
Ein Mausmodell für die fehlende Erkennung
methylierter DNA durch das Mbd1-Protein
(Methyl-CpG-bindendes Protein 1)

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades am
Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von Olaf Friese

Hamburg 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolf H. Strätling

Datum der Disputation: 12.01.2007

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 6 |
| 1.1 | DNA-Methylierung in eukaryotischen Zellen | 6 |
| 1.2 | DNA-Methylierung und Genexpression | 9 |
| 1.3 | Mutationen von <i>DNMT</i> und <i>MECP2</i> | 11 |
| 1.4 | MBD1 und andere Methyl-CpG-bindende Proteine | 16 |
| 1.5 | DNA-Methylierung und Imprinting | 24 |
| 1.6 | DNA-Methylierung und Histonmodifikationen | 27 |
| 1.7 | Aufgabenstellung | 31 |
| | | |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 2.1 | Material | 33 |
| 2.1.1 | Chemikalien und Enzyme | 33 |
| 2.1.2 | Antibiotika und Medien für Bakterienkultur | 34 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen | 35 |
| 2.1.4 | Kits | 38 |
| 2.1.5 | Zelllinien | 39 |
| 2.1.6 | Programme | 39 |
| 2.1.7 | Zellkultur | 40 |
| 2.1.8 | Herstellung kompetenter Bakterien | 47 |
| 2.1.9 | DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen | 49 |
| 2.1.10 | Agarose-Gelelektrophorese | 49 |
| 2.1.11 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten | 49 |
| 2.1.12 | Ligation von DNA-Fragmenten | 50 |
| 2.1.13 | Transformation | 50 |
| 2.1.14 | Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab | 51 |
| 2.1.15 | Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung | 52 |
| 2.1.16 | Präparation von Plasmid-DNA | 52 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.17 | Sequenzierung von DNA | 53 |
| 2.1.18 | Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 54 |
| 2.1.19 | Phenolextraktion von Nukleinsäuren | 55 |
| 2.1.20 | Fällung von Nukleinsäuren | 55 |
| 2.1.21 | Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen | 56 |
| 2.1.22 | Verwendete und hergestellte Vektoren | 56 |
| 2.1.23 | Transfektion | 57 |
| 2.1.24 | Präparation von DNA aus Mausschwänzen | 58 |
| 2.1.25 | Southernblot | 60 |
| 2.1.26 | Injektion von ES-Zellen in Blastozysten | 62 |
| 2.1.27 | Untersuchung der Funktionalität der loxP-Stellen | 62 |
| 2.1.28 | RT-PCR | 62 |
| 2.1.29 | Isolierung der Gesamt-RNA | 63 |
| 2.1.30 | mRNA-Quantifizierung durch LC-PCR | 64 |
| 2.1.31 | Überprüfen von Bakterienkolonien durch PCR | 66 |
| 2.1.32 | Westernblot | 67 |
| 2.1.33 | Röntgen der Mäuse/Ultraschalluntersuchungen | 68 |
| 3 | ERGEBNISSE | 70 |
| 3.1 | Design des Targeting-Vektors | 70 |
| 3.2 | Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen | 76 |
| 3.2.1 | Detektion homologer und Cre-vermittelter Rekombinationen | 78 |
| 3.2.2 | Erzeugung der konditional MBD1-defizienten Mauslinien | 80 |
| 3.2.3 | <i>Mbd1</i> -Expression der konditional MBD1-defizienten Mäuse | 84 |
| 3.2.4 | Genomische Situation der ES-Zellen nach Cre-Expression | 87 |
| 3.3 | Generierung von MBD1-defizienten Mäusen | 90 |
| 3.3.1 | Erzeugung der MBD1-defizienten Mauslinien | 91 |
| 3.3.2 | Fehlende <i>Mbd1</i> -Expression der MBD1-defizienten Mauslinie | 95 |
| 3.4 | Phänotyp der MBD1-defizienten Mäuse | 97 |
| 3.4.1 | Der Einfluss von <i>Mbd1</i> auf das Herz | 98 |
| 3.4.2 | Der Einfluss von <i>Mbd1</i> auf die Skelettbildung | 101 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.4.3 | Expressionsanalysen der MBD1-defizienten Mäuse | 102 |
| 3.4.4 | Untersuchungen von Histon-H3-Modifikationen | 105 |
| 4 | DISKUSSION | 107 |
| 4.1 | Konditional MBD1-defiziente Mäuse | 110 |
| 4.2 | Phänotyp der MBD1-defizienten Mäuse | 113 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 119 |
| 6 | SUMMARY | 121 |
| 7 | LITERATUR | 123 |
| 8 | ANHANG | 132 |
| 8.1 | Allgemeine Abkürzungen | 132 |
| 8.2 | Danksagung | 134 |
| | Erklärung | 135 |

1 Einleitung

1.1 DNA-Methylierung in eukaryotischen Zellen

Bereits 1948 wurde die Modifikation von Cytosin an der Kohlenstoffposition 5' durch Methylierung in Kalbsthymus-DNA entdeckt (Übersicht bei Weissbach, 1993). Die gleiche Modifikation fand man 1951 in Weizenkeimen. 1955 entdeckte man zusätzlich die Methylierung der Stickstoffposition 6 von Adenin in Bakterien. In Prokaryoten ist die Methylierung von Cytosin und Adenin hauptsächlich am Restriktions-Modifikations-System beteiligt, das der Abwehr von Phageninfektionen dient (Arber, 1965). Bei der DNA-Replikation in Bakterien, Pflanzen, Pilzen, Säugerzellen und den meisten Viren werden die vier Haupt-Nukleotide (dNTPs) in die DNA inkorporiert. Modifizierte Nukleotide werden erst nach der Replikation durch Enzyme gebildet, deren Substrat doppelsträngige DNA ist. Die Methylierung von eukaryotischer DNA findet in der Regel an solchen Cytosinen statt, die Teil der Dinukleotidsequenz 5'-CpG-3' sind (Gruenbaum et al., 1982; Bestor, 2000; Simon et al., 1983). Dabei sind die Cytosinreste dieses Dinukleotidpaares symmetrisch methyliert. Säugetierzellen besitzen jedoch auch die Fähigkeit, Cytosine zu methylieren, die Teil der Trinukleotidsequenz 5'-CpNpG-3' sind, wobei N jede der vier Hauptbasen sein kann (Clark et al., 1995). Mit Hilfe des genomischen Sequenzierens nach der Bisulfit-Methode konnten auch außerhalb von CpG- oder CpNpG-Sequenzen methylierte Cytosinreste in der DNA von Säugern, Pilzen und Pflanzen (Antequera und Bird., 1988; Jackson et al., 2004) nachgewiesen werden. Abhängig von der Spezies sind 60-90% aller CpG-Dinukleotide und insgesamt 1-6% aller Cytosine im Genom methyliert. Die in den 5'-CpG-3'-Dinukleotiden vorliegenden Cytosine werden durch DNA-Methyltransferasen (DNMTasen) symmetrisch methyliert. Die erste DNA-Methyltransferase cDNA (Dnmt) wurde 1988 von Bestor und Mitarbeitern aus der Maus kloniert (Bestor et al., 1988). In der Folgezeit wurden Homologe in Menschen, Huhn und Drosophila identifiziert (Ballestar et al., 2001; Okano et al., 1999). Die klonale Weitergabe von Methylierungsmustern und die Etablierung gewebsspezifischer Methylierungsmustern in Säugern führte zu der Annahme, dass verschiedene Typen von Methyltransferasen existieren. Die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 bevorzugt hemi-methylierte DNA als Substrat, welche als Produkt aus der DNA-Replikation hervorgeht. Somit wird der entstehende Tochterstrang an gegenüberliegenden CpG-Stellen methyliert.

Die Methyltransferase DNMT1 (Li E. et al., 1992) sichert so die Weitergabe von Methylierungsmustern in somatischen Geweben. Im Gegensatz dazu benutzen die zwei *de novo*-Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b) unmethylierte DNA als Substrat. Hierdurch wird zum Beispiel DNA viralen Ursprungs via DNA-Methylierung in ihrer Expression inaktiviert. Jahner und Jaenisch (1985) konnten in frühen Embryonen eine solche *de novo*-Methyltransferase-Aktivität zum ersten Mal nachweisen. Okano und Mitarbeitern (1999) gelang es, die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b aus der Maus zu isolieren und zeigten, dass ihre Funktion essentiell für die *de novo*-Methylierung in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist. Ferner werden transgene Konstrukte nach Integration in das Genom via *de novo*-Methyltransferasen methyliert und hierdurch ihre Expression reguliert. Diese Tatsache ist bei der Technik der Pronukleusinjektion von Bedeutung, da das Transgen in Abhängigkeit von der Kopienanzahl und dem Integrationsort exprimiert wird. Neben der Fähigkeit, spezifische Methylierungsmuster zu etablieren, müssen Säugerzellen auch die Fähigkeit zur gezielten Demethylierung von DNA-Sequenzen besitzen. Viele gewebsspezifische Gene werden demethyliert, wenn sie während der Differenzierung induziert werden (Razin und Kafri, 1994). Ob es sich bei diesem Prozess der Demethylierung jedoch um eine spezifische Enzymaktivität handelt, oder ob der Prozess einem passiven Vorgang unterliegt, ist ungeklärt (Mayer et al., 2000; Gruenbaum et al., 1982). Falls die Methyltransferase-Aktivität zum Zeitpunkt der DNA-Replikation inhibiert wird, liegt die Hälfte der replizierten DNA-Stränge nach zwei Replikationsrunden unmethyliert vor. Es wird angenommen, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren, deren Bindungskapazität nicht durch DNA-Methylierung beeinflusst wird (z.B. Sp1), die Erhaltungsmethylierung an der Bindungsstelle verhindert (Brandeis et al., 1994). Durch die Generierung von DNMT1- und DNMT3a/DNMT3b- defizienten Mäusen wurde auf die entscheidende Funktion dieser DNA-Methyltransferasen geschlossen: Bei den defizienten Mäusen (Knockout-Mäuse) tritt embryonale Letalität auf. Eine Erklärung hierfür ist die Dynamik der DNA-Methylierung bei der Mausentwicklung.

Die individuelle Entwicklung beginnt mit einer befruchteten Eizelle, die bereits die gesamte genetische Information für die Ausbildung eines jeden Zelltyps enthält. Das humane Genom beinhaltet nach derzeitigem Wissensstand etwa 24.194 Gene (ensembl.org), die für die Differenzierung von mehr als 200 histologisch definierten Gewebetypen verantwortlich sind. Die Differenzierung einer Zelle geht damit einher, dass ein Großteil des transkriptionellen Genoms abgeschaltet wird. Der Differenzierungsprozeß ist an den genauen Ablauf eines genetischen

Expressionsprogramm gebunden, welcher jedoch unter epigenetischer Kontrolle steht. Das heißt, es erfolgt eine Genregulation unabhängig der DNA-Sequenz, aber abhängig von der Topologie der DNA (Bao et al., 2000; Reik et al., 2001). Auf diese Weise wird ein molekulares Gedächtnis geformt, welches die Differenzierung einer Zelle definiert. Hierbei wird nicht die Basensequenz der DNA selbst verändert, sondern ihre Zugänglichkeit wird über DNA-Methylierung und Veränderung der Chromatinstruktur *via* Histonmodifikationen beeinflusst. Diese Mechanismen werden bereits bei der Reifung der Keimzellen eingeleitet (Sado et al., 2000; Sado und Ferguson-Smith, 2005). Hierbei kommt es zu deutlichen Unterschieden im Umfang der Methylierung bei Spermien und Eizellen. Ein Teil der Methylierungen ist allerdings so stabil, dass sie auch noch nach der Befruchtung und bei allen Folgezellen Bestand haben. Diese werden als Imprints bezeichnet. In der frühen Embryonalentwicklung finden weitere Veränderungen statt, wobei es zu maternalen (von der Mutter vererbt) und paternalen (von dem Vater vererbt) Expressionsunterschieden kommt, die an die Nachkommen übertragen werden. Von speziellem Interesse ist hierbei die Funktion der X-Chromosome bei der Entwicklung von extraembryonalen Geweben wie der Plazenta. Die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen verläuft über eine Kombination von Heterochromatin-Proteinen, die häufig dem Imprinting unterliegen (Ferguson-Smith und Surani, 2001; Mann, 2001; Sado et al., 2000; Csankovszki et al., 2001). Die Rolle von Mbd1 wird hier später diskutiert. Ferner befinden sich viele Gene, die für die Plazenta-Entwicklung von Bedeutung sind auf dem X-Chromosom. Allgemein kann gesagt werden, dass bei einer veränderten Expression von Genen, die für die Ausbildung der Plazenta entscheidend sind, eine postzygotische Entwicklungsbarriere nicht überwunden wird, d.h., der Fötus entwickelt sich nur bis zur Zygote (Hemberger, 2002; Georgiades et al., 2001). Hierbei sind neben der Methylierung der DNA, die Methylierung oder Acetylierung der Kernproteine, besonders der Histone, für die Genregulation entscheidend (Wade et al., 2001; Hashimshony et al., 2003; Grandjean et al., 2001; Peters et al., 2001). Ob und wie diese Prozesse umkehrbar sind und ineinander greifen ist ein zentrales Thema der gegenwärtigen Forschung, besonders im Zusammenhang mit Klonierungsversuchen durch somatischen Kerntransfer (Humpherys et al., 2001). Bei diesem Versuch ist der schwierigste Schritt die Rückführung einer adulten Körperzelle auf die Entwicklungsstufe einer Zygote als Basis für die Bildung verschiedener Gewebe oder eines Individuums, wie es erstmals bei dem Schaf Dolly erfolgreich durchgeführt wurde (Wilmut et al., 1997). Limitierender Faktor beim Klonen, also der Herstellung einer totipotenten Zelle aus einem somatischen Zellkern, der in eine

entkernte Oozyte transferiert wurde, scheinen epigenetische Vorgänge zu sein (Rideout et al., 2001; Jaenisch und Bird, 2003). Fehlsteuerungen in den epigenetischen Regulationsmechanismen können schwerwiegende Folgen, wie zum Beispiel das Rett-Syndrom aufweisen (Rett A., 1966; Ballestar et al., 2005). Für das Rett-Syndrom sind Mutationen im *MeCP2*-Gen, welches von unserem Labor mit entdeckt wurde (von Kries et al., 1991, Amir et al., 1999), verantwortlich. Diese Mutationen wurden in verschiedenen Mausmodellen analysiert (Zhogbi et al., 2005; Chen et al., 2001; Guy et al., 2001; Shahbazian et al., 2002). Als weitere Krankheiten, bei denen von einer epigenetischen Fehlregulation ausgegangen werden kann, sind Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Huntington zu nennen. Weiterhin führen Mutationen im *DNMT3b*-Gen zum ICF-(immunodeficiency, centromeric instability, facial anomaly) Syndrom (Xu et al., 1999; Feng und Zhang, 2005).

1.2 DNA-Methylierung und Genexpression

In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die sequenzspezifische Methylierung von Promotoren in Pflanzen und Säugern (Bird et al., 1986; Li E. et al., 1993) eine wichtige Rolle bei der Genregulation einnimmt. Dabei konnte fast ausschließlich eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und der Transkriptionsrate festgestellt werden. Die Gene, deren Transkription durch DNA-Methylierung unterdrückt wird, weisen im Promotorbereich meist eine hohe Dichte von methylierbaren CpG-Dinukleotiden auf. Diese sogenannten CpG-Inseln sind bei Haushaltsgenen grundsätzlich nicht methyliert (Groudine et al., 1981). Neben Genen aus DNA- und RNA-Viren besitzen nahezu 60% der bekannten endogenen Säugergene eine CpG-reiche Region im Promotorbereich (Bird, 1986; Simon et al., 1983; Zhao et al., 2005). DNA-Methylierung in den meist methylierungsfreien CpG-Inseln ist mit einer stabilen Hemmung der Genexpression verbunden, wie es zum Beispiel beim inaktiven X-Chromosom bei Frauen beobachtet wurde (Csankovszki et al., 2001; Mermoud et al., 2002). In wenigen Fällen korreliert jedoch der erhöhte Methylierungsgrad in einer CpG-reichen Region mit einer erhöhten Transkriptionsrate. Ein Beispiel hierfür ist das Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 2-Rezeptor-Gen (*Igf2r*) der Maus, bei dem Transkription des kodierenden Stranges auf dem maternalen (mütterlichen) Gen möglicherweise eine stromabwärts gelegene CpG-Anhäufung in der DMD (Differentielle Methylierte Domäne)-Region 2 zum Ziel für *de novo*-Methylierung macht. Dadurch kann die DMD-Region 2 des *Igf2r*-Gens nicht mehr als Promotor für den nicht

kodierenden Strang fungieren (Vu et al., 2000; Wutz et al., 2002).

Mindestens zwei alternative Mechanismen können die Inhibierung der Transkription durch DNA-Methylierung bewirken. Eine sequenzspezifische Methylierung kann zu einer direkten Störung der Bindung von essentiellen Transkriptionsfaktoren führen, die den Kontakt zu Cytosinen in der großen Furche der Doppelhelix benötigen. Die meisten Transkriptionsfaktoren haben GC-reiche Bindungsstellen, viele haben CpGs in ihrem Erkennungselement. Interessanterweise vermag der Transkriptionsfaktor Sp1, der für die Transkription vieler Haushaltsgene benötigt wird, sowohl an methylierte als auch an unmethylierte Zielsequenzen zu binden und verhindert darüber hinaus die Methylierung angrenzender Sequenzen (Brandeis et al. 1994). Somit ist die Expression von Haushaltsgenen oft DNA-methylierungsunabhängig. Da Sp1 nur in höher entwickelten Eukaryoten vorkommt, die 5'-Methyl-Cytosin enthalten, kann man vermuten, dass Sp1 eine spezielle Rolle bei der Regulation der Transkription durch Methylierung einnimmt. Ferner erkennen Methyl-CpG-bindende Proteine (MBD Proteine) wie MBD1 und MeCP2 methylierte DNA und reprimieren die Expression von Zielgenen über ihre transkriptionelle Repressordomäne oder via Histonmodifikationen. Zu den Interaktionspartnern von MBD1 gehören Histon-Methylasen wie zum Beispiel SUV39h1 und SETDB1 (Fujita et al., 2003; Sarraf und Stancheva, 2004; Ichimura et al., 2005), die Lysin 9 von Histon H3 methylieren und damit eine Heterochromatinbildung favorisieren (Dobosy und Selker, 2001; Lachner et al., 2001; Lehnertz et al., 2003). Damit werden diese Sequenzbereiche für Transkriptionsfaktoren unzugänglich.

Die Verpackung der DNA eukaryotischer Zellen im Chromatin erfolgt in drei Ebenen. Die Proteine des Chromatins werden in Histone und Nicht-Histon-Proteine eingeteilt. Die Histone sind eine Gruppe kleiner, stark basischer Proteine. Sie tragen zur strukturellen Organisation des Chromatins bei, sowie zur Regulation der Genaktivität. Ihre basischen Aminosäuren neutralisieren die sauren Phosphatgruppen der DNA und ermöglichen die dichte Packung der DNA im Zellkern. Je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen oktameren Komplex, um den 146 Basenpaare gewickelt sind. Diese Partikel werden als Nukleosomen bezeichnet und stellen die unterste Verpackungsebene der DNA dar. An die zwischen den Nukleosomen befindliche DNA bindet das Histon H1 und unterstützt die Ausbildung einer übergeordneten 30 nm-Faser, der sogenannten Solenoidstruktur des Chromatins. Die Solenoide wiederum bilden Chromatinschleifen von ca. 20.000 bis 80.000 Basenpaaren. Das Ende jeder

Schleife ist an eine Gerüststruktur gebunden, die man als Kerngerüst, Matrix oder Scaffold bezeichnet (von Kries et al., 1990). Es wird angenommen, dass die DNA über spezifische Anheftungssequenzen an das Kerngerüst gebunden wird. Diese Matrix bzw. Scaffold Attachment Regions (MARs oder SARs) genannten DNA-Sequenzen sind 250 bis mehrere tausend Basenpaare lang (Loc Phi-Van und Strätling, 1988; Brunner et al., 2000; Horike et al., 2005). Es handelt sich um AT-reiche Sequenzen, für die bisher keine Konsensussequenz identifiziert werden konnte, die aber eine auffällige Doppelstranginstabilität zeigen. Zwischen den MARs liegt die DNA in Schlaufen um das Proteingerüst herum. Dieses Modell wurde durch elektronenoptische Untersuchungen untermauert. Durch Behandlung von Metaphase-Chromosomen mit Polyanionen wurden die Histone entfernt. In anschließenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde dadurch das Proteingerüst der Chromosomen und die in Schlaufen liegende DNA sichtbar. Die Regulierung der Topologie des Chromatins wird durch Histonmodifikationen gewährleistet (Peters et al., 2002; Jenuwein und Allis, 2001). Diese nehmen somit Einfluss auf die Genexpression. Inwieweit DNA-Methylierung Histonmodifikationen steuert oder vice versa ist eine Fragestellung, die momentan intensiv untersucht wird. Ebenfalls ist bisher ungeklärt, welche genaue Funktion den Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBDs) als Regulatoren zwischen diesen beiden epigenetischen Mechanismen zufällt. Grundsätzlich wurde durch die Untersuchung defizienter Mausmodelle (Knockouts) bisher geklärt, dass die Ausschaltung DNA-methylierungsrelevanter als auch chromatinmodifizierender Gene häufig eine embryonale Letalität hervorruft (Li E., 2002; Übersicht).

1.3 Mutationen von *DNMT* und *MECP2*

Der Zusammenhang zwischen DNMTs und MBDs besteht darin, dass DNMTs die DNA methylieren, und die MBDs dieses Methylierungsmuster binden und somit interpretieren. Zu den DNA-Methyltransferasen (DNMTs), die die 5'-Position der Cytosine im Kontext von CpG Stellen methylieren, gehören die Erhaltungs-DNA-Methyltransferase DNMT1 und die *de novo*-DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b (Espada et al., 2004; Bestor et al., 2000; Chen et al., 2002). DNMT3l wird aufgrund einer hohen Homologie zu dieser Familie gezählt, obwohl dieses Protein keine DNA-Methylierung katalysiert. DNMT1 ist für die Erhaltung des Methylierungsmusters während der Replikation der DNA zuständig, während DNMT3A und 3B *de novo*-Methyltransferasen sind, die das Methylierungsmuster der DNA etablieren (Okano et

al., 1998, 2002). Eine abnormale DNA-Methylierung ist an der Pathogenese vieler Krebsarten beteiligt (Park et al., 2005; Yamada et al., 2005; Gaudet et al., 2003; Eden et al., 2003). So kann die Hypomethylierung zur Aktivierung von Onkogenen und die Hypermethylierung zur Repression von Tumorsuppressorgenen führen. In beiden Fällen kann unkontrolliertes Zellwachstum erfolgen (Ballestar et al., 2003; Rountree et al., 2001; Holm et al., 2005). Im Genom ist 5'-Methylcytosin ein *Hotspot* für Mutationen, da die Desaminierung von 5'-Methylcytosin zu Thymin mit hoher Rate spontan abläuft. Somit sind CpG-Dinukleotide häufig von Mutationen betroffen. Gleichzeitig sind sie seltener im menschlichen Genom anzutreffen als eine statistische Verteilung der Basen erwarten ließe. Inwieweit Methyl-CpG-bindendes Protein 1 (MBD1) die Krebsentstehung beeinflusst, wie es bei MBD2 und MBD4 der Fall ist, ist zu untersuchen (Sansom et al., 2003 und 2005; Ballestar et al., 2003; Bader et al. 2003; Campell et al., 2004; Jang et al., 2005; Millar et al., 2002; Patra et el., 2003; Villa et al., 2006; Watanabe et al., 2003; Schlegel et al., 2002; Laird und Jaenisch, 1996). Somit bietet die Generierung von konditional MBD1-defizienten Tieren die Möglichkeit, diese mit anderen gendefizienten Tieren zu verpaaren, die eine erhöhte Karzinomentwicklung aufweisen. Durch das Cre-lox-System könnte sowohl eine embryonale Letalität umgangen werden als auch gewebsspezifische Analysen erfolgen.

Die Abwesenheit von DNA-Methyltransferasen führt bei Mäusen zu schweren Schädigungen. Die Defizienz des *Dnmt1*- oder des *Dnmt3b*-Gens ist embryonal letal, die Defizienz des *Dnmt3a*-Gens ist frühzeitig postnatal letal (Li E. et al., 1992; Okano et al., 1999; Jackson-Grusby et al., 2001). Durch Integration eines hypomorphen *Dnmt1*-Allels in die Maus generierten Rudolf Jaenisch et al. 2003 eine Maus, deren *Dnmt1*-Expression auf 10% reduziert war (Gaudet et al., 2003). Diese Mäuse entwickelten ab dem vierten Monat aggressive T-Zell-Lymphome und zeigten eine Trisomie von Chromosom 15. Die Überexpression von *Dnmt1* im Mausmodell verursacht einen Verlust von Imprinting, embryonale Letalität und eine erhöhte Tumorprogression (Eden et al., 2003; Biniszkiwicz et al., 2002; Lee et al., 2001; Gaudet et al., 2004). DNMT3L, ein katalytisch inaktives Mitglied der DNA-Methyltransferasen-Familie, ist für das Setzen von maternalen Imprints und einigen paternalen Imprints verantwortlich (Hata et al., 2002; Gaudet et al., 2003; Übersicht Li E., 2002). Es konnte demonstriert werden, dass *Dnmt3L* mit der *de novo*-DNA-Methyltransferasen DNMT3a kooperiert, um Imprints in der Keimbahn zu etablieren. Die Abwesenheit von *Dnmt3L* führt zu Azoospermie (Fehlen beweglicher, reifer Spermien im Ejakulat), bis hin zu einer gestörten Meiose und der Derepression von

transposonalen Elementen.

MBD1 gehört der Familie der Methyl-CpG-bindenden Proteine (MBDs) mit den Mitgliedern MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 an. Für MeCP2, MBD1, MBD2 und MBD4 wurde gezeigt, dass sie spezifisch an methylierte DNA binden, nahezu unabhängig von der DNA-Sequenz (Hendrich und Bird, 1999; von Kries et al., 1994; Koch und Strätling, 2004). Das menschliche *MECP2*-Gen liegt auf dem X-Chromosom (Xq28), ist 75,9 kb lang und enthält vier Exons (Quaderi et al., 1994; Reichwald et al., 2000). Der Promotor und das erste, nicht kodierende Exon liegen in einer CpG-Insel. Der Translationsstart befindet sich im zweiten Exon. Das dritte und vierte Exon kodieren zwei wichtige Domänen von MeCP2, die MBD-Domäne (Exon 3 und 4) und die Transkriptionelle Repressor Domäne TRD (Exon 4). Das *MECP2*-Gen wird ubiquitär exprimiert und besitzt zwei Polyadenylierungsstellen (Reichwald et al., 2000). Daher entstehen zwei unterschiedlich lange Transkripte von 1,9 kb und etwa 10 kb, deren Verteilung gewebespezifisch ist (Reichwald et al., 2000). So wird im Gehirn das 10 kb-Transkript stark, das 1,9 kb-Transkript dagegen kaum exprimiert. In Muskelgeweben wie der Skelettmuskulatur und dem Herz hingegen wird das kurze Transkript stark exprimiert, das längere wiederum sehr viel weniger. Der Gehalt von *Mecp2* ist in der adulten Maus in Geweben des Hirns, der Lunge und der Milz hoch, in Herzgewebe und Nierengewebe schwächer und in Lebergewebe, Magen und Dünndarm gerade noch zu detektieren. Es wurde keine Korrelation zwischen Protein- und RNA-Gehalt gefunden, so dass die Translation des Proteins möglicherweise durch gewebsspezifische Faktoren posttranskriptionell reguliert wird. Der Zeitpunkt der Expression von MeCP2 korreliert bei Maus und Mensch mit der Reifung des zentralen Nervensystems, wobei die ontogenetisch älteren Strukturen wie das Rückenmark und der Hirnstamm MeCP2 früher als die neueren Strukturen wie Hippocampus und cerebraler Kortex exprimieren (Shahbazian und Zoghbi, 2002). Amir et al. (1999) identifizierten Mutationen im *MECP2*-Gen als Ursache für das Rett-Syndrom. Bereits 1966 beschrieb der Wiener Kinderarzt Dr. Andreas Rett erstmals diese neurologische Störung (Rett, 1966). Es handelt sich um eine Erkrankung, von der vor allem Mädchen betroffen sind (Amir et al., 1999). Das Rett-Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1 zu 15.000 weiblichen Neugeborenen auf. Da Jungen nur ein *MECP2*-Allel besitzen, sind Mutationen des Gens darüber hinaus für männliche Träger möglicherweise letal. Es wurden jedoch auch einige Fälle von männlichen Trägern mit MeCP2-Mutationen beschrieben, die nicht letal waren. Bei Rett-Patientinnen sind im Vergleich zu gesunden Frauen der Kopfumfang, das Gewicht des Gehirns, die Größe der

Neuronen und Zellkerne sowie die Zelldichte im Gehirn reduziert. Viele Hirnregionen weisen eine geringere Anzahl an Dendriten und Verzweigungen auf. Aus klinischer Sicht entwickeln sich die Patientinnen in den ersten sechs bis 18 Lebensmonaten normal. Es folgt eine Phase, in der es zu mentaler Retardierung und zu einer rasch fortschreitenden Rückentwicklung bereits erworbener Fähigkeiten kommt, z. B. zum Verlust bereits erlernter Sprache, gezielter Handbewegungen und sozial-kommunikativer Fähigkeiten. Es werden stereotype Bewegungen wie Waschbewegungen der Hände entwickelt, die während der gesamten Wachperiode ausgeführt werden. Oft treten Atemprobleme und veränderte Herzschlagfrequenzen auf. Ab dem vierten Lebensjahr folgt eine Phase der Stagnation. In der folgenden Regression können auch epileptischen Anfällen auftreten. Zu den klinischen Diagnosekriterien gehören neben der mentalen Retardierung und den stereotypen Handbewegungen auch Atemprobleme, Krämpfe, Skoliose und allgemeine Hypoaktivität. Bisher sind weder eine biochemische Diagnose noch eine kausale Therapie verfügbar. Es wurde noch nicht vollständig geklärt, wie das Fehlen von funktionellem MeCP2 die Pathogenese des Rett-Syndroms verursacht. Mausmodelle von MECP2-defizienten Mäusen ermöglichen hierzu molekularbiologische Analysen (Watson et al., 2005; Zoghbi et al., 2005; Bienvenu et al., 2006; rett syndrome foundation).

Totales MECP2-Defizit in Mäusen galt anfangs als letal (Tate et al., 1996; Chen et al., 2001). MECP2-defiziente Mäuse, männlich hemizygot und weiblich homozygot, waren aber lebensfähig und zeigten direkt nach der Geburt keinen Rett-Phänotyp. Nach ungefähr drei bis acht Wochen stellten sich Rett-ähnliche Symptome wie unkoordinierte Bewegungen, reduzierte Aktivität und Atmungsprobleme ein (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Diese Mäuse hatten insbesondere kleinere Gehirne sowie kleinere und dichter gepackte Neuronen (Chen et al., 2001). Die Tiere starben innerhalb von zehn Wochen. Bei heterozygoten Weibchen wurde ein Rett-ähnlicher Phänotyp erst nach drei bis zwölf Monaten diagnostiziert (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Konditional MECP2-defiziente Mausmodelle von zwei Arbeitsgruppen wiesen dem humanen Rett-Syndrom vergleichbare Eigenschaften auf (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Durch gezielte Mutagenese wurden Mäuse erzeugt, in denen *Mecp2* während des Embryonalstadiums spezifisch im Gehirn deletiert wurde (Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). Dieses gelang durch die Verpaarung von konditional MECP2-defizienten Mäusen mit hirsnspezifisch Cre-exprimierenden Tieren. Diese Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die MECP2-defizienten Mäuse. Bei weiteren konditional MECP2-defizienten Mäusen, in denen *Mecp2* selektiv in post-mitotischen Neuronen des Gehirns ausgeschaltet wurde, trat ebenfalls ein

den MECP2-defizienten Mäusen vergleichbarer Phänotyp auf, wenn auch später und schwächer ausgeprägt (Chen et al., 2001). Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass durch MECP2-Defizients vor allem die Neuronen des Gehirns geschädigt werden, andere Gewebe scheinen nicht oder kaum betroffen zu sein. Des weiteren scheint sich die Mutation erst im ausgereiften postmitotischen Gehirn zu manifestieren, die Hirnentwicklung wird nur geringfügig beeinträchtigt (Shahbazian und Zoghbi, 2002; Guy et al., 2001; Chen et al., 2001). MeCP2 ist außerdem für das Expressionsmuster von hirnspezifischen Differenzierungs-Genen mitverantwortlich. Eine *Mecp2*-Mutation führt in diesem Fall zur unkontrollierten Expression neuronenspezifischer Gene. Genexpressionsanalysen des Hirngewebes von Rett-Patienten zeigten eine Erhöhung von Glia-Transkripten, die in bekannte neuropathologische Mechanismen involviert sind. Eine Abnahme der Expression wurde bei vielen neuronenspezifischen mRNAs beobachtet. Die dramatische Abnahme der Expression von präsynaptischen Markern deutet auf ein spezifisches Defizit der präsynaptischen Entwicklung hin. Ferner führt ein MECP2-Defizit zu einer verringerten *Ube3a*- und *Gabrb3*-Expression (Makedonski et al., 2005). Eine verringerte *GABRB3*-Expression wird bei dem Angelmann-Syndrom diskutiert. Bei Autismus-Patienten hingegen wurde eine verringerte *UBE3a*-Expression gefunden, somit wird eine Beteiligung von MECP2 auch bei Autismus diskutiert (Makedoski et al., 2005). Weiterhin wird diskutiert, ob das Rett-Syndrom von einer gestörten Expression von Imprinting-Genen herrührt, da eine erhöhte Expression von *Dlx5* und *Dlx6* in MECP2-defizienten Mäusen gefunden wurde (Horike et al., 2005). Die Überexpression von *Mecp2* im Mausmodell führt zu einer neurologischen Fehlfunktion, die Mäuse sind hyperaktiv und etwa 30% sterben schon nach einem Jahr (Collins et al., 2004). Ferner zeigen Mäuse mit einem kombinierten Defizit von *Mbd1* und *Mecp2* eine stark verminderte Lebenserwartung von etwa 3 Wochen (Massechutes Institute of Technologie, 2005). Mutationen im *MBDI*-Gen wurden bei Autismus-Patienten (Li H. et al., 2005) und bei Patienten, die an Lungenkrebs erkrankt sind (Jang et al., 2005; Bader et al., 2003; Ballestar et al., 2003) festgestellt. Weiterhin wird eine erhöhte *Mbd1*-Expression in Biopsien von Prostata- und Dickdarmkrebsgewebe vorgefunden (Patra et al., 2003).

1.4 MBD1 und andere Methyl-CpG-bindende Proteine

Vor einigen Jahren wurde im Labor von W.H. Strätling ein DNA-bindendes Protein entdeckt, welches spezifisch sogenannte MAR-Sequenzen für die Chromatinorganisation wichtige DNA-Elemente bindet (von Kries et al., 1991; Weitzel et al., 1997). Dieses Protein, ARBP oder MeCP2 genannt, erkennt und bindet methylierte CpGs und SARs (Loc, P.V. et al., 1988). Später wurden verwandte Proteine entdeckt, die eine ähnliche DNA-Bindungsdomäne besitzen und auch spezifisch an methylierte Sequenzen binden (Hendrich et al., 1998). Zusammengenommen werden diese Proteine Methyl-CpG-Bindungsproteine genannt. In dieser Familie können vier Methyl-CpG-Bindungsproteine, MeCP2, MBD1, MBD2 und MBD3, als transkriptionelle Repressoren wirken, während ein fünftes Protein, MBD4, an der Reparatur von TG-Mismatchen beteiligt ist, die durch Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin entstehen (Wade et al., 2001). MeCP2 kann sowohl mit dem Corepressor SinA3 und der Histondeacetylase, als auch mit dem basalen Transkriptionskomplex interagieren und deshalb wenigstens teilweise die Transkription auch unabhängig von der Histondeacetylase reprimieren (Weitzel et al., 1997; Yu et al., 2000). Außerdem wird MeCP2 eine Funktion beim Spleißing zugeordnet (Buschdorf und Strätling, 2004). Die drei anderen Mitglieder, MBD1, MBD2 und MBD3, assoziieren auch mit dem Histondeacetylase-Komplex und besitzen somit auch Chromatinmodellierungsaktivität, die zur Bildung einer kompakten und transkriptionell inaktiven Chromatinstruktur beitragen (Nan et al., 1998). Der MeCP1-Komplex, der durch die Proteine MBD2 und MBD3-NuRD gebildet wird (Feng et al., 2001; Wade et al., 1999 und 2001; Ng et al., 1999), benötigt für seine Bindung an DNA mindestens 10-12 methylierte CpGs, während der MeCP2-Komplex einige wenige CpG-Dinukleotide erkennt (Heitmann et al., 2003; Koch und Strätling, 2004).

Das murine *Mbd1*-Gen besteht aus 15 Exons, die über einen Bereich von 14 kb verteilt liegen (Abbildung 1). Die MBD-Domäne wird von Exon 2 und 3, das Kernlokalisierungssignal (NLS) von Exon 4 und die drei CXXC-Domänen werden jeweils von Exon 8, 9 und 10 codiert. CXXC-Domänen sind auch im DNMT1-Protein zu finden. Die Sequenz für die Transkriptionelle Repressordomäne (TRD) befindet sich auf Exon 13 und 14. Während das Startcodon im Exon 2 liegt, befindet sich der Promoter mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem Bereich kurz vor Exon 1 (Genomatrix, promoterfinder). Durch alternatives Spleißen von Exon 10 in der Maus entstehen zwei Isoformen mit entweder zwei oder drei CXXC-Domänen, wobei die dritte Cysteinreiche

Domäne auch an unmethylierte DNA bindet. Beim Menschen hingegen wird Exon 8 alternativ gespleißt, was zu einem Verlust der ersten CXXC-Domäne führt (Jorgensen et al., 2004; Patra et al., 2003). Das menschliche *MBD1*-Gen zeigt zum Mausgen eine hohe Homologie mit zwei Ausnahmen. Das Exon 9 wird im menschlichen Genom von einem kurzen Intron unterbrochen, so dass Exon 9a und 9b entstehen. Bei der Maus ist im Exon 15 ein frühes Translationsstopcodon enthalten. Hingegen werden beim Menschen das gesamte Exon 15 und ein kurzer Bereich des 3'UTR transkribiert (Hendrich et al., 1999; Fujita et al., 1999 und 2000; Ng et al., 2000; Roloff et al., 2003; Nakao et al., 2001).

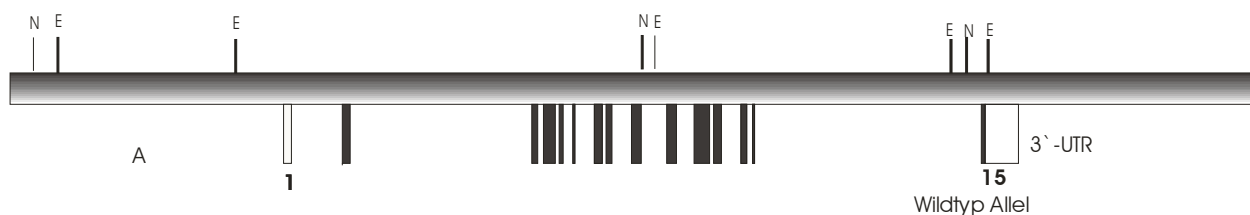


Abbildung 1: Struktur des murinen *Mbd1*-Gens. Das *Mbd1*-Gen erstreckt sich über etwa 14 kb und enthält 15 Exons. Exon 1 ist nicht kodierend und Exon 15 enthält einen untranslatierten 3'-Bereich. Die schwarzen Balken stellen die kodierenden Exons dar. Mit E und N sind die endogenen Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen EcoRI und NcoI eingezeichnet.

| Exon | Nukleotid- position | Exonlänge bp / Domäne | Intron | Nukleotid- position | Intronlänge bp |
|------|------------------------|--------------------------|--------|------------------------|-------------------|
| I | 1276-1424 | 149 | I | 1425-2393 | 969 |
| II | 2394-2529 | 136 MBD | II | 2530-6052 | 3523 |
| III | 6053-6167 | 115 MBD | III | 6168-6256 | 89 |
| IV | 6257-6477 | 221 NLS | IV | 6478-6554 | 77 |
| V | 6555-6637 | 83 | V | 6638-6835 | 198 |
| VI | 6836-6876 | 41 | VI | 6877-7234 | 358 |
| VII | 7235-7381 | 147 | VII | 7382-7464 | 83 |
| VIII | 7465-7593 | 129 CXXC | VIII | 7594-7967 | 374 |
| IX | 7968-8153 | 186 CXXC | IX | 8154-8639 | 486 |
| X | 8640-8807 | 168 CXXC | X | 8808-9143 | 336 |
| XI | 9144-9452 | 309 | XI | 9453-9538 | 86 |
| XII | 9539-9676 | 138 | XII | 9677-10040 | 364 |
| XIII | 10041-10169 | 129 TRD | XIII | 10170-10256 | 87 |
| XIV | 10257-10318 | 62 TRD | XIV | 10319-14666 | 4348 |
| XV | 14667-15288 | 622 | | | |

Tabelle 1: Exon- und Intronstruktur von murinem *Mbd1*. Aufgelistet sind die Anzahl der Exons mit den entsprechenden Nukleotidpositionen, ferner die Exon- und Intronlänge. Weiterhin sind die kodierenden Bereiche mit ihrer Funktion beschrieben. Das Exon 2 enthält den Translationsstart und kodiert mit Exon drei die Methyl-CpG-bindende-Domäne (MBD-Domäne), Exon 4 das Kernlokalisierungssignal (NLS), Exon 8 bis 10 kodieren die drei cysteinreichen Domänen (CXXC) und Exon 13 und 14 die transkriptionelle Repressor-Domäne (TRD) (Hendrich et al., 1999).

Das Prinzip bei der Herstellung von defizienten Mausmodellen ist die spezifische Mutation eines Zielgens, um *in vivo* durch Analysen des Phänotyps Aufschluss über Funktion und Bedeutung des manipulierten Gens zu erhalten. Die Mutation muss dabei zunächst in das Genom einer

embryonalen Stammzelle eingeführt werden, was durch homologe Rekombination zwischen einem die Mutation tragenden Targeting-Vektor und einem endogenen Zielgen gelingt. Durch große homologe Bereiche der genomischen *Mbd1*-Sequenz kann die Integrationswahrscheinlichkeit des Targeting-Vektors erhöht werden. Das Einbringen von loxP-Stellen in das Genom ermöglicht eine spätere, durch die Cre-Recombinase induzierte Deletion zwischen den loxP-Stellen. Die loxP-Stellen werden hierbei in Introns gelegt, um die Translation des Proteins nicht zu beeinträchtigen. Somit werden beliebige Bereiche im Genom deletiert. Ich deletierte Exon 2 und integrierte hierfür die drei loxP-Stellen in Intron 1 und 2. Die manipulierten Zellen werden in Blastozysten injiziert, um hier in ihrer Pluripotenz zur Keimbahn des Embryos beizutragen und die Mutation an dessen Nachkommen weiterzuerben. Nach Elektroporation des Targeting-Vektors in ES-Zellen, transientscher Cre-Expression in den Zellen und der Analyse der Integration vor Blastozysteninjektion entsteht eine transgene Maus, in der ein Großteil der Methyl-CpG-bindenden Domäne des *Mbd1*-Gens (kodiert von Exon 2 und 3) und das Startkodon deletiert sind und somit auf die Funktion des Gens aufgrund des Phänotyps der Maus geschlossen werden kann. Somit wird ein Mausmodell generiert, in dem methylierte DNA nicht mehr von Mbd1 gebunden wird und das Methylierungsmuster der DNA in Abwesenheit von Mbd1 interpretiert wird.

