Puffer (pH 7,4);  
1:10 zur aufzutragenden Probe zugemischt

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA, RNA, PCR-Produkten und Plasmiden fand unter folgenden Bedingungen statt:

0,7 - 2 % -ige Agarose-Gele mit 6 - 8 mm Geldicke und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid-EK in 1x TBE-Puffer wurden bei 2 - 5 V/cm Elektrodenabstand in TBE-Puffer betrieben. Ein mitgeführter Längenstandard ermöglichte die Interpretation der Ergebnisse. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte unter einem UV-Transilluminator (Herolab) bei einer Wellenlänge von 300 nm.

## **2.8 Bisulfitbehandlung von DNA**

Die Bisulfitbehandlung von genomischer DNA ist eine selektive, chemische Umwandlung von Cytosinbasen abhängig von ihrem Methylierungsstatus (Grunau et al. 2001). Unmethylierte Cytosine werden während der Bisulfitbehandlung desaminiert und in Uracile umgewandelt (Abb. 1-6, S. 15), während 5-Methyl-Cytosine nicht verändert werden (Frommer et al. 1992; Clark et al. 1994).

10 mM Hydrochinonlösung: 55 mg Hydrochinon ad 50 ml ddH<sub>2</sub>O; entgast

2 M Natriumbisulfitlösung: 3,8 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ad 10 ml ddH<sub>2</sub>O; pH 5 - 5,2 mit NaOH; entgast

Für die Bisulfitbehandlung wurden 2 - 3 µg genomischer DNA in einer EK von 0,3 M NaOH für 15 min bei 37°C zur Denaturierung inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl 10 mM Hydrochinon und 520 µl 2 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (pH 5,1) wurde für 16 Stunden bei 50 - 55°C inkubiert. Die DNA wurde auf Säulen des QIAamp DNA mini Kits nach der Protokoll des Herstellers gereinigt. Nach dem Aufbringen der DNA des Reaktionsansatzes auf die Säule durch Zentrifugation folgten Waschschrte mit den Puffern AW-1 und AW-2, danach wurde die DNA getrocknet und mit auf 70°C erwärmtem ddH<sub>2</sub>O eluiert. Im nachfolgenden alkalischen Schritt wurden die modifizierten Basen (Uracil-Sulfonate) mit 44 µl 3 M NaOH (EK 0,3 M) für 15 min bei 37°C zu Uracil desulfoniert. Die Reaktion wurde mit 90 µl 3 M NaOAc (pH 5,4) neutralisiert. Die DNA wurde mit 1 ml Ethanol absolut präzipitiert (Sambrook et al. 1989) und in 30 µl 1 mM Tris (pH 7,4) aufgenommen. Bisulfitbehandelte DNA war stark degradiert und bei Lagerung zwischen -15°C und -25°C bis zu 2 Monate lang in einer Bisulfit-PCR (Kap. 2.9.6) amplifizierbar.



## 2.9 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

### 2.9.1 Standard-PCR

Eine DNA-Amplifikation mit Hilfe der Standard-PCR erfolgte nach der Methode von Saiki et al. (1988). Die Reaktionsansätze variierten abhängig von der verwendeten Ausgangs-DNA (genomische DNA, cDNA). Detaillierte Beschreibungen der Primersequenzen, Anlagerungstemperaturen und amplifizierte Fragmentgrößen finden sich im Anhang.

Ausgangsmaterial für die Amplifikation einzelner Exons in einem Reaktionsansatz von 25 µl in 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs (Amersham Biosciences), je 0,2 - 0,4 pmol/µl (5 pmol) Oligonukleotidprimer (F für „Forward“ und R für „Reverse“) und 0,7 - 1 U Taq-DNA-Polymerase waren ca. 100 - 200 ng genomische DNA. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Die PCR-Reaktion erfolgte in 0,5 ml Reaktionsgefäßen in einem programmierbaren Thermocycler (MJ Research PTC-200) unter folgenden Bedingungen:

1. initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	15 - 60 sec
3. Primeranlagerung	48 - 60°C	30 - 60 sec
4. Synthese	72°C	30 sec - 1 min 45 sec
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4		in 24 - 34 Zyklen
6. finale Elongation	72°C	5 min

Das PCR-Reaktionsprogramm umfasste zwischen 25 und 35 Zyklen, wobei die PCR-Variablen wie Temperatur und Zeit der Primer-DNA-Anlagerung in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und Länge der jeweiligen Primer und die DNA-Synthesezeit (4. Schritt) je nach Größe des zu amplifizierenden PCR-Produkts optimiert wurden.

Als Standard-PCR-Protokoll wurde der Ansatz der Ampli-Taq Gold verwendet:

<b>Reagenzien für Ampli-Taq Gold PCR-Ansatz</b>	<b>µl für 1x</b>
ABI Gold PCR-Puffer (10x, Roche/Applied Biosystems)	2,5
dNTPs (2 mM)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM, Roche/Applied Biosystems)	1,5
Primer F (20 pmol/µl)	0,25
Primer R (20 pmol/µl)	0,25
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl, Roche/Applied Biosystems)	0,2
100 - 200 ng genomische DNA oder 90 ng cDNA	1 - 2
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl Gesamtreaktionsvolumen	ad 25 µl

### 2.9.2 RT-PCR

Die Amplifikation von cDNA-Fragmenten erfolgte entweder aus synthetisierter Erststrang-cDNA der Reversen Transkription oder aus kommerziell erworbener cDNA (*Marathon Ready<sup>TM</sup> cDNA*, Clontech).

Etwa 90 ng cDNA wurden in die RT-PCR eingesetzt. Zum Test auf die Amplifizierbarkeit der synthetisierten Erststrang-cDNA wurde eine RT-PCR mit *GAPDH*-Primern gemacht:

*GAPDH*-F: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

*GAPDH*-R: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'

Der Vorwärtsprimer (in Exon 7) und der Rückwärtsprimer (in Exon 8) amplifizieren ein cDNA-Fragment von 282 bp. Diese Primer flankieren ein genomisches Fragment mit Intron von ca. 500 bp und dienen gleichzeitig als Test auf DNA-Kontamination.

Allgemein empfiehlt es sich, Primer für cDNAs intronüberspannend zu legen. RT-PCR-Reaktionen wurden nach dem Standard-Protokoll der Ampli-Taq Gold (Kap. 2.9.1) durchgeführt.

### **2.9.3 Nested PCR**

Abhängig davon, wie hoch das zu untersuchende Gen im jeweiligen Gewebe exprimiert wird, oder die Ausgangsmenge des amplifizierbaren Materials z. B. nach einer Bisulfitbehandlung war, musste an die erste PCR eine zweite, sog. „*nested*“ PCR-Reaktion angeschlossen werden. Das Primerpaar der *nested*-PCR oder zumindest einer der beiden Primer (*semi-nested* PCR) liegt versetzt innerhalb des ersten PCR-amplifizierten Fragments. Ein Aliquot der entstandenen DNA-Fragmente der ersten PCR-Runde dient hierbei als Matrize in der zweiten Runde.

### **2.9.4 Multiplex PCR**

Die Multiplex-PCR erfolgte analog zur Vorschrift der Standard-PCR (Kap. 2.9.1). Anstelle von einem Primerpaar wurden hier zwei Primerpaare gleichzeitig in einen PCR-Reaktionsansatz gegeben. Die Menge der eingesetzten Oligonukleotide musste bei den Multiplex-PCRs individuell optimiert werden. Bei Multiplex-RT-PCRs wurden die Kontroll-*GAPDH*-Primer als interner Standard verwendet und aufgrund der hohen Expression von *GAPDH* in geringeren Mengen eingesetzt, als die cDNA-Primer des zu vergleichenden Gens. Die Produkte der verschiedenen Primerpaare konnten nach einer Gelelektrophorese in einem 2 % -igen Agarose-Gel unterschieden werden. Eine ungefähre Abschätzung der Expressionslevel von Genen verschiedener cDNAs war im Vergleich mit der *GAPDH*-Bande möglich.

Neben der Verwendung des Ampli-Taq-Gold-PCR-Ansatzes wurde als Multiplex-Ansatz auch der Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) nach Herstellerangaben eingesetzt:

<b>Reagenzien für Advantage 2 Polymerase PCR-Ansatz</b>	<b>µl für 1x</b>
Advantage PCR-Puffer (10x)	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
genspezifischer Primer F (20 pmol/µl)	0,5 - 1
genspezifischer Primer R (20 pmol/µl)	0,5 - 1
GAPDH Primer F (20 pmol/µl)	0,25
GAPDH Primer R (20 pmol/µl)	0,25
Advantage Polymerase Mix (50x)	0,07
cDNA (ca. 70 - 120 ng)	0,8 - 1,3
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl Gesamtreaktionsvolumen	ad 25 µl

PCR-Programm:

1. 95°C                      1 min
2. 95°C                      30 sec
3. 56 - 59°C                30 sec
4. 68°C                      30 - 45 sec
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 30 Zyklen
6. 68°C                      1 - 5 min

### 2.9.5 5'-RACE-PCR

Eine spezielle Form der RT-PCR, die *RACE-PCR*, bedient sich als Ausgangsmaterial einer mit synthetischen Sequenz-Adaptoren versehenen cDNA (*Marathon Ready<sup>TM</sup> cDNA, human brain, human fetal brain, human testis*, Clontech). Die *RACE-PCR* wird zur Amplifikation fehlender 5'- und 3'-Enden von cDNA eingesetzt. Mit Hilfe eines genspezifischen Primers (komplementär revers) in der bekannten cDNA-Sequenz und einem *Adaptor Primer* (AP 1) wird ein spezifisches *RACE-PCR*-Produkt generiert. Für die 5'- bzw. 3'-*RACE-PCR* werden abhängig von den verwendeten Primern Anlagerungstemperaturen von 54 - 60°C genutzt. Bei vermuteten Produktgrößen von 0,5 - 2 kb wird eine Synthesezeit von 2 min veranschlagt, für Produkte > 2 kb sind 4 min angemessen. Auch hier ist unter Umständen eine zweite „*nested*“-PCR notwendig, zu der ein *Nested Adaptor Primer* (AP 2) zur Verfügung steht.

Das *RACE-PCR*-Protokoll ist meist ein Standard-Protokoll (Kap. 2.9.1) mit längerer Extensionszeit im PCR-Programm. Für GC-reiche Sequenzen im 5'-Bereich empfiehlt sich das Protokoll der QIAGEN Taq-Polymerase mit bzw. ohne Zugabe von Q-Solution:

<b>Reagenzien für QIAGEN Taq-Polymerase PCR-Ansatz</b>	<b>µl für 1x</b>
QIAGEN PCR-Puffer (10x, QIAGEN)	5
dNTPs (2 mM)	4
Primer AP 1 oder AP 2 (20 pmol/µl)	1
genspezifischer Primer R (20 pmol/µl)	1
Q-Solution (5 x, QIAGEN)	10
QIAGEN Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, QIAGEN)	0,14
90 ng Marathon Ready cDNA oder 1. Runde PCR	1 - 2
ddH <sub>2</sub> O ad 50 µl Gesamtreaktionsvolumen	ad 50 µl

PCR-Programm:

1. 94°C 5 min
2. 94°C 1 min
3. 56 - 60°C 1 min
4. 72°C 1 min
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 28 - 30 Zyklen
6. 72°C 10 min

### 2.9.6 Bisulfit-PCR

3 - 5 µl der bisulfitbehandelten DNA (50 ng amplifizierbare DNA aus ursprünglich 500 ng (Grunau et al. 2001)) wurden in die PCR eingesetzt. Die Bisulfit-PCR ist auf eine Fragmentlänge von maximal ca. 375 bp begrenzt, weil die DNA durch die Bisulfitumwandlung stark beschädigt wurde und in kleinen Fragmenten vorliegt.

Die modifizierte, bisulfitbehandelte DNA wurde mit entsprechenden Primern amplifiziert. Bei der Primerauswahl musste beachtet werden, dass codierender und nicht-codierender Strang nach der Bisulfitumwandlung nicht mehr komplementär sind.

Der Erfolg einer Bisulfit-PCR war stark abhängig von den Primern und musste für jeden Fragmentbereich eigens optimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Primer verwendet, um den Methylierungsstatus von *SGCE* im Promotorbereich mit der Bisulfitsequenzierungsmethode zu untersuchen.

In der optimierten Erstrunden-PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase wurden die Primer BSTx\_F und BSTx\_R (Sequenzen siehe Anhang) für den *Antisense*-Strang verwendet. Diese als „methylierungsunabhängig“ bezeichneten Primer liegen außerhalb von CpG-Dinukleotid-Sequenzen und ermöglichen eine Amplifikation aller bisulfitbehandelten DNA-Stränge unabhängig von ihrem Methylierungsstatus.

Die methylierungsspezifischen Primer (BST\_U\_S4F / BST\_U\_S4R und BST\_M\_S4F / BST\_M\_S4R) beinhalten 3 - 4 CpG-Dinukleotide in ihrer Ausgangssequenz, binden bei stringenten PCR-Bedingungen spezifisch nur an methylierte oder nur an unmethylierte DNA-Stränge und wurden HPLC-gereinigt bestellt.

Die Bisulfit-PCRs wurden mit einem modifizierten Protokoll der Ampli-Taq Gold (Roche/Applied Biosystems) mit erhöhter Primerzugabe (25 pmol) durchgeführt.

<b>Reagenzien für Ampli-Taq Gold Bisulfit-PCR-Ansatz</b>	<b>µl für 1x</b>
ABI Gold PCR-Puffer (10x)	2,5
dNTPs (2 mM)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Primer F (100 pmol/µl)	0,25
Primer R (100 pmol/µl)	0,25
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2
50 ng BST-DNA oder	5
1. Runde Bisulfit-PCR in 2. Runde	2
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl Gesamtreaktionsvolumen	12,8 oder 15,8

PCR-Programm:

1. 95°C                    5 min
2. 95°C                    30 sec
3. 56°C                    30 sec
4. 72°C                    40 sec
5. Wiederholung der Schritte 2 - 4 in 40 Zyklen
- 72°C                    5 min

Die PCR-Reinigung erfolgte in einer Gelextraktion der Banden auf 1,5 - 2 % -igem Agarose-Gel. Um klare, repräsentative Sequenzergebnisse von bisulfitbehandelten DNA-Einzelsträngen zu erhalten, wurden die PCR-Produkte subkloniert.

### **2.9.7 Reinigung von PCR-Produkten**

Um die amplifizierten Fragmente aus der PCR-Reaktion für eine nachfolgende Sequenzierung oder Klonierung (von Puffer, Nukleotiden und Primern) zu reinigen, wurde eine PCR-Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Wurden Primer wie in der Bisulfit-PCR in großem Überschuss eingesetzt, oder entstanden bei einer PCR mehrere Banden, fand eine DNA-Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben statt.

## **2.10 DNA-Sequenzierung**

### **2.10.1 Sequenzreaktion**

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v2.0 (Applied Biosystems)

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode. In die Sequenzreaktion wurden 50 - 100 ng gereinigtes PCR-Produkt bzw. 0,4 - 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Zur doppelsträngigen DNA-Matrize wurden 1,8 µl BigDye™ Terminator Mix, 4 pmol Primer und ddH<sub>2</sub>O bis auf ein Gesamtvolumen von 10 µl zugegeben. Der Sequenzansatz wurde für Vorwärts- (F) und Rückwärts- (R) Primer jeweils getrennt angesetzt. Bei PCR-Fragmenten wurden die zur Amplifikation verwendeten Primer oder *nested* Primer in die Sequenzreaktion eingesetzt. Zur Sequenzierung von Plasmiden dienten im pGEM-T-Vektor die universellen Vektorprimer SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') und T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 94°C                    30 sec
2. 50°C                    15 sec
3. 60°C                    4 min
4. Wiederholung der Schritte 1 - 3 in 25 Zyklen

### 2.10.2 Sequenzfällung

Nach Beendigung der zyklischen Sequenzreaktion wurde der Reaktionsansatz gefällt.

Zu 10 µl Sequenzreaktionsansatz in der Mikrotiterplatte wurden 25 µl Ethanol absolut zugegeben, 15 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, RT, 4316 U/min). Nach einem Waschschrift mit 200 µl 70 % Ethanol (10 min, RT, 3425 U/min) wurde die präzipitierte DNA zum Trocknen mit der Mikrotiterplattenöffnung nach unten 1 min mit 1930 U/min zentrifugiert, dann 5 min bei RT stehen gelassen und schließlich in 25 - 80 µl LiChrosolv-H<sub>2</sub>O (Merck) resuspendiert.

In 1,5 ml Einzelreaktionsgefäßen erfolgte die Ethanolfällung der Sequenzreaktion unter Zugabe von 32 µl Ethanol absolut und 8 µl LiChrosolv-H<sub>2</sub>O, 15 min Inkubation bei RT und 30 min Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 1300 U/min. Das Pellet wurde mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen, für 10 min inkubiert, gevortext und 30 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 65 - 90 µl LiChrosolv-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.10.3 Sequenzanalyse

Die automatisierte Sequenzbestimmung wurde auf dem Sequenziergerät ABI PRISM™-System 3100 (Applied Biosystems) mit POP6-Matrix (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Je 25 µl der gereinigten DNA-Sequenzreaktion wurden auf die Sequenzplatte aufgetragen. Die Laufzeit für einen Lauf von 16 Sequenzen beträgt je nach Kapillarlänge (36 oder 50 cm) 1,5 oder 2,5 h. Die Sequenzrohdaten werden mit dem Softwarepaket 3100 Data Collection Software Version 1.1 erfasst und im Programmpaket *Staden Package* als Elektropherogramme dargestellt und analysiert.

## 2.11 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung diente der Vereinzelung von DNA-Molekülen. Für die Ligation wurde das pGEM-T-Vektorsystem (Promega) eingesetzt. Die Vermehrung der Plasmide erfolgte im *E. coli* Bakterienstamm *XL1-Blue* (Stratagene).

Ampicillin (100 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O; Sigma) sterilfiltriert; EK in Medium und Agar: 50 - 100 µg/ml

1 M IPTG (Roth)

X-Gal Stocklösung (40 mg/ml in Dimethylformamid; Sigma)

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 10 g Trypton (*Peptone from Casein, tryptic digest*, Fluka BioChemika), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl mit dH<sub>2</sub>O ad 1 l; autoklaviert

LB/Amp-Agarplatten: 3 - 4 g Agar (Fluka BioChemika) in 250 ml LB-Medium autoklaviert, Ampicillin EK 50 - 100 µg/ml

Tfb I Lösung (pH 5,6): 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>,

15 % Glycerin, sterilfiltriert

Tfb II Lösung: 10 mM Na-MOPS (pH 7), 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15 % Glycerin; sterilfiltriert  
TYM-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 6 g NaCl, mit dH<sub>2</sub>O ad 1 l; autoklaviert

### 2.11.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterienzellen wurden mit der MgCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt: *E. coli* des Bakterienstamms *XL1-Blue* wurden in 2 ml Medium TYM / 10 mM MgCl<sub>2</sub> üN im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 U/min angezogen. Am nächsten Tag wurde daraus eine 1:200 Verdünnung in 100 ml Medium TYM/10 mM MgCl<sub>2</sub> hergestellt und bei 37°C und 250 U/min inkubiert, bis nach etwa 3 h eine OD<sub>550</sub> von 0,9 erreicht war. Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die Bakterienzellen wurden auf Eis gekühlt und 10 min bei 3000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml Tfb I Lösung resuspendiert, 8 min bei 3000 U/min bei 4°C zentrifugiert und in 4 ml Tfb II Lösung aufgenommen. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Aliquots bei -70°C gelagert. Die Kontrolle der Effizienz der Kompetenzinduktion erfolgte durch Bestimmung der Transformationsrate nach Transformation von 1 µg zirkulärer Plasmid-DNA und führte optimalerweise zu 5 x 10<sup>6</sup> – 2 x 10<sup>7</sup> Einzelkolonien (Sambrook et al. 1989).

### 2.11.2 Ligation

Rapid-Ligation Kit (pGEM-T-Vektorsystem, Promega)

PCR-Amplifikate besitzen ein von der Taq-DNA-Polymerase am 3'-Ende zusätzlich angehängtes Einzelnukleotid (dATP) (Clark 1988) und wurden in einer „sticky end“-Ligation nach dem Protokoll des Herstellers in das pGEM-T-Vektorsystem (Promega) eingebracht (Mezei et al. 1994; Robles et al. 1994). Bei einem optimalen molaren Verhältnis zwischen Insert und Vektor von etwa 3 : 1 wurden 10 bis 50 ng an gereinigtem PCR-Amplifikat mit 50 ng pGEM-T-Vektor in 1x Rapid-Ligation Puffer (EK) mit 1 U T4-DNA-Ligase (3 U/µl) in einem Ligationsansatz von 10 µl bei RT 1 - 3 h oder üN bei 4°C inkubiert. Dann wurde der kompetente Bakterienstamm *E. coli XL1-Blue* mit dem ligierten Vektor transformiert.

### 2.11.3 Transformation

100 µl kompetente *E. coli XL1-Blue* Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und für 15 - 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 - 60 sec bei 42°C und Abkühlung auf Eis folgte die Zugabe von 1 ml Medium TYM / 10 mM MgCl<sub>2</sub>, in dem die transformierten Bakterienzellen für 1 h im Inkubationsschüttler bei 37°C und 250 U/min kultiviert werden. Die Bakterien wurden 3 min bei 1300 U/min abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl Medium TYM / 10 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf einer LB/Amp-Agarplatte ausgestrichen und üN bei 37°C im Inkubator kultiviert. Für eine blau-weiß-Selektion auf Plasmid-Inserts in Bakterienkolonien

von *XL1-Blue* wurden je Agarplatte 25 µl X-Gal und 1,25 µl 1 M IPTG ausplattiert oder dem Agar beigemischt. Weiße Einzelkolonien der ausplattierten Transformation wurden mit Impfösen von der LB/Amp-Agarplatte aufgenommen und in 3 - 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (EK 50 - 100 µg/ml) als üN-Bakterienkultur bei 37°C im Inkubationsschüttler bei 250 U/min kultiviert.

#### **2.11.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien**

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN)

Zur Konservierung der Bakterienklone wurden 500 µl der üN-Bakterienkultur im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Glycerin gemischt und als Glycerinstock bei -70°C gelagert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus bakteriellen üN-Kulturen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers durch alkalische Lyse. Es wurden 20 - 30 µg Plasmid-DNA aus einer üN-Bakterienkultur isoliert.

#### **2.11.5 Restriktionsspaltung von Plasmiden**

Zur Detektion des Inserts im Plasmid wurden 1 - 5 µg der Plasmid-DNA in 1x Tango-Puffer mit 2 - 5 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease Pst I (10 U/µl) und Nco I (10 U/µl) (MBI Fermentas) versetzt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei der enzymespezifischen, vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur von 37°C für 1 - 6 h inkubiert. Die Restriktionsspaltung wurde dann auf einem Agarose-Gel analysiert.

### **2.12 Radioaktive Hybridisierung von Northern-Blots**

Die Expressionsanalyse von *SGCE* wurde auf dem kommerziell erhältlichen Northern-Blot Filter human brain II # 7755-1 (Clontech) durchgeführt.

#### **2.12.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden**

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml, Amersham Biosciences)

BSA (10 mg/ml, Sigma)

Klenow Fragment, exonukleasefreie DNA-Polymerase (10 U/µl, USB)

OLB C (*Oligo Labelling Buffer*): Gemisch aus Lösungen A, B und C im Verhältnis 1 : 2,5 : 1,5

Lösung 0: 1,25 M Tris-HCl (pH 8,0), 125 mM MgCl<sub>2</sub>

Lösung A: 1 ml Lösung 0, 18 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol, je 5 µl 0,1 M dATP, dGTP, dTTP

Lösung B: 2 M HEPES (Sigma), mit NaOH auf pH 6,6

Lösung C: Zufallsprimer (5'-pd(N)<sub>6</sub>-Oligonukleotide, Amersham Biosciences)  
in TE-Puffer pH 7,6; EK 90 OD<sub>260</sub> U/ml

Lachssperma DNA (10 mg/ml, Sigma)

Sephadex G50 (Amersham Biosciences)



TES-Puffer (pH 7,5): 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,25 % SDS, 0,25 % (w/v)  
Bromphenolblau (Sigma)

Die verwendete DNA-Sonde wurde mit Hilfe der Primerverlängerung (*random priming*) und einem modifizierten Protokoll nach Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert.

10 - 20 ng der aufgereinigten DNA-Sonde wurde in einem Gesamtvolumen von 32 µl 10 min bei 95°C denaturiert und danach für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl OLB C, 2 µl BSA, 0,4 µl Klenow-Polymerase und 2 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP wurde die Markierungsreaktion für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100 µl TES-Puffer gestoppt. Die markierte DNA-Sonde wurde über eine Sephadex G50-Säule durch Zentrifugation (10 min, 2000 U/min) von freien Nukleotiden getrennt. Das Eluat und 100 µl Lachssperma DNA (10 mg/ml) wurden in separaten Reaktionsgefäßen 10 min bei 95°C denaturiert, 2 min auf Eis gestellt und in die Hybridisierungsröhre pipettiert.

### 2.12.2 Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsbedingungen

Prähyb-Mix:	1,5x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % Magermilchpulver
20x SSPE:	3,6 M NaCl, 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 M EDTA; pH 7 mit Phosphorsäure eingestellt
Hyb-Mix:	1,5x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % Magermilchpulver, 10 % Dextransulfat
Waschlösung 1:	2x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 2:	0,5x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 3:	0,1x SSC, 0,1 % SDS

Die in 2x SSC geschwenkte Nylonmembran wurde in eine Hybridisierungsröhre gerollt und nach Zugabe von 10 ml Prähyb-Mix für 1 h bei 65°C im Hybridisierungssofen unter ständigem Rotieren vorhybridisiert. Dann wurde der Prähyb-Mix gegen 10 ml vorgewärmten Hyb-Mix ersetzt und nach Zugabe der denaturierten, radioaktiv markierten Sonde und der denaturierten Lachssperma DNA üN im Hybridisierungssofen bei 65°C inkubiert.

Die darauffolgenden Waschbedingungen waren abhängig von Sonde und Filter. Standardmäßig wurde die Membran kurz mit 2x SSC gespült und dann mit steigender Stringenz gewaschen. Zuerst wurde der Filter bei RT für 15 min in Waschlösung 1 und 2 geschwenkt, und bei Bedarf für 5 - 15 min in Waschlösung 3. Um die Stringenz danach weiter zu erhöhen, konnte die Waschlösung 3 auf 50 - 65°C erwärmt werden.

Die Autoradiographie erfolgte mit Fuji-RX-Röntgenfilmen unter Verwendung von CAWO SE6 Verstärkerfolie bei -70°C. Die Expositionszeit variierte zwischen 30 min und zwei Wochen.

## 2.13 Datenbanken und Computerprogramme

### 2.13.1 Datenbanken und allgemeine Internetseiten

Unter der Internetseite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>) der „*Human Genome Resources*“ finden sich diverse Programme, Suchmaschinen und Datenbanken zur Untersuchung von Nukleotid- und Proteinsequenzen.

Swissprot listet unter <http://www.expasy.org> vor allem Programme für Analyse und Vergleich von Proteinsequenzen auf.

In OMIM („*Online Mendelian Inheritance in Man*“) werden Krankheiten symptomatisch und, falls bekannt, auch mit Kopplungsanalyse und krankheitsverursachenden Genen beschrieben. Weitere Datenbanken wie *RefSeq* und *Uni Gene* wurden ebenfalls als Informationsquellen verwendet.

Auf der *Harwell Imprinting Website* (<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting/imprinting.html>) und auf der Internetseite der Universität von Otago (<http://www.otago.ac.nz/IGC>) sind geprägte Gene und Gene parentaler Effekte bzw. uniparentaler Disomien von Mensch, Maus und weiteren Spezies aufgelistet.

Mit BLASTN („*Basic Local Alignment Search Tool*“) (Altschul et al. 1990) kann eine Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Datenbank verglichen werden. Auch der Vergleich einer Sequenz mit der SNP Datenbank (dbSNP) ist damit möglich.

Das Programm BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>) kann dazu verwendet werden, die cDNA-Sequenz eines Gens mit seiner genomischen Sequenz zu vergleichen und damit die Exon-Intronstruktur darzustellen.

Die drei heute am häufigsten verwendeten Programme, mit denen die Annotation des menschlichen Genoms graphisch und tabellarisch dargestellt werden kann, standen zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung. Die ersten Versionen des *UCSC Genome Browsers*, von *Ensembl* und des *Map Viewers* erschienen in der Mitte des Jahres 2000.

### 2.13.2 Genomanalyse

Genomische Sequenzen aus der *GenBank* Datenbank wurden mit dem Annotationsprogramm „*CGTA Sequence Analysis*“ untersucht (<http://ihg.gsf.de/ihg/sequencing.html>). Dieses Annotationsprogramm startet eine Reihe von Sequenzanalyseprogrammen für eine DNA-Sequenz. Drei verschiedene Genvorhersageprogramme (*GENESCAN*, *GRAIL* und *MZEF*), *Exofish*, elektronische PCR von STSs und BLAST-Suchen gegen Datenbanken von mRNAs, Proteinen und *UniGene* Clustern wurden für die Sequenzanalyse eingesetzt. Hoch repetitive DNA wird mit dem Programm *REPEATMASKER* (A.F.A. Smit und P. Green, unpublizierte Daten, University of Washington Genome Center, Washington DC) identifiziert und maskiert.

Das Programmpaket *HUSAR* (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*, DKFZ Heidelberg) wurde zum Sequenzvergleich verwendet.

### **2.13.3 Computerprogramme**

Zur Auswertung von sequenzierten Fragmenten wurde das Programm *GAP4* des *Staden Package* (MCR Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) verwendet, das ähnliche Sequenzen automatisch einander zuordnet und Sequenzabweichungen detektiert (Dear et al. 1991).

Weiterhin wurde das Softwarepaket *GDE* (*Genetic Data Environment*) verwendet, in dem mehrere Sequenzanalyseprogramme unter einer Oberfläche zusammengefasst sind. Dieses Programmpaket enthält u.a. Sequenzalignmentprogramme, ein Programm zum Auffinden von Restriktionsenzymchnittstellen (TACG) und ein Programm zum Primerdesign (*Primer3*). Die Blots von radioaktiven Hybridisierungen können auf einem Phosphoimager mit dem Programm *BASReader 3.01* eingelesen und die Intensitäten mit dem *One-Dscan* Quantifizierungsprogramm Version 1.31 (Scanalytics, Fairfax, VA) untereinander verglichen werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Positionsklonierung des Locus für das MDS

#### 3.1.1 Kopplungsuntersuchung

Es standen DNAs von sechs Familien mit MDS aus der neurologischen Abteilung im Klinikum Großhadern zur Verfügung (Tab. 3-1).

