

Institut für Pathologie und Rechtsmedizin
Abteilung Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. P. Möller

**Untersuchungen zum Einfluss der Promotermethylierung auf die
Regulation der Leptinexpression während der Differenzierung
von Präadipozyten zu Adipozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Vanessa Andrea Scott

aus
Neu-Ulm

Ulm 2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Wabitsch

Tag der Promotion: 20. Januar 2006

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung **4**

2 Material **13**

- 2.1 Geräte
- 2.2 Chemikalien
- 2.3 Zusammensetzung von Lösungen, Puffer und Medien
- 2.4 Oligonukleotide und Primer

3 Methoden **22**

- 3.1 Zellkultur
- 3.2 RNA-Extraktion und reverse Transkription
- 3.3 DNA-Extraktion
- 3.4 Bisulfitmodifikation und Einzelstrang-PCR
- 3.5 Klonierung von PCR-Produkten
- 3.6 DNA-Sequenzierung
- 3.7 Transiente Transfektion
- 3.8 Gelshift-Experimente

4 Ergebnisse **43**

- 4.1 Leptinexpression in LiSa-2 Zellen
- 4.2 Leptinpromoter, CpG-Blott
- 4.3 5-MeC-Gehalt des Leptinpromoters
- 4.4 Sequenzierungen
- 4.5 Transiente Transfektion
- 4.6 Gelshift

5 Diskussion	63
---------------------	-----------

6 Zusammenfassung	71
--------------------------	-----------

7 Literaturverzeichnis	73
-------------------------------	-----------

Danksagung

Publikationen

Lebenslauf

Abkürzungen

5-aza-C	5-aza-Cytidin
5-aza-dC	5-aza-2'-desoxycytidin
A	Adenosin
APS	Ammoniumpersulfat
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary Desoxyribonekleinsäure
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
cm	Zentimeter
CpG-Dinukleotid	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CpG-Insel	CpG-reiche Region
d	Tage
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
dNTP Mix	Desoxynukleosidtriphosphat Mix
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTT	1,4-Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAS	Fatty acid synthetase
FCS	Fetal Calf Serum
g	Graviditätskoeffizient
G	Guanin
GCG	Genetics Computer Group
GLUT 4	Glucosetransporter 4
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin

H ₂ O	Wasser
Il-6	Interleukin 6
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JAK 2	Janus Kinase 2
KCl	Kaliumchlorid
LPL	Lipoproteinlipase
M	Mol
µl	Mikroliter
5-MeC	5-Methylcytosin
MeCP	Methyl CpG binding protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PPAR _γ	peroxysomal-proliferator-activated-receptor-γ2
R	Adenosin oder Guanin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	n-Dodecylsulfat-Natriumsalz
STAT	signal transducers and activators of transcription
sec	Sekunden
T	Thymin
TFIIB	Transcription factor II B
TNFα	Tumornekrosefaktor
U	Units
X-Gal	5-Bromo-4-3-indolyl-β-D-galaktosidase
Y	Cytosin oder Thymin

1 Einleitung

Adipositas, der abnorme Anstieg der Masse an Fettgewebe, ist in der westlichen Welt mit ungefähr 310 Millionen Betroffenen eine der am weitesten verbreitetsten Krankheiten überhaupt (91). Mit ihr verbunden sind unter anderem Atherosklerose, Herzkrankheiten, hoher Blutdruck und Diabetes mellitus. Das Fettgewebe, das nicht nur von Adipozyten, sondern auch von Vorläuferzellen (Präadipozyten) sowie Nerven, Stromazellen, Gefäßen und Immunzellen gebildet wird, rückt immer weiter in den Fokus der aktuellen Forschung. Längst ist bekannt, dass es sich dabei nicht um ein passives Energiereservoir sondern ein komplexes und metabolisch hoch aktives endokrines Organ handelt (52). Es exprimiert zahlreiche, sogenannte „adipose-derived factors“ (Adipozytokine) unter denen sich Zytokine wie Leptin, TNF α und IL-6, Substanzen die dem fibrinolytischen System zugeordnet werden, des Komplementsystems (Adipsin (Komplement Faktor B), Adiponektin), zahlreiche Lipide bzw. Lipoproteine (Apolipoprotein E, Lipoproteinlipase) und Enzyme des Steroidmetabolismus finden (52). Das weitaus am besten untersuchte und bekannteste Adipozytokin ist jedoch Leptin, das von reifen Adipozyten, jedoch nicht von Präadipozyten exprimiert wird und als Markerprotein des Fettgewebes gilt (61).

In der folgenden Arbeit soll untersucht werden, wie die Expression dieses Markerproteins auf molekularer Ebene, durch die Methylierung der in der Promoterregion vorhandenen CpG-Dinukleotide reguliert wird.

Leptin

1994 wurde Leptin (aus dem Griechischen *leptos*, dünn) als „mouse obese gene“ erstmals beschrieben und das Gen von Zhang et al. kloniert (104, 43). Es konnte gezeigt werden, dass die Delezond-Mutation des Leptingens in sogenannten *ob⁻/ob⁻* Mäusen zu Adipositas führt, die durch die Gabe des Genprodukts Leptin therapiert werden konnte (39).

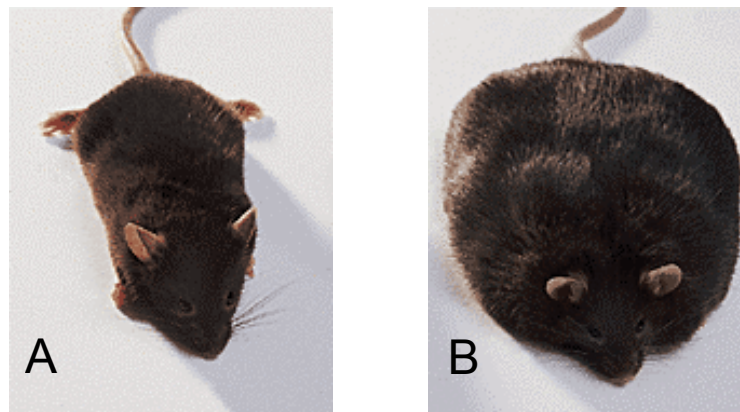


Abb. 1: **A:** Maus ohne Gendefekt, **B:** ob^{-}/ob^{-} Maus

(aus <http://www.hhmi.org/geneshwshare/d130.html>)

Leptin, mit einem Molekulargewicht von 16 kDa, ist ein Peptidhormon, das sich aus 167 Aminosäuren zusammensetzt und vorwiegend im weißen Fettgewebe von reifen Adipozyten synthetisiert und freigesetzt wird (47). Später wurde gezeigt, dass es auch in geringen Mengen in der Mukosa des Magens (5), im Synzitiotrophoblasten der Plazenta (84), der laktierenden Mamma (13) und Muskelzellen gebildet wird (100).

Zu den wichtigsten Funktionen von Leptin zählen dessen Einfluss auf den Energiehaushalt und das Körpergewicht (11, 17, 32). Zusätzlich beeinflusst Leptin die Reifung des reproduktiven Systems (15), die fetale Entwicklung (71), die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (42), die Hämatopoese (34), die Angiogenese (88) und die Immunantwort (58), wobei dessen Einfluss auf entzündliche und autoimmune Prozesse zunehmendes Interesse gewinnt (71). Strukturanalysen ergaben, dass die Konformation von Leptin derer von Zytokinen ähnelt (62, 105).

Es finden sich Leptinrezeptoren sowohl zentral im Hypothalamus als auch in der Peripherie (52). Beim Leptinrezeptor handelt es sich um ein Mitglied der Klasse I Zytokin Rezeptor Familie; die Ligandenbindung führt zur Aktivierung der Janus Kinase 2 (JAK 2) und aktiviert über Phosphorelierung STAT Proteine (signal transducers and activators of transription) (37).

Im Gegensatz zur ob^{-}/ob^{-} Maus ist der Leptinspiegel adipöser Menschen erhöht und korreliert mit der Masse an gespeichertem Fett (63, 30, 19). Er wird durch

verschiedene Faktoren beeinflusst, steigt unter Nahrungszufuhr (80), Insulin- und Glukokortikoid-, TNF α - oder Östrogeneinfluss an (52) und fällt in der Zeit des Fastens (9) sowie dem Einfluss von β 3-Rezeptor-Agonisten, Androgenen, freien Fettsäuren und PPAR γ -Agonisten ab (52).

Die DNA-Sequenz des menschlichen Leptins wurde auf Chromosom 7q31.3 lokalisiert und identifiziert (50). Sie überspannt etwa 20 Kilobasen und enthält drei Exons, die von zwei Introns getrennt werden. Exon 2 und 3 kodieren die Proteinsequenz. 29 Basenpaare stromab des ATG-Startkodon beginnt das erste Exon (50). In der Promoterregion sind die Erkennungssequenzen verschiedener Transkriptionsfaktoren lokalisiert: eine TATA-Box, drei GC Boxen (Sp1 Bindungsdomäne), eine Ap-2- und eine C/EBP- α -Bindungsstelle, die die Transkription regulieren (36).

Differenzierung adipozytärer Zellen

Unter dem Einfluss verschiedener zellulärer Faktoren können Vorläuferzellen zu reifen Zellen differenzieren. Die adulten Zellen unterscheiden sich von den Vorläuferzellen durch die Expression spezifischer Gene, die zur Ausprägung des neuen morphologischen und biochemischen Phänotyps führen.

Bis zu zwei Drittel der gesamten Zellzahl des menschlichen Fettgewebes bestehen aus reifen Adipozyten. Der Rest setzt sich aus verschiedenen Zelltypen, wie Blutzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und adipozytären Vorläuferzellen zusammen (1). Aus diesen adipozytären Vorläuferzellen lassen sich durch hormonelle Stimulation auch *in vitro* reife Adipozyten gewinnen.

Dazu werden die fibroblastenähnlichen präadipozytären Zellen aus kindlichem Fettgewebe gewonnen und mit den Hormonen Insulin, Insulin like growth factor, Kortison, Dexamethason und Trijodthyronin zur Differenzierung angeregt (82). Zunächst durchlaufen die Vorläuferzellen mehrere Zellteilungen (klonale Expansion), erreichen eine Phase des Teilungsstops, in der sie verharren und schließlich durch weitere Differenzierung adipozytenspezifische Gene exprimieren (20, 48, 77, 83).

Morphologisch ist der Prozess der Differenzierung an der Formänderung der spindelförmigen Präadipozyten zu rundlichen Adipozyten, dem Verlust der Teilungsfähigkeit und der zunehmenden Einlagerung von Fetttröpfchen erkennbar.

Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die adipozytäre Differenzierung

Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert auf molekularer Ebene den Prozess der Differenzierung:

Eine wichtige Rolle spielen Mitglieder der Familie der bZIP Transkriptionsfaktoren, die CAAT/enhancer-binding-proteine (C/EBP) (54, 60, 78). In der frühen Differenzierungsphase wird die Expression von C/EBP- β und C/EBP- γ durch cAMP, dessen Konzentration in der Zelle durch Insulin und Dexamethason erhöht wird, induziert. Sie fördern ihrerseits die weitere Differenzierung (57), da sie zur Expression von peroxysomal-proliferator-activated-receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) (85, 95) und C/EBP- α , einer weiteren Untergruppe der C/EBP-Transkriptionsfaktoren, führt (54). C/EBP- α sichert durch Verhinderung der Mitose den differenzierten Zustand (56, 97) und aktiviert die Expression einiger adipozytenspezifischer Gene, die den Fettstoffwechsel des Adipozyten regulieren wie LPL (Lipoproteinlipase), SCD (Stearyl-CoA-Desaturase), FAS (Fatty acid synthetase) und GLUT 4 (Glucosetransporter 4) (97).

Unter dem Einfluss von C/EBP- α differenzieren präadipozytäre Zellen zu reifen Adipozyten auch ohne hormonelle Stimulation (21).

Präadipozyten exprimieren den differenzierungsinhibierenden Transkriptionsfaktor AP 2 α oder CUP (C/EBP- α -undifferentiated-protein), das den C/EBP- α -Promoter reprimiert, und das membrangebundene Oberflächenprotein PREF-1 (Preadipocyte factor 1) (21). Ein weiterer Repressor der Adipogenese ist TNF- α , der sowohl die klonale Expansion als auch die Expression von C/EBP- α , PPAR- γ , LPL, AP 2 und GLUT 4 in bereits reifen Adipozyten inhibiert und zur Dedifferenzierung führt (21).

5-Methylcytosin (5-MeC) und DNA-Methylierung

5-MeC wurde vor über fünfzig Jahren wurde als erste modifizierte Base in der DNA entdeckt (45).

Seine Struktur entspricht dem des Cytosin, dessen Kohlenstoff an Position 5 des Pyrimidinrings methyliert ist. In der DNA-Sequenz des menschlichen Genoms kann in CpG-Dinukleotiden 5-MeC an Stelle von Cytosin vorliegen.

CpG-Dinukleotide sind im gesamten Genom stark unterrepräsentiert (etwa 10% der erwarteten CpG-Häufigkeit) und zu 70-80% methyliert (4). Als Grund für das verminderte Auftreten wird die hohe Mutationsrate von 5-Methylcytosin zu Thymin durch einen Deaminierungs Prozess angenommen (3,4). Es finden sich jedoch über das gesamte Genom verstreut CpG-Inseln, in denen CpG-Dinukleotide gehäuft vorkommen. Nach Gardiner-Garden und Frommer ist eine CpG-Insel ein Bereich größer als 200 bp mit einem hohen GC-Gehalt und einem beobachteten zur erwarteten CpG Verhältnis $> 0,6$ (35). Diese CpG-Inseln sind in den Keimzellen und in somatischen Zellen nicht methyliert. Sie sind häufig in der Promoterregion und den ersten Exons von sogenannten „house-keeping“-Genen (35) und transkriptionell aktiven Genen enthalten (69). Methylierte CpG-Inseln führen auf dem inaktiven X-Chromosom (6, 74, 76) zur Kondensation des Chromatins und damit zur Inhibierung der Transkription (4).

Dennoch finden sich die meisten methylierten Cytosine in CpG-Dinukleotiden, die nicht in CpG-Inseln lokalisiert sind, sondern sich in repetitiven, nicht kodierenden Sequenzen, der Satelliten DNA, befinden. Hier bewahrt die Methylierung jene „parasitären“ Regionen vor der Expression, die im Verlauf der Evolution mittels Virus oder struktureller Mutation in das Genom eingefügt wurden (96).

Die CpG-Methylierung in der Promoterregion eines Gens ist eine Möglichkeit, die Expression gewebespezifischer Gene zu regulieren (14, 41, 59). Diese Rolle der DNA-Methylierung zur Regulation der transkriptionellen Aktivität gewebespezifischer Gene erlangte einige Aufmerksamkeit und scheint ein Hauptmechanismus des Gen-„silencing“ in CpG reichen Genpromotoren zu sein (24, 26).

Möglichkeiten zur Detektion von 5-MeC

Die Funktion von 5-MeC blieb lange Zeit als Folge seiner mangelhaften Detektier- und Differenzierbarkeit in der DNA unklar. Die meisten der entwickelten Methoden zum Nachweis von 5-MeC beruhten auf dem Einsatz methylsensitiver Restriktionsenzyme wie *Sac I* oder *Bgl II* (89, 90). Diese schneiden die DNA an bestimmten Sequenzen, nicht jedoch, wenn 5-MeC an Stelle von Cytosin vorliegt.

Da nur eine begrenzte Anzahl der im Genom vorhandenen möglichen CpG-Dinukleotide sich innerhalb der von Restriktionsenzymen erkennbaren Stellen befinden, sind methylsensitive Restriktionsenzyme nur begrenzt einsetzbar.

Mittels Bisulfitmodifikation, durch das jedes in der DNA-Sequenz vorhandene Cytosin in Uracil chemisch umgewandelt, 5-MeC jedoch nicht verändert wird, kann 5-Methylcytosin von Cytosin unterschieden werden, z. B. mittels anschließender methylspezifischer Einzelstrang-PCR und Sequenzierung (16, 33). Hiermit kann sowohl der Gehalt an 5-Methylcytosin in einer DNA-Sequenz ermittelt als auch der Methylierungsstatus einzelner CpG-Dinukleotide in DNA-Sequenzen gezeigt und verglichen werden.

Synthese von 5-Methylcytosin in der DNA-Sequenz

Die Methylierung von Cytosin in der DNA-Sequenz findet nach der DNA-Synthese statt (7, 8). DNA-Methyltransferasen übertragen eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Cytosin (7, 8). Die DNMT 1 methyliert nach der Replikation der DNA an den hemimethylierten Strängen die nicht methylierte Seite. DNMT 2 und DNMT 3 hingegen methylieren die bisher nicht methylierte DNA als „de novo“-Methylierung (101).

LiSa-2 Zellen

Die menschliche Liposarkom-Zelllinie LiSa-2 wurde aus Zellen einer retroperitonealen Metastase eines wenig differenzierten Liposarkoms (pleomorpher Subtyp) eines 53-jährigen Mannes etabliert.

In serumhaltigem Medium sind LiSa-2 Zellen fibroblastoid und adhärent. Ihre Generationszeit beträgt 75 Stunden. In serumfreiem, basalem oder adipogenem Medium ist die Proliferation der Zellen reduziert. In serumhaltigem Medium lagerten wenige Zellen Lipidtröpfchen ein, was durch Zusatz des PPAR- γ -Agonisten BRL 49653 stark vermehrt wird. Insulin zeigt einen mitogenen Effekt. Diese Wachstumsregulation entspricht derer primärer menschlicher Präadipozyten (98).

Unter dem Einfluss von adipogenem Medium differenzierte ein Großteil der Zellen.

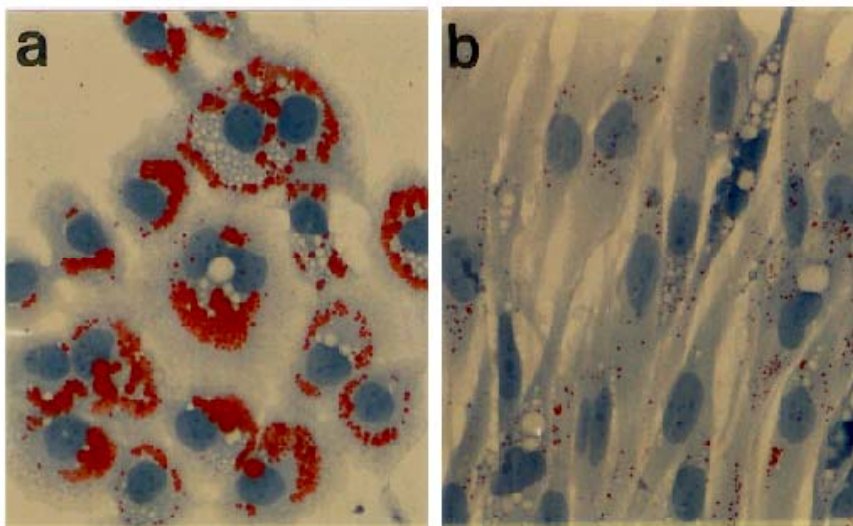


Abb. 2: LiSa-2 Zellen (HE/Sudanrot, 200-fache Vergrößerung) (99)

a: differenzierte Zellen unter dem Einfluss hormoneller Stimulation;

b: fibroblastoide Zellen in serumhaltigem Medium

Diese differenzierten LiSa-2 Zellen erfüllen auch die biochemischen Eigenschaften reifer Adipozyten. Sie exprimieren die adipozytären Markerproteine wie GLUT 4, PPAR γ , FAS und LPL, während die Expression präadipozytärer Marker (z. B. Kollagen und β Aktin) abnimmt. Eine Expression von Leptin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (99).

DNA-Demethylierung durch 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-aza-dC)

Durch Inkubation mit den Cytidin Analoga 5-Azacytidin (5-aza-C) oder 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-aza-dC) können präadipozytäre Zellen ohne hormonellen Einfluss zu Adipozyten differenzieren (93, 94, 79). Da 5-aza-C und 5-aza-dC die DNA-Cytosin-Methyltransferase hemmt, führt die Exposition zur nahezu vollständigen Demethylierung des Genoms mit resultierender chromosomaler Instabilität, Genaktivierung, Differenzierung oder Tumorgenese (38).

Hohe Dosen von 5-Azacytidin haben zytotoxische und antineoplastische Eigenschaften (38).

Fragestellung

- Exprimieren LiSa-2 Zellen nach Inkubation mit 5-aza-dC Leptin?
- Ändert sich im Verlauf der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten in der Promoterregion des humanen Leptingens der Gehalt an 5-MeC in den CpG-Dinukleotiden?
- Wie ändert sich der Gehalt an 5-MeC im Promoterbereich von LiSa-2 Zellen durch Inkubation mit 5-aza-dC?
- Ist die Promoterregion des Leptingens in LiSa-2 Zellen im Vergleich mit Präadipozyten und Adipozyten unterschiedlich methyliert?
- Welchen Einfluss hat die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide des Leptingenpromoters auf seine Aktivität?
- Wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promoter durch eine mögliche DNA-Methylierung beeinflusst?

2 Material

2.1 Geräte

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Geräte sind im folgendem alphabetisch aufgelistet:

Alfexpress-Sequenziergerät (Pharmacia , Uppsala, Schweden), Analysenwaagen (Sartorius, Göttingen), Autoklav (H+P, München), Axiovert25-Mikroskop (Zeiss, Jena), **Brutschrank** Cytoperm (Heraeus, Osterode), **Direkt Blotting** Elektrophorese DNA Sequenzer GATC 1500 (GATC, Konstanz), diverse Glaswaren (Schott, Zwiesel), **Gelkammer** (AGS, Heidelberg), Gewebe-Kulturflaschen 25cm² (Falcon, Heidelberg), **ImageMaster** VDS (Pharmacia , Uppsala, Schweden), **IMVDS** Software (Pharmacia , Uppsala, Schweden), **Kühlzentrifugen** Minifuge T (Heraeus, Osterode)/ Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg), **Laminar-flow** steril-grade classII, type A/B3 (Labotect, Göttingen), Luminometer, Model TD-20/20 (Promega, Madison, USA) **Magnetrührer** (Heidolph, Kelheim), Megafuge 1.0 (Heraeus, Osterode), Mikropipetten (verstellbar) 10, 100 und 1000µl (Eppendorf, Hamburg), **Objektträger** Superfrost Color (Menzel, Braunschweig), **pH-Meter** (WtW, Weilheim), Pipettenspitzen mit Filter (Biozym, Hess.Oldendorf), Photometer Pipetus-Akku (Hirschmann, Eberstadt), **Reaktionsgefäße** (Tubes) 0,5ml und 1,5ml (Eppendorf, Hamburg), Röntgenfilm (Kodak, Rochester, USA), **SpektoPhotometer** D47400 (Beckmann, Fullerton, USA), Spritzen steril 2, 10ml (Becton Dickinson, Heidelberg), Sterilisator (Heraeus, Osterode), **Thermocycler** Primus 96 plus (MWG – Biotech), Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg), Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg), **UV-Lichtbank** 302nm (Bachofer, Reutlingen), **Zentrifugenröhrchen** (PP) 15, 50ml (Greiner, Solingen).