MBD1 gehört zu einer Familie von Kernproteinen, die ein gemeinsames Bindungsmotiv, die Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD), besitzen. Es besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 66,6 kDa. Die Strukturen der hochkonservierten MBD von humanem MeCP2, das parallel von unserem und einem englischen Labor entdeckt wurde (von Kries et al., 1991; Lewis et al., 1992), und von MBD1 wurden mit kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) aufgeklärt. Die Domäne besteht aus einem drei- oder viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, einer direkt folgenden α -Helix und zwei Schleifen (Brunner et al., 2000; Heitmann et al. 2003; Rauch et al., 2005). Außerhalb der MBD besitzen die fünf Proteine keine hohe Homologie und daher unterschiedliche transkriptionelle Repressordomänen (Hendrich und Bird, 1998). Bei MBD1 bindet die dritte cysteinreiche CXXC-Domäne auch an unmethylierte DNA (Fujita et al., 2000; Jorgensen et al., 2004). Analoge CXXC-Domänen wurden auch in dem *DNMT1*-Gen identifiziert (Bestor et al., 2000). Es wird diskutiert, ob MBD1 die Fähigkeit besitzt, methylierte CpG-Sequenzen zu binden und die Repression von Genen in Abhängigkeit von ihrem Methylierungsstatus zu regulieren. Die transkriptionelle Repressordomäne (TRD) von MBD1

ermöglicht die Repression über eine größere Distanz (Ng et al., 2000). Ferner ist MBD1 partiell im centromeren Heterochromatin lokalisiert, wo keine Histonacetylierung zu beobachten ist. MBD1 und MBD2 sind wie MeCP2 ebenfalls transkriptionelle Repressoren (Fujita et al., 1999 und 2000; Ng et al., 2000) und werden vorwiegend im Heterochromatin vorgefunden. Rekombinantes MBD1 zeigt in *in vitro*-Experimenten, dass es die Transkription von methylierter, nicht aber von unmethylierter DNA reprimiert (Fujita et al., 1999). Hingegen wurde von Fujita et al. 2000 in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass die *Snrpn*- und *p16*-Promotoren in Abhängigkeit von der Methylierungsdichte der DNA durch MBD1 reprimiert werden. Die transkriptionelle Repression kann durch den Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A teilweise aufgehoben werden. Es ist noch unbekannt, welche Histondeacetylase mit MBD1 assoziiert sind (Ng et al., 2000), vermutlich aber HDAC3 (Villa et al., 2006), das mit MBD1 in Leukämiezellen interagiert.

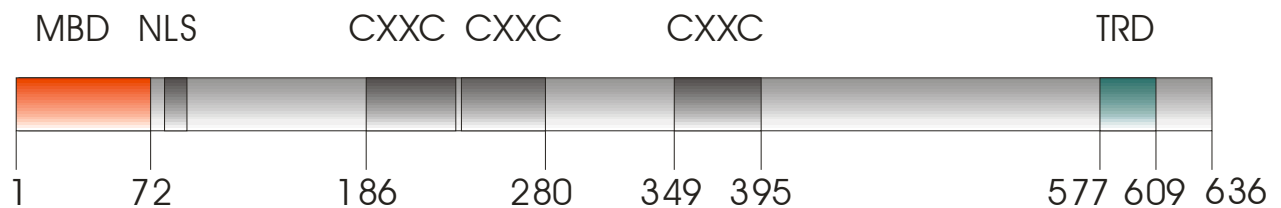


Abbildung 2: Domänenstruktur von murinen Mbd1 (Spleißvariante MBD1v1). Die MBD (Methyl-CpG Bindungsdomäne) erstreckt sich über 72 Aminosäuren und wird von Exon 2 und Exon 3 kodiert. Gefolgt wird sie von einem Kernlokalisierungssignal (NLS) und drei cystinreichen Motiven (CXXC-Domänen). Die Anzahl der CXXC-Motiven variiert bei den Spleißvarianten, außerdem wurde eine Bindung der dritten CXXC-Domäne an nicht-methylierte DNA gezeigt. C-terminal folgt die Transkriptionelle Repressordomäne (TRD) von Aminosäure 577 bis 609.

Die Methyl-CpG-Bindungsdomäne von Mbd1 hat folgende Struktur: Die β -Faltblätter und die α -Helix bilden eine keilförmige Tertiärstruktur, wobei basische, in der MBD-Familie konservierte Aminosäuren weitestgehend auf eine Seite der Struktur und eine flexible Schleife begrenzt sind. Durch diese Anordnung ergibt sich eine positiv geladene Oberfläche, die mit der DNA interagiert (Rauch et al., 2005; Ohki et al., 1999 und 2001). Diese Struktur wurde bisher bei keinem anderen Protein gefunden. Ohki et al. zeigten für MBD1, dass die zwei Methylgruppen der methylierten CpG-Stelle durch Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Valin-20, Arginin-22, Tyrosin-34, Arginin-44 und Serin-45 und der großen Furche der DNA-Helix erkannt werden. Diese fünf Aminosäuren bilden eine kontinuierliche hydrophobe Struktur, die die

Wechselwirkungen zwischen DNA und Protein vermittelt. Bis auf das Valin-20 sind diese Aminosäuren in allen funktionsfähigen MBD-Proteinen konserviert. MeCP2 enthält stattdessen ein basisches Lysin. Die eine Methylgruppe der methylierten CpG-Stelle wird in einer Tasche, bestehend aus den hydrophoben Aminosäuren Valin-20 und Tyrosin-34 sowie dem aliphatischen Arginin-22, gebunden (Ohki et al., 2001). Die zweite Methylgruppe wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den aliphatischen Resten der konservierten Aminosäuren Arginin-44 und Serin-45 erkannt. Die Wechselwirkungen mit den Guanin-Basen erfolgen über Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäuren Arginin-22 und -44. Das Arginin-22 interagiert mit seiner Guanidiniumgruppe zusätzlich mit der zwischen Methylcytosin und Guanin liegenden Phosphatgruppe.

| Interaktion mit | Komplex | Funktion |
|------------------------|------------------|--|
| SUV39h1 | MBD1-SUV39h1-HP1 | Histon H3 Lys9-Methylierung HDAC abhängige Repression |
| SETDB1 | MBD1-CAF1-SETDB1 | Repression, Heterochromatinbildung |
| MPG | MBD1-MPG | DNA Reparatur |
| HDAC3 | MBD1-HDAC3 | Repression in Leukämiezellen |

Tabelle 2: Interaktionspartner von MBD1. Gezeigt ist das Auftreten von MBD1 in mehreren Komplexen mit verschiedenen Funktionen.

Das Kernprotein MBD1, welches vorwiegend im Heterochromatin lokalisiert ist, kann mit CAF1 (Chromatin assembly factor 1) und der Histon-Methyltransferase SETDB1 interagieren (Reese et al., 2003; Fujita et al., 2003; Sarraf und Stancheva, 2004). Dieser MBD1-SETDB1-Komplex hat somit die Fähigkeit, die Genexpression via Histonmethylierung zu lenken. Weiterhin wurde gezeigt, dass MCAF (MBD1-containing chromatin associated factor) die Repression von MBD1 über einen Histondeacetylasen (HDAC) unabhängigen Mechanismus unterstützt und eine Heterochromatin-Bildung favorisiert (Ichimura et al., 2005; Fujita et al., 2003). Analoge Mechanismen wurden auch für MeCP2 gefunden (Yu et al., 2000). Bei der Acetylierung von Histonen mittels Histonacetyltransferasen werden Acetylgruppen kovalent an Histone gebunden, woraus eine zugängliche, transkriptionell aktive Chromatinstruktur entsteht. HDACs hingegen sind die Antagonisten und vermitteln eine transkriptionell-inaktive Heterochromatininformation.

Weiterhin wurde eine Interaktion von MBD1 mit Suv39h1 (Histon-H3-Lysin 9-Methylase) und

HP1 (Heterochromatin Protein 1) gezeigt (Fujita et al., 2003; Lachner et al., 2001; Lehnertz et al., 2003). Suv39h1 hat eine unterstützende Wirkung auf die transkriptionelle Repression von MBD1, die zum Teil unabhängig von der Transkriptionellen Repressordomäne (TRD) von MBD1 abläuft. Diese Funktion zeigt sich bestätigt in der Beobachtung, dass Suv39h1 mit der MBD-Domäne von MBD1 interagieren kann. Als Folge wird Lysin 9 von Histon H3 methyliert, was die Transkription reprimiert. Da die Repression des Suv39h1-MBD1-Komplexes auch über HDAC1 und HDAC2 abläuft, ist die Reprimierung mittels des HDAC Inhibitors Tritostatin A (TSA) zum Teil kompensierbar (Wade et al., 2001). Aufgrund dieser Befunde wird auf eine Interaktion von Suv39h1 mit der Histondeacetylase-abhängigen TRD von MBD1 geschlossen.

MBD1 kann auch mit MPG (Methyl-Purin-DNA-Glycolase) zu einem Komplex (Watanabe et al., 2003) interagieren. MPG entfernt beschädigte Basen aus der DNA, die durch Chemikalien induziert wurden. Der MBD1-MPG-Komplex steigert in *in vitro*-Experimenten die Repression von MBD1. Weiterhin interagiert MBD1 mit dem Oligoadenyl-Synthetase-ähnlichen Protein p59 OASL, welches Reparaturfunktionen in der Zelle aktiviert (Andersen et al., 2004). Somit wird eine Funktion von MBD1 bei der DNA-Reparatur und der Genregulation über eine induzierte Veränderung von Histonmodifikationen diskutiert. Analog zu MBD1 reguliert MeCP2 die Expression des DNA-Reparatur-Gens O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Dies geschieht über eine Bindung von MeCP2 an den methylierten Promotor und dadurch bedingte Histon-H3-Lysin-9-Dimethylierung (Danam et al., 2005; Zhao et al., 2005). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die reprimierende Funktion von MBD1 sowohl über seine transkriptionelle Repressordomäne, als auch über Interaktionen mit histonmodifizierenden Proteine abläuft.

MBD2, ein weiteres Mitglied der MBD Familie, ist Bestandteil von MeCP1 (Ng et al., 1999), einem großen Proteinkomplex von 400 bis 800 kDa, der zwölf oder mehr methylierte CpG-Stellen unabhängig vom Sequenzkontext bindet. Der MeCP1-Komplex bindet und deacetyliert methylierte Nukleosomen *in vitro* und reprimiert somit methylierte Gene (Feng und Zhang, 2001). MBD2 besitzt eine transkriptionelle Repressordomäne, die mSin3A bindet und teilweise mit der Methyl-CpG-Bindungsdomäne überlappt (Boeke et al., 2000). Die transkriptionelle Repression von MBD2 ist von Histondeacetylase abhängig; sie wird durch Trichostatin A aufgehoben (Ng et al., 1999). MBD2-defiziente Mäuse (Hendrich et al., 2001) sind gesund und fruchtbar und zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Lediglich eine leicht veränderte Transkription

von IL 4 (Interleukin 4) wurde beobachtet. Nach Einkreuzung eines *Apc*^{-/+}-Hintergrundes (Adenomatous polyposis coli) zeigen die MBD2-defizienten Mäuse eine stark verringerte intestinale Tumorgenese (Sansom et al, 2003). APC-Mausmodelle haben dominante Mutationen in dem Tumorsuppressorgen *Apc* und zeigen ein spontanes Auftreten von intestinalen Tumoren. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den Doppelmutanten die Repression von Tumorsuppressorgen durch Mbd2 nicht mehr gegeben ist. Von Sansom et al. wurde 2005 auch gezeigt, dass Mbd2 in p53-defizienten Mäusen keinen Einfluss auf die Lymphoma-Entstehung hat. Weiterhin wurde gefunden, dass p53-defiziente Mäuse eine veränderte Regulation von DNA-Methyltransferasen aufweisen, sowie eine gestörte Methylierung des Imprinting IGF2/H19 Locus bevor Karzinome entwickelt werden (Park et al., 2005; Berger und Bird, 2005).

Humanes MBD3 bindet als einziges Mitglied der MBD-Familie nicht an methylierte DNA (Ballestar und Wolffe, 2001). MBD3-defiziente Mäuse haben ein embryonal letalen Phänotyp (Hendrich et al 2001). MBD3 wurde als eine Komponente des Ko-Repressorkomplexes Mi-2/NuRD identifiziert (Wade et al., 1999 und Wade, 2001). Der Mi-2/NuRD-Komplex ist am Nucleosome-Remodeling beteiligt (Zhang et al., 1999). Der NuRD-Komplex kann von MBD2 *in vitro* an methylierte DNA rekrutiert werden, obwohl MBD2 nicht Teil des Komplexes ist (Ng et al., 1999; Zhang et al., 1999). Der entstandene Komplex aus NuRD mit MBD2 wird als MeCP1 bezeichnet. Für MBD2 und MBD3 wurde gezeigt, dass sie über C-terminale coiled-coil-Motive dimerisieren können. Nach Dimerisierung sind sie in der Lage, an hemimethylierte DNA zu binden. MBD3-defiziente Mäuse sterben während der frühen Embryogenese (Hendrich et al., 2001). Die Deletion des *Mbd3*-Gens führt möglicherweise zu einem kompletten Ausfall des NuRD-Komplexes, während die Deletion des MBD2-Gens nur einen Einfluss auf einen Teil der NuRD-Funktion hat.

MBD4 hat eine ähnliche Proteinsequenz wie bakterielle DNA-Reparatur-Enzyme und ist an der Reparatur von TG-Mismatches (TG-CG) beteiligt, welche durch spontane Desaminierung von Methylcytosin zu Thymin entstehen (Hendrich et al., 1999). MBD4-defiziente Mäuse zeigen eine gesteigerte CpG-Mutageneserate. Das Kreuzen von MBD4-defizienten Mäusen mit APC-Mäusen hingegen führt zu einer erhöhten CpG-Mutationsrate und Tumorgenese, da Mbd4 als Mismatch-Repair-Enzym fungiert (Millar, 2002).

1.5 DNA-Methylierung und Imprinting

Genomisches Imprinting ist ein Phänomen, bei dem bestimmte Gene abhängig von ihrem parentalen Ursprung exprimiert werden. Hierbei handelt es sich um Gene, bei denen nur das mütterliche oder väterliche Allel exprimiert wird. Dieser Zusammenhang wurde vor etwa 20 Jahren in der Maus aufgrund von Kerntransplantationen und genetischen Experimenten entdeckt. Mit Hilfe von Kerntransplantationen wurde gezeigt, dass gynogenetische Embryonen mit zwei weiblichen Pronuclei oder zwei männlichen Pronuclei sich nicht vollständig entwickelten (Surani et al., 1990; Barton und Surani, 1993; Barton et al., 2001; Niwa et al., 2004; Pickard et al., 2001; Dr. Michael Didiè, interne Mitteilung). Diese Ergebnisse wurden später im Zusammenhang mit Klonierungsversuchen bestätigt. Hieraus folgte, dass für die normale Entwicklung sowohl ein männliches als auch weibliches Genom erforderlich ist. Es wird argumentiert, dass spezifisches Imprinting des weiblichen und männlichen Genoms während der Gametogenese entsteht, so dass die parentalen Genome funktionell nicht äquivalent sind (Reik et al., 2001 und 2004; Obata und Kono, 2002). Über einen genetischen Ansatz wurde gezeigt, dass dieser Effekt auf bestimmte Bereiche des Genoms beschränkt ist (Cerrato et al., 2003; Ferguson-Smith und Surani, 2001, Constancia et al., 1998 und 2000). So sind sowohl eine weibliche als auch eine männliche Kopie von bestimmten chromosomalen Regionen essenziell für die normale Entwicklung und ihre Funktionalität für die nachfolgenden Generationen. 2004 hingegen wurden von Obata und Kono parthenogene Mäuse, also Mäuse mit zwei haploiden maternalen Genomen aus Oocyten, hergestellt, die sich zu adulten Tieren entwickelten. Um diese transgenen Tieren zu erzeugen, wurden Oocyten aus H19-defizienten Mäusen verwendet. Diese tragen eine etwa 13 kb große Deletion, die das gesamte H19-Gen und die Differenziell Methylierte Domäne (DMD) umfasst (Niwa et al., 2004; Obata und Kono, 2002). Die differentielle Markierung der DMD via DNA-Methylierung des maternalen und paternalen Genoms wird während der Gametogenese etabliert. Die gestörte Etablierung von Imprints hat umfassende Auswirkungen (Li und Jaenisch, 1993; Ferguson-Smith und Surani, 2003). Ferner wird ein Zusammenhang zwischen gestörtem Imprinting und der Krebsentstehung diskutiert (Ferguson-Smith et al., 1990 und 2001; Holm et al., 2005).

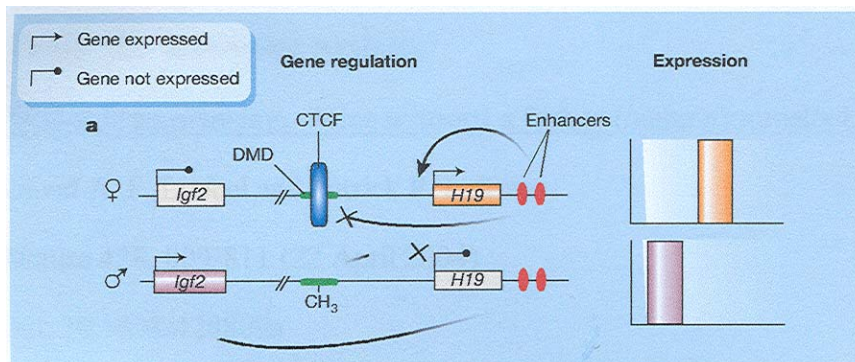


Abbildung 3: Regulation der Imprinting-Gene *Igf2* und *H19*. Das *H19*- und das *Igf2*-Gen befinden sich auf demselben Mausechromosom und sind entgegengesetzt imprinted. In normalen Embryonen wird *H19* nur von dem maternalen Chromosom und *Igf2* nur vom paternalen Chromosom exprimiert. Auf dem maternalen Chromosom bindet das CTCF-Protein (CCCTC-Binding Faktor) an die unmethylierte DMD (Differenziell Methylierte Domäne) und blockiert den Einfluss des Enhancers auf *Igf2*, sodass *H19* anstelle von *Igf2* exprimiert wird. Auf dem paternalen Chromosom ist die DMD methyliert. Dadurch kann CTCF nicht binden. Dadurch hat der Enhancer Einfluss auf *Igf2*, welches exprimiert wird. Die Expression von *H19* hingegen ist abgeschaltet (Loebel und Tam, 2004).

Aus weiterführenden Analysen von Imprinting-Clustern wurden Theorien entwickelt, wie Imprinting-Gene reguliert werden könnten. Imprinting-Kontroll-Regionen regulieren die parentale Expression von Imprinting-Genen (Constancia et al., 2000; Reik et al., 2001). Das experimentell am genauesten untersuchte Beispiel zur Analyse von möglichen Mechanismen für die Kontrolle der Genexpression von Imprinting-Genen ist die *H19-Igf2*-Region. Hierbei erfolgt die Regulation über differentiell methylierte DNA-Abschnitte (DMD). Diese Regionen sind während der Gametogenese und Embryogenese unterschiedlich methyliert. Sie können die parentale spezifische Expression von allen Imprinting-Genen innerhalb des Clusters vermutlich kontrollieren (Abbildung 3) (Li H. et al., 2005; Li J. et al., 2004; Li und Jaenisch, 1993; Grandjean et al., 2001; Vu et al., 2000; Reik et al 2001; Lopes et al., 2003; Biniszkiewicz et al., 2002; Costancia et al., 2000). Hierbei bindet zum Beispiel das Ctfp-Protein an die DMD je nach ihrem Methylierungsstatus und blockiert die Wirkung des Enhancers auf das Wachstumsprotein *Igf2* (Szabo et al., 2004; Shemer et al., 1997). So wird *H19* maternal und *Igf2* paternal exprimiert. Das übergroße Wachstum und tumorassoziierte Krankheitsbild von Beckwith-Wiedemann-Patienten entsteht aus einer Deregulation des Clusters von Imprinting-Genen auf Chromosom 11p15.5.

Im folgenden beschreibe ich die Dynamik der DNA-Methylierung bei der Embryogenese. Als erstes gehe ich auf die Methylierung der Gameten bei dem sich entwickelnden Embryo ein. Als zweiten Punkt bespreche ich die Dynamik der Methylierung nach der Befruchtung der Oocyte. Die erste Welle einer das gesamte Genom umfassenden Demethylierung findet in den primordialen Keimzellen (PGC; Keimzellen, die sich in der ersten Entwicklungsphase befinden) statt. Man geht heute aber davon aus, dass ein Teil des Histonkodes bestehen bleibt und dies Grundlage eines nicht genombedingten Vererbungsganges ist (Morgan et al. 1999 und 2005; Jenuwein und Allis, 2001; Adenot et al., 1997; Li J. et al., 2004). Die PGCs stammen aus dem Epiblasten. Diese Epiblastzellen wandern in die indifferente Genitalleiste ein; bei der Maus geschieht dies zwischen Tag 9,5 bis 10,5 der Embryogenese. Erst hier determinieren aus dem extraembryonalen Ektoderm stammenden Faktoren wie BMP4 und BMP8 die Zellen zu PGCs (Lawson et al., 1999; Herrler et al., 2003). Mit Eintritt in die undifferenzierte Genitalleiste wird die Demethylierung des gesamten Genoms induziert. Hierbei werden alle elterlichen Imprints der DNA entfernt und bei den weiblichen Feten das zweite X-Chromosom reaktiviert (Mermoud et al.; 2002; Sado et al., 2000 und 2005; Csankovski et al., 2001). Bei Mäusefeten ist am Tag 13,5 eine vollständige Löschung aller Methylierungen des Genoms zu beobachten (Barton et al., 2001; Bao et al., 2000). Parallel hierzu erfolgt in dieser Phase eine weitestgehende Reparatur der DNA. Mit der weiteren Differenzierung der Genitalleiste zum Ovar oder zum Hoden kommt es zur Ausbildung der geschlechterspezifischen Methylierung in den Oozyten bzw. Spermien (Razin et al., 1994 und 2005).

Ein Teil der in dieser Phase methylierten Gene wird als imprinted bezeichnet. Darunter versteht man eine besonders widerstandsfähige Methylierung bestimmter DMDs, die auch während späterer Demethylierungsprozesse bestehen bleiben (Santos et al., 2002; Lopes et al., 2001). Heutzutage sind circa 45 Gene bekannt, die imprinted sind (mgu.har.mrc.ac.uk). Beeinträchtigung solcher epigenetischer Determinierungen haben schwere Missbildungen zur Folge (Egger et al., 2004; Ferguson-Smith et al., 2003; Tabelle 3). Während der Endausreifung der Gameten wird das ganze Genom methyliert, so dass die reifen Gameten (reife, zur geschlechtlichen Befruchtung befähigte Keimzelle) transkriptionell inaktiv sind. Haushaltsgene bleiben hierbei unmethyliert, also aktiv. Im Ovar findet die vollständige Methylierung erst kurz vor der präovulatorischen (vor Eintritt des Follikelsprunges) Reaktivierung der Eizelle statt, während dies bei den Spermien bereits in der vorgeburtlichen Vermehrungsphase vollzogen wird (Maus ab E15).

In der Zygote erfolgt die zweite Demethylierungswelle. Das Ooplasma ist ein spezialisiertes Zytoplasma, welches direkt nach der Fertilisation Einfluss auf die Chromosomen nimmt und eine Veränderung der epigenetischen Differenzierung bewirkt (Li J. et al., 2004). Während der ersten sechs Stunden nach der Befruchtung kommt es zu einer unterschiedlichen Entwicklung der mütterlichen und väterlichen Chromosomen (Reik et al., 2004; Santos et al., 2002 und 2005). Während im mütterlichen Genom die Chromosomen methyliert bleiben, kommt es im väterlichen Genom zu einer fast vollständigen Demethylierung (Oswald et al., 2000; Mayer et al., 2000; Herrler et al., 2003; Reik et al., 2001). Epigenetische Faktoren müssen also in der Lage sein, zwischen maternalen und paternalen Genom zu unterscheiden (Gaudet et al., 2004; Pickard et al., 2001). Später während der Embryogenese erfolgt die zufällige Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in weiblichen Organismen via *Xist*, welches ein Imprinting-Gen darstellt (Csankovszki et al., 2001; Sado et al., 2000; Wutz et al., 2002). Bestimmte Repressionsfaktoren am mütterlichen Genom scheinen es vor einer zu frühen Demethylierung zu schützen. Auf der anderen Seite finden wir im väterlichen Genom viel stärker acetyliertes Histon H4, welches ein Zeichen der Aktivierung ist (Adenot et al., 1997; Li et al., 2004; Lachner et al., 2003; Dobosy und Selker, 2001). In diese Mechanismen könnten MBD-Proteine involviert sein (Young et al., 2004; Drewell et al., 2004; Fatemi und Wade, 2006). Kommt es pathologischerweise zur Demethylierung imprinteter Gene bzw. DMDs, so führt dies häufig zur Ausbildung von Missbildungen. Im Zuge der frühen Embryonalentwicklung wird auch das maternale Genom demethyliert. In der Morula sind beide elterlichen Genome hypomethyliert. In der Blastozyste kommt es zu einer relativ gleichmäßigen Methylierung beider Genome. Ab diesem Zeitpunkt wird *Mbd1* exprimiert. Der Umfang der Methylierung hängt in der Folge aber von der Differenzierung zu den entsprechenden Geweben ab. So ist beispielsweise das Genom in der Plazenta nur sehr gering methyliert (Georgiades et al., 2001; Hemberger; 2002).

1.6 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen

Die Chromatinstruktur wirkt als Regulator der Transkription. Somit ist die Transkription bestimmter Gene nicht nur von der Basensequenz der DNA, sondern auch von ihrer topologischen Anordnung innerhalb des Chromatins im Zellkern und damit von der Zugänglichkeit bestimmter Sequenzbereiche für z.B. Transkriptionsfaktoren abhängig (Dosoby und Selker, 2001; Peters et al., 2001 und 2002; Schotta et al., 2004; Übersicht Li E., 2002).

Ferner kontrollieren Histonmodifikationen imprintete Mause Gene (Fournier et al., 2002; Sado et al., 2000; Mermoud et al., 2002). Unter Chromatin versteht man die histologisch bekannte dreidimensionale Struktur der DNA, die molekular-biochemisch durch Assoziation mit Histonen und anderen Kernproteinen gebildet wird. Kernproteine können über die Faltung der DNA bestimmte Sequenzbereiche offenlegen, andererseits kann durch eine dichtere Packung der DNA im Heterochromatin die Aktivität der in solchen Bereichen liegenden Gene unterdrückt werden. Die Stellung der Histone zueinander wie auch die Modifikationen von N-terminalen Enden der Histone (Acetylierung, Methylierung, und Phosphorylierung) sind regulative Elemente in der Chromatinorganisation. Diese Modifikationen des Histonkomplexes stellt den Histoncode dar, der als Teil des epigenetischen Systems mitbestimmt, welcher Teil des genetischen Kodes abgelesen wird (Jenuwein und Allis, 2001). Eine Acetylierung der Histone mittels Histon-Acetylasen führt zur Lockerung der Chromatinstruktur und somit zur Bildung von transkriptionell aktivem Chromatin. Die Acetylierung allein führt aber nicht zur vollen Zugänglichkeit der DNA. Für das Chromatinremodelling werden außerdem Helicasen und andere Enzyme benötigt. Histon-Methylierungen an N-terminalen Lysinen von H3 sind relativ stabile Modifikationen, die auch nach Mitosen an Tochterchromatiden weitergegeben werden. Dies ist einer der epigenetischen Faktoren, die für ein dauerhaftes Abschalten von Genloci sorgen, sowie für die zufällige Inaktivierung eines von beiden X-Chromosomen in weiblichen Individuen verantwortlich ist. Histon-Deacetylierungen sind eng an DNA-Methylierung gebunden (Shema et al., 1997; Dobosy und Selker, 2001). Proteine wie MeCP2, MBD1, MBD2 und MBD4 erkennen und binden an methylierte CpG-Domänen. Die Methylierungsmuster werden von den DNMT-Proteinen gesetzt. MBD-Proteine wiederum binden in Komplexen Histon-Deacetylasen und Histon-Methylasen (Fujita et al., 2003; Nan et al., 1998; Ng et al., 2000; Sarraf und Stancheva, 2004), die zu einer Deacetylierung bzw. Methylierung des N-terminalen Endes der Histone in topologischer Nähe der gebundenen, methylierten DNA führen. Hierdurch kommt es zu einer Kondensation des Chromatins (Heterochromatin), was eine Expression der Gene in diesen Bereichen unterbindet. Bei einer Fehlregulation von Chromatinmodifikationen kommt es häufig zu epigenetischen Erkrankungen (Amir et al., 1999; Astuti et al., 2005; Kantor et al., 2004; Li E., 2002; Ballstar et al., 2003 und 2005), Tabelle 3. So kommt das ICF-Syndrom durch Mutationen im *DNMT3b*-Gen zustande. Eine gestörte Funktion von MeCP2 wird bei Autismus, Rett-Syndrom und anderen neurologischen Erkrankungen diskutiert.

| Krankheit | Symptome | Ursache |
|----------------------------|---|--|
| Fragile X Syndrom | Chromosomale Instabilität, Mentale Retardierung bei Männern | Expansion und Methylierung von CGG-Repeats in der 5'UTR des FMR-Gens |
| ICF Syndrom | centromere Instabilität, Immundefizienz, faciale Dysmorphie | DNMT3b-Mutationen, DNA-Hypomethylierung |
| Angelman's Syndrom | Mentale Einschränkungen | Deregulation des Imprinting im Cluster 15q11-13 maternal |
| Prader Willi Syndrom | Fettleibigkeit, mentale Einschränkungen | Deregulation des Imprinting im Cluster 15q11-13 paternal |
| Beckwith Wiedemann Syndrom | Organübergroße | Deregulation von IGF2 im Imprinting Cluster 11p15.5 |
| Rett Syndrom | Mentale Retardierung bei Mädchen | MeCP2 Mutationen |

Tabelle 3: Epigenetisch bedingte Erkrankungen. Aufgezeigt sind exemplarisch einige Erkrankungen, die ihre Ursache in einer gestörten DNA-Methylierung bzw. deren Erkennung aufweisen (Egger et al., 2004; Bienvenu und Chelly, 2006).

Bei der Aufklärung der molekularbiologischen Zusammenhänge bei epigenetisch bedingten Erkrankungen sind Mausmodelle entscheidend. Somit bedeuten zum Beispiel die Etablierung der konditional MECP2-defizienten Mäuse einen Meilenstein bei der Aufklärung des Rett-Syndroms (Chen et al., 2002; Horike et al., 2005; Makedonski et al., 2005; Samaco et al., 2005; Young und Zoghbi, 2004 ; Akbarian et al., 2001). Im Zeitraum meiner Arbeit wurden mehrere konditional defiziente Mausmodelle von DNA- und Chromatin-modifizierender Proteinen hergestellt, da defiziente Mäuse (Knockout Mäuse) die Embryogenese oft nicht vollständig durchlaufen (Li E., 2002). So zeigen DNMT1-defiziente Mäuse eine genomweite Demethylierung und einen Entwicklungsstop am Tag acht der Embryogenese. Bei Überexpression von *Dnmt1* erfolgt ein gestörtes Imprinting (Gaudet et al., 2004; Biniszkiwicz et al., 2002; Li E. et al, 1992). Konditionale DNMT3a-defiziente Männchen haben eine Fehlfunktion der Hoden und somit eine defekte Spermatogenese. Sie sterben nach etwa einem Monat (Okano et al., 1999). DNMT3b-defiziente Mäuse weisen eine Demethylierung von Satelliten-DNA auf und sterben am Tag 14 bis 18 der Embryogenese aufgrund von Defekten des Neuralrohrs (Feng et al., 2005; Okano et al, 1999). Die kombinierte Abwesenheit der beiden Methyltransferasen *Dnmt3a*^{-/-} x *3b*^{-/-} führt zu einer fehlenden *de novo*-Methylierung und Letalität am Tag 8 der Embryogenese. Konditionale

DNMT3L-Mäuse zeigen keine maternale Methylierung von Imprints in Oozyten, die Männchen sind steril (Hata et al., 2002). MBD2-defiziente Tiere sind gesund und fruchtbar, zeigen aber eine gestörte Betreuung der Nachkommen (Hendrich et al., 2001). Mäuse, die kein MBD3 exprimieren, weisen eine normale Implantation der Embryonen auf, sterben aber am Tag 6 der Embryogenese (Hendrich et al., 2001). Weiterhin sind viele Mäuse mit einem Defizit für histonmodifizierende Gene letal, wie zum Beispiel HDAC1-defiziente Mäuse. Ferner zeigten Peters et al. 2001, dass die kombinierte Defizienz von Suv39h1 (interagiert mit MBD1) und Suv39h2 zu einer defekten Histon H3-Methylierung an Lysin 9 in embryonalen Fibroblasten führt. Weiterhin sind die Männchen unfruchtbar. In diesem Zusammenhang ist, wie bereits erwähnt, von Bedeutung, dass MeCP2 Histonmodifikationen steuert (Horike et al., 2005). So werden die beiden Imprinting-Gene *Dlx5* und *Dlx6*, die für die *Gaba*-Regulation mitverantwortlich sind, im Cortex von MECP2-defizienten Mäusen erhöht exprimiert. Auch wurde beobachtet, dass die Acetylierung von Histon H3 innerhalb des DLX5, DLX6 Imprinting-Locus bei MECP2-defizienten Mäusen erhöht ist. Parallel wurde innerhalb dieses genomischen Ortes eine verringerte H3-Lysin-9-Dimethylierung in den MECP2-defizienten Mäusen gefunden. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass *Mecp2* an *Scaffold attached regions* (SAR) bindet und somit eine Schlaufenstruktur entsteht (Strätling und Yu; 1999; von Kries et al., 1991). Somit werden sich regulierende Elemente, die auf entfernten genomischen Loci liegen, in räumliche Nähe gebracht (Horike et al., 2005; Drewell et al., 2002). Es konnten aus aufwendigen, konditionalen Mausmodellen wichtige Informationen gewonnen werden, die molekularbiologische Fragestellungen beantworten. Ferner wurde mit Hilfe von Mausmodellen analysiert, dass *Mecp2* die *Bdnf*-Expression reguliert und der Krankheitsverlauf des Rett-Syndroms von der *Bdnf*-Expression beeinflusst wird (Chen et al., 2003; Chang et al., 2006).

1.7 Aufgabenstellung

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Generierung einer konditional MBD1-defizienten Mauslinie mittels des Cre-lox-Systems via homologer Rekombination und einer MBD1-defizienten (MBD1-Knockout) Mauslinie nach *in vitro*-Cre-Expression in murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen). Die beiden Mausmodelle sollten wie folgt geschaffen werden: Zunächst wurde ein Targeting-Vektor kloniert, der eine 5' und 3' Homologie des *Mbd1*-Gens enthält und nach der Integration von drei loxP-Stellen innerhalb des Vektors, die sowohl das *Neomycin*-Resistenzgen, als auch Exon zwei mit dem Startkodon flankieren (siehe Abbildung 7). Nach Elektroporation des Targeting-Vektors in mES-Zellen werden anschließend durch homologe Rekombination ES-Zell-Klone erhalten, in welchen in einem der beiden *Mbd1*-Allele das Exon 2 und die Neomycin-Kassette von insgesamt drei loxP-Stellen umgeben sind. Hier teilen sich die beiden Teilprojekte. Nach transienter Expression der Cre-Rekombinase in diesem ES-Zell-Klon entstehen zusätzliche ES-Zell-Klone mit deletiertem Exon 2, hierdurch bedingten deletiertem Translationsstart und entfernter Neomycin-Resistenz. Der Klon vor der Cre-Expression mit drei loxP-Stellen dient zur Etablierung des konditional MBD1-defizienten Mausmodells und der nach Cre-Expression, mit deletiertem Exon 2, zur Etablierung des MBD1-defizienten Mausmodells. Beide Klone werden in Blastozysten injiziert und diese in schein-schwangere Weibchen implantiert, um chimäre Mäuse zu erhalten. Nach Keimbahngängigkeit der manipulierten ES-Zellen und Kreuzung von chimären Männchen mit Wildtyp-Weibchen sollten heterozygote Mäuse erhalten werden. ES-Zellen aus einem 129-Hintergrund werden in C57BL6-Blastozysten injiziert und C57BL6-Ammen implantiert. Somit werden chimäre Tiere mit unterschiedlicher brauner, mosaikartiger Fellfärbung erhalten. Nach Verpaarung der heterozygoten Mäuse untereinander werden eventuell homozygote gezeugt. Weiterhin war geplant, die Genotypisierung der Mäuse mittels PCR-Methoden durchzuführen und die erhaltenden Ergebnisse exemplarisch mittels Southernblot-Analysen zu bestätigen. Um die *Mbd1*-Defizienz zu untermauern, sollte die Abwesenheit von *Mbd1*-mRNA und -Protein gezeigt werden. Weiterhin sollten eventuell auftretende, morphologische Phänotypen näher analysiert und die Tiere auf einen C57BL6-congenischen Hintergrund verpaart werden. Hierbei wird der Anteil der embryonalen Stammzelldonorzelllinie minimiert. Zunächst sollen die konstitutiv MBD1-defizienten Mäuse auf eventuelle Defekte und möglichen Organschädigungen untersucht werden. Die konditional MBD1-defizienten Mäuse hingegen sollten keinen von den gesunden

Tieren abweichenden Phänotyp besitzen. Als längerfristiges Projekt soll die epigenetische *in vivo*-Funktion von Mbd1 mit Hilfe der generierten Mausmodelle analysiert werden. Somit wird ein Einfluss von Mbd1 auf Histonmodifikationen, der Expression insbesondere von Imprinting-Genen und bei der Krebsentstehung vermutet. In einer späteren, in dieser Arbeit noch nicht gezeigten Projekt, ist dann vorgesehen, die konditional MBD1-defizienten Mäuse mit geeigneten Cre-transgenen Mäusen zu verpaaren, die Cre-Rekombinase organspezifisch und/oder unter zeitlicher Kontrolle eines verabreichten Induktors exprimieren bzw. mit anderen konditional defizienten Mäusen zu einem induzierbaren Mausmodell mit kombinierter Gen-Defizienz zu verpaaren. Hierdurch wird eine auf bestimmte Organe beschränkte oder zeitlich begrenzte Inaktivierung des *Mbd1*-Gens erreicht. Mit Hilfe dieser Arbeit sollte eine experimentelle Lücke bei der Etablierung von MBD-defizienten Mausmodellen geschlossen werden. Weiterführende Experimente mit diesen Mausmodellen sollen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen, die die Interpretation des DNA-Methylierungsmuster und Chromatinmodifikationen via Methyl-CpG-bindendem Protein 1 lenken.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in zur Analyse-Qualität bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Roche (Mannheim) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) erworben. Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

| | |
|---|--------------------------------------|
| DNA-Leiter-Mix | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| ExpressHyp Hybridisierungslösung | BD Bioscience, Clontech, Heidelberg |
| Geneticinsulfat (G418) | Life Technologies, Karlsruhe |
| GeneScreen plus Membran NEF 1017 | NEN, Bosten , USA |
| Mineralöl, PCR-grade | Sigma, Deisenhofen |
| Nitrozellulosemembran Protan BA85, 0,45 µm | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Nick-Säule, Sephadex G-50 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| dNTPs | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Sephadex G-50 Spin Säulen | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| peq Gold RNAPure | Peq Lab, Erlangen |
| peq Gold Optipure | Peq Lab, Erlangen |
| Roti-Phenol | Roth, Karlsruhe |
| Roti Phenol/Chloroform/Isopropanol | Roth, Karlsruhe |

Enzyme

BigDye Terminator Ready Reaction Mix (ABI PRISM, Applied Biosystems, Darmstadt)

Dye Terminatoren (Rosenblum et al., 1997)

Deoxynucleosidtriphosphate (dATP, dUTP, dCTP, dTTP)

Ampli Taq-DNA Polymerase FS

r*Tth* Pyrophosphatase

Magnesiumchlorid

| | |
|---|-----------------------------|
| CIAP (<i>alkalische Phosphatase aus Kälberdarm</i>) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| DNase I, RNase frei | Roche, Mannheim |
| Lysozym | Sigma, Deisenhofen |
| RNase, DNase frei | Sigma, Deisenhofen |
| T4-DNA-Ligase, konzentriert | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| T4-DNA Ligase | Roche, Mannheim |
| Proteinase K, PCR rein | Roche, Mannheim |
| Taq-Polymerase | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Taq-Polymerase | Eppendorf, Hamburg |

Radiochemikalien

| | |
|---------------------------------------|------------------------|
| [α^{35S}]dATP (3000 Ci/mmol) | Hartmann, Braunschweig |
| [α^{32P}]dCTP (3000 Ci/mmol) | Amersham, Braunschweig |

2.1.2 Antibiotika und Medien für Bakterienkultur

| | |
|---------------------|---|
| Ampicillin | Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol, bei -20 °C lagern Endkonzentration: 50 µg/ml |
| Streptomycin | Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol, bei -20 °C lagern Endkonzentration: 50 µg/ml |
| Agar | Difco, Detroit, USA |
| Bacto-Tryptone | Difco, Detroit, USA |
| Bacto-Yeast-Extract | Difco, Detroit, USA |
| LB-Medium | 10 g Tryptone 5 g Yeast-Extrakt 10 g NaCl |

auf einen 1 Liter mit H₂O auffüllen, pH 7,0
nach dem Autoklavieren auf 50 °C abkühlen,
bei Bedarf Antibiotika zugeben, bei 4 °C lagern

| | |
|---------------------------|---|
| LB-Agarplatten | 10 g Tryptone 5 g Yeast-Extrakt 10 g NaCl 15 g Agar auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen, pH 7,0 nach dem Autoklavieren auf 50 °C abkühlen, bei Bedarf Antibiotika zugeben, in sterile Ø 10 cm-Platten gießen, ca. 20 ml pro Platte, erstarren lassen und bei 4 °C lagern |
| LB-IPTG/X-Gal-Agarplatten | 20 µl 500 mM IPTG 50 µl 20 mg/ml X-Gal auf eine LB-Agarplatte ausplattieren, 30 min bei 37 °C stehen lassen, frisch verwenden |

2.1.3 Puffer und Lösungen

| | |
|----------------------------------|---|
| 10x CIAP-Reaktionspuffer | 0,1 M Tris-HCl 0,1 M MgCl ₂ pH 7,5 |
| DNA-Bindungspuffer | 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 2 mM EDTA |
| DNA-Denaturierungspuffer | 0,25 M NaOH 0,5 M NaCl |
| DNase I | 10 KU lyophilisierte DNase I 550 µl steriles H ₂ O, bei -20 °C lagern |
| DNA-Verdünnungspuffer | 0,125 M NaOH 0,1x SSC |
| Elutionspuffer | 0,1 M NaHCO ₃ 1% SDS |
| ExpressHyb Hybridisierungslösung | keine Angaben über Zusammensetzung |
| Extraktionspuffer E1 | 10 mM Tris-HCl 10 mM Na ₂ S ₂ O ₅ 1 M NaCl |

| | |
|--------------------------------|--|
| | 0,1% NP-40 1 mM EDTA-KOH 0,5 mM PMSF pH 8,0 |
| Extraktionspuffer E2 | 10 mM Tris-HCl 10 mM Na ₂ S ₂ O ₅ 0,1 M NaCl 0,1% NP-40 1 mM EDTA-KOH 0,5 mM PMSF pH 8,0 |
| | 400 mM Tris-HCl 10x Ligase-Puffer (Roche) 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 5 mM ATP pH 7,8 |
| Lysozym | 10 mg Lysozym lösen in 1 ml H ₂ O Sterilfiltrieren, lagern bei -20 °C |
| 10x PCR Puffer (MBI Fermentas) | 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) 500 mM KCl 0,8% Nonidet P40 25 mM MgCl ₂ |
| RF I | 100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4 °C lagern |
| RF II | 10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 6,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4 °C lagern |

| | |
|------------------------|--|
| 20x SSC-Puffer | 175,3 g NaCl 88,2 g Na ₃ -Citrat ad 1 Liter pH 7,0 |
| STET-Puffer | 8% Saccharose 0,5% Triton X 100 50 mM EDTA 10 mM Tris- HCl pH 8,0 |
| SDS Gelladepuffer | 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 100 mM DTT 2% SDS 0,1% Bromphenolblau 10% Glycerin |
| 1x TAE Puffer | 40 mM Tris-Acetat 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7,5 |
| 5x TBE-Puffer | 445 mM Tris-HCl 445 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0 |
| TBS | 0,144 M NaCl 0,01 M Tris; pH 7,8 |
| TE | 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8,0 |
| Homogenisierungspuffer | 0,25 M Sacharose 10 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 0,1% Triton X-100 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 mM PMSF Proteasehemmer |
| Extraktionspuffer | 500 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 1 mM DTT |

40 mM Tris-HCl, pH 8,0
Proteasehemmer

Trypsin-Lösung 0,05% Trypsin
 0,02% EDTA
 in PBS, pH 7,3

2.1.4 Kits

| | |
|---------------------------------|--|
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiagen P1 | 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A, bei 4 °C lagern |
| Qiagen P2 | 200 mM NaOH 1% SDS |
| Qiagen P3 | 3 M Kaliumacetat, pH 5,5, bei 4 °C lagern |
| Qiagen QBT | 750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Ethanol 0.15% Triton X-100 |
| Qiagen QC | 1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Ethanol |
| Expand Long Template PCR System | Roche, Mannheim |
| Thermo Script II RT-PCR | Invitrogen, Karlsruhe |
| Platinum Taq DNA Polymerase | Invitrogen, Karlsruhe |
| NucleoSpin Plasmid | Macherey-Nagel, Düren (basierend auf Birnboim und Doly, 1979) |
| A1 | Lysepuffer mit RNase, bei 4 °C lagern |
| A2 | Lysepuffer mit SDS |
| A3 | Neutralisationspuffer mit Guanidiniumhydrochlorid |
| A4 | Ethanolischer Waschpuffer |
| AW | Waschpuffer mit Guanidiniumhydrochlorid |
| AE | 5 mM Tris-HCl, pH 8,5 |
| Nucleo Trap | Macherey-Nagel, Düren |
| Nucleo Trap Suspension | Glasmilch |
| NT1 | keine Zusammensetzung angegeben |
| NT2 | keine Zusammensetzung angegeben |
| NT3 | keine Zusammensetzung angegeben |

| | |
|--|---|
| NucleoSpin Extract | Macherey-Nagel, Düren (basierend auf Vogelstein und Gillespie, 1979) |
| NT1 | keine Zusammensetzung angegeben |
| NT3 | keine Zusammensetzung angegeben |
| NE | 5 mM Tris-HCl, pH 8,5 |
| | |
| pGEM-T easy Vektor System 1 | Promega, Mannheim |
| 2x Rapid Ligationspuffer | 60 mM Tris-HCl, pH 7,8 20 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 2 mM ATP 10% Polyethylenglycol (MW 8000) |
| T4-DNA-Ligase (3 U/μl) | |
| pGEM-T easy (50 ng/μl) | |
| | |
| QIAamp DNA Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaquick Gel Extraktions-Kit | keine Zusammensetzung angegeben, Qiagen, Hilden |
| | |
| Rediprime II Random Prime Labelling System | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

2.1.5 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwandt.