Familie	Herkunft	Zahl lebender betroffener Patienten	Altersdurchschnitt zu Krankheitsbeginn (Jahre)	Myoklonus	Torticollis	Schreibkrampf	psychiatrische Störungen (Zahl betroffener Patienten)
MD2	norddeutsche Küste	11 (9♂, 2♀)	8,7	+	+	+	Panikattacken (3)
MD6	Ostbayern	3 (2♂, 1♀)	3,5	+	+	+	Zwangsneurosen (1)
MD7	Nordbayern	7 (3♂, 4♀)	4	+	+	+	Angstneurosen (1)
MD8	Bayern	2 (0♂, 2♀)	7	+	+	-	keine Daten bekannt
MD9	Bayern	4 (3♂, 1♀)	4	+	+	-	Panikattacken (1) Alkoholmissbrauch (1)
MD10	Preußen	8 (3♂, 5♀)	8	+	+	-	keine Daten bekannt

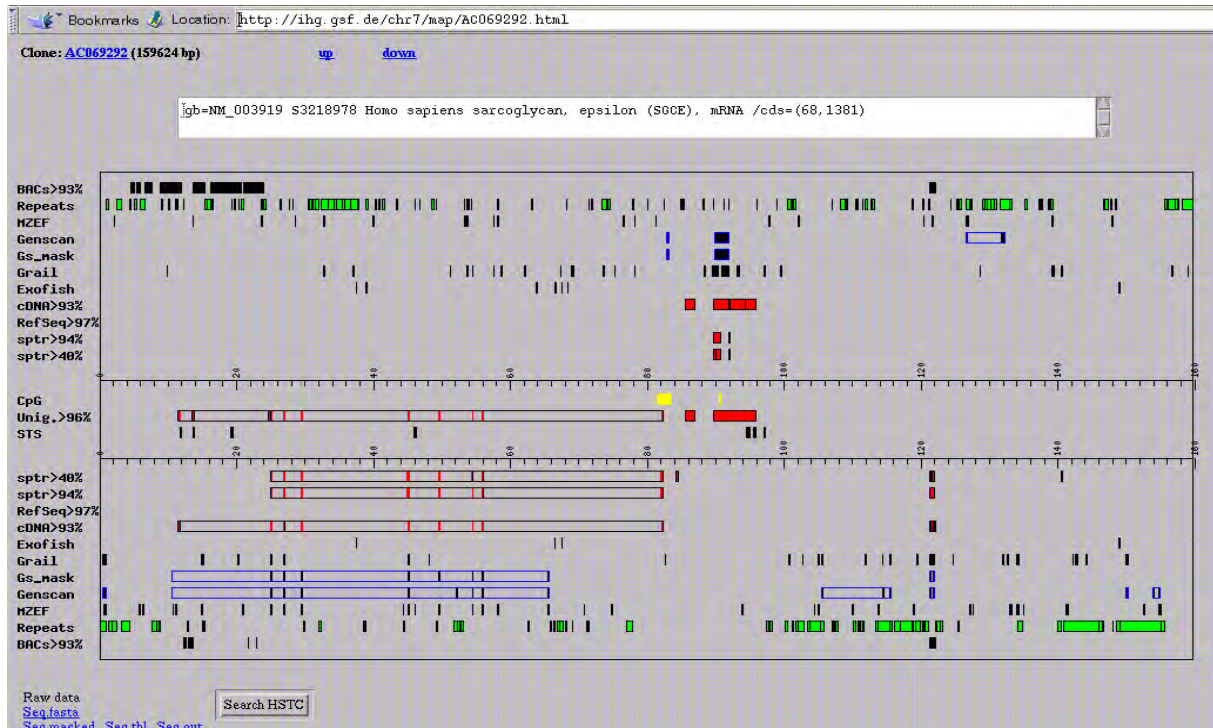
**Tab. 3-1: MDS-Familien** aus Zimprich et al. (2001). Auflistung der MDS-Familien mit ihren Phänotypen von Myoklonus, dystonischen Zuständen wie Torticollis und Schreibkrampf und psychiatrischen Störungen.

Die Kandidatenregion des MDS wurde von Nygaard et al. (1999) in einer genomweiten Kartierung auf Chr. 7q21 - q31 in einem Bereich von 28 cM lokalisiert. Durch eine weitere Kopplungsanalyse mit polymorphen CA-Repeat-Markern wurde die Region auf 7,2 cM zwischen den Markern D7S652 und D7S2480 eingengt (Zimprich et al. 2001). Diese Untersuchungen ergaben einen Multipoint-LOD-Score von 5,99 in vier deutschen MDS-Familien (MD2, MD6, MD7 und MD10) (Asmus et al. 2001). Während des Kandidatengenscreenings in diesem Bereich erschien eine Publikation, in der die Kopplung des MDS in ein Intervall von 14 cM zwischen den Markern D7S2212 und D7S821 beschrieben wurde (Klein et al. 2000b). Im Laufe des Projekts wurde der überlappende Bereich der beiden letzten Kopplungsanalysen zwischen dem proximalen Marker D7S652 (Asmus et al. 2001) und dem distalen Marker D7S821 (Klein et al. 2000b) auf Chr. 7q21.3 als Krankheitslocus definiert (Abb. 1-1, S. 4) und genauer untersucht. Dieser kritische Bereich wurde mit Hilfe eines neu identifizierten CA-Repeats auf BAC-Klon AC003078 proximal weiter um ca. 160 kb auf ca. 3,2 Mb eingegrenzt (Abb. 3-2, S. 38) (Zimprich et al. 2001).

#### 3.1.2 Suche nach Kandidatengen für das MDS

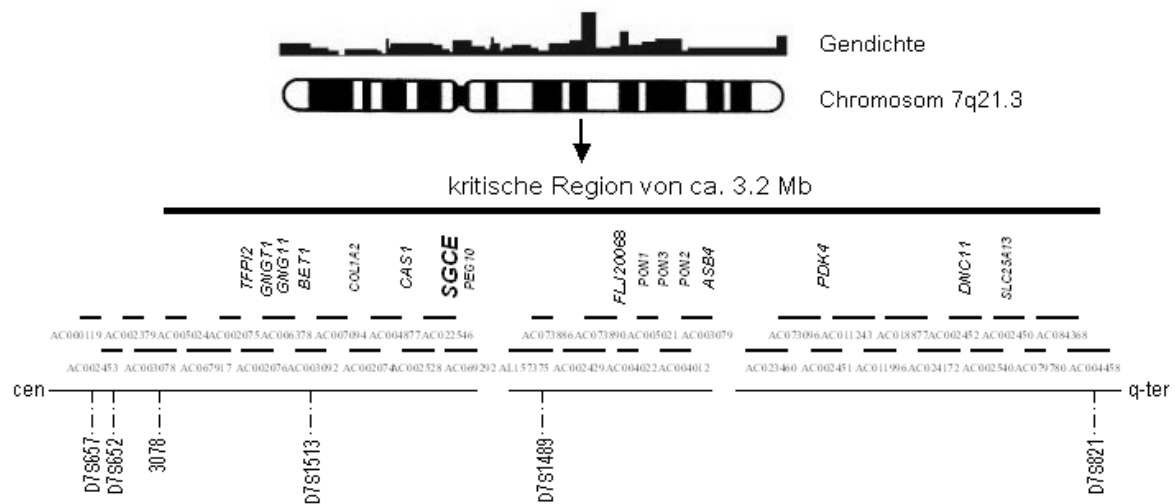
Um in der Kandidatenregion nach Genen zu suchen, musste eine physikalische Karte erstellt werden. Genomische Sequenzen von Chr. 7q21.3 waren durch das Humane Genomprojekt verfügbar, im Jahr 2000 jedoch noch lückenhaft. Für die jeweiligen Marker wurden BAC-

Klone gesucht und zu drei Contigs verbunden (Abb. 3-2, S. 38). Die Region von ca. 3,2 Mb enthielt zwei Lücken. Die vollständigen und unvollständigen Sequenzen der BAC-Klone wurden mit dem Annotationsprogramm CGTA, das verschiedene Sequenzanalyseprogramme in sich kombiniert, untersucht (genauere Programm-Beschreibung unter Kap. 2.13.3, S. 35). Eine exemplarische Darstellung der Analyse eines BAC-Klons findet sich in Abb. 3-1.



**Abb. 3-1:** Das Annotationsprogramm CGTA zeigt die Vorhersage der Gene SGCE und PEG10 mit rot markierten Exons und der Anzeige von CpG-Inseln in gelb auf BAC Klon AC069292 von Chr. 7q21.3.

Die Sequenzanalysen zur Genvorhersage ergaben 16 Gene, 15 bekannte Gene, ein neues Gen (CAS1) und 1 Pseudogen („similar to ADP ribosylation factor“). Die so entstandene physikalische Karte mit vorhergesagten und bekannten Genen des Krankheitslocus für das MDS, den Contigs der BAC-Klone und den genetischen Markern zeigt die Abb. 3-2. Die für Chr. 7q21.3 erstellte Transkriptkarte ist unter <http://ihg.gsf.de/chr7/index.html> verfügbar.



**Abb. 3-2: Physikalische Karte der kritischen Region für das MDS auf Chr. 7q21.3 mit Markern und BAC-Klonen der drei Contigs. Der Krankheitslocus für das MDS wurde auf etwa 3,2 Mb eingegrenzt und die genomischen Sequenzen mit Genvorhersageprogrammen in-silico analysiert. Die auf den jeweiligen Contigs lokalisierten, vorhergesagten und bekannten Gene ergeben eine Transkriptkarte. Die für Chr. 7 angegebene relative Gendichte für ist der NCBI-Datenbank GeneMap'99 entnommen.**

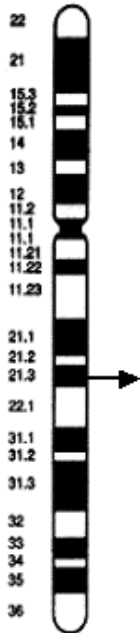
### 3.1.3 Vervollständigung eines neuen Gens

Durch die Sequenzanalyse wurde auf Chr. 7q21.3 ein neues Gen anhand von zwei ESTs mit Homologien zu einem *Drosophila*-Gen vorhergesagt. Die EST-Klone stammten aus cDNA-Bibliotheken, die mit Hilfe von poly-T-Primern konstruiert waren, und umfassten nicht die gesamte Sequenz des vorhergesagten Gens. Das neu identifizierte Gen wurde an seinem 5'-Ende experimentell vervollständigt. Dazu wurde eine 5'-RACE PCR (*Marathon cDNA-RACE-Kit*, Clontech) durchgeführt, in der die cDNAs mit spezifischen Sequenzkassetten ligiert sind. Mit genspezifischen Rückwärtsprimern und einem universellen *Adaptor*-Primer konnte ein längeres cDNA-Fragment amplifiziert werden. Durch RT-PCR und Sequenzierung wurde dann die gesamte vorhergesagte cDNA-Sequenz experimentell bestätigt und z.T. korrigiert. Das neue Gen mit seinen 3 623 bp cDNA umspannt genomisch mehr als 47 000 bp. Es hat einen offenen Leserahmen für 797 Aminosäuren. Dieses Gen wurde als *C7ORF12* bei *GenBank* eingereicht. Zusätzlich wurden drei SNPs (AF397424, AK025532 und AK025532) annotiert. Wegen seiner Homologie zu einer O-Acetyltransferase in *Cryptococcus neoformans* wurde es später in *CAS1* umbenannt.

### 3.1.4 Identifikation von Mutationen im Epsilon-Sarkoglykan-Gen (SGCE)

Für die Mutationssuche in den Kandidatengen wurde genomische DNA von Indexpatienten aus den sechs MDS-Familien verwendet. Mit Hilfe von intronischen Primern

wurden die einzelnen Exons der Gene amplifiziert und auf dem Vorwärts- und Rückwärtsstrang sequenziert. Von den 16 identifizierten Genen wurden 10 vollständig sequenziert (*TFPI2*, *GNGT1*, *GNG11*, *BET1*, *CAS1*, *SGCE*, Neurabin (*FLJ20068*), *ASB-4*, *PDK4* und *DNC11*) (Abb. 3-3). Während des Mutationsscreenings wurden 7 stille Polymorphismen in drei Genen (*CAS1*, Neurabin (*FLJ20068*), *DNC11*) identifiziert, und ein Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch im Neurabin-Gen (*FLJ20068*) führt (*Missense*-Mutation R90Q) (Abb. 3-3).



Accession Nr.	Gene	ORF (AS)	Exons	genomische Klone	Polymorphismen
Z23826	D7S652			AC002453	
AJ207748	EST		3	AC002453	
AK000104	FLJ20097			AC002379	
L00587	CALCR calcitonin receptor	490	9	AC003078	
* HUMPP5	TFPI2 tissue factor	236	5	NT 000452_2	
* S62027	GNGT1 guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 1	74	2	NT 000452_2	
* U31384	GNG11 guanine nucleotide binding protein gamma subunit 11	73	2	NT 000452_2	
* AAD47132	BET1 Bet1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) homolog	118	4	NT 000452_2	
J03464	COL1A2 collagen alpha-2-type	1367	44	NT 000452_4	
* AF355594	drosophila homolog CAS1	797	20	NT 000452_5; AC022546	821C/A, I265I 755T/C, F251F 1178C/T
* AJ000534	SGCE epsilon sarcoglycan	437+25	11+1	AC069292	5 Mutationen
AB028974	PEG10 paternal expressed gene10	325	1	AC069292	
AB049834	KIAA 1051	342			
P32889	similar to ADP ribosylation factor	180	1	AL157375	
* AB033048	PPP1R9A hypothetical protein FLJ20068 (neurabin)	1095	20	AC073886; AC002429; AC073890; NT 000432_1	2141A/G, L713L 343G/A, R90Q
U53784	PON1 paraoxonase 1	356	9	NT 000432_1	
L48516	PON3 paraoxonase 3	342	9	NT 000432_1	
AF001601	PON2 paraoxonase 2	355	9	NT 000432_1	
* AF1256779	LOC51666 ASB-4 protein ankyrin-repeat and SDCS box-containing 4	426	5	NT 000432_2	
* U54617	PDK4 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	411	11	NT 000433	
* AF123074	DNC11 dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 1	608	16	AC073096; AC022261; AC011243; AC018877; AC024172; NT 000434_1	652A/G, Q155Q 1321G/A, V378V 1678A/C, G497G
AF118838	SLC25A13 Citrin	676	13	NT 000434_2; AC079780	
G08626	D7S821			AC084368; NT 000340	

**Abb. 3-3: Transkriptkarte von Chr. 7q21.3** zwischen den polymorphen Markern *D7S652* und *D7S821*. Neben den bekannten Genen wurden zwei neue Gene (*EST* und *CAS1*) und ein Pseudogen („similar to ADP“) identifiziert. Alle mit \* markierten Gene wurden in den MDS-Indexpatienten vollständig auf Mutationen hin untersucht. In der Auflistung sind der offene Leserahmen (ORF) in Aminosäuren (AS), die Anzahl der Exons und die im Mutationsscreening gefundenen Sequenzvarianten angegeben.

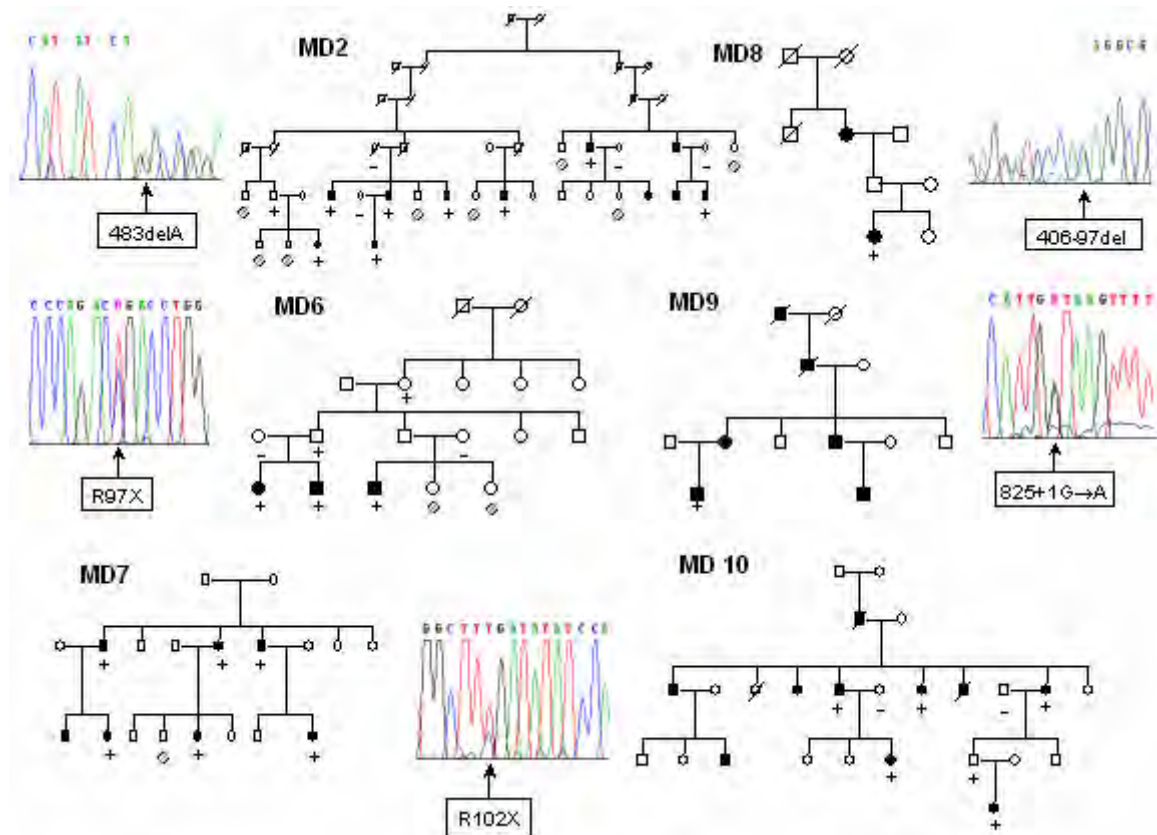
Bei der Sequenzierung des *SGCE*-Gens wurden in den sechs Indexpatienten fünf verschiedene, heterozygote Mutationen identifiziert (Abb. 3-4). Im Exon 3 wurden zwei Stoppmutationen gefunden, eine in der Familie MD6 (289C>T; R97X), die andere in den Familien MD7, MD10 (304C>T; R102X). Eine Deletion von einer Base (483delA) in MD2 führt zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Aminosäurekettenabbruch in



Codon 169. Eine Deletion von 97 bp, die sich vom Intron 3 bis 15 bp in Exon 4 erstreckt (406-97del) wurde in Familie MD8 detektiert. Weiterhin wurde eine Spleißstellenmutation am Beginn von Intron 6 (825+1G>A) in Familie MD9 gefunden.

Die Nummerierung der Basenpaare erfolgte ausgehend vom Startcodon.

Untersuchungen weiterer Familienmitglieder ergaben, dass die Mutationen im *SGCE*-Gen mit der Erkrankung segregierten, also in allen betroffenen Individuen zu finden waren (Abb. 3-4). Die Familienmitglieder der Generationen, die vom MDS-Phänotyp übersprungen wurden, trugen ebenfalls Mutationen und waren stille Mutationsüberträger. In 72 sequenzierten Kontrollallelen wurden keine Sequenzveränderungen in den 11 untersuchten Exons von *SGCE* gefunden.



**Abb. 3-4: Sequenzausschnitte der Mutationen im *SGCE*-Gen mit MDS-Familienstammbäumen leicht verändert aus Zimprich et al. (2001). Es wurden die Bezeichnungen + für Mutationsträger und - für Wildtyp verwendet, wobei O weibliche und □ männliche Familienmitglieder darstellen. Ausgefüllte Symbole kennzeichnen Personen mit MDS.**

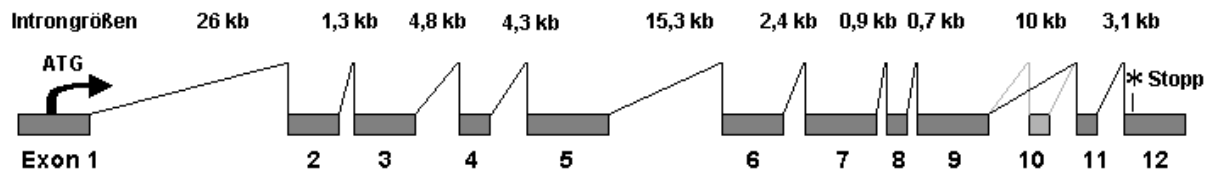
Die Familien MD7 und MD10, die die gleiche Mutation R102X tragen, stammen aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands. Die Familienanamnese ergab keinen Hinweis auf eine Verwandtschaft zwischen den beiden Familien. Sie weisen jedoch gleiche Haplotypen für die zwei nächstgelegenen *CA-Repeat*-Marker (D7S1513 und 69292 in Intron 3) auf (Zimprich et al. 2001).



### 3.1.5 Charakterisierung des SGCE-Gens

#### 3.1.5.1 Genomische Struktur von SGCE

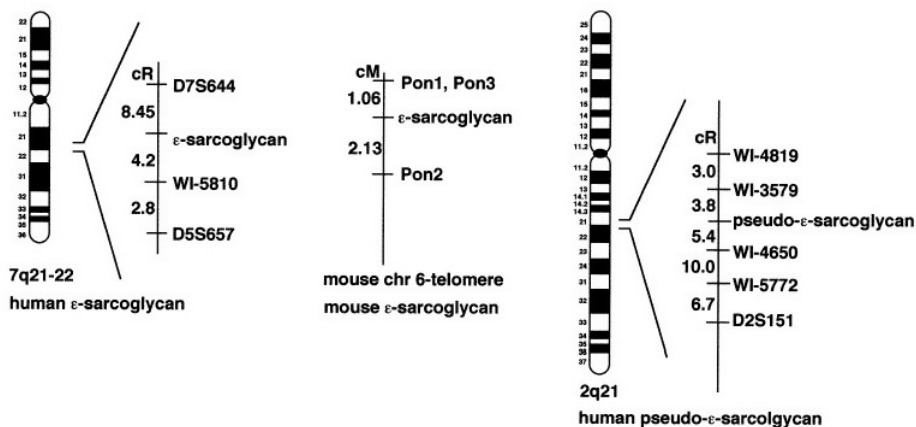
Das SGCE-Gen enthält 12 Exons (McNally et al. 1998) (Abb. 3-5) und umspannt einen genomischen Bereich von etwa 71 000 bp. SGCE tritt in zwei Isoformen, SGCE-1 und SGCE-2 auf. Das Exon 10 wird alternativ gespleißt und kommt nur in der seltenen Isoform 1 vor. Ein polymorpher Dinukleotid-CA-Repeat (69292) liegt am 3'-Ende von Exon 3 (McNally et al. 1998).



**Abb. 3-5: Genstruktur von SGCE.** Das SGCE-Gen besteht aus 12 Exons und besitzt ein alternativ gespleißtes Exon 10. SGCE umfasst einen genomischen Bereich von ca. 71 kb. Die intronischen Bereiche sind in kb angegeben und nicht maßstabsgetreu zum gespleißten Transkript dargestellt, das etwa 1,8 kb lang ist.

#### 3.1.5.2 Klonierung und Kartierung von SGCE

Anhand von Homologien mit der Alpha-Sarkoglykan-Sequenz des Hasen identifizierten Ettinger et al. (1997) einen humanen EST, der eine Teilsequenz eines neuen Proteins codierte, das Epsilon-Sarkoglykan (SGCE) genannt wurde. Mit diesem humanen EST wurden Maus-cDNAs isoliert, die der codierenden Sequenz von Sgce entsprachen (Ettinger et al. 1997). Eine vollständige, menschliche cDNA von SGCE (NM\_003919) wurde 1998 von McNally et al. (1998) isoliert.



**Abb. 3-6: Kartierung von SGCE** (McNally et al. 1998). Das humane Epsilon-Sarkoglykan (links) kartiert auf Chr. 7q21 - 22, das murine Ortholog Sgce liegt proximal auf Maus-Chr. 6 (Mitte). Ein prozessiertes humanes Pseudogen wurde auf Chr. 2q21 (rechts) entdeckt.

Das menschliche *SGCE*-Gen lokalisierten McNally et al. (1998) auf Chr. 7q21 - q22 zwischen den Markern D7S644 und D7S657 und kartierten ein prozessiertes *SGCE*-Pseudogen ohne offenen Leserahmen mit einer Homologie von 82 % auf Chr. 2q21 (Abb. 3-6). In der Maus liegt proximal auf Chromosom 6 der zum menschlichen Chr. 7q21 synthese Bereich, der das orthologe Maus-Gen *Sgce* beherbergt (McNally et al. 1998).

### 3.1.5.3 *SGCE* codiert für das Protein Epsilon-Sarkoglykan

Das von *SGCE* codierte Protein Epsilon-Sarkoglykan ist ein Typ I Transmembranprotein, das aus einer Signalsequenz, einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne besteht.

Die mRNA-Sequenz von *SGCE* wurde in die Aminosäuresequenz aller möglichen Leserahmen übersetzt, und der längstmögliche offene Leserahmen wurde bestimmt. In der 5'-nicht-codierenden Sequenz von *SGCE* liegen zwei mögliche Startcodons für die Translation, vor denen kein Stoppcodon im gleichen Leserahmen lokalisiert ist. Beide entsprechen der von Kozak beschriebenen Konsensussequenz eines Initiationscodons und weisen in Position -3 ein Adenin auf (Abb. 3-7) (Kozak 1987).

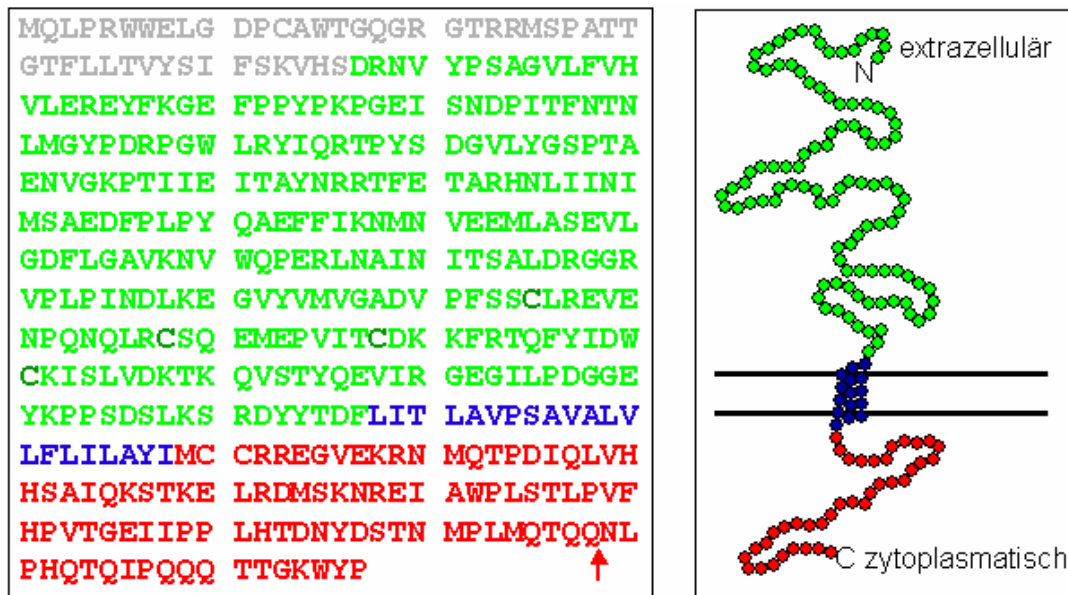
```
AAGCTGGGAGGGAAGAAGAAAGGGAGGGGAGGGGAGAATCGAGGACGGACGGCCTAGCCAGGCCAAGA
ATGCAATTGCCCGGTGGTGGGAGCTGGGAGACCCCTGTGCTTGGACGGGACAGGGTCCGGGGGACACG
CAGGATGAGCCCCGCGACCACTGGCACATTCTTGCTGACAGTGTACAGTATTTTCTCCAAGGTACACT
CCGATCGGAATGTATACCCATCAGCA
```

**Abb. 3-7: Translationsstart von *SGCE*.** In der Sequenz am 5'-Ende der mRNA von *SGCE* liegen zwei potentielle Startcodons (ATG). Beide weisen entsprechend der Konsensussequenz eines Initiationscodons in Position -3 ein Adenin (A) auf (Kozak 1987).

Üblicherweise wird die Sequenz ab dem erstmöglichen Startcodon translatiert (Kozak 1987). Daher wurde die ab dem ersten Initiationscodon translatierte Sequenz als aminosäurecodierende cDNA-Sequenz des *SGCE*-Gens festgelegt. Die beiden potentiellen Initiationscodons liegen im vorhergesagten Signalpeptid und sind nicht im prozessierten Protein von *SGCE* enthalten.

Das Protein der häufigen Isoform *SGCE*-2 (NM\_003919) besteht aus 437 Aminosäuren und enthält eine hydrophobe Signalsequenz von 46 Aminosäuren und eine große extrazelluläre Domäne von 271 Aminosäuren mit 4 konservierten Cysteinen und einer möglichen Glykosylierungsstelle (As 200). Einer Transmembrandomäne von 21 Aminosäuren (As 318 - 338) folgt die zytoplasmatische C-terminale Domäne mit 99 Aminosäuren. Nach Aminosäureposition 418 kann alternativ das Exon 10, codierend für 25 Aminosäuren (WSFAPVAQAG VQWRDLGSLQ PPPPR), eingespleißt werden (Abb. 3-8) und ergibt die seltene *SGCE*-1-Isoform.

Das SGCE Protein ist im Sarkolemma lokalisiert und hat als unprozessiertes Vorläuferprotein ein Molekulargewicht von 49 754 Dalton.



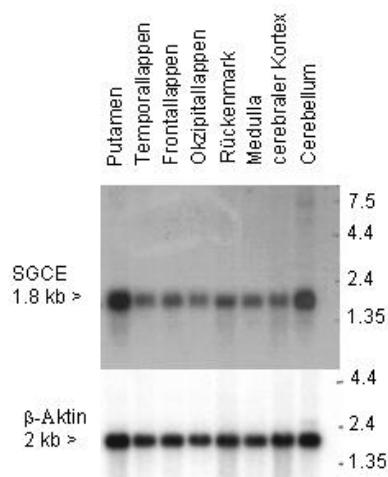
**Abb. 3-8: Aminosäuresequenz und schematische Struktur des Epsilon-Sarkoglykan Transmembranproteins** nach Anlehnung an Crosbie et al. (2000). Der in grau gekennzeichneten Signalpeptidsequenz folgt die extrazelluläre Domäne in grün, die Transmembrandomäne erscheint in blau und das zytoplasmatische C-terminale Ende ist in rot dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die alternative Spleißstelle für Exon 10 in der Aminosäuresequenz.

### 3.1.6 Northern-Blot von SGCE

SGCE ist ubiquitär exprimiert. In einer Northern-Blot Analyse zeigten McNally et al. (1998), dass SGCE in den menschlichen Geweben Plazenta, Pankreas, Herz- und Skelettmuskel, Lunge, Gehirn, Niere und Leber exprimiert wird.

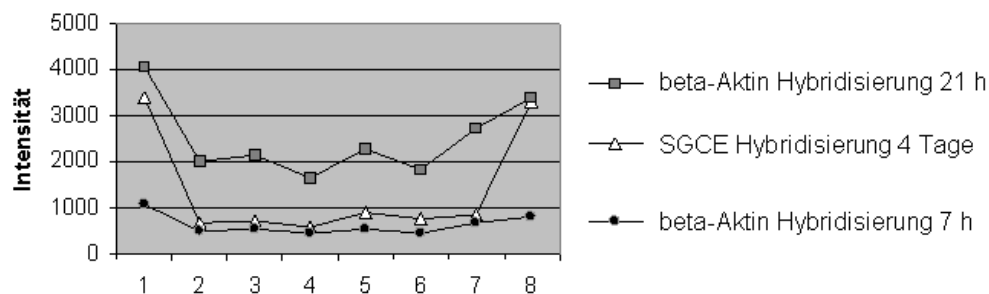
Das MDS ist eine nicht-degenerative neuronale Erkrankung. Daher wurde die Expression von SGCE in verschiedenen Gehirnregionen überprüft. Eine Expressionsanalyse von SGCE wurde auf dem Northern-Blot Filter *human brain II No. 7755-1* (Clontech) durchgeführt. Als Sonde diente ein RT-PCR-Amplifikat aus humaner Gehirn-cDNA, das den Basenpaaren 599 bis 1239 der cDNA von SGCE entspricht.

Die Northern-Blot Analyse zeigte in allen untersuchten Gehirngeweben (Cerebellum, cerebralem Cortex, Medulla, Rückenmark, Okzipitallappen, Frontallappen, Temporallappen, Putamen) mit einer Bande von ca. 1,8 kb eine Expression von SGCE an (Abb. 3-9). Die Expositionszeit für SGCE betrug 96 h. Eine Kontrollhybridisierung des gleichen Filters mit  $\beta$ -Aktin zeigte eine unterschiedliche Ladungsmenge an RNA in der Membran auf. Putamen und Cerebellum waren stärker markiert als die anderen Spuren.