2.2 Chemikalien und Medien

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad p.a.) und Medien aufgelistet:

Diverse Chemikalien für unterschiedliche Arbeitsschritte (alphabetisch): Chloroform (Merck, Darmstadt), N,N-Dimethylformamid (DMF (Merck, Darmstadt), n-Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS) (Merck, Darmstadt), Essigsäure (Roth, Karlsruhe), Ethanol abs. (Merck, Darmstadt), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma, Deisenhofen), Glukose (Merck, Darmstadt), Glycerolgelatine (Merck, Darmstadt), Hämatoxylin (Fluka, München), Isopropanol (Merck, Darmstadt), Kaliumacetat (Merck, Darmstadt), Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, Deisenhofen), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, Deisenhofen), (Fluka, München), Natriumacetat (Fluka, München), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt), NaOH-Plätzchen (Merck, Darmstadt), PBS (Merck, Darmstadt), Phenol (Merck, Darmstadt), Salzsäure (Merck, Darmstadt), Tri-Natriumcitrat (Fluka, München), Tris (Fluka, München), Wasserstoffperoxid 30% (J.T. Bachem, Deventer, Niederlande), Xylol (Merck, Darmstadt).

Agarose-Gelelektrophorese: Agarose (small fragment/ for routine use) (Sigma, Deisenhofen), Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt), 100 bp-Leiter (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Bisulfitmodifikation: CpGenome™ DNA Modification Kit (Intergen Company)

DNA-Extraktion: Proteinase K (Sigma, Deisenhofen), 7,5 M Ammoniumacetat (Sigma, Deisenhofen)

Gelextraktion: Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, USA)

Gelshift: $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dCTP}$ (Pharmacia, Uppsala, Schweden), dATP (Pharmacia, Uppsala, Schweden), dGTP (Pharmacia, Uppsala, Schweden), dTTP (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Klenow-Fragment (5U/ μl) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Nuc Trap System (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Ligation: 2x Rapid Ligation Buffer (Promega, Madison, USA), pGEM®-T Vector (Promega, Madison, USA), T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA)

Methylieren der Oligonukleotide und Plasmide: SssI Methylase (BioLabs, New England), 10x NE Buffer 2 (BioLabs, New England), 200x S-adenosylmethionine

(32mM) (BioLabs, New England), *Hha*I Methylase (Biolabs, New England), 10x *Hha*I Methylase Buffer (Biolabs, New England), 400x S-adenosylmethionine (32 mM)

PCR: 10x Puffer (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Q Solution (Pharmacia, Uppsala, Schweden), dNTP-Mix (Pharmacia, Uppsala, Schweden), MgCl₂ (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Plasmidpräparation: Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega, Madison, USA), EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN; Hilden)

Restriktionsenzyme: Sac I (Boehringer-Mannheim, Mannheim), Bgl II (Boehringer-Mannheim, Mannheim)

Reverse Transkription: poly d(T)₁₅ primer (Boehringer-Mannheim, Mannheim), 5x RT-Puffer (Gibco BRL, Gaithersburg, USA), 1,4-Dithiotreitol (DTT) 0.1M (Serva, Heidelberg), RNAsin (Promega, Madison, USA), dNTP-Mix (Desoxynucleotidtriphosphat) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Reverse Transkriptase Superscript™ II (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

RNA-Isolierung: TRIzol® Reagenz (Gibco BRL, Gaithersburg, USA), RNasefreie Dnase (Boehringer-Mannheim, Mannheim)

Sequenzierung: AutoCycle™ Sequencing Kit (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Harnstoff (Roth, Karlsruhe), Long Ranger Polyacrylamid-Fertiglösung (BioProducts, Rockland, USA), Borsäure (Baker, Deventer, Holland), N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Ammoniumpersulfat (APS) (Serva, Heidelberg)

Transfektion: Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, USA)

Transformation: JM 109 High Efficiency Competent Cells (Promega, Madison, USA), Ampicillin (Sigma, Deisenhofen), Isopropylthiogalactosid (IPTG) (Promega, Madison, USA), 5-bromo-4-3-indolyl-β-D-galactosidase (X-Gal) (Promega, Madison, USA), N,N'-dimethyl-formamid (DMF) (Baker, Deventer, Holland), Bacto® -Tryptone (DIFCO, Detroit, USA), Bacto® -Yeast Extract (Baker, Deventer, Holland)

Zellkultur: Fetal Calf Serum (Sigma, Deisenhofen), Penicillin (Sigma Deisenhofen), Streptomycin (Sigma Deisenhofen), Glutamat (Sigma Deisenhofen), DMEM/Ham's F12(1:1), Biotin (Sigma, Deisenhofen), Insulin (Sigma, Deisenhofen), d-Pantothensäure (Sigma, Deisenhofen), 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (Sigma,

Deisenhofen), Dexamethason (Sigma, Deisenhofen), Trijodthyronin (Sigma, Deisenhofen), Cortison (Sigma, Deisenhofen), Transferrin (Sigma, Deisenhofen), PBS (Sigma, Steinheim)

2.3 Zusammensetzung von Lösungen, Puffer und Medien

2.3.1 Lösungen

TBE (10x)

0.9 M Tris, 0.9 M Borsäure, 0.02 M EDTA (pH 8,0) in a. d.

TAE (10x) (Agarose-Gel-Laufpuffer)

0,2 M Tris, 0,57% Essigsäure, 1% EDTA (0,5 M, pH 8) in a.d.

TE

10 mM Tris , 1 mM EDTA (pH 8,0) in a. d.

2.3.2 Medien

Vollmedium

RPML, 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1/100 ml Glutamat, 10% FCS

F0-Medium

DMEM/Ham's F12 (1:1), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1/100 ml Glutamat, 33 mM Biotin, 17 µM Panthotenat

F3-Medium

F0-Medium, 0,01 mg/ml Transferin, 0,2 ng/ml Trijodthyronin, 10 nM Insulin, 1 µM Cortisol

Adipogenes Differenzierungsmedium

F3-Medium, 500 µM Isobutyl-1-Methyl-Xantin, 0,25 µM Dexamethason

Transfektionsmedium

DMEM ohne Penicillin / Streptomycin

2.3.2 Lösungen zur DNA-Extraktion und Bisulfitmodifikation

DNA-Lysepuffer

10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,4% SDS

Reagenz I

227 mg DNA Modification Reagent I, 571 µl H₂O, pH 5,0 (NaOH)

20 mM NaOH/90% Ethanol

900 µl 100% Ethanol, 93,4 µl H₂O, 6,6 µl 3 M NaOH

Reagenz II

1 µl β-Merkaptoethanol in 20 ml H₂O; je Probe: 750 µl dieser Lösung, 1,35 g DNA Modification Reagent II

2.3.3 Puffer und Medien zur Klonierung

SOC-Medium

2% Bacto[®] -Tryptone, 0,5 % Bacto[®] -Yeast Extract, 0,01 M NaCl, 0.0025 M KCl, 0,02 M Mg²⁺-Stock, filtersterilisiert, 0,02 M Glukose, filtersterilisiert

LB-Medium (pro Liter)

1% Bacto[®] -Tryptone, 0,5% Bacto[®] -Yeast Extract, 0,5% NaCl pH 7,0

IPTG Stock-Lösung

0.1M IPTG filtersterilisiert

2M Mg²⁺-Stock

20.3% MgCl₂ • 6H₂O, 7% MgSO₄ • 7H₂O

X-Gal-Lösung(2ml)

100mg 5-bromo-4-3-Indolyl- β -D-Galactosidase gelöst in 2 ml N,N'-Dimethylformamid

2.3.4 Gelshift

10x Oligo Annealing Puffer

70 mM Tris·HCl, pH 7,5, 70 mM MgCl₂, 500 mM NaCl

STE-Puffer

100 mM NaCl, 20 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA

Verdünnungspuffer (für Leberzellkernproteine):

20 mM HEPES, pH 7,9, 100 mM KCl 1 mM MgCl₂, 20% Glycerin, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF

Bandshiftpuffer I (5x)

125 mM HEPES·KOH, pH 7,9, 250mM KCl, 5 mM EDTA, 20% Ficoll, 5 mM DTT

Bandshiftpuffer II (5x)

125 mM HEPES·HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 50% Glycerin, 5 mM EDTA

2.4 Oligonukleotide und Primer

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Primer wurden aus den entsprechenden cDNA und DNA Daten der Humanen Genbank entnommen und wurden in hochreiner („high salt purified“) Qualität von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Oligonukleotide, die 5-Methylcytosin enthalten, wurden von ThermoHybaid, Ulm, bezogen.

2.4.1 Primer

Die für PCR Reaktionen verwendeten Primer wurden aus der veröffentlichten Leptingen-Sequenz ausgewählt. (GenBank: U43589 und D 62708). Für die methylierungsspezifische PCR-Reaktion wurden das Primerpaar +47r-bsm und -257f-bsm und die am 5'-Ende verkürzten Primer +47r-bsmN und -257f-bsmN für die „nested“ PCR verwendet (Tab. 1).

Um aus bisulfitmodifizierter DNA mittels PCR-Technik ausgewählte Sequenzen methylierungsspezifisch amplifizieren zu können, müssen die Oligonukleotidprimer nach bestimmten Anforderungen ausgewählt werden (33).

Die Primerpaare für mRNA-Expressions-Analysen wurden aus den entsprechenden Genbank cDNA Sequenzen ausgewählt. Dazu wurde das Primer Programm GCG prime program package (Wisconsin Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin) verwendet.

(Tab. 2)

Tab. 1: Primer zur Amplifikation der Promoterregion des Leptingen aus bisulfitmodifizierter DNA

Name	5' – 3' DNA-Sequenz
-257f-bsm	GGA TTT TTY GTT TTT ATT AGT TAT TTT TAA
-257f-bsmN	TY GTT TTT ATT AGT TAT TTT TAA
+47r-bsm	AAA AAA ACR CRC CRT AAC CTT ACC TTA C
+47r-bsmN	A ACR CRC CRT AAC CTT ACC TTA C

DNA Desoxyribonukleonsäure, A Adenosin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin, R Adenosin oder Guanin, Y Cytosin oder Thymin

Tab. 2: Primer zur Amplifikation von cDNA

Name	5' – 3' DNA-Sequenz	Primer position	Produktlänge in bp
Leptin-f	TGT GGC TTG GCC CTA TC	85-102	210
Leptin-r	AGT GTC TGG TCC ATC TTG G	275-294	
SP1-f	ACT ACC AGT GGA TCA TCA GGG	757-777	241
SP1-r	CTG ACA ATG GTG CTG CTT GGA	977-997	

DNA Desoxyribonukleinsäure, cDNA complementary Desoxyribonukleinsäure, bp Basenpaar, A Adenosin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin

Tab. 3: Primer für Transfektionsversuche

Name	5' – 3' DNA-Sequenz
+59r	TAA <u>TAG</u> ATC <u>TAC</u> TAG AAG GAG GAA GGA GCG CGC
-258f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CG</u> AAT AGG ATT TCT CGC TCC TAC C
-199f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> <u>AAT</u> AGT GGC TCC TGG CGC
-174f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> ATA CCC TCG AGG CCC CG
-149f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> ATA CTG CGG GCC CAG GGC TAG
-106f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> ATA GAG GGG CGG GGC GGG
-60f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> ATA GGG CAG TTG CGC AAG TTG TG
-35f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> ATA GCC GCT ATA AGA GGG GCG G
-24f	TAG <u>TGA</u> <u>GCT</u> <u>CTA</u> ATA AGG GGC GGG CAG GC

DNA Desoxyribonukleinsäure; A Adenosin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin,
AGATCT: Sac I Schnittstelle, GAGCTC: Bgl II Schnittstelle

2.4.2 Oligonukleotide / Gelshift

Tab. 4: Oligonukleotide für Gelshiftexperimente

Name	5' – 3' Oligonukleotidsequenz
TATA-f	agg TGT GAT CGG GCC GC T ATA AGA GGG GC
TATA-r	agg GCC CCT CTT ATA GCG GCC CGA TCA CA
TATA-fm	agg TGT GAT CGG GCC GC T ATA AGA GGG GC
TATA-rm	agg GCC CCT CTT ATA GCG GCC CGA TCA CA
C/Ebp-f	agg TGC GGG CAG TTG CGC AAG TTG TCA T
C/Ebp-r	agg ATC ACA ACT TGC GCA ACT GCC CCA CA
C/Ebp-fm	agg TGC GGG CAG TTG CGC AAG TTG TCA T
C/Ebp-rm	agg ATC ACA ACT TGC GCA ACT GCC CCA CA
MBD-f	agg GTG CGC GCG TGG CTC CTG GCG CGC CGA GGC
MBD-r	agg GCC TCG GCG CGC CAG GAG CCA CGC GCG CAC
MBD-fm	agg GTG CGC GCG TGG CTC CTG GCG CGC CGA GGC
MBD-rm	agg GCC TCG GCG CGC CAG GAG CCA CGC GCG CAC

Die Oligonukleotide für die Gelshiftexperimente wurden aus der humanen Promotersequenz des Leptingens ausgewählt. An das 5'-Ende wurden agg-Gruppen zur radioaktiven Markierung angehängt. In den Gelshiftexperimenten wurden von jeder verwendeten Region zusätzlich Oligonukleotide verwendet, die 5-Methylcytosin an Stelle der **C**'s in ihrer DNA-Sequenz enthalten. Die bekannten Transkriptionsfaktorbindungsdomänen sind hier durch die Rahmen markiert (66).
a/A Adenosin, C Cytosin, g/G Guanin, T Thymin

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten

Präadipozyten werden aus menschlichem Fettgewebe durch Behandlung mit Kollagenase isoliert und kultiviert (Hauner 1989). Die Zellen werden, in DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium, das 10% FCS und Penicillin/Streptomycin als Antibiotika enthält, subkultiviert. Zur adipogenen Differenzierung werden die Präadipozyten in 8-well Zellkulturplatten ausgesäht, 3 – 4 Tage in Differenzierungsmedium, danach in F3-Medium kultiviert, bis mikroskopisch eingelagerte Fetttröpfchen und morphologische Veränderungen erkennbar sind. Die Präadipozyten sowie bereits differenzierte Adipozyten wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. Wabitsch und Labor der Universitätskinderklinik Ulm zur Verfügung gestellt.

LiSa-2 Zellen

Die humane Liposarkomzelllinie LiSa-2 wurde in Vollmedium, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 80-90% konfluente Kulturen wurden subkultiviert.

Zur adipogenen Differenzierung werden LiSa-2 Zellen 3 – 4 Tage in Differenzierungsmedium und anschliessend in F3-Medium kultiviert.

Zusätzlich wird ein Teil der Zellen 48 Stunden in F0-Medium, das 0,5 µM 5-Aza-2'-desoxycytidin enthielt, kultiviert und danach adipogen differenziert.

Ebenso werden LiSa-2 Zellen mit Vollmedium oder F0-Medium inkubiert.

3.2 RNA-Extraktion

RNA aus den kultivierten Zellen wird mit der Methode nach TRIzol® isoliert. Das TRIzol® Reagenz beinhaltet eine hochmolare Guanidinisothiocyanatlösung und Phenol. Guanidinisothiocyanat ist ein Salz, das sehr effektiv Proteine denaturieren

und inaktivieren kann, so auch RNasen. Im sauren Phenol lösen sich Proteine und kleine DNA-Fragmente, die größeren DNA-Stränge sammeln sich nach der Zentrifugation in einer Zwischenphase. Der wässrige Überstand enthält die RNA. Weil die Inaktivierung der RNasen sofort nach der Lyse der Zellen stattfindet, liefert diese Methode qualitativ hochwertige Gesamt-RNA.

Das Medium der Zellkultur wird abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gespült. Die Zellen einer 11 x 3 cm Kulturflasche werden in 1 ml TRIzol® suspensiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation werden 300 µl Chloroform dazugegeben, kräftig gemischt und nach weiteren drei Minuten 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wird vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert, 500 µl Isopropanol zugegeben, kräftig gemischt und nach 10-minütiger Inkubation 10 min bei 12.000 x g und 4°C die Gesamt-RNA pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei 55°C in 50 µl RNasefreiem Wasser gelöst. Die RNA wird mindestens 30 min bei 37°C mit RNasefreier DNase verdaut, danach wieder gefällt und wie beschrieben gewaschen und resuspendiert. Um die Integrität der RNA zu beurteilen, werden 5 µl der gelösten RNA auf ein RNasefreies 2%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Diejenigen Proben die keine ribosomale RNA zeigen, sondern im Gel eventuell eine RNA-Degradation werden verworfen. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bei 260 nm bestimmt (Faktor 40 µg/OD) und die RNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Durch die Reverse Transkription (RT) wird eine DNA komplementär zu einer RNA-Matrize synthetisiert. Die RNA wurde bei 75°C, 5 min zur Lösung evtl. vorhandener Sekundärstrukturen denaturiert. Danach gab man RT-Puffer, desoxytriphosphate, RNase-Inhibitoren, randomisierten Hexamer-Oligonukleotiden und Reverse Transkriptase zu und inkubierte 1h bei 37-50°C. Als Reverse Transkriptase wurde SuperScript™ von Gibco BRL verwendet, das eine

modifizierte MMLV-RT ist und keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr besitzt, und dadurch deutlich längere Transkripte ermöglicht.

In einem Gesamtvolumen von 13 µl wird 1 µg RNA und 1 µl Hexamer Primer 5 min bei 75°C erhitzt, und unmittelbar danach auf Eis gekühlt. Ein Master-Mix aus 5 µl 5x RT-Puffer, 2,5 µl DTT (0.1 M), 1 µl RNAsin, 2,5 µl dNTP (10 mM) und 1 µl SuperScript II (2 U/µl) wird dem Template-Mix zugegeben und nach dem folgenden Programm im ThermoCycler inkubiert:

15 Minuten / 37°C

30 Minuten / 45°C

15 Minuten / 50°C

2 Minuten / 95°C

∞ / 4°C

Nach Beendigung der RT-Reaktion wird der Ansatz mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht. Diese cDNA wird für die Expressionsanalysen in der PCR verwendet.

3.3 Bestimmung von CpG-Inseln mit dem CpG-Blott Programm

Da meistens die Promotoren durch DNA-Methylierung reguliert werden, die eine CpG-Insel in ihrer Sequenz enthalten, wurde mittels des CpG-Blott Programms überprüft, ob der untersuchte Abschnitt des Leptingenpromoters gehäufte CpG-Dinukleotide enthält.

Das CpG-Blott Programm – im Internet unter <http://www.emboss.org/> verfügbar – definiert eine CpG-Insel als eine Region in der, über durchschnittlich zehn Basenpaare, der errechnete prozentuale CpG-Gehalt über 50 Prozent liegt, und die berechnete CpG-Dinukleotid Verteilung gegenüber der erwarteten CpG-Verteilung über 0,6 liegt (75).

Die DNA-Sequenz des Leptingen Promoters von -258 bis +59 wird auf diese Weise auf das Vorhandensein einer CpG-Insel untersucht.

3.4 DNA-Extraktion aus Zellkulturen

Das Medium der Zellkultur wird abgesaugt und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden je nach Kulturgröße und -dichte in 1 – 5 ml DNA-Lysepuffer resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Lösung wird in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben, mit 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und 12 – 20h bei 50°C inkubiert.

Phenol-Chloroform-Aufreinigung

Zu den abgekühlten DNA-Lysaten werden 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, intensiv gemischt und anschliessend 10 min bei 12.000g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthält (etwa 450 µl Volumen), wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Man gibt das halbe Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und das doppelte Volumen 100% Ethanol zu und zentrifugiert 2 min bei 12.000 g, bei 4°C, um die ausfallende DNA zu pelletieren. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen bei 37°C, in 50-100µl Nuklease freiem Wasser (je nach Zelldichte der Kultur) resuspendiert und 20 min bei 40 – 50°C im Schüttler gelöst. Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt (1 OD = 50 µg/ml). Die DNA wird bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5 Bisulfitmodifikation und Einzelstrang-PCR

Bei der Bisulfitkonversionsreaktion der DNA werden nicht-methylierte Cytosinreste sulfonyliert, hydrolytisch desaminiert und schliesslich durch alkalische Desulfonylierung in Uracil umgewandelt. 5-MeC hingegen ist durch die zusätzliche Methylgruppe nicht der Sulfonylierung durch Bisulfit zugänglich und bleibt als 5-MeC unverändert (s. Abb. 3). Hierdurch und anschliessender Einzelstrang-PCR und Sequenzierung des Produkts kann 5-MeC von C in der ursprünglichen DNA-Sequenz unterschieden werden (16, 33).

Da durch die Bisulfitmodifikation jedes Cytosin der DNA in Uracil umgewandelt wird, sind die beiden Stränge der DNA nicht mehr komplementär. Die PCR-Reaktion wird daher als Einzelstrang-PCR durchgeführt. Dabei wird nur ein Strang als Matrize verwendet. Die einzelnen Schritte der Einzelstrang-PCR sind in der folgenden Abb. 4 am Beispiel der von uns gewählten Leptingenpromotersequenz systematisch dargestellt.