MES (murine embryonale Stammzellen) R1 Nagy; 1993

MEF (murine embryonale Feederzellen); erhalten von Tina Koppelman, ZMNH

2.1.6 Programme

Homologievergleiche von Sequenzdaten wurden in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) und der Datenbank *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) des *Sanger Institute* und des *European Bioinformatics Institute* durchgeführt. Weiterhin wurden Sequenzvergleiche und Sequenzformatierungen mit dem Programm Bioedit (T.A. Hall Software) erstellt. Der Gehalt und die Klassifizierung repetitiver Sequenzen wurde mit dem RepeatMasker Programm durchgeführt. Es erkennt humane, repetitive Sequenzen (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>, Smit und Green). Die Analyse von MAR-Sequenzen erfolgte mit den Internetbasierten Programmen MAR-Wiz 1.5

von Futuresoft (<http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz>) und dem S/MAR-Test von Genomatix). Tabellenkalkulationen und Abbildungen wurden mit Hilfe des MS-Office Pakets von Microsoft, dem HP-Deskscan Programm von Hewlett Packard und dem Photoshop von Adobe erstellt. Als Sequenzprogramm wurde Vektor NTI 6.0 von Infomax verwendet.

2.1.7 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an sterilen Werkbänken mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Das Zellwachstum wurde mit einem Lichtmikroskop (Zeiss) überprüft. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in einer Wasserdampf gesättigten 5% CO₂-Atmosphäre.

MEF-Medium (für Mausembryo Fibroblastzellen)

| | | | |
|--|----------------|----|--------|
| DMEM (high glucose, no pyruvate, with glutamax) | Gibco#61965026 | | 500 ml |
| FCS (aus Süd Amerika) | Gibco#10270106 | 9% | 50 ml |
| MEM (non-essential amino acids 100x) | Gibco#11140035 | 1x | 5,5 ml |
| Penicillin/Streptomycin (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ml,100x) | Gibco#15070022 | 1x | 5,5 ml |

ES-Medium (für embryonale Stammzellen)

| | | | |
|---|----------------|-----|--------|
| DMEM (high glucose, no pyruvate, 25 mM Hepes) | Gibco#42430025 | | 500 ml |
| FCS (ES qualified) z.B. Gold EU | PAA#A15-649 | 15% | 92 ml |
| Glutamin (200 mM, 100x) | Gibco#25030024 | 1x | 6,2 ml |
| MEM (NEAA, non essential amino acids,100x) | Gibco#11140035 | 1x | 6,2 ml |

| | | | |
|--|---|---------------|-----------|
| Pen/Strep (5000IU Penicillin, 5000mg Streptomycin / ml),100x | Gibco#15070022 | 1x | 6,2 ml |
| Nucleosidmix (100x) | | 1x | 6,2 ml |
| Natriumpyruvat | Gibco#11360039 | 1x | 6,2 ml |
| 2-Mercaptoethanol (50 mM,1000x) | Gibco#31350010 | 2x | 1,24 ml |
| LIF (107 U/ml) | Esgro#13275029 | 1000 units/ml | 62 µl |
| G418 Zusatz bei Selektion (50 mg/ml) | Gibco#10131019 | 200-300µl/ml | 4-6 µl/ml |
| 0,1% Gelantine | Sigma#G-1890 | | |
| Mineralöl | Sigma#-8410 | | |
| PBS, Tabletten lösen, autoklavieren | Gibco#18912014 | | |
| PBS/EDTA für MEF Zellen | 1 Tablette + 0,1g EDTA in 500ml bidest H ₂ O | | |
| Trypsin/EDTA für MEF Zellen | 0,05% Gibco#25300054 | | |
| Trypsin/EDTA für ES Zellen | 0,25% Gibco#25200056 oder | | |
| 2,5% Trypsin 10x in 10% Hühnerserum/PBS | Gibco#25090028 | | |
| Nucleosidmix 100x | Adenosin | Sigma#A-4036 | 80 mg |
| | Guanosin | Sigma#G-6264 | 85 mg |
| | Cytidin | Sigma#C-4654 | 73 mg |
| | Uridin | Sigma#U-3003 | 73 mg |

| | | |
|----------|--------------|-------|
| Thymidin | Sigma#T-1895 | 24 mg |
|----------|--------------|-------|

Den Nucleosidemix bei 37 °C in 100 ml PBS lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei –20 °C lagern.

| | |
|--------------------------------|---|
| Elektroporationspuffer: | 20 mM Hepes |
| | 137 mM NaCl |
| | 5,0 mM KCl |
| | 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ |
| | 6,0 mM Dextrose |

pH Wert auf 7,0 mit 0,5 N NaOH einstellen und sterilfiltrieren.

| | | |
|-------------------|------------|--------------|
| 1x Freeze: | FCS 50% | |
| | Medium 40% | |
| | DMSO 10% | Sigma#D-2650 |

| | |
|------------------|----------|
| 2xFreeze: | FCS 80% |
| | DMSO 20% |

(1:1 mit Zellsuspension mischen)

Mitomycin C: Sigma#M-0503 Mitomycin (MMC) wird zur mitotischen Inaktivierung von MEF-- Zellen benutzt, da es die DNA quervernetzt und somit den Zellzyklus stoppt. 2 mg Mitomycin C (lyophilisiert) werden in 2 ml PBS resuspendiert und in einem Volumen von 150 µl aliquotiert und bei –80 °C lichtgeschützt aufbewahrt. 150 µl reichen für eine 150 mm-Schale mit 15 ml MEF-Medium. Die Konzentration beträgt dabei 10 µg/ml. Zur Kultivierung von **murinen embryonalen Feeder- (MEF) Zellen** wurden 2×10^6 Zellen schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut und auf eine mit 25 ml MEF-Medium vorbereitete 15 cm-Schale gegeben. Diese Zellen kann man drei Tage wachsen lassen, bis sie konfluent sind. Um die Zellen 1:3 oder 1:4 zu splitten, werden 3 bzw. 4 neue 150 mm-Schalen mit 20 ml Medium gefüllt und

beschriftet. Von den MEF-Zellen wird das Medium abgesaugt, die Zellen werden mit 25 ml PBS gewaschen. Anschließend wird das PBS abgesaugt, die Zellen werden mit 3 ml Trypsin für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C überschichtet. Nach dem Trypsinieren werden die Zellen mit einer Pasteurpipette vereinzelt (unter dem Mikroskop kontrollieren) und mit entsprechend viel Medium gemischt (pro Platte noch ca. 5 ml Medium zugeben), um sie dann gleichmäßig auf die neuen Platten zu verteilen. Nun kann man die Zellen 3 Tage wachsen lassen bis sie konfluent sind. Nach diesem Zeitraum werden die Zellen entweder erneut gesplittet, mit MMC im Zellzyklus arretiert, um sie auf die entsprechenden Platten für die ES-Zellkultivierung zu verteilen, oder inaktiviert weggefroren. Zur Inaktivierung von MEF-Zellen werden diese mit **Mitomycin** behandelt. Hierfür wird von einer 15 cm-Schale das Medium abgesaugt und 15 ml neues Medium hinzugegeben, das mit 150 µl MMC versetzt wird. Nach dem Mischen (leichtes Bewegen der Schale) werden die Zellen für 2 bis 3 Stunden bei 37 °C kultiviert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 25 ml PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert bis sich die Zellen ablösen. Die MEF Zellen werden mit 7 ml Medium vollständig von der Platte gespült und im Falcon gesammelt. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt. Auf einer konfluenten 15 cm-Schale wachsen etwa 1 bis $1,5 \times 10^7$ Zellen. Anschließend werden die Zellen bei 1000 Upm (230 g) für 5 Minuten zentrifugiert. Die MEF-Zellen werden nun entweder auf die entsprechenden gelantinierten Zellkulturschalen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 ausgesät oder weggefroren. Hierzu werden die Zellen in einer Dichte von $2-5 \times 10^6$ in 1x Freeze aufgenommen und in einem Gesamtvolumen von 1 ml pro Cryotube überführt. Die Cryotubes werden langsam weggefroren.

| Schalen | Fläche | Zellzahl | Gesamtvolumen |
|----------------|-----------------------------|---------------------|----------------------|
| 92 mm | 57 cm^2 | $2-2,5 \times 10^6$ | 10 ml |
| 58 mm | 21 cm^2 | 1×10^6 | 5 ml |
| 40 mm | 9 cm^2 | 5×10^5 | 2 ml |
| 6 Well | 9,6 cm^2 /pro Well | 5×10^5 | 2,5 ml |

| | | | |
|---------------|---------------------------------|---------------------|--------|
| 24 Well | 2cm ² / pro Well | 1x10 ⁵ | 1 ml |
| 96 Well flach | 0,32 cm ² / pro Well | 1,6x10 ⁴ | 200 µl |

Bei **ES-Zellen** wird generell jeden Tag das Medium gewechselt. ES-Zellen wachsen auf gelantinierten Kulturschalen mit ausgesäten MEF-Zellen, die vorher MMC-inaktiviert wurden. Die Zellen sollten alle zwei Tage konfluent sein, somit werden sie entsprechend 1:4 bis 1:6 gesplittet, falls die Zellen schlecht wachsen 1:1. Die Zellen werden langsam weggefroren und schnell aufgetaut. Beim Einfrieren, Elektroporieren und vor der Blastozysteninjektion wird zwei Stunden vorher das Medium gewechselt. Um ES-Zellen aufzutauen, wird das Cryotube bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und in 5 ml Medium im Falcongefäß aufgenommen. Anschließend erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000 UpM. Das sich bildende Pellet wird in Medium aufgenommen, homogenisiert und auf die entsprechenden Platten mit Feederzellen ausplattiert. Beim Splitten von ES-Zellen wird die konfluent bewachsene Schale mit 1x PBS/EDTA gewaschen, etwa 1/5 Volumen Trypsin/EDTA zugegeben und 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden resuspendiert bis die Zellen vereinzelt sind (im Mikroskop kontrollieren) und im Falcon mit vorgelegtem Medium aufgenommen. Anschließend wird bei 1000 UpM für 5 min zentrifugiert und auf neue Schalen verteilt. Das Umsetzen erfolgt von 96 auf 24 Well, auf 6 Well, auf 58 mm oder 92 ml Schalen.

| Schalen | Fläche | PBS Volumen | Trypsin Volumen |
|----------------|---------------------------|--------------------|------------------------|
| 92 mm | 57 cm ² | 10 ml | 2,5 ml |
| 58 mm | 21 cm ² | 5 ml | 1 ml |
| 6 Well | 9,6cm ² /Well | 3 ml | 500 µl |
| 24 Well | 2cm ² /Well | 1 ml | 150 µl |
| 96 Well flach | 0,32cm ² /Well | 200 µl | 40 µl |

Für die **Elektroporation** werden 2×10^6 Zellen auf eine 60 mm Schale ausgesät. Nach zwei Tagen werden die Stammzellen auf zwei 100 mm-Platten gesplittet. Pro Elektroporationsansatz benötigt man 1×10^7 Zellen, dies entspricht einer 100 mm-Schale (evtl. Zellen zählen). Die zu transformierenden Zellen werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Es werden 2 bis 3 ml 0,25% Trypsin für 3 bis 5 min auf die Zellen gegeben. Die werden resuspendiert und im Falcon mit 7 ml Medium aufgenommen, für 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert und in 10 ml Elektroporationspuffer oder PBS aufgenommen. Nun wird erneut zentrifugiert und das Pellet in 800 µl Elektroporationspuffer gelöst. Nach Zugabe von 25 bis 80 µg linearisierter DNA wird der Ansatz in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette (Biorad) aufgenommen. Folgende Einstellungen werden vorgenommen:

Biorad Elektroporator: 240 V, 500 µF

Doppelpuls: 800 V, 3 µF und 240 V, 500 µF

Schwacher Puls: 800 V, 3 µF

Die Küvetten werden nach erfolgtem Puls für 10 min stehen gelassen und im Falcon mit 10 ml Medium aufgenommen, homogenisiert und auf fünf 100 mm-Schalen verteilt. Auf den Schalen wird jeden Tag das Medium gewechselt. Nach einem Tag kann mit der **Selektion** begonnen werden. Hierzu werden 200 bis 300 µg G418 zur positiven Selektion auf die Anwesenheit einer Neomycinkassette und ab dem 3 bis 6 Tag 10 bis 12 µl Gancyclovir bei Tymidinkinase als negative Selektionskassette zugesetzt. Bei der Verwendung einer Diphtherietoxin-A Kassette ist kein Substratzusatz erforderlich. Nach einer Woche der Selektion kann mit dem **Picken** begonnen werden. Hierzu wird eine 100 mm-Platte mit je zweimal 10 ml PBS gewaschen und unter dem Binokular werden einzelne ES-Zellklone mit runder, nicht zu flacher und glatter Oberfläche, die scharf begrenzt ist, mit einer 20 µl Pipette aufgenommen. Jede einzelne Kolonie wird anschließend in eine 96 Well-Platte mit rundem Boden mit 40 µl vorgelegtem Trypsin übersetzt. Insgesamt gibt man auf der 96 Well zwei Reihen (24 Wells) Trypsin vor, setzt 24 Klone auf diese Platte über und inkubiert nun für 3 bis 5 min bei 37 °C. Nach dieser Zeit werden die Klone gut hoch- und runterpipettiert, mit jeweils 100 µl Medium verdünnt und resuspendiert (Medium von der Feederplatte). Anschließend werden die resuspendierten Zellen auf die 96 Well mit Feederlayer zurückgeführt und es wird kontrolliert, ob Einzelzellen vorliegen. Das Splitten der konfluent gewachsenen 96 Well-Platte erfolgt nach zwei bis drei Tagen. Das Medium wird

abgesaugt und die Platte wird mit 200 µl PBS/EDTA gewaschen. Jedes Well wird mit 40 µl Trypsin für 3 bis 5 min bei 37 °C versetzt. Anschließend wird, je nach Splittverhältnis, mit z.B. 80 µl ES-Medium abgestoppt. Es wird in der Regel 1:4 gesplittet, daher auf zwei 96 Wells mit inaktivierten MEF-Zellen und auf zwei gelantinierte 96 Wells für die anschließende DNA-Präparation. Nach zwei bis drei Tagen sind die Platten nun erneut konfluent (bei den ES-Platten, die weggefroren werden, täglich das Medium wechseln) und sie können weggefroren werden. Um die 96 Well **einzufrieren** werden die Zellen mit 200 µl PBS/EDTA gewaschen und mit 40 µl Trypsin für 3 bis 5 min bei 37 °C inkubiert, resuspendiert, mit 60 µl ES-Medium verdünnt und erneut resuspendiert. Nun werden die 96 Well-Platten auf Eis gestellt und es werden 100 µl 2x Freeze Puffer (80% FCS und 20% DMSO) zugegeben und vermischt. Die Platten werden mit 50 µl Mineralöl überschichtet, mit Klebeband umwickelt und anschließend in einer Styroporbox bei -80 °C weggefroren.

Um die **DNA-Präparation** durchzuführen müssen die 96 Well-DNA-Platten in der Zellkultur vollkommen konfluent gewachsen sein (Farbumschlag des Mediums von violett nach gelb). Dazu wird hier nur alle zwei Tage das Medium gewechselt. Die DNA-Platten werden auf Zellstoff abgekippt, um das Medium zu entfernen und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgekippt und 100 µl Lysispuffer wird zugesetzt.

10ml Lysispuffer enthält:

- 0,1% SDS
- 300 µl Proteinase K (10 mg/ml)
- 100 µl RNase A (10 mg/ml)

Die 96 Well-Platten werden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 55 °C inkubiert, anschließend werden 10 µl (1/10 Volumen) 8 M LiCl und 100 µl Isopropanol hinzugefügt und die Platten werden über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Längere Inkubationszeiten erhöhen die DNA-Ausbeute. Zur DNA-Fällung wird 30 min bei 3800 UpM zentrifugiert und der Überstand wiederum auf Zellstoff abgekippt, mit 100 µl kaltem Ethanol gewaschen und erneut für 20 min bei 3800 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Platte wird bei 55 °C für etwa 10 min getrocknet. Als letzter Schritt kann die DNA in einer feuchten Kammer in 50 µl TE über Nacht auf einem Schüttler gelöst werden. Für den **Restriktionsverdau** mit anschließender Southernanalyse werden 10-15 µg DNA mit 20-50 Units Enzym und 1 µl RNase

(10 mg/ml) versetzt, auf 100 µl aufgefüllt und über Nacht verdaut. Um das Volumen zu reduzieren wird die DNA anschließend gefällt.

Für das **Wegfrieren in Cryovials** wird 2x Freeze vorbereitet und auf Eis gestellt. Die Cryovials werden beschriftet und auf Eis gestellt. Anschließend wird das **24 Well** mit 1 ml PBS gewaschen, mit 150 µl Trypsin für 3 bis 5 min inkubiert, resuspendiert und mit 350 µl ES-Medium abgestoppt. Nach erneutem Resuspendieren auf Eis werden 500 µl 2x Freeze pro Well hinzugegeben, resuspendiert und die Zellen in Cryovials überführt. Nun werden sie bei -80 °C eingefroren und später in flüssigen Stickstoff überführt. Beim Wegfrieren von **6 Wells** wird 1x Freeze und die beschrifteten Cryovials auf Eis gestellt. Die einzelnen Vials werden mit 3 ml PBS gewaschen, mit 500 µl Trypsin für 3-5 min bei 37 °C inkubiert und resuspendiert. Die Zellen werden mit 3-5 ml Medium im Falcongefäß aufgenommen, resuspendiert und 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in 3 ml 1x Freeze aufgenommen und auf drei Cryovials verteilt. Um Klone in Blastozysten zu injizieren werden ES-Zellen von einem 6-Well benötigt. Hierbei wird zwei Stunden vor dem Ablösen der Zellen das Medium gewechselt. Die Zellen werden anschließend mit 3 ml PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin für 2 bis 3 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden nach Möglichkeit keine Einzelzellen, sondern 2-10 aneinanderhängende Zellen verwendet werden. Die Zellen werden kaum resuspendiert, in 3-5 ml ES-Medium aufgenommen und 3-5 min bei 1000 UpM zentrifugiert. Das entstehende Pellet wird in 800 µl ES-Medium aufgenommen und auf Eis gestellt.

2.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Die **Herstellung chemisch kompetenter Bakterien** erfolgte modifiziert nach einer von Hanahan (1983) beschriebenen Methode. 50 ml LB-Medium wurden mit dem jeweils geeigneten Antibiotikum versetzt und mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft.

| Bakterienstamm | Antibiotikum |
|-------------------------|------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | 12,5 µg/ml Tetrazyklin |
| <i>E. coli</i> DH10B | 50 µg/ml Streptomycin |

Die Bakterien wurden bis zu einer Zelldichte von $4-7 \times 10^7$ Zellen/ml bei 37 °C inkubiert (entsprechend einer $OD_{600nm} = 0,6$). Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und bei 1000 g (Varifuge 3.0R, Heraeus) und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 16,7 ml kaltem RF I resuspendiert und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C für 15 min wurde das Zellpellet in 4 ml kaltem RF II resuspendiert und wiederum für 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgläser pipettiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für **die Herstellung von elektrokompenter Bakterien** wird ein Liter LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man lässt die Zellen bei 37 °C unter starkem Schütteln bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-1,0 wachsen und zentrifugiert sie anschließend in einem vorgekühlten GSA Rotor bei 3000 UpM ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 20 ml 10%igen Glycerin gelöst, zentrifugiert und zum Abschluß in 2-3 ml 10%igen Glycerin resuspendiert. Aliquots werden in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei der **Elektrotransformation** wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit sehr hoher Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompenten Bakterien bei 10^9-10^{10} Transformanten/µg DNA.

Ein 50 µl-Aliquot der kompetenten Zellen wird bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. 1 µl einer Plasmid-DNA oder Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt und der Ansatz in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät nach Elektroporation angezeigt wird, sollte zwischen 4-5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 12,5 kV/cm. Danach werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenbergröhrchen überführt und bei 37 °C für 20-30 min geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht bei 37 °C heranwachsen und kann sie dann durch eine Mini-Plasmidpräparation oder mittels PCR charakterisieren. Das **Konservieren** von Bakterienkolonien erfolgt für kürzere Zeit auf Agarplatten bei 4 °C, eine langfristige Lagerung ist durch das Vermischen einer 5 ml Übernachtskultur mit 87% Glycerin

im Verhältnis 1:1 möglich. Die Kulturen werden dann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt

2.1.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurde der Reaktionspuffer so gewählt, dass beide Enzyme mindestens 50% ihrer maximalen Aktivitäten aufwiesen. Für den Fall, dass dies nicht möglich war, wurde die DNA mit beiden Enzymen nacheinander geschnitten. Das erste Enzym wurde nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert, bevor die zweite DNA-Spaltung durchgeführt wurde. Vektor-DNA, die für eine Klonierung geschnitten wurde, wurde zusätzlich mit CIAP dephosphoryliert (Ahmad und Huang, 1981). Es wurden 1 bis 4 μg Vektor-DNA mit 5 μl des 10x CIAP-Reaktionspuffers versetzt und mit H_2O auf 49 μl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 μl CIAP (1 U/ μl) hinzu gegeben und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dephosphoryliert. Die Hitzeinaktivierung der CIAP erfolgte bei $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min. Zur Linearisierung des Targeting Vektors wurden etwa 400 μg Plasmid-DNA mit 400 Einheiten NotI über Nacht in 1 ml Gesamtvolumen geschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt.

2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von geschnittenen DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten wurde die horizontale Gelelektrophorese benutzt. Es wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 0,5x TAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, mit 4 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in einen präparierten Gelträger gegossen. Nach vollständigem Aushärten des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 0,5x TAE gefüllten Gelkammer bei konstanter Spannung (6-8 V/cm) durchgeführt. Parallel zu den Proben wurde ein Längenstandard (DNA-Leiter-Mix) aufgetragen, um die spätere Größenbestimmung der DNA-Fragmente auf einem UV-Tisch zu ermöglichen.

2.1.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelen, von enzymatisch geschnittenen oder PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten, erfolgte über eine Säule mit dem NucleoSpin Extract Kit oder Nucleo-Trap (für kleine Segmente). Die Fragmente wurden auf einem 1-2%igen Agarosegel nach Größe elektrophoretisch getrennt. Auf dem UV-Tisch wurde die gewünschte DNA-Bande

mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgesäß transferiert. Für große Ausbeuten an DNA sollte das Gelstück möglichst klein sein. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer NT1 zugegeben. Die Agarose wurde 10 min bei 50 °C im Heizblock unter leichtem Vortexen gelöst. Die Lösung wurde auf eine NucleoSpin-Säule, in einem 2 ml Auffanggefäß stehend, pipettiert und 1 min bei 8.000 UpM zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Durchlauf wurde verworfen und 600 µl ethanolischer Puffer NT3 auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 11.000 UpM wurde der Durchlauf entfernt und die Säule erneut mit 200 µl Puffer NT3 beladen. Nach 2 min Zentrifugation bei 11.000 UpM wurde die Säule in ein neues Eppendorfgesäß gestellt. Zur Elution der DNA-Fragmente wurden 50 µl Puffer NE oder steriles H₂O auf die Säule pipettiert und für 1 min mit 11.000 UpM zentrifugiert. Die Reinheit der eluierten DNA wurde auf einem Agarosegel überprüft.

2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente (Inserts) wurden in ein- bis dreifach molaren Überschuss mit 50 ng linearisierter dephosphorylierter Vektor-DNA unter Verwendung von 1 µl (30 U) T4-DNA-Ligase in 1x Ligasepuffer in einem Endvolumen von 20 µl für 4 h oder über Nacht bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend nach Hitzedeaktivierung bei 65 °C für 10 min direkt zur Transformation eingesetzt. Bei Blunt-end Klonierungen wurden zusätzlich 2 µl 50% PEG 4000 zu dem Ansatz gegeben.

2.1.13 Transformation

Die Transformation der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte nach dem Verfahren von Hanahan (1983). 200 µl kompetente Bakterienzellen wurden bei RT aufgetaut und auf Eis gestellt. Der Ligationsansatz oder die Plasmid-DNA wurde zu den kompetenten Bakterien gegeben, kurz geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt. Zu der Zellsuspension wurden 900 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotika gegeben und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, auf LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht (ca. 15 h) bei 37 °C inkubiert.

2.1.14 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Es wurde eine „*Boiling Prep*“ basierend auf dem Protokoll von Holmes und Quigley (1981) verwandt. Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für viele *E. coli*-Laborstämme. Die Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (ca. 30 min) und in der hohen Qualität der gewonnenen DNA. Es wurden jeweils 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Kulturröhrchen geschüttelt. Je 2 ml der Übernachtskulturen wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei 5.000 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 500 µl STET-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (10 mg/ml) wurde das Eppendorfgefäß mehrfach invertiert und 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation für 90 sec im Heizblock bei 95 °C unter Schütteln fortgesetzt und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat (pH 5,2) und 500 µl Isopropanol wurde die Lösung geschüttelt und die Plasmid-DNA durch 10 min Zentrifugation bei 14.000 Upm präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nach Lufttrocknung in 50 µl H₂O aufgenommen. Typischerweise ließen sich auf diese Weise bis zu 20 µg Plasmid-DNA gewinnen, deren Reinheit ausreichend für die anschließende Restriktionsanalyse war. Eine **zweite Methode** zur DNA-Präparation im kleinen Maßstab, besteht darin, dass 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E.coli*-Kolonie auf der Transformationsplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Kulturröhrchen geschüttelt wurde. Davon werden 2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 µl Qiagen P1 suspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Qiagen P2 wurde das Eppendorfgefäß invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 150 µl Qiagen P3 zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Eppendorfszentrifuge (14000 UpM, 10 min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 1ml kaltem absolutem Ethanol gemischt und erneut für 30 min bei 14.000 UpM im Kühlraum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wie oben wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. Mit dieser Methode werden etwa 20 µg Plasmid-DNA gewonnen.

2.1.15 Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Die Präparation von Plasmid-DNA zum Zwecke der Sequenzierung erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit von Macherey und Nagel. Es wurden 3 ml der Übernachtskultur wie in 2.1.14 beschrieben pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer A1 mit RNase durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde 250 µl Lyse-Puffer A2 zupipettiert, das Eppendorfgefäß 8-mal invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Neutralisationspuffer A3 wurde das Eppendorfgefäß erneut 8-mal invertiert und 10 min bei 11.000 UpM zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der klare Überstand wurde auf eine NucleoSpin-Säule, in einem 2 ml Auffanggefäß stehend, pipettiert und 1 min bei 11.000 UpM zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 600 µl Waschpuffer A4 auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min wurde der Durchlauf entfernt und erneut 2 min zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, 50 µl steriles H₂O auf die Säule pipettiert und für 1 min mit 11.000 UpM zentrifugiert. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen wurde die Elution mit dem Durchfluss einmal wiederholt. Die auf diese Weise gewonnene DNA war für die Sequenzierung (siehe 2.1.17) geeignet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA einer optischen Dichte von 1,0.

2.1.16 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Für die Präparation wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Es wurden jeweils 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Tag bei 37 °C im Kulturröhrchen geschüttelt. Mit dieser Bakteriensuspension wurde anschließend eine 250 ml Übernachtskultur angeimpft. Die 250 ml Übernachtskultur wurde in einem GSA-Rotor (Sorvall) für 10 min bei 4 °C und 5.000 UpM in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5B) pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Qiagen P1 vollständig resuspendiert. Anschließend wurde für die alkalische Lyse der Bakterien durch Zugabe von 10 ml Qiagen P2 durchgeführt, es wurde vorsichtig gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Zur Neutralisation wurden 10 ml kaltes Qiagen P3 zugegeben, und es wurde sofort vorsichtig gemischt. Nach Inkubation für 10 min bei RT wurden die ausgefällten Proteine durch eine

QIAfilter-Maxi-Cartridge-Filtration von der gelösten Plasmid-DNA abgetrennt. Zu dem Filtrat wurden 2,5 ml Qiagen ER gegeben, es wurde durch 10-maliges Invertieren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das klare Lysat wurde auf eine zuvor mit 10 ml Qiagen QBT äquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule pipettiert. Nachdem das Lysat durchgeflossen war, wurde die Säule 2-mal mit je 30 ml Qiagen QC gewaschen, um Kohlenhydrate zu entfernen. Schließlich wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml Qiagen QN eluiert. Die DNA im Eluat wurde mit 10,5 ml ungekühltem Isopropanol gefällt und für 30 min bei 14.000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge) im Kühlraum pelletiert. Das Pellet wurde mit 2,5 ml kaltem 70%igem endotoxinfreien Ethanol gewaschen und für 10 min zentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde an der Luft getrocknet und in 200-1000 µl H₂O aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene endotoxinfreie DNA wurde für die Transfektion kultivierter Zellen (siehe 2.1.23) verwendet.

2.1.17 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung mit BigDye-Terminatoren basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode (Sanger et al., 1977). Jede DNA-Probe wird nur einer einzigen Sequenzierungsreaktion unterworfen, die alle vier unmarkierten dNTPs enthält. Der Abbruch der enzymatischen Synthese erfolgt durch den Einbau eines der vier Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Alle so entstandenen Oligonukleotide können in einem Sequenziergel anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz identifiziert werden. Die DNA-Sequenz kann so direkt abgelesen werden. Zur Sequenzierung wurde 700 ng Plasmid-DNA oder 100 bis 400 ng gereinigtes PCR-Produkt, 15 pmol Primer und 4 µl BigDye-Terminator-Ready-Reaktion-Mix eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler mit Heizdeckel (Mastercycler, Eppendorf) ohne Ölschicht durchgeführt, da BigDye-Fluorophore sich in Mineralöl lösen und so nicht mehr für die Sequenzierreaktion zur Verfügung stehen. Das Sequenzierprogramm sah wie folgt aus: Zunächst wurde 1 min bei 95 °C denaturiert, anschließend folgten 25 Sequenzierzyklen. Jeder Zyklus umfasste 30 sec Denaturierung bei 96 °C, 15 sec Annealing bei 50 °C und 4 min Elongation bei 60 °C. Danach wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl abs. Ethanol gemischt und mit 14.000 Upm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich

markierten Dye-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 DNA-Sequencer. Auf diese Weise wurde ein Bereich bis zu 600 bp sequenziert. Die Sequenzdaten wurden in Textformat gespeichert und für Homologievergleiche in den Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) und der Datenbank Ensembl des Sanger Institute und des European Bioinformatics Institute (<http://www.ensembl.org>) verwendet.

2.1.18 Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA im präparativen Maßstab wurde das Expand Long Template PCR System von Roche verwendet. Bei der verwendeten DNA-Polymerase handelte es sich um ein Gemisch aus zwei Enzymen (Taq- und Pwo-Polymerase) im Verhältnis 10:1. Dieses hat den Vorteil, dass lange DNA-Fragmente mit hoher Genauigkeit amplifiziert werden können. Ansonsten wurde mit der rekombinanten Taq von MBI/Fermentas gearbeitet. Die Reaktionen wurden im Mastercycler (Eppendorf) oder im OmniGene Thermocycler (Hybaid) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl 10x Puffer 3, 25 µM dNTPs (10 mM), 1,5 µl je Primer (15 pM), 10 ng DNA-Template und 2,6 U Enzym-Mix. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Das Temperaturprofil für die Amplifikation sah wie folgt aus:

A.: Plasmid DNA als *Template*

1x 2 min 94 °C
35x 10 sec 94 °C, 30 sec 62 °C, 90 sec 68 °C (Denaturierung, Annealing, Elongation)
1x 7 min 68 °C

B.: Genomische DNA als *Template*

1x 4 min 94 °C
35x 30 sec 94 °C, 30 sec 62 °C, 1-5 min 68 °C (Denaturierung, Annealing, Elongation)
1x 7 min 68 °C

Die Annealingtemperatur richtete sich nach den eingesetzten Primern gemäß der Formel: $\text{Temperatur} = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$. Die Buchstaben A, T, C und G stehen für die Anzahl der entsprechenden Basen in den Primern. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten PCR-Fragmentes und betrug 60 sec je 1 kb. Eine Primeranalyse wurde mittels Vector NTI 6.0 von Infomax durchgeführt. Zum Schluss wurde der Ansatz bei 68 °C für 7 min

inkubiert, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden konnten. Bei schwierigen PCR-Reaktionen mit genomischer DNA als Template wurden 1% DMSO und 1% Betain dem Ansatz zugesetzt. Der PCR-Ansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das PCR-Produkt aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract Kit (siehe 2.1.11) isoliert. Das gereinigte DNA-Fragment konnte aufgrund der eingeführten Restriktionsschnittstellen verdaut und in den entsprechend vorbereiteten Vektor eingebaut werden.

2.1.19 Phenolextraktion von Nukleinsäuren

Phenol(Roth): redestilliertes, in TE äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0

Zusatz von 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0

Die wässrigen Nucleinsäurelösung wird in einem Eppendorfgeläß 1:1 mit Phenol versetzt und auf dem Vortex Mixer gemischt. Zur Phasentrennung ist eine kurze Zentrifugation notwendig. Vor Verwendung der DNA werden Phenolreste durch mehrfaches Extrahieren mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Den letzten Reinigungsschritt bildet eine Fällung mit 2 Volumen 0,4 M LiCl in Ethanol. Das erhaltene Präzipitat wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen. Alternativ kann auch mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2, in Ethanol gelöst, und 1 Volumen Isopropanol gefällt werden.

2.1.20 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wässriger DNA-Lösung mit 2 Volumen 0,4 M LiCl, in Ethanol gelöst, fällt für 10 Minuten bei 4 °C und zentrifugiert anschließend 30 min mit 13.000 UpM bei 4 °C. Das Pellet wird in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Alternativ kann auch mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 in Ethanol und 1 Volumen Isopropanol gefällt werden. Die Extinktion der Nucleinsäuren wird photometrisch bei 260 nm bestimmt (eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA). Das Verhältnis der Extinktion gemessen bei 260 nm zu der bei 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) sollte für eine sorgfältig präparierte Nucleinsäure bei 1,8 liegen, das Verhältnis OD_{260} zu OD_{230} bei 2,25.

2.1.21 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen

Zur Isolierung von hochmolekularer DNA benötigt man konfluent gewachsene Zellen einer Zellkulturplatte (55 cm²), die zweimal mit PBS gewaschen werden und mit 3 ml Proteinase K Lösung versetzt werden. Nach Überführen der Lösung in sterile Zentrifugenröhrchen inkubiert man über Nacht bei 37 °C. Durch Extraktion mit 3 ml Phenol werden Proteine extrahiert. Nach gründlichem Waschen mit Chloroform/Isoamylalkohol werden die Proben gegen TE dialysiert, wobei ein mehrmaliger Pufferwechsel erfolgt.

5x Proteinase K Puffer: 5% SDS, 80 mM EDTA, 0,4 M Tris/HCl, pH 7,5

Proteinase K-Lösung: 0,2 mg/ml Proteinase K in 1x Puffer

Alternativ hierzu gibt es eine **Quick DNA Gewinnungsmethode**. Hierzu wird eine konfluent bewachsene 9,1 cm² Kulturplatte mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Proteinase K Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1,5 ml Eppendorfgläser inkubiert man über Nacht bei 56 °C. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von 1 ml 75 mM NaOAc, in Ethanol gelöst, ohne Schütteln für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einen anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5000 UpM wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen zwei Waschschrte, bei denen das Pellet mit 0,5 ml 70% Ethanol für 30 min stehengelassen und anschließend wie beim ersten Mal zentrifugiert wird. Nach dem zweiten Waschschrte lässt man das DNA-Pellet für 10 min bei Raumtemperatur trocknen und nimmt die DNA dann in 30 µl TE auf, so dass die DNA Konzentration etwa 0,5 µg/µl beträgt.

2.1.22 Verwendete und hergestellte Vektoren

ploxPneo-1: 4965 bp, Plasmid mit einer Neomycinresistenz, die von zwei identisch orientierten loxP-Stellen flankiert ist. Die Neomycin-Resistenz steht unter der Kontrolle eines PGK-1 Promoters und Terminators. Geschenk von Michael Bösl, ZMNH.

pKO Select 840 DT: 2984 bp, Plasmid mit einer Diphtherie Toxin A-Kassette, Stratagen

ploxNeoDTI: 6181 bp, Plasmid mit einer Neo- und DT-Kassette (aus ploxPneo-1 und pKO Select 840 DT)

pBSKM : 2961 bp, pBlueSkript, Stratagen

pBSKMNeoCL: 4611 bp, pBSKM mit einer Neo-Resistenz von Christian Hübner, ZMNH

pBSKM 2.9: 5658 bp, Plasmid bestehend aus dem pBSKM und einem einklonierten PCR-Produkt (MBD1 Gens von 452-3150 bezogen auf NCBI AF 120978; EcoRI einkloniert)

pBSKMBfrIlox: 5712 bp, Plasmid bestehend aus dem pBSKM 2.9 und einer einklonierten loxP-Stelle mittels BfrI.

pBSlox9604-13152r: 6563 bp, Plasmid bestehend aus dem pBSKMBfrIlox und einer verlängerten 5`Region des Vektors (aus pGEM 9604-13152l SacI kloniert)

pGEM t-easy: 3015 bp, linearisierter TA Kloning Vektor, Promega

pGEM 5-1: 8115 bp, Plasmid bestehend aus dem pGEM t-easy und einem einklonierten PCR-Produkt (MBD1-Gens von 3514- 8601 bezogen auf NCBI AF 120978)

pGEM9604-13152l: 6572 bp, Plasmid, bestehend aus dem pGEM t-easy und einem PCR-Produkt von 9604 bis 13153 bp bezogen auf den NCBI Klon AF120978 –10 kb).

ploxNeoDTI5.1r: 11275 bp, Plasmid, bestehend aus dem ploxNeoDTI und dem einklonierten PCR-Fragment aus dem pGEM 5.1, XhoI einkloniert.

ploxNeoDTI7.8l: 13993 bp, Plasmid, bestehend aus dem ploxNeoDTI5.1r und dem einklonierten Insert aus dem pBSKM2.9BfrIlox über eine EcoRI-Schnittstelle.

ploxNeoICDTI7.8b: 14083 bp, Plasmid, bestehend aus ploxNeoI7.8l und einer ausgetauschten Neo Kasette (aus pBSKMNeoCl). Es stellt den mit NotI linearisierten Targeting-Vektor dar.

Von allen Plasmiden wurden ausführlich Karten mittels Vector NTI 6.0 von Infomax und Restriktionsmappen mittels bioedit 5.0.0 angefertigt.

2.1.23 Transfektion

Die Technik der Transfektion ermöglicht das Einbringen fremder DNA in Zellen und damit die Analyse überexprimierter Proteine in der Zellkultur. Zunächst wurde die älteste

Transfektionsmethode mit Calciumphosphat verwendet. Dabei wird ein Präzipitat aus DNA und Calciumphosphat erzeugt, das wahrscheinlich durch Phagozytose von Zellen aufgenommen wird. In der mitotischen Phase ist die Kernmembran zeitweise aufgelöst, so dass die DNA in den Zellkern gelangen kann. Diese Methode wird oft verwendet, jedoch ist die Transfektionseffizienz meist sehr gering. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 6×10^5 HEK293-Zellen in \varnothing 35 mm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgesät, so dass sie für die Transfektion zu 50– 80% konfluent waren. Drei Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Herstellung der DNA-Calciumphosphat-Komplexe wurden 3 μg Plasmid-DNA mit sterilem H_2O auf 153 μl Endvolumen aufgefüllt und mit 22 μl 2 M Calciumchlorid in einem 12 ml Röhrchen (Greiner) gemischt. Unter Vortexen wurden 175 μl 2x HBS hinzu getropft. Die Lösung wurde 30 min bei RT inkubiert, kurz gevortext und zu den vorbereiteten Zellen getropft (100 μl pro Schale). Die entstandenen Mini-Kristalle aus DNA und Calciumphosphat waren anschließend im Mikroskop als feine Körnchen sichtbar. Die Schalen wurden im Brutschrank (Heraeus) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Für eine stabile Transfektion, d.h. eine dauerhafte Integration der fremden DNA in das zelluläre Genom, erfolgte eine Selektion mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 im Kulturmedium. Die Selektion dauerte an, bis in den Kontrollschalen alle nicht transfizierten Zellen starben und sich in den behandelten Schalen Kolonien von transfizierte Zellen bildeten.

2.1.24 Präparation von DNA aus Mausschwänzen

Zur Präparation von DNA aus Mausschwänzen wird ein circa 0,5 cm langes Stück vom Schwanz der Maus abgeschnitten. Die Maus sollte älter als drei Wochen sein. Falls es nötig ist, können die Schwänze für einige Wochen bei -20 °C gelagert werden. Pro Schwanz werden 0,5 ml Tail Puffer hinzugegeben und über Nacht bei 55 °C unter schütteln in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß verdaut. Nach der Zugabe von 0,5 ml Phenol/Chloroform (1:1) wird der Ansatz mindestens eine Stunde geschüttelt und anschließend für 15 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und gleiches Volumen Isopropanol (500 μl) zugegeben. Nach mehrmaligen Invertieren für 20-30 min fällt die DNA als weißer Niederschlag aus. Die Lösung wird für 15 min bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet, in 50 μl Wasser resuspendiert und für den Restriktionsverdau werden 20 μl eingesetzt, für eine PCR-Reaktion etwa 0,5 μl . Der Tail Puffer beinhaltet: 50 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5%

SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K (direkt vor Benutzung zugeben). Alternativ wurde eine DNA-Präparation mit dem **Isolierungskit** der Firma Appli Chem durchgeführt. Hierzu werden 0,5 ml Tailpuffer und 30 µl Proteinase K (Roche, 19.45 µg pro ml) hinzugegeben. Die Mausschwänze werden in 2 ml Eppendorfgläser über Nacht bei 56 °C verdaut und mit 0,5 ml DNA Isolierungsreagenz versetzt. Anschließend wird die Lösung für 5 min durch horizontale Rotation gemischt, 1 ml 96% Ethanol hinzugefügt und die Lösung erneut gemischt. Die DNA wird 5 min bei RT gefällt und 12 min bei 11.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet aus genomischer DNA zweimal mit 96% Ethanol gewaschen. Hierfür wird jeweils 300 µl Ethanol hinzugegeben und für 10 min bei 11.000 UpM zentrifugiert. Die DNA wird zuletzt für etwa 30 min bei 55 °C getrocknet und über Nacht bei 37 °C in 100 µl TE im Thermoschüttler gelöst. Die Qualität der DNA ist ausreichend für Southernblots und PCR-Reaktionen. Für die Genotypisierung der beiden Mauslinien MBD1- VF10 , F7/10 (conditional) als auch für die Linien MBD1-VF10 creA7, MBD1-VF10 creF12 wurde folgende PCR-Reaktion verwendet:

Für die konditionalen **Linien MBD1-VF10 und F7/10** eine PCR mit den Primer: plox 7.8 2976 rev und plox 7.8 2699 for, die eine Fragmentgröße von 237 bp bei Wildtyp-Mäusen und 277 bp bei Mäusen mit getargetem Allel ergeben.

plox 7.8 2976 rev. CCCGGTGTCTAGCTGCATTTATGG

plox 7.8 2699 for. GAGAAAGAGTAGCTAACACCGGCTGTAGG

Für die Reaktion werden 3 µl genomische DNA, je 1 µl primer, 1 µl dNTP (10 mM), 0.5 µl Taq (MBI, 5 U pro µl), 5 µl Roche Puffer 2 (PCR long template Puffer), 1 µl Betain (10%), 1 µl DMSO (10%) und 38,5 µl Wasser angesetzt. Das Programm besteht aus folgenden Schritten: 4 min 94 °C; 30 sec 94 °C, 30 sec 50 °C, 30 sec 72 °C x35; 1 min 72 °C Für die **MBD1-defizienten Linien MBD1-VF10 cre A7 und MBD1-VF10 cre F12** eine PCR mit den Primer: plox 7.8 2501 for, plox 7.8 6239 rev und plox7.8 2976 rev, die eine Fragmentgröße von 435 bp bei Wildtyp-Mäusen und 519 bp bei Mäusen mit deletiertem Allel aufweisen.

plox7.8 2976 rev CCCGGTGTCTAGCTGCATTTATGG

plox7.8 2501 for CCTCGAGACGGGAGAAATAGTTAGA

plox7.8 6239 rev GACTAAGAGCCAATGGCTTTAGAGG

Das Programm beinhaltet folgende Schritte: 4 min 94 °C; 30 sec 94, °C, 30 sec 54, °C, 1 min 72 °C x 35; 1 min 72 °C.