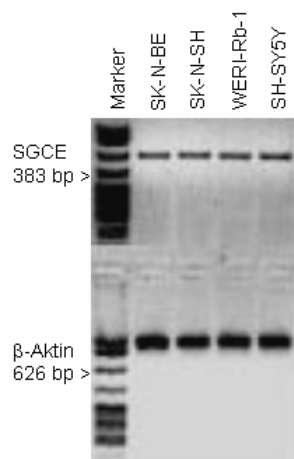
**Abb. 3-9: Northern-Blot Analyse** von SGCE in verschiedenen Gehirnregionen. Alle untersuchten Gehirngewebe zeigten in der Hybridisierung mit einer SGCE cDNA-Sonde die Expression eines ca. 1,8 kb großen SGCE Transkripts. Die darunter dargestellte Hybridisierung ist die Kontrolle mit  $\beta$ -Aktin.

Zur Quantifizierung der Hybridisierungssignale wurden die Northern-Blots von SGCE und  $\beta$ -Aktin eingescannt und mit einem Quantifizierungsprogramm (*One-Dscan* Version 1.31, Scanalytics) analysiert. Beim Vergleich der Hybridisierungssignalintensitäten zwischen SGCE und  $\beta$ -Aktin (Abb. 3-10) konnte eine ansteigende Intensität der Expression von SGCE in folgenden Gehirngeweben festgestellt werden: Okzipitallappen, Medulla, Temporallappen, Frontallappen, Rückenmark, cerebraler Cortex, Cerebellum und Putamen. Putamen und Cerebellum zeigten selbst bei Berücksichtigung der unterschiedlichen RNA-Ladungsmengen des Northern-Blots eine höhere Expression von SGCE als die anderen Gehirnregionen.



**Abb. 3-10: Vergleich von Hybridisierungssignalintensitäten.** Die Intensitätswerte der Hybridisierungssignale von SGCE im Vergleich zu  $\beta$ -Aktin in den Geweben 1 - 8: Putamen, Temporallappen, Frontallappen, Okzipitallappen, Rückenmark, Medulla, cerebraler Cortex, Cerebellum.

Die Expression von SGCE wurde außerdem in Tumorzelllinien neuronalen Ursprungs (drei Neuroblastomzelllinien und einer Retinoblastomzelllinie) über RT-PCR-Amplifikation nachgewiesen (Abb. 3-11) (Zimprich et al. 2001).



**Abb. 3-11: RT-PCR-Analysen von SGCE** zwischen Exon 2 und Exon 5 und von  $\beta$ -Aktin mit Gesamt-RNA aus den Neuroblastomzelllinien (SK-N-BE, SK-N-SH, SH-SY5Y) und der Retinoblastomzelllinie (WERI-Rb-1) (Zimprich et al. 2001). SGCE ist in Tumorgewebe neuronalen Ursprungs exprimiert.

## 3.2 Untersuchung des SGCE-Gens auf genomische Prägung

### 3.2.1 Vererbung des MDS

Da nicht jeder obligate Mutationsträger betroffen war, wurde die Vererbung des MDS als autosomal dominant mit unvollständiger Penetranz definiert (Gasser 1998). Eine unvollständige Penetranz ist eine extreme Form der variablen Expressivität, bei der ein Genotyp nicht zwangsläufig im selben Phänotyp resultiert (Rakyan et al. 2002).

Stammbaumanalysen der in dieser Arbeit untersuchten sechs Familien mit MDS (Abb. 3-4, S. 40) zeigten die reduzierte Penetranz in den Nachkommen betroffener Frauen. 32 klinisch betroffene Individuen erbten die Erkrankung von ihrem Vater, und nur zwei von ihrer Mutter (Tab. 3-2). Bei den phänotypisch unauffälligen Mutationsträgern wurde in allen 10 gesicherten Fällen ein mütterlicher Ursprung des mutierten Allels festgestellt (Tab. 3-2). Diese geschlechtsabhängige Vererbung des MDS gab den Hinweis auf eine mögliche maternale Prägung des SGCE-Gens, die eine monoallelisch paternale Expression bewirkt.

Status	paternale Transmission	maternale Transmission
betroffene Mutationsträger	32	2
betroffene Mutationsträger in Literatur	> 60	6
asymptomatische Mutationsträger	0	> 10
asymptomatische Mutationsträger in Literatur	3	21

**Tab. 3-2: Parentale Transmissionen der Mutationen mit bzw. ohne MDS-Phänotyp der Nachkommen.** Eine väterliche Transmission der Mutation führt zu betroffenen Nachkommen, während eine maternale Transmission meist asymptotische Mutationsträger ohne MDS-Phänotyp hervorbringt.

Weitere in der Literatur veröffentlichte MDS-Familien zeigen ebenfalls Transmissionen, die mit einem maternalen Prägungsmechanismus kompatibel sind (Tab. 3-2) (Kurlan et al. 1988; Kyllerman et al. 1990, Lundemo, 1985 #41; Fahn et al. 1991; Nygaard et al. 1999; Klein et al.

2000b; Asmus et al. 2002; Marechal et al. 2003). Mindestens 60 MDS-Patienten erbten ihre Mutation vom Vater, und nur sechs von der Mutter. Bei 21 von 24 asymptomatischen Mutationsträgern wurde eine maternale Transmission festgestellt.

In der Maus liegt das *Sgce*-Gen in der zum menschlichen Chr. 7q21 syntenen Region proximal auf Mauschromosom 6 (Abb. 3-6, S. 41) (McNally et al. 1998). Experimentell wurden an diesem Locus in der Maus zwei geprägte Gene beschrieben: das maternal exprimierte *Asb-4* bei 0,6 cM (Mizuno et al. 2002) und das vorwiegend monoallelisch paternal exprimierte *Sgce* bei 1,0 cM Lokalisation (Piras et al. 2000). In den meisten adulten Mausgeweben ist das maternale Allel von *Sgce* transkriptionell stillgelegt und wird nur im Gehirn schwach exprimiert. Nachdem einige geprägte Gene einen konservierten Prägungsstatus in der Maus und im Menschen aufweisen, war dies ein zusätzlicher Hinweis auf eine maternale Prägung des menschlichen *SGCE*-Gens.

### **3.2.2 Methylierungsstatus im Promotorbereich von *SGCE***

Zur Analyse des Methylierungsstatus von CpG-Dinukleotiden vor dem Transkriptionsstart des *SGCE*-Gens wurde eine genomische Bisulfitsequenzierung in diesem Bereich durchgeführt. Eine differentielle Methylierung der elterlichen Allele ist ein Kennzeichen der genomischen Prägung, die für das *SGCE*-Gen untersucht wurde. Mit Hilfe von Polymorphismen konnten die parental Allele in einer Bisulfitsequenzierung unterschieden werden. Bei der Verwendung von DNA uniparentaler Disomien von Chr. 7 (UPD7) werden ohne weitere Unterscheidung nur maternale oder nur paternale Allele untersucht.

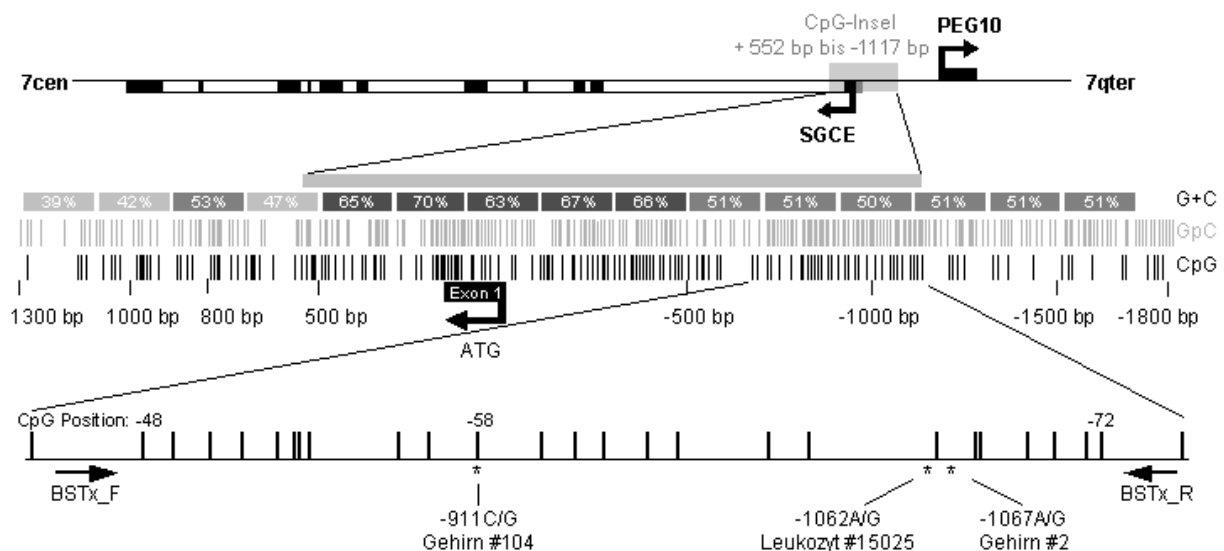
#### **3.2.2.1 Promotoranalyse**

Im Bereich von -1117 bp am 5'-Ende vor bis +662 bp nach dem *SGCE* Initiationscodon liegt eine CpG-Insel, die 113 CpG-Dinukleotide enthält (Abb. 3-12). Die potentielle Promotorregion, das erste Exon und der Anfang von Intron 1 des *SGCE*-Gens sind in diese CpG-Insel eingebettet. Die Sequenz weist mit einem GC-Anteil von 60,4 % auf über 1,7 kb (im Vergleich zu ~ 40 % im übrigen Genom) und einem hohem CpG-Vorkommen mit einem Verhältnis  $\text{CpG}_{\text{beobachtet}}/\text{CpG}_{\text{erwartet}}$  von 0,70 (im Vergleich zu einem Wert von 0,25 im übrigen Genom) die typischen Charakteristika einer CpG-Insel auf (Gardiner-Garden et al. 1987; Antequera et al. 1993).

#### **3.2.2.2 Polymorphismus-Screening im Promotorbereich von *SGCE***

Um elterliche Allele voneinander unterscheiden zu können, wurde der Promotorbereich von *SGCE* in 42 Leukozyten-DNAs und 36 DNAs aus humanem Gehirngewebe auf genomische Polymorphismen hin untersucht. Durch die Sequenzierung des Bereiches von -1266 bp bis -454 bp vor dem Translationsstart von *SGCE* wurden drei Polymorphismen detektiert, die ab dem Startcodon von *SGCE* auf dem nicht-codierenden Strang angegeben sind. In der

Leukozyten-DNA einer Kontrolle (#15025) wurde ein Polymorphismus mit den Allelen A und G in der Promotorregion -1062 bp 5' vor dem Translationsstart von *SGCE* entdeckt, der von der Mutter (#15024) vererbt wurde. In den Gehirn-DNAs wurden zwei Polymorphismen identifiziert. In Gehirn-DNA #104 liegt ein Polymorphismus mit den Allelen C und G im Promotorbereich -911 bp 5' vor dem Translationsstart. Ein weiterer Polymorphismus mit den Allelen A und G in der Promotorregion -1067 bp 5' vor dem Translationsstart wurde in Gehirn-DNA #2 entdeckt. Da von den Gehirn-DNAs keine elterliche DNA zur Verfügung stand, konnten die beiden Polymorphismen der Gehirn-DNAs zwar der Allelunterscheidung dienen, jedoch keinem parentalen Ursprung zugeordnet werden. In den MDS-Indexpatienten von den Familien MD2, MD6, MD7 und MD9 wurden Fragmente von -1266 bp bis -454 bp und von -476 bp bis -65 bp vor dem Translationsstart von *SGCE* sequenziert. Es wurden keine Polymorphismen im Promotorbereich gefunden.



**Abb. 3-12: *SGCE*-Gen und CpG-Dichteblot auf Chr. 7q21.3.** Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *SGCE* und *PEG 10*. Die gebogenen Pfeile sind Translationsstart von *SGCE* bzw. Transkriptionsstart von *PEG10*. Die als graues Rechteck gekennzeichnete CpG-Insel beherbergt 113 CpG-Dinukleotide und reicht von der Promotorregion bis in Intron 1 von *SGCE* hinein. Darunter ist der G+C-Gehalt in % angegeben. Die vertikalen grauen Striche stellen einen GpC-Dichteblot dar, die schwarzen Striche zeigen die Verteilung von CpGs in diesem Bereich. Die unten vergrößert dargestellte Teilsequenz, in welcher drei Polymorphismen (\*) liegen, wurde in einer Bisulfit-PCR mit den Primern *BSTx\_F* und *BSTx\_R* (Pfeile) amplifiziert und sequenziert.

### 3.2.2.3 Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs in verschiedenen Geweben

Um die differentielle Methylierung zu untersuchen, wurde eine Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Es wurden DNAs aus zwei maternalen UPD7 lymphoblastoiden Zelllinien, einer paternalen UPD7 lymphoblastoiden Zelllinie, eine weibliche Leukozyten-DNA, zwei

Gehirn-DNAs und Leukozyten-DNA einer betroffenen MDS-Patientin von Familie MD7, die eine *SGCE*-Mutation von ihrer Mutter geerbt hat, bisulfitsequenziert.

Durch die Behandlung mit Natriumbisulfit und Natronlauge wurde die DNA stark fragmentiert und zu ~ 90 % degradiert (Grunau et al. 2001). Nach der Bisulfitbehandlung von 3 µg genomischer DNA war photometrisch keine DNA-Konzentration mehr messbar. Dennoch ließ sich die bisulfitbehandelte DNA nach Optimierung des Bisulfit-PCR-Protokolls und der verwendeten Primersequenzen amplifizieren. Generell war eine Amplifikation bisulfitbehandelter DNA bis zu Fragmentgrößen von maximal 400 bp erreichbar.

In der optimierten Erstrunden-PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase bei 40 Zyklen wurden die Primer BSTx\_F und BSTx\_R (Primersequenzen siehe Anhang) verwendet, die keine CpG-Dinukleotide enthalten und eine Amplifikation aller bisulfitbehandelten DNA-Stränge unabhängig von ihrem Methylierungsstatus ermöglichen. Aus diesem Grund wurde die Bisulfit-PCR als „methylierungsunabhängig“ bezeichnet. Das amplifizierte Produkt war 376 bp lang, enthielt 25 CpG-Dinukleotide und war von -772 bis -1148 bp vor dem Initiationscodon von *SGCE* auf dem nicht-codierenden Strang lokalisiert (Abb. 3-12). Mit der Subklonierung dieser methylierungsunabhängigen Bisulfit-PCR-Amplifikate und der Sequenzierung von Einzelkolonien wurde das Methylierungsmuster des 48. bis 72. CpG-Dinukleotids vor dem Translationsstart von *SGCE* analysiert. Die Ergebnisse der genomischen Bisulfitsequenzierung sind in Abb. 3-14 graphisch dargestellt und in Tab. 3-3 zusammengefasst (Grabowski et al. 2003).

Die Bisulfitsequenzierungen der maternalen UPD7s (lymphoblastoide Zelllinien 15/96 und 100/98), die nur mütterliche Allele von Chromosom 7 repräsentieren, ergaben in je 15 Klonen eine Cytosin-Methylierung der CpG-Dinukleotide von über 94 % (Abb. 3-14 a+b). Von der paternalen UPD7 (lymphoblastoide Zelllinie 108/98) wurden 15 Klone bisulfitsequenziert, die alle komplett unmethyliert waren (Abb. 3-14 c).

Aus diesen Ergebnissen mit uniparentalen Disomien war zu erkennen, dass in lymphoblastoiden Zelllinien auf den maternalen Allelen die Cytosine in CpG-Dinukleotiden nahezu vollständig methyliert vorliegen, während die paternalen Allele gänzlich unmethyliert sind. Dieser Zustand der differentiellen Methylierung zeigte sich auch, wenn die elterlichen Allele anhand eines genomischen Polymorphismus unterschieden werden konnten (Beispiel in Abb. 3-13). In der Leukozyten-DNA (#15025) waren die CpG-Dinukleotide der 9 Klone mit maternalem Allel G methyliert, während die 13 Klone des paternalen Allels A unmethyliert vorlagen (Abb. 3-14 d).

Auch die Bisulfitsequenzierungen der zwei Gehirn-DNAs #2 und #104 zeigten zum einen relativ einheitlich methylierte Klone eines Allels (91 - 92 %, beide mit Polymorphismus), zum anderen zu 95 - 99 % unmethylierte Klone des anderen Allels (Abb. 3-14 e und f). Die Polymorphismen der Gehirn-DNAs dienten der Allelunterscheidung, konnten jedoch keinem



elterlichen Ursprung zugeordnet werden. Der Polymorphismus (-911 C>G) in CpG-Dinukleotid Nr. - 58 von Gehirn-DNA #104 reduzierte die Anzahl an CpG-Dinukleotiden in einem Allel auf 24. In Gehirn-DNA #2 wurden 10 methylierte und 9 unmethylierte Klone vorgefunden, in Gehirn-DNA #104 war das Verhältnis von methylierten zu unmethylierten Klonen 8 zu 14.

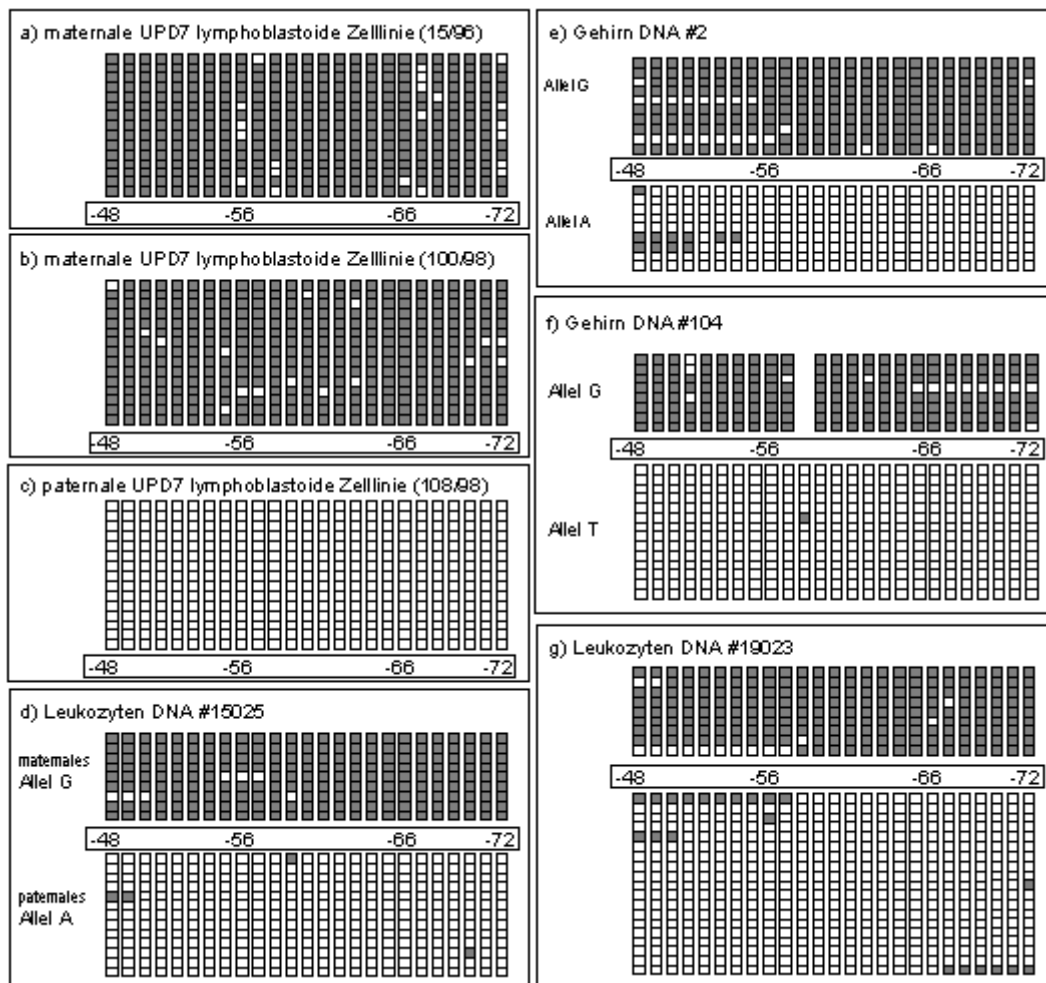
Die Leukozyten-DNA einer MDS-Patientin (#19023) mit maternaler Transmission des MDS zeigte in der Bisulfidsequenzierung sowohl methylierte, als auch unmethylierte Klone (Abb. 3-14 g). Es konnten jedoch keine Allele unterschieden werden, da im Promotorbereich kein Polymorphismus gefunden wurde. Von den 28 gepickten Klonen waren 9 Klone, deren CpG-Dinukleotide zu 93 % methyliert vorlagen, und 19 zu 95 % unmethylierte Klone.

ACTACAAAAA ACGCTACAAA AACCGATGCGA TTAGCCAGCC unbehandelte DNA, paternales Allel A  
 ACTACAAAAA GCGCTACAAA AACCGATGCGA TTAGCCAGCC unbehandelte DNA, maternales Allel G  
 ATTATAAAAA ATGTATAAA AATGATGTGA TTAGTTAGTT BST unmethyliert, paternales Allel  
 ATTATAAAAA GCGTTATAAA AACCGATGCGA TTAGTTAGTT BST methyliert, maternales Allel

**Abb. 3-13: Ausschnitt aus der Promotorsequenz von SGCE mit Polymorphismus in der nativen DNA von #15025 (oben) und nach der Bisulfidumwandlung. In blau sind unmethylierte Cytosine gekennzeichnet, die während der Bisulfidbehandlung (BST) in Uracil-Bausteine umgewandelt und in der PCR als Thymin gelesen wurden. Die grün markierten Cytosine waren methyliert und wurden nicht chemisch umgewandelt. Die elterlichen Allele sind über einen Polymorphismus (A/G) unterscheidbar und zeigen eine allelspezifische Methylierung der CpG-Dinukleotide (unterstrichen).**

DNA	Klonanzahl	CpGs/Klon	Σ CpGs	Ausnahmen	%	Methylierungsstatus
matUPD7 lymphoblastoide Zelllinie (15/96)	15	25	375	21	94,4	methyliert
matUPD7 lymphoblastoide Zelllinie (100/98)	15	25	375	16	95,7	methyliert
patUPD7 lymphoblastoide Zelllinie (108/98)	15	25	375	0	100,0	unmethyliert
Leukozyten DNA #15025, maternales Allel G	9	25	225	7	96,9	methyliert
Leukozyten DNA #15025, paternales Allel A	13	25	325	4	98,8	unmethyliert
Leukozyten DNA #19023	9	25	225	15	93,3	methyliert
Leukozyten DNA #19023	19	25	475	21	95,6	unmethyliert
Gehirn-DNA #2, Allel G	10	25	250	22	91,2	methyliert
Gehirn-DNA #2, Allel A	9	25	225	11	95,1	unmethyliert
Gehirn-DNA #104, Allel G	8	24	192	14	92,7	methyliert
Gehirn-DNA #104, Allel A	14	25	350	1	99,7	unmethyliert

**Tab. 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bisulfidsequenzierungen von zwei maternalen UPD7s (15/96 und 100/98), einer paternalen UPD7 (108/98), einer heterozygoten Kontroll-Leukozyten-DNA (#15025), einer Leukozyten-DNA einer MDS-Patientin (#19023) mit maternaler Transmission und zwei heterozygoten Gehirn-DNAs (#2 und #104).**



**Abb. 3-14: Methylierungsmuster** sequenzierter Klone aus methylierungsunabhängigen Bisulfitamplifikationen des 48. bis 72. CpG-Dinukleotids am 5'-Ende vor dem Translationsstart von SGCE (■=methyliert, □=unmethyliert). a) + b) maternale UPD7 Zelllinien stark methyliert c) paternale UPD7 Zelllinie komplett unmethyliert d) Kontroll-Leukozyten-DNA (#15025) mit methylierten Klonen des maternalen Allels G und unmethylierten Klonen des paternalen Allels A e) + f) Gehirn-DNAs mit Polymorphismen zeigen je ein methyliertes und ein unmethyliertes Allel g) Leukozyten-DNA einer MDS-Patientin (#19023) mit maternaler Transmission des MDS weist in der Bisulfitsequenzierung sowohl methylierte als auch unmethylierte Klone auf.

Bei der Verwendung von methylierungsspezifischen Primern wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit den methylierungsunabhängigen Primern. Die Bisulfitsequenzierung der Gehirn-DNA #104 ergab zu 95,7 % einheitlich methylierte Klone des Allels G, und zu 98,1 % unmethylierte Klone des Allels T.

Methylierungsspezifische PCRs reflektieren nicht immer das tatsächlich herrschende Verhältnis von methylierten zu unmethylierten DNA-Strängen im Ausgangsmaterial. Zum einen können vereinzelt vorliegende DNA-Stränge mit außergewöhnlicher Methylierung ebenfalls spezifisch amplifiziert werden. Obwohl in der paternalen UPD7 (108/98) die Allele vollständig unmethyliert vorliegen (Abb. 3-14), war eine schwache Amplifikation mit Primern

spezifisch für methylierte DNA möglich. Die Subklonierung ergab vier Klone, die zu 95,5 % methyliert waren. Zum anderen kann die Amplifikation durch Primer-Mismatches an Methylierungsspezifität verlieren. In maternalen UPD7s liegen die Allele methyliert vor. Mit Primern spezifisch für unmethylierte DNA gelang aufgrund von *Primer-Mismatches* eine schwache Amplifikation. Die Klone waren zu 97,5 % methyliert.

### **3.2.3 Untersuchungen monoallelischer Expression auf Chr. 7q21.3**

Die genomische Prägung von Genen kann über Expressionsanalysen nachgewiesen werden. Potentiell geprägte Gene wurden auf monoallelische Expression untersucht, indem RT-PCRs aus cDNA uniparentaler Disomien von Chr. 7 durchgeführt wurden. Alternativ wurde die Expression einiger Gene mit einem Polymorphismus über RT-PCR-Sequenzierung analysiert.

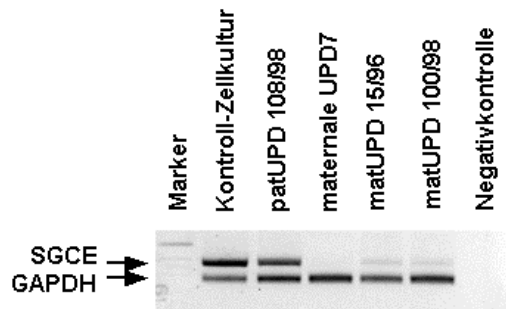
#### **3.2.3.1 Expressionsanalyse durch RT-PCR an UPD7 cDNAs**

Es wurden RT-PCR-Amplifikationen aus cDNAs lymphoblastoider Zelllinien einer paternalen und zweier maternalen uniparentaler Disomien von Chr. 7 (UPD7) durchgeführt, um eine allelspezifische Expression von Genen auf Chr. 7 zu detektieren. Die Primer wurden so gewählt, dass sie, mit Ausnahme von *ASB-4* und dem intronfreien *PEG10*, ein Intron umfassten. Bei der RNA-Isolation wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um eine DNA-Kontamination zu vermeiden. Die RT-PCR aus der cDNA einer lymphoblastoiden Zelllinie diente zur Kontrolle der Amplifikation, und eine Negativkontrolle erfolgte ohne cDNA-Zugabe. Untersucht wurden das *SGCE*-Gen und 15 weitere Gene der Chromosomenregion 7q21.3.

Es standen getrocknete Zellpellets von Zelllinien einer paternalen UPD7 und zwei maternalen UPD7 aus dem MPI Berlin zur Verfügung. Aus diesen Zellpellets wurde RNA isoliert (RNeasy Mini Kit und RNase-free DNase Set, QIAGEN), in cDNA umgeschrieben (*First-strand* cDNA Synthese Kit, Amersham Biosciences) und mit einer *GAPDH*-RT-PCR überprüft. *GAPDH* war in allen cDNAs mit annähernd gleicher Intensität amplifizierbar und zeigte keine DNA-Kontamination der RNAs an (Abb. 3-16 unten).

Bei den RT-PCR-Amplifikationen des *SGCE*-Transkripts von 153 bis 536 bp der cDNA wurde konsistent in vier Versuchen in den maternalen UPD7 cDNAs nur eine sehr schwache bis komplett fehlende Amplifikation vorgefunden. Die paternale UPD7 zeigte in der RT-PCR eine starke Amplifikation, ebenso wie die Kontroll-cDNA. Um eine semi-quantitative Abschätzung der Expression von *SGCE* in den verschiedenen cDNAs durch einen Vergleich der Stärke der Banden auf dem Agarose-Gel zu ermöglichen, wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. In diesem RT-PCR-Ansatz wurden die Primer für *SGCE* und *GAPDH* eingesetzt, um eine Amplifikation von *SGCE* und *GAPDH* simultan unter gleichen Bedingungen zu gewährleisten (Abb. 3-15). Die *GAPDH*-Banden (282 bp) waren in allen cDNAs vorhanden und annähernd gleich stark, wobei in der Kontroll-cDNA und der maternalen UPD7 15/96 die Amplifikation

etwas geringer ausfiel. Die Amplifikation des *SGCE*-Transkripts von 679 bis 1070 bp war auch mit der Multiplex-PCR in den einzelnen cDNAs sehr unterschiedlich. Die Expression von *SGCE* in der Kontroll-cDNA und der paternalen UPD7 war anhand der starken RT-PCR-Banden eindeutig erkennbar, während in den beiden maternalen UPD7 cDNAs nur eine sehr geringe Amplifikation von *SGCE* möglich war (Grabowski et al. 2003). Eine Wiederholung dieser RT-PCRs mit erneut isolierter RNA ergab gleiche Bandenverhältnisse.



**Abb. 3-15: Multiplex-RT-PCR von *SGCE* und *GAPDH* mit cDNAs aus lymphoblastoiden Zelllinien einer Kontrolle, einer paternalen und zweier maternalen UPD7.** *SGCE* ließ sich aus cDNA der Kontrolle und der paternalen UPD7 amplifizieren, jedoch nicht oder nur sehr schwach in den maternalen UPD7 Zelllinien. Die simultane *GAPDH*-Amplifikation diente der Kontrolle und dem Vergleich der cDNAs untereinander.

In maternalen UPD7 cDNAs kann prinzipiell die Expression biallelisch exprimierter und paternal geprägter Gene über RT-PCR nachgewiesen werden. Unterliegt ein Gen der maternalen Prägung und transkriptionellen Stilllegung, fehlt dessen Expression in maternalen UPD7 cDNAs. Die in verschiedenen PCR-Ansätzen konstant schwache Amplifikation von *SGCE* in den maternalen UPD7 cDNAs deutet daher auf eine vorwiegend monoallelisch paternale Expression und maternale Prägung des Epsilon-Sarkoglykan-Gens hin.

Da geprägte Gene oft gehäuft in Clustern vorliegen, wurden auch umliegende Gene von *SGCE* auf Chr. 7q21.3 auf genomische Prägung und monoallelische Expression hin in den UPD7 cDNAs untersucht. Neun Gene (*TFPI2*, *BET1*, *PEG10*, *PON3*, *PON2*, *ASB-4*, *SLC25A13* und *DSS1*) ließen sich in einer ersten RT-PCR-Runde amplifizieren und konnten auf allelspezifische Expression in UPD7 cDNAs untersucht werden (Abb. 3-16), während von sechs weiteren Genen die Expression in Lymphoblasten zu gering war. Die Ergebnisse der einzelnen RT-PCRs sind entsprechend der Genlokalisierung auf Chr. 7 von proximal nach distal beschrieben und in Tab. 3-4 (S. 55) zusammengefasst.

*CALCR* („*Calcitonin Receptor*“) ließ sich weder aus Lymphoblasten-cDNA, noch aus Gehirn amplifizieren. ESTs wurden nach Datenbankeinträgen nur in Ovarialkarzinomen und im Knochen vorgefunden.

*TFPI2* („*Tissue Factor Pathway Inhibitor 2*“) zeigte in allen cDNAs RT-PCR-Produkte und ist nicht geprägt.