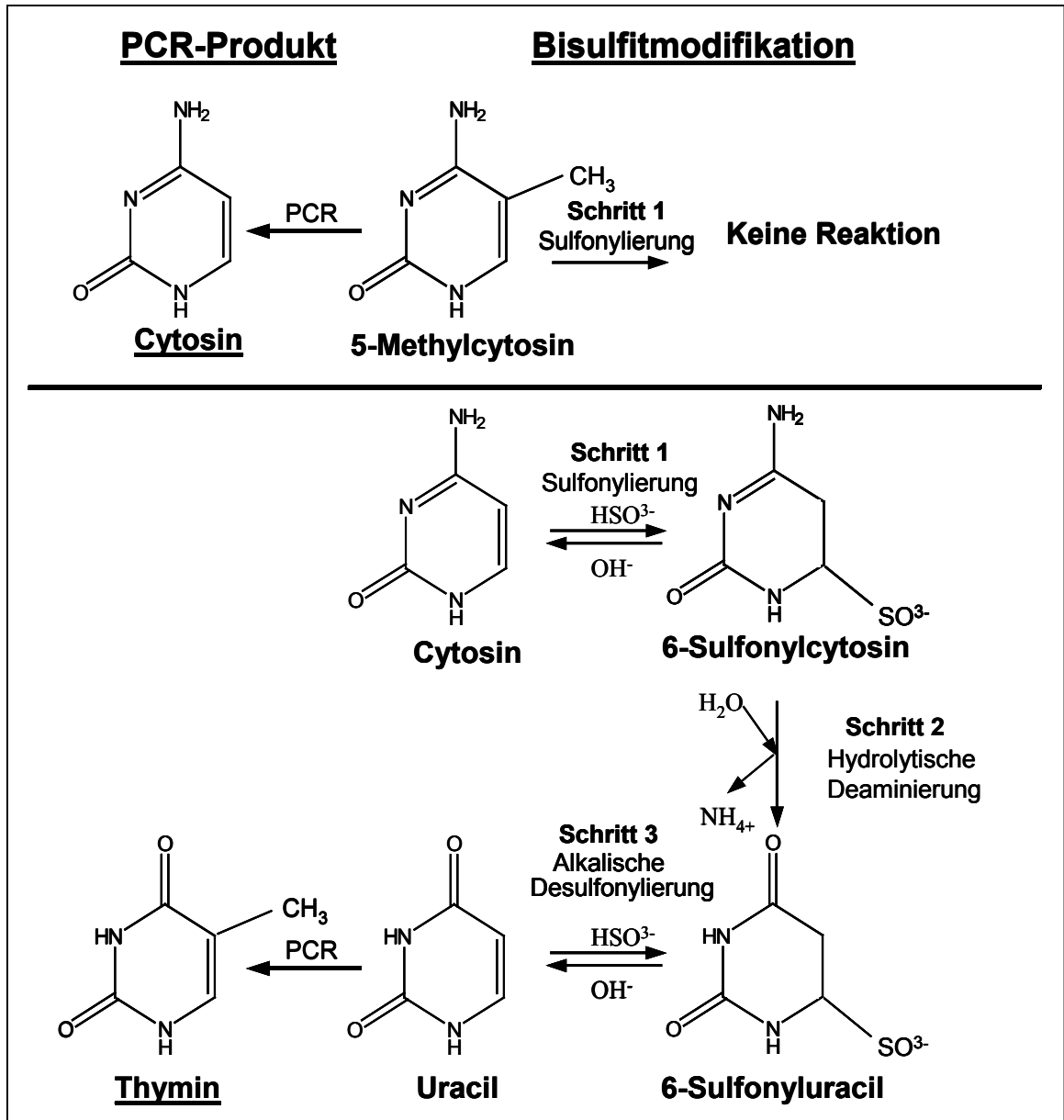


Abb. 3: Bisulfitkonversion von Cytosin und 5-Methylcytosin

chemische Strukturformelgleichung der Bisulfitmodifikation und Ergebnis im PCR-Produkt der anschliessenden Polymerasekettenreaktion (PCR). (modifiziert nach 33)

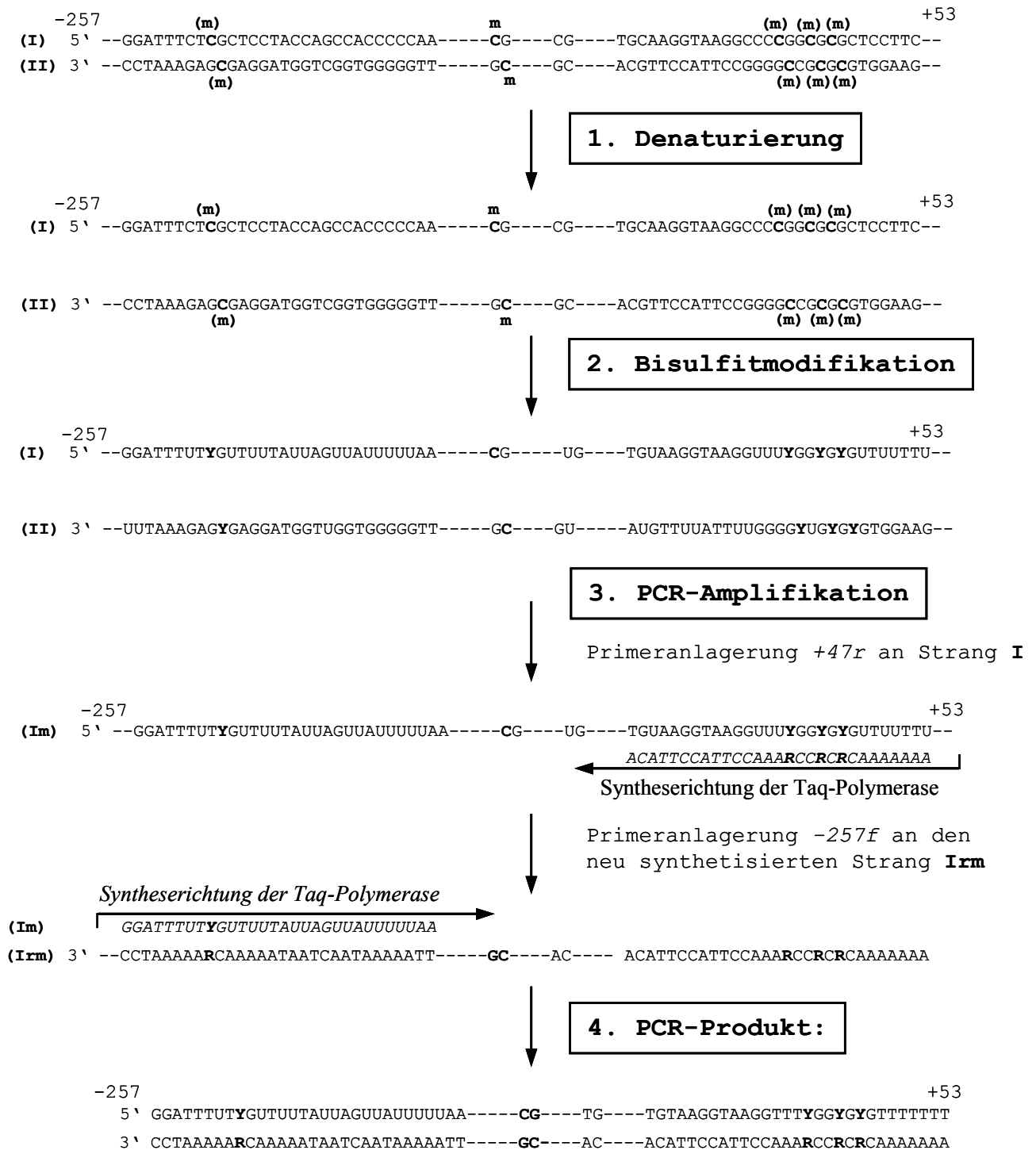


Abb. 4: Bisulfitkonversion und Einzelstrang-PCR der untersuchten DNA-Sequenz (-257 bis +53) des Leptingenpromoters

Die beiden komplementären Stränge (I, II) werden denaturiert, Bisulfit modifiziert (Im, IIm), und, da nicht mehr komplementär, nur Strang Im in der Einzelstrang-PCR amplifiziert (Irm reverser=komplementärer Strang zu Im).

PCR Polymerasekettenreaktion, A Adenosin, C Cytosin, G Guanin, R Adenosin oder Guanin, T Thymin, Y Cytosin oder Thymin, DNA Desoxyribonukleinsäure, C(m) 5-Methylcytosin oder Cytosin, Cm 5-Methylcytosin (modifiziert nach 33)

Durchführung der Bisulfitkonversion

1 µg der zellulären DNA, wird auf 100 µl H₂O in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß verdünnt. Zur Denaturierung werden 7,0 µl frisch angesetzte 3 M NaOH zugegeben, so dass die Endkonzentration 0,3 M entspricht. Falls die Probe weniger als 1 µg DNA enthält, werden 2 µl DNA Modification Reagenz IV zugeben, um die DNA zu stabilisieren und 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden 550 µl frisch zubereitetes Reagenz I, in dem das Natriumbisulfit und Hydroquinon enthalten sind, zugegeben, gemischt und 16 – 20 h bei 50° C im Heizblock inkubiert.

5 µl des Reagenz III wird zum Reaktionsgemisch gegeben, 750 µl Reagenz II zugefügt, kurz gemischt und 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA an Reagenz III zu binden. Die gebundene DNA wird kurz bei 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und das Pellet insgesamt dreimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem der Überstand des letzten Waschschrittes abgeschüttet wurde, wird noch einmal 2 min bei 12.000 g zentrifugiert und der verbliebenen Überstand vorsichtig abpipettiert. Auf das Pellet werden 50 µl eines 20 mM NaOH/90% Ethanol-Gemisch gegeben, kurz gevortext um das Pellet zu resuspendieren, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, und kurz bei 5.000 x g zentrifugiert. Anschliessend wird das DNA-Reagenz III-Pellet zweimal mit 90% Ethanol gewaschen und wiederum der verbliebene Überstand nach einem zusätzlichem Zentrifugationsschritt vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wird in 25 – 50 µl TE-Puffer resuspendiert und 15 min bei 50°C inkubiert, um die DNA zu desorbieren. Nach 2 min Zentrifugation bei 12.000 x g wird der Überstand, der die modifizierte DNA enthält, in ein neues Reagiergefäß überführt und bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Prinzip der PCR und Semi-nested PCR

PCR: Die bisulfitmodifizierte Promoter DNA-Sequenz wird mittels der Polymerasekettenreaktion, die auf der exponentiellen Multiplikation von DNA basiert, amplifiziert.

Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize und Abkühlen auf die Annealing-Temperatur, binden spezifische, komplementäre Primer (Annealing), welche von einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Zugabe von

Desoxyribonucleotiden (dNTP) bei 72°C verlängert werden (Elongation). Diese Reaktion wird durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur unterbrochen, wobei die doppelsträngige DNA erneut denaturiert wird, so daß sich nach dem Abkühlen auf Annealing-Temperatur die Primer an die komplementäre (c)DNA erneut binden können.

Semi-nested PCR: Durch die verschachtelte ("nested" bzw. "semi-nested") PCR erhöht sich die Sensitivität und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich. Die Spezifität ist deshalb so groß, weil bei dieser Methode nahezu alle falschen unspezifischen Kopien unberücksichtigt bleiben. Denn nach der ersten PCR-Runde bieten unspezifische Produkte keine komplementäre Sequenz für die inneren Primer und stehen damit in den weiteren Runden nicht mehr als Matrize zur Verfügung. Aus diesem Grund wird unter optimalen Bedingungen ausschließlich die Zielsequenz amplifiziert. Durch die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode wächst allerdings auch die Anfälligkeit durch DNA-Kontaminationen.

Durchführung der Einzelstrang-PCR:

Es wird ein Mastermix für die Anzahl der Proben auf Eis pipettiert: je 5 µl 10x PCR-Puffer, 5 µl Q-Solution, 0,5 µl dNTP's, 0,5 µl Tag-Polymerase und 33 µl nukleasefreies Wasser. Als Matrize 5 µl DNA (100 ng) und 0,5 µl Primer (je 25 pmol Hin- und Zurück-Primer). Der Ansatz wird kurz gemischt und 10 sec zentrifugiert und die PCR-Tubes in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Block gegeben und das Programm gestartet.

PCR-Programm: **TD 30**

1. Deckelheizung: 110°C

2. Block: 95°C,

Programm:

CYCLE: 95°C, 1 min, 62°C, 1 min., 72°C, 1 min.
 95°C, 1 min, 60°C, 1 min., 72°C, 1 min.
 95°C, 1 min., 58°C, 1 min., 72°C, 1 min.
 95°C, 1min., 56°C, 1 min, 72°C, 1 min.
 72°C, 10 min.

Deckelheizung: aus

Block: 10°C

Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Amplifikate erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots in einem 2%-igem Agarosegel, nachfolgender Ethidiumbromid-Färbung und Auswertung unter UV-Licht mittels eines Bildverarbeitungssystem (IMVDS-Image Master™).

Die Länge der DNA-Fragmente wird mit einer 100bp-Leiter (Längen von 100 bis 2000bp) bestimmt.

Gelextraktion

Durch Ausschneiden der Banden unter UV-Licht können die gesuchten DNA-Fragmente aus der PCR-Reaktion gewonnen und für den weiteren Verwendungszweck aufgereinigt werden.

Für die Extraktion wird das „Wizard® PCR Preps DNA Purification System“ entsprechend den Angaben des Herstellers benutzt:

Zur Vorbereitung wird ein 2%-iges Agarosegel angefertigt und das PCR-Produkt aufgetragen. Das PCR-Produkt wird solange elektrophoretisch getrennt, bis die Banden gut voneinander abgrenzbar waren. Dies erleichtert das spätere Ausschneiden der DNA-Banden. Das Agarosegel wird unter ein 302 nm-UV-Licht gelegt, die gewünschte Bande anhand ihrer Länge im Vergleich zum Standard identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei muß darauf geachtet werden, dass die DNA nicht zulange dem UV-Licht ausgesetzt wird, da dies zu Alterationen der DNA führen kann.

Die ausgeschnittenen Gel-Stücke werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 1 ml Resinsuspension zugegeben und bei 55°C geschmolzen.

Auf eine „Wizard® Minicolumn“ wird eine 3 ml „Luer-Lock“ Spritze aufgesetzt. Die DNA/Resin-Lösung wurde in die Spritze gefüllt und mit dem Stempel in die Säule gedrückt. Um das PCR-Produkt von Salzen und Proteinen aufzureinigen, wird die Säule mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen und mittels Zentrifugation 2 min bei 10.000 x g getrocknet. Die Säule wird nun auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgesteckt, 50 µl nukleasefreies, auf 60°C erwärmtes Wasser aufgetragen, 1 min inkubiert und durch Zentrifugation (20 sec bei 10.000x g) die im Wasser gelöste DNA eluiert. Die Konzentration wird photometrisch bestimmt und das Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.6 Klonierung von PCR-Produkt in einen Plasmidvektor

Prinzip der DNA-Klonierung

Ein DNA-Fragment, welches die zu klonierende DNA-Sequenz enthält, wird in ein ringförmiges DNA-Molekül, das Plasmid, eingefügt, so daß ein rekombinantes DNA-Molekül entsteht (Ligation). Das Plasmid dient als Vehikel und transportiert das ligierte DNA-Fragment in ein Bakterium (Transformation). Im Bakterium wird die Plasmid-DNA einschließlich des ligierten DNA-Fragmentes repliziert. Sofern, wie im vorliegenden Fall, ein sog. high-copy-Plasmid (pGEM[®]-T) verwendet wird, entstehen multiple identische Kopien. Wenn sich das Bakterium teilt, werden Kopien des Plasmids auch auf die Tochterzellen weitergegeben, in denen es erneut repliziert wird.

Bei Wachstum auf Agar-Platten entsteht aus einer Bakterie durch häufige Zellteilungen eine Kolonie, d. h. ein Klon gleichartiger Wirtszellen, die das rekombinante Plasmid ebenfalls in zahlreichen Kopien enthalten.

Durchführung der Klonierung

a) Ligation von PCR-Produkt mit Plasmid-DNA

Für die Ligation der amplifizierten, Bisulfit modifizierten DNA mit der Plasmid-DNA wird das PCR-Produkt in einem Verhältnis von 3:1 zur Vektor-DNA verwendet. Dabei gilt folgende **Formel**:

$$X \text{ ng DNA} = (\text{Basenpaare cDNA}) \times (50 \text{ ng Plasmid-DNA}) / \text{Basenpaare Plasmid-DNA}$$

Basenpaare DNA = ca. 0,3 kb; Basenpaare Plasmid-DNA = 3,0 kb

Für die Ligation werden 15 ng PCR-Produkt verwendet.

Das verwendete Plasmid pGEM[®]-T ist linearisiert und besitzt an den 3'-Enden je einen Thymidin Überhang. Diese können mit den von der Taq-Polymerase bei der PCR hergestellten Adenosin-Überhängen hybridisieren und anschließend bei 4°C von der T4-Ligase verbunden werden (sog. „A-T-Klonierung“).

Durchführung: Der folgende Ansatz wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert: 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer, 1 µl Plasmid DNA (pGEM[®]-T Plasmid, 50ng), 1 µl T4

DNA Ligase und X µl PCR-Product (je nach Konzentration der DNA-Lösung (15ng DNA)). Der Ansatz wird mit sterilem H₂O auf 10 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

b) Herstellung von LB-Agar-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal

Zu einem Liter LB-Medium werden 15g Agarose gegeben und autoklaviert. Die Lösung muß auf mindestens 50°C abgekühlt sein, bevor Ampicillin auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml dazugegeben wurde. Es werden jeweils 30 – 35 ml des Mediums in eine 85 mm Petrischale gegeben. Auf die LB/Ampicillin-Platten werden nach Abkühlen und Aushärten 100 µl IPTG- und 20 µl X-Gal-Lösung gegeben, gleichmäßig mit einem Spatel in die Oberfläche eingerieben und getrocknet.

c) Transformation

Durch das Ausplattieren der Bakterien auf einem ampicillinhaltigen Selektionsmedium kann man transformierte Bakterien selektieren. Als nächstes muß man feststellen, welche der Bakterien rekombinierte DNA-Moleküle aufgenommen haben und welche nur selbstligierte Vektormoleküle enthalten.

Der Klonierungsvektor pUC8 (pGEM[®]-T) trägt ein Gen für Ampicillinresistenz und ein lacZ-Gen, das einen Teil des Enzyms β-Galactosidase codiert. Beim Klonieren mit pUC8 wird das lacZ-Gen durch den Einbau eines DNA-Fragments inaktiviert, die Rekombinanten sind darin erkennbar, dass sie keine funktionierende β-Galactosidase mehr synthetisieren können.

Das Enzym β-Galactosidase ist am Abbau von Lactose zu Glucose und Galactose beteiligt. Es wird normalerweise von dem lacZ-Gen codiert, das im Genom von E.coli liegt. Manche E.coli-Stämme (z.B. *JM 109 Efficiency Competent Cells*) besitzen ein verändertes lacZ-Gen, dem ein großer Abschnitt namens lacZ' fehlt und das nur den α-Peptidanteil der Galactosidase codiert. Solche veränderten E.coli-Stämme können das Enzym nur dann bilden, wenn sie ein Plasmid wie beispielsweise pUC8 tragen, das den fehlenden lacZ'-Teil des Gens enthält.

Bei der Klonierung mit pUC8 trägt man die Zellen auf ampicillinhaltigem Agar auf und mustert sie dann auf Galactosidase-Aktivität durch, um die Rekombinanten zu identifizieren. Zellen, die ein normales pUC8-Plasmid tragen, sind ampicillinresistent und können Galactosidase synthetisieren. Rekombinanten sind

ebenfalls ampicillinresistent, aber sie bilden keine funktionierende Galactosidase, da das Gen durch den DNA-Insert zerteilt ist.

Die Untersuchung, ob eine Kolonie das Enzym Galactosidase produziert, gelingt, indem das Lactoseanalog X-gal verwendet wird. Die Galactosidase baut X-gal zu einem dunkelblauen Produkt ab. Setzt man dem Agar X-gal und den Induktor IPTG für das Enzym sowie Ampicillin zu, sind die Kolonien, die keine Rekombinanten enthalten, blau gefärbt. Rekombinanten, bei denen das lacZ'-Gen durch Einbau des PCR-Produkt geteilt ist, können dagegen kein funktionsfähige Galactosidase herstellen, und ihre Kolonien sind weiß.

Für die Transformation dienten *JM 109 Efficiency Competent Cells* und der Plasmidvektor *pGEM[®]-T*.

Das Mikroreaktionsgefäß mit dem Ligationsansatz wird zentrifugiert, so dass sich der Inhalt am Boden des Gefäßes sammelt. 2 µl der Ligationsreaktion werden in ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und auf Eis gestellt. Die bei -80°C gefrorenen *JM109 High Efficiency Competent Cells* werden ebenfalls auf Eis gestellt und nach etwa fünf Minuten durch leichtes "Antippen" des Reaktionsgefäßes gemischt. Zum Ligationsansatz werden 50 µl *JM109* Zellen gegeben, der Inhalt vorsichtig gemischt und für weitere 20 min auf Eis gestellt. Die Bakterien werden 45 sec in einem Wasserbad (exakt 42°C) einem Hitzeschock ausgesetzt, währenddessen sie nicht geschüttelt werden. Unmittelbar danach wird das Reaktionsgefäß 2 min auf Eis gestellt. Die Bakterien werden in 950 µl Soc-Medium (Raumtemperatur) unter ständigem Schütteln (~150 rpm) 90 min bei 37°C kultiviert. 100µl der Transformationskultur und eine 1:10 Verdünnung der Kultur werden auf zwei LB/Ampicillin/IPTG/X-gal-Platten ausgestrichen. Die Platten werden danach über Nacht (16 – 24h) bei 37°C bebrütet.

d) Bakterienkultur in LB-Medium

Einzelne weiße Kolonien werden in 10 ml ampicillinhaltiges LB-Medium transferiert und die Kultur über Nacht bei 37°C und unter kräftigem Schütteln (~250 rpm) bebrütet.

Ob die selektierten Bakterien das Plasmid mit dem Insert enthalten, wird in einer PCR überprüft. Von der Kultur werden 10 µl in 90 µl sterilem Wasser in ein 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und dies in einem PCR-Cycler 20 Minuten auf 95°C

erhitzt. Dadurch werden die Bakterien abgetötet und lysiert, so dass der Überstand nach kurzer Zentrifugation die Plasmide enthält. Der PCR-Ansatz enthält 5 µl 10x Puffer, 5 µl Q-Solution, 0,5 µl M13 Oligonukleotid-Primer, 0,5 µl dNTP's und 0,5 µl Taq-Polymerase in 35 µl sterilem Milipore H₂O. Dazu gibt man 5 µl des Bakterienlysats. Es wird das PCR-Programm TD 30 verwendet. (s. unter 2.9)

Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmid-DNA-Präparation aus den Bakterienkulturen wird das Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System von Promega verwendet.

Dazu werden bis zu 10 ml der Bakterinkultur, die über Nacht in LB-Medium wuchsen, 15 min. bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 250 µl Zellresuspensionslösung komplett gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. 250 µl Zellysepuffer werden zugegeben und die Komponenten vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wird 5 min inkubiert, bis sie klar erscheint. 10 µl alkalische Protease Lösung werden hinzupipettiert, wiederum vorsichtig gemischt und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. (Die alkalische Protease inaktiviert Endonukleasen und andere Proteine, die während der Lyse der Bakterienzellen freigesetzt werden und die Qualität der Plasmid-DNA beeinflussen können). Anschliessend werden 350 µl Neutralisationspuffer zugegeben, die Lösung sofort gemischt und 10 min, bei 10.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird in eine vorbereitete Säule gegeben und die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial gebunden. Die Säule wird zweimal mit Waschpuffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 100 µl nukleasefreiem Wasser eluiert, photometrisch die Konzentration bestimmt und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.7 DNA-Sequenzierung

Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Sanger-/Dideoxy-Methode

Bei der Kettenabbruchmethode nach Sanger (81) wird ein DNA-Strang mit Hilfe einer DNA-Polymerase verlängert. In der Reaktion sind sämtliche Reagenzien enthalten, die man für eine DNA-Synthese *in vitro* benötigt – einschließlich einer

DNA-Polymerase und 2',3'-Dideoxynucleotidphosphate (ddNTP), die fluoreszenzmarkiert sind. DNA-Polymerasen können ddNTPs genauso wie dNTPs über ihre 5'-Phosphatgruppen in eine wachsende DNA-Kette einbauen. Den ddNTPs fehlen allerdings die 3'-OH-Gruppen, die für die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zur Kettenverlängerung erforderlich sind. Daher endet die Kette an der Stelle, an der das ddNTP eingebaut wird. Man führt mit jeder Matrize vier Reaktionen durch, die sich nur darin unterscheiden, welches der vier ddNTPs (N=A, T, G, C) im Ansatz enthalten ist. Die entstandene DNA wird mit einer hochauflösenden denaturierenden Gelelektrophorese nach aufgetrennt.

Durch das Polyacrylamidgel werden die markierten DNA-Stränge, die bei den Sequenzierungsreaktionen synthetisiert wurden, während der Elektrophorese geschleust und der Größe nach aufgetrennt. Die kleinsten Moleküle werden im Gel am wenigsten zurückgehalten und wandern daher am schnellsten.