2.1.25 Southernblot

10 µg der aufgereinigten hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10 fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10 µg/ml) sowie 50 U des Restriktionsenzym versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wird die DNA direkt mit 5 µl 6x Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0,8 bis 1,2%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Bei diesen Schritten ist es wichtig, auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen DNA-Lösung zu achten. Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran (NEN, Gene Screen Plus; NEF 1017) erfolgt mit 0,4 M NaOH. Große Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl für 15 min depuriniert werden, so dass sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH gewaschen und in die Blotappertur überführt: Es liegt mit der Unterseite nach oben (oberhalb des Flüssigkeitsspiegels des Reservoirs) auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatmann 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier befinden sich mehrere Lagen 3MM Papier, die nicht mit der Flüssigkeit in direktem Kontakt stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt und mit NaOH benetzt. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 N NaOH angefeuchtetes und fünf Lagen trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier den Aufbau ab. Die Anordnung wird vorsichtig mit Plastikfolie abgedeckt und schließlich eine Glasplatte und ein Gewicht aufgelegt. Der Transfer sollte mindestens sechs Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Anschließend wird die Nylonfolie zur Hybridisierung weiterverwendet. Eine weitergehende Fixierung der DNA auf der Membran z.B. durch Backen ist unnötig.

Hybridisierung

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| Hybridisierungslösung: | ExpressHyb Solution, BD Bioscience |
| Waschlösung 1 | 2x SSC; 0,5% SDS |

Waschlösung 2

0,1x SSC; 0,1% SDS

5 ml der Hybridisierungslösung werden in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungssofen gefüllt und die Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingerollt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 60 °C im Hybridisierungssofen für 30 min unter Rotation. Die denaturierte radioaktive Sonde (rediprime Kit) wird zusammen mit 40 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml) hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgt bei 60 °C über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden, des weiteren sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden. Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert. Die Membran wird vorsichtig entnommen. Die folgenden Waschrinne erfolgen bei 60 °C im Hybridisierungssofen: 1x 5 min mit 10 ml Waschlösung 1; mindestens 2x mit 10 ml Waschlösung 2. Die verbleibende Aktivität auf der Membran sollte zwischen 100 und 400 Zerfälle/s betragen. Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknen der Membran führt zu einer irreversiblen Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich. Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch mehrfaches Waschen mit Waschlösung 2 bei 95 °C entfernt. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt.

Radioaktive Markierung mit „Rediprime DNA Labelling System“

10-25 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl TE in einem Eppendorfgeläß für 10 min bei 100 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling Mix (Rediprime TM II von Amersham) pipettiert, gemischt und nach Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) für mindestens 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl 0.2 M EDTA gestoppt. Anschließend werden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex-G 50 Säule abgetrennt, die Probe erneut 5 Minuten bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wird die Aktivität der Sonde im Szintillationszähler bestimmt. Weiterhin wurden die Sonden auf ihre theoretische Spezifität untersucht, hierzu habe ich eine vorbereitende Blast-search-Homologie-Suche in der ensembl-Datenbank (www.ensembl.org) durchgeführt um spezifische Sonden zu erhalten.

Klenow-Markierung :

10x Klenow-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 2 mM DTT

Die zu markierenden DNA Fragmente werden mit Restriktionsenzymen geschnitten, die 5'-T-Überhänge aufweisen, und durch Fällung gereinigt. Anschließend markiert man die verdaute DNA durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Enzym. Hierzu versetzt man circa 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl mit 2 µl Nucleotidmix (je 3 mM dCTP, dGTP, dTTP), 4 µl α -³²P-dATP (>3000 Ci/mmol) und 2 U Klenow Enzym. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und Abstoppen der Reaktion mit 5 µl 0,3 M EDTA erfolgt eine Aufreinigung über eine Sephadex G50 Säule.

2.1.26 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten

Die Gewinnung von Blastozysten (C57BL6) und die Bereitstellung von pseudo-schwangeren Mäusen erfolgte von Tina Koppelman und Dr. Irm Hermans Borgmeyer, ZMNH. Für die ES-Zell-Injektion in Blastozysten wurden die gekühlten Blastozysten unter dem Injektor mit 12-15 runden, homogenen ES-Zellen injiziert. Nach dem Transfer wurde etwas Flüssigkeit aus den Blastozysten abgesaugt, um den dortigen Verbleib des ES-Zellen in diesen zu gewährleisten. Pro Amme wurden etwa 10-12 Blastozysten injiziert.

2.1.27 Untersuchung der Funktionalität der loxP-Stellen

Um die Funktionalität der ersten und dritten loxP-Stelle innerhalb des Targeting-Vektors zu testen, wurden ein stabil Cre-exprimierende *E.-Coli*-Zellen (294-Cre, NAR 1996; ein Geschenk von Dr. Francis Stewart) bei 37 °C für 16 Stunden kultiviert und chemisch kompetent gemacht (2.1.8). Anschließend wurde der Targeting-Vektor transformiert und die entsprechenden Mini-Präparationen des Plasmids durch einen Verdau mit NotI linearisiert. Innerhalb des Targeting - Vektors mit einer Größe von 14083 bp wird der Bereich zwischen der ersten und dritten loxP-Stelle deletiert. Diese Deletion erfolgt in Abhängigkeit der Cre-Expression nur bei einem Teil der Plasmide innerhalb der Zellen,. Somit kommt eine Fragmentgröße von 10864 bp nach Cre-vermittelter Deletion zustande. Aufgrund der erhaltenden Fragmentgrößen kann auf die intakte Funktionalität der im Targeting-Vektor enthaltenden äußeren loxP- Sequenzen geschlossen werden.

2.1.28 RT-PCR

In allen Zellen findet der normale Informationsfluß in der folgenden Richtung statt: DNA zu

RNA, [prä-mRNA zu reifer mRNA], zu Protein. Die Retroviren können aber mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) den Informationsfluß umkehren und aus m-RNA doppelsträngige DNA bilden. In der Molekularbiologie wird dieses Enzym zur Synthese von cDNA aus mRNA verwendet. Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht im Vergleich zur konventionellen Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek eine schnellere und effizientere cDNA-Klonierung. In der reversen Transkription wurde gesamt RNA in gesamt cDNA umgeschrieben. Die Reaktion kann mit viralen Polymerasen, z.B. der ThermoScript RT, erfolgen, die Oligo (dT) in 5' → 3'Richtung komplementär zur RNA verlängern. Der erste Schritt der reversen Transkription fand in einem Volumen von 20 µl unter folgenden Bedingungen statt: Hierzu wurden 1 µl RNA, 4 µl cDNA Puffer, 1 µl oligo dT, 1µl DTT 0,1 M, 1 µl random hexamer Primer, 1 µl RNase-Inhibitor, 2 µl dNTP, 1 µl DEPC-Wasser und 1 µl Thermo Script vermischt und mit DEPC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die RNA, Primer und dNTPs können für 5 min bei 65 °C vorerhitzt und anschließend auf Eis gestellt werden. Darauf werden die restlichen Komponenten zugegeben und die Reaktion im Thermocycler für 45 min auf 50 °C erhitzt. Des weiteren erfolgt ein Temperaturschritt für 5 min bei 85 °C. Zum Schluß wird 1 µl RNase H bei 37 °C hinzugefügt. Je 2 µl des Reaktionsansatzes werden als Template für die entsprechenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern verwendet. Für Genexpressionsanalysen im Light Cycler werden 15 µl Gesamtvolumen bei einer Primer-Konzentration von 15 pM eingesetzt.

2.1.29 Isolierung der Gesamt-RNA

Der Abbau von RNA-Molekülen durch Ribonukleasen (RNasen) während der RNA-Präparation ist eine unerwünschte Begleitreaktion. Ribonukleasen sind sehr stabile Enzyme, die keine Kofaktoren benötigen. Der erste Schritt der Präparation bestand in einer Zellyse unter Bedingungen, die zur weitgehenden Denaturierung der RNasen führte. Die RNA wurde dann durch eine saure Phenolextraktion von den anderen Makromolekülen abgetrennt.

Guanidiniumisothiocyanat ist eine effektive Protein-denaturierende Substanz. Die verwendete Methode zur RNA-Präparation basiert auf der Eigenschaft von RNA-Molekülen, in einer wässrigen Phase mit 4 M Guanidiniumisothiocyanat bei einem pH-Wert von 4,0 gelöst zu bleiben. Unter diesen sauren Bedingungen hingegen reichern sich DNA-Fragmente (bis 10 kb) und Proteine in der organischen Phenol/Chloroformphase an. Daher war die Fragmentierung der

DNA im Zuge der Zellyse notwendig (Homogenisation). Aus 50 mg Gewebe wurde Gesamt-RNA aufgereinigt. Das Gewebe wurde in 1 ml einer einphasigen Phenol und Guanidin-isothiocyanat Lösung (RNA-Gold, peq lab) mit einem Polytron-Homogenisator homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennte sich das Homogenat in drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase befand sich die nicht-degradierte RNA, frei von DNA und Proteinen. Die RNA wurde nach der Extraktion aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit Ethanol 70% gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die RNA konnte bei -80 °C gelagert werden. Eine zusätzliche Aufreinigung wurde mit Hilfe von peqGold RNSPureTM nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das RNA-Pellet wurde abschließend in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Als Alternative wurde die **Trizol-Methode** verwendet. Hierzu wurden etwa 30 bis 50 mg Gewebe (Hirn) entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebe in einem Mörser zerkleinert bzw. im Metallmörser zertrümmert. Das Gewebe wurde in ein gekühltes Eppendorfgefäß gegeben, auf Eis gestellt und eventuell gewogen. Es wurde 800 µl Trizol hinzugefügt, danach wird die Lösung mittels hoch- und runter pipetieren homogenisiert. Eine Inkubation von fünf Minuten bei RT schließt sich an. Anschließend werden 160 µl Chloroform zugesetzt, für ca. 15 sec gevortext und die Mischung bei RT für 3 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 10000 UpM, 4 °C) wird die obere Phase in ein neues Gefäß überführt, 400 µl Isopropanol werden hinzugegeben. Nach dem Vortexen wird für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt ein Zentrifugationsschritt mit 13.000 UpM für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird zweimal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und abschließend in etwa 100 µl DEPC Wasser gelöst.

2.1.30 mRNA-Quantifizierung durch LC-PCR

Bei der LC-PCR (light cycler, Roche) wurden generell 45 Cyclen gefahren und ein Kapillarvolumen von 15 µl verwendet. Die Primer Konzentration betrug 15 pM und die c-DNA wurde in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt, was etwa einer Konzentration von 0,1 µg/µl entsprach. Für diese Real-Time-PCR mit SYBR Green wurde 10 µl von Tube 1a (LC FastStart Enzym) mit dem Inhalt von 1b auf ein Gesamtvolumen von 60 µl vereinigt und durch Pipettieren vermischt.

Als Ansatz für den Mastermix wurden folgende Konzentrationen verwendet:

| Reagenz | Stockkonz. | Endkonz. | µl pro tube | µl bei 5 Rkt | µl bei 10 Rkt |
|----------------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Sybr Green | 10x | 1x | 1,5 | 7,5 | 15 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 3 mM | 1,8 | 9 | 18 |
| H ₂ O | | | 9,75 | 48,75 | 97,5 |
| Vorwärts, Rückwärts Primer | Je 15 pmol/µl | | 1 | 5 | 10 |

Pro Kapillare wurden 1,5 µl Template-DNA zu 13,5 µl Mastermix pipettiert.

Liste der LC-PCR Primer:

| c-DNA | Temp. | vorwärts Primer Sequenz | rückwärts Primer Sequenz |
|--------------|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| H19 | 61°C | TGTAAACCTCTTTGGCAATGCTGCC | TATTGATGGACCCAGGACCTCTGGT |
| MBD1 | 61°C | TGGACGCTCAGACATCTATTACCAGAGC | GCAGACACAGATAGTGAAGCTAGAGCTGTG |
| BDNF | 61°C | GGACAGTCATTGGTAACCTCGCTCATT | TCCCCAACAGATGCAGGAAGGTAATG |
| UBE3a | 61°C | AATCCATCTTCTTTTGAAACTGAGGGT | TTTGTAATTGGAATTTTATCACCATTTT |
| U2af1-rs2 | 61°C | TACCACAGATAACCACGGATAACCTG | ATAGGCCTGCCCATGCAGTTA |
| PEG3 | 61°C | TGGTGCAGACATTGAAGACC | TTGCTCTCTTCCTCCTCAGG |
| SNRPN | 61°C | ATACTGGCATTGCTCGTG | TGGAGGAGGCATGCCTATAG |
| IGF2r | 61°C | TTCGACCTATAAGAAGCCTT | GGGTACTTTGCTTTTGGGTA |
| BRCA1 | 56°C | CCCAAAGATGAGCTGGAGAG | GTCCCACATCACAAGACGTG |

| | | | |
|--------|------|------------------------------|------------------------------|
| BRCA2 | 56°C | CCATTTTCAGAAGACCAGTGG | ACGAACACCTATGAGTAGCC |
| WT1 | 56°C | CCAGGCTGCAATAAGAGATA | ATGTTGTGATGGCGGACCAAT |
| Trp53 | 53°C | CTTCCCGCCATAAAAAACA | AGCCCTGAAGTCATAAGACAGC |
| p53BP1 | 61°C | TCCAAGTGTGTAAGTTCCTGGTGGAGTC | TCGATCTCCTTTCATCTTCTCTGCTGCG |
| ActaB | 61°C | TTCTTTGCAGCTCCTTCGTTGCCG | TGGATGGCTACGTACATGGCTGGG |
| GAPDH | 61°C | ACGGGAAGCTCACTGGCATGGC | TCTTACTCCTTGGAGGCCATGTAGG |
| RB1 | 63°C | CGCAGCAGTTGATCTAGATGAGATGC | TTGTATGGCTCTCTGAGTAGTGCAGGAG |
| NF1 | 63°C | ACATGCAGCCGAAGTTCGGAATTCTG | TATGTTGCTCTCGTCCACCACATCCTTG |
| MDM2 | 63°C | GCTTCGGAACAAGAGACTCTGGTTAGAC | CCAGGTAGCTCATCTGTGTTCTCTTCTG |

2.1.31 Überprüfen von Bakterienkolonien durch PCR

Zur schnellen Überprüfung von pGEM-T easy transformierten Klonen wurde ein PCR-basiertes Verfahren verwendet. Die zu untersuchende Bakterienkolonie wurde mit einer 10 µl-Pipettenspitze isoliert und in 10 µl sterilem H₂O in einem Eppendorfgefäß resuspendiert. Um den Klon nicht zu verlieren, wurde mit derselben Pipettenspitze eine neue LB amp-Platte angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 100 °C im Wasserbad lysiert. 2 µl des Lysates wurden mit 8 µl Master-Mix einer PCR unterzogen. Als Primer wurden T7-forward und Sp6-reverse Primer eingesetzt, die die multiple Klonierungsregion umfassen. Master-Mix und Programm für die PCR-basierte Analyse von zehn Bakterienkolonien beinhaltet folgende Reagentien: 10 µl 10x PCR Puffer (MBI Fermentas), 2 µl dNTPs (10 mM), 10 µl T7 Vorwärtsprimer (5 pmol/µl), 10 µl Sp6 Rückwärtsprimer (5 pmol/µl), 47,5 µl H₂O und 0,5 µl Taq-Polymerase (MBI Fermentas). Das Temperaturprofil bestand aus folgenden Schritten: 1x 96 °C, 2 min; 40x (96 °C 10s, 52 °C 30 s, 72 °C 25s) ; 1x72 °C 2min. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert. Eine funktionierende PCR lieferte bei Eigenligation des pGEM-T easy-Vektor ein PCR-Produkt von 177 bp; dies ist die Länge zwischen den Hybridisierungsstellen der

verwendeten Primern. Sobald ein Insert im Vektor enthalten war, wurde das Amplifikat größer als 177 bp. Die DNA positiver Klone wurde meist nach einer Mini-Präparation mit Restriktionsenzymen identifiziert.

2.1.32 Westernblot

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen aufgrund unterschiedlicher Molekularmassen mit nachfolgender Identifikation der Proteine. Es wurde das Minigel-System PROTEAN II (Bio-Rad) verwendet. Die benutzten 9%igen Gele setzten sich wie folgt zusammen:

| | Trenngel (9 %) | Sammelgel (3 %) |
|-------------------------------|----------------|-----------------|
| H ₂ O | 8,1 ml | 6,3 ml |
| Acrylamid (30 %) | 5,4 ml | 2,0 ml |
| 1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 M SDS | 4,5 ml | - |
| 0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 M SDS | - | 2,5 ml |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 70 µl | 100 µl |
| TEMED | 8 µl | 20 µl |

Tabelle 1: Zusammensetzung des 9%igen Trenngels und des 3%igen Sammelgels für SDS-PAGE.

Das zu untersuchende Gewebe der Mäuse wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und zerkleinert. Unter Benutzung eines 1 ml Glaspotters wurde das pulverisierte Gewebe etwa 25 mal in Homogenisierungspuffer (10 ml/g Gewebe) mittels des Douncers homogenisiert. Danach erfolgte eine erste Zentrifugation bei 13.000 UpM für 10 min und 4 °C. Der erhaltene Überstand entspricht der ersten Überstandsfraktion. Das Pellet wird in 300 µl Extraktionspuffer aufgenommen, gevortext und etwa 25 mal im Glas-Teflon-Potter extrahiert. Anschließend wird die Suspension für 20 min bei 13.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand ist mit dem Zellkernextrakt angereichert. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese in 1x SDS-Gelladepuffer aufgenommen und bei 100 °C im Wasserbad für 10 min denaturiert. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurden 5 µl gefärbter Protein-Leiter-Mix in einer Spur neben den Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V in 1x Glycin-Laufpuffer durchgeführt und beendet, sobald die Lauffront (Bromphenolblau) aus dem Gel austrat. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Mini-Transblot-Systems (Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran (Protan BA85, Schleicher & Schuell) geblottet. Zuvor wurden die SDS-Polyacrylamidgele und die Nitrozellulosemembranen für 20 min in

Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 110 V für 75 min im Eisbad. Die Effektivität des Transfers wurde anhand der Übertragung des gefärbten Proteinmarkers überprüft. Die Membranen wurden anschließend bei RT über Nacht in 25 ml Block-Puffer (5% Magermilchpulver in TBS) auf einem Schüttler inkubiert. Durch diesen Schritt werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Die blockierten Membranen wurden mit primärem Antikörper für mindestens 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden dann dreimal mit je 15 ml Puffer MM für je 10 min gewaschen. Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde für mindestens 1 h mit einem Meerrettich-peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper Ziege Anti-Maus (Verdünnung: 1:5.000) in Puffer MM bei RT inkubiert. Durch mehrfaches Waschen mit je 15 ml Waschlösung auf einem Schüttler wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Es wurde zweimal mit TBS gespült, dreimal je 10 min, zweimal je 15 min, zweimal je 30 min mit TBS-T gewaschen und zum Abschluß zweimal je 30 min mit TBS. Vor der Detektion wurden je 1 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 (Amersham) frisch gemischt. Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 min unter Schwenken in der ECL-Lösung inkubiert, dann auf Filterpapier (Whatman) leicht getrocknet und in Klarsichtfolie eingeschlagen. Zur Aufnahme der Chemolumineszenzsignale wurden für 5 s bis 2 h Röntgenfilme (X-OMAT, Kodak, Super RX, Fuji) aufgelegt und anschließend maschinell entwickelt. Der konditionale Knockout wurde mit Imgenex Antikörpern (Verdünnung 1:1000) und der Totale Knockout mit Antikörpern von Santa Cruz ebenfalls (Verdünnung 1:1000) detektiert.

2.1.33 Röntgen der Mäuse/Ultraschalluntersuchungen

Um die Mäuse zu röntgen, wurden Sie unter Kohlendioxyd-Sauerstoff-Narkose anästhesiert und anschließend mittels Erhöhung der Kohlendioxyd-Konzentration in der Atemluft getötet. Anschließend wurden ihnen die inneren Organe entnommen. Nach Fixierung auf dem Rücken wurden sie mittels Röntgenstrahlen durchleuchtet (Experimentelle Unfallchirurgie, UKE; Dr. Thorsten Schinke).

Die Ultraschalluntersuchungen wurden von Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pharmakologie freundlicherweise durchgeführt. Eventuelle Unterschiede in Herzfunktion und Morphologie wurden mittels Echokardiographie (Echo, Visual Sonics, 15 MHz Schallkopf) evaluiert. Dafür wurden die Versuchstiere in volatiler Narkose (2% (v/v) Isofluran in 95%

Sauerstoff und 5% Kohlensäure) in supine Lage gebracht und elektrokardiographisch überwacht. Haare auf der Brust wurden mit einem Keratinolytikum entfernt. Echo Aufnahmen erfolgten sowohl in *PW-Doppler Mode* wie auch im *EKV (echokardiographic kiloherz visualisation) Mode*. Daraus wurden folgende Parameter abgeleitet:

Herzzeitvolumen: $CO = VTI \times (3,14 \times PAD^2/4) \times HF$ wobei VTI die Abkürzung für *velocity-time integral* und PAD – für Durchmesser der Pulmonalarterie und HF - für Herzfrequenz ist. Gewicht von dem linken Ventrikel wurde nach elliptischem Muster berechnet: $LVM = 1.04 \times 0,83 \times 3,14 ([LVESD + La]^3 - [LVESD]^3)$ wobei LVM für *left ventricular mass*, LVESD – linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser und La– Wanddicke an der Spitze. Als Kontraktilitätsparameter diente das FAS(fractional area shortening):

$FAS = (LVEDD - LVESD) \times 100\% / LVEDD$, LVEDD ist linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (Experimentelle Pharmakologie, UKE-; Dr. Ivan Melnychenko).

3 Ergebnisse

Die hier vorgelegte Arbeit unterteilt sich in 5 Schritte: Der erste bestand in der Planung der konditionalen Mbd1-Defizients in der Maus. Eine funktionelle Region von Mbd1 sollte durch das Einbringen von loxP-Stellen deletiert und somit die Expression von *Mbd1* nach Cre-Expression unterbunden werden. Als zweiter Schritt erfolgte das *Vektordesign* und die anschließende *Klonierung des Targeting-Vektors*. Der dritte Schritt bestand in der Generierung einer ES-Zelllinie durch *homologe Rekombination* des Targeting-Vektors. Die hieraus erhaltenen murinen ES-Zellen mit getargetem Allel wurden in Blastozysten injiziert, diese in schein-schwangere Weibchen transplantiert. Schließlich wurden chimärer Mäuse erhalten. Diese Mäuse wurden mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt und bilden nach Keimbahngängigkeit die zum Teil heterozygote F1-Generation der *konditional MBD1-defizienten Mauslinie*. Parallel hierzu wurden ES-Zellen mit getargetem Allel in der Zellkultur mit einem Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid transfiziert, woraus das *MBD1-defiziente Mausmodell* erzeugt wurde. Hieraus entstanden Mäuse mit deletiertem Exon 2 und deletiertem Translationsstart des *Mbd1*-Gens. Diese ES-Zellen wurden ebenfalls in Blastozysten injiziert und diese in schein-schwangere Weibchen implantiert, um chimäre Mäuse zu erhalten. Die chimären Mäuse wurden mit Wildtyp-Weibchen verpaart; hieraus entstanden die ersten heterozygoten Mäuse (Schritt 4). Bei beiden Mauslinien wurden heterozygote Tiere miteinander verpaart, um homozygote Nachkommen zu bekommen. Die Genotypisierung erfolgte mittels Southern Blot und PCR-Reaktionen. Anschließend wurde die *Mbd1*-Expression auf RNA- und Proteinebene analysiert. Abschließend im fünften Schritt erfolgte eine erste *Phänotypisierung* der Mäuse.

3.1 Design des Targeting-Vektors

Da zu Beginn meiner Arbeit unklar war, inwieweit eine MBD1-Defizients embryonal letal ist, verfolgte ich einen konditionalen Ansatz unter Verwendung des Cre-lox-Systems. Dieses System erlaubt die Ausschaltung des manipulierten Gens zellspezifisch oder zu einem bestimmten Zeitpunkt durch das Verpaaren mit Cre-exprimierenden Mäusen. Auf diese Weise lässt sich der Phänotyp unabhängig von eventuell durch den Gendefekt bedingten Entwicklungsstörungen untersuchen. Durch zwei gleichgerichtete loxP-Stellen, welche Exon 2 flankieren, das ein Großteil der Methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD) kodiert und das Startkodon beinhaltet,

kann dieses mittels Cre-Rekombination deletiert werden. Die loxP-Sequenzen legte ich in Introns, um die mRNA- und Proteinsynthese vor der Cre-Rekombination *in vivo* nicht zu behindern. Das *Neomycin*-Resistenzgen als positiver Selektionsmarker habe ich zusammen mit den regulatorischen Elementen ebenfalls von loxP-Sequenzen flankiert. Die Cre-Rekombinase diskriminiert nicht zwischen den insgesamt drei loxP-Stellen, es kommt somit zu drei verschiedenen Rekombinationsereignissen (siehe unten). Der MBD1-Targeting-Vektor verfügt mit den 5' und 3' die Neomycin-Resistenz-Kassette flankierenden Armen über einen homologen Bereich zu der genomischen Sequenz von *Mbd1v1* von etwa 7,8 kb, was eine hohe Rate an homologen Rekombinationen in ES-Zellen zur Folge hatte. Die Positionen, die im folgenden angegeben werden, beziehen sich auf den NCBI Mausklon AF120978, dessen Sequenz mit der ensembl Datenbank (www.ensembl.org, sanger institute ENSMUSG00000024561) abgeglichen wurde. Somit beginnt der mittels PCR synthetisierte homologe 5' Bereich bei Position 452 und endet bei Position 3150 (Tabelle 1). Exon 2 kodiert die ersten 40 Aminosäuren der sich über 72 Aminosäuren erstreckenden MBD-Domäne und enthält den Translationsstart. Innerhalb des 5,1 kb großen homologen 3' Bereiches von Position 3514 bis 8601 befinden sich Exon 3 bis Exon 9. Die homologen Sequenzabschnitte wurden mittels Proofreading-PCR-Reaktionen amplifiziert und in den Targeting-Vektor kloniert. Um die konditionalen MBD1-defizienten Mäuse zu generieren, ist Exon 2 von zwei gleich orientierten loxP-Sequenzen innerhalb von Introns flankiert. Eine *in vivo* als auch *in vitro* Cre-Expression induziert die Deletion von Exon 2 und damit des Translationsstartcodons. Die beiden folgenden ATGs können nicht als alternative Translationsstarts genutzt werden, da dem nächsten ATG (in einem anderen Leserahmen) sofort ein Stopcodon folgt und das darauf folgende ATG ebenfalls in einem anderen Leserahmen steht. Das *Neomycin*-Resistenzgen als positiver Selektionsmarker mit einem ubiquitär exprimierenden eukaryontischen PGK-1- (Phosphoglycerat Kinase 1) Promoter und einer PGK-1-Terminatorsequenz ist von zwei gerichteten loxP-Sequenzen flankiert. Auf diese Weise sind sowohl das Exon 2 als auch die Neomycin-Kassette von insgesamt drei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung umrahmt und so einer Cre-Rekombinase bedingten Deletion zugänglich. Generell kann gesagt werden, dass nach der Deletion des Exons 2 die Funktion des Proteins nicht mehr gewährleistet ist. Hieraus ergibt sich eine fehlende Erkennung methylierter DNA durch das Mbd1-Protein. Außerdem benötigen alle bisher bekannten vier Spleißisoformen von Mbd1 das Startcodon in Exon 2. Im Detail erstreckte sich die Klonierung des Targeting-Vektors über folgende Arbeitsschritte:

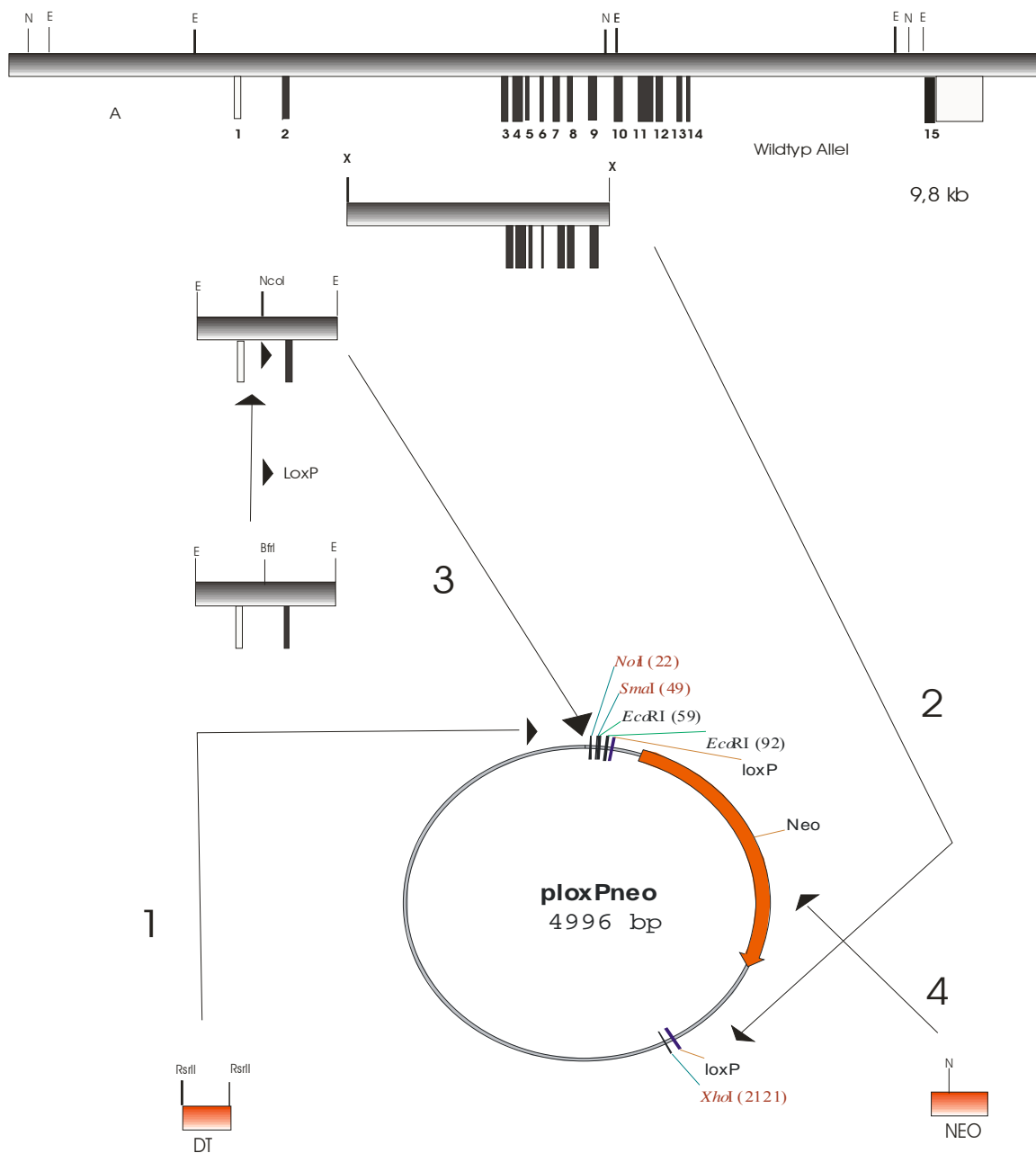


Abbildung 4: Klonierung des Targeting-Vektors. Zur Klonierung des Targeting-Vektors habe ich mit dem Expressionsplasmid ploxPneo begonnen, das das *Neomycin*-Resistenz-Gen enthält, welches von zwei gleich orientierten loxP Stellen flankiert ist. In diesen Vektor wurde blunt end eine *Diphtherie-Toxin A*-Kassette zur negativen Selektion eingeführt (Schritt 1). Als folgender Schritt 2 wurde ein 5,1 kb großer homologer Bereich über XhoI-Schnittstellen integriert. Das erhaltende Plasmid von 11275 bp wurde anschließend mittels EcoRI geöffnet und mit einem 2,7 kb großen zweiten homologen Segment ligiert (Schritt 3). Innerhalb dieses Segmentes hatte ich eine zusätzliche, identisch orientierte loxP-Stelle bereits einkloniert. Abschließend wurde das 14083 bp große Targeting-Plasmid mit NotI linearisiert und für die Elektroporation in ES-Zellen gereinigt. Später wurde die Neomycinresistenz ausgewechselt (Schritt 4). Die Schnittstellen sind mit X für XhoI, E für EcoRI und N für NcoI gekennzeichnet.

Zuerst habe ich in den Expressionvektor ploxPneo, der eine *Neomycin*-Kassette (Neo) mit flankierenden loxP-Sequenzen enthält, eine *Diphtherie-Toxin A* (DT)-Kassette für die negative Selektion durch blunt-end Klonierung eingebracht (Abbildung 4). Die DT-Kassette wird bei homologer Rekombination im *MbdI*-Locus nicht mitintegriert; bei zufälliger Integration im Genom hingegen wirkt die Expression des Toxins für ES-Zellen tödlich. Die DT-Kassette wurde mit Rsr II ausgeschnitten und nach Auffüllung der Schnittstellen in die SmaI-Restriktionsstelle des ploxPneo-Vektors ligiert. Als zweiter Schritt erfolgte die Klonierung des 5,1 kb langen Bereiches, der die Exons 3 bis 9 enthält. Es sollte das entsprechende PCR-Produkt mit XhoI Schnittstellen innerhalb der Primer in den XhoI linearisierten Vektor ligiert werden. Da sich jedoch die direkte Klonierung des PCR-Produktes als schwierig erwies, wurden die Amplifikate zuerst in einen TA-Kloning-Vektor ligiert und anschließend über XhoI Schnittstellen in den ploxNeoDT-Vektor integriert. Die Orientierung habe ich durch Sequenzierungen und Kontrollverdauungen überprüft. Für die Klonierung des 5' homologen Bereiches wurde ein 3,0 kb großes PCR-Produkt mit EcoRI-Primer-Schnittstellen, welches Exon 1 und 2 codiert, mit EcoRI geschnitten und durch eine endogene EcoRI-Schnittstelle auf 2,7 kb verkürzt. Zur weiteren Gestaltung des 5' gelegenen Armes des Targeting-Vektors wurde das in den pBlueSkript-Vektor zwischenklonierte 2,7 kb große DNA-Segment mit BfrI geschnitten, um eine dritte identisch orientierte loxP-Stelle zwischen Exon 1 und Exon 2 zu etablieren. Hierfür habe ich zwei synthetisch hergestellte komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide von 40 bp mit einer loxP-Sequenz und zusätzlichen NcoI-Schnittstelle gegeneinander angelagert und in die BfrI-Stelle des Plasmids integriert. Als vorletzter Klonierungsschritt wurde dieses Insert aus dem pBlueSkript-Plasmid in das endgültige Plasmid mittels EcoRI eingefügt. Zu einem späteren Zeitpunkt musste die Neomycin-Resistenz ausgetauscht werden, da die ES-Zellen anfänglich die G418-Selektion nicht überlebten. Deshalb wurde das Targeting-Plasmid mit EcoRV geöffnet und das *Neomycin*-Resistenzgen blunt end ausgewechselt. Etwa 1 mg des fertiggestellten Konstruktes habe ich mittels 400 Einheiten NotI über Nacht linearisiert und vorbereitend für die Elektroporation in ES-Zellen durch Phenolextraktion gereinigt. Die vollständige Linearisierung und Qualität des Plasmides wurde abschließend überprüft.

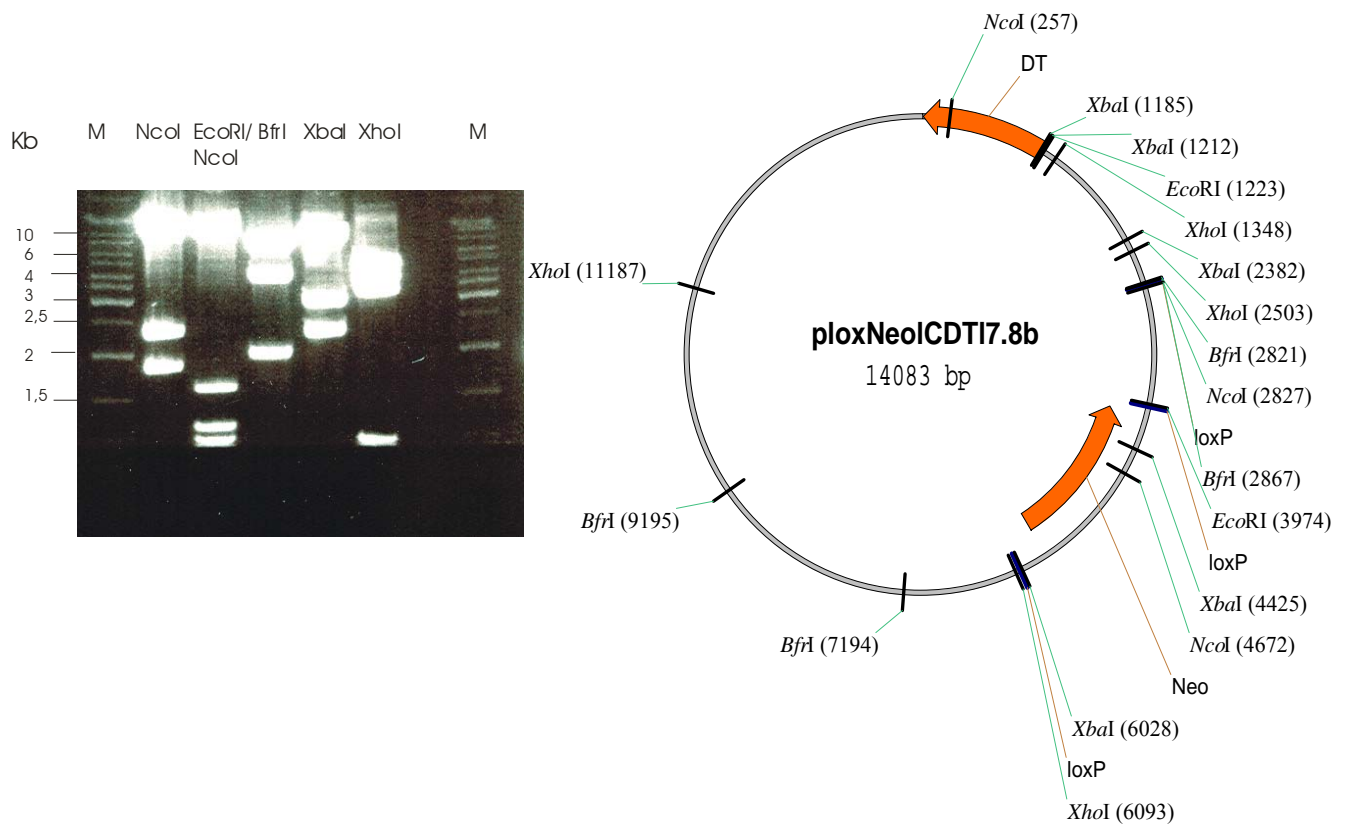


Abbildung 5: Überprüfung des Targeting-Vektors. Das Targeting-Plasmid wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Mit M sind zwei Markerspuren gekennzeichnet (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kb). Die Enzymnamen sind über den jeweiligen Spuren aufgelistet. Die entsprechende Plasmidkarte mit den relevanten Restriktionsschnittstellen ist rechts dargestellt. Als Pfeile sind die Diphtherie-Toxin A (DT) und die Neomycin-(Neo) Selektionskassetten und als Balken die drei loxP-Stellen eingezeichnet. Beide Kassetten sind entgegengesetzt zur *MbdI*-Sequenz orientiert und enthalten eigene Promotor- und Terminator-Sequenzen. Ferner enthält das Plasmid eine singuläre NotI-Schnittstelle an Position 1 der Karte (nicht eingezeichnet).

In Abbildung 5 sind exemplarisch Kontrollverdauungen des 14083 bp großen Targeting-Vektors mit den Enzymen NcoI (9668, 2570 und 1845 bp); EcoRI und NcoI (9668, 1604, 1147, 966 und 698 bp); BfrI (7709, 4327, 2001 und 46 bp); XbaI (9240, 2043, 1603, 1170 und 27 bp) und XhoI (5094, 4244, 3590 und 1155 bp) gezeigt. Die erhaltenen Fragmentgrößen stimmen mit den theoretischen Segmenten (in Klammern) bis auf die XbaI-Verdauung überein. Hier war die Verdauung unvollständig oder eine Schnittstelle war nicht vorhanden. Wichtige funktionale Bereiche wie die drei loxP-Stellen, der Promotor der *Neomycin*-Resistenz und die Ligationsstellen der nacheinander klonierten Segmente des Targeting-Plasmids wurden sequenziert und für korrekt befunden. Ferner wurde die Intaktheit der NotI-Schnittstelle zur

Linearisierung des Targeting-Plasmids überprüft. Weiterhin wurde die Funktionalität der flankierenden loxP-Stellen untersucht:

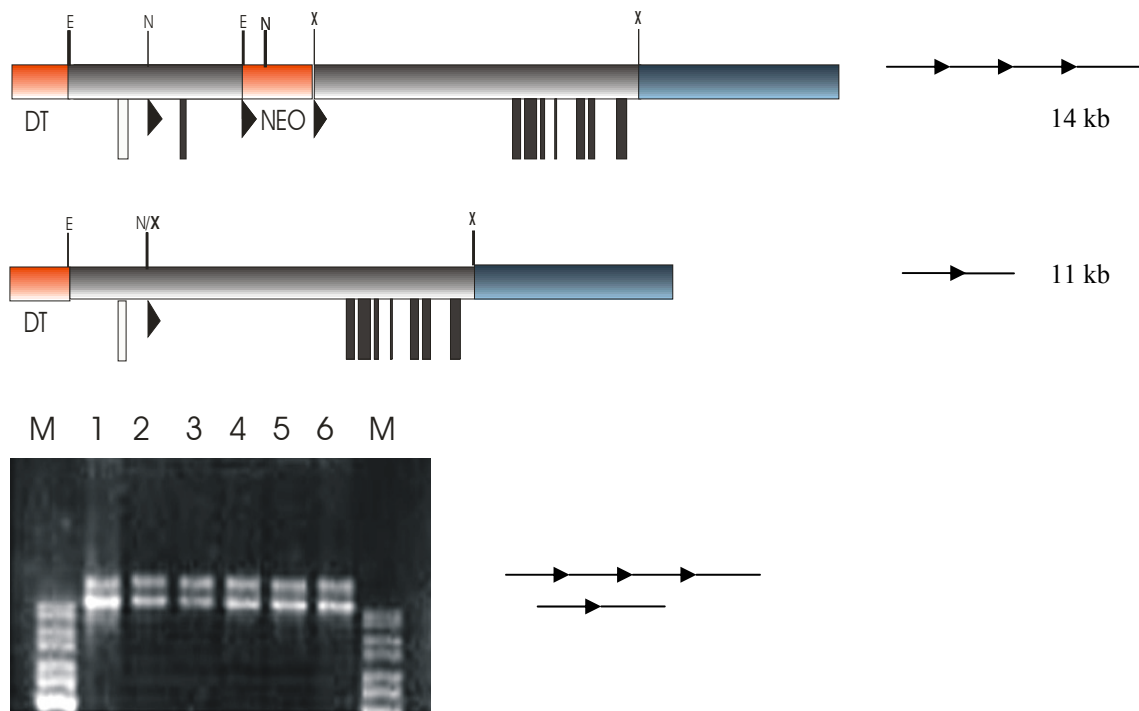


Abbildung 6: Überprüfung der loxP-Stellen des Targeting-Vektors. Im oberen Teil der Abbildung ist der Targeting-Vektor vor und nach Cre-Expression in *E.colis* schematisch gezeigt. Die Selektionskassetten sind in der Abbildung mit Neo (*Neomycin*) und DT (*Diphtherie-Toxin A*) gekennzeichnet, getrennt durch den ersten homologen Bereich mit dem nicht kodierenden Exon 1 und dem das Startkodon enthaltenden Exon 2. Anschließend folgt der zweite homologe Bereich mit Exon 3 bis 9 und abschließend das Vektorrückgrat. Die von der Cre-Rekombinase erkannten loxP-Stellen sind als ausgefüllte, schwarze Dreiecke hervorgehoben. Ferner sind die Exons als schwarze Balken gezeigt und das nicht kodierende Exon 1 als offener Balken. Im unteren Teil der Abbildung wurden sechs mit dem Targeting-Plasmid transfizierte *E.coli* Klone unter den Bedingungen einer gleichzeitigen Cre-Expression kultiviert. Die obere Bande zeigt den mit NotI linearisierten Vektor mit einer Größe von 14 kb und die untere Bande einen zwischen den äußeren loxP-Stellen nach temporärer Cre-Expression verkürzten Vektor mit einer Größe von 11 kb. M bedeutet Markerspur mit den Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5 und 3 kb.