*GNGT1* („*Guanine Nucleotide binding protein, Gamma Transducing activity polypeptide 1*“) ließ sich weder aus Lymphoblasten-cDNA, noch aus Gehirn amplifizieren. ESTs wurden nach Datenbankeinträgen nur in Stäbchenzellen der Photorezeptoren detektiert.

*GNG11* („*Guanine Nucleotide binding protein, Gamma subunit 11*“) wurde nicht auf Transkriptionsebene untersucht, da dessen Expression nach EST-Datenbankeinträgen ausschließlich in der Retina stattfindet.

Das Gen *BET1* („*Bet1-Homolog*“) zeigte in allen cDNAs RT-PCR-Produkte und ist nicht geprägt.

Die Expression von *COL1A2* („*Collagen Alpha-2 type I*“) ließ sich aus Gehirn-cDNA, jedoch nicht in Lymphoblasten detektieren.

*CAS1* („*Drosophila homolog*“) ließ sich aus Gehirn-cDNA amplifizieren, ist jedoch in Lymphoblasten zu schwach exprimiert, um in einer Erstrunden-PCR nachgewiesen werden zu können.

*SGCE* („*Epsilon Sarcoglycan*“) wies in den maternalen UPD7 Zelllinien eine fehlende bzw. vergleichsweise sehr schwache Expression auf und ist vorwiegend paternal exprimiert.

*PEG10* („*Paternally Expressed Gene 10*“) ließ sich aus lymphoblastoide cDNA der Kontrollzelllinie und der paternalen UPD7 amplifizieren, fehlte jedoch in den beiden maternalen UPD7 cDNAs. Zum semi-quantitativen Vergleich wurden Multiplex-RT-PCRs für *GAPDH* als internen Standard und *PEG10* angesetzt. Die *GAPDH*-Banden waren in allen cDNAs etwa gleich stark, während keine spezifischen Banden für *PEG10* aus den maternalen UPD7 cDNAs amplifiziert wurden. *PEG10* ist in allen fetalen und adulten Geweben, mit Ausnahme von Gehirn, maternal geprägt und nur paternal exprimiert (Piras et al. 2000).

Das Pseudogen „*Similar to ADP ribosylation factor*“ wurde nicht auf genomische Prägung hin untersucht.

Die Gene für Neurabin („*Hypothetical protein FLJ20068*“) und *PON1* („*Paraoxonase 1*“) ließen sich aus Gehirn-cDNA, jedoch nicht aus Lymphoblasten-cDNA amplifizieren.

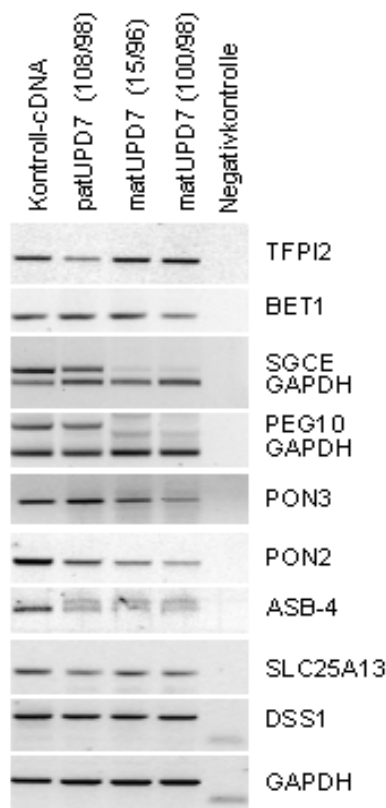
*PON3* („*Paraoxonase 3*“) und *PON2* („*Paraoxonase 2*“) waren aus allen cDNAs gut amplifizierbar und sind nicht geprägt.

*ASB-4* („*Ankyrin-repeat and SOCS Box-containing 4*“) wurde aus Lymphoblasten im 3'UTR der cDNA von 1278 bis 1475 bp amplifiziert. In den maternalen und paternalen UPD7 cDNAs war *ASB-4* als leichte Doppelbande amplifizierbar und ist nicht geprägt. In „*Genbank*“ wurden verschiedene Varianten von *ASB-4* dokumentiert, die durch alternatives Spleißing der cDNA am 3'-Ende entstehen und die Amplifikation der Doppelbande erklären. Die größere PCR-Bande mit einer Fragmentgröße von 198 bp wurde sequenziert und ließ sich einer cDNA-Sequenz von *ASB-4* spezifisch zuordnen.

*PDK4* („*Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isoenzyme 4*“) ließ sich aus Gehirn-cDNA, jedoch nicht aus Lymphoblasten-cDNA amplifizieren.

*DNC11* („*Dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 1*“) wurde nicht auf Transkriptionsebene untersucht, da ESTs in der Datenbank nur in speziellen Gehirnregionen beschrieben wurden.

*SLC25A13* („*Solute Carrier family 25, member 13; Citrin*“) und *DSS1* („*Deleted in Split-hand/Split-foot 1 region*“) zeigten in allen cDNAs annähernd gleichstarke RT-PCR-Banden und sind nicht geprägt.



**Abb. 3-16: Vergleich der Genexpressionen zwischen maternalen und paternalen uniparentalen Disomien von Chromosom 7 (UPD7) und einer GAPDH-Kontroll-Amplifikation über RT-PCR mit cDNAs aus lymphoblastoiden Zelllinien. In den maternalen UPD7 cDNAs ist SGCE nur sehr schwach amplifizierbar und PEG10 nicht spezifisch amplifizierbar. SGCE und PEG10 sind maternal geprägte Gene, die auf dem mütterlichen Allel nur schwach oder nicht exprimiert werden. Die umliegenden Gene auf Chr.7q21 TFPI2, BET1 proximal, sowie PON3, PON2, ASB-4, SLC25A13 und DSS1 distal sind nicht geprägt.**

Gen	LB	Gehirn	Prägungsstatus	cDNA bp
<i>CALCR</i>	-	-	?	488 bis 898
<i>TFPI2</i>	+	?	nicht geprägt	567 bis 993
<i>GNGT1</i>	-	-	?	-3 bis +376
<i>BET1</i>	+		nicht geprägt	22 bis 305
<i>COL1A2</i>	-	+	?	95 bis 529
<i>CAS1</i>	-	+	?	332 bis 524
<i>SGCE</i>	+	+	maternal geprägt	679 bis 1070
<i>PEG10</i>	+	+	maternal geprägt	868 bis 1297
Neurabin ( <i>FLJ20068</i> )	-	+	?	244 bis 621
<i>PON1</i>	-	?	?	33 bis 415
<i>PON3</i>	+	?	nicht geprägt	64 bis 407
<i>PON2</i>	+	?	nicht geprägt	247 bis 690
<i>ASB-4</i>	+	+	nicht geprägt	1278 bis 1475
<i>PDK4</i>	-	+	?	56 bis 450
<i>SLC25A13</i>	+	?	nicht geprägt	1180 bis 1554
<i>DSS1</i>	+	?	nicht geprägt	60 bis 420

**Tab. 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse der RT-PCRs.** Expression von Genen in lymphoblastoiden Zelllinien (LB) und Gehirn sowie deren Prägungsstatus, der mit RT-PCRs aus cDNA von UPD7 lymphoblastoiden Zelllinien analysiert wurde. Einige Gene waren nicht in einer ersten PCR-Runde amplifizierbar und konnten nicht untersucht werden. Die cDNA-Amplifikation ist ab dem Translationsstartcodon angegeben. Die Reihenfolge der Gene entspricht ihrer Lokalisation von proximal nach distal auf Chr. 7q21.3.

### 3.2.3.2 RT-PCR-Sequenzierung bei genomisch Heterozygoten

Bei genomisch Heterozygoten kann über cDNA-Sequenzierung untersucht werden, ob ein Gen monoallelisch oder biallelisch transkribiert wird. Die elterliche Herkunft der jeweiligen Allele wird über Genotypisierung der parentalen DNAs festgestellt, falls diese verfügbar sind. In 42 DNAs von Zellkulturen wurden für die Gene (*CAS1*, *PON3*, *ASB-4* und *SGCE*) Polymorphismen im codierenden Bereich und in den 3'UTR und 5'UTR gesucht. Außerdem wurde nach codierenden und nicht-codierenden SNPs gesucht, die in der SNP-Datenbank (dbSNP) angegeben waren.

Zur Expressionsanalyse wurden die lymphoblastoiden Zellkulturen der genomisch heterozygoten DNAs kultiviert und aus den Zellen RNA isoliert (RNeasy Mini Kit und RNase-free DNase Set, QIAGEN). Weitere drei RNAs wurden aus Frischblut heterozygoter *SGCE*-Mutationsträger isoliert.

Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben (*First-strand* cDNA Synthese Kit, Amersham Biosciences) und mit einer *GAPDH*-RT-PCR überprüft. Dann wurde die cDNA in einer RT-PCR im Bereich des Polymorphismus amplifiziert und sequenziert.

## **CAS1**

Für *CAS1* war keine heterozygote Zelllinie vorhanden. Bei der Sequenzierung von Exon 8 und Exon 11 von *CAS1* konnten in den 42 DNAs lymphoblastoider Zelllinien keine Sequenzvarianten nachgewiesen werden.

### **Expression von *PON3* in Zellkultur mit Polymorphismus**

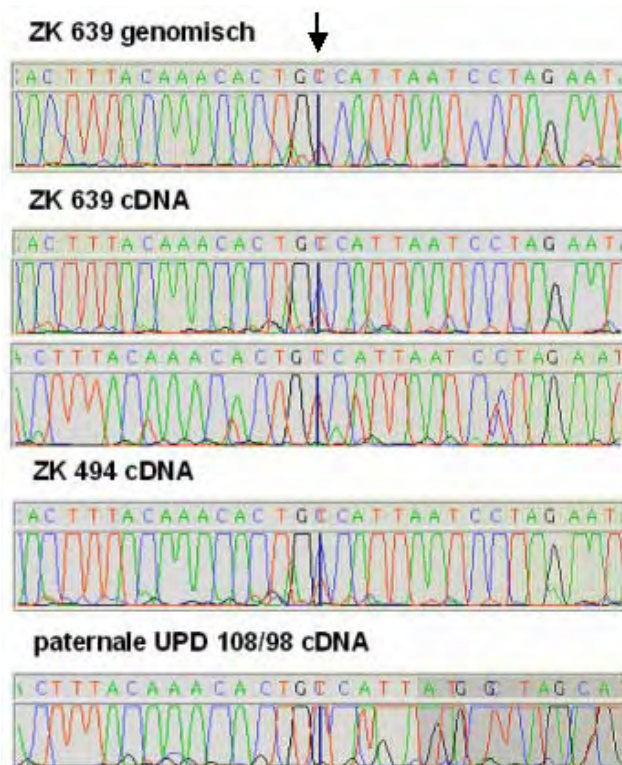
Eine biallelische Expression von *PON3* wurde durch RT-PCR-Sequenzierung in zwei genomisch heterozygoten Zellkulturen nachgewiesen. In Exon 4 von *PON3* wurde in zwei DNAs ein synonymes SNP mit den Allelen G und A an Basenpaarposition 297 der cDNA (297G>A; A99A) identifiziert. Über die Sequenzierung der elterlichen DNAs war die Herkunft der Allele bei zwei der Heterozygoten eindeutig nachvollziehbar. Die heterozygoten Nachkommen erben beide das Allel A vom Vater, das Allel G von der Mutter. Bei #16162 war die Mutter homozygot G, der Vater heterozygot A/G. Bei #16443 war der Vater homozygot A, die Mutter heterozygot A/G.

Die aus den Zellkulturen von #16162 und #16443 isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in eine RT-PCR eingesetzt. *PON3* wurde mit cDNA-Primern von 209 bp bis 407 bp amplifiziert und sequenziert. In den Elektropherogrammen war bei beiden cDNAs eine biallelische Expression der Allele G und A von *PON3* festzustellen. In der Zellkultur von #16162 waren die Sequenzintensitäten von G und A gleich hoch, während bei Zellkultur von #16443 die Sequenzintensität für G höher war als für A.

### **Expression von *ASB-4* in Zellkultur mit Polymorphismus**

Von *ASB-4* wurde zur Bestätigung der RT-PCR-Ergebnisse eine weitere Expressionsanalyse durchgeführt, da es über RT-PCR im intronfreien 3'UTR amplifiziert wurde. Im *ASB-4*-Gen wurden der 5'UTR von -315 bis +34 bp und der 3'UTR von 1248 bis 1618 bp (342 bp nach dem Stoppcodon) sequenziert. Dabei konnte im 3'UTR ein häufiger SNP mit den Allelen C und T in Basenpaarposition 1412 entdeckt werden. Weil *ASB-4* in lymphoblastoiden Zellen nur gering exprimiert wird, wurde von der Erstrunden-RT-PCR von *ASB-4* eine zweite PCR-Runde mit einem nach innen versetzten („*nested*“) Primer durchgeführt und sequenziert. Die RT-PCR-Sequenzierungen der genomisch heterozygoten lymphoblastoiden Zelllinien #639 und #494 im 3'UTR ergaben die Allele C und T auch in der cDNA (Abb. 3-17) und zeigten damit eine biallelische Expression an. Bei der paternalen UPD7 (108/98), die auf cDNA-Ebene ebenfalls die beiden Allele C und T aufweist, handelt es sich um eine Heteroisodisomie, bei der die zwei verschiedenen Allele des Vaters von Chr. 7 an den Nachkommen weitergegeben wurden.





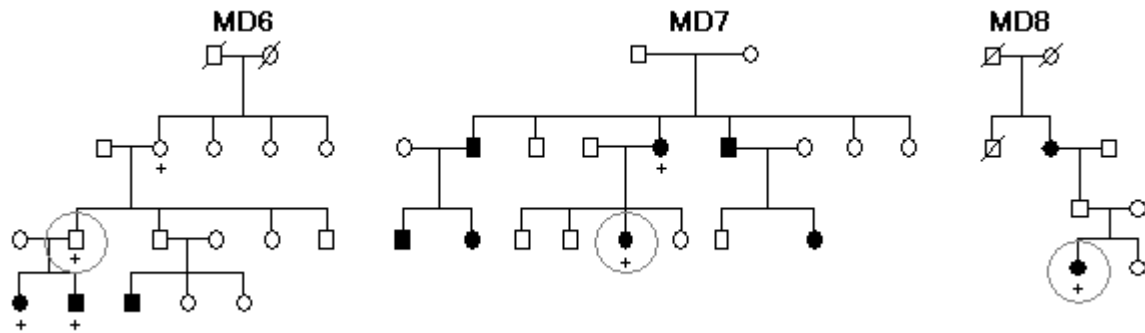
**Abb. 3-17: Sequenzierung von ASB-4 in Patienten mit heterozygoter Sequenzvariante.** Die genomische Sequenzierung einer DNA (oben) mit der heterozygoten Sequenzvariante zeigte die Allele T und C mit gleicher Intensität. Die RT-PCR-Sequenzierungen von drei cDNAs aus lymphoblastoiden Zelllinien wiesen die Transkription der beiden Allele von ASB-4 nach. Das Verhältnis der Sequenzintensitäten der Allele variierte geringfügig.

### Expression von SGCE in Zellkultur mit Polymorphismus

In einer Zellkultur mit heterozygotem Polymorphismus wurde eine Expression von vorwiegend paternalen, aber auch maternalen Allelen von SGCE gezeigt. Für SGCE wurden die 42 DNAs, von denen Zellkulturen existieren, im 5'UTR von -103 bp bis +116 bp und im 3'UTR von 1250 bp bis 1691 bp von SGCE auf Polymorphismen hin sequenziert. Im 3'UTR wurde in cDNA Basenpaarposition 1415 ein Polymorphismus mit den Allelen A und G in der männlichen Kontroll-DNA #15012 gefunden. Da die DNA-Sequenzierung der Mutter einen homozygoten Status des Allels A ergab, wird ein paternaler Ursprung des Allels G angenommen. Aus der lymphoblastoiden Zellkultur von #15012 wurde RNA isoliert. Eine RT-PCR-Sequenzierung der cDNA wurde von 1252 bis 1516 bp durchgeführt. Im Elektropherogramm war der Polymorphismus ebenfalls heterozygot sichtbar, obwohl die Sequenzintensität des paternalen Allels G etwa doppelt so hoch war wie die des maternalen Allels A. Selbst bei RT-PCRs mit unterschiedlicher Zyklenzahl (18, 20, 22, 25 und 30 Zyklen) war eine biallelische Expression der Allele A und G in der Zellkultur zu erkennen. Das PCR-Produkt von 30 Zyklen RT-PCR wurde subkloniert. Davon wurden 10 Klone gepickt und sequenziert, wobei 3 Klone das maternale Allel A aufwiesen, und 7 das paternale Allel G.

### Expression von SGCE in Frischblut heterozygoter Mutationsträger

Eine rein monoallelisch paternale Expression von SGCE wurde in Leukozyten-cDNAs von genomisch heterozygoten SGCE-Mutationsträgern in drei verschiedenen MDS-Familien (Abb. 3-18) vorgefunden. Die RNA wurde hier direkt aus Frischblut isoliert und durch RT-PCR-Sequenzierung analysiert.

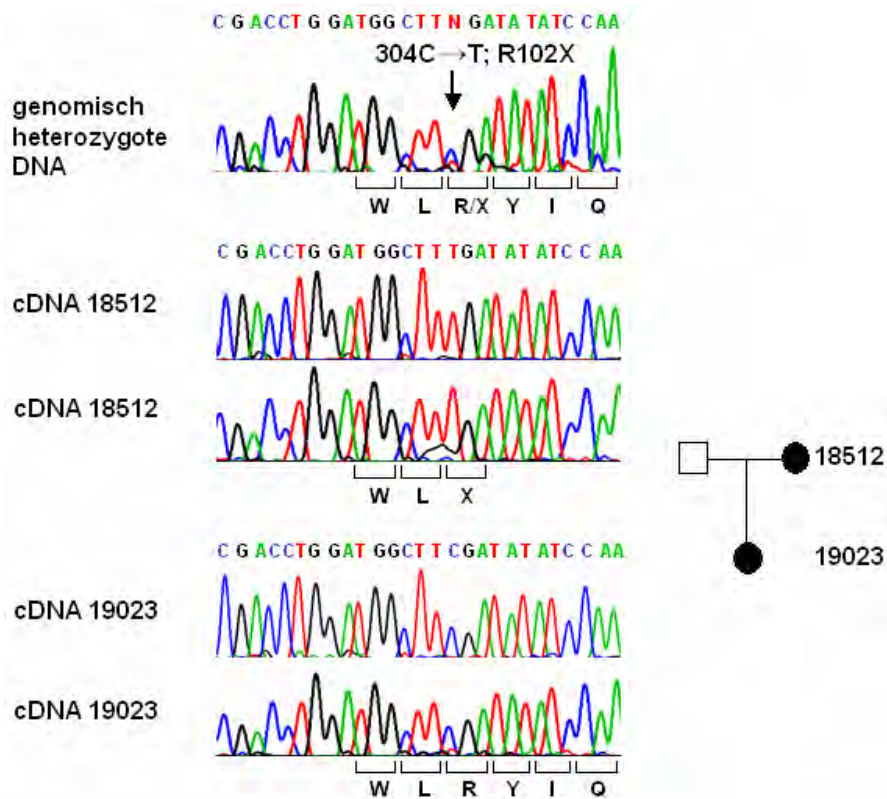


**Abb. 3-18: RT-PCR-Sequenzierung in drei heterozygoten SGCE-Mutationsträgern von verschiedenen MDS-Familien.** Aus Frischblut der markierten Patienten wurde RNA isoliert. Die Sequenzen der RT-PCRs ergaben immer eine monoallelische Expression des jeweils paternalen SGCE-Allels.

Es wurde RNA aus Frischblut eines asymptotischen Mutationsträgers (aus MD6) untersucht, bei dem nur das paternale Wildtyp-Allel exprimiert ist. Das maternale, mutierte Allel ist transkriptionell stillgelegt, so dass es nicht zur Ausprägung des MDS kommt.

Die Sequenzen der RT-PCR einer MDS-Patientin (aus MD8) zeigen eine monoallelische Expression des mutierten Allels von SGCE, das vom Vater vererbt wurde, der asymptotischer Mutationsträger ist. Auch hier wird nur das väterliche Allel des SGCE-Gens in Leukozyten exprimiert. Die Krankheitstransmission des MDS ist mit einem maternalen Prägungsmechanismus vereinbar.

Wir untersuchten in Familie MD7 eine betroffene Patientin, bei der eine maternale Transmission der Krankheit vorliegt. Die Mutation, die zu einem frühzeitigen Aminosäure-Kettenabbruch von SGCE führt, liegt in der DNA der erkrankten Mutter (#18512) und der erkrankten Tochter (#19023) heterozygot vor (Abb. 3-19 oben). In den Blutleukozyten der Mutter wird ausschließlich das mutierte SGCE-Allel exprimiert. Bei der RT-PCR-Sequenzierung von SGCE wurde nur das mutierte Allel T detektiert (Abb. 3-19 Mitte). Die erkrankte, genomisch heterozygote Tochter (#19023) zeigte auf Transkriptionsebene ebenfalls eine monoallelische Expression von SGCE. In der cDNA-Analyse von Frischblut der Tochter zeigte sich überraschenderweise, dass nur das väterliche Wildtyp-Allel C exprimiert ist (Abb. 3-19 unten). Trotz der Expression des paternalen Wildtyp-Allels in Leukozyten, das zu einer normalen Aminosäuresequenz von SGCE führt, ist die Tochter vom MDS betroffen.



**Abb. 3-19: RT-PCR-Sequenzierung heterozygoter MDS-Patienten.** Die am MDS erkrankte Tochter (#19023) erbt die Mutation von ihrer ebenfalls betroffenen Mutter (#18512). Die genomisch heterozygote Mutter (304C>T; R102X) exprimiert in Blutleukozyten nur das mutierte Allel T von SGCE, das zu einem frühzeitigen Aminosäure-Kettenabbruch führt. Die ebenfalls genomisch heterozygote Tochter zeigt in Blutleukozyten nur die Expression des gesunden paternalen Allels C, das zu einer normalen Aminosäuresequenz von SGCE führt, und ist trotzdem erkrankt.

Eine Expressionsanalyse von SGCE in Gehirngewebe war nicht möglich. Im codierenden Bereich von SGCE konnte in 33 untersuchten Gehirn-DNAs kein Polymorphismus gefunden werden. Gehirn-Gewebe von MDS-Patienten zum direkten Nachweis monoallelischer oder biallelischer Expression von SGCE stand nicht zur Verfügung.

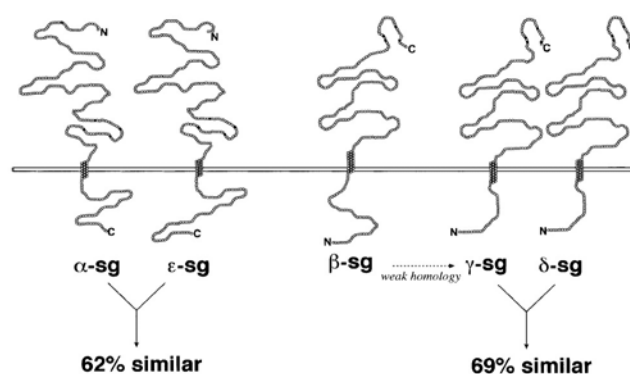
## 4 Diskussion

### 4.1 Die Sarkoglykan-Proteinfamilie

#### 4.1.1 Homologie der Sarkoglykane

Sarkoglykane sind N-glykosylierte Proteine mit einer Transmembrandomäne (Ozawa et al. 1998). Bei Invertebraten kennt man drei Sarkoglykan-Gene, aus denen vermutlich durch Genduplikationsereignisse in Säugern zusätzliche Sarkoglykane entstanden sind (Wheeler et al. 2002). Im Menschen sind die sechs Sarkoglykan-Gene Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und Zeta- Sarkoglykan bekannt. Das Epsilon-Sarkoglykan wurde der Sarkoglykanfamilie aufgrund seiner Homologie und der nahezu identischen Exon-Intron-Struktur zu Alpha-Sarkoglykan („Adhalin“, *SGCA*; NM\_000023) zugeordnet (McNally et al. 1998). *SGCE* und *SGCA* sind auf Nukleotidebene zu 41 % identisch und besitzen auf Proteinebene eine Ähnlichkeit von 62 % (Abb. 4-1 und Abb. 4-2) (McNally et al. 1998).

Alpha- und Epsilon- Sarkoglykan sind Typ 1 Transmembranproteine mit einem extrazellulären N-Terminus, während die übrigen Sarkoglykane der Sarkoglykanfamilie Typ 2 Transmembranproteine sind, deren N-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. Die Gamma-, Delta- und Zeta- Sarkoglykane besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen (Abb. 4-1, Alignment im Anhang) und konservierte Exon-Intron-Strukturen (Crosbie et al. 2000; Wheeler et al. 2002). Diese Proteine sind untereinander zu 48 – 58 % identisch, während das Beta-Sarkoglykan auf Proteinebene zu 23 - 25 % mit ihnen identisch ist und nur eine schwache Homologie zeigt (Alignment im Anhang).



**Abb. 4-1: Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit der Sarkoglykane** aus (Hack et al. 2000). Alpha- und Epsilon- Sarkoglykan sind Typ 1 Transmembranproteine. Ihre Aminosäuresequenzen weisen eine Ähnlichkeit von 62 % auf. Alle weiteren bekannten Sarkoglykane sind Typ 2 Transmembranproteine. Die Aminosäuresequenzen der Gamma- und Delta- Sarkoglykane sind zu 69 % ähnlich und besitzen eine schwache Homologie zu Beta-Sarkoglykan.

```

1
AS_SGCA_hs ~~~~~~MA ETLFWTP... .LLVVLLAGL GDTEAQQTTL
AS_SGCE_hs MQLPRWWELG DPCAWTGQGR GTRRMSPATT GTFLLTVYSI FSKVHSDRNV

51
AS_SGCA_hs HPLVGRV FVH TLDHETFLSL PEHVAVPPAV H...ITYHAH LQGH PDLPRW
AS_SGCE_hs YPSAGVLFVH VLEREYFKGE FPPYPKPGEI SNDPITFNTN LMGYPDRPGW

101
AS_SGCA_hs LRYTQRSPHH PGFLYGSATP EDRG.LQVIE VTAYNRDSFD TTRQRLVLEI
AS_SGCE_hs LRYIQRTSYS DGVLYGSPTA ENVGKPTIE ITAYNRRTFE TARHNLINI

151
AS_SGCA_hs GDPEGPLLPY QAEFLVRSHD AEEVLPSTPA SRFLSALGGL WEPGELQLLN
AS_SGCE_hs MSAEDFPLPY QAEFFIKNMN VEEMLASEVL GDFLGAVKNV WQPERLNAIN

201
AS_SGCA_hs VTSALDRGGR VPLPIEGRKE GVIKVG SAS PFSTCLKMVA SPDSHARCAQ
AS_SGCE_hs ITSALDRGGR VPLPINDLKE GVIYVMGADV PFSSCLREVE NPQNQLRCSQ

251
AS_SGCA_hs GQPPLLS CYD TLAPHFRVDW CNVTLVDKSV PEPAD E VPTP GDGILEHDPF
AS_SGCE_hs EM E P VITCDK KFR TQFYIDW CKISLV D KTK QVSTYQEVIR GEGILPDGGE

301
AS_SGCA_hs FCPPTEAPD. RDFLVDALVT LLVPLL VALL L T L L LAYVMC CRREGRLKRD
AS_SGCE_hs YKPPSDSLKS RDYYTDFLIT LAVPSAVALV LFLILAYIMC CRREGVEKRN

351
AS_SGCA_hs LATSDIQMVH HCTIHGNTEE LRQMAASREV PRPLSTLPMF NVHTGERLPP
AS_SGCE_hs MQTPDIQLVH HSAIQSTKE LRDM SKNREI AWPLSTLPVF HPVTGEIIPP

401
AS_SGCA_hs R...VDSAQ VPLILDQH~ ~~~~~~ ~~~~~~
AS_SGCE_hs LHTDNYDSTN MPLMQTQONL PHQTQIPQQQ TTGWYP
437

```

**Abb. 4-2: Alignment der Aminosäuresequenzen von SGCE und SGCA.** Epsilon- und Alpha-Sarkoglykan sind auf Proteinebene zu 41 % identisch (grau unterlegt).

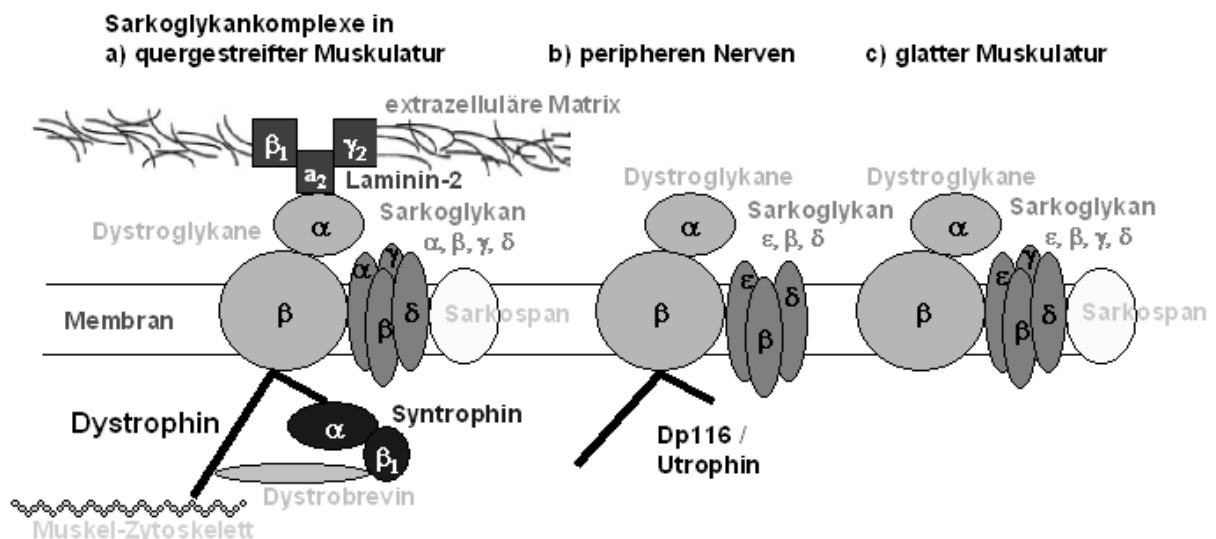
Sequenzvergleiche von *SGCE* zwischen *Homo sapiens* und *Mus musculus* ergaben Übereinstimmungen von 89 % auf Nukleotidebene (Alignment im Anhang) und von 92 % auf Proteinebene (Abb. 4-3).