Durchführung der Sequenzierung

Die Sequenzierung eines PCR-Fragments wird mit dem Auto Cycle Sequenzier-Kits durchgeführt. Hierzu werden vier 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße benötigt, in die jeweils 2 µl ddNTP (A,C,G,T) pipettiert werden. Als Master Mix 1 dient ein Ansatz aus 2 µl Reaction buffer, 5 µl dNTP, 2 µl DMSO, 2 µl Taq-Polymerase (verdünnt in Dilutive buffer auf 1,25 U/µl) und 1 µl H₂O. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes beträgt 12 µl. Zum Master Mix 1 werden 3 µl (entsprechend 1,5 µg) Plasmid-DNA, 1,5 µl H₂O und 2 µl *-40 Sequenzier-Primer* für die Vorwärts-Sequenzierung bzw. 2 µl *Reverse Primer* für die Rückwärts-Sequenzierung und ein Tropfen Öl (um Verdampfen zu verhindern) hinzugegeben. Mit jedem DNA-Plasmid-Insert wird sowohl eine Vorwärts- als auch eine Rückwärts-Sequenzierung durchgeführt.

PCR-Sequenzierungsprotokoll:

1. 94°C -- 4,20 Minuten
2. 94°C -- 40 sec
65°C -- 40 sec *-40 Primer* (bzw. 50°C -- 40 sec *Reverse Primer*)
72°C -- 40 sec
insgesamt 35 Zyklen

3. 72°C -- 10 Minuten
4. 4°C

Die Sequenzierung wird in dem Elektrophorese-Sequenziergerätes (*Alfexpress*) durchgeführt. Zur Herstellung des Polyacrylamid-Gels werden 21,7 g Harnstoff in 6,6 ml Long Ranger Gel-Lösung, 9,0 ml 10x TBE, mit H₂O auf 63 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, gelöst und durch Aufziehen mit einer 50 ml Spritze und einem Steril-Filter (0,45 µm) entgast. Danach werden 30 µl Temed und 300 µl APS dazugegeben und das Gel zügig in die Gelkammer gegossen. Die Polymerisationszeit des Polyacrylamidgels beträgt ca. 90 min. Vor dem Auftragen auf das Gel werden den Proben 4 µl Stop-Lösung zugegeben, gevortext und zentrifugiert. Die DNA wird durch Erhitzen auf 95°C für 2 – 3 min in einem Formamid-haltigen Puffer denaturiert und auf Eis gestellt. Die Laufbedingungen der Sequenzierung wird durch die Software des *Alfexpress* aufrechterhalten: 1500 V, 38 mA, 34 W, 50°C, Laufzeit 720 min.

Die vom Sequencer ermittelten Rohsequenzdaten werden mit der Auswertungssoftware *Alf Evaluation* prozessiert und als Textdatei exportiert.

In den einzelnen Sequenzen wird die Position der methylierten CpG-Dinukleotide bestimmt, sowie der prozentuale Gehalt an 5-MeC einer Sequenz. Ebenso wird der prozentuale Gehalt an 5-MeC der 28 untersuchten CpG-Dinukleotide aller Sequenzen eines Zelltyps errechnet und der Mittelwert sowie die Standardabweichung zur Bestimmung der Streuung bestimmt.

$$M: M = \sum X_i / n$$

$$SD = \sqrt{\sum (X_i - M)^2 / n - 1}$$

M Mittelwert, SD Standardabweichung, $\sum$ Summe, n Umfang der Grundgesamtheit
 X_i Merkmalsausprägung am i-ten Element der Grundgesamtheit

3.8 Transiente Transfektion mit Lipofectamin Reagenz

Um die Aktivität des Leptinpromoters in Abhängigkeit von dessen Methylierungsstatus zu untersuchen, werden Promoterkonstrukte in ein Plasmid inkloniert und das Konstrukt einem Reportergen, in diesem Fall dem *Firefly* Luziferasegen, vorgeschaltet. Die Leptinpromotersequenzen sind unterschiedlich lang und enthalten daher verschiedene Bindungsstellen für Transfektionsfaktoren.

Ein Aliquot des jeweiligen Plasmids wird CpG-methyliert, um die Aktivität des methylierten und nicht methylierten Promoterabschnitts vergleichen zu können. Die Aktivität des Promoters wird über die Expression von Luziferase bestimmt, das die Emission von Licht aus Luziferin katalysiert, das im Luminometer gemessen wird. Als interner Standard wird eine Kotransfektion mit dem pRL-CMV Vektor durchgeführt, auf dem sich das Gen der *Renilla* Luziferase befindet. Die *Firefly* und die *Renilla* Luziferase Aktivität können nacheinander im Luminometer bestimmt werden. Ebenso wird eine Kotransfektion mit einem C/EBP- α exprimierendem Plasmid durchgeführt.

Plasmid-Leptinpromoter-Konstrukte:

Es werden DNA-Sequenzen des Leptinpromoters mittels PCR entsprechend den in Tab. 3 (Kap. 2.1) beschriebenen Primern, aus DNA, die aus LiSa-2 Zellen extrahiert wird, hergestellt, wie beschrieben aufgetrennt und aufgereinigt.

Die Primer enthielten 5'-seitig Schnittstellen-Sequenzen für Restriktionsendonukleasen, um die PCR-Produkte richtungsspezifisch in das Plasmid einklonieren zu können.

Dazu werden die PCR-Produkte mit je 20 U *SacI* und *BglII* in 50 μ l Restriktionspuffer A 6 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wird über ein Agarose Gel aufgetrennt, die Produkte ausgeschnitten und aufgereinigt (s. Kap.3.4). Ebenso wird der pGL3 Basic-Vektor mit *SacI* und *BglII* geschnitten und aufgereinigt (s. Phenol-Chloroform-Aufreinigung in Kap. 3.4 DNA-Extraktion). Die Ligation und Klonierung wird wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt.

Da zur Transfektion von Zellen größere Mengen an Plasmiden benötigt werden, als zur Sequenzierung ausreichen, werden 100 ml Bakterienkultur angezüchtet.

Durchführung des Maxi-Präp nach Anleitung des EndoFree Plasmid Maxi Protokolls:

Die Bakterienkultur wird 15 min bei 6.000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das Pellet wird in 10 ml Puffer P1, dem Rnase A in einer Konzentration von 100 μ g/ml zugegeben wurde, resuspendiert und die Bakterien zur weiteren Lyse 10 ml Puffer P2 versetzt und 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Zu diesem Lysat werden 10 ml Puffer P3 zugegeben, vorsichtig vermischt und die Lösung sofort auf die QIAfilter Kartusche gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird das Lysat filtriert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Zur Inaktivierung der Endotoxine wird das Filtrat mit 2,5 ml Puffer ER vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Equilibrierung der QIAGEN-tip 500 mit 10 ml Puffer QBT werden die Plasmide an die Säule gebunden, zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA in 15 ml Puffer QN eluiert. Die DNA wird mit Isopropanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet in endotoxin-freiem TE Puffer resuspendiert und die DNA-Konzentration der Plasmide photometrisch bestimmt.

CpG-Methylierung der Plasmide

20 µg der Plasmid-DNA werden 24 h mit 20 U der SssI- oder HhaI-Methylase in 400 µl Methylase Puffer und 160 µM S-Adenosylmethionin inkubiert. Nach je vier h werden wiederholt je 2 µl S-Adenosylmethioninlösung zugefügt und die Reaktion durch 10 min Erhitzen auf 60°C abgestoppt. Die Plasmide werden mit Phenol-Chloroform-Isomylalkohol aufgereinigt (s. Kap 3.4)

Durchführung der Transfektion

Am Tag vor der Transfektion werden 5×10^4 LiSa-2 Zellen in 500 µl Vollmedium pro Well auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h hatten die Zellen 50 – 80% Konfluenz erreicht. Pro Well werden 2 µl Lipofectamine Reagenz, 0,5 µg C/EBP-α-Expressionsvektor, 0,5 µg Insert-tragender Vektor und 25 ng pRL-CMV Vektor in 50 µl Transfektionsmedium vermischt und zur Komplexierung 30 min inkubiert. Währenddessen wird das Medium von den Zellen abgesaugt und mit 0,2 ml Transfektionsmedium ausgetauscht. Die komplexierten Vektoren werden mit weiteren 150 µl Transfektionsmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 5h Inkubation bei 37°C werden weitere 400 µl DMEM Medium, das 20% FCS enthielt, zugefügt.

Nach weiteren 48 h werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit passivem Lysepuffer (100 µl pro Well) lysiert.

Die Luciferase Aktivität wird mit dem Dual-Luziferase Reporter Assay System im Luminometer bestimmt. Dazu wurden 100 µl Luziferase Assay Reagenz II in die Luminometer Röhrchen vorgelegt, 20 µl des Zelllysates dazugegeben, gemischt und die *Firefly* Luziferase Aktivität bestimmt. Danach wird diese mit 100 µl Stop & Glo Reagenz abgestoppt und die *Renilla* Luziferase Aktivität bestimmt.

Zur Bestimmung der relativen Werte wird der Wert der Luziferase Aktivität durch den Wert der *Renilla* Luziferase Aktivität geteilt. Von den Einzelwerten werden für jede Plasmidlänge und in Abhängigkeit von dessen Methylierung der arithmetische Mittelwert und, zur Darstellung der Streuung, die Standardabweichung berechnet. (Formeln s. Kap. 3.7)

3.9 Gelshift

Prinzip des Gelshift

Über einen Gelshift lassen sich Bindungsaffinitäten von Protein an bestimmte DNA-Fragmente *in vitro* bestimmen. Dazu werden radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit Zellproteinen inkubiert und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt durch Autoradiografie des getrockneten Gels (Gentechnische Methoden). Als Signale erscheinen die ungebundenen DNA-Fragmente, die im Gel schneller laufen, sowie verschiedene Protein-DNA-Komplexe, die retardieren. Zur spezifischen Bestimmung der Proteinbindung kann dem Protein-Oligonukleotidgemisch zusätzlich nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid zugegeben werden, das nun ebenfalls mit den Proteinen Komplexe bilden kann. Entspricht die DNA-Sequenz des nicht markierten Oligonukleotid – dem sogenannten Kompetitor – der DNA-Sequenz des eingesetzten radioaktiv markierten Oligonukleotids – der Sonde – so fängt der Kompetitor die spezifischen Proteine ab: durch die homologe Kompetition verschwinden spezifische Banden (Spur C in Abb. 5). Gibt man dagegen einen nicht homologen Kompetitor zu, die DNA-Sequenz des Kompetitor entspricht also nicht derjenigen der Sonde, so bleiben die spezifischen Banden erhalten, da die Affinität der Proteine zu dieser Sequenz vergleichsweise niedriger ist. Es verschwinden allerdings die Banden

unspezifischer DNA-Protein-Komplexe, da der nicht homologe Kompetitor zu diesen Proteinen eine ähnliche Affinität aufweist wie die Sonde (Spur D in Abb. 5).

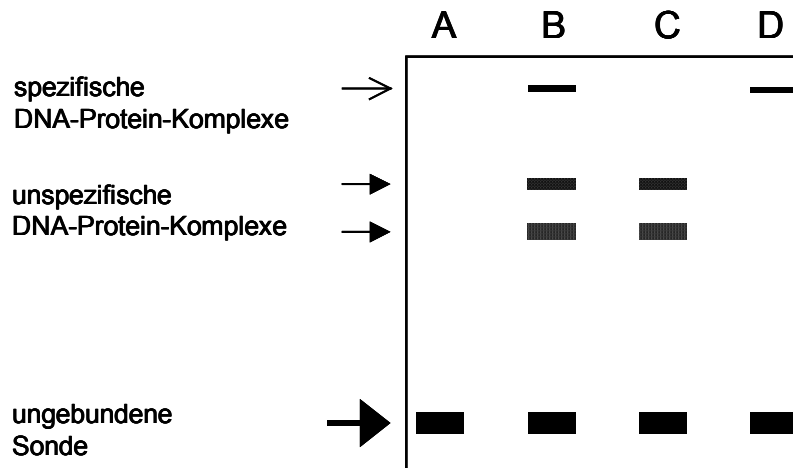


Abb. 5: Schematische Darstellung eines EMSA-Gels

In der Abbildung ist ein mögliches Ergebnis eines EMSA Gellauf dargestellt. In Spur A ist nur die ungebundene Sonde abgebildet. In Spur B sind noch zusätzliche DNA-Protein-Komplexe dargestellt. Durch Zugabe eines homologen Kompetitors verschwindet die Bande des spezifischen Komplexes in Spur C. In Spur D verschwinden durch den heterologen Kompetitor unspezifische Protein-DNA-Komplexe. DNA Desoxyribonukleinsäure, EMSA electrophoretic mobility shift assay

Annealing der Oligonukleotide

Für die Gelshift-Sonden soll die Endkonzentration der Oligonukleotide im Oligo Annealing Puffer soll 2,5 pmol/μl betragen. In ein 0,5-Mikroreaktionsgefäß werden 340 μl H₂O, 40 μl 10 x Oligo Annealing Puffer und jeweils 10 μl der entsprechenden Konzentration Oligonukleotid gegeben und 15 min in einem kochendem Wasserbad erhitzt, um die eventuell bereits annealten Oligonukleotide wieder zu denaturieren. Um nun die komplementären Oligonukleotide zu annealen wurden sie über ca 12 h im Wasserbad abgekühlt.

³²-P-Markierung der annealten Oligonukleotide

Die doppelsträngigen Oligonukleotsonden können nun mit der Klenow-Fragment-DNA-Polymerase, radioaktiv am 5'-Ende mit α³²-P-dCTP markiert werden. Ein

Probenansatz enthält in 50 µl 2,5mM dNTPs, 5 µl 10x Klenow-Puffer, und 2,5 pmol Oligonukleotid, 1 µl Klenow (ca 5 Units Enzym) und 5 µl α^{32} -P-dCTP (ca. 50 µCi) und wird 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die radioaktiv markierten Oligonukleotide werden mit dem *Nuc Trap System* aufgereinigt. 80 µl STE-Puffer wurden auf die Säule aufgetragen mit einer 10 ml Spritze durch die Säule gedrückt bis ein Tropfen heraustropft. Diese equilibrierte Säule soll innerhalb von 5 – 10 min verwendet werden. Die Säule wird in die *Betashield* Vorrichtung eingespannt und das radioaktiv markierte Oligonukleotid aufpipettiert. Nun wird die Spritze aufgesetzt und der Stempel mit dem *Betashield* langsam aber konstant durchgedrückt.

Durchführung des Gellaufs

Es wird ein nicht-denaturierendes 4,5% Polyacrylamid-Gel (Bakker 1991) gegossen und über Nacht im Kühlraum, oder mindestens 3 h bei Raumtemperatur polymerisiert.

Der Mastermix enthält 4 µl 5x Band-Shift Puffer, 2 µl Poly dl-dC, 2 µl BSA (10mg/ml) in 16 µl Gesamtvolumen. In 1,5ml Eppendorfgefäße werden 2 µl Proteinansatz (0,5 µg Proteinextrakt in Protein-Verdünnungspuffer gelöst) und im kompetitiven Experiment 1 µl unmarkiertes Oligonukleotid (entsprechend 10- oder 100-fach molaren Überschuss) vorgelegt. Je Bandshiftreaktion wird 1 µl 32 P-markiertes Oligonukleotid dem Mastermix zugegeben, von dem jeweils 17 µl auf die vorgelegten Proteine verteilt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Als Laufstreckenmarker werden noch je 2 µl Blaumarker zugegeben. Nach 30 min Vorlaufzeit, bei 13 mA und 10 Volt/cm, werden 20 µl Probe in die ausgespülten Taschen des 4,5% PAA-Gel aufgetragen. Die Laufzeit beträgt bei 13 mA 120 – 150 min. Als Laufpuffer wird 0,5x TBE verwendet.

Das Gel wird auf 3 Lagen Whatmanpapier gelegt, mit Frischhaltefolie überzogen, auf dem Vakuumtrockner 30 min bei 70°C getrocknet und anschließend 12 – 48 h mit einem Röntgenfilm exponiert. Nach dem Entwickeln des Röntgenfilm werden die unterschiedlichen DNA-Protein-Komplexe als Banden sichtbar.

4 Ergebnisse

4.1 Leptinexpression in LiSa-2 Zellen

Die Expression von Leptin wurde in LiSa-2 Zellen nach mRNA Extraktion und nachfolgender cDNA Synthese bestimmt.

Leptin mRNA lässt sich auch nach adipogener Stimulierung von LiSa-2 Zellen nicht mittels RT-PCR nachweisen. Erst durch zusätzliche Inkubation mit 5-Aza-dC wird die Expression von Leptin in LiSa-2 Zellen nachweisbar. Dazu wurden LiSa-2 Zellen verwendet, die mit 5-Aza-dC vorinkubiert worden waren.

Die mRNA wurde am 1. und 2. Tag nach adipogener Stimulation – aus nicht differenzierten Zellen – und nach 14 und 23 Tagen aus morphologisch sichtbar differenzierten Zellen gewonnen.

Um die Leptin Expression semiquantitativ darstellen zu können, wurde die mRNA Expression des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors Sp1 als interner Standard gleichzeitig in einer sogenannten Duplex PCR mit der Leptin Expression bestimmt. Die elektrophoretische Auftrennung eines solchen Experiments ist in Abb. 6 dargestellt.

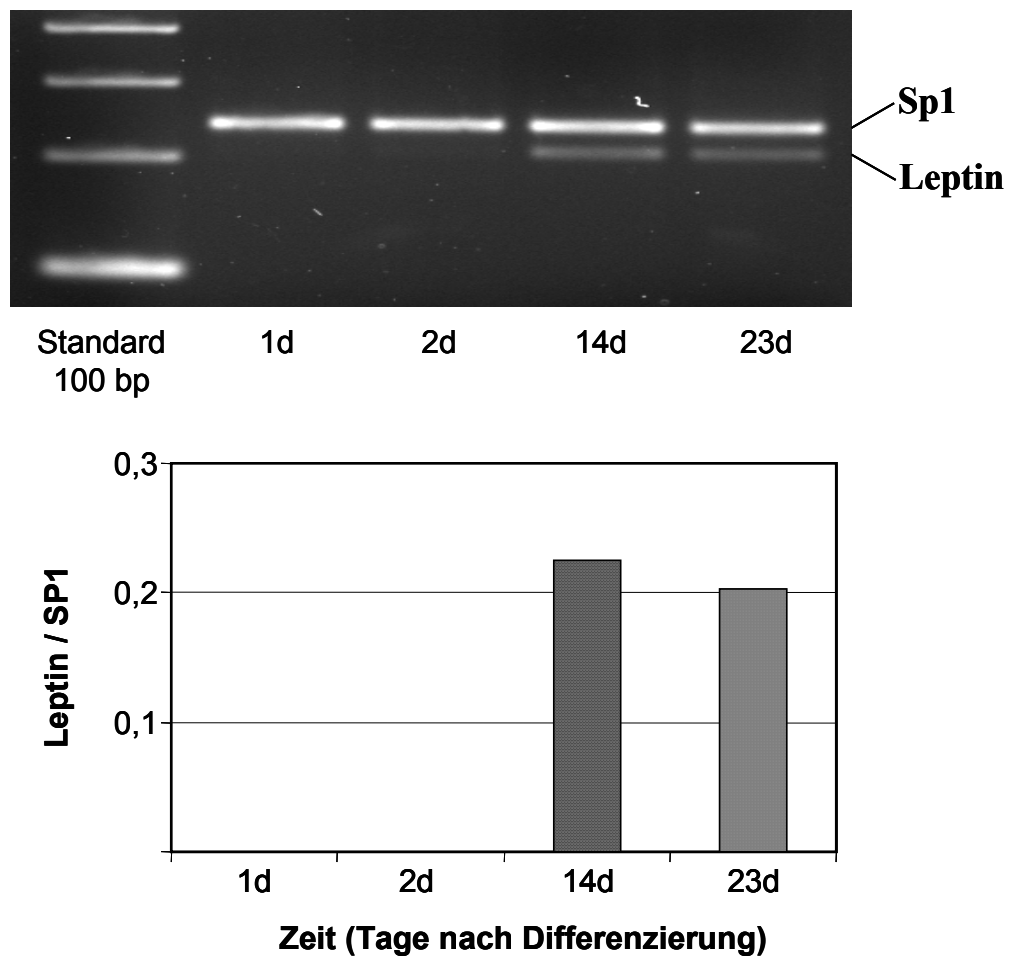


Abb. 6: mRNA Expression von Leptin und Sp1 in LiSa-2 Zellen

Das Diagramm zeigt die Höhe der Expression von Leptin bezogen auf Sp1 als relative Werte.

mRNA messenger Ribonukleinsäure, d Tag, bp Basenpaare

4.2 CpG-Blott

Die Induktion der Leptinexpression nach Kulturbedingungen, die eine Methylierung der DNA verhindert, deutet darauf hin, dass der Leptinpromoter durch Methylierung/Demethylierung ab und angeschaltet werden kann. Hierzu wurde zuerst untersucht, ob der Leptinpromoter eine CpG-Insel besitzt.

Um CpG-Inseln in DNA-Sequenzen zu finden, gibt es das CpG-Blott Computerprogramm. Gibt man die Promotersequenz ein, so erkannte das CpG-Blott Programm in dem Promoterabschnitt von -258 bis +59 eine CpG-Insel, die sich von Nukleotid +3 bis Nukleotid -211 erstreckt. Sie hat einen CG-Gehalt von 73,8%. Das durchschnittliche Verhältnis des beobachteten gegenüber des erwarteten CpG-Dinukleotid-Gehaltes liegt bei 0,87.

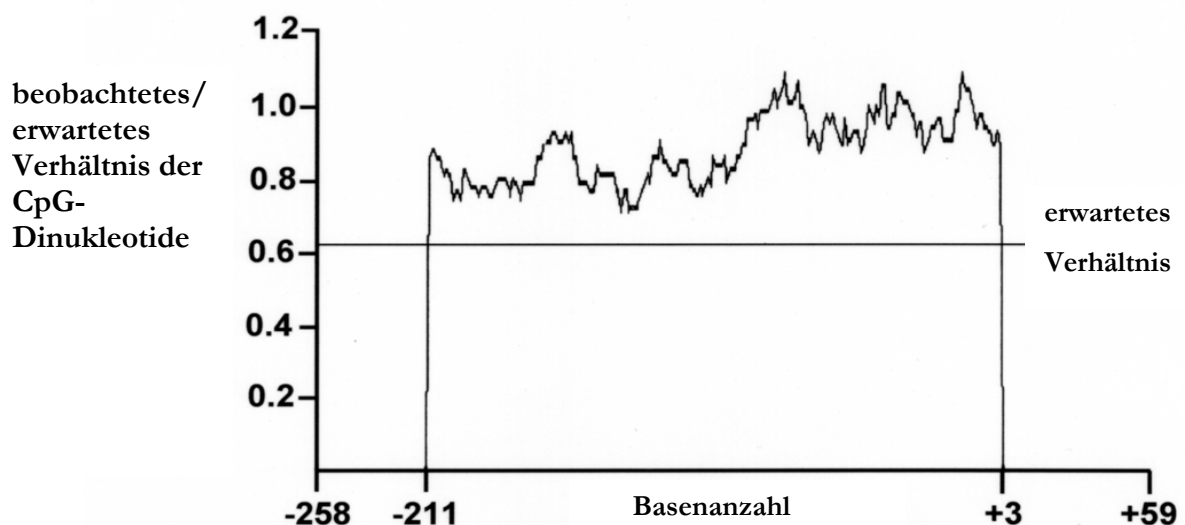


Abb. 7: CpG-Blott

Das Diagramm zeigt den durchschnittlichen CpG-Dinukleotid Gehalt über jeweils 10 Basenpaare von Nukleotid -258 bis Nukleotid +59. Das erwartete Verhältnis 0,625 eines CpG-Dinukleotid in 10 Dinukleotiden ist als Gerade eingezeichnet.