Um die Funktionalität der loxP-Sequenzen vor der Elektroporation in ES-Zellen zu testen, habe ich den Targeting-Vektor in Cre-Rekombinase exprimierende *E. coli*-Bakterien transformiert. Die Cre-Expression der *E. coli* wird von einem temperatursensitiven Promoter reguliert, der bei 37 °C aktiv ist. Chemisch kompetente Cre-exprimierende *E. coli* (294-Cre Zellen; Buchholz et al., 1996; Geschenk von Francis Stewart) wurden mit dem Targeting-Plasmid transformiert und

ausplattiert. Sechs ampicillinresistente Klone wurden in LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Anschließend habe ich aus allen sechs Ansätzen die Plasmidfraktion isoliert und mit NotI linearisiert. Hierbei werden Cre-Rekombinase induzierte Deletionen innerhalb des Plasmids beobachtet. Durch unvollständige Deletionen zwischen den beiden äußeren loxP-Stellen, wahrscheinlich bedingt durch eine begrenzte Cre- Rekombinase Aktivität, sind zwei Fragmente entstanden, eines mit 14 kb (obere Bande im Gel) für den ursprünglichen Vektor und eines mit 11 kb (untere Bande im Gel) nach Cre-vermittelter Deletion. Hierbei wurden ausschließlich Deletionen von der ersten bis zur dritten lox-P-Stelle beobachtet und somit deren Funktionalität gezeigt. Ferner wurden alle drei loxP-Stellen sequenziert und als korrekt befunden.

3.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

In der überwiegenden Zahl von stabilen Integrationen in das Genom wird fremde DNA durch heterologe Rekombination eingebracht. Bei der Integration des Targeting-Vektors durch homologe Rekombination hingegen ist der Integrationsort vorgegeben. Homologe Rekombination beobachtet man häufig bei Bakterien, Hefe und Viren, aber bei Säugetieren ist sie ausgesprochen selten. Nach Elektroporation eines linearisierten Targeting- Vektors wird auf die stabile Integration z.B. mittels G418 bei einer eingebrachten Neomycin- Resistenz selektioniert. Bei der homologen Rekombination werden in der Regel fünf Schritte durchlaufen: DNA-Aufspaltung durch zwei Einzelstrangbrüche, der Austausch der Stränge innerhalb des Duplexes ähnlich einer Holliday-Struktur, DNA-Reparatur durch Ligation der homologen Bereiche und die Neuordnung nach Austausch der homologen Bereiche. Hierfür werden größere homologe Sequenzbereiche benötigt. Die Reaktion erfolgte enzymatisch. Um einen korrekten Ablauf der Rekombination zu gewährleisten, verwendete ich DNA-Templates isogenen Ursprungs für die PCR-Amplifikation der homologen Bereiche. Das heißt, es wurde genomische DNA von den später benutzten ES-Zellen (R1) verwendet. Aus Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass nach der Elektroporation des linearisierten Targeting-Vektors und erfolgter homologer Rekombination in ES-Zellen ein getargetes Allel (B) entstand. Die Zellen waren neomycinresistent und wiesen im Southernblot nach EcoRI-Verdauung zwei Banden von einer Größe bei 9,8 für das Wildtyp- und 8,9 kb für das getargete Allel auf. Ferner habe ich für die erste Southernblot-Analyse der positiven, G418-resistenten ES-Zell-Klone die Sonde B zwischen

der zweiten NcoI- und der dritten EcoRI-Schnittstelle und somit außerhalb des 3' homologen Bereich des Targeting-Vektors, der sich bis Exon 9 erstreckt, benutzt. Die Diphtherie-Toxin A (DT)-Kassette geht bei der gewünschten Integration des Targeting-Vektors im *Mbd*-Locus verloren.

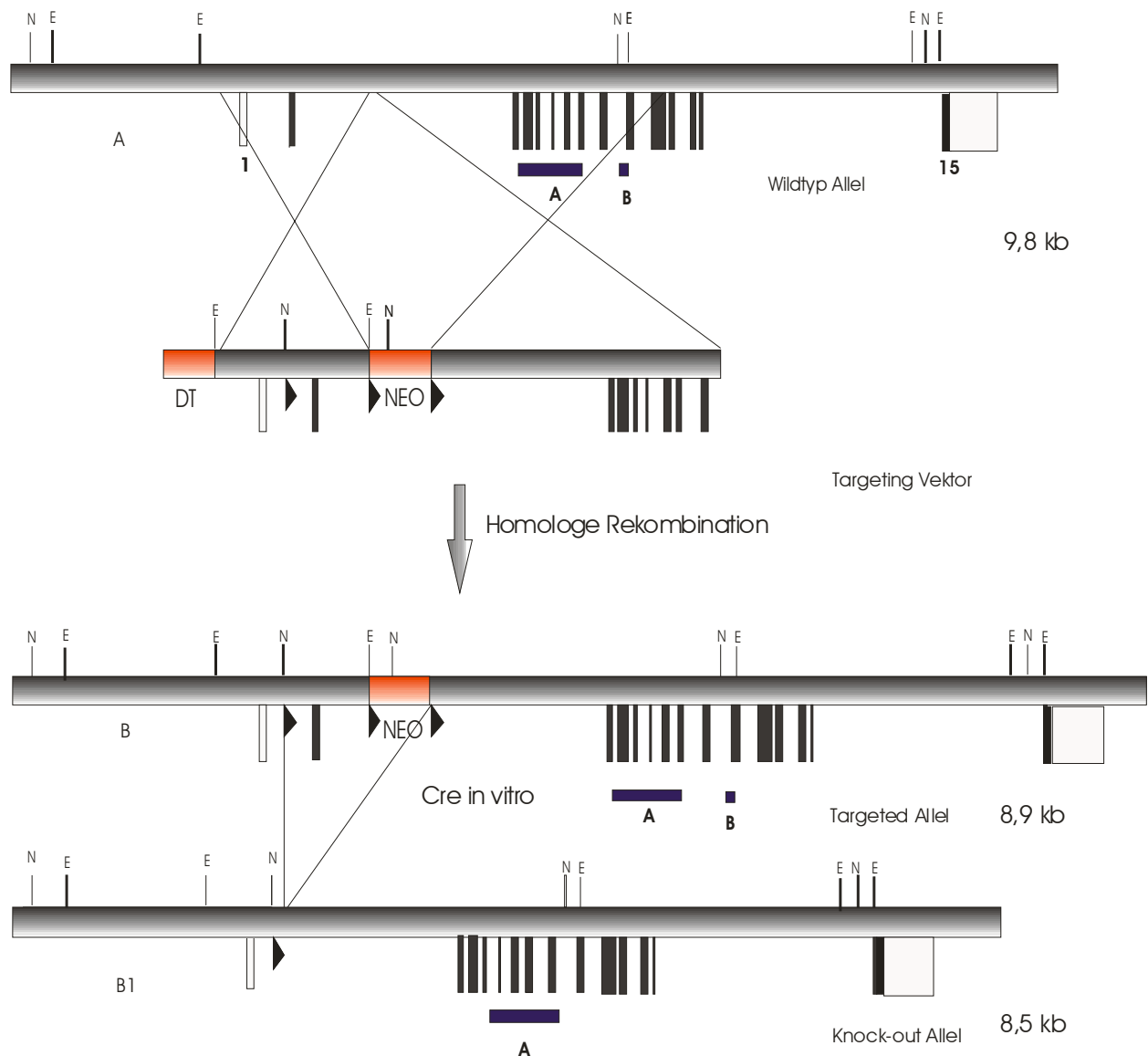


Abbildung 7: MBD1-defiziente murine ES-Zellen mit getargeten *Mbd1*-Allel und MBD-defizienten Allel. In der obersten Zeile ist das Wildtyp-Allel des *Mbd1*-Gens mit seinen 15 Exons (senkrechte Balken) dargestellt. Das erste Exon ist nicht kodierend (offener Balken). In den MBD1-defizienten Mäusen soll das zweite Exon, welches das erste ATG und somit den Translationsstart enthält, deletiert werden. Das nächste ATG befindet sich im dritten Exon in einem anderen Leserahmen, ihm folgt unmittelbar ein Stopcodon. Es kann also nach Deletion des zweiten Exons kein funktionelles *Mbd1*-Protein gebildet werden. Der Targeting-Vektor in

der zweiten Zeile enthält das Gen für *Diphtherie-Toxin A* (DT), 2.2 kb genomische Sequenz (Anfangsteil des *Mbd1*-Gens und 0.5 kb 5'-Bereich flankierende Sequenz), das *Neomycin*-Resistenzgen (NEO) und 5.1 kb genomische Sequenz aus der zentralen Region des *Mbd1*-Gens. Der Vektor enthält ferner drei loxP-Stellen für die Deletion durch Cre-Rekombinase (schwarze Dreiecke); zwei flankieren das *Neomycin*-Gen, eine weitere befindet sich im ersten Intron. Das *Diphtherie-Toxin A*-Gen wird durch homologe Rekombination entfernt und dient somit als negativer Selektionsmarker. Das Neomycin-Resistenzgen hingegen dient als positiver Selektionsmarker; nach Integration des Targeting-Vektors in das Genom der ES-Zellen sind diese G418-resistent. Der linearisierte Targeting-Vektor wurde in ES-Zellen (R1) elektroporiert. Durch homologe Rekombination wurden G418-resistente Zellklone mit einem Targeted-Allel (dritte Zeile) erhalten. Nach der späteren Transfektion eines Plasmides mit dem Cre-Rekombinase-Gen entstanden G418-sensitive ES-Zell-Klone mit *Mbd1*-defizienten-Allel (vierte Zeile), in dem das zweite Exon deletiert wurde. Die horizontalen Balken markieren die Hybridisierungsproben A und B. Restriktionsenzyme: E, EcoRI; N, NcoI.

3.2.1 Detektion homologer und Cre-vermittelter Rekombinationen

Bei der Mehrzahl der ES-Zell-Klone, die nach Elektroporation mit dem Targeting-Vektor eine sieben-tägige Selektionsphase auf die Neomycinresistenz überlebt haben, war mit dem stabilen Einbau des *Neomycin*-Resistenzgens im Genom zu rechnen. Zu unterscheiden sind hier die zufällige Integration von Teilen des Targeting-Vektors zu der gewünschten homologen Rekombination, bei der eines der beiden Allele spezifisch durch das elektroporierte Konstrukt ersetzt wird. Bei der zufälligen Integration wird die DT-Kassette *Diphtherie-Toxin A* exprimieren, was für die ES-Zellen zum Tode führt. Weiterhin ist zu erwarten, dass viele Klone neomycinresistent sind, bei denen der Targeting-Vektor oder Teile desselben mit der Neo-Kassette an beliebiger Stelle im Genom integriert sind. Um eine homologe Rekombination zuverlässig detektieren zu können, wurden Southern Blots durchgeführt. Ich habe vorher mittels PCR die Anzahl der fast 700 gepickten, potentiell positiven ES-Zell-Klone eingeschränkt. Mit Hilfe der PCR-Reaktion in der Abbildung 8A wurden sechs positive ES-Zell-Klone analysiert, bei denen eine homologe Rekombination im *Mbd1*-Gen stattgefunden hat. Hierfür wurden in der Zellkultur sieben 96 Well-Platten mit ES-Zell-Klonen nach einer sieben-tägigen G418-Selektion bei 250-300 µg/ml kultiviert. Anschließend wurden die Klone in 96 Well-Platten propagiert und eingefroren. Für die DNA-Gewinnung habe ich die 96 Well-Platten konfluent wachsen lassen und die genomische DNA präpariert. Die erhaltene genomische DNA habe ich für die unten aufgeführte PCR-Reaktion und für die Southernblot-Analyse verwendet. Für die Detektion der potentiell positiven, G418-resistenten ES-Zell-Klone mittels PCR habe ich zunächst eine Positivkontrolle gestaltet. Hierzu habe ich ein Plasmid kloniert, das die erste loxP-Sequenz

innerhalb den sich über 2,7 kb erstreckenden 5' homologen Bereichs analog zum Targeting-Vektor enthält, und zusätzlich einen im Bezug zum Targeting-Vektor um 100 bp verlängerten 5' Bereich, der mit der zweiten endogenen EcoRI-Schnittstelle beginnt, enthält (Abbildung 7A). Dieses Plasmid wurde mit ES-Wildtyp-DNA verdünnt und als Kontrolle eingesetzt (Spur K; Abbildung 8A). In Abbildung 8A ist ein positiver Klon mit einer PCR-Produktgröße von 1,73 kb gezeigt. Insgesamt habe ich sechs positive ES-Zell-Klone mittels der PCR-Analyse identifizieren können. Um die Integration des Targeting Vektors in den *Mbd1*-Locus zu bestätigen und eine zufällige Integration auszuschließen habe ich bei der Southernblot-Analyse die dritte EcoRI-Schnittstelle und die Sonde B außerhalb der Sequenz des Targeting-Vektors verwendet. Nach homologer Rekombination des Targeting-Vektors in das *Mbd1*-Gen identifizierte ich nach einem Verdau mit EcoRI zwei Banden bei 9,8 kb für das Wildtyp-Allel und eine Bande von 8,9 kb für das getargete Allel (Spuren 2, 3, 4 und 5). Eine Integration des Targeting-Vektors in beide Allele wurde nicht beobachtet.

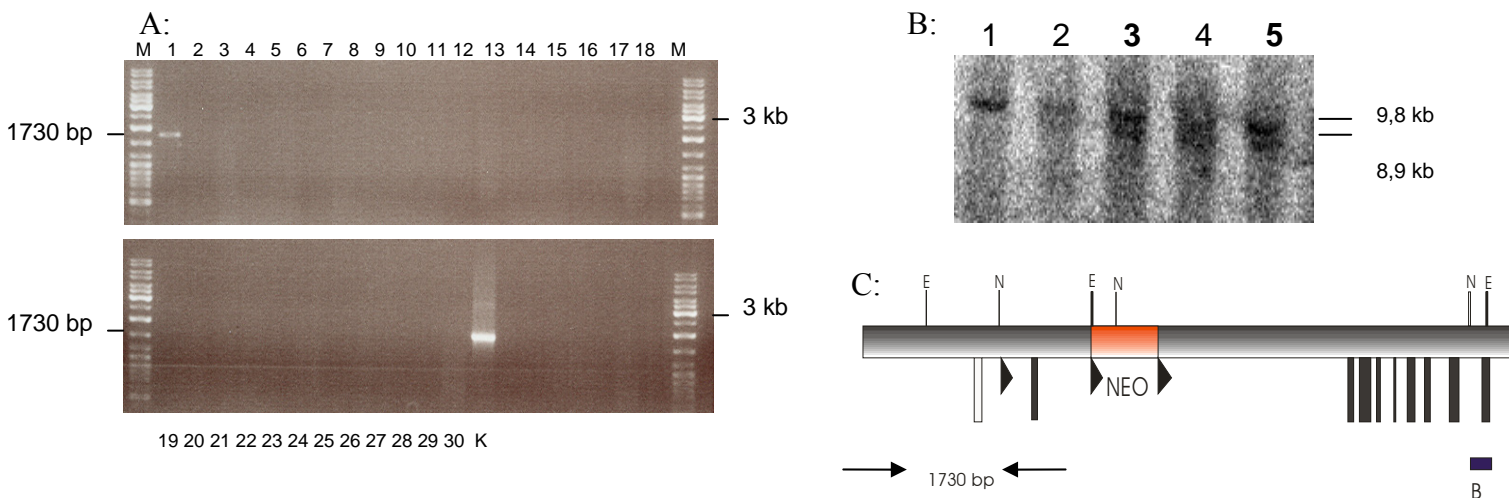


Abbildung 8: Screening der ES-Zellen auf homologe Rekombination durch PCR- und Southernblot-Analysen. Genomische DNA aus etwa 700 neomycinresistenten ES-Zell-Klonen wurde in einer PCR-Reaktion eingesetzt, bei welcher der Vorwärtsprimer 5' der theoretischen Integrationsstelle des Targeting-Vektors und der Rückwärtsprimer in der ersten lox-P-Stelle des getargeten Allels binden (Pfeilspitzen in Teil C). Nach erfolgter homologer Rekombination wird somit eine Fragmentgröße von 1730 bp in der PCR-Reaktion erhalten. In Teil A sind exemplarisch 30 PCR-Reaktionen gelelektrophoretisch analysiert. Nur bei einem Klon (Spur 1) ist die diagnostische Bande von 1730 bp sichtbar. Diese Bande erscheint ebenfalls, wenn ein Kontrollplasmid (siehe Text) in der PCR-Reaktion eingesetzt wird (Spur K). Für den Southernblot im Teil B der Abbildung habe ich die DNA aus 5 ES-Zell-Klonen, die ich mittels der vorher beschriebenen PCR-Reaktion als positiv identifiziert habe, eingesetzt. Nachdem ich die genomische DNA mit EcoRI verdaut habe, gelelektrophoretisch getrennt und geblottet habe, fand eine Hybridisierung mit Sonde B statt. Sonde B bindet an einen Bereich 3' vom

Integrationsort des Targeting-Vektors. Die beiden Klone Nr.3 (IVF7) und Nr.5 (VF10) mit den Fragmentgrößen von 9,8 kb für das Wildtyp-Allel und 8,9 kb für das getargete-Allel wurden anschließend erneut in Zellkultur genommen und für die Blastozysteninjektion kultiviert.

Insgesamt waren die Klone Nr. 2, 3, 4 und 5 positiv in der Southernblot-Analyse. Nr. 3 (IVF7) und Nr. 5 (VF10) der Southernblot-Analyse wurden dann erneut in Kultur genommen, expandiert und in Blastozysten injiziert, um letztere in pseudoschwangere Weibchen zu implantieren. Hieraus entwickelten sich chimäre Nachkommen.

3.2.2 Erzeugung der konditional MBD1-defizienten Mauslinien

Für die Generierung der beiden konditional MBD1-defizienten Mauslinien, MBD1-VF10 und MBD1-IVF7, wurden zwei ES-Zell-Klone mit getargetem Allel in insgesamt 26 Blastozysten injiziert und diese implantiert. Folgende Nachkommen wurden nach der Implantation erhalten:

| | Chimäre Männchen | Chimäre Weibchen |
|-----------|------------------------------|------------------|
| MBD1-IVF7 | 4x100%, 1x80%, 1x0% | 2x100%, 1x90% |
| MBD1-VF10 | 1x90%, 1x80%, 1x50%, 2x0% | 1x60%, 1x40% |

Tabelle 4 : Fellfarbenanalyse der chimären konditional MBD1-defizienten Mäuse. ES-Zellen (R1; Nagy, 1993) stammen von Mäusen mit einer hellen Fellfarbe. Nach Implantation dieser Zellen in Blastozysten von schwarzen C57BL/6-Mäusen entstehen Nachkommen mit mosaikartigem Farbmuster und unterschiedlicher Ausdehnung der hellen Fellfarbe. Somit kann auf den Anteil der manipulierten ES-Zellen geschlossen werden, die in den Nachkommen ausdifferenziert sind. Mit den Prozentzahlen ist der ungefähre Anteil des hellen Farbmusters aufgeführt.

Um die heterozygote F1-Generation zu erzeugen habe ich von der MBD1-IVF7 Linie zwei 100% chimäre und ein 80% chimäres Männchen und von der MBD1-VF10 Linie ein 90% und ein 80% chimäres Männchen mit je zwei Wildtyp-C57BL/6-Weibchen verpaart. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Fellmusterung durch die genetisch veränderten ES-Zellen. Da die manipulierten ES-Zellen keimbahngängig waren, konnte ich heterozygote Mäuse identifizieren (siehe unten). Diese wurden dann untereinander verpaart, um homozygote Tiere zu erhalten. Um die Genotypisierung der Tiere durchzuführen wurde bei den ersten heterozygoten Tieren Schwanzbiopsien genommen, hieraus die genomische DNA isoliert und parallel mittels Southernblot- und PCR-Analyse genotypisiert (Abbildung 9B). Heterozygote Tiere zeigen im

Southernblot eine Doppelbande nach einem EcoRI-Verdau bei 9,8 und 8,9 kb, analog zu den in ES-Zellen analysierten Fragmentgrößen.

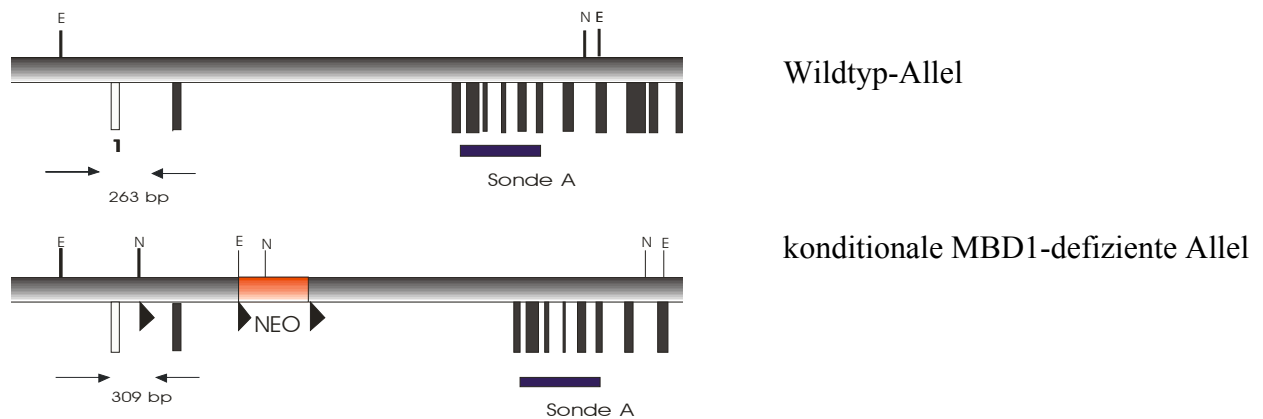


Abbildung 9A: Schema der Genotypisierung der konditional MBD1-defizienten Mäuse mit getargetem Allel. Die Spitzen der Pfeile symbolisieren die Primer, die für die Genotypisierung mittels PCR benutzt werden. Der Vorwärtsprimer bindet bei dem Wildtyp-Allel (oben) und getargetem Allel (unten) vor Exon 1, der Rückwärtsprimer im 3`Bereich der loxP-Stelle. Die unterschiedlichen PCR-Produktgrößen kommen durch die im getargeten Allel integrierte loxP-Stelle zustande. Somit werden PCR-Amplifikate von 263 bp für das Wildtyp-Allel und 309 bp für das getargete MBD1-Allel erhalten. Für die Southernblot-Analyse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien mit EcoRI (E) geschnitten, gelelektrophoretisch getrennt und mit Sonde A (horizontaler Balken) hybridisiert.

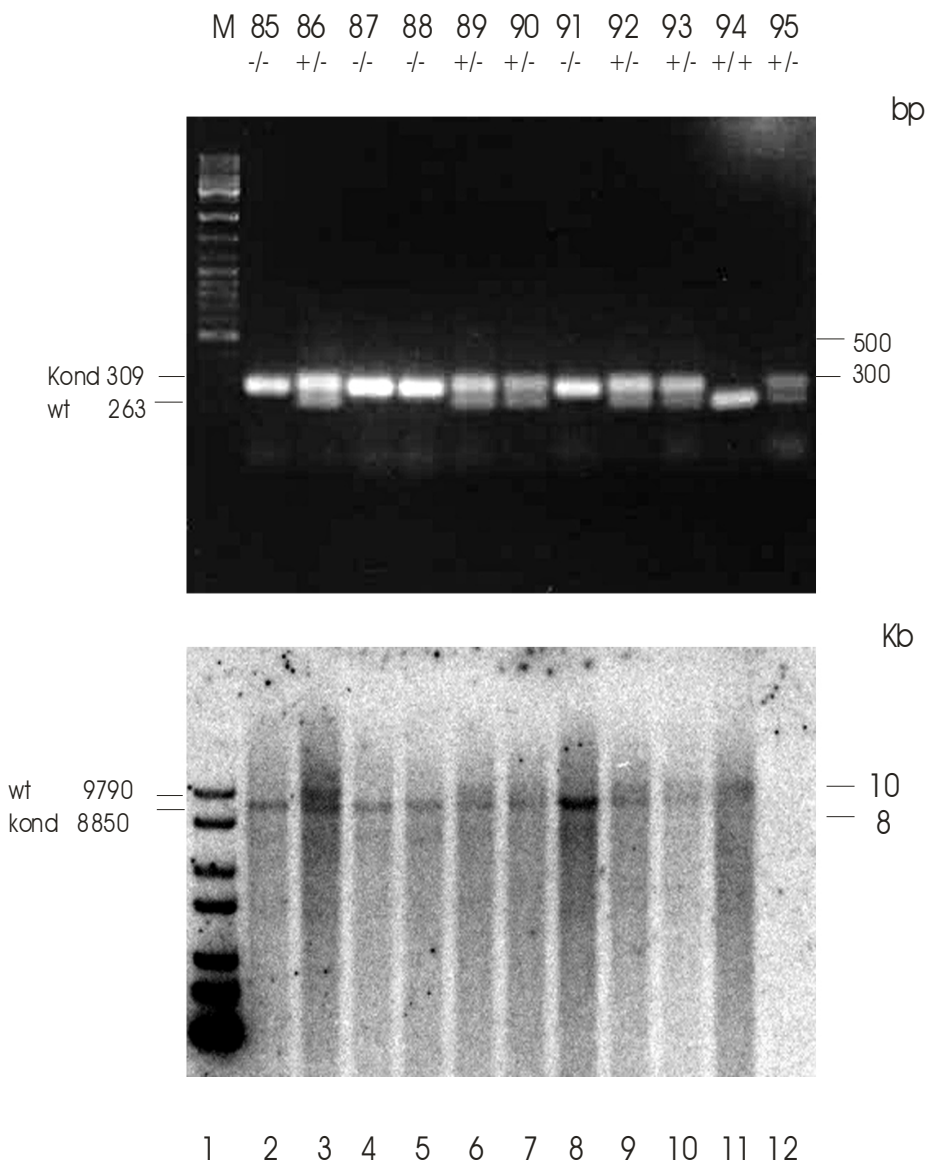


Abbildung 9 B: Genotypisierung der konditional MBD1-defizienten Mauslinie durch PCR- und Southernblot-Analyse. Exemplarisch wurde von 11 Mäusen (Nummer 85-95) aus Schwanzbiopsien DNA präpariert. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion (oberer Bildteil) mit zwei Primern (schwarze Pfeile), die an das Wildtyp-Allel bzw. das konditional MBD-defiziente-Allel binden, durchgeführt. Das Wildtyp-Allel ergibt ein Produkt von 263 bp, das getargete Allel ein 309 bp großes Produkt. In einer Southernblot-Analyse (unterer Bildteil) wurde DNA mit EcoRI verdaut, elektrophoretisch getrennt, geblottet und mit Probe A hybridisiert. In der Autoradiographie wird das Wildtyp-Allel durch eine Bande bei 9790 bp, das getargete Allel bzw. die getargeten Allele durch eine 8850 bp-Bande charakterisiert. In dem rechten Teil der Abbildung sind die entscheidenden Markerspuren von 500 bp in dem Agarosegel und die beiden obersten Banden der Markerspuren von 10 kb und 8 kb im Southernblot gut sichtbar.

| Genotyp MBD1 | Gesamt | Weibchen | Männchen |
|---------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Wt | 109 | 56 | 53 |
| +/- | 92 | 43 | 49 |
| -/- | 36 | 19 | 17 |
| Gesamt | 237 | 118 | 119 |

Tabelle 5: Anzahl der erhalten Genotypen der konditionalen Mauslinie MBD1-VF10 mit getargetem Allel. In der Tabelle sind die 237 genotypisierten Mäuse nach Wildtyp (Wt), heterozygot (+/-) und homozygoten Mäusen (-/-) geschlechtsspezifisch aufgelistet. Es wurden für die Verpaarungen Elterntiere mit unterschiedlichen Genotypen verpaart und 118 Weibchen zu 119 Männchen erhalten.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte vorwiegend mittels PCR-Analyse (Abbildung 9B). Wildtyp-Mäuse waren durch eine singuläre Bande bei 263 bp charakterisiert, heterozygote Mäuse durch zwei Banden bei 263 bp und 309 bp, während homozygote Mäuse mit getargetem *Mbd1*-Gen eine Bande bei 309 bp zeigten (oberer Bildteil). Die unterschiedliche PCR-Produktgröße kommt durch die nach homologer Rekombination integrierte loxP-Stelle im getargeten Allel zustande (Abbildung 9A). Die Genotypen habe ich exemplarisch in Southernblot-Analysen bestätigt. Für Wildtyp-Mäuse trat eine Bande bei 9790 bp (Spur 11), für heterozygote Tiere zwei Banden bei 9790 und 8850 bp (Spuren 3, 6, 7, 9 und 10) und für homozygote Mäuse eine Bande bei 8850 bp (Spuren 2, 4, 5 und 8) auf. Somit ist eine funktionelle Genotypisierung etabliert. Insgesamt habe ich etwa dreihundert Tiere der konditional MBD1-defizienten Linie MBD1-VF10 genotypisiert und die erwarteten Genotypen im Hinblick der Mendelschen Gesetze bestätigt: Zum Beispiel wurden bei der Verpaarung von homozygoten mit Wildtyp-Mäusen nur heterozygote Genotypen identifiziert. Die heterozygoten Mäuse wurden weiter untereinander zu Linien mit mehreren hundert Tieren verpaart. Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, dass mindestens 237 Tiere der konditionalen Linie MBD1-VF10 genotypisiert wurden. Es wurden Elterntiere mit unterschiedlichen Genotypen verpaart. Hierbei ist eine fast identische Anzahl von Weibchen und Männchen verschiedener Genotypen erhalten worden (Wildtyp: 56 Weibchen zu 53 Männchen, heterozygot: 43 Weibchen zu 49 Männchen und homozygot: 19 Weibchen zu 17 Männchen). Dieses Ergebnisse kommen der Erwartung von 50% Männchen zu 50% Weibchen sehr nahe. Bei der Linie MBD1-VF10 wird ein Embryotransfer durchgeführt. Die Linie wurde auf einen C57BL6-Hintergrund zurückgekreuzt.

3.2.3 *Mbd1*-Expression der konditional MBD1-defizienten Mäuse

Für die Analyse der Expression von *Mbd1* in der konditional MBD1-defizienten Mauslinie MBD1-VF10 mit getargeten Allelen habe ich von einer Wildtyp-Maus und einer homozygote konditional MBD1-defizienten Maus mit getargeten MBD1-Allelen (-/-) Hirne entnommen. Nach der RNA-Isolierung wurde die RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Template für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Mit Hilfe MBD1-spezifischer Primer (siehe Material und Methoden) wurde ein Amplifikat bei 308 bp mit unterschiedlicher Intensität erhalten. Die Primer binden innerhalb von Exon 2 und 4, daher wurden die 4 bekannten Spleißisoformen detektiert, wodurch DNA-Verunreinigungen das Ergebnis nicht verfälschen konnten.

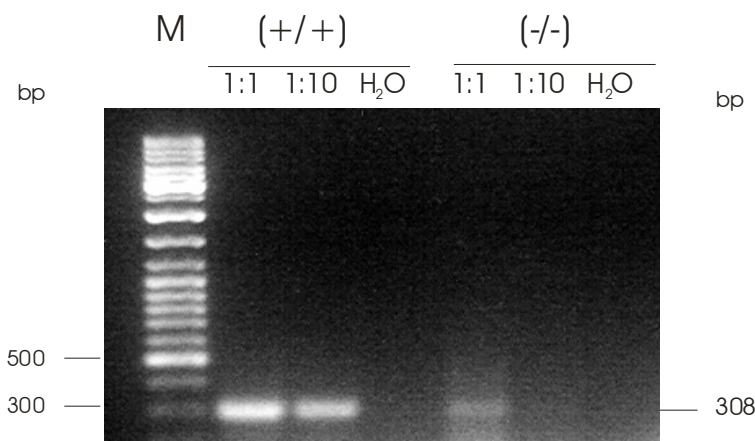


Abbildung 10: Verringerte Expression des *Mbd1*-Gens im Gehirn von konditional MBD1-defizienten Mäusen mit getargeten Allelen. Aus dem Gehirn von zwei Mäusen mit bekanntem Genotyp (Wildtyp +/+ und homozygot konditional MBD1-defizient -/-) wurde Gesamt-RNA isoliert und die Expression des *Mbd1*-Gens durch RT-PCR analysiert. Positive Expression wird durch ein PCR-Produkt mit 308 bp angezeigt. Das Template für die PCR-Reaktionen wurde 1:1 und in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Ferner wurde eine Wasserkontrolle ohne Templat durchgeführt. Spur M enthält Marker-DNA.

Im Vergleich der Konzentration der *Mbd1*-cDNA von einer Wildtyp-Maus zu einer homozygoten Maus ist eine stark verringerte Expression des *Mbd1*-Gens in den homozygot konditionale MBD1-defizienten Mäusen festzustellen (Abbildung 10). Bei beiden PCR-Reaktionen mit cDNA als Template wurde diese in zwei Verdünnungen eingesetzt. Für die cDNA Synthese wurden sowohl Oligo-dT als auch random hexamer Primer eingesetzt, um optimale Umschreibereaktionen zu erreichen. Wenn ich die cDNA 1:1 verdünnt einsetzte, war die diagnostische Bande von 308 bp bei den homozygoten Mäusen nur schwach zu sehen. Bei

einer 1:10 Verdünnung habe ich bei den homozygoten Tieren kein Signal mehr erhalten. Die Wasserkontrollen waren ebenfalls negativ. Somit kann von einer eventuell hypomorphen Expression in den konditionalen Mäusen gesprochen werden. Nach der Kryokonservierung dieser Linie wird die quantitative *Mbd1*-Expression der Mäuse geklärt.

Um eine eventuell verringerte Proteinkonzentration von Mbd1 in den konditionalen Mäusen relativ zu den Wildtyp-Mäusen zu detektieren, wurde ein Westernblot durchgeführt (Abbildung 11). Lebergewebe der Mäuse wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren, zerkleinert und in einem Homogenisierungspuffer mittels eines Glas-Glas-Potters homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet (der erhaltende Überstand bildet die Überstandsfraktion Ü) in einem 500 mM Extraktionspuffer aufgenommen und mittels eines Glas-Glas-Potters erneut extrahiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wird die Kernextraktfraktion (Ex) erhalten. Die Proteinproben wurden gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran elektrogeblottet, mittels Magermilchpulver blockiert und nach Zugabe des ersten und zweiten Antikörpers und Zugabe von ECL-Lösung auf einem Röntgenfilm entwickelt. Als Kontrolle für die gleichmäßig effiziente Extraktion wurden die Überstands- und Extraktionsfraktionen mit einem *Mecp2*-spezifischen Antikörper inkubiert. Mbd1 hat ein apparentes Molekulargewicht von 66,6 kDa und wurde erwartungsgemäß nur in der Kernextraktspuren gefunden. Die MBD1-Bande in der Extraktspur der Wildtypmaus ist etwa ähnlich stark derjenigen in der Extraktspur der homozygot konditional MBD1-defizienten Maus. Überstands- und Extraktfraktionen wurden weiterhin mit *Mecp2*-Antikörpern inkubiert, um die effiziente Fraktionierung der Methyl-CpG-bindenden Proteine zu kontrollieren.

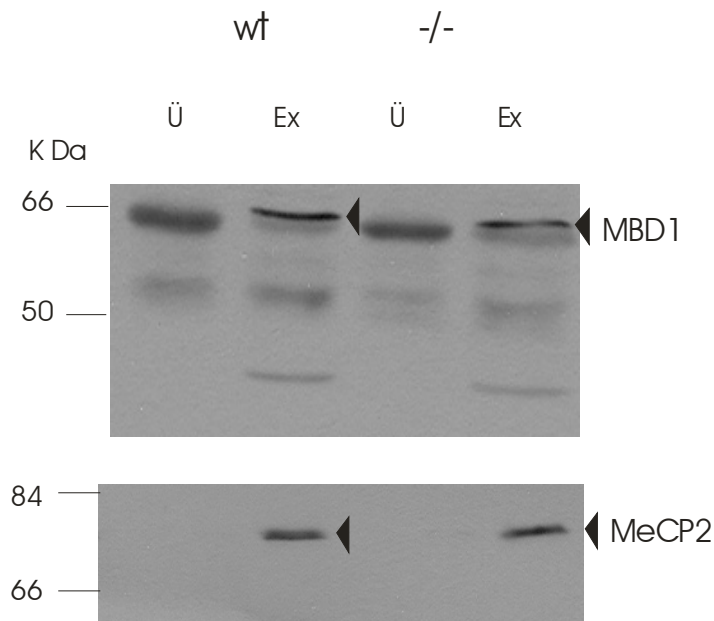


Abbildung 11: Expression von Mbd1-Protein in den konditional MBD1-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Leberproben von zwei Mäusen (Wildtyp und konditional MBD1-defizienten Maus -/-) wurden homogenisiert und durch eine erste Zentrifugation in eine rohe Kernfraktion und eine Überstandsfraktion (Ü) getrennt. Nach Extraktion der Kerne mit einem 500 mM NaCl-Puffer und nach einer zweiten Zentrifugation wurde eine Extraktfraktion (Ex) gewonnen. Überstands- und Extraktfraktion wurden einer Westernblot-Analyse mit Mbd1-(IMG-306, Imgenex) und Mecp2-(Upstate 07-013) Antikörpern unterworfen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Genotypisierung der konditional MBD1-defizienten Linie mit getargetem Allel sowohl mittels PCR-Analyse als auch durch Southernblot-Analyse erfolgreich durchgeführt und identische Genotypen bei beiden Analysen erhalten wurden. Somit wurde die schnellere und kostengünstigere PCR-Reaktion durch die genauere Southernblot-Analyse untermauert. Ferner wurden identische Mbd1-Proteinkonzentrationen bei Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen im Westernblot analysiert. Somit kann geschlossen werden, dass Mbd1 in den konditional MBD1-defizienten Tieren in nahezu unveränderter Konzentration vorhanden ist. Merkwürdig ist die Beobachtung, dass in den homozygoten konditional MBD1-defizienten Mäusen eine verringerte Mbd1-RNA-Konzentration detektiert wurde. Dieses Ergebnis muss daher noch bestätigt werden. Diese verminderte Expression scheint einen geringen Einfluss auf die Menge an translatiertem Mbd1 zu haben. Ferner kann von der Funktionalität des Cre-lox-Systems bei den Mäusen ausgegangen werden, da eine Cre-Expression in den ES-Zellen erfolgreich durchgeführt wurde (siehe unten).

3.2.4 Genomische Situation der ES-Zellen nach Cre-Expression

Um die Neomycin-Kassette zu entfernen, habe ich homolog rekombinierte murine ES-Zellklone der Zelllinien MBD1-VF10 und IVF7 transient mit einem Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid durch Elektroporation transfiziert (Abbildung 7 und 12A). Durch die Anwesenheit von drei loxP-Sequenzen ergeben sich mehrere Deletionsmöglichkeiten in dem *Mbd1*-Gen. Die Identifizierung dieser verschiedenen Typen nach *in vitro*-Cre-vermittelter Rekombinationen erfolgt mittels Southernblot-Analyse und durch G418-Selektion. ES-Zellen mit getargetem Allel zeigen zwei Fragmentgrößen im Southernblot bei 9,8 und 8,9 kb. Weiterhin sind sie Neomycin-resistent. Nach Cre-Expression verkürzt sich das Allel mit integriertem Targeting-Vektor, je nachdem, welche beiden der drei äquivalenten loxP-Stellen von der Cre-Rekombinase genutzt werden (Abbildung 12). Somit ist das MBD1-defiziente Allel durch eine Southernblot-Bande bei 8,5 kb charakterisiert. Die Zellen sterben bei G418-Selektion. Der Southernblot ist in Abbildung 12 B gezeigt. Nach der transienten Transfektion des Cre-exprimierenden Plasmids habe ich zweimal je 200 Stammzellklone vereinzelt, gesplittet und sie bezüglich ihrer neomycinresistenz untersucht. Da die deletierten, positiven Klone keine Resistenz zeigen, wurden bei dem elektroporierten MBD1-IVF7-Zellen 27 Klone und bei dem MBD1-VF1-Zellen 42 Klone näher analysiert (Abbildung 12).

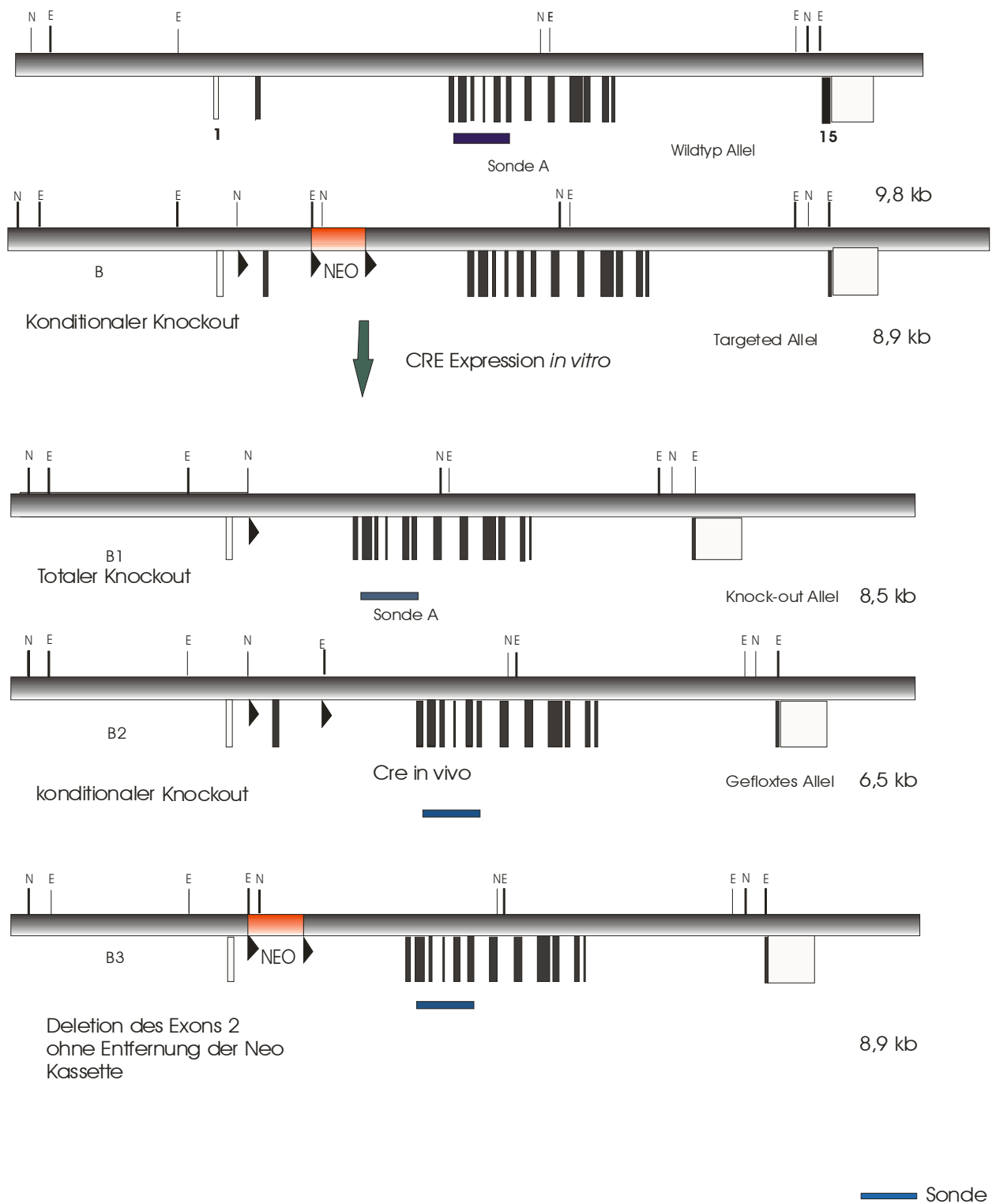


Abbildung 12 A: Mögliche Deletionen im *Mbd1*-Gen nach Cre-Expression

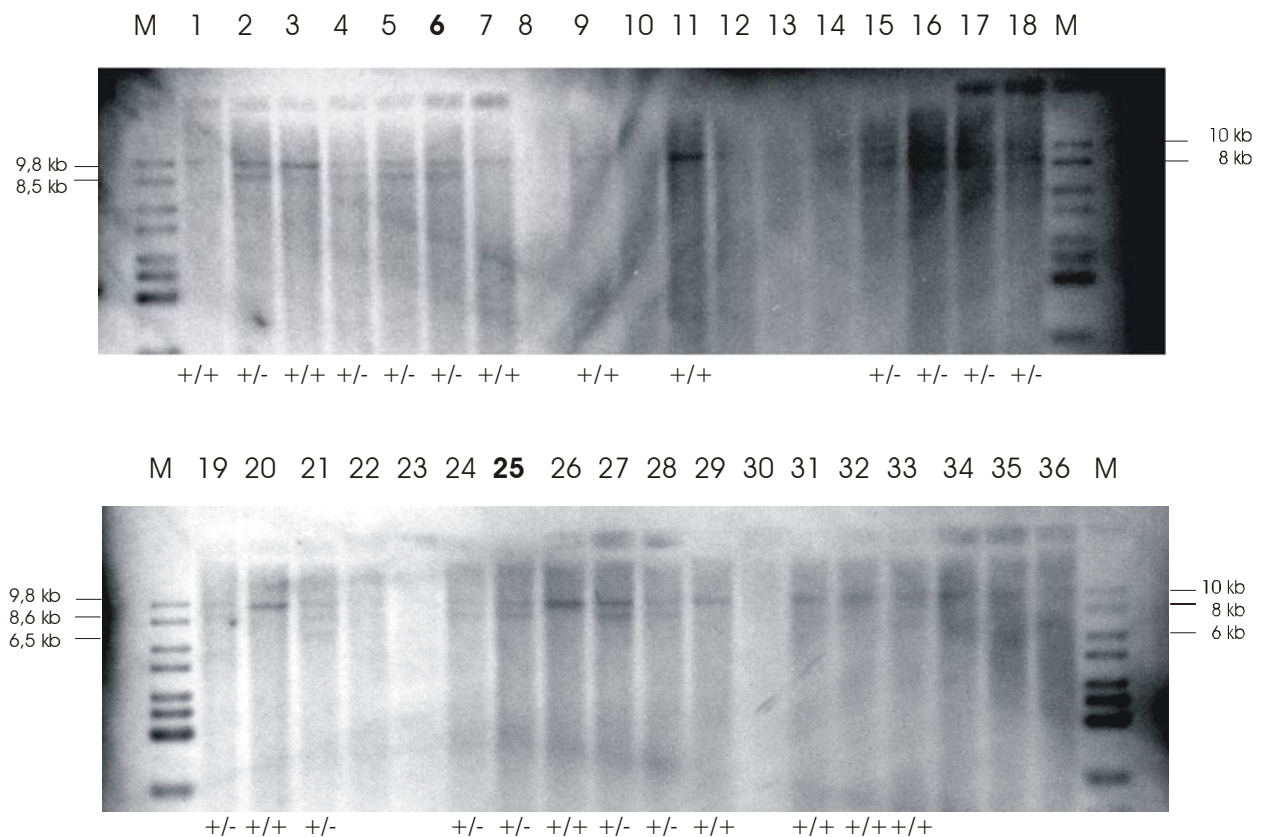


Abbildung 12 B: Southernblot der ES-Zellen nach Cre-Expression.