	1				50
SGCE_hs_As	MQLPRWWELG	DPCAWTGQGR	GTRRMSPATT	GTFLLLTVYSI	FSKVHSDRNV
Sgce_mm_As	~~~~~	~~~~~	~~~~MSPATT	GTFLLLTVYTL	FSKVHSDRNV
	51				100
SGCE_hs_As	YPSAGVLFVH	VLEREYFKGE	FPPYPKPGEI	SNDPITFNTN	LMGYPDRPGW
Sgce_mm_As	YPSAGVLFVH	VLEREYFKGE	FPPYPKPGEV	SNDPITFNTN	LMGYPDRPGW
	101				150
SGCE_hs_As	LRYIQRTPYS	DGVLYGSPTA	ENVGKPTIIE	ITAYNRRTFE	TARHNLIINI
Sgce_mm_As	LRYIQRTPYS	DGVLYGSPTA	ENVGKPTIIE	ITAYNRRTFE	TARHNLIINI
	151				200
SGCE_hs_As	MSAEDFPLPY	QAEFFIKNMN	VEEMLASEVL	GDFLGAVKNV	WQPERLNAIN
Sgce_mm_As	MSAEEFPLPY	QAEFFIKNMN	VEEMLASEVL	GDFLGAVKNV	WQPERLNAIN
	201				250
SGCE_hs_As	ITSALDRGGR	VPLPINDLKE	GVYVMVGADV	PFSSCLREVE	NPQNQLRCSQ
Sgce_mm_As	ITSALDRGGR	VPLPINDMKE	GVYVMVGADV	AFSSCLREVE	NPQNQLRCSQ
	251				300
SGCE_hs_As	EMEPVITCDK	KFRTQFYIDW	CKISLVDKTK	QVSTYQEVIR	GEGILPDGGE
Sgce_mm_As	EMEPVITCDK	KFRTHFHIDW	CKISLVDKTK	QVSTYQEVVR	GEGILPDGGE
	301				350
SGCE_hs_As	YKPPSDSLKS	RDYYTDFLIT	LAVPSAVALV	LFLILAYIMC	CRREGVEKRN
Sgce_mm_As	YKPPSDSLKS	RDYYTDFLVT	LAVPSAVALV	LFLILAYIMC	CRREGVEKRD
	351				400
SGCE_hs_As	MQTPDIQLVH	HSAIQKSTKE	LRDMSKNREI	AWPLSTLPVF	HPVTGEIIPP
Sgce_mm_As	MQTPDIQLVH	HSSIQKSTKE	LRDMSKNREI	AWPLSTLPVF	HPVTGEVIPP
	401			437	
SGCE_hs_As	LHTDNYDSTN	MPLMQTQQNL	PHQTQIPQQQ	TTGKWYP	
Sgce_mm_As	THTDNYDSTN	MPLMQAQQNL	PHQTQIPQPQ	TTGKWYP	

**Abb. 4-3: Alignment der Aminosäuresequenzen von Epsilon-Sarkoglykan des Menschen (*homo sapiens*; hs) und der Maus (*mus musculus*; mm). Die Proteine sind zu 92 % identisch (grau unterlegt).**

## 4.1.2 Sarkoglykankomplexe

Die Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta- Sarkoglykane bilden in quergestreiften Muskeln einen heterotetrameren Sarkoglykankomplex, der ein Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGK) ist. Dieser enthält neben dem Sarkoglykankomplex eine zweite Glykoproteineinheit, die Dystroglykane Alpha und Beta, und die zyttoplasmatischen Proteine Dystrophin, Dystrobrevin und Syntrophine (Abb. 4-4 A) (Yoshida et al. 2000). Der DGK verbindet in Muskelzellen das Sarkolemma über Laminin-2 mit der extrazellulären Matrix und über Dystrophin mit dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett und dient der Stabilität der Muskelfasermembranen. Mutationen in den Genen von Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta-Sarkoglykan führen zu den autosomal rezessiven Gliedergürtel-Muskeldystrophien (LGMD) vom Typ 2C - 2F (Barresi et al. 2000), die auch als Sarkoglykanopathien bezeichnet werden. Die Mutationen führen über eine Membranstabilität, eine veränderte Permeabilität mit erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration zur Apoptose und schließlich zu einer Muskelfaserdegeneration in Herz- und Skelettmuskeln (Hack et al. 2000). Mutationen im Dystrophin-Gen führen ebenfalls zu Muskeldystrophien, die zusätzlich mit milder geistiger Retardierung assoziiert sind (Hack et al. 2000). Für die Sarkoglykanopathien existieren Tiermodelle wie kardiomyopathische Hamster und Mäuse mit dystrophischen Veränderungen der Skelett- und Herzmuskeln, die Mutationen in den Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta- Sarkoglykanen aufweisen (Liu et al. 1999; Hack et al. 2000). Für Epsilon-Sarkoglykan wurden bisher keine Tiermodelle beschrieben.



**Abb. 4-4: Sarkoglykane in Komplexen.** a) Sarkoglykane im Dystrophin-Glykoprotein-Komplex in Herz- und Skelettmuskel, abgewandelt nach Hack et al. (2000) und Porter (2000). b) Proteinkomplex mit Epsilon-Sarkoglykan, Dystroglykanen und Dystrophin-Homologen im peripheren Nerv nach Imamura et al. (2000). c) Epsilon-Sarkoglykan mit Beta-, Gamma- und Delta- Sarkoglykan, Dystroglykanen und Sarkospan in glatter Muskulatur (Straub et al. 1999; Barresi et al. 2000).

*SGCE* wird ubiquitär in allen fetalen und adulten untersuchten Geweben exprimiert und unterscheidet sich dadurch von den gewebespezifisch exprimierten Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta- Sarkoglykanen. Das Alpha-Sarkoglykan wird nur in der quergestreiften Muskulatur von Herz- und Skelettmuskeln exprimiert, Gamma-Sarkoglykan liegt zudem in glatter Muskulatur vor, wie auch die Beta- und Delta-Sarkoglykane, die außerdem in peripheren Nerven und anderen Geweben exprimiert werden. *SGCE* kann mit Komponenten des DGK in Komplexen vorliegen, deren Zusammensetzung gewebespezifisch variiert. Obwohl Epsilon-Sarkoglykan in glatter Muskulatur anstelle von Alpha-Sarkoglykan im Sarkoglykankomplex mit den Beta-, Gamma- und Delta- Sarkoglykanen und Sarkospan vorkommen kann (Abb. 4-4 C), und diesen Komplex auch in der Skelettmuskulatur bildet, scheint *SGCE* nicht als integraler Bestandteil am DGK in Muskelzellen beteiligt zu sein (Liu et al. 1999; Straub et al. 1999; Barresi et al. 2000). In MDS-Patienten mit Mutationen im Epsilon-Sarkoglykan-Gen finden sich keine Anzeichen von Muskeldystrophien (Zimprich et al. 2001). Bei Untersuchungen am Herzmuskel und bei Muskelkraftanalysen in Skelettmuskeln konnten keine Abweichungen von der Norm festgestellt werden.

In peripheren Nerven bildet Epsilon-Sarkoglykan mit Beta- und Delta- Sarkoglykan, mit den Dystroglykanen Alpha und Beta und Dystrophin-homologen Proteinen wie Utrophin oder Dp116 einen Komplex (Abb. 4-4 B) (Imamura et al. 2000).

Beim MDS handelt es sich um eine neurologische, nicht-degenerative Erkrankung. *SGCE* ließ sich in Zellkulturen neuronalen Ursprungs und in allen Regionen des adulten humanen Gehirns nachweisen. Die stärkste Expression von *SGCE* wurde in Cerebellum und Putamen vorgefunden. Diese Regionen werden mit der Pathogenese von Bewegungsstörungen in Verbindung gebracht (Perimutter et al. 1997). Bei Dystonien werden generell Dysfunktionen oder Störungen der Basalganglien vermutet (Kandel et al. 1996). Ein Myoklonus entsteht aus einer Störung des Zentralnervensystems, bei welcher spontane elektrische Entladungen generiert und über die peripheren Nerven weitergegeben werden, und eine plötzliche Muskelkontraktion verursachen (Adelmann 1999).

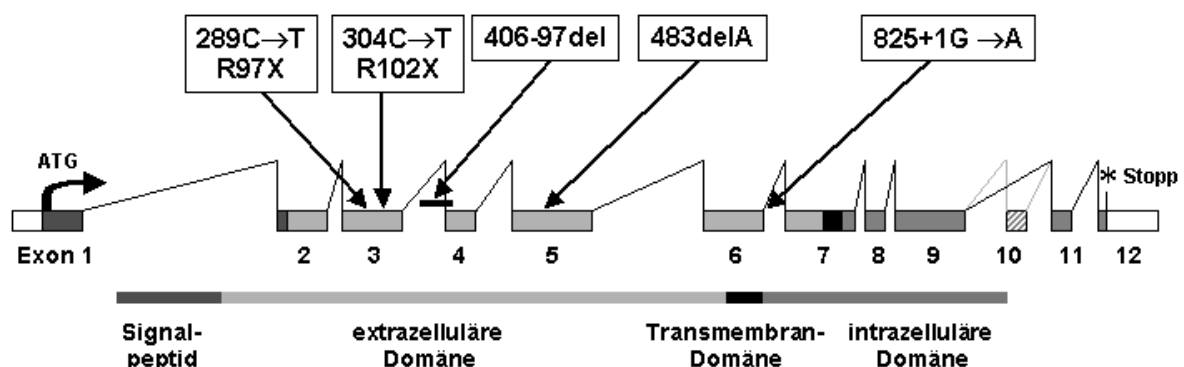
*SGCE* wurde auch in der äußeren Membran von Schwann'schen Zellen nachgewiesen (Imamura et al. 2000). Allerdings liegen keine klinischen oder elektrophysiologischen Anzeichen auf eine Erkrankung oder Schädigung der peripheren Nerven vor (Asmus et al. 2002). Die Nervenreizleitungsgeschwindigkeiten von MDS-Patienten zeigten keine Abweichungen von der Norm.



## 4.2 Mutationen im SGCE-Gen verursachen das MDS

Durch die Mutationsanalyse wurden die meisten Gene in der Kandidatenregion von Chr. 7q21.3 untersucht. Dabei wurden in den Genen *CAS1*, Neurabin (*FLJ20068*) und *DNC11* sieben synonyme Polymorphismen vorgefunden, und ein nicht-synonymer SNP im Neurabin-Gen (*FLJ20068*), der zu einem Aminosäureaustausch (R90Q) führt. Diese Polymorphismen kamen jeweils nur in einer DNA vor und wurden daher nicht als krankheitsverursachend betrachtet.

Im Gen *SGCE* wurden in allen sechs Indexpatienten der MDS-Familien heterozygote Mutationen gefunden (Abb. 4-5). Die 72 sequenzierten Kontrollallele zeigten keine Sequenzabweichungen im *SGCE*-Gen.



**Abb. 4-5: Lokalisation der fünf verschiedenen, heterozygoten Mutationen im *SGCE*-Gen. Im vorhergesagten Transmembranprotein befinden sich alle Mutationen in der extrazellulären Domäne.**

In Exon 3 wurden zwei Stoppmutationen (R97X; 289C>T in einer Familie und R102X; 304C>T in zwei Familien) identifiziert. Eine Deletion (406-97del), die Intron 3 und 15 bp von Exon 4 betrifft, bewirkt den Verlust von 5 Aminosäuren und zerstört die Spleißstelle am 5'-Ende von Exon 4. Die 1-bp-Deletion (483delA) in einer weiteren MDS-Familie führt zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stopp der Translation nach Codon 168. Außerdem wurde eine Spleißstellenmutation (825+1G>A) am 5'-Ende von Intron 6 identifiziert. Drei weitere intronische Spleißstellenmutationen in MDS-Patienten (233-1G>A, 463+6T>C, 1037+5G>A) wurden später beschrieben (Asmus et al. 2002). In 120 Kontrollchromosomen konnten keine Mutationen an den intronischen Positionen +5 oder +6 gefunden werden (Tab. 4-1).

Alle identifizierten Mutationen von *SGCE* führen zu einem vorhergesagten Funktionsverlust des Proteins. Die Stoppmutationen im *SGCE*-Gen bewirken einen Kettenabbruch bereits im extrazellulären Bereich des vorhergesagten Transmembranproteins. Spleißstellenmutationen verhindern das korrekte Spleißen der prä-mRNA und bewirken über eine aberrante mRNA-Prozessierung den Funktionsverlust des mutierten Gens.

Bei einer paternal vererbten interstitiellen Deletion zwischen 9,0 und 16,5 Mb auf Chr. 7q21.2-7q21.3, die *SGCE* und benachbarte Gene umfasst, wurden Mikrozephalie,

Kleinwüchsigkeit, Sprachverzögerung, leichte faziale Abnormalitäten und myoklonische Bewegungen (Intentionsmyoklonus) beschrieben (Deberardinis et al. 2003). Die zusätzlich zum MDS vorhandenen Symptome werden vermutlich durch Haploinsuffizienz oder genomische Prägung der weiteren deletierten Gene in diesem Bereich verursacht („*Contiguous Gene Deletion Syndrome*“) (Deberardinis et al. 2003).

Mutation in SGCE	Exon	vorhergesagte Auswirkung	Anzahl	Referenz
106+1G>A	1	Spleißstellenmutation am 5'-Ende von Intron 1	1	(Dagvadorj et al. 2002)
232G>A	2	G78S, Spleißstellenmutation am 3'-Ende von Exon 2	1	(Dagvadorj et al. 2002)
233-1G>A	3	Spleißstellenmutation am 3'-Ende von Intron 2	1	(Asmus et al. 2002)
276delG	3	M92fsX40	1	(Asmus et al. 2002)
304C>T	3	R102X	12	(Zimprich et al. 2001; Asmus et al. 2002; Han et al. 2003)
406-97del	4	del131ITAYN, Spleißstellenmutation am 5'-Ende von Exon 4	1	(Zimprich et al. 2001)
463+6T>C	4	Spleißstellenmutation am 5'-Ende von Intron 4	1	(Asmus et al. 2002)
483delA	5	Q161fsX9	1	(Zimprich et al. 2001)
556_559delGCAG	5	A186fsX1	1	(Marechal et al. 2003) starker Phänotyp
587T>G	5	L196R	1	(Klein et al. 2002) mit <i>DYT1</i> del323FTKLDY328
734_737delAATT	6	Q245fsX10	1	(Asmus et al. 2002)
825+1G>A	6	Spleißstellenmutation am 5'-Ende von Intron 6	1	(Zimprich et al. 2001)
835_839delACAAA	7	T279fsX17	2	(Klein et al. 2002; Han et al. 2003) mit / ohne <i>DRD2</i> V154I
856C>T	7	Q286X	1	(Asmus et al. 2002)
884_885insT	7	P296fsX2	1	(Foncke et al. 2003) mit Epilepsie
1037+5G>A	7	Spleißstellenmutation am 5'-Ende von Intron 7	1	(Asmus et al. 2002)
Chr. 7q21 del von ca. 9-16.5 Mb		Deletion des SGCE-Gens und benachbarter Gene	1	(Deberardinis et al. 2003) „ <i>Contiguous Gene Deletion Syndrome</i> “

**Tab. 4-1: Übersicht über Mutationen im SGCE-Gen mit cDNA-Position, betroffenem Exon und vorhergesagter Auswirkung. Es wird angenommen, dass alle SGCE-Mutationen zu einem Funktionsverlust führen. Zusätzlich zur SGCE-Mutation wurde in einem Fall eine Missensemutation im DRD2-Gen beschrieben, in einem anderen Fall wurde ferner eine Deletion ohne Leserahmenverschiebung im DYT1-Gen detektiert.**

Es wird über eine genetische Heterogenität des MDS diskutiert, bei der Mutationen von verschiedenen Genen zum gleichen Krankheitsbild führen (Rieß 2002). In einer Familie wurde ein neuer Locus für das MDS auf Chr. 18p11 kartiert, nachdem keine Mutation im SGCE-Gen gefunden wurde (Grimes et al. 2002). Angemerkt sei, dass das MDS aufgrund seiner klinisch heterogenen Ausprägung oft nur schwer zu diagnostizieren ist (Rieß 2002).

### **4.3 Untersuchungen auf genomische Prägung**

Stammbaumanalysen von MDS-Familien zeigten ein deutliches Ungleichgewicht in der Penetranz abhängig vom elterlichen Ursprung des Krankheitsallels. Die vorherrschend paternale Transmission des mutierten Allels auf MDS-Patienten ließ einen maternalen Prägungsmechanismus für das krankheitsverursachende *SGCE*-Gen vermuten. Das murine Epsilon-Sarkoglykan-Gen (*Sgce*) wurde zudem als monoallelisch paternal exprimiert beschrieben (Piras et al. 2000).

Zur Untersuchung geprägter Gene wurden Methoden ausgewählt, mit denen die Prägung in der genomischen DNA und auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden kann. Auf DNA-Ebene wurde die Cytosin-Methylierung in CpG-Dinukleotiden untersucht. Die Methode der genomischen Bisulfitsequenzierung diente dem Nachweis einer differentiell methylierten Region im Promotorbereich von *SGCE*. Geprägte Gene zeigten auf transkriptioneller Ebene eine bevorzugte oder ausschließlich monoallelische Expression eines elterlichen Allels.

#### **4.3.1 Bewertung der Bisulfitsequenzierungsmethode**

Mit der genomischen Bisulfitsequenzierung wurde eine CpG-Insel, die im Promotorbereich des *SGCE*-Gens lokalisiert ist, auf ihre Methylierung hin untersucht. Bei der Bisulfitsequenzierung können Fehlerquellen, Artefakte und Probleme auftreten, die im Folgenden analysiert werden sollen.

Zur Bisulfit-PCR-Amplifikation steht nur sehr wenig modifizierte DNA zur Verfügung, da die DNA bei der Denaturierung mit Natronlauge fragmentiert wird (Rein et al. 1998) und nach der Natriumbisulfitbehandlung etwa 84 - 96 % der eingesetzten DNA degradiert sind (Grunau et al. 2001).

Nach der Bisulfitumwandlung sind der codierende und nicht-codierende Strang nicht mehr komplementär zueinander. In dieser Arbeit wurde der Methylierungsstatus auf dem nicht-codierenden Strang untersucht, der bei der Transkription die Vorlage für die messenger-RNA darstellt (Strachan et al. 1996). Es wird angenommen, dass die Methylierung der DNA symmetrisch vorliegt (Eden et al. 1994; Tomatsu et al. 2002).

Zur Amplifikation bisulfitmodifizierter DNA wurden „methylierungsunabhängige“ Primer verwendet, die außerhalb von CpG-Dinukleotiden liegen und DNA unabhängig von ihrem Methylierungsmuster amplifizieren. Die heterogenen Amplifikate wurden subkloniert. Durch Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone wurde der Methylierungsstatus von DNA-Einzelsträngen untersucht.

##### **4.3.1.1 Artefakte und Fehler der Bisulfitumwandlung**

Bei der Bisulfitbehandlung muss eine vollständige und selektive Umwandlung unmethylierter Cytosine gewährleistet werden. Liegt die DNA vor allem in GC-reichen Sequenzen nicht

komplett denaturiert als Einzelstrang vor, erfolgt eine unvollständige Bisulfitumwandlung und es bleiben falsch positive Cytosine in der Sequenz (Thomassin et al. 1999). Unter optimalen Bedingungen werden  $99,48 \pm 0,39$  % der unmethylierten Cytosine durch die Bisulfitbehandlung in Uracile umgewandelt (Grunau et al. 2001). Nachdem die Methylierung von Cytosinen außerhalb von CpG-Dinukleotiden in Säugern nicht erwiesen ist (Gruenbaum et al. 1982; Bestor et al. 1983), wurden unmethylierte Cytosine außerhalb von CpGs zur Beurteilung der Effektivität der Umwandlung herangezogen. Zwischen den Primern sind in der DNA-Sequenz 85 Cytosine, von denen 25 in CpG-Position liegen und methyliert sein können. In den Bisulfitsequenzen wurden 99,85 % der Cytosine außerhalb von CpGs umgewandelt, was einer nahezu vollständigen Bisulfitumwandlung entspricht.

Obwohl die Bisulfitumwandlung sehr selektiv ist, können bei längeren Reaktionszeiten auch methylierte Cytosine desaminiert und in Uracil umgewandelt werden (Wang et al. 1980; Grunau et al. 2001). Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Reaktion 5-Methyl-Cytosin  $\rightarrow$  Uracil ist zwar sehr langsam, jedoch bleiben dadurch möglicherweise 2 - 3 % der methylierten Cytosine in CpGs als falsch Negative unentdeckt (Wang et al. 1980).

#### 4.3.1.2 PCR-Artefakte

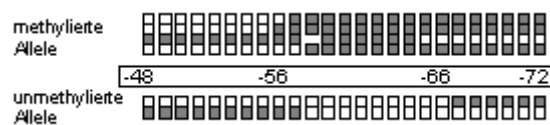
In einer Population von PCR-Fragmenten können durch den fehlerhaften Einbau von Basen durch die Taq-DNA-Polymerase Sequenzabweichungen entstehen, die nach Herstellerangaben mit einer Häufigkeit von 1 : 1000 Basenpaaren auftreten. Bei der Sequenzierung subklonierter Einzelfragmente werden Sequenzabweichungen entdeckt.

Es wurden insgesamt 182 Abweichungen von den erwarteten Bisulfitsequenzen beobachtet, die sich über 51136 bp der 136 Klone verteilen (Tab. 4-2). Davon sind 50 Sequenzabweichungen, die nicht in CpGs liegen, aufgrund ihrer Häufigkeit von 0,1 % Taq-DNA-Polymerasefehlern zuzuschreiben. Die übrigen 132 Sequenzabweichungen, die in CpG-Dinukleotiden liegen, repräsentieren geringfügige Abweichungen vom generellen Methylierungsmuster des Allels. Auf methylierten DNA-Strängen erschienen 5,8 % der Cytosine in CpGs als unmethyliert, und in unmethylierten DNA-Strängen wichen 2,1 % der Cytosine in CpGs vom erwarteten Methylierungsmuster ab. Es wird angenommen, dass in biologischen Systemen selten ein vollkommen einheitliches Methylierungsmuster vorliegt.

Sequenzabweichung	Anzahl	mögliche Ursachen
C unmethyliert→U in CpG 5mC→U C→T	95	nicht 100 % methyliert vorliegende DNA-Stränge, desaminierte 5-Methyl-Cytosine, Taq-DNA-Polymerasefehler
5mC→C U→C	37	nicht 100 % unmethyliert vorliegende DNA-Stränge, Taq-DNA-Polymerasefehler
C unmethyliert→C in CpH	12	Taq-DNA-Polymerasefehler
A→G in DpN	27	Taq-DNA-Polymerasefehler
G→T in DpN	5	Taq-DNA-Polymerasefehler
G→C in DpN	1	Taq-DNA-Polymerasefehler
G→A in DpN	3	Taq-DNA-Polymerasefehler
T→G in DpN	1	Taq-DNA-Polymerasefehler
C→A in CpH	1	Taq-DNA-Polymerasefehler

**Tab. 4-2: Abweichungen von den erwarteten Bisulfitsequenzen.** Die CpG-Dinukleotide der DNA-Stränge weichen zu 2,1 - 5,8 % vom generellen Methylierungsmuster des Allels ab. Die Sequenzabweichungen außerhalb von CpGs (in DpN oder CpH) sind auf Taq-DNA-Polymerasefehler zurückzuführen.

In Ausnahmefällen traten bei der Bisulfitsequenzierung Klone mit erheblich unterschiedlicher Methylierung auf. Sechs Klone von 136 hatten mindestens sechs aufeinanderfolgende CpG-Dinukleotide, die randständig positioniert waren, und von dem Methylierungsstatus der übrigen CpG-Dinukleotide abwichen (Abb. 4-6). Solche Klone, die zur einen Hälfte methyliert, zur anderen unmethyliert waren, wurden auch in der Literatur beschrieben (Zeschnigk et al. 1997), und sind vermutlich PCR-Artefakte, die durch eine fehlerhafte Anlagerung und Verlängerung von PCR-Fragmenten entstanden sind (PCR-Hybride) (Warnecke et al. 1997).



**Abb. 4-6: PCR-Hybride.** DNA-Stränge, deren randständige CpG-Dinukleotide in ihrer Methylierung vom üblichen Methylierungsstatus des Stranges abweichen, sind vermutlich PCR-Artefakte. Unter den 136 Klonen waren sechs PCR-Hybride.

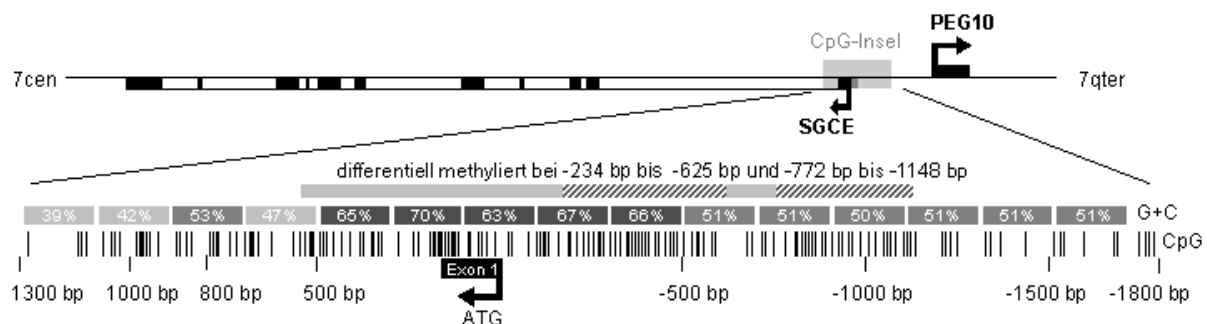
Die Subklonierung liefert Informationen über das Verhältnis von methylierten zu unmethylierten Allelen im Bisulfitamplifikat. Es wurden meist mehr unmethylierte als methylierte Klone vorgefunden. Nachdem sich in drei DNAs die methylierten und unmethylierten DNA-Stränge über Polymorphismen verschiedenen elterlichen Ursprüngen zuordnen ließen, konnte ausgeschlossen werden, dass in den untersuchten DNAs mehr DNA-Stränge im unmethylierten Zustand vorlagen. Bei Voss et al. (1998) und Warnecke et

al. (1997) wurde eine unausgeglichene Amplifikation von methylierten und unmethylierten DNA-Strängen in der Bisulfit-PCR beschrieben. Eine geringere Amplifikation methylierter DNA-Stränge wird aufgrund der GC-reicheren Basenzusammensetzung vermutet, die mehr Sekundärstrukturen und eine erhöhte Schmelztemperatur mit sich bringt (Voss et al. 1998).

#### 4.3.2 SGCE weist eine maternal methylierte Promotorregion auf

Geprägte Gene weisen differentiell methylierte Regionen (DMRs) auf, die meist CpG-reich sind und in Abhängigkeit vom elterlichen Ursprung auf einem Allel methyliert, auf dem anderen unmethyliert vorliegen. Die Ausdehnung der DMRs variiert zwischen geprägten Genen. Die Position der Methylierung muss experimentell herausgefunden werden (El Kharroubi et al. 2001).

Innerhalb der CpG-Insel, die den Promotorbereich und das erste Exon des *SGCE*-Gens umspannt, wurde das Methylierungsmuster mit der genomischen Bisulfitsequenzierung untersucht. Neben der differentiellen Methylierung von 25 CpG-Dinukleotiden im Bereich von -772 bis -1148 bp existierten weitere 28 differentiell methylierte CpG-Dinukleotide im Bereich von -234 bis -625 bp vor dem Initiationscodon von *SGCE* (Abb. 4-7) (Müller et al. 2002). Möglicherweise sind auch weitere Bereiche der CpG-Insel differentiell methyliert.



**Abb. 4-7: Differentiell methylierte Regionen** wurden in der CpG-Insel (grauer Balken) auf Chr. 7q21.3 im Bereich von -234 bp bis -625 bp und von -772bp bis -1148 bp (schattiert) vor dem Translationsstart von *SGCE* nachgewiesen. Der G+C-Gehalt der Sequenz ist in % angegeben.

Die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierungen zeigten, dass in peripheren Blutleukozyten das maternale Allel methyliert ist. Das paternale Allel liegt unmethyliert vor. Bei methylierten Allelen waren 91 - 97 % der CpG-Dinukleotide methyliert, bei unmethylierten Allelen waren 0 - 5 % der CpG-Dinukleotide methyliert.

In zwei DNAs aus Gehirngewebe wurde ebenfalls eine allelspezifische differentiell methylierte Region nachgewiesen. Der elterliche Ursprung der Allele konnte nicht ermittelt werden. Es wird angenommen, dass wie in Leukozyten auch im Gehirn das methylierte Allel maternalen Ursprungs ist.

Die CpG-Dinukleotide lymphoblastoider Zellkulturen maternaler und paternaler UPD7 wiesen ebenfalls das entsprechende elternspezifische Methylierungsmuster auf. Die maternalen

UPD7-DNAs zeigten zu über 94 % methylierte Allele, während die Klone der Bisulfidsequenzierung der paternalen UPD7 komplett unmethyliert waren.

Der Methylierungsstatus der Allele variierte leicht und ohne Präferenz für bestimmte CpG-Positionen und entspricht den üblichen Abweichungen in biologischen Systemen. In der PWS/AS-Region auf Chr. 15q11 - q13 wurde eine DMR in der *SNRPN*-Region beschrieben, deren 23 CpG-Dinukleotide auf dem maternalen Allel zu 94 - 97 % methyliert waren und auf dem paternalen Allel komplett unmethyliert vorlagen (Zeschnigk et al. 1997).

Die in dieser Arbeit beschriebene DMR ist auf Chr. 7q21.3 zwischen *SGCE* und *PEG10* lokalisiert. Diese Gene sind beide paternal exprimiert und werden in entgegengesetzte Richtung transkribiert (Abb. 4-7), so dass die DMR vor dem Transkriptionsstart beider Gene lokalisiert ist und bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen könnte (Smallwood et al. 2003).

### **4.3.3 Bewertung der Methoden der Expressionsanalyse**

Über RT-PCR-Amplifikation wurde in cDNAs aus UPD7-Zellkulturen maternalen bzw. paternalen Ursprungs die Expression verschiedener Gene von Chr. 7q21.3 getestet, um Gene zu identifizieren, die elternspezifisch exprimiert sind. Es wurde keine DNA-Kontamination der cDNAs beobachtet. Für die RT-PCRs wurden mit Ausnahme von *PEG10* und *ASB-4* intronüberspannende cDNA-Primer verwendet, um eine genomische Amplifikation auszuschließen. Einige Gene auf Chr. 7q21.3 waren in lymphoblastoiden Zelllinien zu niedrig exprimiert, um über RT-PCR nachgewiesen zu werden.

Für die differentiell exprimierten Gene *SGCE* und *PEG10* wurden Multiplex-PCRs mit *GAPDH* angesetzt, in denen die Expression des Gens mit der Expression von *GAPDH* als interne Kontrolle verglichen wurde.

Weiterhin wurden Expressionsanalysen in Zelllinien durchgeführt, in denen sich die Allele der Gene *PON3*, *ASB-4* oder *SGCE* durch Polymorphismen unterscheiden ließen.

Nachdem sich in Zelllinien unter Kulturbedingungen die Methylierungs- und Expressionsmuster verändern können, ist es fraglich, ob sich cDNAs von Zelllinien für Expressionsanalysen eignen. Es wurden in lymphoblastoiden Zellkulturen sowohl *de novo* Methylierungen als auch Demethylierungen beschrieben, die zu einer veränderten Expression von Genen führen (Hannula et al. 2001c). Ob solche Veränderungen auch die Methylierung geprägter Gene betreffen, wurde nicht untersucht. Diese Möglichkeit muss bei der Interpretation der eigenen Expressionsergebnisse mit Zellkulturen berücksichtigt werden. Die Bisulfidsequenzierung der DMR von *SGCE* zeigte keine veränderten Methylierungsmuster der UPD7-Zellkulturen im Vergleich zu Frischgewebe. Eine Expressionsänderung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Bestätigung der paternalen Expression von *SGCE* wurden Expressionsanalysen aus Frischblut von drei genomisch heterozygoten *SGCE*-Mutationsträgern durchgeführt.

### 4.3.4 Paternale Expression von *SGCE* und *PEG10*

In den Expressionsanalysen wurden *SGCE* und benachbarte Gene auf eine mögliche monoallelische Expression untersucht. Dazu wurden cDNAs von verschiedenen lymphoblastoiden Zelllinien und von peripheren Lymphoblasten verwendet.

#### 4.3.4.1 RT-PCR von *SGCE* und anderen Genen auf 7q21.3 in UPD7

Über RT-PCR lässt sich eine allelspezifische Expression geprägter Gene in cDNAs aus lymphoblastoiden Zelllinien mit UPD7 maternalen bzw. paternalen Ursprungs nachweisen. *SGCE* und *PEG10* sind maternal geprägt und zeigten eine bevorzugte monoallelische paternale Expression. In den beiden maternalen UPD7 war die Expression von *SGCE* sehr stark reduziert. Die Transkription von *SGCE* erfolgt bevorzugt vom paternalen Allel.

Die Expression von *PEG10* war in beiden maternalen UPD7 cDNAs nicht nachweisbar. *PEG10* wird monoallelisch paternal exprimiert und ist ein maternal geprägtes Gen.

Die Gene *TFPI2*, *BET1*, *PON3*, *PON2*, *ASB-4*, *SLC25A13* und *DSS1* haben eine biallelische Expression in lymphoblastoiden Zelllinien und sind nicht geprägt.