4.3 5-MeC-Gehalt des Leptinpromoter

Um in der DNA-Sequenz des untersuchten Promoterabschnitts den CpG-Methylierungsstatus zu bestimmen, wurde die DNA mit Bisulfit modifiziert und mittels methylsensitiver Einzelstrang-PCR amplifiziert und sequenziert. Dadurch erschien in der Sequenz C als T und 5-MeC als C. Die modifizierten Sequenzen wurden mit dem entsprechenden Abschnitt der unveränderten Promotersequenz verglichen und so die CpG und 5-MeCpG in der Promoterregion von Präadipozyten, Adipozyten und LiSa-2 Zellen bestimmt.

Die untersuchte Region enthielt 317 Basenpaare mit 32 CpG-Dinukleotiden, von denen drei in den Anlagerungsregionen der Primer (s. Tab. 1) lagen, weshalb diese nicht bei der Auswertung berücksichtigt wurden. In Abb. 8 ist die Promoter-Sequenz des humanen Leptingens von Basenpaar -228 bis +24 relativ zum Startcodon ATG (+1) dargestellt.

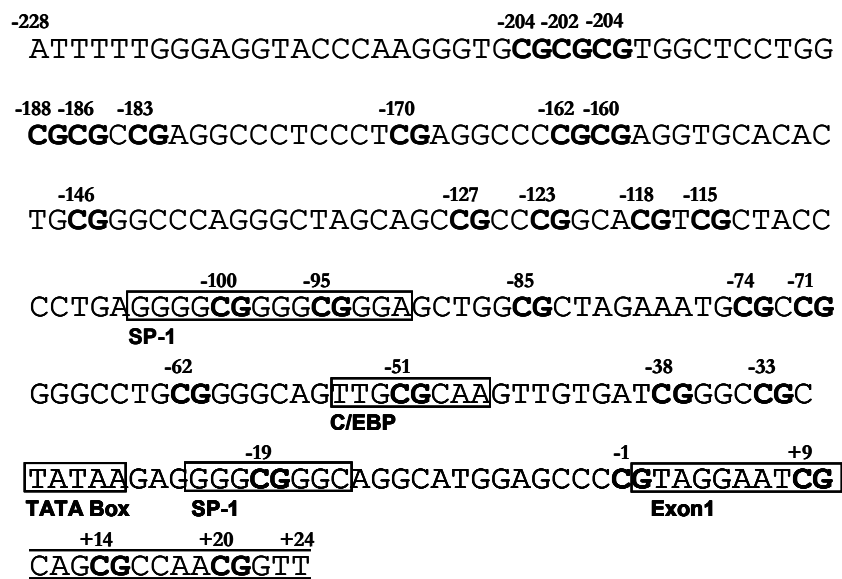


Abb. 8: DNA-Sequenz des untersuchten Abschnitt des menschlichen Leptingenpromoter.

In der DNA-Sequenz sind die bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen eingezeichnet und benannt, sowie die darin enthaltenen CpG-Dinukleotide fett gedruckt und die Basenpaarposition angegeben.

A Adenosin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin, DNA Desoxyribonukleinsäure, C/EBP CCAAT/enhancer binding protein (modifiziert nach 36)

4.4 Ergebnisse der Sequenzierungen

Prädipozyten – Adipozyten

Da Prädipozyten durch hormonellen Einfluss zu Adipozyten differenzieren und auf diesem Weg die Leptin-Expression induziert wird, wurde der Leptinpromotor beider Zellarten auf den 5-MeC-Gehalt in der CpG-Insel untersucht und verglichen. (Abb. 9)

Hierbei zeigte sich, dass die nahezu alle CpG-Dinukleotide in diesem Abschnitt in Prädipozyten methyliert waren (89,8% $\pm$ 1,3%). Nach Differenzierung zu Adipozyten waren nur noch wenige CpG's methyliert (8,0% $\pm$ 7,1%).

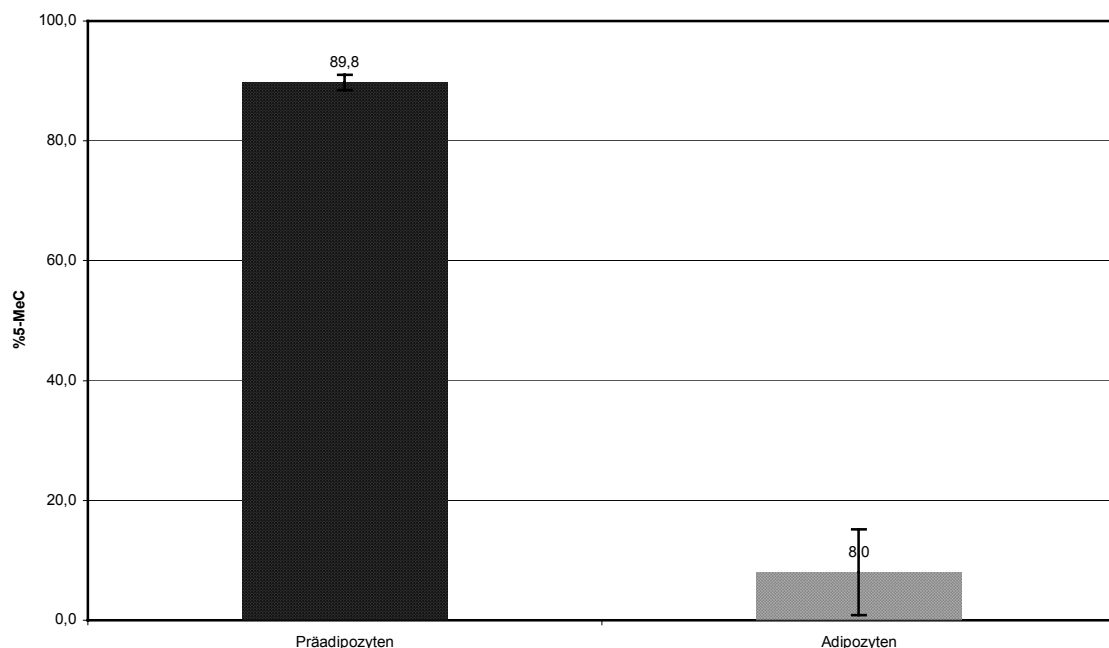


Abb. 9: 5-MeC Gehalt in Prädipozyten und Adipozyten

Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Gehalt an 5-Methylcytosin (%5MeC) der 28 untersuchten CpG-Dinukleotide des sequenzierten Promoterabschnitt in Prädipozyten und Adipozyten.

LiSa-2 Zellen

Da die LiSa-2 Zellen nach Inkubation mit 5-aza-dC Leptin exprimieren (LiSa-2,AZA), wurde der 5-MeC-Gehalt in der DNA des Leptinpromoters dieser Zellen mit Leptin negativen LiSa-2 Zellen verglichen. Leptin negative LiSa-2 Zellen waren solche, die in Vollmedium (LiSa-2,FCS), in F0 Medium (LiSa-2,F0) und adipogenem Medium (LiSa-2,Quick) kultiviert worden waren.

(Abb. 10)

Es zeigte sich, dass der Promoter in Leptin exprimierenden LiSa-2 Zellen im Vergleich zu Leptin negativen Zellen deutlich demethyliert war.

Der Gehalt an 5-MeC betrug in LiSa-2,F0 47% $\pm$ 12,6%, in LiSa-2,FCS 46,3% $\pm$ 13,3% und in LiSa-2,Quick 55,0% $\pm$ 11,9%.

In LiSa-2,AZA war das Verhältnis methylierter CpG's zu nicht methylierten deutlich geringer bei 13,8% $\pm$ 13,3%.

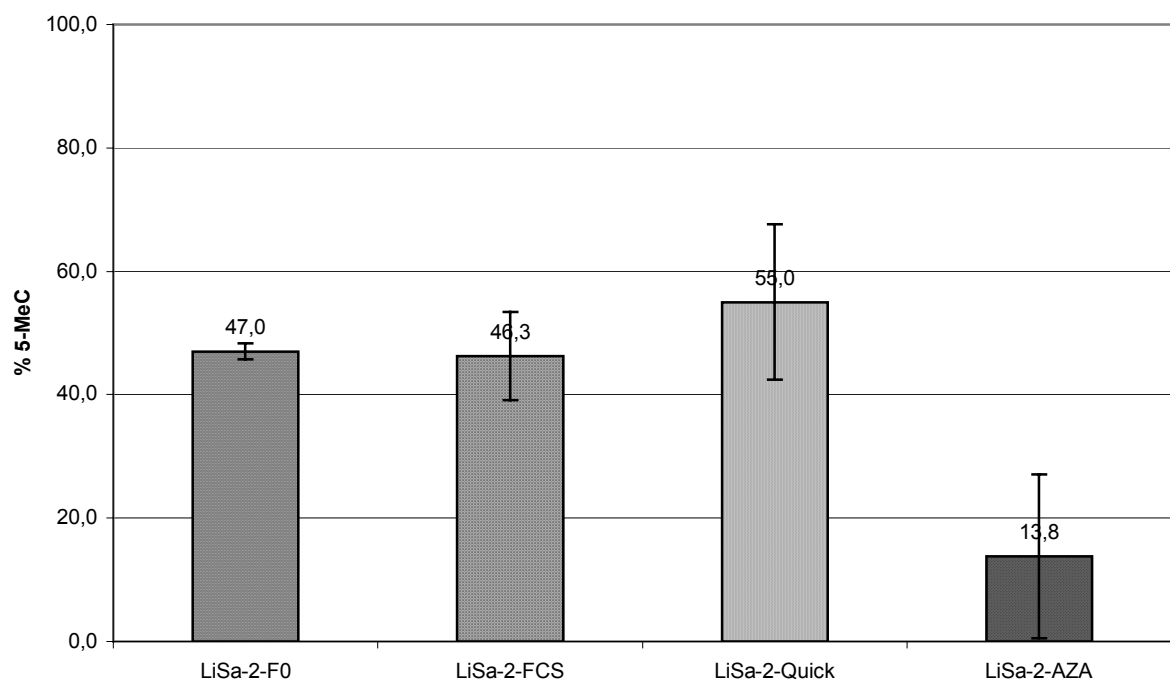


Abb. 10 : 5-MeC-Gehalt in LiSa-2 Zellen

Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Gehalt an 5-MeC der 28 im sequenzierten Abschnitt vorhandenen CpG-Dinukleotide in LiSa-2-F0 (in F0-Medium inkubiert), LiSa-2-FCS (in Fetal Calf Serum-haltigem Medium inkubiert), LiSa-2-Quick (mit Quick-Medium inkubiert) und LiSa-2-AZA (mit 5-Aza-2'-desocytidin vorinkubiert). 5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin

Der Promoter in LiSa-2;FO, LiSa-2;FCS und LiSa-2;Quick, die wie die Präadipozyten kein Leptin exprimierten, enthielt nur etwa die Hälfte des in Präadipozyten gefundenen 5-MeC/C Verhältnis, war also deutlich demethyliert.

Die Inkubation mit 5-aza-dC führte in LiSa-2 Zellen zur weiteren Demethylierung des Promoters begleitet mit der Expression von Leptin. Der gefundene Anteil an 5-MeC in Leptin exprimierenden LiSa-2 Zellen und Adipozyten war vergleichbar gering.

Um nun zu zeigen, welche CpG-Cluster des Promoters von der Demethylierung besonders betroffen waren, wurde der Methylierungsstatus der einzelnen CpG-Dinukleotide durch Sequenzierung der Bisulfit modifizierten DNA untersucht. Die folgenden Abbildungen zeigen die DNA-Sequenz des untersuchten Leptinpromoterabschnitts, in denen unter den CpG-Dinukleotiden angegeben ist, ob sich 5-MeC (ausgefüllter Kreis) oder C (nicht gefüllter Kreis) an dieser Position in der untersuchten Sequenz befand.

Im Promoter der Präadipozyten waren alle CpG-Dinukleotide außer an den Positionen -162, -146 und +9 in den vier Sequenzen vollständig methyliert (Abb. 11). Nach adipogener Differenzierung enthielt die Promoterregion in den Adipozyten bis auf vereinzelte CpG-Dinukleotide kein 5-MeC (Abb. 12). Hier wurden sieben unabhängige Sequenzierungen durchgeführt.

Die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten geht also mit einer dramatischen Demethylierung der DNA des untersuchten Leptinpromoterabschnitts einher.

Vergleichbar dazu zeigten LiSa-2;AZA in 5 unabhängigen Sequenzen zwei vollständig demethylierten Sequenzen und drei Sequenzen, die unterschiedlich stark (bis max 32 %) methyliert waren. (Abb. 13)

Im Promoterabschnitt von LiSa-2; F0 (Abb. 14), LiSa-2; FCS (Abb. 15) und LiSa-2; Quick (Abb. 16) waren die CpG-Dinukleotide -204, -202, -200, -188, -186, -183, -162, -160, -51, -38, -33 und -19 in über der Hälfte der Sequenzen methyliert. Die Vorinkubation mit 5-Aza-dC führte in der Tumorzelllinie LiSa-2 zu einer Demethylierung der CpG-Dinukleotide, die durch adipogene Differenzierung mittels Hormonen in Präadipozyten zu Adipozyten bedingt wurde.

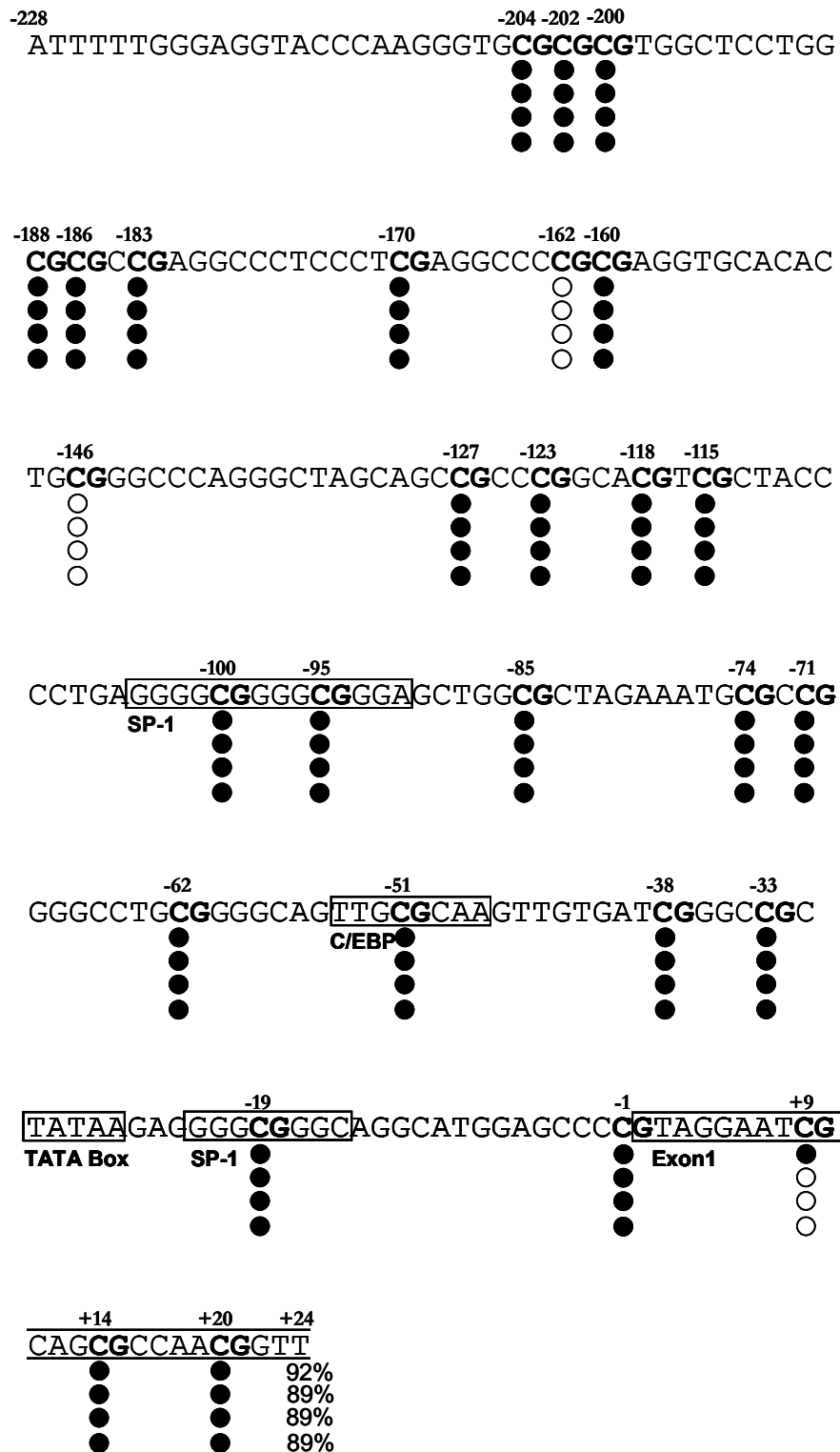


Abb. 11: 5-MeC-Gehalt von Präadipozyten

Die schwarz ausgefüllten Kreise markieren 5-MeC im sequenzierten Leptingenpromoterabschnitt (nicht ausgefüllte Kreise stehen für C). Die Prozentangabe ist der Gehalt von 5-MeC in den 28 untersuchten CpG-Dinukleotiden der Sequenzierung einer Zelle. Die Zahlen markieren die Position der CpG-Dinukleotide in der Promotersequenz.

5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin. Die Rahmen markieren die TATA-Box, die Bindungsstellen für SP 1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) sowie Exon 1.

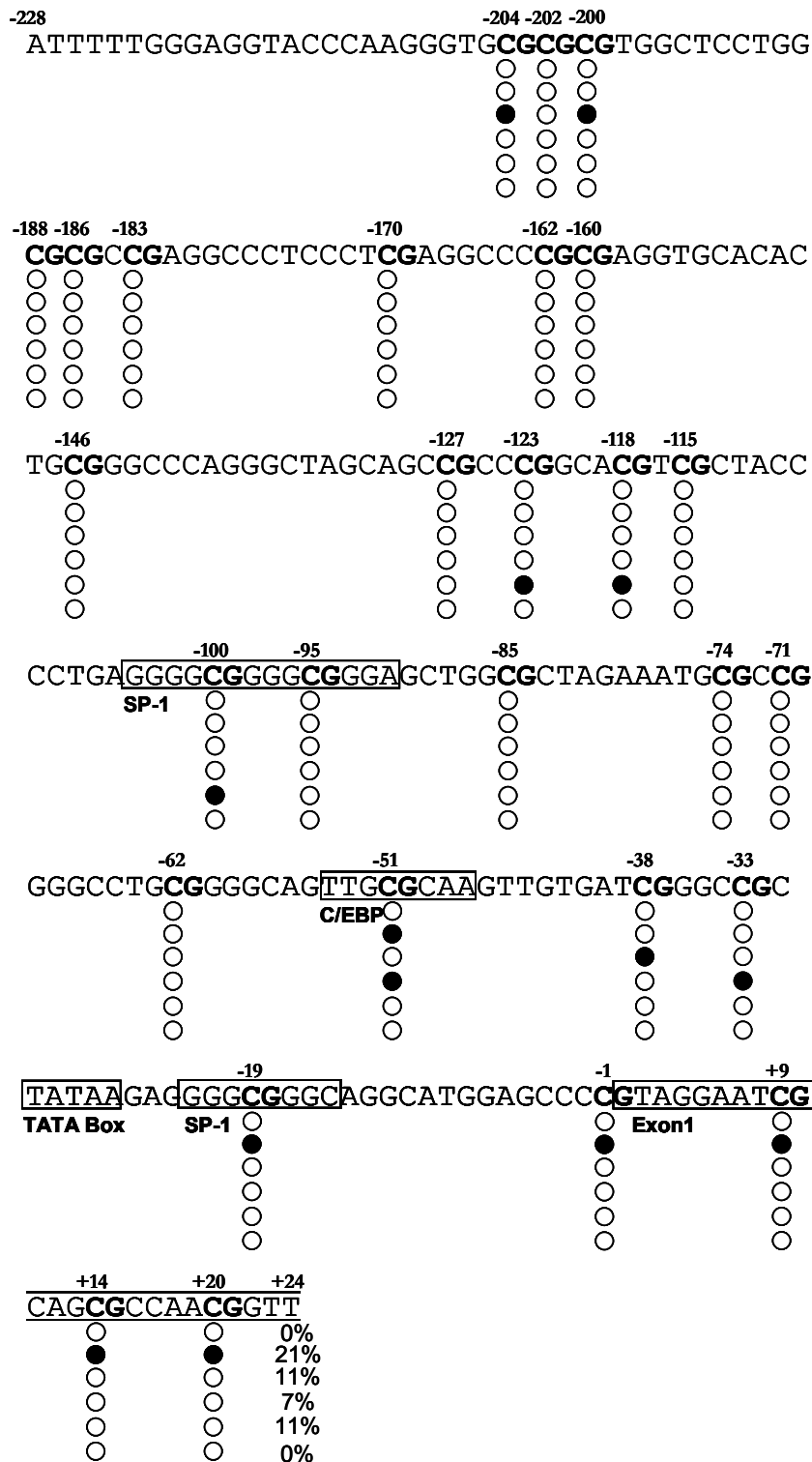


Abb. 12: 5-MeC-Gehalt von Adipozyten

Die schwarz ausgefüllten Kreise markieren 5-MeC im sequenzierten Leptingenpromoterabschnitt (nicht ausgefüllte Kreise stehen für C). Die Prozentangabe ist der Gehalt von 5-MeC in den 28 untersuchten CpG-Dinukleotiden der Sequenzierung eines Adipozyten.

5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin. Die Rahmen markieren die TATA-Box, die Bindungsstellen für SP 1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) sowie Exon 1.