Im Teil A der Abbildung 12 sind schematisch die möglichen genomische Deletionen des *Mbd1*-Locus nach Cre-Expression aufgeführt. Es können drei mögliche Deletionen erhalten werden, die sich mittels Southernblot diskriminieren lassen. Ferner zeichnen sich zwei Rekombinationstypen innerhalb der ES-Zellen durch eine Neomycinsensibilität aus (B1 und B2). Dargestellt ist nur ein Allel der ES-Zellen, Schnittstellen sind mit N für NcoI und E für EcoRI gekennzeichnet. Ferner ist am rechten Rand die unterschiedliche Bandengröße nach einem EcoRI-Verdau und der Hybridisierung mit der internen Sonde A aufgeführt. Im Teil B ist ein Southernblot von genomischer DNA aus 36 G418-sensitiven ES-Zellen nach Cre-Expression gezeigt. Die genomische DNA habe ich mit EcoRI verdaut, geblotet und mit Sonde A hybridisiert. Wildtyp-ES-Zellen (+/+) sind durch eine einzelne Bande bei 9,8 kb charakterisiert, heterozygote (+/-) ES-Zellen mit MBD1-defizientem Allel durch zwei Banden bei 9,8 und 8,5 kb. Die ES-Zellen in Spur Nr. 6 lieferten die Mauslinie MBD1-VF10creA7 und diejenige in Spur Nr. 25 die Linie MBD1-VF10creF12. M steht für Marker mit den Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3 und 2,5 kb.

Bei der transienten Transfektion von murinen ES-Zellen mit einem Cre-exprimierenden Plasmid können die drei besprochenen Deletionen erhalten werden (Abbildung 12A). Als erste Möglichkeit entsteht das von mir erhaltende MBD1-defiziente Allel (Abbildung 12 B; untere Bande) nach *in vitro* Cre-Expression in den Spuren 2, 3, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 25, 27 und

28 mit einer Fragmentgröße von 8,5 kb und ein detektiertes Wildtyp-Allel von 9,8 kb (obere Bande). Als zweite, theoretische Möglichkeit könnte man ein gefloxtes Allel mit einer Fragmentgröße von 6,5 kb im Southernblot erhalten (Abbildung 12 A). ES-Zellen mit gefloxtem Allel habe ich nicht detektiert. Als dritte Möglichkeit kann nach Cre-Expression ein Allel mit deletiertem Translationsstart, deletiertem Exon 2 und nicht deletierter Neo-Kassette entstehen. Hier würde man eine Fragmentgröße im Southernblot von ebenfalls 8,9 kb erwarten, aber die ES-Zellen würden eine G418-Selektion überleben. Ferner würde man bei der Genotypisierung der MBD1-defizienten Mäuse mittels Multiplex-PCR diese Situation feststellen (siehe unten). Eine singuläre Bande bei 9,8 kb kommt durch Wildtyp-ES-Zellen zustande, die eine G418-Selektion überlebt haben.

Zwei Klone, MBD1-VF10-CreA7 (Nr. 6) und MBD1-VF10-CreF12 (Nr. 25) wurden in der Zellkultur expandiert, mit BamHI kontrollverdaut und erneut in einem Southernblot bestätigt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden diese beiden Klone expandiert und in Blastozysten injiziert, um in je zwei pseudoschwangere Weibchen implantiert zu werden. Die erhaltenen chimären Nachkommen wurden mit C57BL6-Weibchen verpaart, um die ersten heterozygoten Tiere (F1-Generation) zu generieren. Hierzu müssen die transgenen Zellen der chimären Tiere keimbahngängig sein, was auch der Fall war. Somit wird die Deletion an die Nachkommen weitergegeben.

3.3 Generierung von MBD1-defizienten Mäusen

Neomycinsensitive ES-Zellen, die ursprünglich aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert wurden, können auch nach genetischer Manipulation in der Zellkultur durch Reinjektion in Blastozysten zu Keimzellen differenzieren. Diese Zellen werden dann in Blastozysten injiziert, die von schwangeren Spendertieren gewonnen werden. Die Blastozysten, die die manipulierten ES-Zellen enthalten, werden dann in pseudoschwangere Weibchen implantiert. Nach der Blastozysteninjektion homolog rekombinanter ES-Zellen in pseudoschwangere, schwarze Mäuse (C57BL6) werden chimäre Nachkommen erhalten. Die hier verwendeten ES-Zellen (R1; Nagy et al., 1993) erzeugen eine hellbraune Fellfarbe, sodass chimäre Nachkommen aufgrund ihrer Fellfarbe identifiziert werden können. Nach der Verpaarung von chimären Mäusen mit Wildtypmäusen wurden bei Keimbahngängigkeit der manipulierten ES-Zellen heterozygote Junge erhalten.

3.3.1 Erzeugung der MBD1-defizienten Mauslinien

Bei beiden Linien MBD1-VF10creA7 und MBD1-VF10creF12 wurden zwei ES-Zell-Klone nach erfolgter homologer Rekombination und *in vitro* Cre-Expression in insgesamt 40 Blastozysten injiziert und diese implantiert (Transgener Service, ZMNH). Folgende Nachkommen wurden erhalten:

| | Chimäre Männchen | Chimäre Weibchen |
|-------------------|------------------|------------------|
| MBD1-VF10 cre F12 | 2x100% | |
| MBD1-VF10 cre A7 | 5x100% | 2x100% |

Tabelle 6 : Fellfarbanalyse der chimären MBD1-defizienten Mäuse. Nach Implantation homolog rekombinanter ES-Zellen in Blastozysten von schwarzen C57BL6-Mäusen entstehen Nachkommen mit verschiedener, mosaikartiger Fellfarbe. Somit kann auf den Anteil der manipulierten ES-Zellen geschlossen werden, die in den Nachkommen ausdifferenziert sind.

Um die heterozygote F1-Generation zu erzeugen habe ich von der Linie MBD1-VF10creF12 zwei 100% chimäre Männchen mit je zwei Wildtyp-Weibchen (C57BL6) verpaart und bei der Linie MBD1-VF10creA7 drei 100% chimäre Männchen mit je zwei Wildtyp-C57BL6-Weibchen gekreuzt. Den erhaltenden Nachkommen (bei Wurfgrößen zwischen 8 und 12 Jungen) wurden Schwanzbiopsien entnommen. Diese wurden mittels Southernblots analysiert. Analog der konditionalen MBD1-defizienten Tieren wurden eine PCR-Reaktion etabliert, deren Ergebnisse exemplarisch durch Southernblot-Analysen bestätigt wurde. Mit Hilfe einer Multiplex-PCR wurde zwischen den drei auftretenden Genotypen diskriminiert (Abbildung 13).

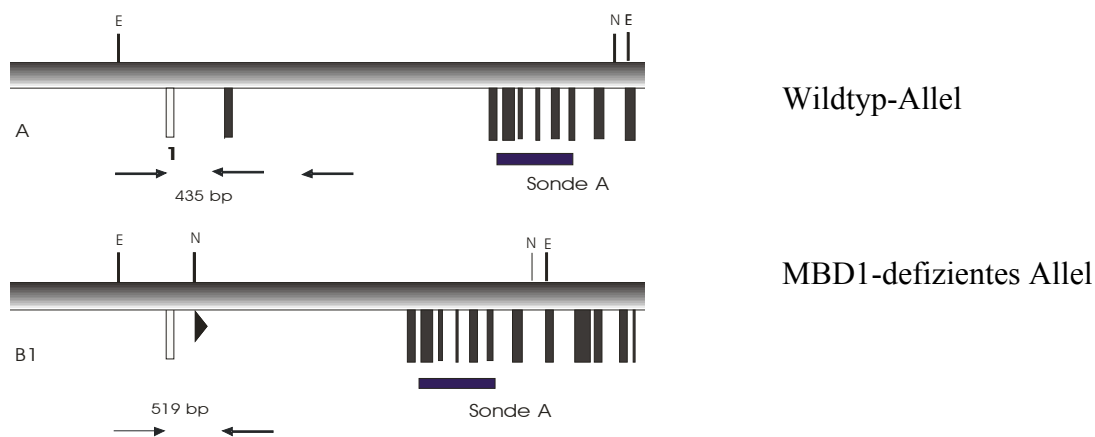


Abbildung 13 A: Genotypisierung der MBD1-defizienten Mauslinie durch Multiplex-PCR und Southernblot-Analyse. Dargestellt ist die Karte der genomische Situation des *Mbd1*-Gens bei Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen. Die Pfeilspitzen zeigen die Primer, die für die Genotypisierung mittels PCR benutzt werden. Der Vorwärtsprimer (Primer 1) bindet bei dem Wildtyp-Allel und MBD1-defizienten Allel vor der nach homologer Rekombination integrierten loxP-Sequenz. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Rückwärtsprimer (Primer 2 und 3) werden PCR-Amplifikate bei 435 bp für das Wildtyp-Allel und 519 bp für das Exon 2-defiziente Allel (nach der Deletion zwischen den äußeren loxP-Stellen) erhalten. Für den Southernblot habe ich genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert, mit EcoRI geschnitten, elektrophoretisch getrennt, geblottet und mit der Sonde A (horizontaler Balken) hybridisiert.

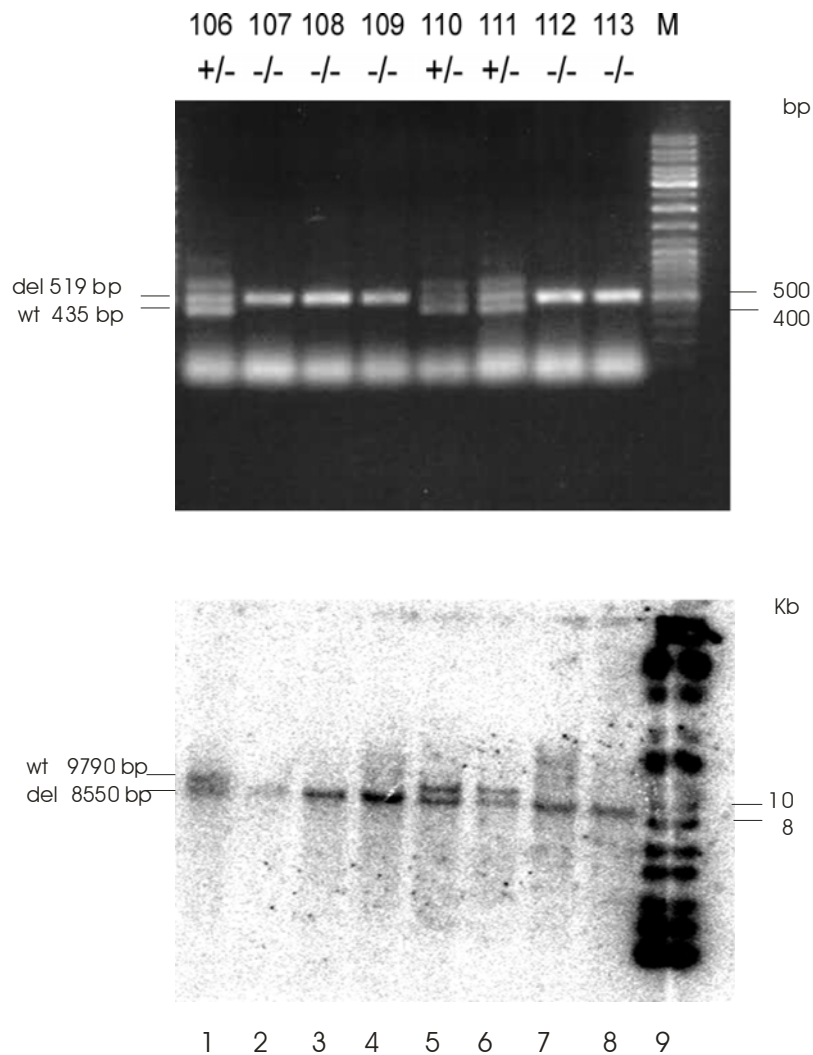


Abbildung 13B: PCR- und Southernblot-Analyse der MBD1-defizienten Mauslinie MBD1-VF10creF12. Exemplarisch habe ich von acht Mäusen (Nr. 106-113) aus Schwanzbiopsien genomische DNA präpariert. Anschließend wurde eine Multiplex-PCR-Reaktion (oberer Bildteil) mit einem Vorwärtsprimer und zwei Rückwärtsprimern durchgeführt. Das Wildtyp-Allel ergibt ein Produkt mit 435 bp, das MBD1-defiziente Allel ein 519 bp großes Produkt. In einer Southernblot-Analyse (unterer Bildteil) wurde Schwanzbiopsien-DNA mit EcoRI verdaut, elektrophoretisch getrennt, geblottet und mit Sonde A hybridisiert. In der Autoradiographie wird das Wildtyp-Allel durch eine Bande bei 9790 bp, das defiziente Allel durch eine 8550 bp Bande charakterisiert. Der resultierende Genotyp ist in der zweiten Zeile gekennzeichnet: +/-, heterozygot; -/-, homozygot. Spur 9 enthält Marker-DNA.

| Genotyp MBD1 | Gesamt | Weibchen | Männchen |
|---------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| wt | 147 | 73 | 74 |
| +/- | 162 | 82 | 80 |
| -/- | 121 | 51 | 70 |
| gesamt | 431 | 207 | 224 |

Tabelle 6: Geringere Anzahl der Geburt von weiblichen MBD1-defizienten Mäusen. Hierbei wurden Zuchtkästen von Eltern mit verschiedenen Genotyp angelegt. Die Anzahl der Verpaarungen waren 18, bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 8,9 Tieren. Aufgeführt sind die drei unterschiedlichen Genotypen nach dem Geschlecht der Mäuse (wt, Wildtyp; +/- heterozygot; -/- homozygot). Die zu erwartende Verteilung von Männchen zu Weibchen liegt bei 1:1. Insgesamt wurden 431 Mäuse genotypisiert.

In Abbildung 13 ist die Genotypisierung von 8 Mäusen der MBD1-defizienten Linie MBD1-VF10creF12 dargestellt. Hierzu habe ich genomische DNA aus den Schwanzbiopsien der Mäuse Nr. 106-113 präpariert und für eine Multiplex-PCR als Templat eingesetzt bzw. für die Southernblot-Analyse mit EcoRI geschnitten, im Gel aufgetrennt, geblottet und hybridisiert. Unter den Mausnummern ist der mit beiden Methoden identifizierte Genotyp gezeigt. In der Multiplex-PCR wurden drei Primer eingesetzt, um ähnliche Fragmentgrößen zu erhalten (als Pfeilspitzen der Pfeile eingezeichnet, Abbildung 13A). Der verwendete Vorwärtsprimer ergab ein PCR-Amplifikat mit einem der beiden Rückwärtsprimer. Der erste Rückwärtsprimer bindet nur am Wildtyp-Allel und der zweite Rückwärtsprimer am MBD1-defizienten Allel als auch in größerer Entfernung am Wildtyp-Allel. Ein PCR-Produkt bei dem Wildtyp-Allel zwischen Primer eins und Primer drei wurde durch entsprechende PCR-Bedingungen mit begrenzter Elongationszeit des Programms vermieden. Durch die PCR-Analyse erhielt ich bei drei Mäusen (Nr. 106, 110 und 111) zwei Amplifikate von einer Größe von 435 bp und 519 bp. Somit konnte ich ihnen einen heterozygoten Genotyp zuordnen. Bei 5 Mäusen (Nr. 107, 108, 109, 112 und 113) erhielt ich eine singuläre Bande bei 519 bp. Somit zeigten sie einen homozygoten, MBD1-defizienten Genotyp. Das unterste, verschwommene Signal kommt durch Primeroligomere zustande.

In der Southernblot-Analyse identifizierte ich zwei Banden bei 9790 bp und 8550 bp bei den Tieren mit heterozygoten Genotyp (Nr. 106, 110 und 111) und eine singuläre Bande bei 8550 bp für die homozygoten MBD1-defizienten Mäuse (Nr. 107, 108, 109, 112 und 113). Mit Hilfe der

Genotypisierung wurden über 431 Nachkommen mit Wildtyp-, heterozygotem- und homozygotem Genotyp erhalten (Tabelle 7).

3.3.2 Fehlende *Mbd1*-Expression der MBD1-defizienten Mauslinie

Zuerst habe ich die als Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäuse genotypisierten Geschwistertiere im Hinblick auf ihre *Mbd1*-Expression untersucht. Es wurden je vier Wildtyp-Mäuse (wt) und vier Mäuse ohne funktionelles *Mbd1*-Gen (-/-) getötet. Nach Entnahme der Hirne wurde die RNA isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend habe ich eine PCR-Reaktion mit *Mbd1*-spezifischen Primern durchgeführt. Bei Wildtyp-Tieren wurde eine starke *Mbd1*-Expression im Hirn gefunden, während in MBD1-defizienten Tieren keine *Mbd1*-mRNA zu detektieren war. Somit zeigen die Wildtypmäuse (+/+) Nr. 52, 55, 94 und 63 eine Bande bei 308 bp, bei den defizienten Mäusen (-/-) mit den Nummern 65, 43, 62 und 90 ist keine *Mbd1*-mRNA vorhanden. Die Primer wurden in Exon 2 und 4 gelegt, um die vier bekannten Isoformen zu detektieren und Verunreinigungen mit genomischer DNA erkennen zu können.

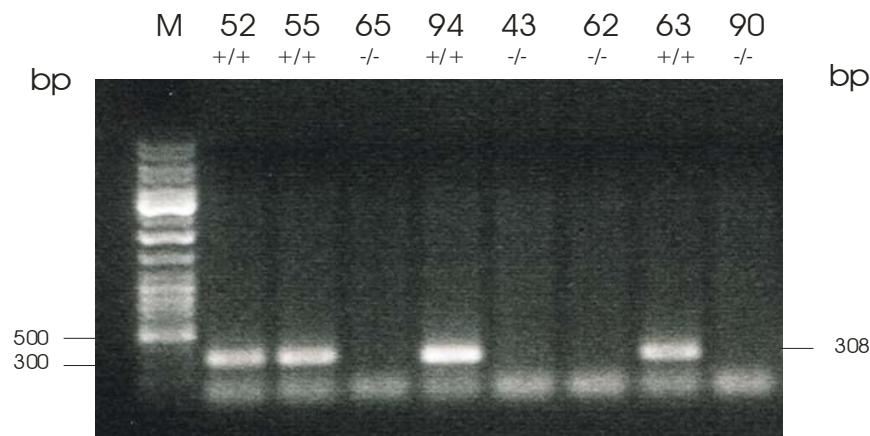


Abbildung 15: RT-PCR Analyse der *Mbd1*-Expression in defizienten (-/-) Mäusen. Von je vier MBD1-defizienten Mäusen (Nummer 65, 43, 62, 90) und vier Wildtyp-Mäusen (Nummer 52, 55, 94, 63) habe ich RNA aus Hirngewebe isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die MBD1-spezifischen Primer ergeben ein 308 bp Produkt. Die Primer wurden so gelegt, dass zwischen den vier verschiedenen Spleißvarianten nicht diskriminiert wird. +/+, Wildtyp; -/- homozygot MBD1-defizient; M, Marker.

Um auszuschließen, dass bestimmte *Mbd1*-Spleißisoformen in den defizienten Tieren translatiert wurden, wurde ein Westernblot mit Antikörpern gegen eine C-terminale Sequenz des *Mbd1*-Proteins durchgeführt (Abbildung 16). Lebergewebe der Mäuse wurde in flüssigem Stickstoff

eingefroren, zermörsert und in einem Homogenisierungspuffer mittels eines Glas-Glas-Potters homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet (der erhaltene Überstand bildet die Überstandsfraction Ü) in einem 500 mM Extraktionspuffer aufgenommen und mittels des Glas-Glas-Potters erneut extrahiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wird die Kernextraktfraction (Ex) erhalten. Die Proteinproben wurden gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, mittels Magermilchpulver blockiert und nach Zugabe des ersten und zweiten Antikörpers und Zugabe von ECL-Lösung auf einem Röntgenfilm entwickelt. Als Kontrolle für die gleichmäßig effiziente Extraktion wurden die Überstands- und Extraktionsfraktionen mit einem Mecp2-spezifischen Antikörper inkubiert. Es zeigt sich im Vergleich zwischen dem Wildtyp, heterozygoten und MBD1-defizienten Tieren eine abnehmende Konzentration an Mbd1 (apparentes Molekulargewicht von 66,6 kDa). So ist in der Extraktfraction bei Wildtyp-Mäusen eine prominente MBD1-Bande (Pfeilkopf), bei heterozygoten Tieren eine verringerte Mbd1-Konzentration und bei den defizienten Tieren ist kein Mbd1-Protein zu detektieren. Für Mecp2 wurden in den verschiedenen Mäusen keine veränderten Signalstärken analysiert. Somit kann auf eine gleichmäßig effiziente Extraktion der Methyl-CpG-bindenden Proteine geschlossen werden.

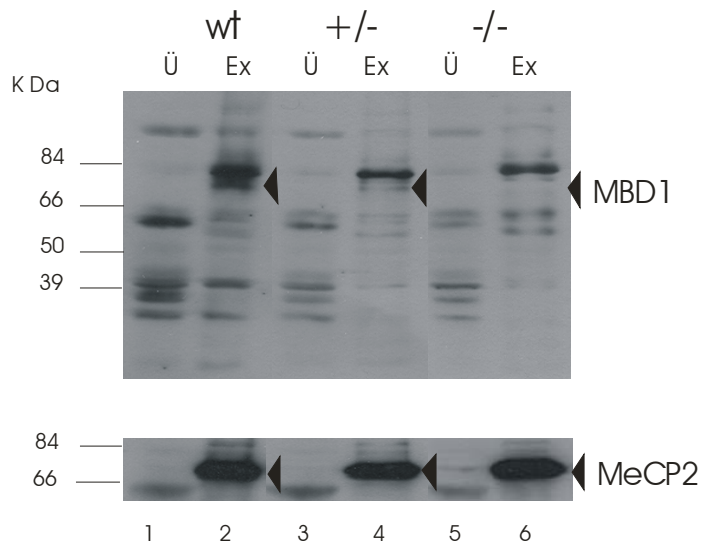


Abbildung 16: Fehlendes Mbd1-Protein in defizienten Mäusen. Leberproben von drei Mäusen (wt; +/-; -/-) wurden homogenisiert und durch eine erste Zentrifugation in eine rohe Kernfraction und eine Überstandsfraction (Ü) getrennt. Die Kernextraktion wurde anschließend mit einem 500 mM NaCl-Puffer homogenisiert und zentrifugiert, um eine Extraktionsfraction (Ex) zu gewinnen. Bei Wildtyp-Mäusen ist in Höhe der Pfeilköpfe eine prominente Mbd1-Bande aufgetreten, bei heterozygoten Tieren etwas Mbd1-Protein und bei MBD1-defizienten Mäusen kein Mbd1. Überstands- und Extraktionsfraction wurden einer Westernblot-Analyse mit Mbd1-Antikörpern (IMG-306, Santa Cruz) unterworfen. Als Kontrolle dafür, dass der 500 mM NaCl-Puffer MBD-Proteine effizient extrahiert, diente ein Westernblot mit Mecp2-Antikörpern (07-

013, Upstate-Antikörper).

Somit konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Geschwistertiere eine unveränderte *Mbd1*-Expression zeigen, heterozygote eine verringerte Expression und MBD1-defiziente Mäuse kein Mbd1-Protein exprimieren. Ferner wurden die vorher erhaltenden Genotypen mittels RT-PCR und Westernblot-Analysen bestätigt.

Nach der Etablierung der MBD1-defizienten Mauslinie wurde ein Embryotransfer durchgeführt und damit begonnen, sie auf einen congenischen C57BL6-Hintergrund zurückzukreuzen. Hierbei wird der Anteil des Donorsegmentes (129-Hintergrund) im Targeting-Vektor minimiert. Hierzu werden heterozygote Tiere über etwa 10 Generationen mit Wildtypmäusen verpaart (Banbury Conference recommendations; Wolfer et al., 2002). Parallel hierzu begann ich, heterozygote Mäuse miteinander zu verpaaren, um Liniengrößen von mehreren hundert Tieren für die Phänotypanalyse zu erhalten. Hierbei wurden heterozygote Mäuse gekreuzt, um in der F2-Generation Wildtyp mit MBD1-defizienten Mäusen vergleichen zu können. Ferner wurden ältere Tiere hinsichtlich einer spontanen Karzinomentstehung beobachtet. Eine größere Anzahl von weiblichen und/oder männlichen Tieren wurde untersucht, die innerhalb einer Gruppe gleichen oder ähnlichen Alters sind.

3.4 Phänotyp der MBD1-defizienten Mäuse

Die MBD1-defizienten Mäuse haben sich als lebensfähig und fertil erwiesen. Ich habe kein schwerwiegend auffälliges Verhalten feststellen können, obwohl die MBD1-defizienten Mäuse die Tendenz zu einer mentalen Retardierung zeigen. Weiterhin entwickeln sie keine spontanen Karzinome. Ihre Mortalität ist, soweit beobachtet, nicht erhöht. Der Durchmesser der Samentubulli war bei drei untersuchten homozygot MBD1-defizienten Männchen im Vergleich zu drei Wildtyp-Männchen leicht verringert (interne Mitteilung PD Joachim Weitzel). Generell kann gesagt werden, dass das MBD1-defiziente Mausmodell mit der damit verbundenen fehlenden Erkennung methylierter DNA durch Mbd1 einen schwer zu analysierenden Phänotyp aufweist.

3.4.1 Der Einfluss von Mbd1 auf das Herz

In neueren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Histonacetylierung als stressinduzierter Regulator der Genexpression zum Beispiel im Herzen wirken kann (Dr. El-Armouche, persönliche Mitteilung). Generell kann gesagt werden, dass die Pumpfunktion des Herzens von der Fähigkeit des Herzmuskels (Myocard) abhängt, Kräfte für die aktive Verkürzung (Shortening) der Herzkammern aufzuwenden. Bei Kontraktion der Kammern (Systole) werden die Segelklappen geschlossen, die Taschenklappen geöffnet, das Blut wird in die Arterien gedrückt. Bei Kammererschaffung (Diastole) wird umgekehrt das Blut aus den Vorhöfen und Venen angesaugt. Nach Herzinfarkten und einhergehender verminderter Kontraktilität des Herzens wird eine veränderte Struktur von herzspezifischem Tubulin und eine verminderte α -MHC-Expression vorgefunden. Die Inhibierung von HDACs durch Trichostatin A hat eine erhöhte α -MHC-Expression in Kardiomyozyten zur Folge. Hierbei induzierte Trichostatin A eine Hyperacetylierung der Histone. Da MBD1 mit HDACs interagiert und HDAC-Inhibitoren zu einer verringerten Expression von β -MHC (β -Myosin-Heavy-Chain) führen, habe ich Veränderungen am Herzen der Mäuse untersucht. Als Vorbereitung für diese Untersuchungen habe ich analysiert, ob eine unauffällige Gewichtszunahme der Tiere erfolgt (Abbildung 17).

Als erste Analysen wurden von 31 Mäusen der Quotient aus Herz- und Körpergewicht bestimmt. Hierzu habe ich die Tiere gewogen und anschließend getötet, um ihnen die Herzen zu entnehmen. Diese wurden in PBS gewaschen und ebenfalls gewogen. In Abbildung 17 ist die nicht auffällige Gewichtszunahme der Mäuse in Abhängigkeit ihres Alters gezeigt. Hierbei sind im oberen Teil der Abbildung 17 Wildtyp- zu MBD1-defizienten Männchen und im unteren Bildteil Wildtyp- zu MBD1-defizienten Weibchen aufgetragen.

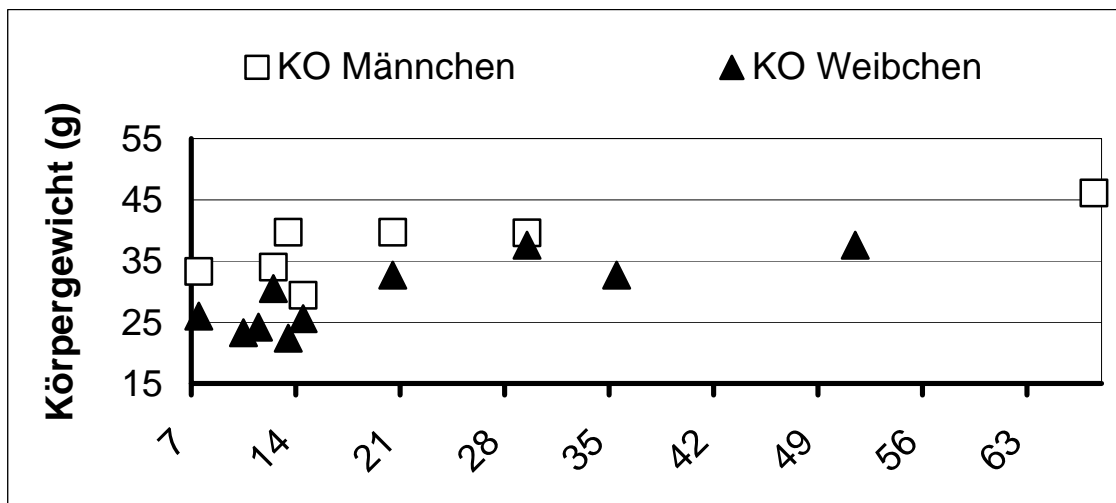
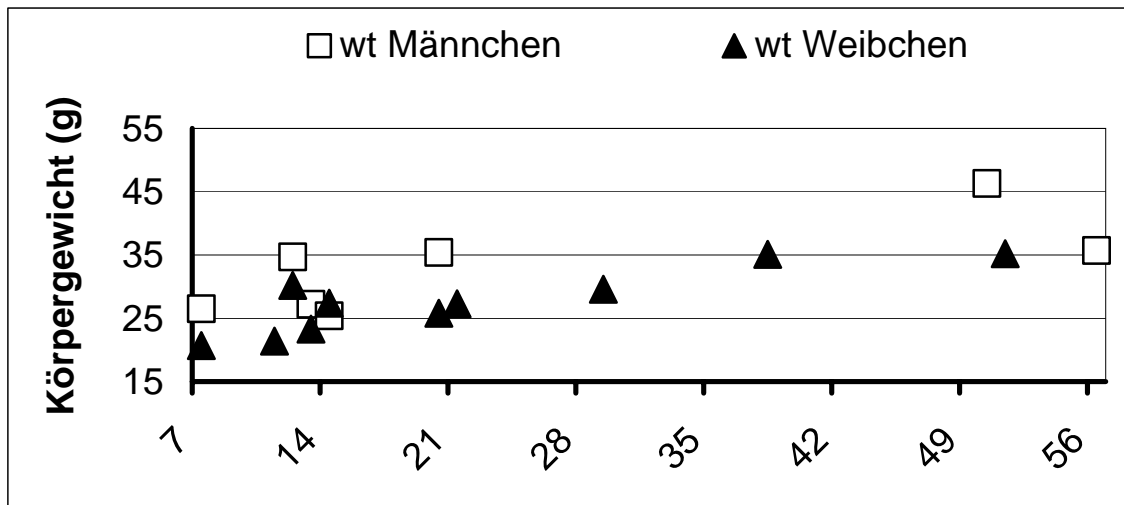


Abbildung 17: Gewichtszunahme der MBD1-defizienten Mäuse in Abhängigkeit vom Alter in Wochen. Im oberen Teil der Abbildung ist das Körpergewicht von Wildtyp-Männchen und -Weibchen in Abhängigkeit ihres Alters dargestellt. Im unteren Teil wird die Gewichtsveränderung bei MBD1-defizienten Mäusen gezeigt. Pro Messpunkt wurden mindestens zwei Tiere gewogen. Die Gewichtszunahmen zeigen keine Auffälligkeiten. Trotzdem besteht bei den jungen MBD1-defizienten Männchen und Weibchen zwischen der 12. und 20. Woche eine vergrößerte Varianz.

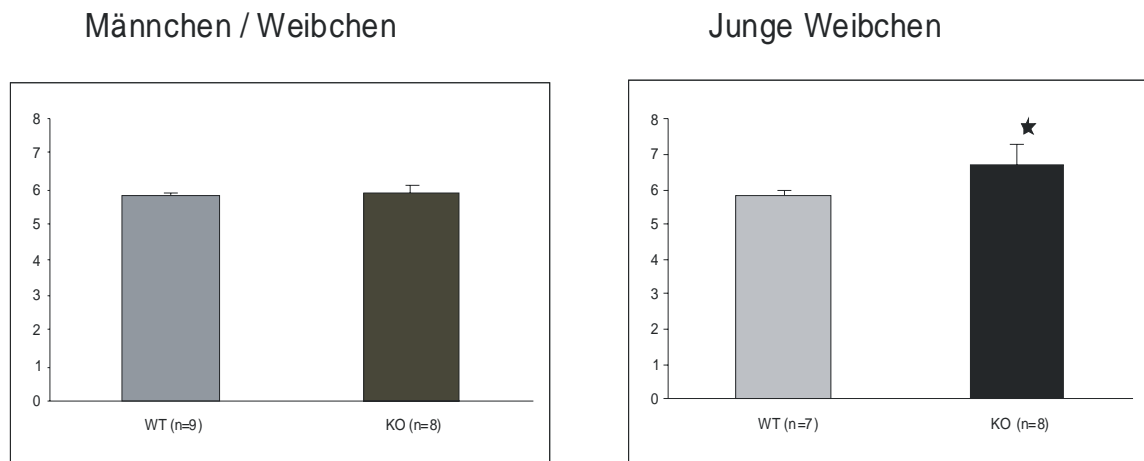


Abbildung 18: Herz- zu Körpergewichtsanalysen. Der Quotient aus Herzgewicht zu Körpergewicht (mg/g) ist als Balken dargestellt. Im linken Teil der Abbildung werden 9 Wildtyp gegen 8 MBD1-defiziente Mäuse gezeigt. Hierbei wurden sowohl männliche Tiere als auch weibliche Mäuse unterschiedlichen Alters von der 13. bis 35. Woche verwendet. Im rechten Teil wurden ausschließlich junge Weibchen mit einem Alter zwischen der 12.-16. Woche analysiert. Hier wurde eine signifikante Erhöhung von 21,0% ($p < 0,05$) festgestellt.

Im linken Teil der Abbildung 18 ist kein Unterschied im Quotienten zwischen Herz- und Körpergewicht bei 9 Wildtyp ($5,86 \pm 0,35$) gegen 8 MBD1-defiziente Mäuse ($5,47 \pm 0,3$) bei unterschiedlichem Geschlecht und Alter zwischen der 13. bis 35. Woche zu sehen. Im rechten Teil der Abbildung wurden nur junge weibliche Tiere im Alter zwischen der 12. bis 16. Woche analysiert. Hier wurde ein signifikanter Unterschied (t-Test $p < 0,05$) von $5,7 \pm 0,2$ bei 7 Wildtyp-Weibchen zu $6,9 \pm 0,42$ bei 8 MBD1-defizienten Mäusen gefunden. Das relative Herzgewicht war bei 12 bis 16 Wochen alten Weibchen um 21% erhöht. Die Ultraschalluntersuchungen zeigen folgendes Ergebnis (Tabelle 8):

| | SV (ml) | FS (%) | FAS (%) | LVM (mg) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Männchen | | | | |
| 4 WT | 0,058±0,003 | 25,282±4,59 | 40,894±2,41 | 140,122±9,21 |
| 4 KO | 0,056±0,006 | 26,455±1,41 | 36,623±2,52 | 146,233±5,81 |
| Weibchen | | | | |
| 5 WT | 0,041±0,007 | 26,250±2,09 | 43,987±2,98 | 99,853±7,56 |
| 5 KO | 0,038±0,007 | 20,652±3,22 | 36,635±4,18 | 90,863±7,15 |

Tabelle 8: Herzspezifische Parameter aus Ultraschallanalysen +/- SEM. SV Schlagvolumen, FS fractional shortening, FAS fractional area shortening, LVM Linke ventrikuläre Masse. In den FAS-Wert geht der linksventrikuläre enddiastolische und der endsystolische Durchmesser ein.

Für die Ultraschallanalysen wurden je vier Wildtyp-Männchen (WT) und vier MBD1-defiziente Männchen (KO) im Alter von 20 Wochen untersucht, um auftretende Unterschiede in der Herzfunktion und Morphologie zu analysieren (Tabelle 8). Bei den Weibchen wurden fünf Wildtyp und fünf MBD1-defiziente Mäuse im Alter zwischen der 7. bis 21. Woche geschallt. Aufgrund der erhaltenen Parameter für Schlagvolumen (SV), der Kontraktilitätsparameter (fractional shortening; FS und fractional area shortening; FAS) und dem kalkulierten Gewicht des linken Ventrikel (left ventricular mass) wurden keine signifikant abweichenden Werte in der Funktionalität der Herzen zwischen Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen festgestellt. Ferner wurden keine Herzrhythmusstörungen diagnostiziert. Somit bleibt die Frage offen, wodurch der signifikante Unterschied bei den Herz- und Körpergewichtsmessungen bei jungen MBD1-defizienten Weibchen zustande kommt.

3.4.2 Der Einfluss von Mbd1 auf die Skelettbildung

Da Rett-Patientinnen zum Teil Osteoporose zeigen (Budden und Gunness, 2003) und MBD1 zu der gleichen Protein-Familie wie MeCP2 gehört, habe ich die Tiere geröntgt, um Anzeichen von Knochenfehlentwicklungen im Mausmodell analysieren zu können. Aufgrund der Aufnahmen wurde keine Auffälligkeit beobachtet (Abbildung 19). Es wurde weder eine veränderte Knochendichte noch augenscheinliche Abnormalitäten in der Skelettentwicklung zwischen Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen beobachtet. Weitergehende Analysen wurden nicht durchgeführt.

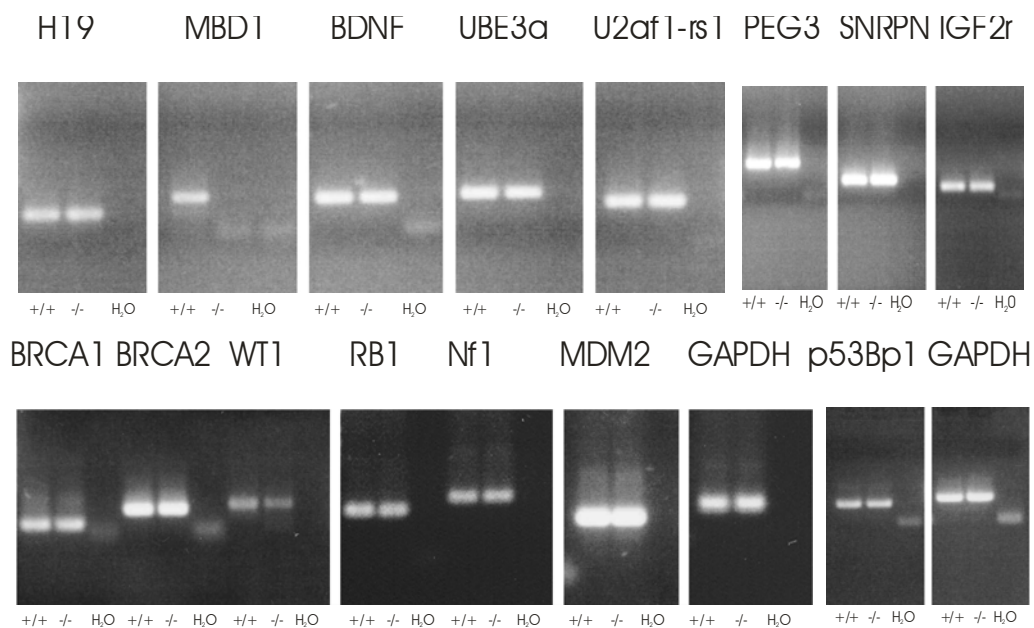


Abbildung 19: Röntgenaufnahmen von drei Wildtyp-Mäusen (links) und drei MBD1-defizienten Mäusen (rechts).

3.4.3 Expressionsanalysen der MBD1-defizienten Mäuse

Zu Beginn der Expressionsanalysen habe wir sichergestellt, dass homozygote MBD1-defiziente Tiere, deren Genotyp mittels PCR-Reaktionen ermittelt wurde (siehe oben), keine *Mbd1*-Expression zeigen. Anschließend habe ich eine Auswahl an Genen getroffen, die einen Zusammenhang in ihrer Expressionsregulation zu dem transkriptionellen Repressor MBD1 zeigen könnten. Wie aus zwei Veröffentlichungen hervorgeht, weisen MECP2-defiziente Mäuse eine veränderte Expression von Imprinting-Genen wie *DLX5* und *DLX6* auf (Horike et al., 2005; Young und Zoghbie, 2004). Dagegen bleibt die Expression von dem Imprinting-Gen *Snrpn* bei MECP2-defizienten Mäusen im Vergleich zwischen Wildtyp und MECP2-defizienten Mäusen im Cortex unverändert. Zu den analysierten Imprinting-Genen gehören *H19*, *Ube3a* (Ubiquitin-Protein-Ligase E3a), *U2af1-rs1* (U2 small nuclear ribonucleoproteine auxiliary factor), *Peg3* (paternally expressed gene 3), *Snrpn* (small nuclear ribonucleoproteine polypeptide N) und *Igf2r* (insulin-like growth factor II receptor), die entweder maternal oder paternal im Gehirn exprimiert werden. Ferner ist interessant, dass MBD2 x *Apc* Mäuse (MBD2-Defizients in einem APC-Hintergrund) eine verringerte Tumorgenese aufweisen (Sansom et al., 2003 und 2005). *Apc*-Mäuse tragen eine Mutation im *Apc*-Gen und zeigen eine hohe Rate spontaner Kolonkarzinome. Aufgrund dieser Beobachtungen habe ich die Expression von Tumorsuppressorgen in Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen untersucht. Von den Tumorsuppressorgen wurden die beiden brustkrebsspezifischen Suppressoren *Brca1* (breast cancer 1 gene), *Brca2* (breast

cancer 2 gene), weiterhin *Wt1* (Wilms Tumor 1 gene), *Rb1* (Retinoblastoma 1), *Nf1* (Neurofibromatosis Type 1), *Mdm2* (Mouse double minute 2 homolog), *p53* (Tumor Protein p53) und dessen Bindeprotein p53bp1 im Hinblick auf ihre Expression in Maushirnen analysiert. Retinoblastoma-Protein 1 (*Rb1*) reguliert ferner Histonmodifikationen. Als Haushaltsgene dienten *Gapdh* und *Actab* (β -Actin). Hierzu wurden Hirnproben entnommen und semi-quantitativ mittels Echtzeit LC-PCR untersucht. Es ist jeweils exemplarisch die Expression von einer Wildtyp-Maus, einer MBD1-defizienten Maus und eine Wasserkontrolle gezeigt (Abbildung 20). Für die Analyse der *p53*-Expression wurden die entstandenen PCR-Produkte von je 4 Wildtyp und 4 MBD1-defizienten Mäusen mit einer zusätzlichen Verdünnung der eingesetzten cDNA von 1 zu 5 in Abbildung 20 gezeigt. Die Auswertung der LC-PCR-Daten führte zu nahezu identischen Expressionsdaten zwischen Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen.