#### 4.3.4.2 Expressionsanalyse in Zelllinien mit Polymorphismus

Von Zellkulturen, in denen die elterlichen Allele über einen Polymorphismus in *PON3*, *ASB-4* oder *SGCE* unterschieden werden konnten, wurde eine cDNA-Sequenzierung durchgeführt.

Die biallelische Expression von *PON3*, die bereits in maternalen und paternalen UPD7-cDNAs gezeigt werden konnte, wurde in zwei heterozygoten Zelllinien bestätigt.

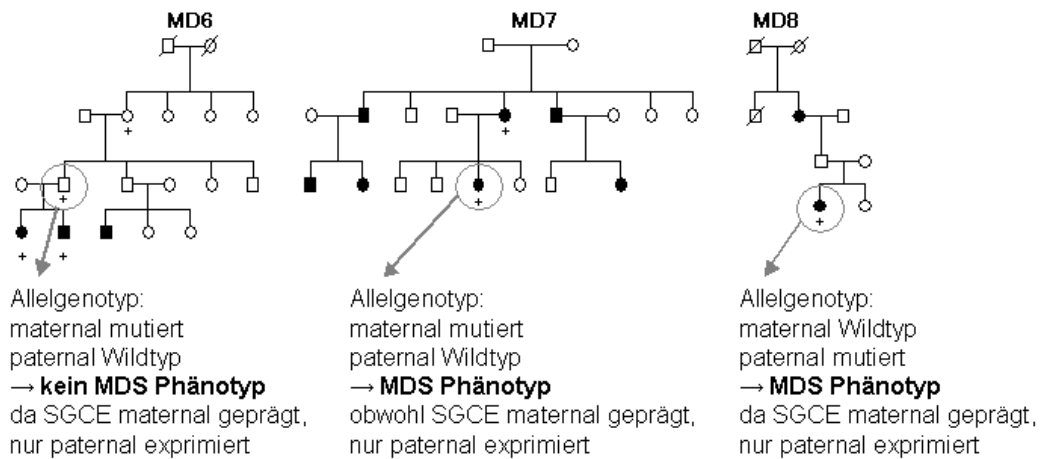
In den drei lymphoblastoiden Zelllinien mit heterozygotem Polymorphismus in *ASB-4* wurde eine biallelische *ASB-4*-Expression vorgefunden. Damit wurde das Ergebnis der biallelischen Expression in maternalen sowie paternalen UPD7-cDNAs bestätigt. Anders als in der Maus, in der *Asb-4* maternal exprimiert vorliegt (Mizuno et al. 2002), wird *ASB-4* in menschlichen lymphoblastoiden Zelllinien biallelisch exprimiert.

Bei der cDNA-Sequenzierung einer Zellkultur mit Polymorphismus in *SGCE* erschien die Expression von *SGCE* biallelisch, mit stärkerer Expression des paternalen Allels. Möglicherweise kam es in dieser Zelllinie zur Veränderung der Genexpression unter Kulturbedingungen (Hannula et al. 2001c). Eine Lockerung der maternalen Prägung könnte die Transkription des maternalen Allels bewirkt haben.

#### 4.3.4.3 Expressionsanalyse in heterozygoten *SGCE*-Mutationsträgern

Eine monoallelische Expression des paternalen Allels von *SGCE* wurde in drei heterozygoten *SGCE*-Mutationsträgern vorgefunden, bei denen eine cDNA-Sequenzierung aus Frischblut durchgeführt wurde (Abb. 4-8). Die peripheren Blutleukozyten waren keinen Kulturbedingungen ausgesetzt und reflektieren den *in vivo* Expressionsstatus von *SGCE*.





**Abb. 4-8: Expressionsanalyse von drei heterozygoten SGCE-Mutationsträgern.** Bei der cDNA-Sequenzierung aus Frischblut wurde in allen drei Fällen (markiert) eine Expression des paternalen Allels von SGCE detektiert.

Selbst bei der maternalen Transmission des MDS in Familie MD7 war bei der Tochter nur das paternale Allel exprimiert. Ob das maternale Allel in geringem Ausmaß zusätzlich exprimiert wird, konnte nicht ausgeschlossen werden, weil heterozygote Allele bei der Sequenzierung nur semiquantitativ detektiert werden. Wird ein Allel zu ca. 5 % exprimiert, tritt es bei der Sequenzierung möglicherweise nur als Hintergrundrauschen im Elektropherogramm auf und bleibt unentdeckt (Kwok et al. 1994; Marth et al. 2001).

#### 4.3.4.4 Expression kann gewebespezifisch variieren

Das für das MDS als neuronale Erkrankung relevante Gewebe ist vermutlich das zentrale Nervensystem. In der Maus ist *Sgce* in allen Geweben maternal geprägt. Im Gehirngewebe der Maus findet jedoch auch eine schwache Expression des maternalen Allels statt (Piras et al. 2000). Nachdem die allelspezifische Expressionsregulation geprägter Gene gewebespezifisch variieren kann (Meguro et al. 2001), könnte auch im menschlichen Gehirn das *SGCE*-Gen nicht geprägt vorliegen. Eine monoallelische Expression des paternalen Allels von *SGCE* konnte in Gehirngewebe mangels cDNA-Polymorphismus nicht untersucht werden. Es fand sich aber eine allelspezifische Methylierung. Höchstwahrscheinlich ist im menschlichen Gehirn, wie auch in den Leukozyten, das maternale Allel methyliert. Es ist daher anzunehmen, dass *SGCE* im Gehirn ebenfalls maternal geprägt vorliegt und nicht biallelisch exprimiert wird.

Bei einer unterschiedlichen Expression geprägter Gene in verschiedenen Geweben wird erwartet, dass diese wie z.B. in den murinen, reziprok geprägten Genen *Igf2* und *H19* durch ein verändertes Methylierungsmuster der Allele reflektiert wird (Feil et al. 1994b).

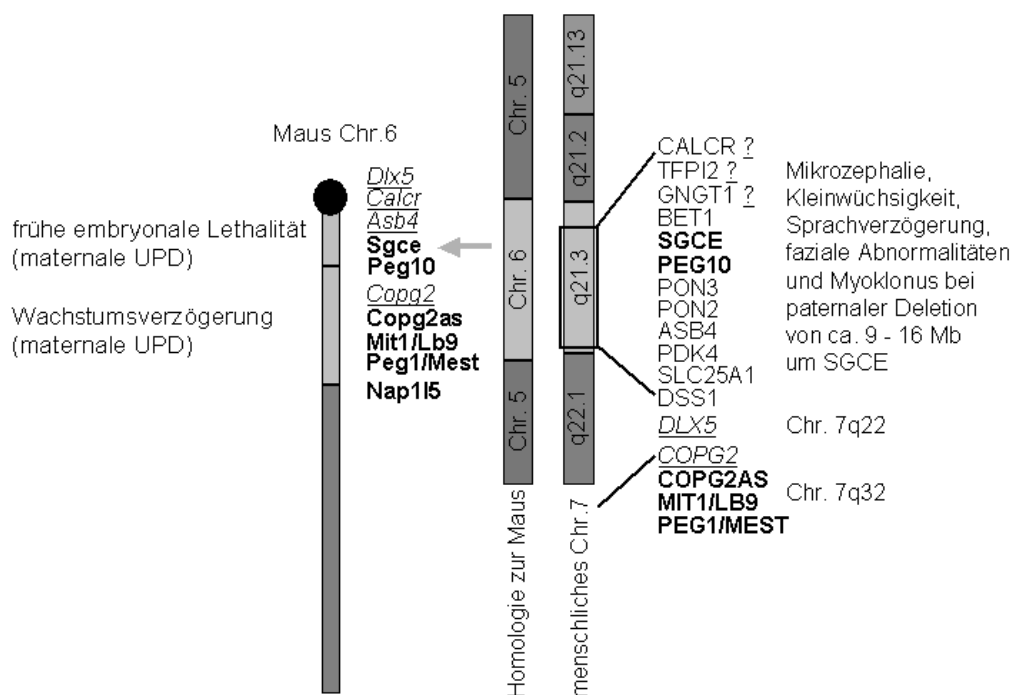
### 4.3.5 Prägungsstatus in der Maus und im Menschen

Von den über 50 bekannten geprägten Genen weisen einige einen konservierten Prägungsstatus zwischen Mensch und Maus auf.

In der Maus liegt das *Sgce*-Gen im proximalen Bereich auf Chr. 6, dessen Region eine Synthenie zum humanen Chr. 7q21 aufweist (Abb. 4-9) (McNally et al. 1998). Eine maternale uniparentale Vererbung dieses Bereiches von Chr. 6 ist in der Maus mit einer frühen embryonalen Lethalität vor dem 11. Tag verbunden und läßt ein oder mehrere maternal geprägte Gene vermuten, während Embryonen mit paternaler UPD6 lebensfähig sind (Cattanach et al. 1997; Beechey et al. 2000).

Die bekannten geprägten Gene der Maus in dieser Region sollen mit dem Prägungsstatus der orthologen Gene des Menschen auf Chr. 7q21.3 verglichen werden.

Das murine *Sgce*-Gen ist, wie auch das menschliche *SGCE*, maternal geprägt und wird in fast allen adulten und fetalen Geweben von *Mus musculus* überwiegend vom väterlichen Allel exprimiert.



**Abb. 4-9: Vergleich geprägter Gene beim Menschen auf Chr. 7q21.3 und der synthenen Region auf dem Maus-Chr. 6, abgewandelt nach (Beechey et al. 2000). Maternal exprimierte (paternal geprägte) Gene sind kursiv unterstrichen, paternal exprimierte (maternal geprägte) Gene sind fett markiert. Die übrigen Gene sind nicht geprägt bzw. mit unbekanntem Prägungsstatus (?).**

Die Expression des *Sgce*-Gens fehlt in uniparentalen parthenogenetischen Maus-Fibroblastenzelllinien und lässt sich selbst nach Exposition mit Histondeacetylase- und/oder Methyltransferase-Inhibitoren, die auf Chromatinebene die Prägungsmerkmale der Histondeacetylierung bzw. der Cytosin-Methylierung löschen, nicht reaktivieren (El Kharroubi

et al. 2001). Der Prägungsstatus einiger anderer Gene konnte auf diese Weise aufgehoben werden.

Das distal von *Sgce* gelegene Gen *Peg10* wird in der Maus wie in menschlichen Lymphoblasten nur paternal exprimiert (Kobayashi et al. 1997; Ono et al. 2003). *PEG10* ist durch die Integration eines Retrotransposons entstanden (Ono et al. 2001). In Mäusen bewirkte die Integration von Retrotransposon IAP („*Intracisternal Particle A*“) eine geprägte Expression eines nahegelegenen endogenen Agouti-Gens (Duhl et al. 1994; Morgan et al. 1999). In Analogie dazu könnte durch die Methylierung des maternalen Allels zur Stilllegung des viralen, transponierbaren Elements *PEG10* die Prägung von *SGCE* auf Chr. 7q21.3 entstanden sein.

Proximal von den maternal geprägten Genen *Sgce* und *Peg10* bei 1,0 cM (Piras et al. 2000) ist das paternal geprägte *Asb-4* auf dem Mausechromosom 6 bei 0,6 cM lokalisiert. In der Maus liegt *Asb-4* maternal exprimiert vor (Mizuno et al. 2002), während die biallelische Expression von *ASB-4* in menschlichen lymphoblastoiden Zelllinien gegen eine paternale Prägung von *ASB-4* im Menschen spricht.

Die Gene Neurabin (*FLJ20068*), *Pon2* und *Pon3* zeigten in embryonalen Stadien der Maus eine bevorzugte maternale Expression, die in neonatalen Geweben biallelisch wurde (Ono et al. 2003). In menschlichen Lymphoblasten waren *PON2* und *PON3* biallelisch exprimiert. Der Prägungsstatus von *CALCR*, dessen Mausortholog maternal geprägt vorliegt, wird im Menschen diskutiert (Okita et al. 2003). Für *DLX5* wurde in der Maus und in humanen Lymphoblasten eine maternale Expression vorgefunden (Beechey et al. 2000; Okita et al. 2003).

Neben der Prägung in der Region 7q21, in der *SGCE* und *PEG10* liegen, gibt es Anzeichen auf weitere geprägte Regionen auf dem Chromosom 7. Die Hinweise kommen von Erkrankungen, bei denen ein Prägungsmechanismus eine Rolle spielt, und die auf das Chr. 7 kartieren.

Aufgrund des SRS-Phänotyps bei maternaler UPD7 wird angenommen, dass geprägte Gene auf Chr. 7 in den Kandidatenregionen auf Chr. 7p11.2 - 13 und 7q31 - qter lokalisiert sind (Hannula et al. 2001b; Hitchins et al. 2001; Kotzot et al. 2001).

Bei der Vererbung von Autismus, einer neuropsychiatrischen Erkrankung mit gestörter Kommunikation und gestörten sozialen Interaktionen sowie repetitiven Interessen und Verhaltensweisen, wurde unter anderem eine mögliche paternale Assoziation mit Chr. 7q in den Bereichen 7q21.3 - q22 und 7q31 - q33 beschrieben (Ashley-Koch et al. 1999; Andres 2002). Beim Williams-Beuren-Syndrom (OMIM 194050) wurde eine mögliche Assoziation mit einer Deletion maternalen Ursprungs auf Chr. 7q11.23 beschrieben (Perez Jurado et al. 1996). Aufgrund von Deletionen und einer paternalen Monosomie wird auf Chr. 7q22 ein geprägtes Kandidatengen für die adulte akute myeloische Leukämie vermutet (Katz et al.

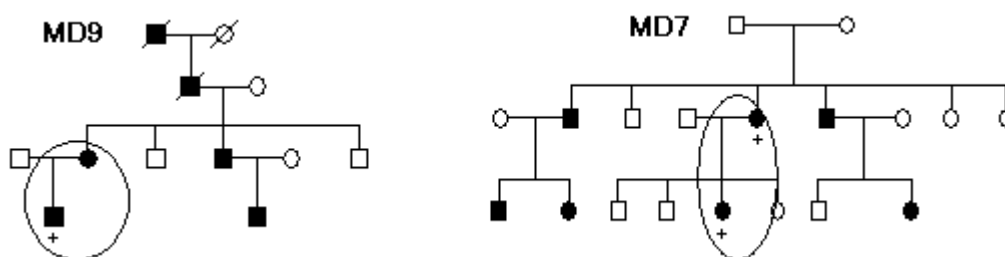
1992; Frohling et al. 2001). Der Bereich auf Chr. 7q21 - 31 könnte für Chorionkarzinome eine Rolle spielen (Ono et al. 2001).

Weiterhin wurden einzelne geprägte Gene auf Chr. 7 beschrieben. Das Gen *GBR10* auf Chr. 7p11.2 - 12 ist in einer stark isoform- und gewebespezifischen Art geprägt. In zahlreichen fetalen Geweben werden alle *GBR10*-Spleißvarianten biallelisch exprimiert. Im Gehirn werden die meisten *GBR10*-Isoformen nur vom paternalen Allel transkribiert, und im Skelettmuskel wird eine Isoform nur vom maternalen Allel exprimiert (Blagitko et al. 2000; Yoshihashi et al. 2000; McCann et al. 2001).

Das Gen *PEG1/MEST* auf Chr. 7q32 wird in fetalen Geweben paternal exprimiert, in Blutleukozyten biallelisch (Riesewijk et al. 1997; Yamasaki et al. 2000). Bei der Expression von *PEG1* in einer maternalen UPD7 wird vermutet, dass die Transkription von einem alternativen Promotor ausgeht (Cuisset et al. 1997). Das *Antisense*-Transkript *PEG1-AS/MESTIT* ist zwischen den zwei Promotoren von *PEG1* lokalisiert und wird paternal exprimiert (Nakabayashi et al. 2002). Zu dem benachbarten Gen *COPG2* auf Chr. 7q32, das paternal oder biallelisch exprimiert vorgefunden wurde, existiert ein geprägtes *Antisense*-Transkript *CIT1* in Intron 20 (Yamasaki et al. 2000).

#### 4.3.6 Transmission des MDS

Der Vererbungsmodus des MDS entspricht der Annahme einer maternalen Prägung für *SGCE*. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit hängt somit von der elterlichen Herkunft der Mutation ab. Bei der genetischen Beratung muss mitberücksichtigt werden, dass die Transmission des MDS zu 6 - 10 % abweichend von einer maternal geprägten Vererbung erfolgen kann (Tab. 3-2, S. 45). In diesen Ausnahmefällen wird das MDS von der Mutter vererbt. Familie MD7 und MD9 zeigen je eine maternale Transmission des MDS (Abb. 4-10). In beiden Stammbäumen erscheint das MDS als autosomal dominante Erkrankung.



**Abb. 4-10: Ausnahmen von maternal geprägter Transmission des MDS.** In den Familien MD9 und MD7 wird das MDS mit der Mutation von der betroffenen Mutter auf das Kind weitervererbt. Das Gen scheint hier nicht maternal geprägt zu sein. In der Tochter von MD7 war in peripheren Leukozyten dennoch nur das paternale Allel exprimiert.

Von der MDS-Patientin aus MD7, bei der eine maternale Transmission vorliegt, wurde in peripheren Blutleukozyten die monoallelische Expression des paternalen Wildtyp-Allels

nachgewiesen. *SGCE* liegt auch hier im peripheren Blut maternal geprägt vor, obwohl die mütterliche Transmission der Mutation zu einem betroffenen MDS-Phänotyp führte. Die Bisulfidsequenzierung von DNA peripheren Blutes dieser Patientin detektierte eine DMR im Promotorbereich von *SGCE* und bestätigte den maternalen Prägungsstatus von *SGCE*. Warum die Mutation auf dem maternalen Allel trotz der überwiegend paternalen Expression des Wildtyp-Allels den MDS-Phänotyp hervorrufen konnte, ist unklar.

Möglicherweise wird die Prägung von *SGCE* in Geweben, die für die Pathogenese des MDS entscheidend sind, reduziert oder aufgehoben wird. Ein solcher gewebespezifischer Verlust der Prägung wurde für das geprägte Gen *IGF2* in Wilms-Tumoren beschrieben (Steenman et al. 1994).

Die zusätzliche Expression des mutierten maternalen Allels müsste einen dominant-negativen Effekt oder Dosiseffekt ausüben, um einen MDS-Phänotyp hervorzurufen. Als dominant-negative Mutation wird eine Mutation bezeichnet, die zu einem veränderten Genprodukt führt, das in Heterozygoten die Funktion eines Wildtyp-Genprodukts blockieren kann (Strachan et al. 1996). Die Struktur des mutierten Proteins könnte eine Komplexbildung oder Protein-Interaktion verhindern. Gegen einen dominant-negativen Effekt der Mutation R102X im *SGCE*-Gen spricht, dass in Familie MD10, in der dieselbe Mutation vorliegt wie in MD7, bei einer mütterlichen Transmission der Mutation die Generation von der Krankheit übersprungen wird.

Möglicherweise bestimmt die Gendosis von *SGCE* die Pathogenese des MDS. Ein Locus, bei dem eine Verminderung der Aktivität um 50 % phänotypische Auswirkungen hat, ist gendosisempfindlich (Strachan et al. 1996). Auf *SGCE* als geprägtes Gen übertragen könnte dies bedeuten, dass phänotypische Auswirkungen auftreten, wenn die Aktivität des mutierten maternalen Allels unzureichend unterdrückt wird, oder die Expression des Wildtypallels nicht ausreichend hoch ist.

Weiterhin ist es möglich, dass in den Fällen der maternalen Transmission die Prägung von *SGCE* z.B. im Gehirngewebe umgekehrt wurde, und *SGCE* nun nur maternal exprimiert wird. *SGCE* könnte in einigen Geweben auch als metastabiles Epiallel vorliegen, bei dem die Stilllegung der Allele eher zufällig bzw. nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom elterlichen Ursprung erfolgt (Rakyan et al. 2002).

#### **4.3.7 Uniparentale Disomien von Chromosom 7 (UPD7)**

Die klinischen Ausprägungen der maternalen UPD7 wie prä- und postnatale Wachstumsstörungen, vor allem Kleinwüchsigkeit und Dysmorphiezeichen, sind auch typisch für das Silver-Russel-Syndrom (SRS) (Kap. 1.5.2.3, S. 13) (Kotzot et al. 1995). Als Kandidatenregionen für das SRS sind die Bereiche auf Chr. 7p11.2 - 13 und 7q31 - qter beschrieben, in denen ein oder mehrere maternal geprägte Gene vermutet werden (Hitchins

et al. 2001). Eine paternale UPD7 scheint dagegen keine Auswirkungen auf Wachstum und Entwicklung zu haben (Hoglund et al. 1994).

Bei Patienten mit maternaler UPD7 müsste die fehlende Expression des maternal geprägten *SGCE*-Gens zu Symptomen des MDS führen. Allerdings sind keine neurologischen Symptome des MDS bei SRS-Patienten mit maternaler UPD7 beobachtet worden (persönliche Mitteilung von Dr. D. Kotzot). Es stellt sich die Frage, ob bei uniparentalen Disomien die Genexpression verändert wird, und ein stark betroffenen Phänotyp verhindert oder abgeschwächt wird, der aufgrund der unausgeglichene Expression geprägter Gene auftreten würde?

Es wurde beobachtet, dass die Ausprägung des Angelman-Syndroms in Fällen mit paternaler UPD15 oder Imprintingmutationen schwächer sind, als bei Patienten mit einer Mutation im Gen *UBE3A* (Bottani et al. 1994; Saitoh et al. 1997). Auch beim Silver-Russel-Syndrom wurden vergleichsweise mildere Phänotypen bei SRS-Patienten mit maternaler UPD7 beschrieben (Preece et al. 1997; Hannula et al. 2001a), die einen „Rettungsmechanismus“ bei uniparentalen Disomien vermuten lassen. Eine in der Literatur beschriebene maternale UPD7 war mit intrauteriner Wachstumsverzögerung assoziiert, zeigte jedoch keine Symptome des SRS (Kotzot et al. 1995).

In Patienten mit maternaler UPD7 könnten „Rettungsmechanismen“ die fehlende Expression von *SGCE* kompensieren, abschwächen oder aufheben, und das Auftreten des MDS-Phänotyps verhindern. Es besteht die Möglichkeit, dass bei maternaler UPD7 alternative Transkripte von *SGCE* aktiviert werden, oder die Stilllegung des geprägten maternalen Allels gelockert oder aufgehoben wird.

Eine Lockerung der Prägung von *SGCE* konnte in den maternalen UPD7-Zelllinien auf Methylierungsebene nicht festgestellt werden. Die Allele waren im untersuchten Abschnitt zu über 94 % einheitlich methyliert und entsprachen der durchschnittlich erwarteten Methylierung geprägter Allele (Zeschnigk et al. 1997). Ob die Methylierung bei UPD7-Patienten in anderen Geweben wie im Gehirn verändert vorliegt, ist unbekannt.

In drei heterozygoten *SGCE*-Mutationsträgern wurde *SGCE* in peripheren Lymphoblasten monoallelisch vom paternalen Allel exprimiert, während in den beiden maternalen UPD7-Zelllinien die Expression von *SGCE* sehr schwach detektierbar war. Das deutet darauf hin, dass in maternalen UPD7-Zelllinien trotz Methylierung die Expression des maternalen Allels nicht vollkommen unterdrückt wird. Die schwache Rest-Expression von *SGCE* könnte das Auftreten von MDS-Symptomen bei maternaler UPD7 verhindern.

Die Beschreibung eines Patienten mit einer Deletion von ca. 9 - 16 Mb auf dem paternalen Chr. 7q21 bekräftigt wiederum, dass *SGCE* ein maternal geprägtes Gen ist (Deberardinis et al. 2003). Durch die Deletion des paternalen *SGCE*-Gens und die fehlende Expression wurden die myoklonischen Bewegungen hervorgerufen (Deberardinis et al. 2003).

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde über positionelle Klonierung das Gen *SGCE* identifiziert. Mutationen in diesem Gen sind die Ursache für das Myoklonus-Dystonia-Syndrom (MDS). In den MDS-Patienten von sechs Familien wurden fünf verschiedene, heterozygote Mutationen im Gen für *SGCE* gefunden, die zu einem vorhergesagten Funktionsverlust des Epsilon-Sarkoglykan-Proteins führen. Die Diagnostik für das MDS wurde in Form einer Sequenzmutationsanalyse im *SGCE*-Gen etabliert.

Die Vererbung des MDS wurde in Stammbaumanalysen näher charakterisiert. In allen betroffenen Personen war eine Mutationen im *SGCE*-Gen nachweisbar. Beim MDS wurde ein autosomal dominanter Vererbungsmodus mit reduzierter Penetranz angenommen, da nicht alle Mutationsträger betroffen sind.

Hinweise auf eine mögliche maternale Prägung von *SGCE* waren einerseits die Transmission des MDS in Abhängigkeit vom elterlichen Ursprung des mutierten Allels und andererseits die monoallelisch paternale Expression des Maus-Orthologen *Sgce*-Gens. Es wurde deshalb der Prägungsstatus des *SGCE*-Gens in der genomischen DNA und auf transkriptioneller Ebene untersucht.

Durch genomische Bisulfitsequenzierung wurde in der CpG-Insel im Promotorbereich von *SGCE* eine differentiell methylierte Region (DMR) in humanen Leukozyten und in Gehirngewebe nachgewiesen. In lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten mit uniparentalen Disomien von Chromosom 7 (UPD7) und in DNAs, deren parentale Allele über eine Sequenzvariante unterschieden werden können, waren die Cytosine von CpG-Dinukleotiden auf dem maternalen Allel nahezu vollständig methyliert nachweisbar, während das paternale Allel unmethyliert vorlag.

Expressionsanalysen in Leukozyten bestätigten, dass die Methylierung des mütterlichen Allels zur transkriptionellen Stilllegung führt. In Blutleukozyten wurde *SGCE* ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert. Die allelspezifische Expression des *SGCE*-Gens wurde auch in UPD7-Zelllinien nachgewiesen. Das *SGCE*-Gen war in einer paternalen UPD7-Zelllinie exprimiert. In zwei maternalen UPD7-Zelllinien war die Expression dagegen nur sehr schwach nachweisbar.

*SGCE* liegt auf Chromosom 7 in der Region 7q21.3. In diesem Bereich wurden 8 weitere Gene auf eine differentielle Expression zwischen maternalen und paternalen UPD7-cDNAs untersucht. Das zu *SGCE* benachbarte Gen *PEG10* zeigte ebenfalls eine maternale Prägung. Darüber hinaus konnten keine weiteren geprägten Gene nachgewiesen werden.

Das MDS wird meist über eine väterliche Transmission des mutierten Allels übertragen und ist mit einer maternalen Prägung vereinbar. In zwei von mindestens 14 Fällen, in denen die Mutter das mutierte *SGCE*-Gen vererbte, wurde jedoch das MDS beobachtet. Im einen Ausnahmefall maternaler Transmission wurde das Methylierungsmuster und die Expression von *SGCE* in peripheren Lymphozyten untersucht. Die Bisulfidsequenzierung ergab eine differentiell methylierte Promotorregion. Auf Expressionsebene wurde lediglich das väterliche Allel, das keine Mutation trug, detektiert. Warum es in dieser Situation zur Ausprägung des MDS kommt, ist unklar. Die Expression von *SGCE* konnte nicht in anderen Geweben untersucht werden. Eine veränderte bzw. relaxierte Prägung von *SGCE* im zentralen Nervensystem, dem für das MDS als neuronale Erkrankung vermutlich relevanten Gewebe, könnte eine Erklärung für die maternale Transmission in Einzelfällen sein.

Welche pathophysiologische Rolle *SGCE* beim MDS spielt, ist noch nicht geklärt. Die Verteilung und Lokalisation des ubiquitär exprimierten Epsilon-Sarkoglykans in Zellen des Nervensystems ist nur teilweise bekannt. Ob *SGCE* als Transmembranprotein mit anderen Proteinen Komplexe bildet oder interagiert, ist wenig untersucht. Um bindende Proteine zu identifizieren, bieten sich verschiedene Interaktionsanalysen an. Weiterführend könnte über funktionelle Promotoranalysen in Zellkulturen die Regulation der Expression des *SGCE*-Gens untersucht werden.



## 6 Literatur

- Adelmann G. (1999). "Encyclopedia of Neuroscience". Boston, Basel, Stuttgart, Birkhäuser.
- Alberts B., Bray D., et al. (1994). "Molecular Biology of the Cell". New York, Garland Publishing.
- Altschul S.F., Gish W., et al. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215** (3): 403-10.
- Andres C. (2002). "Molecular genetics and animal models in autistic disorder." *Brain Res Bull* **57** (1): 109-19.
- Angelman H. (1965). ""Puppet children" : a report of three cases." *Dev. Med. Child Neurol.* **7**: 681-3.
- Antequera F. and Bird A. (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (24): 11995-9.
- Arima T., Drewell R.A., et al. (2001). "A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus." *Hum Mol Genet* **10** (14): 1475-83.
- Ashley-Koch A., Wolpert C.M., et al. (1999). "Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7." *Genomics* **61** (3): 227-36.
- Asmus F., Zimprich A., et al. (2001). "Inherited Myoclonus-dystonia syndrome: narrowing the 7q21-q31 locus in German families." *Ann Neurol* **49** (1): 121-4.
- Asmus F., Zimprich A., et al. (2002). "Myoclonus-dystonia syndrome: epsilon-sarcoglycan mutations and phenotype." *Ann Neurol* **52** (4): 489-92.
- Avner P. and Heard E. (2001). "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation." *Nat Rev Genet* **2** (1): 59-67.
- Bachman K.E., Rountree M.R., et al. (2001). "Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin." *J Biol Chem* **276** (34): 32282-7.
- Barresi R., Moore S.A., et al. (2000). "Expression of gamma-sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex." *J Biol Chem* **275** (49): 38554-60.
- Becker P.B. (2002). "Nucleosome sliding: facts and fiction." *Embo J* **21** (18): 4749-53.
- Beechey C.V., Cattanach B.M., et al. (2000). Mouse Imprinting Data and References. *MRC Mammalian Genetics Unit (online)* <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting/imprinting.html>.
- Bell A.C. and Felsenfeld G. (2000). "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene." *Nature* **405** (6785): 482-5.
- Bestor T.H. and Ingram V.M. (1983). "Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** (18): 5559-63.

- Bhattacharya S.K., Ramchandani S., et al. (1999). "A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA." *Nature* **397** (6720): 579-83.
- Bird A.P. (1995). "Gene number, noise reduction and biological complexity." *Trends Genet* **11** (3): 94-100.
- Blagitko N., Mergenthaler S., et al. (2000). "Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion." *Hum Mol Genet* **9** (11): 1587-95.
- Bottani A., Robinson W.P., et al. (1994). "Angelman syndrome due to paternal uniparental disomy of chromosome 15: a milder phenotype?" *Am J Med Genet* **51** (1): 35-40.
- Bourc'his D., Xu G.L., et al. (2001). "Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints." *Science* **294** (5551): 2536-9.
- Brandeis M., Kafri T., et al. (1993). "The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse." *Embo J* **12** (9): 3669-77.
- Buiting K., Saitoh S., et al. (1995). "Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15." *Nat Genet* **9** (4): 395-400.
- Burgers W.A., Fuks F., et al. (2002). "DNA methyltransferases get connected to chromatin." *Trends Genet* **18** (6): 275-7.
- Cardoso M.C., Joseph C., et al. (1997). "Mapping and use of a sequence that targets DNA ligase I to sites of DNA replication in vivo." *J Cell Biol* **139** (3): 579-87.
- Cardoso M.C., Sporbert A., et al. (1999). "Structure and function in the nucleus: subnuclear trafficking of DNA replication factors." *J Cell Biochem Suppl* **32-33**: 15-23.
- Cattanach B.M. and Beechey C.V. (1997). "Imprinting (Reik, W., and Surani, M.A., Eds.)." *Frontiers in Molecular Biology*: 118-145, Oxford Univ. Press, Oxford.
- Cattanach B.M. and Kirk M. (1985). "Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice." *Nature* **315** (6019): 496-8.
- Cedar H. and Verdine G.L. (1999). "Gene expression. The amazing demethylase." *Nature* **397** (6720): 568-9.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162** (1): 156-9.
- Chuang L.S., Ian H.I., et al. (1997). "Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1." *Science* **277** (5334): 1996-2000.
- Clark J.M. (1988). "Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* **16** (20): 9677-86.
- Clark S.J., Harrison J., et al. (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." *Nucleic Acids Res* **22** (15): 2990-7.
- Collins F.S. (1995). "Positional cloning moves from perditional to traditional." *Nat Genet* **9** (4): 347-50.