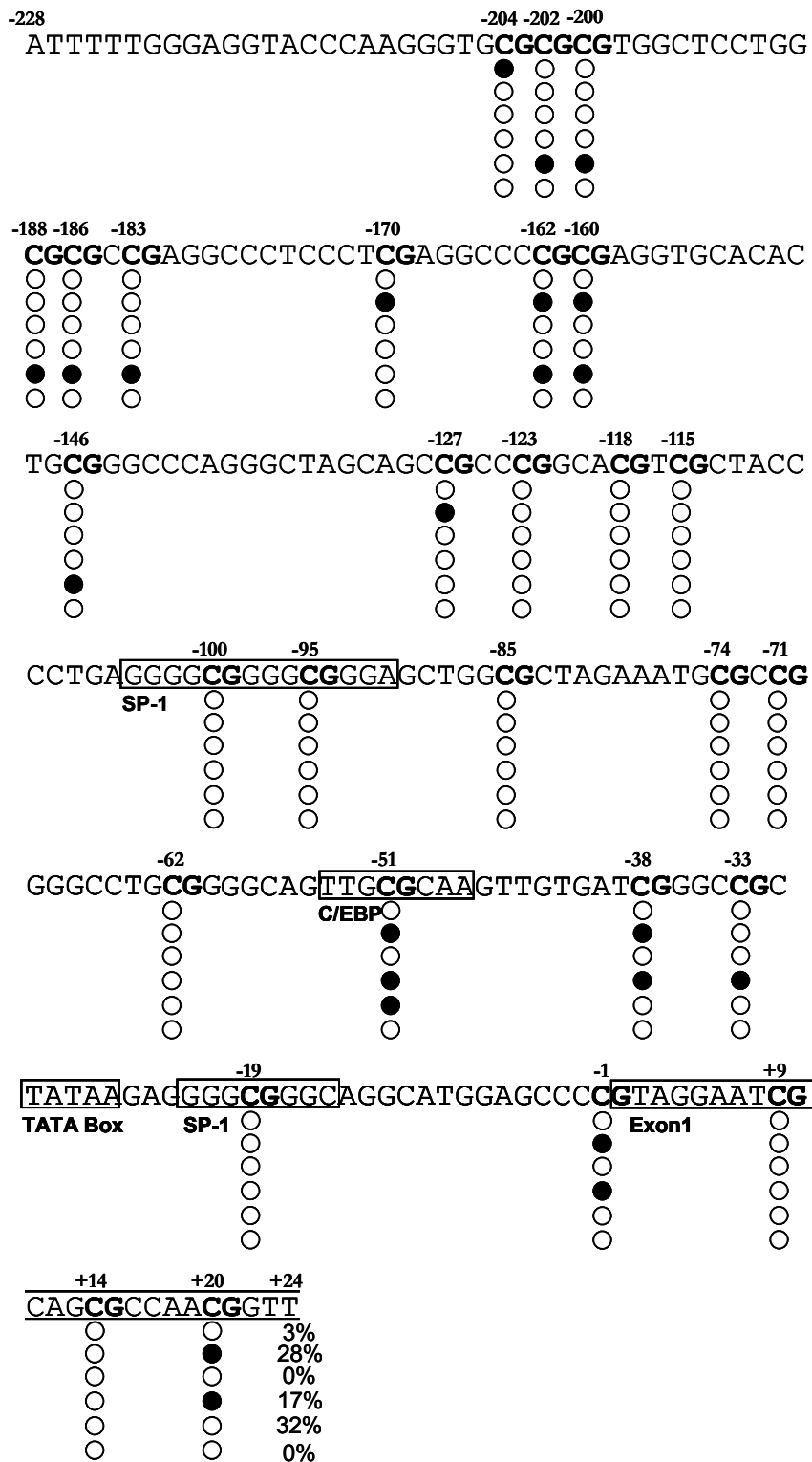


Abb. 13: 5-MeC-Gehalt von LiSa-2-AZA

Die schwarz ausgefüllten Kreise markieren 5-MeC im sequenzierten Leptingenpromoterabschnitt (nicht ausgefüllte Kreise stehen für C). Die Prozentangabe ist der Gehalt von 5-MeC in den 28 untersuchten CpG-Dinukleotiden der Sequenzierung einer Zelle (LiSa-2-AZA LiSa-2 Zellen in 5-aza-2'-desoxycytidin vorinkubiert).

5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin. Die Rahmen markieren die TATA-Box, die Bindungsstellen für SP 1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) sowie Exon 1.

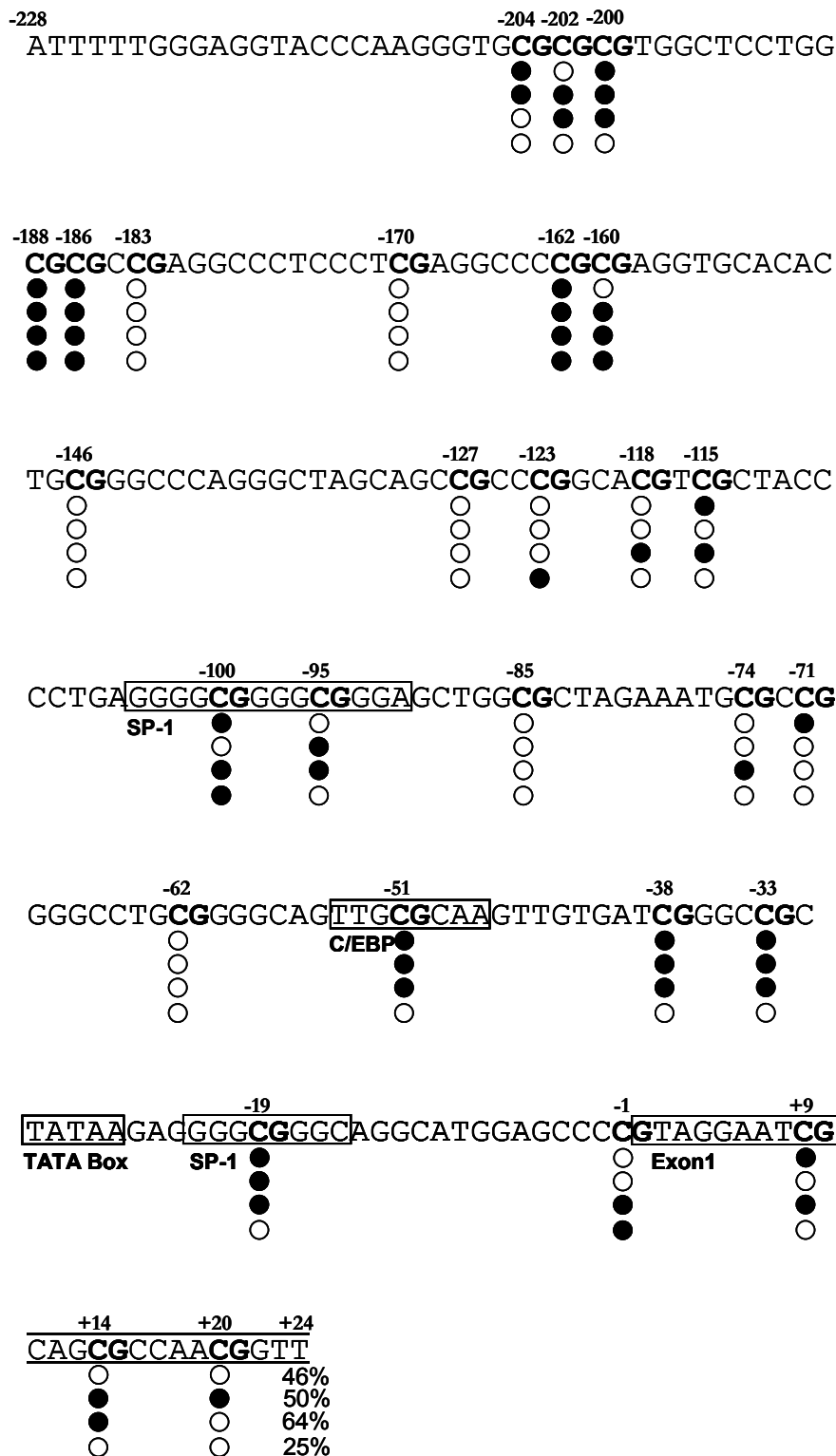


Abb. 14: 5-MeC-Gehalt von LiSa- 2-F0

Die schwarz ausgefüllten Kreise markieren 5-MeC im sequenzierten Leptingenpromoterabschnitt (nicht ausgefüllte Kreise stehen für C). Die Prozentangabe ist der Gehalt an 5-MeC in den 28 untersuchten CpG-Dinukleotiden der Sequenzierung einer Zelle (LiSa-2-FO LiSa-2 Zellen mit F0-Medium inkubiert).

5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin. Die Rahmen markieren die TATA-Box, die Bindungsstellen für SP 1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) sowie Exon 1.



5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin. Die Rahmen markieren die TATA-Box, die Bindungsstellen für SP 1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) sowie Exon 1.

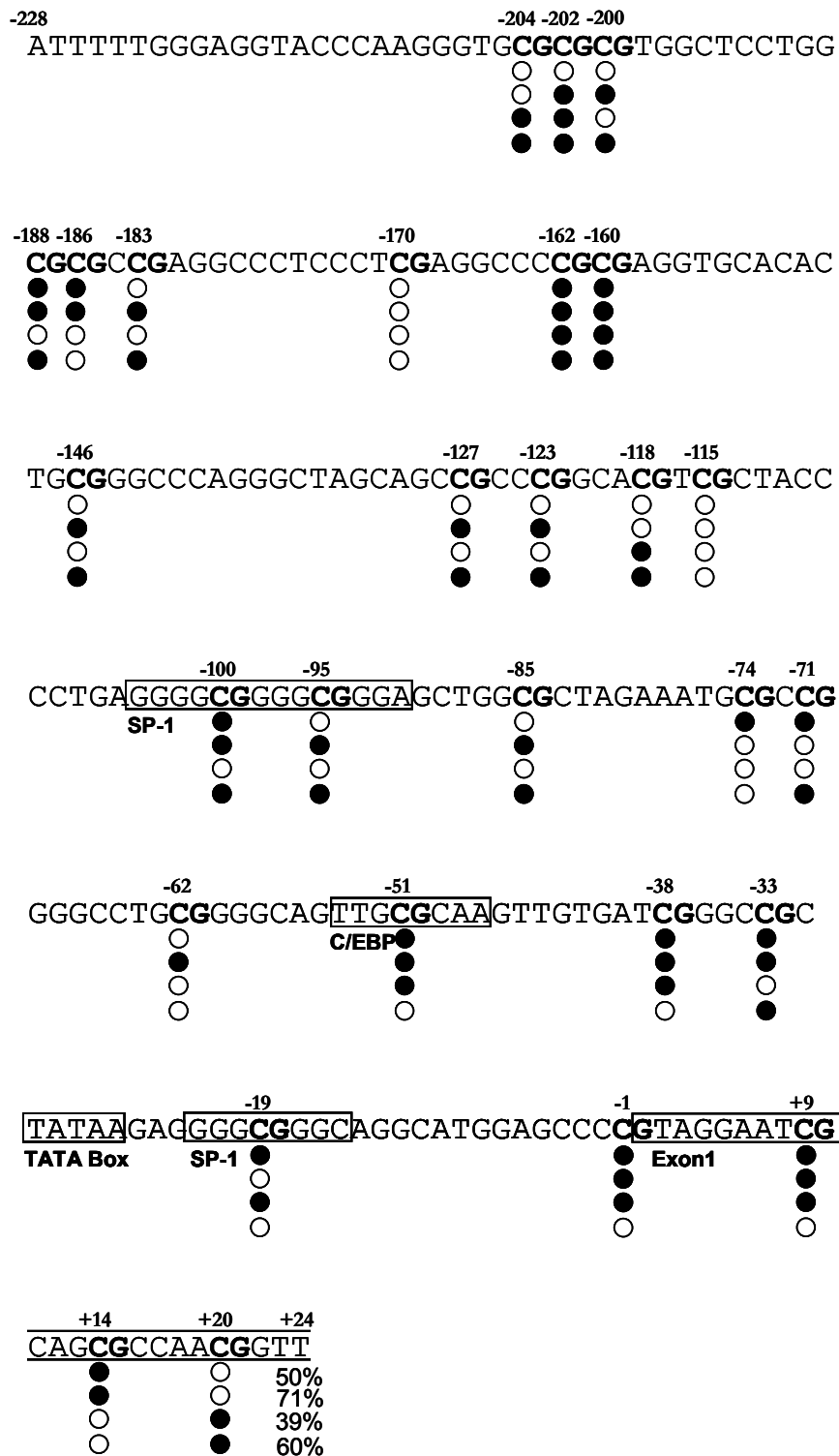


Abb. 16: 5-MeC Gehalt von LiSa-2,Quick

Die schwarz ausgefüllten Kreise markieren 5-MeC im sequenzierten Leptingenpromoterabschnitt (nicht ausgefüllte Kreise stehen für C). Die Prozentangabe ist der Gehalt an 5-MeC zu C in den 28 untersuchten CpG-Dinukleotiden der Sequenzierung einer Zelle (LiSa-2-Quick LiSa-2 Zellen mit Quick-Medium inkubiert).

5-MeC 5-Methylcytosin, C Cytosin. Die Rahmen markieren die TATA-Box, die Bindungsstellen für SP 1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) sowie Exon 1.

4.5 Transiente Transfektion von LiSa-2 Zellen

Der Einfluss der CpG-Methylierung auf die Aktivität des humanen Leptinpromoter wurde in Transfektionsexperimenten untersucht. Dazu wurden unterschiedlich lange DNA-Promoterkonstrukte in den pGL3Basic Vektor vor das Reportergen Luziferase eingefügt. Zusätzlich wurden die Konstrukte mit der *HhaI*- oder *SssI*-Methylase methyliert. Die methylierten und nicht methylierten Promoterkonstrukte wurden in LiSa-2 Zellen transient transfektiert. Die Luziferaseaktivität wurde nach 48 Stunden gemessen und auf die Aktivität der Co-transfektierten Renilla-Luziferase tragenden Plasmide bezogen (Abb. 17)

Die höchste Luziferaseaktivität wurde bei Konstrukt P-106 gemessen, das die TATA-Box, die C/EBP- α - und die Sp1-Bindungsstellen enthielt. Die abschnittsweise Verlängerung des eingefügten Promoterkonstrukts ohne weitere bekannte Bindungsdomänen für Transkriptionsfaktoren führte zur Abnahme der Aktivität der Konstrukte P-149, P-174, P-199 und P-258, wobei die Aktivität in Plasmid P-258 im Vergleich mit Plasmid P-199 wieder leicht zunahm. Die Aktivität des Konstrukts P-60, dem die Sp1-Bindungsstelle fehlte, fiel etwa auf die Hälfte des Werts von Konstrukt P-106, in dem die Sp1-Bindungsstelle enthalten war. Die weitere Verkürzung des Promoters ohne die C/EBP- α -Bindungsstelle führte zu einer deutlich verminderten Aktivität. Das Promoterkonstrukt ohne TATA-Box zeigte keine Promoteraktivität mehr und war vergleichbar mit dem promoterlosen pGL3-Basisvektors ($<1,0$).

Die vollständige Methylierung aller CpG-Dinukleotide mit der *SssI*-Methylase führte zum Aktivitätsverlust der Promoterkonstrukte P-258, P-199 und P-35. Die Aktivität der übrigen *SssI*-methylierten Konstrukte entsprach der Grundaktivität des TATA-Box-enthaltenden nicht methylierten Konstrukts P-35.

Durch die Methylierung der Plasmide mit der *HhaI*-Methylase wurden nur bestimmte einzelne CpG-Dinukleotide der Sequenz des Leptinpromoters methyliert. Die gemessene Promoteraktivität wurde durch diese Methylierung weniger stark vermindert als die vollständige Methylierung aller CpG-Dinukleotide. Die Methylierung an Position -51 innerhalb der C/EBP- α -Bindungsstelle verminderte die Aktivität von Plasmid P-60 im Vergleich zum gleich langen nicht

methylierten Konstrukt auf die Hälfte. Die Methylierung an Position -38 und -33 verringerte die Genexpression von Plasmid P-60 zusätzlich, wie der Vergleich mit dem vollständig SssI-methylierten Konstrukt P-60 zeigt.

Eine Verlängerung des Promoterkonstrukts (P-106, *HhaI*-methyliert) und die damit verbundene zusätzlich enthaltene Sp1-Bindungsstelle zeigte keinen aktivierenden Einfluss. Jedoch führte die *HhaI*-Methylierung an Position -188 und -186 bei Plasmid P-199 zur Deaktivierung der Promoteraktivität vergleichbar mit der des vollständig (*Sss-I*) methylierten, gleichlangen Konstrukts.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass vor allem die CpG-Methylierung in der Nähe der TATA-Box an Position -33 und -38, an Position -51 in der C/EBP- α -Bindungsstelle und an Position -186, -188, und -200 die Leptinpromoteraktivität reguliert. Durch die vollständige Methylierung wird der Promoter unabhängig von dessen Länge und vorhandenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen deaktiviert. Die Methylierung einzelner, bestimmter CpG-Dinukleotide zeigt abhängig von der Position des methylierten CpG-Dinukleotids den gleichen Effekt.

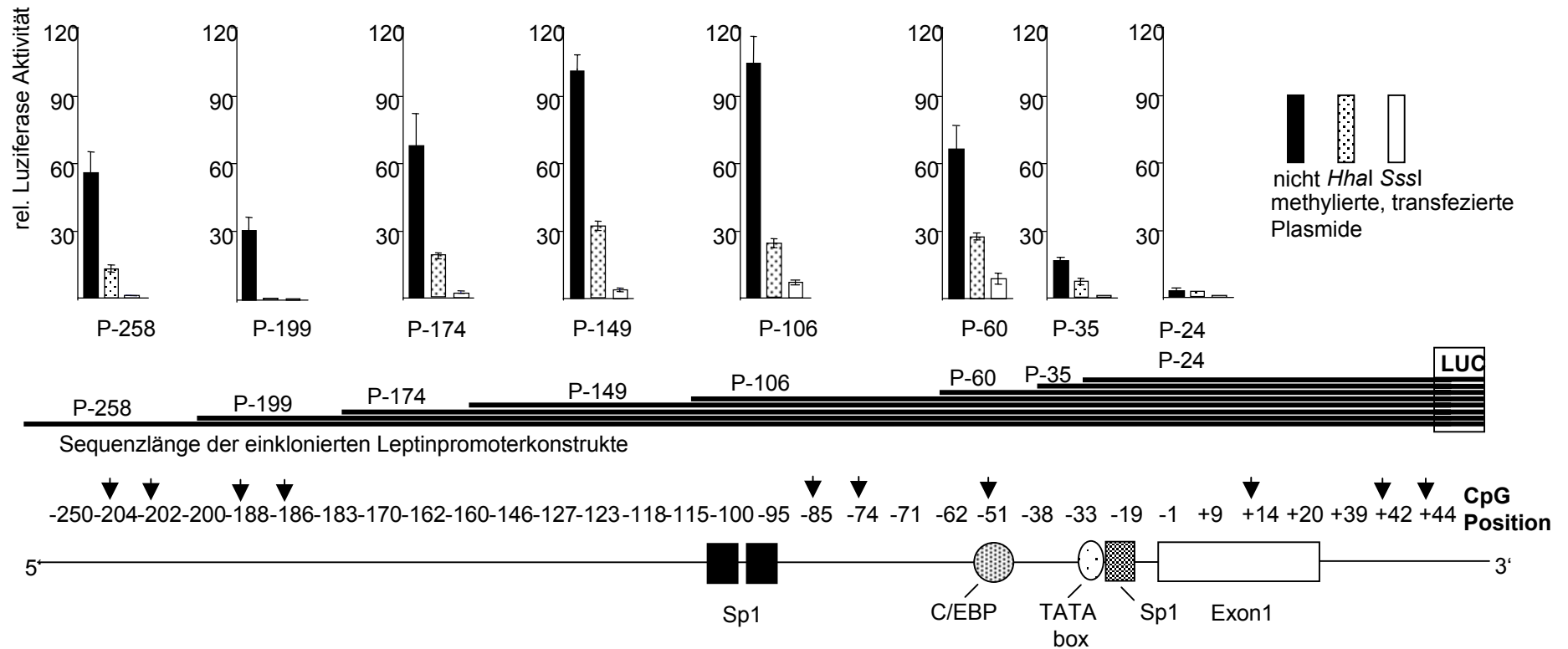


Abb. 17: Leptinpromoteraktivität in Transfektionsversuchen in Abhängigkeit von Sequenzlänge und Methylierungsstatus

Das Schema zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von der Länge des einklonierten Promoterkonstruktes (P-258, P-199, P-174, P-149, P-106, P-60, P-35, P-24) und dessen Methylierung. Die Länge ist auch systematisch anhand der darunterliegenden Balken dargestellt. Die darunterliegende Zahlenleiste symbolisiert die Positionen der CpG-Dinukleotide.

Pfeile Position der mittels *HhaI*-Methylase methylierten CpG-Dinukleotide. Die Symbole deuten die Lage der Bindungsdomänen der Transkriptionsfaktoren (Sp1, C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein), der TATA-Box und Exon 1 in der Sequenz an.

4.6 Gelshiftexperimente

Bindungsnachweis methylspezifischer DNA-Protein-Komplexe

Da in den Transfektionsexperimenten gezeigt werden konnte, dass die Methylierung der Promoters zur Verminderung der Promoteraktivität führt, wurde der Einfluss der Methylierung auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte Sequenzen des Leptingenpromoter mit Gelshift Versuchen untersucht. Um 5-MeC-CpG methylspezifische DNA-Protein-Komplexe zu erkennen, wurden sowohl methylierte als auch die entsprechenden nicht methylierten Oligonukleotide, die bestimmten Regionen der Leptinpromoter-Sequenz entsprachen, eingesetzt.

TATA-Box

Es wurde die Bindung spezifischer Proteine an die Region -19 bis -42 des Leptinpromoters bestimmt, in der von Position -31 bis -27 die TATA-Box liegt und an Position -33 und -38 zwei CpG-Dinukleotide enthält. (Abb. 18)

Der EMSA zeigt die Bildung von methylspezifischen DNA-Protein-Komplexen, an die Region der TATA-Box (Pfeile). Ebenso lassen sich TATA-Box-bindende-Proteine nachweisen, die unabhängig von der Methylierung in dieser Region binden (Stern).