M 52 55 65 94 43 62 63 90 M
 wt wt -/- wt -/- -/- wt -/

P53 1:1 1:5 1:1 1:5 1:1 1:5 1:1 1:5 1:1 1:5 1:1 1:5 1:1 1:5 1:1 1:5

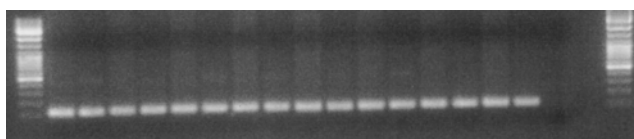


Abbildung 20: Expression von Imprinting- und Tumorsuppressorgenen in MBD1-defizienten Maushirnen. Hierzu wurde Gesamt-RNA isoliert, mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mit genspezifischen Primern in einer anschließenden PCR-Reaktion im Light-Cycler semiquantitativ analysiert. In der jeweils ersten Spur (++) ist Wildtyp-cDNA, in der zweiten Spur cDNA aus MBD1-defizienten Tieren (-/-) und in der dritten Spur eine Wasserkontrolle nach PCR-Reaktion exemplarisch aufgetragen. Ferner wurde die Expression von p53 bei 8 Tieren (je 4 Wildtyp und 4 -/- Mäusen in zwei cDNA-Verdünnungen) untersucht. Mit M sind die Markerspuren gekennzeichnet.

Wie aus Abbildung 20 erkennbar ist, zeigen MBD1-defiziente Tiere keine *Mbd1*-Expression im Gehirn. Hingegen wird *Mbd1* im Gehirn von Wildtyp-Mäusen stark exprimiert. Ich habe keine signifikanten Expressionsunterschiede im Hirn der Mäuse zwischen Wildtyp- und MBD1-defizienten Tieren festgestellt, wie auch aus den identischen Signalstärken der PCR-Produkte und der Analyse der LC-Daten zu schließen war. Eine geringere Expression von *Wt1* (Wilms Tumor 1 gene) konnte in weiterführenden Experimenten auch im Herzgewebe bestätigt werden. Da keine signifikanten Unterschiede bei der Genexpression im Hirn gefunden wurden (Zhao et al., 2003), wurden umfassendere Untersuchungen im Herz durchgeführt.

Für die Expressionsanalyse im Herz wurden je 8 MBD1-defiziente und Wildtyp-Mäuse verschiedener Würfe untersucht. Es wurden zwei Tumorsuppressorgene (*Wt1*, *Brca2*), die drei Imprinting-Gene (*Ube3a*, *Snrpn* und *U2af1-rs1*), *Bdnf* (brain-derived neurotrophic factor) und als Kontrolle *Mbd1* auf mRNA-Expression in Wildtyp und MBD1-defizienten Tieren analysiert. Hierzu wurde aus mindestens 6 Wildtyp- und 6 defizienten Tieren RNA aus den Herzen isoliert und in cDNA mit Reverser Transkriptase umgeschrieben. Der Genotyp der Tiere wurde anschließend mittels MBD1-spezifische Primer nach einer PCR-Reaktion mit Gesamt- cDNA als Template bestätigt. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen nach Doppelbestimmungen sind in Abbildung 21 gezeigt. Die Werte wurden auf die individuelle Expression des Haushaltsgen *Gapdh* der verschiedenen Mäuse normiert, da hier theoretisch eine unveränderte Expression des Haushaltsgens in Wildtyp- als auch MBD1-defizienten Tieren existiert. Weiterhin kann durch die eingesetzten GAPDH-Primer eine Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA ausgeschlossen werden, da die Primer intronüberspannend binden. Die Expression der Wildtyp-Mäuse wurde auf 100% gesetzt. Somit wurde eine veränderte Expression im Herzen von MBD1-defizienten Mäusen bei *Brca2* von 1 zu 0,83, bei *Wt1* von 1 zu 0,67, bei *Bdnf* von 1 zu 0,62, bei *Ube3a* von 1 zu 1, bei *Snrpn* von 1 zu 0,86 und bei *U2af1-rs1* 1 zu 1,04 analysiert. Alle Veränderungen waren nicht signifikant. Die Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktionen lag jeweils über 0,8 (theoretisch 1). Ferner wurden alle PCR-Produkte in Agarosegelen aufgetrennt

und die Signale auf Singularität und Produktgröße überprüft.

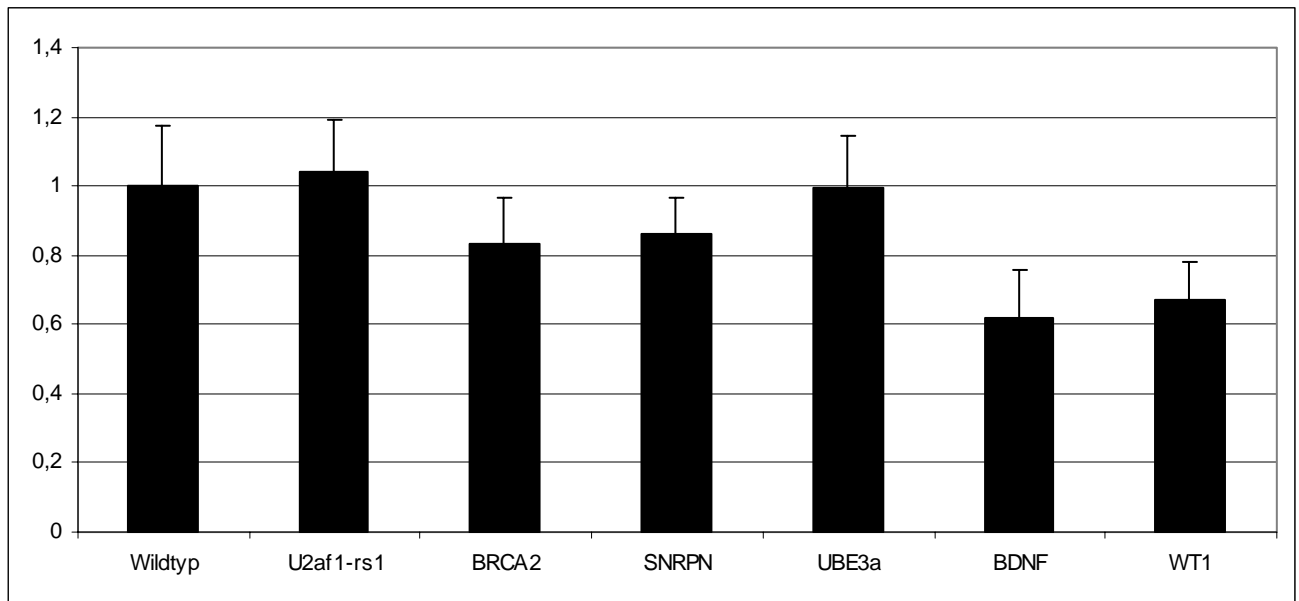


Abbildung 21: Expression von *U2af1-rs1*, *Wt1*, *Bdnf*, *Ube3a* und *Snrpn* im Herzgewebe von MBD1-defizienten Mäusen. Die Expression der Tumorsuppressorgene *Brca2*, *Wt1*, der Imprinting-Gene *Ube3a*, *Snrpn*, *U2af1-rs1* und von *Bdnf* ist im Diagramm gezeigt. Der erste Balken zeigt die Expression der untersuchten Gene in den Wildtyp-Mäusen, mittels des Haushaltsgens *Gapdh* auf 1 (100%) normalisiert. Die folgenden Punkte zeigen die Expression der untersuchten Gene in den MBD1-defizienten Mäusen. Hierzu wurden mindestens 6 Wildtyp- und 6 MBD1-defiziente Mäuse in Doppelbestimmungen analysiert \pm SEM.

3.4.4 Untersuchungen von Histon-H3-Modifikationen

Da eine *in vitro*-Interaktion zwischen Mbd1 und den Histone-H3-Methylasen Suv39h1 und Setdb1 gezeigt wurde (Fujita et al., 2003; Sarraf und Stancheva, 2004; Jenuwein et al., 1998; Melcher et al., 2000) habe ich H3-Modifikationen untersucht. Ferner wurde eine Interaktion von Mbd1 mit HDAC3 in Leukämiezellen gefunden (Villa et al., 2006; Tabelle 2). Für die Westernblots wurden aus Hirn- und Leberproben von Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen Kernproteine extrahiert, angereichert und mittels spezifischen Antikörpern analysiert. Das zu untersuchende Gewebe der Mäuse wurde in gefrorenem Zustand zermörsert und in einem Homogenisierungspuffer mittels eines Glas-Glas-Potters homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in einem 500 mM Extraktionspuffer aufgenommen und mittels eines Glas-Glas-Potters erneut extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation der Suspension wurde die aufgetragene Kernextraktfraktion erhalten. Die Proteinproben wurden gelelektrophoretisch getrennt, auf eine

Nitrozellulosemembran geblottet, mittels Magermilchpulver blockiert und nach Zugabe des ersten und zweiten Antikörpers und Zugabe von ECL-Lösung auf einem Röntgenfilm entwickelt. Das apparente Molekulargewicht von modifiziertem Histon-H3 beträgt etwa 15 kDa und ist in der Abbildung 22 als prominentes Signal zu identifizieren. Für die Histon-H3-Acetylierung ist in Westernblots bei Wildtypmäusen keine veränderte Gesamtacetylierung in Hirnen bzw. Leber von MBD1-defizienten Mäusen zu finden. Weiterhin ist in Hirngewebe von den MBD1-defizienten Mäusen keine veränderte Dimethylierung von Lysin 9 am Histon H3 festzustellen. Bei der H3 Lysin 9-Trimethylierung wurden ebenfalls keine Unterschiede in Hirn- und Lebergewebe analysiert. Weiterführende Experimente mittels Chromatin-Immunopräzipitation wurden bisher nicht durchgeführt.

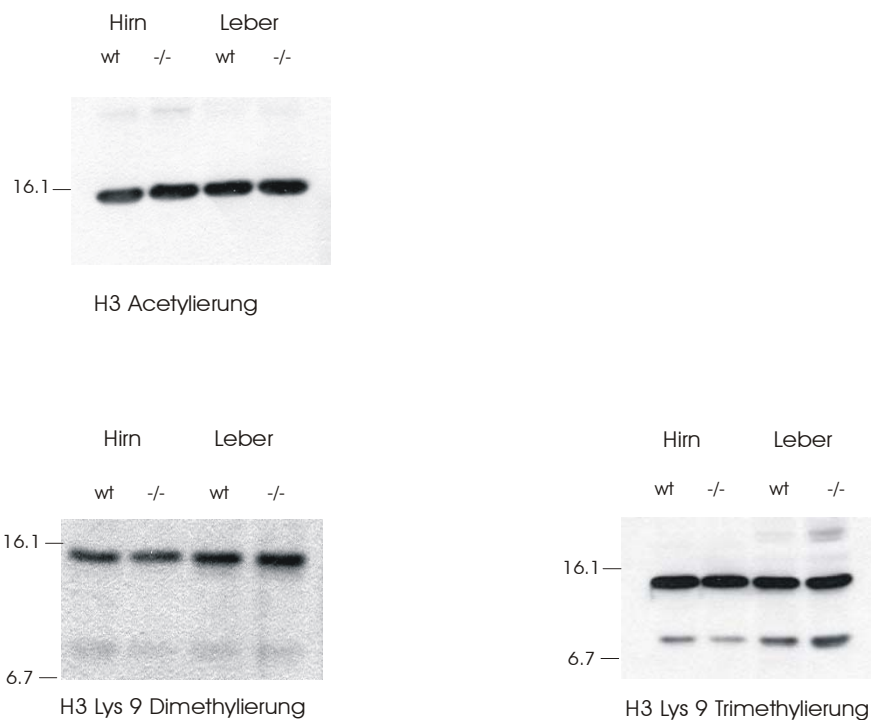


Abbildung 22: Analyse von Histon-H3-Modifikationen. Gehirn- und Leberproben von zwei Mäusen (Wildtyp und homozygot MBD1-defizient) wurden homogenisiert und durch eine erste Zentrifugation in eine rohe Kernfraktion und eine Überstandsfraktion getrennt. Die Kernextraktion wurde anschließend mit einem 500 mM NaCl-Puffer homogenisiert und zentrifugiert, um eine Extraktionsfraktion zu gewinnen. Es wurden Modifikationen von Histon-H3 im Hinblick auf die Gesamtacetylierung (oben) und Lysin 9-Di- und Trimethylierung (unten links und rechts) mit Hilfe von spezifischen Antikörpern untersucht. Histon H3 zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 15 kDa und ist in den Blots als prominentes Signal zu erkennen. Jeweils gleiche Mengen an Protein wurden aufgetragen (Antikörper abcam; ab 8898, ab 7312).

4 Diskussion

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Generierung einer konditional MBD1-defizienten Mauslinie mittels Gentergeting über homologe Rekombination und einer MBD1-defizienten Mauslinie. Bei der Etablierung der konditional MBD1-defizienten Mauslinie mit getargeten Allelen wurde das Cre-Lox-System angewendet. Als längerfristiges Projekt soll die *in vivo*-Funktion von Mbd1 mit Hilfe der generierten Mausmodelle analysiert werden. Ich vermute einen Einfluss von MBD1 auf Histonmodifikationen, auf die Expression insbesondere von Imprinting-Genen und bei der Krebsentstehung. Es ist bekannt, dass die DNA-Methylierung von entscheidender Bedeutung für die Genregulation, bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen (Sado et al., 2000; Sado und Ferguson-Smith 2005; Beard et al., 1995), bei der allelspezifischen Genexpression (Imprinting) (Ferguson-Smith et al., 2001; Santos et al., 2002) und bei der Inaktivierung von repetitiven, parasitären genomischen Elementen (Retrotransposons und endogenen Retroviren) ist (Yu et al., 2001; Groudine et al., 1981). Dass die DNA-Methylierung essentiell für die Säugetierentwicklung ist, zeigten Rudolf Jaenisch und andere eindrucksvoll in konditionalen Mausmodellen (Okano et al., 1999; Li E. et al., 1992; Li E., 2002 Übersicht). Für die *in vivo*-Analyse der Funktion der MBD-Familie, die an methylierte DNA bindet und somit die Methylierungsmuster interpretiert, sind ebenfalls defiziente Mausmodelle essentiell. Ein großer Schritt bei der Aufklärung des Rett-Syndroms in molekularbiologischer Hinsicht war die Etablierung von konditional MECP2-defizienten Mäuse (Chen et al., 2001; Guy et al., 2001; Young und Zoghbi, 2004; Zoghbi, 2005). Ferner wurden entscheidende Erkenntnisse über die Funktion von MBD2 und MBD4 bei der Tumorgenese durch das Verpaaren mit Apc-Mäusen gewonnen. Apc-Mäusen tragen Mutationen im Apc-Gen und bekommen spontan intestinale Karzinome. Zu Beginn meiner Arbeit im Herbst 2000 existierten noch keine konditional defizienten Mäuse der MBD-Familie. Als ursprüngliches Projekt waren konditional MECP2-defiziente Mausmodelle vorgesehen, die aber parallel von Rudolf Jaenisch und Adrian Bird im Frühjahr 2001 publiziert wurden (Chen et al., 2001; Guy et al., 2001). Ich etablierte eine MBD1-defiziente und eine konditional MBD1-defiziente Mauslinie. Somit besteht nun die Möglichkeit, die *in vivo*-Funktion von MBD1 im Mausmodell zu untersuchen und mit der von Mecp2 zu vergleichen. Im Verlauf der Arbeit wurden MBD1-defiziente Mäuse auch von einer amerikanischen Gruppe generiert (Zhao et al., 2003). Die defizienten Mausmodelle von Methyl-CpG-bindenden Proteinen und DNA-Methyltransferasen

sind entscheidend bei der Aufklärung von Imprinting, X-Chromosominaktivierung und Krebs, da sich Zellkulturmodelle für diese Fragestellungen als unzureichend erwiesen haben. Zellkulturmodelle zeigen eine abweichende DNA-Methylierung bedingt durch ihre Immortalität. Bei der Analyse von Imprinting-Phänomenen sind Mausmodelle notwendig, um den parentalen Ursprung der transkribierten mRNA zurückverfolgen zu können (Peters und Beechey, 2004; Ferguson-Smith et al., 2003; Pickard et al., 2001). Weiterhin sind für die Untersuchung von dynamischen, epigenetischen Vorgängen wie die DNA-Methylierung und Modifizierung von Histonen Mausmodelle essentiell.

Die Nichtmethylierung von promotorassoziierten CpG-Inseln ist ein wichtiger Aspekt bei der Transkription von Wirbeltiergenen (Bird, 1986; Ng et al., 2000; Jaenisch und Bird, 2003). Weiterhin werden Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA bei der Krebsentstehung beobachtet (Rountree et al., 2001; Eden et al., 2003; Simon et al., 1983; Peterson et al., 2003). Die Arbeitsgruppe von Rudolf Jaenisch zeigte 2003, dass eine um 90% verringerte Expression von DNMT1 in einer hypomorphen Maus nach 4 bis 8 Wochen zu aggressiven Lymphomen führt (Gaudet et al., 2003). Eine Hypomethylierung der DNA erzeugt chromosomale Instabilität und eine verstärkte Tumorsektion. Im *Dnmt1*-überexprimierenden Mausmodell mit einer Hypermethylierung der DNA, sterben etwa 30 % der Tiere nach etwa einem Jahr an Karzinomen (Lee et al., 2001; Eden et al., 2003). Einhergehend mit Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kommt es früh in der Karzinomentwicklung zur fortschreitenden Demethylierung des Genoms. Diese führt vermutlich zu der häufig zu beobachtenden Dedifferenzierung des Phänotyps von Tumorzellen. Die DNA-Methylierung erfährt somit im Laufe der Entwicklung eines Tumors zweierlei Veränderungen. Zum einen wird das Ausmaß der Gesamtmethylierung reduziert. Zum anderen werden bestimmte Genloci, z.B. Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, stärker methyliert. Hierdurch werden diese Gene inaktiviert (Eden et al., 2003; Gaudet et al., 2004)). Es wurde gezeigt, dass in MBD2-defizienten Mäusen die intestinale Tumorgenese verringert ist (Sansom et al., 2003; Ballestar und Esteller, 2005). Nach Einkreuzung des *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*)-Gens durch *Apc*^{min/+}-Mäuse in MBD2-defiziente Mäuse ist die Überlebensrate verlängert, sowie Anzahl und Größe der intestinalen Tumore reduziert. Dies lässt den Schluss zu, dass MBD2 an der Interpretation des Methylierungsmusters in Tumorzellen beteiligt ist. Hierbei könnte es Tumorsuppressorgene reprimieren. Umgekehrt ist die Situation bei dem Reparaturprotein MBD4, welches zusätzlich zur Methyl-CpG-Bindungsdomäne eine Thymin-Glycosylase-Domäne besitzt (Millar et al.,

2002). Nach Einkreuzung des *Apc*^{min/+}-Hintergrunds zeigten MBD4-defiziente Mäuse eine verstärkte Tumorbildung mit CpG→TpG-Transitionen im *Apc*-Gen. MBD4 unterdrückt also die CpG-Mutabilität und Tumorgenese. Weiterhin zeigen Zellen aus MBD4-defizienten Mäusen eine verringerte Apoptose nach Induktion mit DNA-schädigenden Substanzen.

Inwieweit MBD-Proteine, die methylierte DNA binden und somit das Methylierungsmuster interpretieren, für die Genregulation verantwortlich sind, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen mit Hilfe von Mausmodellen (Chen et al., 2003; Watson et al., 2005; Zoghbi., 2005; Samaco et al., 2005; Ferguson-Smith et al., 2003). Ich gehe inzwischen von einer dynamischen Bindung von MBD1 an methylierte CpG-Stellen aus, da ich sonst einen letalen Phänotyp vermuten würde (Bienvenu und Chelly, 2006). Bei dem Versuch, die biologische Bedeutung der *in vivo*-DNA-Methylierung zu verstehen, drängt sich eine Schlüsselfrage auf: Wie wird das Muster der DNA-Methylierung durch die Zelle gelesen (Fatemi und Wade, 2006)? Methylierte CpGs sind Bindungsstellen für spezielle Proteine wie zum Beispiel MBD1, die diese binden und die Genexpression regulieren. Diese wiederum können Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutieren (Sarraf und Stancheva, 2004; Fujita et al., 2003; Wade, 2001; Shahbazian et al., 2002). Weiterhin werden molekularbiologische Modelle diskutiert, über welche Mechanismen diese Regulation *in vivo* ablaufen könnte. Wie ich in dieser Arbeit zeigen konnte sind MBD1-defiziente Mäuse lebensfähig und fertil. Die MBD2-defizienten Mäuse sind ebenfalls lebensfähig und zeigten nur ein gering verändertes Verhalten bei der Betreuung der Nachkommen, wohingegen die MBD3-defizienten Mäuse während der Embryogenese starben. MBD4-defiziente Mäuse weisen eine stark erhöhte Mutationsrate auf. Die Tatsache, dass die MBD-defizienten Mausmodelle sehr verschiedene Phänotypen zeigten, lässt auf eine unterschiedliche, sich nicht kompensierende Funktion der Proteinfamilie schließen.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich Mäuse mit getargeten MBD1-Allelen (konditional MBD1-defizientes Mausmodell) und parallel hierzu MBD1-defiziente Mäuse (Knockout) generiert. Um die Funktion von MBD1 im Säugetier zu testen wurde zu Beginn ein konditionaler Ansatz verfolgt, um eine mögliche embryonale Letalität, wie zum Beispiel bei MBD3 (Hendrich et al., 2001), zu umgehen. Für den zu erwartenden Phänotyp bei den defizienten Mäusen hatte ich im Rahmen meiner Arbeit wenig Anhaltspunkte, da vor 2001 noch keine defizienten Mausmodelle der MBD-Familie existierten, außer nicht konditionale MeCP2-defiziente Mäuse, die angeblich embryonal letal waren (Tate et al., 1996; Chen et al., 2001). Generell ging ich von einer

embryonalen Letalität der MBD1-defizienten Mäuse aus und hätte im Laufe der Arbeit eine spontane Krebsentstehung in den Mäusen aufgrund der Interaktion von MBD1 mit dem DNA-Reparaturenzym Methylpurin-DNA-Glycosylase (MPG) erwartet (Danam et al., 2005; Rountree et al., 2001; Watanabe et al., 2003; Laird and Jaenisch, 1996; Ballestar et al., 2003 und 2005). Außerdem reguliert MBD1 die *in vitro*-Expression von O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), die ebenfalls in der DNA-Reparatur involviert ist (Danam et al., 2005; Ichimura et al., 2005). Ferner waren für mich neurologische Fehlfunktionen zu erwarten, die sich auch bestätigt haben (Zhao et al., 2003). MECP2-defiziente Mäusen zeigen in biochemischen Analysen eine kaum veränderte Genexpression, obwohl sie einen Rett-ähnlichen Phänotyp aufweisen. Somit wurden Mausmodelle für das Rett-Syndrom generiert und intensiv analysiert (Tudor et al., 2002; Asaka et al., 2006; Dani et al., 2005; Moretti et al., 2005 und 2006; Shahbazian und Zoghbi, 2002; Pelka et al., 2006; Chang et al., 2006; Akbarian et al., 2001; Zoghbi et al., 2005; Guy et al., 2001; Gemelli et al., 2006; Setoguchi et al., 2006; Bienvenu und Chelly, 2006 Übersicht). Die Überexpression von *Mecp2* führt ebenfalls zu neurologischen Störungen in Mäusen (Collins et al., 2004). Die Funktion von MBD1 besteht analog zu MeCP2 in der Interaktion mit Metylierungsmustern der DNA und vermutlich in der Regulation der Genexpression über Histonmodifikationen in der Umgebung dieser methylierten DNA-Sequenzen, wie auch eventuell in der Mitwirkung an der Steuerung der Embryogenese (Tabelle 7) (Horike et al., 2005; Dosoby und Selker, 2001; Danam et al 2005; Zoghbi, 2005; Hendrich et al., 2001; Shahbazian und Zoghbi, 2002). Inwieweit es sich hier um dynamische Regulationsmechanismen wie bei der DNA-Methylierung handelt und inwieweit sie miteinander Wechselwirken, bleibt zu klären (Gaudet et al., 2004; Fujita et al., 2003; Reik et al., 2001; Santos et al., 2005; Li E., 2002; Schotta et al., 2004; Lehnertz et al., 2003).

4.1 Konditional MBD1-defiziente Mäuse

Bei den konditional MBD1-defizienten Mäusen mit getargeten Allelen waren exemplarisch die Resultate für die Genotypisierung nach PCR-Analyse identisch mit denjenigen durch Southernblot-Analyse. Auf eine Verpaarung mit Cre-exprimierenden Mäusen habe ich bisher verzichtet, da sich die MBD1-defizienten Mäuse als fertil und lebensfähig erwiesen, wovon zu Beginn der Arbeit nicht ausgegangen werden konnte. Bei den konditionalen Tieren mit getargeten MBD1-Allelen erwies sich als sehr interessant, dass die Genexpression von *Mbd1*

verringert ist (Abbildung 10). Dieses Ergebnis muss überprüft werden, wenn wieder Mäuse zur Verfügung stehen. Somit kann eventuell von einer hypomorphen Expression gesprochen werden. Als mögliche Erklärung sehe ich eine transkriptionelle Interferenz mit der Neomycin-Kassette, welche einen eigenen PGK-Promotor und eine eigene Terminatorsequenz beinhaltet. Weiterhin integrierte die Neomycin-Kassette in entgegen gesetzter Orientierung zum *Mbd1*-Gen, was vermutlich die Gentranskription stört. Trotzdem wurden im Westernblot vergleichbare (Abbildung 11) Proteinkonzentrationen gefunden. Somit wurde keine Korrelation zwischen RNA- und Proteingehalt festgestellt, sodass die Translation des Proteins analog zu *Mecp2* möglicherweise posttranskriptionell reguliert wird. Expressionsanalysen werden nach der Cryokonservierung der Linie wiederholt.

Epigenetische Mechanismen führen zu einer unterschiedlichen Expression von mutiertem *p53* in transgenen Mäusen (Krepulat et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Tumorprogression ist bis heute unklar (Gaudet et al., 2003; Eden et al., 2003; Berger und Bird, 2005; Fraga et al., 2005; Rountree et al., 2001; Astuti et al., 2005; Schlegel et al., 2002; Yamada et al., 2005). Zusätzlich führt ein Verlust von Imprinting zu einer erhöhten Tumorprogression in adulten Mäusen (Holm et al., 2005). Auf eine weiterführende Analyse der konditional MBD1-defizienten Mäuse wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt verzichtet, obwohl sich diese Linie für die Generierung von Mausmodellen mit kombinierter Gendefizienz anbietet. In *Dnmt1*-defizienten Zellen, gewonnen aus den DNMT1-defizienten Mäusen, wurde eine *p53*-bedingte Apoptose und eine Fehlregulation von chromatinmodifizierenden Proteinen analysiert (Laird und Jaenisch, 1996; Jackson-Grusby et al., 2001; Holm et al., 2005; Gaudet et al., 2003; Peterson et al., 2003). *P53*-defiziente Mausmodelle weisen eine Deregulation der DNA-Methyltransferasen auf und zeigen einen Verlust der parentalen Methylierung am *Igf2/H19*-Locus (Park et al., 2005). Ferner entwickeln sie Karzinome. In weiterführenden Experimenten könnte man konditional MBD1-defiziente Mäuse mit konditionalen tumorsuppressorgen-defizienten Mäusen verpaaren. Konditional defiziente Mäuse wie zum Beispiel das RB1-Mausmodell (Retinoblastoma 1 Modell) existieren seit längerer Zeit (Gonzalo et al., 2005; Robertson et al., 2000). Außerdem sind konditionale Mausmodelle mit Tumorsuppressordefizienz wie zum Beispiel *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MDM2* inzwischen käuflich erwerbbar (Jax.mice). Für aufwendige molekularbiologische Analysen im Säugetier könnten ebenfalls kombinierte, defiziente Mausmodelle erzeugt werden. Hierbei könnten die Vorteile des konditionalen Cre-lox-Systems zum Tragen kommen, um organspezifische Expressionsstudien durchzuführen.

Weiterhin vermute ich, dass MBD1 einen Einfluss auf die Tumorgenese hat. Bei MBD1 besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass es Onkogene hemmen oder zur Reprimierung von Tumorsuppressorgenen führen könnte (Patra et al., 2003; Campell et al., 2004; Villa et al., 2005; Rountree et al., 2001; Ballestar und Esteller, 2005). So wäre ein sehr interessanter Ansatz, MBD1-defiziente Tiere mit APC- Mäusen zu kreuzen, um die mögliche veränderte Tumorgenese zu beurteilen (Ballestar et al., 2003; Berger und Bird, 2005; Millar et al., 2002; Sansom et al., 2003 und 2005).

Aus Mausstudien und molekularen Erkrankungen beim Menschen kann geschlossen werden, welche Gene bei der Embryonalentwicklung essentiell sind. *Mbd1* gehört, wie in dieser Arbeit gezeigt, mit *Mbd2* und *Mecp2* nicht zu dieser Genkategorie. So kann hingegen davon ausgegangen werden, dass die embryonale Letalität der MBD3-defizienten Mäuse auf die essentielle Funktion des MBD3-NuRD-Komplexes rückzuführen ist (Wade et al., 1999; Zhang et al., 1999). Generell ist bis heute unklar, inwieweit epigenetische Regulationsmechanismen miteinander Wechselwirken (Jaenisch und Bird, 2003; Peters et al., 2002). Außerdem ist unklar, ob DNA- Methylierung die Histonmethylierung bzw. Histonacetylierung in Säugetieren steuert oder vice versa (Dosoby und Selker, 2001; Danam et al., 2005; Jenuwein und Allis, 2001; Lehnertz et al., 2003). Ein sehr interessantes Experiment unternahm Hashimshony et al. 2003. Sie erzeugten konditional transgene Mäuse mit einem menschlichen β -Globin-Gen, das sich hinter einem Insel-Element befand. Dieses Insel-Element schützt das Transgen vor DNA-Methylierung, indem es eine *de novo*-Methylierung des transgenen β -Globin-Promotors durch Dnmt3a und b verhindert. Mit Hilfe der Integration von zwei loxP-Stellen in dem Transgen kann dieses Insel-Element mittels Cre-Rekombinase induzierten Deletionen sowohl vor als auch nach der Implantation in der murinen Gebärmutter entfernt werden. Je nach Zeitpunkt der Entfernung wurden verschiedene Histonmodifikationen an Histon H3 gefunden. Hierzu gehörten die Acetylierung und die Methylierung der Lysine 4 und 9 (Grandjean et al., 2001). Aus diesem Experiment kann gefolgert werden, dass die unterschiedliche DNA-Methylierung des Transgens, gesteuert durch den Zeitpunkt der *in vivo*-DNA-Methylierung bei der Embryogenese, unterschiedliche Histonmodifikationen induziert (Reik et al., 2003; Santos et al., 2002 und 2005). Weiterhin wurde eine *Mecp2*-Anreicherung an methylierten, transgenen DNA-Sequenzen festgestellt. Ich habe keine unterschiedliche Intensität von Histon-H3-Acetylierung oder Histon-H3-Di- und Tri-Methylierung in Hirn- oder Lebergewebe von MBD1-defizienten Mäusen finden können, wie es in *MECP2*-defizienten Mäusen auftritt (Shahbazian et al., 2003). Um aber den

Einfluss von Mbd1 und die damit verbundenen veränderten Histonmodifikationen genauer zu analysieren, muss man individuelle genomische Loci untersuchen (Hashimshony et al., 2003; Auriol et al., 2005; Horike et al., 2005). Dieses ist mittels Chromatin-Immunpräzipitation möglich, würde aber den Rahmen dieser Promotion sprengen.

4.2 Phänotyp der MBD1-defizienten Mäuse

Die MBD1-defiziente Mauslinie wurde erzeugt, indem *in vitro* in die murinen ES-Zellen mit getargetem Allel transient ein Cre-exprimierendes Plasmid transfiziert wurde. Hierdurch wurde Exon 2 mit dem Startcodon deletiert. Somit wird Mbd1, das methylierte DNA bindet, nicht mehr translatiert. Außerdem wird kein verkürztes Mbd1 erzeugt, wie aus dem Westernblot der MBD1-defizienten Mäuse hervorgeht. Diese Vorgehensweise führt zu einer fehlenden Erkennung methylierter DNA durch das Mbd1-Protein. Ferner benötigen alle vier bekannten Spleißisoformen von Mbd1 das Startcodon in Exon 2. Außerdem beinhalten die MBD1-defizienten Mäuse weder Reporterkonstrukte noch Selektionskassetten. Die Genotypisierung der MBD1-defizienten Mäuse erfolgte über eine Multiplex-PCR mittels drei Primern. Exemplarisch waren die Resultate der PCR-Analyse identisch mit der Southernblot-Analyse. In den MBD1-defizienten Mäusen ist in RT-PCR-Analysen nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA keine MBD1-mRNA mit Gen-spezifischen Primern zu detektieren (Abbildung 15). Analog konnte auf Proteinebene mit einem spezifischen Antikörper kein Mbd1-Protein mehr nachgewiesen werden (Abbildung 16). Die MBD1-defizienten Mäuse sind lebensfähig und fertil. Ich vermute somit eine dynamische Bindung von Mbd1 an methylierte Promotoren, da ansonsten ein auffälligerer Phänotyp entstanden wäre. Weiterhin konnte ich *in vitro*-Studien nicht bestätigen, in denen gezeigt wurde, dass Mbd1 zum Beispiel die Expression von *Snrpn* inhibiert (Fujita et al., 2000). Ich habe eine unveränderte Expression von *Snrpn* in den defizienten Mäusen vorgefunden (Abbildung 20).

Als auffälliges Phänomen ist die geringere Anzahl an weiblichen MBD1-defizienten Mäusen (70 männliche zu 51 weibliche) zu nennen (Tabelle 6). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass eine gestörte X-chromosomale Inaktivierung in weiblichen Tieren die Entwicklung von extra-embryonalen Gewebe wie die Plazenta beeinflusst (Sado et al., 2000; Young und Zoghbi, 2004; Georgiades et al., 2001; Hemberger, 2002). Somit würde eine gestörte Versorgung der weiblichen Mausembryonen mit Nährstoffen und Sauerstoff zum Tode führen. Generell wurde

gezeigt, dass extraembryonales Gewebe im Gegensatz zu embryonalem Gewebe geringer methyliert ist (Reik et al., 2001). Ferner wird in extraembryonalen Geweben wie der Plazenta bevorzugt das paternale X-Chromosom inaktiviert (Wutz et al., 2002; Hemberger, 2002). Diese Inaktivierung wird von dem Imprintinggen *Xist* induziert, das nur im inaktiven X-Chromosom exprimiert wird. Inwieweit die Regulation von *Xist* über Heterochromatinproteine reguliert wird, bleibt spekulativ (Mermoud et al., 2002; Csankovski et al., 2001). *Mecp2* gehört zu den Proteinen, die in der X-Chromosominaktivierung involviert sind. Bei Mutationen im *Mecp2*-Gen ist diese gestört (Watson et al., 2005). *Mbd1* könnte aber als Regulator durchaus in die engere Wahl fallen. Da *Mbd1* erst ab dem Blastozystenstadium exprimiert wird (Jaxmice Informatic) und dieses Phänomen nur bei den weiblichen defizienten Tieren auftritt, ist es möglich, dass MBD1 die Schwangerschaft geschlechtsspezifisch beeinflusst. Für weiterführende Untersuchungen würde ich die Genexpression in der Plazenta untersuchen (Georgiades et al., 2001; Ferguson-Smith und Surani, 2001). Bei der Phänotypisierung von MECP2-defizienten Mäusen wurde eine gestörte X-Chromosominaktivierung analysiert, wobei dieser Befund in Beziehung zum Rett-Syndrom diskutiert wird (Young and Zoghbi, 2004). Auffällige Organschädigungen wurden in den homozygoten MBD1-defizienten Mäusen nicht festgestellt, sie sind lebensfähig. Es wurden sehr kleine Wildtyp- als auch MBD1-defiziente Weibchen vorgefunden. Die Gewichtszunahme in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht scheint innerhalb der Norm zu liegen, obwohl dieser Parameter bei den MBD1-defizienten Tieren sehr schwankt. Bei MECP2-defizienten Tieren ist die Gewichtszunahme auffällig (Pelka et al., 2005). Dies könnte ein Ansatzpunkt für die Analyse der Expression von Imprinting-Genen sein, da diese Genklasse oft für das Wachstum von Säugetieren verantwortlich ist (Pelka et al., 2005; Jaenisch und Bird, 2003; Tilghman, 1999). Ich habe kein Imprinting-Gen gefunden, das von *Mbd1* *in vivo* signifikant reguliert wird. Im Gegenteil, die Expression von *Ube3a*, *Snrpn* (auch im Hirngewebe von MECP2-defizienten Mäusen; Horike et al., 2005) und *U2af1-rs1* bleibt nahezu unverändert (Abbildung 21). Für weiterführende Untersuchungen müssten mehr Mäuse aus Verpaarungen mit verschiedenen Genotypen analysiert werden und umfassendere Expressionsstudien in verschiedenen Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Genchips durchgeführt werden. Ferner ist es essentiell, die paternale oder maternale Expression der zu analysierenden Gene zurückverfolgen zu können (Ferguson-Smith und Surani, 2001; Constancia et al., 2001; Hemberger, 2002).

Signifikant um 21,0% erhöht ist der Quotient von Herz- und Körpergewicht bei jungen, weiblichen, MBD1-defizienten Mäusen (von 6,7 \pm 0,4 zu 5,7 \pm 0,2 mg/g; Abbildung 18). Aus weiterführenden Untersuchungen mittels Ultraschall wurde aber nicht festgestellt, dass dieser Parameter durch hypertrophe Herzen bei den MBD1-defizienten Weibchen zustande kommt (Tabelle 8). Im Gegensatz zu den MECP2-defizienten Mäusen liegen keine Herzrhythmusstörungen vor (Zoghbi et al., 2005). Weitere Analysen in dieser Richtung sind vorgesehen. Die Skelettentwicklung hingegen scheint unauffällig. Zhao et al. zeigten 2003 ebenfalls, dass MBD1-defiziente Mäuse fertil und lebensfähig sind. Weiterhin fanden sie in Untersuchungen beschränkt auf das Maushirn eine eingeschränkte Neurogenese bei adulten neuronale Stammzellen (ANC) und eine Beeinträchtigung der Hippocampusfunktion. Außerdem zeigten die ANCs eine verringerte Differenzierung, eine genomische Instabilität und eine veränderte Chromosomenzahl (Aneuploidie). Ihre Schlussfolgerung ist, dass DNA-Methylierung und ihre Erkennung durch Mbd1, wichtig für die zelluläre genomische Stabilität und essentiell für neuronale Stammzellen und für eine unbeeinträchtigte Hirnfunktion ist. Somit zeigten sie in den MBD1-defizienten Mäusen, in denen Exon 2 bis 10 deletiert ist und ein lacZ-Reporterkonstrukt integriert wurde, dass die Tiere Defekte im räumlichen Lernverhalten aufweisen. In Expressionsprofilen wurde ausschließlich eine Expressionserhöhung von IAPs (intracisternal A particle, Retrotransposon) im Hippocampus gefunden. Es wurden geringere Hirngewichte bei MBD1-defizienten Tieren in einem 129-Hintergrund festgestellt. IAP stellt einen Methylierungsmarker dar (Lane et al., 2003; Gaudet et al., 2004). Ob bei den MBD1-defizienten Mäusen Histonmodifikationen oder eine veränderte Expression von Imprinting-Genen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht betroffen sind, wurde nicht untersucht. Fernerhin beschränkte sich die Analyse auf das Gehirn der Mäuse. Im Gegensatz zu MECP2-defizienten Mäusen, bei denen auch das Zentralnervensystem betroffen ist, wurde bei MBD1-defizienten Mäusen kein verändertes Angstverhalten festgestellt (Zoghbi et al., 2005; Pelka et al., 2006). Gegenwärtige Untersuchungen der MBD1-defizienten Mäuse werden zur Zeit mit der Experimentellen Pharmakologie des UKEs durchgeführt. Ein Schwerpunkt wird auf das Herz gelegt. Um das Problem des genetischen Hintergrundes zu umgehen (Wolfer et al., 2002) wurden heterozygote Tiere über mehr als zwei Jahr verpaart und auf einen C57BL6-Hintergrund zurückgekreuzt. Hierbei wird der Anteil des S129-Hintergrundes der ES-Zellen (R1) minimiert.

Als erste biochemische Untersuchungen wurden Expressionsanalysen im Gehirn der Mäuse durchgeführt. Es wurde 2002 von Fournier et al. gezeigt, dass MBD1 mit dem maternalen Allel

der Differentiell Methylierten Domäne (DMD) von den Imprinting-Genen *Snrpn*, *Igf2r* und *U2af1-rs1* assoziiert ist. Ferner wurde beschrieben, dass *Mecp2* die Expression von *Ube3a* reguliert (Samaco et al., 2005). So ist in MECP2-defizienten Mäusen eine reduzierte Expression zu finden, was aber umstritten ist (Makedonski et al., 2005; Jordan und Francke, 2006). Weiterhin wurde eine methylierungsabhängige Inaktivierung der Imprinting-Kontrollregion (DMD) von H19 durch *Mecp2* festgestellt (Drewell et al., 2002). Ich analysierte die Imprinting-Gene *H19*, *Ube3a*, *U2af1-rs1*, *Peg3*, *Snrpn* und *Igf2r* auf ihre Expression im Gehirn von MBD1-defizienten Mäusen (Vu et al., 2000; Samaco et al., 2005; Horike et al., 2005). Hierbei konnte ich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen nachweisen (Grandjean et al., 2001; Li E. et al., 1993; Li L. et al., 2000). Ferner wurde gezeigt, dass MBD1 für die Funktion von PML-RAR-alpha notwendig ist. PML-RAR-alpha induziert eine Blockierung der hämatopoetischen Differenzierung. Als Folge entsteht eine akute, promyelocytische Leukämie (Villa et al., 2006). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass MeCP2 für das Zellwachstum von Prostatakrebszellen notwendig ist (Bernard et al., 2006). MBD2 zeigt im Mausmodell mit APC-Hintergrund einen Einfluss auf die Tumorgenese. Ich untersuchte die Expression von den Tumorsuppressor-Genen *Brca1*, *Brca2*, *Wt1*, *Rb1*, *Nf1*, *Mdm2* und *p53* in Hirnen von MBD1-defizienten Mäusen (Astuti et al., 2005).

Wie in dieser Arbeit gezeigt (Abbildung 20) ist die Expression von Imprinting-Genen wie *Ube3a*, *U2af1-rs1* und *Snrpn* (Fournier et al., 2002) und der Tumorsuppressor-Gene *Brca2* und *Wt1* (Auriol et al., 2005; Astuti et al., 2005; Fraga et al., 2005) in den MBD1-defizienten Maushirnen unverändert. *Mecp2* reguliert die *Bdnf*-Expression im Gehirn (Chang et al., 2006; Chen et al., 2003). In MECP2-defizienten Mäusen wurde eine reduzierte *Bdnf*-Konzentration gefunden. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und der *BDNF*-Expression geschlossen (Asaka et al., 2006; Chang et al., 2006; Moretti et al., 2005 und 2006). Ich habe eine nichtsignifikante Reduzierung der Expression von *Bdnf* im Herzgewebe gezeigt (Abbildung 21). Inwieweit dieser Befund mit dem neurologischen Phänotyp bei MBD1-Defizients einhergeht, bleibt zu untersuchen (Zhao et al., 2003). MECP2-defiziente Mäuse sterben vermutlich an Herz-Kreislaufversagen. Deshalb untersuchten wir das Herzgewebe der MBD1-defizienten Mäuse (Weese-Mayer et al., 2006; Zoghbi et al., 2005; Ballestar und Wolffe, 2001; Ballestar und Esteller, 2005). Dies geschah mittels Ultraschallanalysen. Außerdem werden herzspezifische Gene über Histonacetylierung reguliert.