- Constancia M., Pickard B., et al. (1998). "Imprinting mechanisms." *Genome Res* **8** (9): 881-900.
- Cooper D.N. and Krawczak M. (1989). "Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes." *Hum Genet* **83** (2): 181-8.
- Cooper D.N. and Youssoufian H. (1988). "The CpG dinucleotide and human genetic disease." *Hum Genet* **78** (2): 151-5.
- Crollius H.R., Jaillon O., et al. (2002). "Genome-wide comparisons between human and tetraodon." *Ernst Schering Res Found Workshop* **36**: 11-29.
- Crollius H.R., Jaillon O., et al. (2000). "Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*." *Genome Res* **10** (7): 939-49.
- Crosbie R.H., Lim L.E., et al. (2000). "Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions." *Hum Mol Genet* **9** (13): 2019-27.
- Cross S.H. and Bird A.P. (1995). "CpG islands and genes." *Curr Opin Genet Dev* **5** (3): 309-14.
- Cuisset L., Le Stunff C., et al. (1997). "PEG1 expression in maternal uniparental disomy 7." *Ann Genet* **40** (4): 211-5.
- Dagvadorj A., Karp B.I., et al. (2002). "Epsilon-sarcoglycan mutations in three ethnically diverse families segregating Myoclonus-Dystonia." *Am J Hum Genet* **71** Suppl 4: 2149.
- Dear S. and Staden R. (1991). "A sequence assembly and editing program for efficient management of large projects." *Nucleic Acids Res* **19** (14): 3907-11.
- Deberardinis R.J., Conforto D., et al. (2003). "Myoclonus in a patient with a deletion of the epsilon-sarcoglycan locus on chromosome 7q21." *Am J Med Genet* **121A** (1): 31-6.
- Doheny D. and al. e. (2000). "Phenotypic features of myoclonic dystonias in two kindreds." *Mov Disord* **15** Suppl 3: S162.
- Drewell R.A., Brenton J.D., et al. (2000). "Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch." *Development* **127** (16): 3419-28.
- Drewell R.A., Goddard C.J., et al. (2002). "Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2." *Nucleic Acids Res* **30** (5): 1139-44.
- Duhl D.M., Vrieling H., et al. (1994). "Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice." *Nat Genet* **8** (1): 59-65.
- Eberharder A. and Becker P.B. (2002). "Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics." *EMBO Rep* **3** (3): 224-9.
- Eden S. and Cedar H. (1994). "Role of DNA methylation in the regulation of transcription." *Curr Opin Genet Dev* **4** (2): 255-9.
- Ehrlich M., Gama-Sosa M.A., et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." *Nucleic Acids Res* **10** (8): 2709-21.

- El Kharroubi A., Piras G., et al. (2001). "DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts." *J Biol Chem* **276** (12): 8674-80.
- Elliott M. and Maher E.R. (1994). "Beckwith-Wiedemann syndrome." *J Med Genet* **31** (7): 560-4.
- Engel E. (1980). "A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy." *Am J Med Genet* **6** (2): 137-43.
- Engel J.R., Smallwood A., et al. (2000). "Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome." *J Med Genet* **37** (12): 921-6.
- Ettinger A.J., Feng G., et al. (1997). "Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D." *J Biol Chem* **272** (51): 32534-8.
- Fahn S. and Sjaastad O. (1991). "Hereditary essential myoclonus in a large Norwegian family." *Mov Disord* **6** (3): 237-47.
- Feil R., Charlton J., et al. (1994a). "Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing." *Nucleic Acids Res* **22** (4): 695-6.
- Feil R., Walter J., et al. (1994b). "Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes." *Development* **120** (10): 2933-43.
- Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132** (1): 6-13.
- Foncke E.M., Klein C., et al. (2003). "Hereditary myoclonus-dystonia associated with epilepsy." *Neurology* **60** (12): 1988-90.
- Fremont M., Siegmund M., et al. (1997). "Demethylation of DNA by purified chick embryo 5-methylcytosine-DNA glycosylase requires both protein and RNA." *Nucleic Acids Res* **25** (12): 2375-80.
- Frohling S., Nakabayashi K., et al. (2001). "Mutation analysis of the origin recognition complex subunit 5 (ORC5L) gene in adult patients with myeloid leukemias exhibiting deletions of chromosome band 7q22." *Hum Genet* **108** (4): 304-9.
- Frommer M., McDonald L.E., et al. (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (5): 1827-31.
- Gardiner-Garden M. and Frommer M. (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* **196** (2): 261-82.
- Gasser T. (1998). "Inherited myoclonus-dystonia syndrome." *Adv Neurol* **78**: 325-34.
- Gasser T., Bereznai B., et al. (1996). "Linkage studies in alcohol-responsive myoclonic dystonia." *Mov Disord* **11** (4): 363-70.
- Germain-Lee E.L., Ding C.L., et al. (2002). "Paternal imprinting of Galpha(s) in the human thyroid as the basis of TSH resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a." *Biochem Biophys Res Commun* **296** (1): 67-72.
- Grabowski M., Zimprich A., et al. (2003). "The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted." *Eur J Hum Genet* **11** (2): 138-44.

- Grandjean V., O'Neill L., et al. (2001). "Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain." *FEBS Lett* **488** (3): 165-9.
- Gregory R.I., Randall T.E., et al. (2001). "DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes Snrpn and U2af1-rs1." *Mol Cell Biol* **21** (16): 5426-36.
- Grimes D.A., Bulman D., et al. (2001). "Inherited myoclonus-dystonia: evidence supporting genetic heterogeneity." *Mov Disord* **16** (1): 106-10.
- Grimes D.A., Han F., et al. (2002). "A novel locus for inherited myoclonus-dystonia on 18p11." *Neurology* **59** (8): 1183-6.
- Gruenbaum Y., Cedar H., et al. (1982). "Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase." *Nature* **295** (5850): 620-2.
- Grunau C., Clark S.J., et al. (2001). "Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters." *Nucleic Acids Res* **29** (13): E65-5.
- Hack A.A., Groh M.E., et al. (2000). "Sarcoglycans in muscular dystrophy." *Microsc Res Tech* **48** (3-4): 167-80. [pii].
- Hajkova P., Erhardt S., et al. (2002). "Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells." *Mech Dev* **117** (1-2): 15-23.
- Hammond S.M., Caudy A.A., et al. (2001). "Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA." *Nat Rev Genet* **2** (2): 110-9.
- Han F., Lang A.E., et al. (2003). "Mutations in the epsilon-sarcoglycan gene found to be uncommon in seven myoclonus-dystonia families." *Neurology* **61** (2): 244-246.
- Hannula K., Kere J., et al. (2001a). "Do patients with maternal uniparental disomy for chromosome 7 have a distinct mild Silver-Russell phenotype?" *J Med Genet* **38** (4): 273-8.
- Hannula K., Lipsanen-Nyman M., et al. (2001b). "A narrow segment of maternal uniparental disomy of chromosome 7q31-qter in Silver-Russell syndrome delimits a candidate gene region." *Am J Hum Genet* **68** (1): 247-53.
- Hannula K., Lipsanen-Nyman M., et al. (2001c). "Maternal and paternal chromosomes 7 show differential methylation of many genes in lymphoblast DNA." *Genomics* **73** (1): 1-9.
- Hark A.T., Schoenherr C.J., et al. (2000). "CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus." *Nature* **405** (6785): 486-9.
- Hayashizaki Y., Shibata H., et al. (1994). "Identification of an imprinted U2af binding protein related sequence on mouse chromosome 11 using the RLGs method." *Nat Genet* **6** (1): 33-40.
- Hayatsu H. (1996). "The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids." *J Biochem (Tokyo)* **119** (3): 391-5.
- Heard E., Clerc P., et al. (1997). "X-chromosome inactivation in mammals." *Annu Rev Genet* **31**: 571-610.

- Hitchins M.P., Stanier P., et al. (2001). "Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions." *J Med Genet* **38** (12): 810-9.
- Hoglund P., Holmberg C., et al. (1994). "Paternal isodisomy for chromosome 7 is compatible with normal growth and development in a patient with congenital chloride diarrhea." *Am J Hum Genet* **55** (4): 747-52.
- Howlett S.K. and Reik W. (1991). "Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development." *Development* **113** (1): 119-27.
- Hurst L.D. and McVean G.T. (1997). "Growth effects of uniparental disomies and the conflict theory of genomic imprinting." *Trends Genet* **13** (11): 436-43.
- Ichinose H., Ohye T., et al. (1994). "Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene." *Nat Genet* **8** (3): 236-42.
- Imamura M., Araishi K., et al. (2000). "A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system." *Hum Mol Genet* **9** (20): 3091-100.
- Isles A.R. and Wilkinson L.S. (2000). "Imprinted genes, cognition and behaviour." *Trends Cogn Sci* **4** (8): 309-318.
- Jaenisch R. (1997). "DNA methylation and imprinting: why bother?" *Trends Genet* **13** (8): 323-9.
- Jaenisch R. and Bird A. (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* **33** (Suppl): 245-54.
- Jeppesen P. and Turner B.M. (1993). "The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression." *Cell* **74** (2): 281-9.
- Jiricny J. (1996). "Mismatch repair and cancer." *Cancer Surv* **28**: 47-68.
- Jones P.A., Rideout W.M., 3rd, et al. (1992). "Methylation, mutation and cancer." *Bioessays* **14** (1): 33-6.
- Kafri T., Ariel M., et al. (1992). "Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line." *Genes Dev* **6** (5): 705-14.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., et al. (1996). "Principles of neural science". Norwalk, Connecticut, USA, Appleton & Lange.
- Kanduri C., Pant V., et al. (2000). "Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive." *Curr Biol* **10** (14): 853-6.
- Kaneko-Ishino T., Kuroiwa Y., et al. (1995). "Peg1/Mest imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization." *Nat Genet* **11** (1): 52-9.
- Kass S.U., Pruss D., et al. (1997). "How does DNA methylation repress transcription?" *Trends Genet* **13** (11): 444-9.
- Katz F., Webb D., et al. (1992). "Possible evidence for genomic imprinting in childhood acute myeloblastic leukaemia associated with monosomy for chromosome 7." *Br J Haematol* **80** (3): 332-6.

- Kawai J., Hirotsune S., et al. (1993). "Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method." *Nucleic Acids Res* **21** (24): 5604-8.
- Kelsey G. and Reik W. (1998). "Analysis and identification of imprinted genes." *Methods* **14** (2): 211-34.
- Kishino T., Lalande M., et al. (1997). "UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome." *Nat Genet* **15** (1): 70-3.
- Kitsberg D., Selig S., et al. (1993). "Allele-specific replication timing of imprinted gene regions." *Nature* **364** (6436): 459-63.
- Klein C., Brin M.F., et al. (1999). "Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (9): 5173-6.
- Klein C., Gurvich N., et al. (2000a). "Evaluation of the role of the D2 dopamine receptor in myoclonus dystonia." *Ann Neurol* **47** (3): 369-73.
- Klein C., Liu L., et al. (2002). "Epsilon-sarcoglycan mutations found in combination with other dystonia gene mutations." *Ann Neurol* **52** (5): 675-9.
- Klein C., Schilling K., et al. (2000b). "A major locus for myoclonus-dystonia maps to chromosome 7q in eight families." *Am J Hum Genet* **67** (5): 1314-9.
- Knoll J.H., Cheng S.D., et al. (1994). "Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region." *Nat Genet* **6** (1): 41-6.
- Kobayashi S., Kohda T., et al. (1997). "Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7." *Hum Mol Genet* **6** (5): 781-6.
- Kotzot D. (1999). "Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15." *Am J Med Genet* **82** (3): 265-74.
- Kotzot D., Holland H., et al. (2001). "Maternal isochromosome 7q and paternal isochromosome 7p in a boy with growth retardation." *Am J Med Genet* **102** (2): 169-72.
- Kotzot D., Schmitt S., et al. (1995). "Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation." *Hum Mol Genet* **4** (4): 583-7.
- Kozak M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." *Nucleic Acids Res* **15** (20): 8125-48.
- Kurlan R., Behr J., et al. (1988). "Myoclonus and dystonia: a family study." *Adv Neurol* **50**: 385-9.
- Kwok P.Y., Carlson C., et al. (1994). "Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products." *Genomics* **23** (1): 138-44.
- Kyllerman M., Forsgren L., et al. (1990). "Alcohol-responsive myoclonic dystonia in a large family: dominant inheritance and phenotypic variation." *Mov Disord* **5** (4): 270-9.
- Lander E.S., Linton L.M., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409** (6822): 860-921.

- Larsen F., Gundersen G., et al. (1992). "CpG islands as gene markers in the human genome." *Genomics* **13** (4): 1095-107.
- Lau J.C.Y., Hanel M.L., et al. (2001). "Histone Acetylation and Methylation Patterns of the Human Imprinted NDN Gene." *Am J Hum Genet* **69 Suppl 4**: 1043.
- Lee M.P., DeBaun M.R., et al. (1999). "Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (9): 5203-8.
- Leonhardt H., Page A.W., et al. (1992). "A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei." *Cell* **71** (5): 865-73.
- Li E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." *Nat Rev Genet* **3** (9): 662-73.
- Lindenmulder F.G. (1933). "Familial myoclonia occurring in three successive generations." *J Nerv Ment Dis* **77**: 489-92.
- Lisitsyn N. and Wigler M. (1993). "Cloning the differences between two complex genomes." *Science* **259** (5097): 946-51.
- Liu L.A. and Engvall E. (1999). "Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle." *J Biol Chem* **274** (53): 38171-6.
- Ludecke B., Dworniczak B., et al. (1995). "A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome." *Hum Genet* **95** (1): 123-5.
- Lundemo G. and Persson H.E. (1985). "Hereditary essential myoclonus." *Acta Neurol Scand* **72** (2): 176-9.
- Lyle R., Watanabe D., et al. (2000). "The imprinted antisense RNA at the Igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1." *Nat Genet* **25** (1): 19-21.
- Maher E.R. and Reik W. (2000). "Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited." *J Clin Invest* **105** (3): 247-52.
- Mann M.R. and Bartolomei M.S. (1999). "Towards a molecular understanding of Prader-Willi and Angelman syndromes." *Hum Mol Genet* **8** (10): 1867-73.
- Marechal L., Raux G., et al. (2003). "Severe myoclonus-dystonia syndrome associated with a novel epsilon- sarcoglycan gene truncating mutation." *Am J Med Genet* **119B** (1): 114-7.
- Marth G., Yeh R., et al. (2001). "Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they?" *Nat Genet* **27** (4): 371-2.
- Matsuura T., Sutcliffe J.S., et al. (1997). "De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome." *Nat Genet* **15** (1): 74-7.
- Mayer W., Niveleau A., et al. (2000). "Demethylation of the zygotic paternal genome." *Nature* **403** (6769): 501-2.
- McCann J.A., Zheng H., et al. (2001). "Evidence against GRB10 as the gene responsible for Silver-Russell syndrome." *Biochem Biophys Res Commun* **286** (5): 943-8.



- McNally E.M., Ly C.T., et al. (1998). "Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene." *FEBS Lett* **422** (1): 27-32.
- Meguro M., Kashiwagi A., et al. (2001). "A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome." *Nat Genet* **28** (1): 19-20.
- Mezei L.M. and Storts D.R. (1994). "Purification of PCR products." *PCR Technology: Current Innovations*, Griffin, H.G. and Griffin, A.M., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 21.
- Miller S.A., Dykes D.D., et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* **16** (3): 1215.
- Mizuno Y., Sotomaru Y., et al. (2002). "Asb4, Ata3, and Dcn are novel imprinted genes identified by high-throughput screening using RIKEN cDNA microarray." *Biochem Biophys Res Commun* **290** (5): 1499-505.
- Morgan H.D., Sutherland H.G., et al. (1999). "Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse." *Nat Genet* **23** (3): 314-8.
- Müller B., Hedrich K., et al. (2002). "Evidence That Paternal Expression of the epsilon-Sarcoglycan Gene Accounts for Reduced Penetrance in Myoclonus-Dystonia." *Am J Hum Genet* **71** (6): 6.
- Nakabayashi K., Bentley L., et al. (2002). "Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (MESTIT1) in the human MEST locus on chromosome 7q32." *Hum Mol Genet* **11** (15): 1743-56.
- Narlikar G.J., Fan H.Y., et al. (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." *Cell* **108** (4): 475-87.
- Neitzel H. (1986). "A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines." *Hum Genet* **73** (4): 320-6.
- Nicholls R.D., Saitoh S., et al. (1998). "Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes." *Trends Genet* **14** (5): 194-200.
- Nygaard T.G., Raymond D., et al. (1999). "Localization of a gene for myoclonus-dystonia to chromosome 7q21-q31." *Ann Neurol* **46** (5): 794-8.
- Okano M., Xie S., et al. (1998a). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nat Genet* **19** (3): 219-20.
- Okano M., Xie S., et al. (1998b). "Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells." *Nucleic Acids Res* **26** (11): 2536-40.
- Okita C., Meguro M., et al. (2003). "A new imprinted cluster on the human chromosome 7q21-q31, identified by human-mouse monochromosomal hybrids." *Genomics* **81** (6): 556-9.
- Ono R., Kobayashi S., et al. (2001). "A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21." *Genomics* **73** (2): 232-7.
- Ono R., Shiura H., et al. (2003). "Identification of a large novel imprinted gene cluster on mouse proximal chromosome 6." *Genome Res* **13** (7): 1696-705.

- Orlando V., Strutt H., et al. (1997). "Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking." *Methods* **11** (2): 205-14.
- Ozawa E., Noguchi S., et al. (1998). "From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **21** (4): 421-38.
- Ozelius L.J., Hewett J.W., et al. (1997). "The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein." *Nat Genet* **17** (1): 40-8.
- Perez Jurado L.A., Peoples R., et al. (1996). "Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth." *Am J Hum Genet* **59** (4): 781-92.
- Perimutter J.S., Stambuk M.K., et al. (1997). "Decreased [18F]spiperone binding in putamen in idiopathic focal dystonia." *J Neurosci* **17** (2): 843-50.
- Peters J., Wroe S.F., et al. (1999). "A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (7): 3830-5.
- Piras G., El Kharroubi A., et al. (2000). "Zac1 (Lot1), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes: identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines." *Mol Cell Biol* **20** (9): 3308-15.
- Porter J.D. (2000). "Introduction to muscular dystrophy." *Microsc Res Tech* **48** (3-4): 127-30.
- Prader A., Labhart A., et al. (1956). "Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter." *Schweiz. Med. Wochenschrift* **86**: 1260-1.
- Preece M.A., Price S.M., et al. (1997). "Maternal uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome." *J Med Genet* **34** (1): 6-9.
- Quinn N.P., Rothwell J.C., et al. (1988). "Hereditary myoclonic dystonia, hereditary torsion dystonia and hereditary essential myoclonus: an area of confusion." *Adv Neurol* **50**: 391-401.
- Rakyan V.K., Blewitt M.E., et al. (2002). "Metastable epialleles in mammals." *Trends Genet* **18** (7): 348-51.
- Razin A. and Shemer R. (1995). "DNA methylation in early development." *Hum Mol Genet* **4** (Spec No): 1751-5.
- Rea S., Eisenhaber F., et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." *Nature* **406** (6796): 593-9.
- Reik W. and Constancia M. (1997a). "Genomic imprinting. Making sense or antisense?" *Nature* **389** (6652): 669-71.
- Reik W. and Maher E.R. (1997b). "Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome." *Trends Genet* **13** (8): 330-4.
- Reik W. and Walter J. (2001). "Genomic imprinting: parental influence on the genome." *Nat Rev Genet* **2** (1): 21-32.

- Rein T., DePamphilis M.L., et al. (1998). "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes." *Nucleic Acids Res* **26** (10): 2255-64.
- Rideout W.M., 3rd, Coetzee G.A., et al. (1990). "5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes." *Science* **249** (4974): 1288-90.
- Riesewijk A.M., Hu L., et al. (1997). "Monoallelic expression of human PEG1/MEST is paralleled by parent-specific methylation in fetuses." *Genomics* **42** (2): 236-44.
- Rieß O. (2002). "Neurogenetik", Schöls L.
- Robertson K.D. and Wolffe A.P. (2000). "DNA methylation in health and disease." *Nat Rev Genet* **1** (1): 11-9.
- Robinson W.P. (2000). "Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences." *Bioessays* **22** (5): 452-9.
- Robles J. and Doers M. (1994). "pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide." *Promega Notes* **45**: 19.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239** (4839): 487-91.
- Saitoh S., Buiting K., et al. (1997). "Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation." *Am J Med Genet* **68** (2): 195-206.
- Sambrook J., Fritsch E.F., et al. (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12): 5463-7.
- Sleutels F., Zwart R., et al. (2002). "The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes." *Nature* **415** (6873): 810-3.
- Smallwood A., Papageorgiou A., et al. (2003). "Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted PEG10, and SGCE in human placenta." *Biol Reprod* **69** (1): 286-93.
- Smilnich N.J., Day C.D., et al. (1999). "A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (14): 8064-9.
- Spence J.E., Perciaccante R.G., et al. (1988). "Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease." *Am J Hum Genet* **42** (2): 217-26.
- Steenman M.J., Rainier S., et al. (1994). "Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour." *Nat Genet* **7** (3): 433-9.
- Strachan T. and Read A.P. (1996). "Molekulare Humangenetik". Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Straub V., Ettinger A.J., et al. (1999). "epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex." *J Biol Chem* **274** (39): 27989-96.

- Surani M.A., Barton S.C., et al. (1984). "Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis." *Nature* **308** (5959): 548-50.
- Szabo P., Tang S.H., et al. (2000). "Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function." *Curr Biol* **10** (10): 607-10.
- Tada T., Tada M., et al. (1998). "Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells." *Dev Genes Evol* **207** (8): 551-61.
- Taylor S.M. and Jones P.A. (1979). "Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5- azacytidine." *Cell* **17** (4): 771-9.
- Thomassin H., Oakeley E.J., et al. (1999). "Identification of 5-methylcytosine in complex genomes." *Methods* **19** (3): 465-75.
- Tilghman S.M. (1999). "The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development." *Cell* **96** (2): 185-93.
- Tomatsu S., Orii K.O., et al. (2002). "Methylation Patterns of the Human beta-Glucuronidase Gene Locus: Boundaries of Methylation and General Implications for Frequent Point Mutations at CpG Dinucleotides." *Genomics* **79** (3): 363-75.
- Venter J.C., Adams M.D., et al. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291** (5507): 1304-51.
- Voss K.O., Roos K.P., et al. (1998). "Combating PCR Bias in Bisulfite-Based Cytosine Methylation Analysis. Betaine-Modified Cytosine Deamination PCR." *Analytical Chemistry* **70**: 3818-3823.
- Walsh C.P., Chaillet J.R., et al. (1998). "Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation." *Nat Genet* **20** (2): 116-7.
- Wang R.Y., Gehrke C.W., et al. (1980). "Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues." *Nucleic Acids Res* **8** (20): 4777-90.
- Warnecke P.M., Stirzaker C., et al. (1997). "Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA." *Nucleic Acids Res* **25** (21): 4422-6.
- Wheeler M.T., Zarnegar S., et al. (2002). "Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **11** (18): 2147-54.
- Yamasaki K., Hayashida S., et al. (2000). "The novel gene, gamma2-COP (COPG2), in the 7q32 imprinted domain escapes genomic imprinting." *Genomics* **68** (3): 330-5.
- Yoder J.A., Walsh C.P., et al. (1997). "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." *Trends Genet* **13** (8): 335-40.
- Yoshida M., Hama H., et al. (2000). "Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy." *Hum Mol Genet* **9** (7): 1033-40.
- Yoshihashi H., Maeyama K., et al. (2000). "Imprinting of human GRB10 and its mutations in two patients with Russell-Silver syndrome." *Am J Hum Genet* **67** (2): 476-82.

Zeschnigk M., Schmitz B., et al. (1997). "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method." *Hum Mol Genet* **6** (3): 387-95.

Zimprich A., Grabowski M., et al. (2001). "Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus- dystonia syndrome." *Nat Genet* **29** (1): 66-9.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

5mC	5-Methyl-Cytosin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
AS	Angelman-Syndrom
BAC	künstliches Bakterienchromosom ( <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> )
bp	Basenpaare
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , vergleicht eine Nukleotidsequenz gegen eine Nukleotidsequenz-Datenbank
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
BST	Bisulfitbehandlung; bisulfitbehandelt ( <i>Bisulfite Treatment/treated</i> )
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
ca.	cirka
Chr.	Chromosom
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CpG(s)	CpG-Dinukleotid(e)
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DGK	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DMR	differentiell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	2'-Desoxyribo-Nukleotid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
EST	exprimierte, sequenzmarkierte Stelle ( <i>Expressed Sequence Tag</i> )
F	vorwärts ( <i>Forward</i> )

h	Stunde ( <i>hour</i> )
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kb	Kilobasenpaare (10 <sup>3</sup> bp)
konz.	konzentriert
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
mat	maternal
Mb	Megabasenpaare (10 <sup>6</sup> bp)
MDS	Myoklonus-Dystonia-Syndrom (s)
μg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger-RNA</i> )
OD	optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Katalog Nummer)
p	kurzer Chromosomenarm
pat	paternal
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PWS	Prader-Willi-Syndrom
q	langer Chromosomenarm
R	rückwärts ( <i>Reverse</i> )
<i>RACE</i>	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden ( <i>seconds</i> )
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus

sog.	sogenannt
SRS	Silver-Russel-Syndrom
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temp.	Temperatur
ter	Telomer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	enzymatische Einheit ( <i>Unit</i> )
üN	über Nacht
UPD7	uniparentale Disomie von Chromosom 7
UV	ultraviolett
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid



## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Kopplung des MDS auf Chr. 7q21.3-22.1	S. 4
Abb. 1-2: Methylierungs-Reprogrammierung	S. 6
Abb. 1-3: Mögliche Transitionen von Cytosin	S. 8
Abb. 1-4: Promotormethylierung und Chromatin-Remodelling	S. 10
Abb. 1-5: Geprägte Antisense-Transkripte	S. 11
Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Bisulfitbehandlung von DNA	S. 15
Abb. 3-1: Das Annotationsprogramm CGTA	S. 37
Abb. 3-2: Physikalische Karte der kritischen Region für das MDS auf Chr. 7q21.3	S. 38
Abb. 3-3: Transkriptkarte von Chr. 7q21.3	S. 39
Abb. 3-4: Sequenzausschnitte der Mutationen im <i>SGCE</i> -Gen mit MDS-Familienstammbäumen	S. 40
Abb. 3-5: Genstruktur von <i>SGCE</i>	S. 41
Abb. 3-6: Kartierung von <i>SGCE</i>	S. 41
Abb. 3-7: Translationsstart von <i>SGCE</i>	S. 42
Abb. 3-8: Aminosäuresequenz und schematische Struktur des Epsilon-Sarkoglykan Transmembranproteins	S. 43
Abb. 3-9: Northern-Blot Analysen	S. 44
Abb. 3-10: Vergleich von Hybridisierungssignalintensitäten	S. 44
Abb. 3-11: RT-PCR-Analysen von <i>SGCE</i>	S. 45
Abb. 3-12: <i>SGCE</i> -Gen und CpG-Dichteblot auf Chr. 7q21.3	S. 47
Abb. 3-13: Ausschnitt aus der Promotorsequenz von <i>SGCE</i> mit Polymorphismus	S. 49
Abb. 3-14: Methylierungsmuster	S. 50
Abb. 3-15: Multiplex-RT-PCR von <i>SGCE</i> und <i>GAPDH</i>	S. 52
Abb. 3-16: Vergleich der Genexpressionen zwischen maternalen und paternalen uniparentalen Disomien von Chromosom 7	S. 54
Abb. 3-17: Sequenzierung von <i>ASB-4</i>	S. 57
Abb. 3-18: RT-PCR-Sequenzierung in drei heterozygoten <i>SGCE</i> -Mutationsträgern	S. 58
Abb. 3-19: RT-PCR-Sequenzierung heterozygoter MDS-Patienten	S. 59
Abb. 4-1: Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit der Sarkoglykane	S. 60
Abb. 4-2: Alignment der Aminosäuresequenzen von <i>SGCE</i> und <i>SGCA</i>	S. 61
Abb. 4-3: Alignment der Aminosäuresequenzen von Epsilon-Sarkoglykan	S. 62
Abb. 4-4: Sarkoglykane in Komplexen	S. 63
Abb. 4-5: Lokalisation der fünf verschiedenen, heterozygoten Mutationen	S. 65
Abb. 4-6: PCR-Hybride	S. 69
Abb. 4-7: Differentiell methylierte Regionen	S. 70
Abb. 4-8: Expressionsanalyse von drei heterozygoten <i>SGCE</i> -Mutationsträgern	S. 73

Abb. 4-9: Vergleich geprägter Gene

S. 74

Abb. 4-10: Ausnahmen von maternal geprägter Transmission des MDS

S. 76

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Locusheterogenität der Dystonien	S. 3
Tab. 3-1: MDS-Familien	S. 36
Tab. 3-2: Parentale Transmissionen	S. 45
Tab. 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 49
Tab. 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse der RT-PCRs	S. 55
Tab. 4-1: Übersicht über Mutationen im <i>SGCE</i> -Gen	S. 66
Tab. 4-2: Abweichungen von den erwarteten Bisulfitsequenzen	S. 69

# Anhang

## Primer:

### Intronische Primer für die Mutationsanalyse der *SGCE*-Exons:

Exon 1: 5'-AGCAAGAATGTGCCAGTGGT-3'; 5'-GCTAGAGGGAGTACGGGATT-3'; 230 bp  
Exon 2: 5'-GCTGAATTATCAAGGGCGTATC-3'; 5'-TTAGACCATTGAAATAATGTTAATGA-3'; 302 bp  
Exon 3: 5'-TGATTGAAACTACCAAAGCAACA -3'; 5'-CTGTGTTTCCATGCACAAAAT-3'; 370 bp  
Exon 4: 5'-TCATTGCCAGAGAAGGAAT-3'; 5'-TTTTCCACCATCATAACACACCA-3'; 417 bp  
Exon 5: 5'-CCTGCTGCCAGGATTATGAC-3'; 5'-TGCAATAGGCCATCTTCCAT-3'; 401 bp  
Exon 6: 5'-TCCTGCTTTAAGGTGGATTG-3'; 5'-AAACGTTAACTCCAGCCACA-3'; 302 bp  
Exon 7: 5'-TTGGAAAAGATGGCTTTTTAGA-3'; 5'-TGAACCAAATGAAACTTTGCT-3'; 421 bp  
Exon 8: 5'-AGCATTTCACATCATGCAA-3'; 5'-ATGATGGGCAACTGAGAGGT-3'; 187 bp  
Exon 9: 5'-TTGATGACCCATCAGGCTAA-3'; 5'-AACAAACACAACAACAGAAAGCTC-3'; 345 bp  
Exon 11: 5'-AGGGGAATTGTGCTGGATTA-3'; 5'-TGTTTTGCCATTATTTGGTGAA-3'; 286 bp  
Exon 12: 5'-TGTCACGCTTCTGTGTTCC-3'; 5'-TATGCCAGAAAAGCTCATGC -3'; 200 bp  
Exon 12 3'-UTR: 5'-AAAGAAAAGTACTGAAGCAATGA-3'; 5'-ACAAATTGTCAAAAATGCTTTAAGT-3'; 201 bp

### *SGCE*-Promotorprimer:

esarcPro1: 5'-CCTGTCTTCGCAGAGGAGTC-3', 5'-GTAAGTCCGCAGCTCATGTC-3'; 812 bp

### *SGCE* cDNA-Primer:

Exon 3 Fc: 5'-CCATCAGCAGGTGTCTCTT-3'; Exon 5 Rc: 5'-ACCTCACTGGCCAACATTTTC-3'; 384 bp  
Exon 6 Fc: 5'-TGTAGTCAAGAAATGGAGCCTGT-3'; Exon 8 Rc: 5'-GGACCAGTTGGATGTCTGGT-3'; 337 bp

### Multiplex-RT-PCR:

Exon 6 Fc: 5'-GGTGCAGATGTCCCGTTTTTC-3'; Exon 8/9 Rc: 5'-TGGATGTCTGGTGTTCATG-3'; 392 bp (679 bis 1070 bp)

### Northern-Blot-Sonde der cDNA von *SGCE*:

5'-ACATCACATCGGCCCTAGAC-3'; 5'-CAATGGCATGTTTGTGCTATC-3'; 641 bp (599 bp bis 1239 bp)

### cDNA-Primer verschiedener Gene für RT-PCR:

*GAPDH*: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'; 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'; 283 bp  
*SGCE*: 5'-GGTGCAGATGTCCCGTTTTTC-3'; 5'-TGGATGTCTGGTGTTCATG-3'; 389 bp  
*TFPI2*: 5'-TGGCTGTGGAGGGAATGAC-3'; 5'-ACGACCCCAAGAAATGAGTG-3'; 426 bp  
*BET1*: 5'-GAAGGAGTACCTCCTGGC-3'; 5'-GCATCATATAGCACAGCAGC-3'; 283 bp  
*PEG10*: 5'-GAAAGCTGAACCTGTGCCTC-3'; 5'-TCAAATGACAGCACCTCTCG-3'; 429 bp  
*PON3*: 5'-AATATCCAGGCATGCCAAAC-3'; 5'-ATGTGGGGATGATTCACAAC-3'; 200 bp  
*PON2*: 5'-GCACGGGAATTAAGAATCAG-3'; 5'-TTCATGAGCCAATATGTCAGC-3'; 443 bp  
*SLC25A13*: 5'-GTTGCCACAGTTATTGGGAG-3'; 5'-AACCTGCCCATCTTCATTTG-3'; 373 bp  
*DSS1*: 5'-TCCTTGAGGAAGAGTGAGG-3'; 5'-AGTGTCCCATCCTGGGTTC-3'; 360 bp  
*ASB-4*: 5'-GCCTTATGAGACAGCAGTTC-3'; 5'-TGAAAATTCCTTAACCTTACTTC-3'; 197 bp im 3'-UTR

### Universelle 5'-*RACE*-Primer :

*Adaptor Primer 1*, AP1 (10 µM): 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

*Nested Adaptor Primer 2*, AP2 (10 µM): 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

### **Bisulfit-Primer für den Promotorbereich von *SGCE*:**

Die methylierungsunabhängigen Primer BSTx\_F und BSTx\_R liegen außerhalb von CpG-Dinukleotiden und ermöglichen eine Amplifikation von bisulfitbehandelter DNA mit jedem Methylierungsmuster im Promotor von *SGCE*.