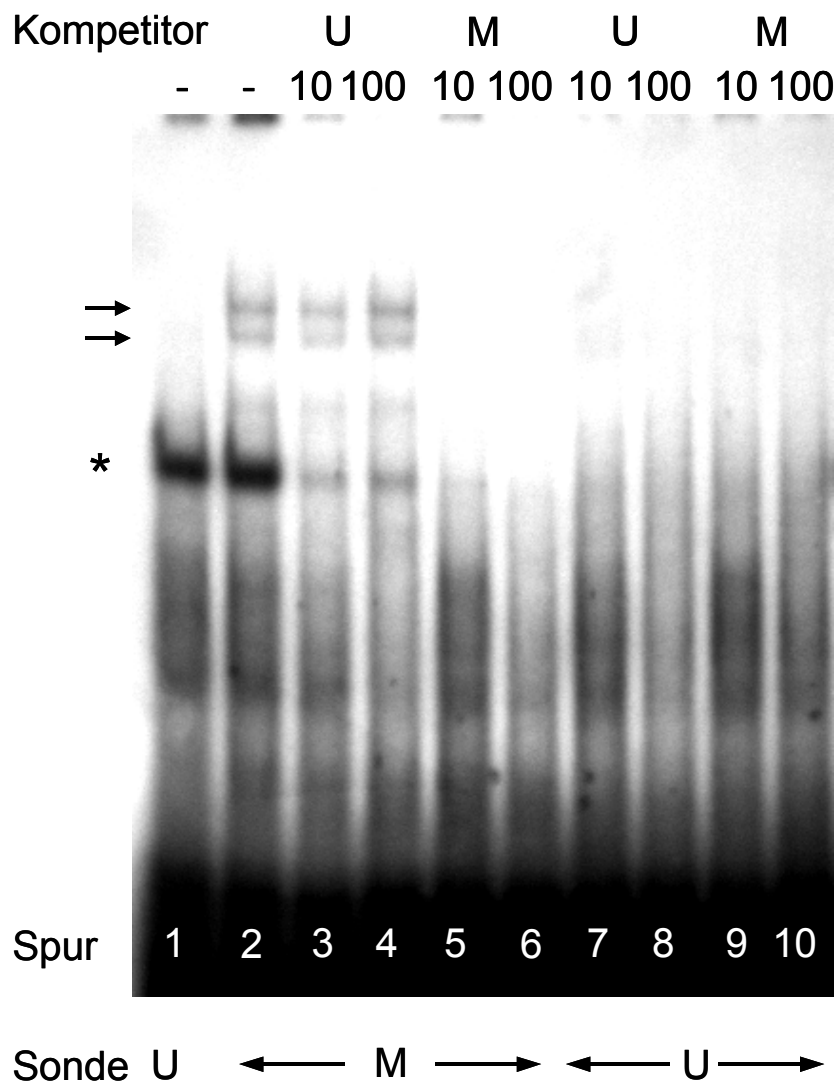


Abb. 18: Gelshift – TATA-Box

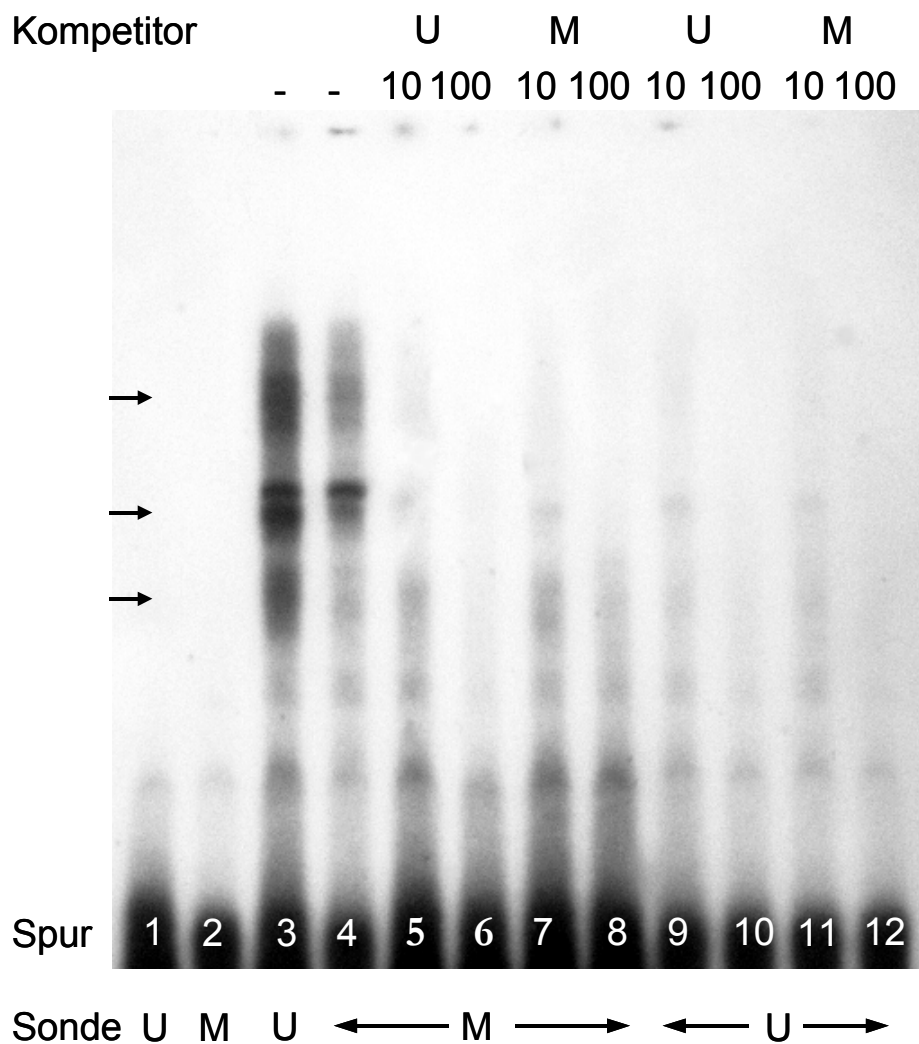
Radiographie des Gellaufs mit den DNA-Sonden TATA-f/r bzw. TATA-fm/rm. Die Pfeile markieren methylspezifische DNA-Protein-Komplexe, der Stern die Bildung unspezifischer DNA-Protein-Komplexe.

Sonde bzw. Kompetitor: U: nicht methyliertes Oligonukleotid (TATA-f/r) M: methyliertes Oligonukleotid (TATA-fm/rm)

10, 100: 10- bzw. 100- facher molarer Überschuss des Kompetitor.

C/EBP- α

An die Promoterregion -39 bis -64, in der eine C/EBP- α -Erkennungssequenz liegt, wurde die Bindung von Proteinen nachgewiesen, die sowohl Komplexe mit methylierter als auch nicht methylierter Sonde formten, jedoch mit der methylierten Sonde eine verminderte Bindungsaffinität zeigten. Die Bindung von C/EBP- α wurde durch die Methylierung der CpG-Dinukleotide an Stelle -51 und -62 demnach nicht vollständig jedoch teilweise inhibiert. (Abb. 19)

**Abb. 19: Gelshift – C/EBP- α -Bindungsstelle**

Radiographie des Gellaufs mit den DNA-Sonden C/EBP-f/r bzw. C/EBP-fm/rm. Die Pfeile markieren methylspezifische DNA-Protein-Komplexe.

Sonde bzw. Kompetitor: U: nicht methyliertes Oligonukleotid (C/EBP-f/r) M: methyliertes Oligonukleotid (C/EBP-fm/rm)

10, 100: 10- bzw. 100- facher molarer Überschuss des Kompetitor.

C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

EMSA – Methyl-Bindungs-Domäne (MBD)

Da in den Transfektionsversuchen deutlich wurde, dass auch die Methylierung der weiter stromauf gelegene Region, in der 6 CpG-Dinukleotide an Position -204, -202, -200, -188, -186 und -183 vorhanden sind, einen deutlichen Einfluss auf die Promoteraktivität hatte, wurde dieser Abschnitt von -178 bis -210 auf die Bindung methylspezifischer Proteine untersucht. (Abb. 20)

Es wurde die Bindung sowohl methylunabhängige (Stern) als auch methylspezifische Proteine an dieser Region (Pfeil) nachgewiesen.

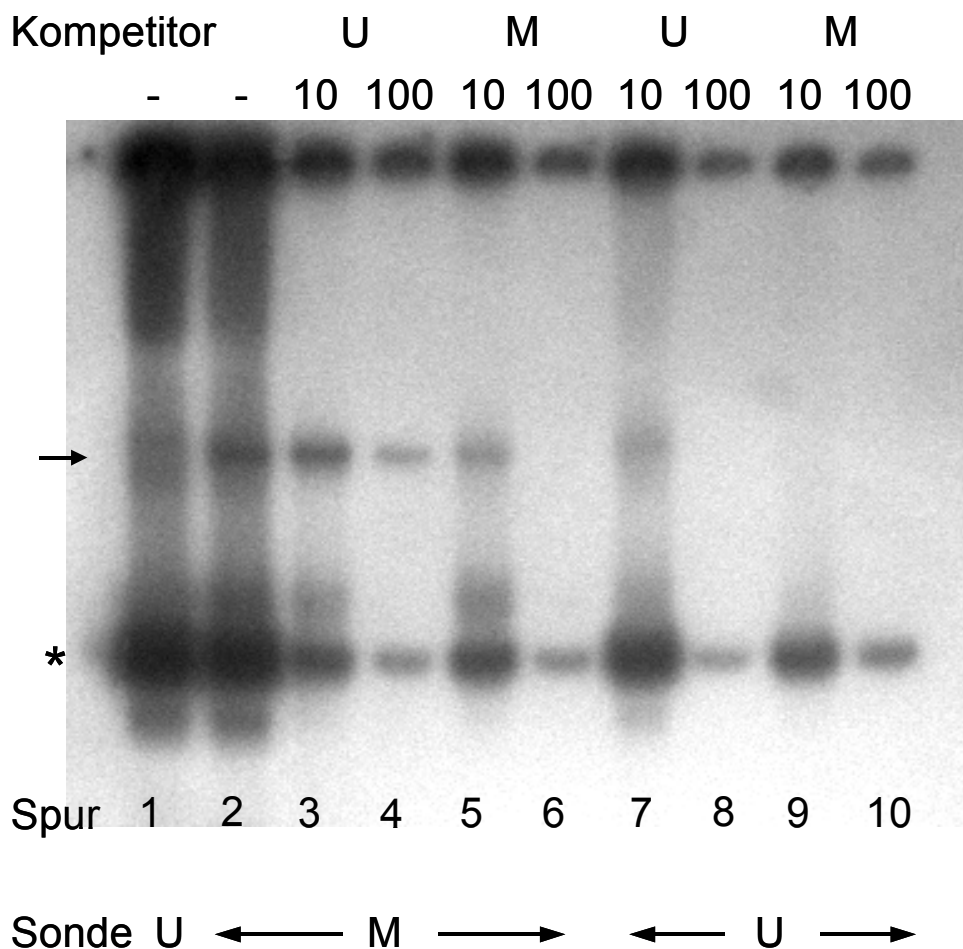


Abb. 20: Gelshift - MBD

Radiographie des Gellaufs mit den DNA-Sonden MBD-f/r bzw. MBD-fm/rm. Der Pfeil markiert einen methylspezifischen DNA-Protein-Komplex, der Stern die Bildung unspezifischer DNA-Protein-Komplexe.

Sonde bzw. Kompetitor: U: nicht methyliertes Oligonukleotid (MBD-f/r) M: methyliertes Oligonukleotid (MBD-fm/rm).

10, 100: 10- bzw. 100- facher molarer Überschuss des Kompetitor. MBD: Methyl-Binding-Domäne

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Liposarkomzelllinie LiSa-2 mit dem Methyltransferaseinhibitor 5-aza-dC und nachfolgender adipogener Stimulation zur Expression von Leptin führte. Im Gegensatz dazu hatte die alleinige Exposition mit hormonhaltigem, adipogenem Medium zwar die adipozytäre Differenzierung der Zellen bewirkt, die sowohl morphologisch in der zunehmenden Speicherung von Fetttröpfchen als auch der Expression einiger für Adipozyten spezifische Gene deutlich wurde, jedoch keine Expression von Leptin auslösen können (99).

Da bekannt ist, dass die Exposition von Zellen mit 5-aza-dC zur DNA-Demethylierung des Genoms führt (38), konnte vermutet werden, dass die Promoteraktivität des Leptingens durch die Methylierung der in der Promoterregion vorhandenen CpG-Dinukleotide reguliert wird. Von Taylor et al. wurde bereits 1979 die Möglichkeit der adipozytären Differenzierung unter dem Einfluss von 5-aza-dC ohne weitere hormonelle Stimulation gezeigt (93). Dass die DNA-Demethylierung im Verlauf der adipozytären Differenzierung ein wichtiges regulatives Motiv darstellt, wurde auch von der Beobachtung bestärkt, dass in 3T3-L1 Präadipozyten die Expression des Insulin-abhängigen Glukosetransporter GLUT 4 während der Ausreifung zu Adipozyten mit der Demethylierung der Promotersequenz einhergeht (102).

Um den Einfluss der DNA-Methylierung zu untersuchen, wurde zunächst der Anteil von methylierten CpG-Dinukleotiden in der DNA-Sequenz des humanen Leptingenpromoters bestimmt, und dieser in Leptin exprimierenden Zellen mit dem Anteil in nicht Leptin exprimierenden Zellen verglichen. Als Leptin exprimierende Zellen wurden Adipozyten, die aus humanen Präadipozyten *in vitro* ausdifferenzierten, sowie mit 5-aza-dC vorinkubierte und adipogen differenzierte LiSa-2 Zellen verwendet. Als nicht Leptin exprimierende Zellen dienten humane Präadipozyten sowie LiSa-2 Zellen.

Zunächst wurde die proximale Region des Leptingenpromoters mit dem CpG-Blott-Programm auf das Vorliegen einer CpG-Insel untersucht. Diese Analysen

ergaben, dass sich in der Region von -211bp bis +3bp eine CpG-Insel erstreckt. In dieser Region war die Häufigkeit von CpG-Dinukleotiden deutlich erhöht. Bezogen auf die Verteilungswahrscheinlichkeit innerhalb von 10 Basen, betrug die beobachtete Häufigkeit von CpG-Dinukleotiden 0,87. Die erwartete Häufigkeit wäre 0,625. Nach Antequera handelt es sich bei einer Ratio $>0,6$ um eine CpG-Insel (4). Etwa 60 % aller menschlichen Promotoren enthalten CpG-Inseln. In der übrigen DNA sind CpG-Dinukleotide stark unterrepräsentiert wegen der spontanen Deaminierung von 5-MeC zu Thymin, was zu einem T:G-Mismatch führt (respektive C:A im komplementären Strang) und bei der nächsten DNA-Replikation fixiert wird, sollte es nicht von Reparaturenzymen erkannt und ausgetauscht werden. Die Deaminierung Cytosins führt jedoch zu Uracil, dessen U:G-Mismatch viel effizienter erkannt und repariert wird (4). Dass methylierte CpG-Dinukleotide nicht völlig aus dem Genom verschwunden sind, liegt an der Entstehung neuer CpG-Dinukleotide durch Punktmutation (4).

Etwa 80% aller CpG-Dinukleotide des menschlichen Genoms sind methyliert, jedoch nicht in CpG-Inseln. CpG-Inseln sind mit der „offenen“ oder aktiven Form des Chromatins assoziiert, mit hyperacetylierten Histonen, Nukleosom-freien Regionen und somit eine direkte Bindung von Transkriptionsfaktoren bzw. Polymerasen an die DNA ermöglicht (4). Alle Promotoren von „house-keeping“ Genen enthalten CpG-Inseln (in nicht methylierter Form) und etwa die Hälfte der gewebespezifischen Gene (4).

Mit methylspezifischen Sequenzierungen konnte gezeigt werden, dass 89% der CpG-Dinukleotide im untersuchten Leptingenpromoter von Präadipozyten methyliert waren. Demgegenüber zeigte sich der untersuchte Promoterabschnitt nach der Differenzierung zu Adipozyten mit nur 8,0% methylierten CpG-Dinukleotiden stark demethyliert.

Ebenso stark demethyliert war der Leptingenpromoter in LiSa-2 Zellen nach Inkubation mit 5-aza-dC und anschliessender hormoneller Stimulation (13,8%). Die Leptinexpression wird sowohl durch physiologischen Differenzierung von Präadipozyten, die allein durch hormonelle Stimulation ausgelöst wird, als auch durch die Inkubation mit 5-aza-dC und zusätzlicher adipogener Differenzierung durch Demethylierung der proximalen Region des Leptingenpromoters induziert.

In LiSa-2 Zellen fand sich eine um die Hälfte verminderte CpG-Methylierung gegenüber Präadipozyten, die aber zu keiner Leptingenaktivierung führte. Dies deutet darauf hin, dass die Methylierung spezieller Sequenzen für die Promoterinaktivierung verantwortlich sein muss.

In den methylspezifischen Sequenzierungen konnte gezeigt werden, dass in Leptin negativen Zellen vor allem die Positionen -33 und -38 (in der Nähe der TATA-Box), -51 (innerhalb der C/EBP- α -Bindungsstelle) sowie eine CpG-reiche Region von -183 bis -204 stark methyliert sind, während andere CpG-Dinukleotide in diesen Sequenzen völlig demethyliert sind (z. B. an Position -170, -146, -127, -85, -74 oder -62).

Ebenso wie in menschlichen Präadipozyten fand Yokomori et al. in 3T3-L1 Maus-Präadipozyten eine vergleichbar hohe Promotermethylierung des Leptingens (103). Die sieben von ihm untersuchten CpG-Dinukleotide im Maus-Leptinpromoter wurden im Verlauf der Differenzierung unterschiedlich stark demethyliert (80-20%), während in dieser Region in humanen Adipozyten nur ca. 8% der CpG-Dinukleotide methyliert sind.

Des weiteren war das CpG-Dinukleotid an Position -54, das sich im Maus Leptinpromoter in der C/EBP- α -Bindungsstelle befindet, bei Yokomori auch nach der Differenzierung methyliert (103). Demgegenüber fanden wir die vergleichbare Position -51 in menschlichen Adipozyten und LiSa-2-AZA häufig demethyliert. Bemerkenswerterweise enthält der untersuchte Abschnitt des Leptingenpromoters der Maus nur acht CpG-Dinukleotide hingegen der entsprechende Abschnitt beim Menschen 14. Dies entspricht der Beobachtung, dass etwa 20% der im menschlichen Genom mit CpG-Inseln assoziierten Promotoren diesen in der Maus entbehren (4).

In den Transfektionsversuchen zeigte sich, dass die Leptinpromoteraktivität durch Methylierung regulierbar ist. Dabei bewirkte sowohl die vollständige Methylierung aller im Promoterbereich vorhandener CpG-Dinukleotide mit der Sssl-Methyltransferase als auch die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide mittels *HhaI*-Methyltransferase die vollständige Inaktivierung. Diese Beobachtung liefert die Erklärung, dass von LiSa-2 Zellen trotz hypomethylierter Promoterregion kein Gentranskript synthetisiert wird. Die Methylierung einzelner, bestimmter CpG-

Dinukleotide führt bereits zur Inaktivierung des Promoters. Die Aktivität eines Promoters ist also nicht proportional zu dessen Methylierungsgrad sondern abhängig von der Position der methylierten CpG-Dinukleotide im Promoter und deren Lage in bzw. in der Nähe von Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren.

Ein möglicher Mechanismus, über den die CpG-Methylierung Einfluss auf die Promoteraktivität haben kann, ist, die Bindung von Transkriptionsfaktoren direkt zu vermindern oder ganz zu verhindern. Jedoch hat nur eine Minderheit der bekannten Transkriptionsfaktoren CpG-Dinukleotide in ihren DNA-Erkennungssequenzen. Die Methylierung der in der Erkennungssequenz vorhandenen CpG-Dinukleotide von AP2 (18), E2F (10) und c-Myc (49, 72) schliesst die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren nahezu aus und inhibiert dadurch direkt die Genexpression. Die Affinität von Sp1 an GC-reiche Abschnitte schien von der CpG-Methylierung unbeeinflusst zu bleiben (40, 44), jedoch wurde im Promoter des T1 α Gens der Einfluss 5-MeC-haltiger CpG-Dinukleotide in der Sp1 Bindungsdomäne auf die T1 α Genexpression gezeigt (12).

Mittels Gelshiftexperimenten wurde hier der Effekt der CpG-Methylierung auf die Bindung von Proteinen am menschlichen Leptinpromoter untersucht. In der C/EBP- α -Bindungsdomäne des menschlichen Leptinpromoter ist an Stelle -51 ein CpG-Dinukleotid enthalten. Der Vergleich der Bindungsaffinitäten der Proteine an methylierten und nicht methylierten Sonden zeigte, dass an der methylierten Sonde die Affinität der Proteine zur Sonde vermindert ist. Entsprechend führte in Transfektionsexperimenten die Methylierung dieser Stelle zu einer Verminderung der Promoteraktivität um 50% verglichen mit dem gleich langen jedoch nicht methylierten Konstrukt.

Durch Demethylierung im Verlauf der Differenzierung wird die Bindung von C/EBP- α an die Promoterregion des Leptingens erst ermöglicht und die Promoteraktivität bis zu 10fach verstärkt. (64, 66)

Die experimentelle Mutation der DNA-Sequenz an Stelle -51 von CG nach AT in der C/Ebp- α -Bindungsdomäne führte nicht nur zur starken Abnahme der

Promoteraktivität sondern auch zur Verhinderung der Bindung von C/EBP- α im Gelshift (64).

Eine andere Möglichkeit der Beeinflussung der Promoteraktivität durch CpG-Methylierung besteht in der zusätzlichen Anlagerung methylspezifischer Proteine, die dann aktivierend oder als Repressoren wirken.

An Position -31 und -33 befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur TATA-Box (50) zwei CpG-Dinukleotide, die ebenfalls in den Sequenzen Leptin exprimierender Zellen nicht methyliert und in Leptin negativen Zellen methyliert vorlagen. In Gelshiftexperimenten mit Sonden dieser Region fanden sich zusätzliche Banden methylspezifischer Protein-DNA-Komplexe.

Auch mit der Sonde MBD-f/rm, die an den Positionen -186, -188, -200, -204 und -206 methylierte CpG-Dinukleotide enthielt, formten sich methylspezifische DNA-Protein-Komplexe.

Da die CpG-Dinukleotide an den oben genannten Stellen in Präadipozyten methyliert und in Adipozyten nicht mehr methyliert waren, deutet dies darauf hin, dass hier die Bindung methylspezifischer Proteine die Aktivität des Promoters und somit die Leptinexpression beeinflussen kann. So sind verschiedene Proteine bekannt, die an der proximalen Promoterregionen an methylierte DNA binden und deren Funktion als Repressoren der Genaktivität angenommen wird. Es wurden bisher zwei chromosomale Proteinkomplexe identifiziert, die eine hohe Affinität gegenüber methylierter DNA aufweisen (55, 65). Methyl-CpG-binding-protein-1 ist ein Proteinkomplex, der sich aus 10 großen Polypeptiden zusammen setzt. Die MBD2 Untereinheit bindet spezifisch an verschiedene DNA Sequenzen, die mindestens zwölf symmetrisch methylierte CpG-Dinukleotide enthalten. Sie unterdrückt die Transkription, in dem es durch Histondeacetylierung zur Nukleosomenremodellierung kommt (29, 106).

Methyl-CpG-binding-protein 2 bindet demgegenüber spezifisch an einzelne CpG-Dinukleotide und ist vor allem am Heterochromatin des Zentromer lokalisiert (31, 67). Dabei bindet die Domäne, die die Transkription unterdrückt, an Komponenten des mSin3A-Histon Deacetylase Komplex und unterdrückt die Transkription über Histon-Deacetylierung und Remodelling der Chromatinstruktur (68).

Ein alternativer Signalweg um die Transkription zu unterdrücken, ohne die Aktivierung der Histon-Deacetylase, ist die Interaktion der Domäne mit TFIIB der

basalen Transkriptionseinheiten, die mit der TATA-Erkennungssequenz interagiert (51). Dies könnte der Mechanismus sein, der, sind die CpG-Dinukleotide proximal der TATA-Box methyliert, zur Unterdrückung der Transkription des Leptingen beiträgt.