Bisherige Messungen haben gezeigt, dass eine unveränderte Expression der Imprinting-Gene *Ube3a*, *U2af1-rs1* und *Snrpn* im Herzen von Wildtyp- und MBD1-defizienten Mäusen vorliegt. Ferner ist die Expression der beiden Tumorsuppressor-Gene *Wt1* und *Brca2* im Herzen der MBD1-defizienten Mäuse nicht signifikant verringert. Das spontane Auftreten von Herztumoren wurde bei den MBD1-defizienten Mäusen nicht beobachtet. Generell kann aber auch gesagt werden, dass Herztumore sehr selten entstehen. Weiterhin konnte ich eine Repression des *Snrpn*-Promoters durch Mbd1, wie es in Zellkulturstudien gefunden wurde (Fujita et al., 2001), nicht bestätigen.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass eine gestörte DNA-Methylierung sehr schwerwiegende Auswirkungen hat, was aufgrund der Phänotypen der DNMT-defizienten Mäusen zu folgern ist (Li E. et al., 1992; Li E., 2002; Lee et al., 2001; Binizskiewicz et al., 2002; Bestor, 2000; Okano et al., 1999). Inwieweit Methyl-CpG-bindende-Proteine (MBDs) die Verbindung zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikationen darstellen, bleibt zu klären (Danam et al., 2005; Shahbazian und Zoghbi, 2002; Zhao et al., 2005; Dobosy und Selker, 2001; Sarraf und Stancheva., 2004). Es wurde ein Komplex zwischen DNMT1 und HDAC1, RB und E2F1 identifiziert, der eine direkte Interaktion zwischen methylierter DNA und Deacetylierung von Histon H1 ermöglichen könnte (Robertson et al., 2000). Ferner ist die Expression von *DNMT1* für Histon-H3-Modifikationen notwendig. Weitere Analysen von veränderten Histonmodifikationen in MBD-defizienten Mäusen stehen aus (Horike et al., 2005; Shahbazian und Zoghbi, 2002). MECP2-defiziente Tiere zeigen geringe Expressionsunterschiede im Gehirn, weisen aber einen dem Rett-Syndrom analogen Phänotyp auf (Tudor et al., 2002; Asaka et al., 2006; Dani et al., 2005; Moretti et al., 2005 und 2006; Pelka et al., 2006; Akbarian et al., 2001; Zhogbi et al., 2005). Der Krankheitsverlauf ist hierbei von der *Bdnf*-Expression abhängig (Chang et al., 2006). Ferner kann die induzierte Expression von *Mecp2* im Mausmodell den Rett-analogen Phänotyp beheben (Luikenhuis et al., 2004).

Aufgrund meiner Arbeit konnte somit eine Lücke bei der Etablierung von MBD-defizienten Mausmodellen geschlossen werden. Somit existieren bis heute MBD-defiziente (Knockout) Mauslinien von MECP2, MBD1 (C57BL6-Hintergrund; Olaf Friese und 129S4-Hintergrund; Zhao et al., 2003), MBD2 und MBD4. Mit Hilfe des konditionalen Ansatzes sind zwei konditional defiziente Linien von MECP2 und die in dieser Arbeit gezeigte von MBD1 verfügbar. Nach erfolgter Cryokonservierung sind die konditional MBD1-defizienten Mäuse (mit getargeten Allelen) und die MBD1-defiziente Mauslinie auch anderen Laboratorien

zugänglich. So kann zum Beispiel am Mausmodell untersucht werden, ob MBD1 bei Autismus eine relevante Funktion zugeordnet werden kann (Li et al., 2005; Bienvenu und Chelly, 2006). Ferner ist zu analysieren, inwieweit eine MBD1-Defizienz für ein beeinträchtigtes Lernverhalten und für eine reduzierte Neurogenese und für eine genomische Instabilität verantwortlich ist (Zhao et al., 2003; Setoguchi et al., 2006). Außerdem vermute ich, dass die Funktionen von MeCP2 und MBD1 sich ähneln, da beide defiziente Mausmodelle neurologische Störungen aufweisen, obwohl der Phänotyp der MECP2-defizienten Mäuse auffälliger ist. Weiterführende Experimente mit diesen Mausmodellen sollen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen, die die Interpretation des DNA-Methylierungsmuster und Chromatinmodifikationen via Methyl-CpG-bindendem Protein 1 lenken.

5 Zusammenfassung

DNA-Methylierung in der Dinukleotidsequenz CpG ist von entscheidender Bedeutung bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Säugetierzellen, bei der allelspezifischen Genexpression (Imprinting) und bei der Inaktivierung von repetitiven genomischen Elementen (Retrotransposons und endogenen Retroviren). Weiterhin ist DNA-Methylierung essentiell für die Entwicklung von Säugetieren und deren Genregulation. Bevorzugt im Heterochromatin lokalisiertes Methyl-CpG-bindendes Protein 1 (MBD1) gehört einer Familie von Methyl-CpG bindenden Proteinen mit den Mitgliedern MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 an, die das Methylierungsmuster der DNA interpretieren. Frühere Analysen defizienter Mäuse zeigen, dass Methyl-CpG-bindende Proteine die Tumorgenese beeinflussen und durch die Interaktion mit histonmodifizierenden Proteinen die Genexpression *in vivo* steuern. Murines Mbd1 enthält mehrere funktionelle Domänen und kommt in vier Splicevarianten vor; die Volle-Längen-Variante v1 enthält 636 Aminosäuren. Der Methyl-CpG-Bindungsdomäne folgen ein Kernlokalisierungssignal, dann drei cysteinreiche CXXC-Domänen, welche eine unspezifische DNA-Bindung bewirken, und schließlich C-terminal eine transkriptionelle Repressordomäne.

Um die Funktion von MBD1 *in vivo* zu charakterisieren, wurden konditional MBD1-defiziente Mäuse mit getargeten Allelen und MBD1-defiziente (MBD1-Knockout) Mäuse generiert. Für die letzteren Mäuse wurde Exon 2, welches das Startcodon enthält und etwa die Hälfte der Methyl-CpG-Bindungsdomäne kodiert, deletiert. Bei den Mäusen mit getargetem Allel wurde die Möglichkeit einer embryonal letal wirkenden Defizienz berücksichtigt und somit ein konditionaler Ansatz verfolgt. Zu Anfang klonierte ich einen Targeting-Vektor, der einen kurzen und einen langen Arm mit genomischer *Mbd1*-Sequenz enthält, welche durch das *Neomycin-resistenz*-Gen und drei loxP-Stellen unterbrochen sind. Nach Elektroporation des linearisierten Vektors in murine ES-Zellen wurden Klone selektioniert, in denen der Vektor mit dem *Mbd1*-Locus homolog rekombinierte und ein getargetes Allel entstand. Korrekte Klone wurden mittels Southernblot- und PCR-Analysen identifiziert. Zwei Klone wurden in Blastozysten injiziert und in scheinchwangere Mäuse implantiert. Resultierende chimäre Mäuse wurden mit Wildtypmäusen gekreuzt, um heterozygote Tiere zu erhalten. Für die Generierung der MBD1-defizienten Mäuse wurden ES-Zellen mit getargetem Allel mit einem Cre-exprimierenden

Plasmid transient transfiziert. Klone mit deletiertem Exon 2 wurden mittels Southernblot- und PCR-Analysen identifiziert. Wiederum wurden zwei Klone in Blastozysten injiziert und in scheinchwangere Mäuse implantiert. Hieraus entstanden neun chimäre Tiere, die ebenfalls mit Wildtypmäusen rückgekreuzt wurden. Alle genetischen Manipulationen waren keimbahngängig. Insgesamt wurden somit vier Mauslinien erhalten, zwei konditional MBD1-defiziente Linien mit getargetem Allel und zwei MBD1-defiziente Linien.

Die konditional MBD1-defizienten Mäuse mit getargetem Allel zeigten eine verringerte Expression des *Mbd1*-Gens, aber relativ zu Wildtypmäusen eine unveränderte Mbd1-Protein-Expression in Lebergewebe. Die MBD1-defiziente Mäuse waren lebensfähig und fertil. Interessanterweise war die Häufigkeit homozygoter weiblicher MBD1-defizienten Nachkommen relativ zu derjenigen heterozygoter und Wildtyp-Geschwisterweibchen reduziert; mögliche Ursachen werden diskutiert. Ein Analyseschwerpunkt der MBD1-defizienten Mäuse war das Herz. Das relative Herzgewicht aller MBD1-defizienten Mäuse zusammengenommen entsprach dem der Wildtypmäuse. Jedoch war das relative Herzgewicht in der Subpopulation der 12 bis 16 Wochen alten MBD1-defizienten Weibchen um $21,0\% \pm \text{SEM } 0,42$ ($p < 0,05$) erhöht. Verschiedene andere Parameter des Herzens waren allerdings unverändert. Ebenso unverändert war die Expression einer Reihe von Imprinting- und Tumorsuppressorgenen in Hirn und Herz, u.a. die Expression des Imprintinggens *Snrpn*. Dies war unerwartet, da frühere Chromatin-Immunpräzipitationen zeigten, dass MBD1 mit dem *Snrpn*-Gen assoziiert ist. Weiterführende Untersuchungen mit den konditional MBD1-defizienten sowie MBD1-defizienten Mäusen sollten zu einem besseren Verständnis der epigenetischen Mechanismen beitragen, wie die Interpretation des DNA-Methylierungsmusters zu veränderten Chromatinmodifikationen und Genexpressionen führt.

6 Summary

DNA methylation at CpG dinucleotides is crucial for silencing of one of the two X chromosomes in mammalian cells, for imprinting and for inactivation of repetitive elements (retrotransposons and endogenous retroviruses). Furthermore, DNA methylation is essential for mammalian development and for regulating mammalian gene expression. Methyl-CpG-binding protein 1 (MBD1), which preferentially localizes in heterochromatin regions, belongs to the family of methyl-CpG-binding proteins comprising the members MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 and MBD4, which interpret the DNA methylation pattern. Previous mice deficient in one of these proteins show that methyl-CpG-binding proteins influence tumorigenesis and regulate gene expression *in vivo* through interaction with histone modifying proteins. Murine Mbd1 harbors several functional domains and occurs in four splice variants; the full-length variant v1 contains 636 amino acids. The methyl-CpG-binding domain is followed by a nuclear localization signal, three cysteine-rich CXXC domains, which mediate unspecific DNA binding, and a C-terminal transcriptional repression domain.

To characterize the function of Mbd1 *in vivo*, I generated conditional MBD1-deficient mice with targeted alleles and MBD1-deficient (MBD1-knockout) mice. In the latter mice exon 2, which contains the start codon and encodes half of the methyl-CpG-binding domain, is deleted. The mice with targeted alleles were generated in order to be used in case that MBD1-deficient mice would have been embryonically lethal. In the beginning I cloned a targeting vector which contains a short and a long arm with genomic *Mbd1* sequences interrupted by the *neomycin resistance* gene and three lox-P-sites. After electroporation of the linearized vector into murine embryonic stem cells I screened stem cell clones in which the vector underwent homologous recombination with the *Mbd1*-gene to generate a targeted allele. Correct clones were identified by Southern blotting and PCR-analyses. Two clones were injected into blastocysts and implanted into pseudopregnant mice. Resulting chimeric mice were crossed with wild type mice to obtain heterozygous conditional MBD1-deficient mice with a targeted allele. To generate MBD1-deficient mice, stem cells with a targeted allele were transfected with a Cre-expressing plasmid. Clones with deleted exon 2 were identified by Southern blotting and PCR analyses. Again two clones were injected into blastocytes and implanted into pseudo pregnant mice. Nine resulting chimeric mice were back-crossed with wild type mice. All genetic manipulations had germline

transmission. Totally, I generated four mouse lines, two conditional MBD1-deficient lines with targeted alleles and two MBD1-deficient lines.

Conditional MBD1-deficient mice with targeted alleles show reduced expression of the *Mbd1*-gene, but – relative to wild type mice – an unchanged Mbd1 protein expression. MBD1-deficient mice were viable and fertile. Interestingly, the frequency of homozygous female MBD1-deficient mice were reduced relative to that of heterozygous and wildtype sister females; possible causes are discussed. I focussed on analyses of various heart functions of the MBD1-deficient animals. The relative heart weight of all MBD1-deficient mice corresponded to that of wild type mice. However, the relative heart weight in the subgroup of 12 to 16 weeks old MBD1-deficient mice was elevated by $21,0\% \pm \text{SEM } 0,42$ ($p < 0.05$). Yet various other parameters of the heart were unaltered. Also expression of various imprinting and tumor suppressor genes in brain and heart were unchanged, including expression of the imprinting gene *Snrpn*. This was unexpected since previous chromatin immunoprecipitation analyses showed that MBD1 is associated with the *Snrpn* gene. Further studies using the conditional MBD1-deficient mice as well as the MBD1-deficient mice should lead to a better understanding of the epigenetic mechanisms of how interpretation of the DNA methylation pattern directs modified chromatin structures and altered gene expression.

7 Literatur

1. Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J. P. & Thompson, E. M. (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124, 4615-25.
2. Akbarian, S., Chen, R. Z., Gribnau, J., Rasmussen, T. P., Fong, H., Jaenisch, R. & Jones, E. G. (2001). Expression pattern of the Rett syndrome gene MeCP2 in primate prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 8, 784-91.
3. Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U. & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-8.
4. Andersen, J. B., Strandbygard, D. J., Hartmann, R. & Justesen, J. (2004). Interaction between the 2'-5' oligoadenylate synthetase-like protein p59 OASL and the transcriptional repressor methyl CpG-binding protein 1. *Eur J Biochem* 271, 628-36.
5. Antequera, F. & Bird, A. P. (1988). Unmethylated CpG islands associated with genes in higher plant DNA. *Embo J* 7, 2295-2299.
6. Arber, W. (1965). [the Role of DNA Methylation in the Control My the Host of Modification of the Bacteriophage.]. *Pathol Microbiol (Basel)* 28, 71-2.
7. Asaka, Y., Jugloff, D. G., Zhang, L., Eubanks, J. H. & Fitzsimonds, R. M. (2006). Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 21, 217-27.
8. Astuti, D., Latif, F., Wagner, K., Gentle, D., Cooper, W. N., Catchpoole, D., Grundy, R., Ferguson-Smith, A. C. & Maher, E. R. (2005). Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour. *Br J Cancer* 92, 1574-80.
9. Auriol, E., Billard, L. M., Magdinier, F. & Dante, R. (2005). Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res* 33, 4243-54.
10. Bader, S., Walker, M., McQueen, H. A., Sellar, R., Oei, E., Wopereis, S., Zhu, Y., Peter, A., Bird, A. P. & Harrison, D. J. (2003). MBD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancers. *Oncogene* 22, 3506-10.
11. Ballestar, E. & Esteller, M. (2005). Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochem Cell Biol* 83, 374-84.
12. Ballestar, E., Paz, M. F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M. F., Espada, J., Cigudosa, J. C., Huang, T. H. & Esteller, M. (2003). Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *Embo J* 22, 6335-45.
13. Ballestar, E., Pile, L. A., Wassarman, D. A., Wolffe, A. P. & Wade, P. A. (2001). A Drosophila MBD family member is a transcriptional corepressor associated with specific genes. *Eur J Biochem* 268, 5397-406.
14. Ballestar, E., Ropero, S., Alaminos, M., Armstrong, J., Setien, F., Agrelo, R., Fraga, M. F., Herranz, M., Avila, S., Pineda, M., Monros, E. & Esteller, M. (2005). The impact of MECP2 mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients. *Hum Genet* 116, 91-104.
15. Ballestar, E. & Wolffe, A. P. (2001). Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268, 1-6.
16. Ballestar, E., Yusufzai, T. M. & Wolffe, A. P. (2000). Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochemistry* 39, 7100-6.
17. Bao, S., Obata, Y., Carroll, J., Domeki, I. & Kono, T. (2000). Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. *Biol Reprod* 62, 616-21.
18. Barton, S. C., Arney, K. L., Shi, W., Niveleau, A., Fundele, R., Surani, M. A. & Haaf, T. (2001). Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. *Hum Mol Genet* 10, 2983-7.
19. Barton, S. C. & Surani, M. A. (1993). Manipulations of genetic constitution by nuclear transplantation. *Methods Enzymol* 225, 732-44.
20. Beard, C., Li, E. & Jaenisch, R. (1995). Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 9, 2325-34.
21. Berger, J. & Bird, A. (2005). Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* 33, 1537-40.

22. Bernard, D., Gil, J., Dumont, P., Rizzo, S., Monte, D., Quatannens, B., Hudson, D., Visakorpi, T., Fuks, F. & de Launoit, Y. (2006). The methyl-CpG-binding protein MECP2 is required for prostate cancer cell growth. *Oncogene* 25, 1358-66.
23. Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203, 971-83.
24. Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9, 2395-402.
25. Bienvenu, T. & Chelly, J. (2006). Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7, 415-26.
26. Biniszkiwicz, D., Gribnau, J., Ramsahoye, B., Gaudet, F., Eggan, K., Humpherys, D., Mastrangelo, M. A., Jun, Z., Walter, J. & Jaenisch, R. (2002). Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 22, 2124-35.
27. Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-13.
28. Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U. & Renkawitz, R. (2000). The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* 275, 34963-7.
29. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. & Cedar, H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371, 435-8.
30. Brunner, E., Weitzel, J., Heitmann, B., Maurer, T., Strätling, W. H. & Kalbitzer, H. R. (2000). Sequence-specific ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignments of the MAR-binding domain of chicken MeCP2/ARBP. *J Biomol NMR* 17, 175-6.
31. Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 24, 3118-9.
32. Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F. & Stewart, A. F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 24, 4256-62.
33. Budden, S. S. & Gunness, M. E. (2003). Possible mechanisms of osteopenia in Rett syndrome: bone histomorphometric studies. *J Child Neurol* 18, 698-702.
34. Buhrmester, H., von Kries, J. P. & Strätling, W. H. (1995). Nuclear matrix protein ARBP recognizes a novel DNA sequence motif with high affinity. *Biochemistry* 34, 4108-117.
35. Buschdorf, J. P. & Strätling, W. H. (2004). A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* 82, 135-43.
36. Campbell, P. M., Bovenzi, V. & Szyf, M. (2004). Methylated DNA-binding protein 2 antisense inhibitors suppress tumourigenesis of human cancer cell lines in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 25, 499-507.
37. Cerrato, F., Dean, W., Davies, K., Kagotani, K., Mitsuya, K., Okumura, K., Riccio, A. & Reik, W. (2003). Paternal imprints can be established on the maternal Igf2-H19 locus without altering replication timing of DNA. *Hum Mol Genet* 12, 3123-32.
38. Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S. & Jaenisch, R. (2006). The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341-8.
39. Chen, R. Z., Akbarian, S., Tudor, M. & Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-31.
40. Chen, T., Ueda, Y., Xie, S. & Li, E. (2002). A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* 277, 38746-54.
41. Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., Jaenisch, R. & Greenberg, M. E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-9.
42. Clark, S. J., Harrison, J. & Frommer, M. (1995). CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet* 10, 20-7.
43. Collins, A. L., Levenson, J. M., Vilaythong, A. P., Richman, R., Armstrong, D. L., Noebels, J. L., David Sweatt, J. & Zoghbi, H. Y. (2004). Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet* 13, 2679-89.
44. Constancia, M., Dean, W., Lopes, S., Moore, T., Kelsey, G. & Reik, W. (2000). Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19. *Nat Genet* 26, 203-6.
45. Csankovszki, G., Nagy, A. & Jaenisch, R. (2001). Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153, 773-84.

46. Danam, R. P., Howell, S. R., Brent, T. P. & Harris, L. C. (2005). Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Mol Cancer Ther* 4, 61-9.
47. Dani, V. S., Chang, Q., Maffei, A., Turrigiano, G. G., Jaenisch, R. & Nelson, S. B. (2005). Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12560-5.
48. Dobosy, J. R. & Selker, E. U. (2001). Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci* 58, 721-7.
49. Drewell, R. A., Goddard, C. J., Thomas, J. O. & Surani, M. A. (2002). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res* 30, 1139-44.
50. Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.
51. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-63.
52. Ergun, S., Buschmann, C., Heukeshoven, J., Dammann, K., Schnieders, F., Lauke, H., Chalajour, F., Kilic, N., Strätling, W. H. & Schumann, G. G. (2004). Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem* 279, 27753-63.
53. Espada, J., Ballestar, E., Fraga, M. F., Villar-Garea, A., Juarranz, A., Stockert, J. C., Robertson, K. D., Fuks, F. & Esteller, M. (2004). Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* 279, 37175-84.
54. Fatemi, M. & Wade, P. A. (2006). MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J Cell Sci* 119, 3033-7.
55. Feng, J., Chang, H., Li, E. & Fan, G. (2005). Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res* 79, 734-46.
56. Feng, Q. & Zhang, Y. (2001). The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15, 827-32.
57. Ferguson-Smith, A., Lin, S. P., Tsai, C. E., Youngson, N. & Tevendale, M. (2003). Genomic imprinting--insights from studies in mice. *Semin Cell Dev Biol* 14, 43-9.
58. Ferguson-Smith, A. C., Reik, W. & Surani, M. A. (1990). Genomic imprinting and cancer. *Cancer Surv* 9, 487-503.
59. Ferguson-Smith, A. C. & Surani, M. A. (2001). Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 293, 1086-9.
60. Fournier, C., Goto, Y., Ballestar, E., Delaval, K., Hever, A. M., Esteller, M. & Feil, R. (2002). Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J* 21, 6560-70.
61. Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Roperio, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. & Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37, 391-400.
62. Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M. & Nakao, M. (2000). Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20, 5107-18.
63. Fujita, N., Takebayashi, S., Okumura, K., Kudo, S., Chiba, T., Saya, H. & Nakao, M. (1999). Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol Cell Biol* 19, 6415-26.
64. Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Ohkuma, Y., Chiba, T., Saya, H. & Nakao, M. (2003). MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 23, 2834-43.
65. Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. & Nakao, M. (2003). Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278, 24132-8.
66. Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H. & Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489-92.
67. Gaudet, F., Rideout, W. M., 3rd, Meissner, A., Dausman, J., Leonhardt, H. & Jaenisch, R. (2004). Dnmt1 expression in pre- and postimplantation embryogenesis and the maintenance of IAP silencing. *Mol Cell Biol* 24, 1640-8.

68. Gemelli, T., Berton, O., Nelson, E. D., Perrotti, L. I., Jaenisch, R. & Monteggia, L. M. (2006). Postnatal loss of methyl-CpG binding protein 2 in the forebrain is sufficient to mediate behavioral aspects of Rett syndrome in mice. *Biol Psychiatry* 59, 468-76.
69. Georgiades, P., Watkins, M., Burton, G. J. & Ferguson-Smith, A. C. (2001). Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4522-7.
70. Gilbert, N., Boyle, S., Sutherland, H., de Las Heras, J., Allan, J., Jenuwein, T. & Bickmore, W. A. (2003). Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *Embo J* 22, 5540-50.
71. Gonzalo, S., Garcia-Cao, M., Fraga, M. F., Schotta, G., Peters, A. H., Cotter, S. E., Eguia, R., Dean, D. C., Esteller, M., Jenuwein, T. & Blasco, M. A. (2005). Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol* 7, 420-8.
72. Grandjean, V., O'Neill, L., Sado, T., Turner, B. & Ferguson-Smith, A. (2001). Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain. *FEBS Lett* 488, 165-9.
73. Groudine, M., Eisenman, R. & Weintraub, H. (1981). Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation. *Nature* 292, 311-7.
74. Gruenbaum, Y., Cedar, H. & Razin, A. (1982). Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* 295, 620-2.
75. Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J. E. & Bird, A. (2001). A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322-6.
76. Hashimshony, T., Zhang, J., Keshet, I., Bustin, M. & Cedar, H. (2003). The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet* 34, 187-92.
77. Hata, K., Okano, M., Lei, H. & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983-93.
78. Heitmann, B., Maurer, T., Weitzel, J. M., Strätling, W. H., Kalbitzer, H. R. & Brunner, E. (2003). Solution structure of the matrix attachment region-binding domain of chicken MeCP2. *Eur J Biochem* 270, 3263-70.
79. Hemberger, M. (2002). The role of the X chromosome in mammalian extra embryonic development. *Cytogenet Genome Res* 99, 210-7.
80. Hendrich, B., Abbott, C., McQueen, H., Chambers, D., Cross, S. & Bird, A. (1999). Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome* 10, 906-12.
81. Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V. A. & Bird, A. (2001). Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 15, 710-23.
82. Herrler, A., von Rango, U. & Beier, H. M. (2003). Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online* 6, 244-56.
83. Holm, T. M., Jackson-Grusby, L., Brambrink, T., Yamada, Y., Rideout, W. M., 3rd & Jaenisch, R. (2005). Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell* 8, 275-85.
84. Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J. F. & Kohwi-Shigematsu, T. (2005). Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* 37, 31-40.
85. Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W. M., 3rd, Binszkiewicz, D., Yanagimachi, R. & Jaenisch, R. (2001). Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293, 95-7.
86. Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N. & Nakao, M. (2005). Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* 280, 13928-35.
87. Jackson, J. P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P. B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. & Jacobsen, S. E. (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112, 308-15.
88. Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. & Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 27, 31-9.
89. Jaenisch, R. & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl, 245-54.
90. Jaenisch, R., Harbers, K., Jahner, D., Stewart, C. & Stuhlmann, H. (1982). DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *J Cell Biochem* 20, 331-6.
91. Jang, J. S., Lee, S. J., Choi, J. E., Cha, S. I., Lee, E. B., Park, T. I., Kim, C. H., Lee, W. K., Kam, S., Choi, J. Y., Kang, Y. M., Park, R. W., Kim, I. S., Cho, Y. L., Jung, T. H., Han, S. B. & Park, J. Y. (2005). Methyl-CpG binding domain 1 gene polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Cancer*

- Epidemiol Biomarkers Prev 14, 2474-80.
92. Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-80.
 93. Jordan, C. & Francke, U. (2006). Ube3a expression is not altered in Mecp2 mutant mice. *Hum Mol Genet*.
 94. Jorgensen, H. F., Ben-Porath, I. & Bird, A. P. (2004). Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol Cell Biol* 24, 3387-95.
 95. Kantor, B., Kaufman, Y., Makedonski, K., Razin, A. & Shemer, R. (2004). Establishing the epigenetic status of the Prader-Willi/Angelman imprinting center in the gametes and embryo. *Hum Mol Genet* 13, 2767-79.
 96. Koch, C. & Strätling, W. H. (2004). DNA binding of methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human MCF7 cells. *Biochemistry* 43, 5011-21.
 97. Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Niwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Park, E. S., Seo, J. S. & Ogawa, H. (2004). Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428, 860-4.
 98. Krepulat, F., Löhler, J., Heinlein, C., Hermannstadter, A., Tolstonog, G. V. & Deppert, W. (2005). Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. *Oncogene* 24, 4645-59.
 99. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-20.
 100. Laird, P. W. & Jaenisch, R. (1996). The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30, 441-64.
 101. Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J. & Reik, W. (2003). Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35, 88-93.
 102. Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P. & Hogan, B. L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424-36.
 103. Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D. & Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
 104. Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R. & Wilson, C. B. (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763-74.
 105. Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. & Peters, A. H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13, 1192-200.
 106. Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-73.
 107. Li, E., Beard, C., Forster, A. C., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. (1993). DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 297-305.
 108. Li, E., Beard, C. & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-5.
 109. Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-26.
 110. Li, H., Yamagata, T., Mori, M., Yasuhara, A. & Momoi, M. Y. (2005). Mutation analysis of methyl-CpG binding protein family genes in autistic patients. *Brain Dev* 27, 321-5.
 111. Li, J. Y., Lees-Murdock, D. J., Xu, G. L. & Walsh, C. P. (2004). Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 84, 952-60.
 112. Li, L. L., Szeto, I. Y., Cattana, B. M., Ishino, F. & Surani, M. A. (2000). Organization and parent-of-origin-specific methylation of imprinted Peg3 gene on mouse proximal chromosome 7. *Genomics* 63, 333-40.
 113. Li, T., Vu, T. H., Ulaner, G. A., Littman, E., Ling, J. Q., Chen, H. L., Hu, J. F., Behr, B., Giudice, L. & Hoffman, A. R. (2005). IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Mol Hum Reprod* 11, 631-40.
 114. Loc, P. V. & Strätling, W. H. (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *Embo J* 7, 655-64.
 115. Loebel, D. A. & Tam, P. P. (2004). Genomic imprinting: mice without a father. *Nature* 428, 809-11.
 116. Lopes, S., Lewis, A., Hajkova, P., Dean, W., Oswald, J., Forne, T., Murrell, A., Constancia, M.,

- Bartolomei, M., Walter, J. & Reik, W. (2003). Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet* 12, 295-305.
117. Luikenhuis, S., Giacometti, E., Beard, C. F. & Jaenisch, R. (2004). Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6033-8.
118. Makedonski, K., Abuhatzira, L., Kaufman, Y., Razin, A. & Shemer, R. (2005). MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Hum Mol Genet* 14, 1049-58.
119. Mann, J. R. (2001). Imprinting in the germ line. *Stem Cells* 19, 287-94.
120. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501-2.
121. Mermoud, J. E., Popova, B., Peters, A. H., Jenuwein, T. & Brockdorff, N. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* 12, 247-51.
122. Millar, C. B., Guy, J., Sansom, O. J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P. D., Bishop, S. M., Clarke, A. R. & Bird, A. (2002). Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 297, 403-5.
123. Moretti, P., Bouwknecht, J. A., Teague, R., Paylor, R. & Zoghbi, H. Y. (2005). Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14, 205-20.
124. Moretti, P., Levenson, J. M., Battaglia, F., Atkinson, R., Teague, R., Antalffy, B., Armstrong, D., Arancio, O., Sweatt, J. D. & Zoghbi, H. Y. (2006). Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 26, 319-27.
125. Moretti, P. & Zoghbi, H. Y. (2006). MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Curr Opin Genet Dev* 16, 276-81.
126. Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W. & Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1, R47-58.
127. Morgan, H. D., Sutherland, H. G., Martin, D. I. & Whitelaw, E. (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23, 314-8.
128. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8424-8.
129. Nakao, M., Matsui, S., Yamamoto, S., Okumura, K., Shirakawa, M. & Fujita, N. (2001). Regulation of transcription and chromatin by methyl-CpG binding protein MBD1. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S174-6.
130. Nan, X., Campoy, F. J. & Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-81.
131. Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-9.
132. Ng, H. H., Jeppesen, P. & Bird, A. (2000). Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20, 1394-406.
133. Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. & Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23, 58-61.
134. Niwa, K., Takano, R., Obata, Y., Hiura, H., Komiyama, J., Ogawa, H. & Kono, T. (2004). Nuclei of oocytes derived from mouse parthenogenetic embryos are competent to support development to term. *Biol Reprod* 71, 1560-7.
135. Nunes, S. M., Ferralli, J., Choi, K., Brown-Luedi, M., Minet, A. D. & Chiquet-Ehrismann, R. (2005). The intracellular domain of teneurin-1 interacts with MBD1 and CAP/ponsin resulting in subcellular codistribution and translocation to the nuclear matrix. *Exp Cell Res* 305, 122-32.
136. Obata, Y. & Kono, T. (2002). Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 277, 5285-9.
137. Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J., Ikegami, T., Nakao, M. & Shirakawa, M. (2001). Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell* 105, 487-97.
138. Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Nakao, M. & Shirakawa, M. (1999). Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD1. *Embo J* 18,

6653-61.

139. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-57.
140. Okano, M., Xie, S. & Li, E. (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26, 2536-40.
141. Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. & Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10, 475-8.
142. Park, I. Y., Sohn, B. H., Choo, J. H., Joe, C. O., Seong, J. K., Lee, Y. I. & Chung, J. H. (2005). Deregulation of DNA methyltransferases and loss of parental methylation at the insulin-like growth factor II (Igf2)/H19 loci in p53 knockout mice prior to tumor development. *J Cell Biochem* 94, 585-96.
143. Patra, S. K., Patra, A., Zhao, H., Carroll, P. & Dahiya, R. (2003). Methyl-CpG-DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 759-66.
144. Pelka, G. J., Watson, C. M., Radziewicz, T., Hayward, M., Lahooti, H., Christodoulou, J. & Tam, P. P. (2006). Mecp2 deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain* 129, 887-98.
145. Peters, A. H., Mermoud, J. E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N. & Jenuwein, T. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* 30, 77-80.
146. Peters, A. H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M. & Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323-37.
147. Peters, J. & Beechey, C. (2004). Identification and characterisation of imprinted genes in the mouse. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2, 320-33.
148. Peterson, E. J., Bogler, O. & Taylor, S. M. (2003). p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res* 63, 6579-82.
149. Phi-Van, L., von Kries, J. P., Ostertag, W. & Strätling, W. H. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol* 10, 2302-7.
150. Pickard, B., Dean, W., Engemann, S., Bergmann, K., Fuermann, M., Jung, M., Reis, A., Allen, N., Reik, W. & Walter, J. (2001). Epigenetic targeting in the mouse zygote marks DNA for later methylation: a mechanism for maternal effects in development. *Mech Dev* 103, 35-47.
151. Rauch, C., Trieb, M., Wibowo, F. R., Wellenzohn, B., Mayer, E. & Liedl, K. R. (2005). Towards an understanding of DNA recognition by the methyl-CpG binding domain 1. *J Biomol Struct Dyn* 22, 695-706.
152. Razin, A. & Kafri, T. (1994). DNA methylation from embryo to adult. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 48, 53-81.
153. Reese, B. E., Bachman, K. E., Baylin, S. B. & Rountree, M. R. (2003). The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 3226-36.
154. Reichwald, K., Thiesen, J., Wiehe, T., Weitzel, J., Strätling, W. H., Kioschis, P., Poustka, W. A., Rosenthal, A., Platzer, M., (2000). Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* 11, 182-90.
155. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089-93.
156. Reik, W., Murrell, A., Lewis, A., Mitsuya, K., Umlauf, D., Dean, W., Higgins, M. & Feil, R. (2004). Chromosome loops, insulators, and histone methylation: new insights into regulation of imprinting in clusters. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69, 29-37.
157. Rett, A. (1966). Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 37, 723-726.
158. Rideout, W. M., 3rd, Eggan, K. & Jaenisch, R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-8.
159. Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P. A., Jones, P. L. & Wolffe, A. P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25, 338-42.
160. Roloff, T. C., Ropers, H. H. & Nuber, U. A. (2003). Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC Genomics* 4, 1.
161. Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G. & Baylin, S. B. (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20, 3156-65.

162. Sado, T., Fenner, M. H., Tan, S. S., Tam, P., Shioda, T. & Li, E. (2000). X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol* 225, 294-303.
163. Sado, T. & Ferguson-Smith, A. C. (2005). Imprinted X inactivation and reprogramming in the preimplantation mouse embryo. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1, R59-64.
164. Samaco, R. C., Hogart, A. & LaSalle, J. M. (2005). Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 14, 483-92.
165. Samiec, P. S. & Goodman, J. I. (1999). Evaluation of methylated DNA binding protein-1 in mouse liver. *Toxicol Sci* 49, 255-62.
166. Sansom, O. J., Berger, J., Bishop, S. M., Hendrich, B., Bird, A. & Clarke, A. R. (2003). Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 34, 145-7.
167. Sansom, O. J., Bishop, S. M., Bird, A. & Clarke, A. R. (2005). MBD2 deficiency does not accelerate p53 mediated lymphomagenesis. *Oncogene* 24, 2430-2.
168. Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. & Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241, 172-82.
169. Santos, F., Peters, A. H., Otte, A. P., Reik, W. & Dean, W. (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* 280, 225-36.
170. Sarraf, S. A. & Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* 15, 595-605.
171. Sasaki, H., Jones, P. A., Chaillet, J. R., Ferguson-Smith, A. C., Barton, S. C., Reik, W. & Surani, M. A. (1992). Parental imprinting: potentially active chromatin of the repressed maternal allele of the mouse insulin-like growth factor II (Igf2) gene. *Genes Dev* 6, 1843-56.
172. Schlegel, J., Guneyusu, S. & Mennel, H. D. (2002). Expression of the genes of methyl-binding domain proteins in human gliomas. *Oncol Rep* 9, 393-5.
173. Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. & Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18, 1251-62.
174. Setoguchi, H., Namiyama, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T. & Nakashima, K. (2006). Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J Neurosci Res*.
175. Shahbazian, M., Young, J., Yuva-Paylor, L., Spencer, C., Antalffy, B., Noebels, J., Armstrong, D., Paylor, R. & Zoghbi, H. (2002). Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35, 243-54.
176. Shahbazian, M. D. & Zoghbi, H. Y. (2002). Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet* 71, 1259-72.
177. Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A. D. & Razin, A. (1997). Structure of the imprinted mouse Snrpn gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10267-72.
178. Simon, D., Stuhlmann, H., Jahner, D., Wagner, H., Werner, E. & Jaenisch, R. (1983). Retrovirus genomes methylated by mammalian but not bacterial methylase are non-infectious. *Nature* 304, 275-7.
179. Strätling, W. H. & Yu, F. (1999). Origin and roles of nuclear matrix proteins. Specific functions of the MAR-binding protein MeCP2/ARBP. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9, 311-8.
180. Surani, M. A., Kothary, R., Allen, N. D., Singh, P. B., Fundele, R., Ferguson-Smith, A. C. & Barton, S. C. (1990). Genome imprinting and development in the mouse. *Dev Suppl*, 89-98.
181. Szabo, P. E., Tang, S. H., Silva, F. J., Tsark, W. M. & Mann, J. R. (2004). Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 24, 4791-800.
182. Tate, P., Skarnes, W. & Bird, A. (1996). The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet* 12, 205-8.
183. Tudor, M., Akbarian, S., Chen, R. Z. & Jaenisch, R. (2002). Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15536-41.
184. Villa, R., Morey, L., Raker, V. A., Buschbeck, M., Gutierrez, A., De Santis, F., Corsaro, M., Varas, F., Bossi, D., Minucci, S., Pelicci, P. G. & Di Croce, L. (2006). The methyl-CpG binding protein MBD1 is required for PML-RAR{alpha} function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1400-5.
185. von Kries, J. P., Buhmester, H. & Strätling, W. H. (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* 64, 123-35.
186. von Kries, J. P., Phi-Van, L., Diekmann, S. & Strätling, W. H. (1990). A non-curved chicken

- lysozyme 5' matrix attachment site is 3' followed by a strongly curved DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 18, 3881-5.
187. von Kries, J. P., Rosorius, O., Buhrmester, H. & Strätling, W. H. (1994). Biochemical properties of attachment region binding protein ARBP. *FEBS Lett* 342, 185-8.
188. Vu, T. H., Li, T., Nguyen, D., Nguyen, B. T., Yao, X. M., Hu, J. F. & Hoffman, A. R. (2000). Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human IGF2-H19 imprinted region. *Genomics* 64, 132-43.
189. Wade, P. A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23, 1131-7.
190. Wade, P. A., Geggion, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F. & Wolffe, A. P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23, 62-6.
191. Watanabe, S., Ichimura, T., Fujita, N., Tsuruzoe, S., Ohki, I., Shirakawa, M., Kawasuji, M. & Nakao, M. (2003). Methylated DNA-binding domain 1 and methylpurine-DNA glycosylase link transcriptional repression and DNA repair in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12859-64.
192. Watson, C. M., Pelka, G. J., Radziewicz, T., Shahbazian, M. D., Christodoulou, J., Williamson, S. L. & Tam, P. P. (2005). Reduced proportion of Purkinje cells expressing paternally derived mutant *Mecp2308* allele in female mouse cerebellum is not due to a skewed primary pattern of X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 14, 1851-61.
193. Weese-Mayer, D. E., Lieske, S. P., Boothby, C. M., Kenny, A. S., Bennett, H. L., Silvestri, J. M. & Ramirez, J. M. (2006). Autonomic Nervous System Dysregulation: Breathing and Heart Rate Perturbation during Wakefulness in Young Girls with Rett Syndrome. *Pediatr Res*.
194. Weissbach, A. (1993). A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *Exs* 64, 1-10.
195. Weitzel, J. M., Buhrmester, H. & Strätling, W. H. (1997). Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Mol Cell Biol* 17, 5656-66.
196. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-3.
197. Wolfer, D. P., Crusio, W. E. & Lipp, H. P. (2002). Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25, 336-40.
198. Wutz, A., Rasmussen, T. P. & Jaenisch, R. (2002). Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nat Genet* 30, 167-74.
199. Xu, G. L., Bestor, T. H., Bourc'his, D., Hsieh, C. L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. J. & Viegas-Pequignot, E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402, 187-91.
200. Yamada, Y., Jackson-Grusby, L., Linhart, H., Meissner, A., Eden, A., Lin, H. & Jaenisch, R. (2005). Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13580-5.
201. Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A. & Zhao, G. Q. (2000). Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14, 1053-63.
202. Young, J. I. & Zoghbi, H. Y. (2004). X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of rett syndrome. *Am J Hum Genet* 74, 511-20.
203. Yu, F., Thiesen, J. & Strätling, W. H. (2000). Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 28, 2201-6.
204. Yu, F., Zingler, N., Schumann, G. & Strätling, W. H. (2001). Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* 29, 4493-501.
205. Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. & Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-35.
206. Zhao, W., Soejima, H., Higashimoto, K., Nakagawachi, T., Urano, T., Kudo, S., Matsukura, S., Matsuo, S., Joh, K. & Mukai, T. (2005). The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J Biochem (Tokyo)* 137, 431-40.
207. Zhao, X., Ueba, T., Christie, B. R., Barkho, B., McConnell, M. J., Nakashima, K., Lein, E. S., Eadie, B. D., Willhoite, A. R., Muotri, A. R., Summers, R. G., Chun, J., Lee, K. F. & Gage, F. H. (2003). Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6777-82.
208. Zoghbi, H. Y. (2005). MeCP2 dysfunction in humans and mice. *J Child Neurol* 20, 736-40.

8 Anhang

8.1 Allgemeine Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| ARBP | Attachment region binding protein |
| AS | Aminosäuren |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Ci | Curie |
| CIAP | Calf intestine alkaline phosphatase |
| MeCP2 | MeCP2 / ARBP |
| CpG | Cytidin-Guanosin-Dinukleotid |
| cpm | Counts per minute |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytosintriphosphat |
| ddNTP | Didesoxynucleosidtriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMD | differentiell methylierte Domäne |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNMT | DNA-Methyltransferase |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz |
| EST | Expressed sequence tag |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FISH | Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung |
| h | Stunde(n) |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| ICF syndome | Immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome |
| IPTG | Isopropyl- β -thiogalactopyranosid |
| Kb / kb | Kilobasenpaare / kilobasepairs |
| kDa | Kilodalton |
| LINE | Long interspersed nuclear repeat |
| LTR | Long terminal repeat |
| M | Molar |
| MAR | Matrix attachment region |

| | |
|--------------|---|
| MBD | Methyl-CpG-Bindungsdomäne |
| MBD1 | humanes Methyl-CpG bindendes Protein 1 |
| Mbd1 | murines Methyl-CpG bindendes Protein 1 |
| <i>MBD1</i> | humanes Methyl-CpG bindendes Protein 1 Gen |
| <i>Mbd1</i> | murines Methyl-CpG bindendes Protein 1 Gen |
| MeCP2 | humanes Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 |
| Mecp2 | murines Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 |
| <i>MECP2</i> | humanes Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 Gen |
| <i>Mecp2</i> | murines Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 Gen |
| mCi | Millicurie |
| MCS | Multiple Klonierungsstelle |
| min | Minute |
| MIR | Mammalian-wide interspersed repeat |
| mM | Millimolar |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NLS | Nuclear localisation signal |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz |
| ORF | Open reading frame |
| p. A. | zur Analyse |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PR | Prolin-reiche Region |
| Rb | murines Retinoblastoma Protein 1 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SAR | scaffold attachment region |
| SATB | specific AT-rich DNA binding protein |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SINE | Short interspersed nuclear element |
| SV | Sarkom-Virus |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TPRT | Target primed reverse transcription |
| TRD | Transkriptionelle Repressor Domäne |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TSA | Trichostatin A |
| U | Units |
| UKE | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid |

8.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 2000 bis April 2006 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Leitung von meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Wolf H. Strätling angefertigt.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Wolf H. Strätling für die intensive Betreuung der Arbeit. Viele anregende Diskussionen haben die wissenschaftliche Arbeit begleitet und mir fortlaufend neue Aspekte aufgezeigt.

Herrn Prof. Dr. Hahn möchte ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Vertretung meiner Arbeit gegenüber dem Fachbereich Chemie danken.

Herrn Prof. Dr. Deppert danke ich sehr für die Prüfungsteilnahme.

Irm Hermans-Borgmeyer, Michael Boesl, Tina Koppelman, Thorsten Schinke, Peter Nolau, Frauke Krepulat, Edzard Schwedhelm, Renke Maaß, Anna Stennpaß, Mirja Reichel, Nicole Lüneburg, Martin Karjalainen, Ali El-Armouche, Ivan Melnychenko, Christina Rogge, Karim Sultan, Birgitt Henkel, Joachim Weitzel, Fang Yu, Jan Buschdorf, Christoph Koch, Nora Zingler, Christian Buschmann, Gerald Schumann, Susanne Giehler, Mirjana Raikovitch, Angelika Harneit, Heidi Schwarzenbach, Imke Müller, Frank Schnieders, Siegfried Himpel und Steffen Rietz danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre kollegiale Unterstützung im Labor. Ebenso danke ich allen Kollegen der Zellulären Signaltransduktion und allen Mitarbeitern des Instituts für den fortwährenden wissenschaftlichen Austausch und das kollegiale Miteinander. Weiterhin bedanke ich mich bei den Tierpflegern und Tierpflegerinnen des UKEs.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die gewährte Unterstützung im Rahmen des SFB 545 (Teilprojekt B2: molekulare Mechanismen von Krankheiten), sowie

Prof. W. H. Zimmermann und

Prof. R. Boeger.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