BSTx\_F: 5'-GTGTTATGTTTTATAAATAGATAAG-3'; BSTx\_R: 5'-AACTCATATACCTCTACAATTC-3'; 375 bp

Die methylierungsspezifischen Bisulfit-Primer liegen in genomischen Sequenzen mit mehreren CpG-Dinukleotiden und wurden *nested* oder *semi-nested* untereinander oder in Kombination mit dem methylierungsunabhängigen Primer BSTx\_R verwendet.

Amplifikation des unmethylierten Strangs (in 2. Runde PCR bei 56°C)

BST\_U\_S5 F: 5'-TTATAAGTATGTTTTATGTGGGT-3'

BST\_U\_S4: 5'-TGGATGGGTGTTTTAGTGGT-3'; 5'-ATACCTCACAACACAATAAAACA-3'; 190 bp

Amplifikation des methylierten Strangs (in 2. Runde PCR bei 56°C)

BST\_M\_S5 F: 5'-TAAGTACGTTTTACGCGGGC-3'

BST\_M\_S4: 5'-AAATTGAATTGCGTTTTATATGC-3'; 5'-ATCGAACTAACTAATCGCATCG-3'; 93 bp

**Alignment von Aminosäuresequenzen des Menschen (*homo sapiens*; hs)  
von SGCD (Isoform 1 und 2), SGCG und SGCZ**

	1				50
SGCD1_AS_hs	MMPQEYTHH	RS..TMPGSV	GPQVYKVGII	GWRKRCLYFF	VLLLMILILV
SGCD2_AS_hs	MMPQEYTHH	RS..TMPGSV	GPQVYKVGII	GWRKRCLYFF	VLLLMILILV
SGCG_AS_hs	~MVREQYTTA	TEGICIERPE	NOYVYKIGII	GWRKRCLYLF	VLLLLIILVV
SGCZ_AS_hs	~MTREQYILA	TQQNNLPRTE	NAQLYPVGIY	GWRKRCLYFF	VLLLLVMTMIV
	51				100
SGCD1_AS_hs	NLAMTIWILK	VMNFTIDGMG	NLRITEKGLK	LEGDSEFLQP	LYAKEIQSRP
SGCD2_AS_hs	NLAMTIWILK	VMNFTIDGMG	NLRITEKGLK	LEGDSEFLQP	LYAKEIQSRP
SGCG_AS_hs	NLALTIWILK	VMWFSPAGMG	HLCVTKDGLR	LEGESEFLFP	LYAKEIHSRV
SGCZ_AS_hs	NLAMTIWILK	VMNFTVDGMG	NLRVTKKGIK	LEGISEFLLP	LYVKEIHSRK
	101				150
SGCD1_AS_hs	GNALYFKSAR	NVTVNILNDQ	TKVLTQLITG	PKAVEAYGKK	FEVKTV.SGK
SGCD2_AS_hs	GNALYFKSAR	NVTVNILNDQ	TKVLTQLITG	PKAVEAYGKK	FEVKTV.SGK
SGCG_AS_hs	DSSLLQSTQ	NVTVNARNSE	GEVTGRLKVG	PKMVEVQNOQ	FQINSN.DGK
SGCZ_AS_hs	DSPLVLQSDR	NVTVNARNHM	GQLTGQLTIG	ADAVEAQCKR	FEVRASEDGR
	151				200
SGCD1_AS_hs	LLFSADNNEV	VVGAERLRVL	GAEGTVFPKS	IETPNVRADP	FKELRLESPT
SGCD2_AS_hs	LLFSADNNEV	VVGAERLRVL	GAEGTVFPKS	IETPNVRADP	FKELRLESPT
SGCG_AS_hs	PLFTVDEKEV	VVGTDKLRVT	GPEGALFEHS	VETPLVRADP	FQDLRLESPT
SGCZ_AS_hs	VLFSADEDEI	TIGA EKLVKVT	GTEGAVFGHS	VETPHIRAEP	SQDLRLESPT
	201				250
SGCD1_AS_hs	RSLVMEAPKG	VEINAEAGNM	EATCRTELRL	ESKDGEIKLD	AAKIRLPRLP
SGCD2_AS_hs	RSLVMEAPKG	VEINAEAGNM	EATCRTELRL	ESKDGEVRDE	KDRSSKSYSF
SGCG_AS_hs	RSLSDAPRG	VHIQAHAGKI	EALSQMDILF	HSSDGMVLVD	AETVCLPKLV
SGCZ_AS_hs	RSLIMEAPRG	VQVSAAAGDF	KATCRKELHL	QSTEGEIFLN	AETIKLGNLP
	251				300
SGCD1_AS_hs	HGSYT...PT	GTR..QKVF	ICVCANGRLF	LSQAGAGSTC	QINTSVCL~~
SGCD2_AS_hs	NRPTL...PI	TG~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
SGCG_AS_hs	QGTWG...PS	GSS..QSLYE	ICVCPDGKLY	LSVAGVSTTC	QEHSHICL~~
SGCZ_AS_hs	TGSFSSSSPS	SSSRQTVYE	LCVCPNGKLY	LSPAGVGSTC	QSSSNICLWS

**Alignment von Aminosäuresequenzen des Menschen (*homo sapiens*; hs)  
von SGCB, SGCD (Isoform 1 und 2), SGCG und SGCZ**

	1				50
SGCB_AS_hs	MAAAAAAAAAE	QQSSNGPVKK	SMREKAVERR	SVNKEHNSNF	KAGYIPIDED
SGCD1_AS_hs	~~~~~	~~~~~	~~~MMPQEQY	THHRS...TM	PGSVGP....
SGCD2_AS_hs	~~~~~	~~~~~	~~~MMPQEQY	THHRS...TM	PGSVGP....
SGCG_AS_hs	~~~~~	~~~~~	~~~MVREQY	TTATEGI.CI	ERPENQ....
SGCZ_AS_hs	~~~~~	~~~~~	~~~MTREQY	ILATQQN.NL	PRTEANA....
	51				100
SGCB_AS_hs	RLHKTGLRGR	KGNLAICVII	LLFILAVINL	IITLVIWAVI	RIGPNGCDSM
SGCD1_AS_hs	QVYKVGIIYGW	RKRCLYFFVL	LLMILILVNL	AMTIWILKVM	NFTIDGMGNL
SGCD2_AS_hs	QVYKVGIIYGW	RKRCLYFFVL	LLMILILVNL	AMTIWILKVM	NFTIDGMGNL
SGCG_AS_hs	YVYKIGIIYGW	RKRCLYLFVL	LLLIIILVVNL	ALTIWILKVM	WFSPAGMGHL
SGCZ_AS_hs	QLYPVGIYGW	RKRCLYFFVL	LLLVTMIVNL	AMTIWILKVM	NFTVDGMGNL
	101				150
SGCB_AS_hs	EFHESGLLRF	KQVSDMGVIH	PLYKSTVGGR	RNENLVITGN	.NQPIVFQQG
SGCD1_AS_hs	RITEKG.LKL	EGDSE..FLQ	PLYAKEIQSR	PGNALYFKSA	RNVTVNILND
SGCD2_AS_hs	RITEKG.LKL	EGDSE..FLQ	PLYAKEIQSR	PGNALYFKSA	RNVTVNILND
SGCG_AS_hs	CVTKDG.LRL	EGESE..FLF	PLYAKEIHSR	VDSSLLQST	QNVTVNARNS
SGCZ_AS_hs	RVTKKG.IRL	EGISE..FLL	PLYVKEIHSR	KDSPLVLQSD	RNVTVNARNH
	151				200
SGCB_AS_hs	TTKLSVENNK	TSITSDIGMQ	FFDPRTQ...	NILFSTD...	..YETHEFHL
SGCD1_AS_hs	QTKVLTQLIT	GPKAVEAYGK	KFEVKTV.SG	KLLFSADNNE	VVVGAEERLRV
SGCD2_AS_hs	QTKVLTQLIT	GPKAVEAYGK	KFEVKTV.SG	KLLFSADNNE	VVVGAEERLRV
SGCG_AS_hs	EGEVTGRLKV	GPKMVEVQNQ	QFQINSN.DG	KPLFTVDEKE	VVVGTDKLRV
SGCZ_AS_hs	MGQLTGQLTI	GADAVEAQCK	RFEVRASEDG	RVLFSADEDE	ITIGAELKLV
	201				250
SGCB_AS_hs	PSGVKSLNVQ	KASTERITSN	ATSDLNIKVD	GRAIVRGNE.	GVFIMGKTIE
SGCD1_AS_hs	LGAEGTVFPK	SIETPNVRAD	PFKELRLESP	TRSLVMEAPK	GVEINAEAGN
SGCD2_AS_hs	LGAEGTVFPK	SIETPNVRAD	PFKELRLESP	TRSLVMEAPK	GVEINAEAGN
SGCG_AS_hs	TGPEGALFEH	SVETPLVRAD	PFQDLRLESP	TRSLSMDAPR	GVHIQAHAGK
SGCZ_AS_hs	TGTEGAVFGH	SVETPHIRAE	PSQDLRLESP	TRSLIMEAPR	GVQVSAAGD
	251				300
SGCB_AS_hs	FHMGGNMELK	AENS..IILN	GSVMVSTTRL	PSSSSG..DQ	LGSGD.WVRY
SGCD1_AS_hs	MEATCRTELRL	LESKDGEIKL	DAAKIRLPRL	PHGSYT...P	TGTR..QKVF
SGCD2_AS_hs	MEATCRTELRL	LESKDGEVRD	EKDRSSKSYS	FNRPTL...P	ITG~~~~~
SGCG_AS_hs	IEALSQMDIL	FHSSDGMLVL	DAETVCLPKL	VQGTWG...P	SGSS..QSLY
SGCZ_AS_hs	FKATCRKELH	LQSTEGEIFL	NAETIKLGNL	PTGSFSSSSP	SSSSSRQTVY
	301			333	
SGCB_AS_hs	KLCMCADGTL	FKVQVTSQNM	GCQISDNPCG	NTH	
SGCD1_AS_hs	EICVCANGRL	FLSQAGAGST	.CQINTSVCL	~~~	
SGCD2_AS_hs	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
SGCG_AS_hs	EICVCPDGKL	YLSVAGVSTT	.CQEHSHICL	~~~~~	
SGCZ_AS_hs	ELCVCPNGKL	YLSVAGVSTT	.CQSSSNICL	WS~	

**Alignment von cDNAs der Gene *SGCE* des Menschen (*homo sapiens*; *hs*) und *Sgce* der Maus (*mus musculus*; *mm*): 89 % identisch**

	1				50
SGCE_hs_mRNA	AAGCTGGGAG	GGAAGAAGAA	AGGGAGGGGA	GGGGAGAATC	GAGGACGGAC
Sgce_mm_mRNA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51				100
SGCE_hs_mRNA	GGCCTAGCCA	GGCCAAGAAT	GCAATTGCCC	CGGTGGTGGG	AGCTGGGAGA
Sgce_mm_mRNA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~GAGA
	101				150
SGCE_hs_mRNA	CCCCTGTGCT	TGGACGGGAC	AGGGTCGGGG	GACACGCAGG	ATGAGCCCCG
Sgce_mm_mRNA	CCCTTGTGCT	TGGACGGGAA	AGGGTCGGGG	GACACTCAAG	ATGAGCCCCG
	151				200
SGCE_hs_mRNA	CGACCACTGG	CACATTCTTG	CTGACAGTGT	ACAGTATTTT	CTCCAAGGTA
Sgce_mm_mRNA	CGACCACTGG	CACATTCTTA	CTGACAGTGT	ACACTCTTTT	CTCCAAGGTG
	201				250
SGCE_hs_mRNA	CACTCCGATC	GGAATGTATA	CCCATCAGCA	GGTGCCTCT	TTGTTTCATGT
Sgce_mm_mRNA	CACTCTGACC	GGAACGTGTA	CCCATCTGCA	GGTGCCTCT	TTGTTTCATGT
	251				300
SGCE_hs_mRNA	TTTGGAAAGA	GAATATTTTA	AGGGGGAATT	TCCACCTTAC	CAAAAACCTG
Sgce_mm_mRNA	GTTGGAGAGA	GAGTATTTTA	AGGGTGAATT	TCCACCTTAT	CAAAGCCTG
	301				350
SGCE_hs_mRNA	GCGAGATTAG	TAATGATCCC	ATAACATTTA	ATACAAATTT	AATGGGTTAC
Sgce_mm_mRNA	GGGAGGTTAG	TAATGATCCC	ATAACATTTA	ACACAAATTT	AATGGGCTAC
	351				400
SGCE_hs_mRNA	CCAGACCGAC	CTGGATGGCT	TCGATATATC	CAAAGGACAC	CATATAGTGA
Sgce_mm_mRNA	CCAGATAGAC	CTGGATGGCT	TCGATATATC	CAAAGGACCC	CGTACAGTGA
	401				450
SGCE_hs_mRNA	TGGAGTCCTA	TATGGGTCCC	CAACAGCTGA	AAATGTGGGG	AAGCCAACAA
Sgce_mm_mRNA	TGGAGTCCTG	TATGGGTCTC	CAACAGCTGA	AAATGTGGGG	AAACCAACTA
	451				500
SGCE_hs_mRNA	TCATTGAGAT	AACTGCCTAC	AACAGGCGCA	CCTTTGAGAC	TGCAAGGCAT
Sgce_mm_mRNA	TTATTGAGAT	AACTGCCTAC	AATAGACGTA	CCTTTGAGAC	TGCAAGGCAT
	501				550
SGCE_hs_mRNA	AATTTGATAA	TTAATATAAT	GTCTGCAGAA	GACTTCCCGT	TGCCATATCA
Sgce_mm_mRNA	AACTTGATAA	TTAATATAAT	GTCAGCAGAA	GAATTCCCGT	TGCCATATCA
	551				600
SGCE_hs_mRNA	AGCAGAATTC	TTCATTAAGA	ATATGAATGT	AGAAGAAATG	TTGGCCAGTG
Sgce_mm_mRNA	AGCAGAATTC	TTCATCAAAA	ATATGAATGT	GGAAGAAATG	TTGGCCAGCG
	601				650
SGCE_hs_mRNA	AGGTTCTTGG	AGACTTTCTT	GGCGCAGTGA	AAAATGTGTG	GCAGCCAGAG
Sgce_mm_mRNA	AGGTTCTTGG	AGACTTTCTC	GGGGCTGTAA	AAAATGTGTG	GCAGCCAGAG
	651				700
SGCE_hs_mRNA	CGCCTGAACG	CCATAAACAT	CACATCGGCC	CTAGACAGGG	GTGGCAGGGT
Sgce_mm_mRNA	CGCCTCAACG	CCATAAACAT	CACGTCAGCC	CTGGATAGGG	GTGGCAGAGT
	701				750
SGCE_hs_mRNA	GCCACTTCCC	ATTAATGACC	TGAAGGAGGG	CGTTTATGTC	ATGGTTGGTG
Sgce_mm_mRNA	GCCGCTTCCT	ATTAATGACA	TGAAGGAGGG	TGTTTATGTC	ATGGTTGGTG



	751				800	
SGCE_hs_mRNA	CAGATGTC	CC	GTTTTCTTCT	TGTTTACGAG	AAGTTGAAAA	TCCACAGAAT
Sgce_mm_mRNA	CCGATGTTGC		ATTTTTCTTCT	TGTTTACGAG	AAGTTGAAAA	TCCACAGAAT
	801				850	
SGCE_hs_mRNA	CAATTGAGAT		GTAGTCAAGA	AATGGAGCCT	GTAATAACAT	GTGATAAAAA
Sgce_mm_mRNA	CAGTTAAGAT		GCAGTCAAGA	AATGGAGCCT	GTGATAACAT	GCGACAAAAA
	851				900	
SGCE_hs_mRNA	ATTTTCGTACT		CAATTTTACA	TTGACTGGTG	CAAAATTTCA	TTGGTTGATA
Sgce_mm_mRNA	GTTCCGAACT		CACTTTCATA	TCGACTGGTG	CAAGATTTCA	CTGGTTGACA
	901				950	
SGCE_hs_mRNA	AAACAAAGCA		AGTGTCCACC	TATCAGGAAG	TGATTCGTGG	AGAGGGGATT
Sgce_mm_mRNA	AAACAAAGCA		AGTGTCCACC	TATCAGGAAG	TAGTTCGTGG	CGAGGGCATT
	951				1000	
SGCE_hs_mRNA	TTACCTGATG		GTGGAGAATA	CAAACCCCCT	TCTGATTCTT	TGAAAAGCAG
Sgce_mm_mRNA	TTGCCCGACG		GCGGGGAGTA	CAAGCCCCT	TCGGATTCTT	TGAAAAGCCG
	1001				1050	
SGCE_hs_mRNA	AGACTATTAC		ACGGATTTC	TAATTACACT	GGCTGTGCCC	TCGGCAGTGG
Sgce_mm_mRNA	AGACTATTAC		ACGGATTTC	TCGTTACCCT	GGCTGTGCCC	TCGGCGGTAG
	1051				1100	
SGCE_hs_mRNA	CACTGGTCCT		TTTTCTAATA	CTTGCTTATA	TCATGTGCTG	CCGACGGGAA
Sgce_mm_mRNA	CACTGGTGCT		TTTCCTAATA	CTCGCTTATA	TCATGTGCTG	CCGACGGGAA
	1101				1150	
SGCE_hs_mRNA	GGCGTGGA		AGAGAAACAT	GCAAACACCA	GACATCCAAC	TGGTCCATCA
Sgce_mm_mRNA	GGAGTGGA		AGAGAGACAT	GCAAACCCCA	GATATCCAGC	TTGTCCATCA
	1151				1200	
SGCE_hs_mRNA	CAGTGCTATT		CAGAAATCTA	CCAAGGAGCT	TCGAGACATG	TCCAAGAATA
Sgce_mm_mRNA	CAGCTCGATT		CAGAAATCTA	CCAAGGAGCT	TCGAGACATG	TCCAAAAACA
	1201				1250	
SGCE_hs_mRNA	GAGAGATAGC		ATGGCCCCTG	TCAACGCTTC	CTGTGTTCCA	CCCTGTGACT
Sgce_mm_mRNA	GAGAGATTGC		ATGGCCCCTG	TCTACCCTGC	CCGTGTTCCA	CCCTGTAACT
	1251				1300	
SGCE_hs_mRNA	GGGGAAATCA		TACCTCCTTT	ACACACAGAC	AACTATGATA	GCACAAACAT
Sgce_mm_mRNA	GGGGAGGTTA		TACCTCCCAC	GCACACAGAC	AACTACGACA	GCACCAACAT
	1301				1350	
SGCE_hs_mRNA	GCCATTGATG		CAAACGCAGC	AGAACTTGCC	ACATCAGACT	CAGATTCCCC
Sgce_mm_mRNA	GCCGTTGATG		CAGGCACAGC	AGAACTTGCC	ACACCAGACT	CAGATCCCTC
	1351				1400	
SGCE_hs_mRNA	AACAGCAGAC		TACAGGTAAA	TGGTATCCCT	GAAGAAAGAA	AACTGACTGA
Sgce_mm_mRNA	AACCGCAGAC		TACAGGTAAA	TGGTATCCCT	GAAGAAAGAA	AGCTGACAGA
	1401				1450	
SGCE_hs_mRNA	AGCAATGAAT		TTATAATCAG	ACAATATAGC	AGTTACATCA	CATTTCTTTT
Sgce_mm_mRNA	AGCAATGAGT		TTATAATCAG	.CACTGCTGC	AGCCGTGTCT	CACCCCTTT.
	1451				1500	
SGCE_hs_mRNA	CTCTTCCAAT		AATGCATGAG	CTTTTCTGGC	ATATGTTATG	CATGTTGGCA
Sgce_mm_mRNA	CCCTTCCAAT		AATGCATGAG	CTTTCCTGAC	ATCGGTTACG	CATGCCCACT
	1501				1550	
SGCE_hs_mRNA	GTATTAAGTG		TATACCAAAT	AATACAACAT	AACTTTCATT	TTACTAATGT
Sgce_mm_mRNA	GTGTTGAGA.		...ACCAAAT	ACCGTGACAC	ATCTCTCACT	T.ACTAATGC

	1551					1600
SGCE_hs_mRNA	ATTTTTTTTGT	ACTTAAAGCA	TTTTTGACAA	TTTGTAAAAC	ATGATGACT	
Sgce_mm_mRNA	ATTTTTTTTGT	ACTTAAAGCA	TTTTTGAAAA	TTTATAAGAC	ATCAACGACT	
	1601					1650
SGCE_hs_mRNA	TTATATTTGT	TACAATAAAA	GTGATCTTT	AAAATAAATA	TTATTAATGA	
Sgce_mm_mRNA	TTATATTTGT	TACAATAAAA	AGTAACTTT	AAAATAAATA	TTAAAAAAAAA	
	1651					
SGCE_hs_mRNA	AAAAAAG					
Sgce_mm_mRNA	A~~~~~					

## IUPAC-Schlüssel

Nukleinsäure		Aminosäure	
A	Adenin	A	Ala Alanin
B	nicht A	B	Asx Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cytosin	C	Cys Cystein
D	nicht C	D	Asp Asparaginsäure
E		E	Glu Glutaminsäure
F		F	Phe Phenylalanin
G	Guanin	G	Gly Glycin
H	nicht G	H	His Histidin
I		I	Ile Isoleucin
J		J	
K	G oder T	K	Lys Lysin
L		L	Leu Leucin
M	A oder C	M	Met Methionin
N	A, C, G oder T	N	Asn Asparagin
O		O	
P		P	Pro Prolin
Q		Q	Gln Glycin
R	A oder G	R	Arg Arginin
S	C oder G	S	Ser Serin
T	Thymin	T	Thr Threonin
U	Uracil	U	
V	nicht T	V	Val Valin
W	A oder T	W	Trp Tryptophan
X		X	Xxx jede beliebige As
Y	C oder T	Y	Tyr Tyrosin
Z		Z	Glx Glutamin oder Glutaminsäure
-	Lücke	-	Lücke
*	TAA, TAG, TGA	*	Stopp

Diese Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Meitinger und PD Dr. Tim-Matthias Strom in der Abteilung für Medizinische Genetik der Kinderklinik und Poliklinik, Klinikum Innenstadt der LMU München und am Institut für Humangenetik der TU München in der GSF Neuherberg in der Zeit von Januar 2000 bis Januar 2004.

## **Danksagung**

Meinem Projektbetreuer Dr. Tim-Matthias Strom danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und den guten Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Forschung. Außerdem bin ich ihm für seine Betreuung und Unterstützung dankbar.

Prof. Dr. Thomas Meitinger danke ich sehr für die Schaffung der guten Arbeitsbedingungen, für seine wissenschaftlichen Anregungen, das stete Interesse am Fortgang und Gelingen dieser Arbeit, sowie für Hilfestellungen bei Vorträgen und Veröffentlichungen.

Prof. Dr. Thomas Cremer danke ich für seine Bereitschaft, meine Dissertation vor der biologischen Fakultät der LMU München zu vertreten. Für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen möchte ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken.

Prof. Dr. Heinrich Leonhardt sei an dieser Stelle für die Übernahme des Zweitgutachtens und sein dafür aufgebrachtes Engagement gedankt, sowie für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ich möchte Dr. Alexander Zimprich und Prof. Dr. Thomas Gasser aus der neurologischen Abteilung im Klinikum Großhadern für die gute Zusammenarbeit und den Zugang zu Patienten-Material danken. Bei Dr. Vera Kalscheuer vom MPI Berlin bedanke ich für die Bereitstellung von Zellen aus UPD7-Zelllinien. Ich möchte mich bei Prof. Dr. Alfons Meindl für die Bereitstellung von DNAs und Zellkulturen und bei den hilfsbereiten Laborkollegen aus der medizinischen Genetik der LMU München bedanken. Heide Hellebrand und Birgit Neitzel danke ich für ihren arbeitstechnischen Rat und Beistand.

Großer Dank gebührt Dr. Bettina Lorenz-Depiereux als Anlaufstelle im Laboralltag, für ihre wissenschaftlichen Anregungen und die Unterstützung meiner Arbeit. Meinen Laborkollegen Dr. Thomas Bettecken, Dr. Ingrid Bader, Dr. Konstanze Hörtnagel, Evelin Hoffmann, Max Mayr, Michael Kaufersch und vor allem Anna Benet-Pages und Evelyn Botz danke ich sehr für das gute Arbeitsklima. Ich danke Dr. Andreas Bolzer für seine Unterstützung während der Dissertation, die Durchsicht des Manuskripts und für seine Freundschaft.

Ich danke allen, die mich während dieser Zeit begleitet haben und zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen haben: meinen Mitbewohnern, meinen Freunden, Kollegen und meiner Familie.

Mein tiefster Dank gebührt meinen Eltern und meinen Großeltern, die mich vom Studium bis hin zur Dissertation stets unterstützt haben.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Monika Grabowski  
Geburtsdatum: 16. Dezember 1974  
Geburtsort: Freilassing  
Familienstand: ledig

**Institutsanschrift:** GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt  
Institut für Humangenetik  
Ingolstädter Landstr. 1  
85764 Neuherberg

## **Schulausbildung:**

1981 - 85 Grundschule König Otto, Königsbrunn  
1985 - 92 Gymnasium Königsbrunn  
1992 - 94 Gymnasium St. Anna, Augsburg; Allgemeine Hochschulreife

## **Hochschulausbildung:**

1994 - 96 Grundstudium und Vordiplom in Biologie an der TU München  
1996 - 98 Hauptstudium Biologie (Diplom) an der LMU München,  
Fachrichtung: Anthropologie und Humangenetik  
01/1999 - 10/1999 Diplomarbeit „Analyse repetitiver Sequenzen im menschl. Genom  
mittels Vielfarben-FISH auf Metaphase- und Interphase-  
Chromosomen“ bei Dr. M. Speicher, Humangenetik der LMU München  
11/1999 Abschluß als Diplom Biologin mit Note 1,2

## **Berufstätigkeit:**

01/2000 - 02/2003 wissenschaftliche Angestellte der Abteilung Medizinische Genetik,  
Klinikum Innenstadt, LMU München (Ziel: Promotion)  
01/2001 Umzug ans Institut für Humangenetik der TU München/GSF Neuherberg  
03/2000 - 04/2003 wissenschaftliche Angestellte in der Humangenetik der TU-München  
seit 06/2003 Mitarbeiterin im Medizinisch Genetischen Zentrum (MGZ) München

## **Stipendien, Kurse und Kongresse:**

05/1999 2. Europäischen Zytogenetik Kongress/Wien  
03/2000 Einführungskurs in das Betriebssystem Unix am LRZ  
03/2000 - 04/2000 Europäischer Kurs für medizinische Genetik/Sestri Levante  
09/2000 EMBO Workshop am RZPD Berlin  
05/2001 10. Internationalen Kongress für Humangenetik/Wien  
07/2001 Husar-Einführungskurs  
10/2001 NFF-Stipendium für den 51. Kongress der American Society of Human  
Genetics/San Diego  
11/2001 EGF-Stipendium für den 2. Internationalen Bioinformatikkurs/Bertinoro  
05/2002 Europäischer Humangenetik Kongress/Strasbourg

## Publikationsliste

### Artikel:

Grabowski M., Fauth C., Wirtz A., Speicher M.R. (2000). "Breakpoint within the nucleolus organizer region resulting in a reciprocal translocation t (4;14)(q21;p12)". *Am J Med Genet.* **92** (4): 264-8.

### ADHR Consortium:

Group 1: White K.E., Evans W.E., O'Riordan J.L.H., Speer M.C., Econs M.J.

Group 2: Lorenz-Depiereux B., Grabowski M., Meitinger T., Strom T.M. (2000).

"Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23". *Nat Genet.* **26** (3): 345-8.

Zimprich A., Grabowski M., Asmus F., Naumann M., Berg D., Bertram M., Scheidtmann K., Kern P., Winkelmann J., Müller-Myhsok B., Riedel L., Bauer M., Müller T., Castro M., Meitinger T., Strom T.M., Gasser T. (2001). "Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome". *Nat Genet.* **29** (1): 66-9.

Grabowski M., Zimprich A., Lorenz-Depiereux B., Kalscheuer V., Asmus F., Gasser T., Meitinger T., Strom T.M. (2002). "The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted". *Eur J Hum Genet.* **11** (2): 138-44.

### Kongressbeiträge:

#### Vortrag mit publiziertem Abstract:

Grabowski M., Zimprich A., Asmus F., Bauer M., Naumann M., Berg D., Bertram M., Winkelmann J., Müller-Myhsok B., Meitinger T., Strom T.M., Gasser T. (2001). "Mutations in the gene for epsilon-sarcoglycan (SGCE) cause myoclonus-dystonia syndrome". *Am J Hum Genet.* **69**, Suppl. 4.

#### Poster mit publiziertem Abstract:

Grabowski M., Zimprich A., Lorenz-Depiereux B., Asmus F., Bauer M., Kalscheuer V.M., Gasser T., Meitinger T., Strom T.M. (2002). "Epsilon-sarcoglycan (SGCE), the gene mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is imprinted". *Eur J Hum Genet.* **10**, Suppl. 1.