Ein weiteres Protein, das an methylierte DNA bindet, ist Kaiso. Dieses benötigt als Erkennungssequenz mindestens zwei symmetrisch methylierte CpG-Dinukleotide (73). Hauptsächlich bindet es an Sequenzen, die drei methylierte CpG-Dinukleotide enthalten, wobei C_mG 2 und C_mG 3 von unterschiedlich vielen Nukleotiden getrennt werden können. So bildet z. B. das methylierte DNA-Motiv - C_mGC_mGGC_mG-, das im Xist-Promoter lokalisiert ist, die Erkennungssequenz eines Proteinkomplexes, in dem Kaiso nachweisbar ist (48). Es wurde auch an einem methylspezifischen DNA-Protein-Komplex, der an der Sequenz C_mGC_mGGGAAAAAC_mG im Promoter des Retinoblastomgen bindet, gezeigt, dass Kaiso enthalten ist (73). Kaiso beinhaltet eine Zinkfinger Domäne, die zur Bindung an DNA nur zwei benachbarte C_mG-Dinukleotide in der DNA-Sequenz benötigt. Da die im Leptingenpromoter von -182bp bis -188bp liegende DNA-Sequenz - CGCGCCG- der Erkennungssequenz von Kaiso im Xist-Promoter ähnelt, könnte auch in den nachgewiesenen methylspezifischen DNA-Protein-Komplexen Kaiso als Komponente enthalten sein. Bei Kaiso handelt es sich um ein ca. 80 kD Protein, das die Transkription *in vivo* methylspezifisch hemmt und mit MeCP1 assoziiert ist. Bemerkenswert ist, dass Kaiso als Bindungspartner von p120 Catenin gefunden wurde (22), welches wiederum mit der cytoplasmatischen Komponente von E-Cadherin assoziiert ist (2). Hier scheint die Signalübertragung zwischen E-Cadherin, p120 Catenin und Kaiso von der Zelloberfläche in den Zellkern möglich (2).

DNA-Methylierung und Karzinogenese

Es wurde bereits dargestellt, dass der Leptinpromoter in LiSa-2 Zellen im Vergleich zu Präadipozyten hypomethyliert ist. Dennoch exprimierten LiSa-2 Zellen keine Leptin mRNA (99). Es handelt sich hierbei jedoch um keine für Liposarkome typischen Phänotyp, da in 5 von 16 Liposarkomen von Oliveira et al in Leptin mRNA nachgewiesen werden konnte (70). Ein Bezug zwischen Differenzierungsgrad und Leptinexpression steht bisher aus. Allerdings konnte am Retinoblastom 1 gezeigt werden, dass fünf von 27 entdifferenzierten Tumorarealen eines gut differenzierten Liposarkoms Mutationen bzw. Promotermethylierung zeigten, wohingegen diese in keiner der gut differenzierten Arealen nachgewiesen werden konnten (92). Durch den Einsatz neuer Microarraytechnik konnte von Shimoji et al. gezeigt werden, dass der unterschiedliche Differenzierungsgrad von Liposarkomen mit einem unterschiedlichem Genexpressionsmuster einhergeht (86). Allerdings gab es vor allem in der gut differenzierten Gruppe Muster, die denen der schlecht differenzierten, also weiter fortgeschrittenen Sarkomen entsprachen (86). Welchem Stellenwert die Methylierung in der Entdifferenzierung von Liposarkomen einnimmt, liegt noch im Dunkeln.

Jedoch rückt die Methylierung immer weiter ins Blickfeld der Karzinogenese. In Tumorzellen kann neben einer in CpG-Inseln lokalisierte Hypermethylierung, die häufig mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgen einhergeht, auch eine generelle Hypomethylierung des Genoms vorliegen (27, 28).

Hyper- und Hypomethylierung koexistieren in Neoplasmen, sind Ausdruck verschiedener Signalkaskaden und geben, durch die prinzipielle Reversibilität dieses epigenetischen Phänomens, die Möglichkeit zu unterschiedlichen therapeutischen Konzepten. Dabei sind je nach Tumorart unterschiedliche Gene betroffen. In Brust- und Darmkrebs oder Leukämien wurde dies in den letzten Jahren besonders gut untersucht (27, 28, 23). Erste klinische Studien über den Einsatz DNA-demethylierender Substanzen wie 5-aza-C bei Leukämien bzw. dem myelodysplastischen Syndrom eröffnen neue Horizonte durch die Möglichkeit der Beeinflussung des genetischen Codes einer Zelle (23).

Schlussfolgerung

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass die Methylierung der in der DNA-Sequenz des proximalen menschlichen Leptinpromoters vorhandenen CpG-Dinukleotide einen Einfluss auf die Promoteraktivität und damit die Leptinexpression hat. Nach dem Prozess der Differenzierung liegt ein demethylierter, aktiver Promoter vor, der in Präadipozyten noch methyliert und inaktiv ist. Ebenso ist die untersuchte Region in der Tumorzelllinie LiSa-2, die nach Inkubation mit 5-Aza-dC Leptin exprimiert, demethyliert, in den nicht Leptin exprimierenden LiSa-2 Zellen jedoch zur Hälfte methyliert. Bemerkenswerterweise reichte in LiSa-2 Zellen nur etwa der halbe Anteil an 5-MeC aus, um die Promoteraktivität zu soweit zu reduzieren, dass kein Leptin exprimiert wird. Hieraus wird deutlich, dass nicht ein bestimmter Grad der Methylierung erreicht sein muss, sondern vielmehr die Position der methylierten CpG-Dinukleotide in bzw. bei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren für die Promoteraktivität von Bedeutung ist.

Mittels Transfektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide im Leptinpromoter bereits ausreicht, um den Promoter abzuschalten. Vor allem die Region um die TATA-Box, die C/EBP- α -Bindungsdomäne und eine weitere CpG-reiche Region bei -200 bis -206 sind für die Aktivität von besonderer Bedeutung.

Mit Gelshift-Experimenten konnte einerseits die Anlagerung methylspezifischer Proteine in der Nähe der TATA-Box und der CpG-reichen Region gezeigt werden, sowie dass die Methylierung an Position -54 innerhalb der C/EBP- α -Bindungsstelle zum Affinitätsverlust des Transkriptionsfaktors an die DNA führte.

Die Demethylierung der Promoterregion in LiSa-2 Zellen entspricht einer häufig gesehenen Hypomethylierung im Verlauf der Karzinogenese. Sowohl Hypo- als auch Hypermethylierung stellen, da es sich im Unterschied zu Mutationen um prinzipiell reversible Prozesse handelt, neue, vielversprechende Angriffspunkte in der Krebsbehandlung dar.

6 Zusammenfassung

Adipositas stellt ein zunehmendes gesundheitliches Problem vor allem der industrialisierten Welt dar. Fettgewebe und damit Leptin als Hauptvertreter der vom Fettgewebe hergestellten Botenstoffe rückt zunehmend ins Interesse der Forschung. In dieser Arbeit habe ich mich mit der Regulation der Leptinexpression auf molekularer Ebene, dem Einfluss der Desoxyribonukleinsäuremethylierung (DNA-Methylierung) auf die Promoteraktivität beschäftigt.

Die humane Liposarkomzelllinie LiSa-2 exprimierte nach Inkubation mit dem Methyltransferaseinhibitor 5-aza-2'-desoxyCytidin und anschließender hormoneller Stimulation Leptin. Die alleinige hormonelle Stimulation führte zwar zur adipogenen Differenzierung, induzierte jedoch keine Leptinexpression, so dass auf eine Methylierung des Leptingenpromoters als Ursache für die Repression der Leptingenaktivität geschlossen werden konnte.

Mittels Bisulfitmodifikation der aus Präadipozyten, Adipozyten und LiSa-2 Zellen extrahierten Desoxyribonukleinsäure (DNA), anschließender methylspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass Zellen, die kein Leptin exprimieren, einen höheren Gehalt an 5-Methylcytosin im untersuchten Bereich des Leptingenpromoters aufwiesen als Leptin exprimierende Zellen. Auch einzelne CpG-Dinukleotide (5'-Cytosin-Guanin-3' Dinukleotide), die sich in der Nähe oder direkt in der Erkennungssequenz von Transfektionsfaktoren befinden, wurden im Verlauf der Differenzierung demethyliert.

In Gelshiftexperimenten wurde die zusätzliche Bindung von Proteinen, die spezifisch an methylierte DNA, an den proximalen Promoter im Bereich der TATA-Box binden gezeigt. Ausserdem verringerte sich die Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors C/EBP- α (CAAT/enhancer binding protein α) an den proximalen Leptinpromoter, wenn das in der Erkennungssequenz vorhandene CpG-Dinukleotid methyliert war.

Im weiter distal gelegenen Promoterbereich konnten sowohl die Anlagerung methylspezifischer wie unspezifischer Proteine nachgewiesen werden.

Der Vergleich mit Transfektionsversuchen bestätigte die Annahme, dass die Methylierung der im Promoter vorhandenen CpG-Dinukleotide zur Abnahme der

Promoteraktivität führt und bereits die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide ausreicht, um die Transkription von Leptin zu inhibieren.

Von methylspezifischen Proteinen wie z. B. Methyl-CpG-binding-Protein 1 (MeCP 1) ist bekannt, dass ihre Anlagerung an die DNA die Histon-Deacetylase aktiviert und die daraus folgenden Remodelierung der Chromatinstruktur die Transkription des Gens unterdrückt.

Unklar bleibt, wodurch die Demethylierung des Promoters im Verlauf der Differenzierung ausgelöst wird, bzw. ob sie nicht auch Folge der Genaktivierung sein kann.

In den DNA-Sequenzen zeigte sich ausserdem, dass der Leptinpromoter nicht Leptin exprimierender LiSa-2 Zellen im Vergleich zu Präadipozyten bereits partiell demethyliert ist. Eine hormonelle Stimulation dieser Zellen reichte nicht aus, um den Promoter weiter zu demethylieren und es fand weiterhin auch keine Leptinexpression statt.

In diesem Fall kann die vorliegende Demethylierung nicht auf eine Promoteraktivierung zurückgeführt werden, sondern sollte als Geschehen im Verlauf der malignen Entartung gewertet werden. Gerade der Bezug zwischen Karzinogenese und DNA-Methylierung ist in den letzten Jahren zunehmend untersucht worden, so dass sich mit dem Einsatz von demethylierenden Substanzen wie 5-Azacytidin bereits neue therapeutische Möglichkeiten ergeben.

7 Literaturverzeichnis

1. **Ailhaud G, Grimaldi P, Négrel R:** Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12:207-233 (1992)
2. **Anastasiadis PZ, Reynolds AB:** The p120 catenin family: Complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* 113:1319-1334 (2000)
3. **Antequera F, Bird A:** DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance. Birkhauser, Basel, S. 169 (1993)
4. **Antequera F:** Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* 60:1647-1658 (2003)
5. **Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J P, Bortoluzzi M N, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin M J:** The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793 (1998)
6. **Bartolomei MS, Tilghman SM:** Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet.* 31:493-525 (1997)
7. **Bird A:** The essentials of DNA Methylation. *Cell* 70:5-8 (1992)
8. **Bird A:** DNA Methylation de Novo. *Science* 286:2287-2288 (1999)
9. **Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I:** Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3419-23 (1996)
10. **Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK:** CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6481-6486 (2000)

11. **Campfield, L A:** Central mechanisms responsible for the actions of OB protein (leptin) on food intake, metabolism and body energy storage. *Front Horm Res* 26:12-20 (2000)
12. **Cao Y X, Jean J C, Williams M C:** Cytosine methylation of an Sp1 site contributes to organ-specific and cell-specific regulation of expression of the lung epithelial gene T1alpha. *Biochem J* 350:883–890 (2000)
13. **Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Cananueva FF:** Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4270-4273 (1997)
14. **Cedar H:** DNA methylation and gene activity. *Cell* 53:3-4 (1988)
15. **Chehab F F:** Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Pharmacol Sci* 21:309-314 (2000)
16. **Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M:** High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acids Res* 22: 2990-2997 (1994)
17. **Cohen P, Miyazaki M, Socci MD, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM:** Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297: 240-243 (2002)
18. **Comb M, Goodman H M:** CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 18: 3975-3982 (1990)
19. **Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro FJ:**

- Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295 (1996)
20. **Cornelius P, MacDougald O A, Lane M D**: Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14:99-129 (1994)
21. **Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr**: Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10:3-10 (1999)
22. **Daniel JM, Reynolds AB**: The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 19: 3614-3623 (1999)
23. **Das P M, Singal R**: DNA Methylation and Cancer. *J Clin Onc* 22:4632-4642 (2004)
24. **De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T**: DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 19: 7327-7335 (1999)
25. **Dignam, J D**: Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods Ezymol* 182:194-203 (1990)
26. **Eden S, Cedar H**: Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 4: 255-259 (1994)
27. **Esteller M, Herman JG**: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196: 1-7 (2000)
28. **Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG**: A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Research* 61:3225-29 (2001)

29. **Feng Q, Zhang Y:** The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15:827-832 (2001)
30. **Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollman B:** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314 (1995)
31. **Free A, Wakefield RID, Smith BO, Dryden DTF, Barlow PN, Bird AP:** DNA recognition by the methyl-CpG binding domain of MeCP2. *J Biol Chem* 276:3353-3360 (2001)
32. **Friedman JM, Halaas JL:** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770 (1998)
33. **Frommer M, McDonald L E, Millar D S, Collis C M, Watt F, Grigg G W, Molloy P L, Paul C:** A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1827-1831 (1992)
34. **Gainsford T, Willson T A, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola A, Alexander W S, Hilton D J:** Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14564-14568 (1996)
35. **Gardiner-Garden M; Frommer M:** CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Bio* 196:261-282 (1987)
36. **Gong D, Bi S, Pratley R E, Weintraub B D:** Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271: 3971-3974 (1996)

37. **Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MK, Skoda RC:** Defective Stat signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci* 93:6231-6235 (1996)
38. **Haaf T:** The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes. *Pharmacol Ther* 65:19-46 (1995)
39. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM:** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546 (1995)
40. **Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M:** Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor SP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2066-2070 (1988)
41. **Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF:** Promoting effect of glucocorticoids on differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84:1663-1670 (1989)
42. **Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI:** Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100:270-278 (1997)
43. **He Y, Chen J, Quon MJ, Reitman M:** The mouse obese gene. *J. Biol. Chem.* 270:28887-28891 (1995)
44. **Holler M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W:** Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 2:1127-1135 (1988)
45. **Hotchkiss R D:** The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175:315-332 (1948)

46. **Huntriss J, Lorenzi R, Purewal A, Monk M:** A methylation-dependent DNA-binding activity recognising the methylated promoter region of the mouse Xist gene. *Biochem Biophys Res Commun* 235:730-738 (1997)
47. **Hwang CS, Mandrup S, MacDougald OA, Geiman DE, Lane MD:** Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:873-877 (1996)
48. **Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD:** Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:231-259 (1997)
49. **Iguchi-Ariga S M, Schaffner W:** CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3:612-619 (1989)
50. **Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Maszusaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nichi S, Hosoda K, Inazawa J, Nakao K:** Structural Organization and chromosomal Assignment of the Human obese Gene. *J Biol Chem* 270:27728-27733 (1995)
51. **Kaludov NK, Wolffe AP:** MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28:1921-1928 (2000)
52. **Kershaw EE, Flier JS:** Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556 (2004)
53. **Laird PW:** The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature reviews cancer* 3:253-266 (2003)

54. **Lane MD, Tang QQ, Jiang MS:** Role of CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 266:677-683 (1999)
55. **Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A:** Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69:905-914(1992)
56. **Lin F, Lane M D:** CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8757-8761 (1994)
57. **Loftus T M, Lane MD:** Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 7:603-608 (1997)
58. **Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI:** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901 (1998)
59. **Lu S, Davies P J A:** Regulation of the expression of the tissue transglutaminase gene by DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4692-4697 (1997)
60. **MacDougald OA, Cornelius P, Liu R, Lane MD:** Insulin regulates transcription of the CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) alpha, beta and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 270:647-654 (1995)
61. **MacDougald O A; Hwang C-S, Fan H, Lane M D:** Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9034-9037 (1995)
62. **Madej T, Boguski MS, Bryant SH:** Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 373:13-18 (1995)

63. **Maffaei MJ, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GM, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S:** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* mRNA in obese and weight-reduces subjects. *Nat Med* 1:1555-1161 (1995)
64. **Mason M M, He Y, Chen H, Quon M J, Reitman M:** Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology* 139:1013-1022 (1998)
65. **Meehan R R, Lewis J D, McKay S, Kleiner E L, Bird A P:** Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58:499-507 (1989)
66. **Miller S G, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, Briggs M R, Auwerx J:** The adipocyte specific transcription factor C/EBP alpha modulates human *ob* gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5507-5511 (1996)
67. **Nan X, Tate P, Li E, Bird A:** DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol* 16:414-421 (1996)
68. **Nan X, Ng H, Johnson C A, Laherty C D, Turner B M, Eisenman R N, Bird A:** Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389 (1998)
69. **Naveh-Many T, Cedar H:** Active gene sequences are undermethylated. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4264-4250 (1981)
70. **Oliveira AM; Nascimento AG, Lloyd RV:** Leptin and leptin receptor mRNA are widely expressed in tumors of adipocytic differentiation. *Mod Pathol* 14:549-55 (2001)

71. **Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva F F, Dieguez C, Gomez-Reinno JJ, Gualillo O:** Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Letters* 579:295-301 (2005)
72. **Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB:** Association of myn, the murine homolog of max, with c-myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 65:395-407 (1991)
73. **Prokhortchouk, A., B. Hendrich, H. Jørgensen, A. Ruzov, M. Wilm, G. Georgiev, A. Bird, and E. Prokhortchouk.** The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15:1613-1618 (2001)
74. **Razin A:** CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three-way connection. *EMBO J* 17: 4905-4908 (2001)
75. **Rice P, Longden I, Bleasby A:** EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16:276-277 (2000)
76. **Riggs AD, Pfeifer GP:**X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 8:169-174 (1992)
77. **Rosen E D, Spiegelman B M:** 2000 Molecular Regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 145-171 (2000)
78. **Rosen ED, Hsu C, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM:** C/EBP alpha induces adipogenesis through PPAR gamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16:22-26 (2002)
79. **Sager R, Kovac P:** Pre-adipocyte determination either by insulin or by 5-azacytidine. *Proc Natl Acad Sci* 79:480-484 (1982)

80. **Saladin R; Devos P, Guerre-Millo M, Leturge A, Girard J, Steals B, Auwerx J:** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-29 (1995)
81. **Sanger F, Nickleln S, Coulson AR:** DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467 (1997)
82. **Schmidt W, Poll-Jordan G, Loffler G:** Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J Biol Chem* 265:15489-15495 (1990)
83. **Scott RE, Hoerl BJ Jr., Wille JJ, Florine DL, Krawisz BR, Yun K:** Coupling of proadipocyte growth arrest and differentiation. II. A cell cycle model for the physiological control of cell proliferation. *J Cell Biol* 94:400-405 (1982)
84. **Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF:** Synthesis of Leptin in human placenta. *Endocrinology* 138:4501-4504 (1997)
85. **Shao D, Lazar M A:** Peroxisome proliferator activated receptor gamma , CCAAT/ enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 272:21473-21478 (1997)
86. **Shimoji T, Kanda H, Kitagawa T, Kadota K, Asai R, Takahashi K, Kawaguchi N, Matsumoto S, Hayashizaki Y, Okazaki Y, Shinomiya K:** Clinico-molecular study of dedifferentiation in well-differentiated liposarcoma. *Biochem Biophys Res Comm* 315:1133-1140 (2004)
87. **Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi B, Cedar H:** DNA methylation represses transcription *in vivo*. *Nat Genet* 22:203-206 (1999)

88. **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb M B, Poverini PJ, Flores-Riveros JR:** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686 (1998)
89. **Singer J, Roberts-Ems J, Riggs A D:** Methylation of mouse liver DNA studied by means of the restriction enzymes msp I and hpa II. *Science* 203:1019-1021 (1979)
90. **Singer-Sam J, Grant M, LeBon JM, Okuyama K, Chapman V, Monk M, Riggs AD:** Use of a HpaII polymerase chain reaction to study DNA methylation in the PgK-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol* 10:4987-4989 (1990)
91. **Speakman J R:** Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr* 134:2090-2105 (2004)
92. **Takahira T, Oda Y, Tamiya S, Yamamoto H, Kobayashi C, Izumi T, Ito K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M:** Alterations of the RB1 gene in dedifferentiated liposarcoma. *Mod Pathol Epub ahead of print* (2005)
93. **Taylor SM, Jones PA:** Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17:771-779 (1979)
94. **Taylor SM, Jones PA:** Cellular differentiation. *Int J Obes* 9:15-21 (1985)
95. **Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM:** Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156 (1994)
96. **Turker MS und Bestor TH:** Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutat Res* 386:119-130 (1997)

97. **Umek RM, Friedman AD, McKnight SL:** CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 51:288-292 (1991)
98. **Wabitsch M, Braun S, Hauner H, Heinze E, Ilondo MM, Shymko R, DeMeeyts P, Teller W M:** Mitogenic and antiadipogenic properties of human growth hormone in human adipocyte precursor cells in primary culture. *Pediatr Res* 40:450-456 (1996)
99. **Wabitsch M, Bruederlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Moeller P:** LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer* 88:889-894 (2000)
100. **Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L:** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393:684-688 (1998)
101. **Xu GL, Bestor TH:** Cytosine methylation targetted to pre-determined sequences. *Nat Genet* 17: 376-378 (1997)
102. **Yokomori N, Tawata M, Onaya T:** DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse GLUT4 gene. *Diabetes* 48:685-690 (1999)
103. **Yokomori N, Tawata M, Onaya T:** DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during the differentiation of 3T3-L1 cells. *Diabetologia* 45: 140-148 (2002)
104. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM:** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432 (1994)
105. **Zhang Y, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM , Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner**

- BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW:** Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387:206-209 (1997)
106. **Zhang Y, Ng H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D:** Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13:1924-1935 (1999)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Möller gilt mein Dank für die interessante Aufgabenstellung.
Herrn Dr. Ingo Melzner für die gute wissenschaftliche Betreuung und praktische Anleitung.

Frau Karola Dorsch für die Mithilfe und das Beibringen zahlreicher molekularbiologischer Techniken.

Herrn Prof. Dr. Wabitsch für die Überlassung von Präadipozyten und Adipozyten aus dem Labor der Kinderklinik.

Besonderen Dank an Frau Sofia Riolini, ohne die diese Arbeit nie fertig geworden wäre.

Danke an meine Mutter, die mir unermüdliche Unterstützung gewährt hat und immer zur Seite gestanden ist.

Veröffentlichungen

Melzner I, **Scott V**, Dorsch K, Fischer P, Wabitsch M, Brüderlein S, Hasel C, Möller P: Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. J Biol Chem 277 (47): 45420-45427 (2002)

Vorträge

“Regulation der Leptingenexpression in humanen Adipozyten” Sommertreffen der Bayerischen Hochschulinstitute für Pathologie, Würzburg 2002

„Leptin Gene Expression in human preadipocytes is regulated by CpG methylation in its proximal promoter” Partnerin-Day, Disorders of Body Weight Regulation, Marburg 2003

Lebenslauf

Geburtsdatum: 30.05.1978
Geburtsort: Neu-Ulm

Schulbildung

09/1984 – 07/1988	Grundschule, Senden
09/1988 – 06/1997	Gymnasium St. Hildegard, Ulm
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/97-5/04	Universität Ulm: Studiengang Medizin
08/00	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/03	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/03-04/04	Praktisches Jahr: Universität Padova (Italien), Kempten
04/04	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: gut)

Beruflicher Werdegang

05/04-09/04	AiP, Chirurgie, Stiftungsklinik Weißenhorn
10/04	Approbation
seit 09/04	Assistenzärztin, Abteilung für Pathologie, Universitätsklinikum Ulm