

# Diät-beeinflusste Regulation der Expression von Genen des oxidativen Stresses beim Schwein

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Bianka Kurts-Ebert, geb. am 19. Februar 1975 in Neindorf  
aus Klingendorf

Rostock, 29. 06. 2007

**Gutachter:**

Prof. Dr. Manfred Schwerin

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN)

Vorstand/Abteilung Funktionale Genomanalyse

Wilhelm-Stahl-Allee 2

18196 Dummerstorf

Prof. Dr. Edda Siegl

Universität Rostock

Fachbereich Biologie

Inst. f. Zellbiologie und Biosystemtechnik Abteilung

Genetik/Immunbiologie

Albert-Einstein-Str. 3

18059 Rostock

Datum der Verteidigung: 14. Januar 2007

## INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abkürzungsverzeichnis</i> . . . . .	7
<i>Abbildungsverzeichnis</i> . . . . .	9
<i>Tabellenverzeichnis</i> . . . . .	12
<i>1. Einleitung</i> . . . . .	15
<i>2. Stand der Forschung</i> . . . . .	17
2.1 Ernährungsbedingte Prägung des Stoffwechsels und der Gesundheit	17
2.1.1 Pränatale metabolische Programmierung . . . . .	17
2.1.2 Frühe postnatale metabolische Programmierung . . . . .	19
2.1.3 Ursachen für persistente physiologische und metabolische Veränderungen . . . . .	19
2.1.4 Vererbbarkeit der metabolischen Programmierung . . . . .	25
2.2 DNA-Methylierung möglicher Mechanismus der metabolischen Programmierung . . . . .	25
2.2.1 DNA-Methylierung . . . . .	26
2.2.2 Funktion der DNA-Methyltransferasen . . . . .	30
2.2.3 Mechanismus der Gen-Inaktivierung durch Chromatin- modellierung . . . . .	33
2.2.4 DNA-Methylierung als möglicher molekularer Mechanis- mus für ernährungsbedingte persistente Stoffwechselef- fekte . . . . .	35
<i>3. Aufgabenstellung</i> . . . . .	39
<i>4. Material und Methoden</i> . . . . .	41
4.1 Experimenteller Ansatz: Diäten und Tiere . . . . .	41
4.2 Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	44
4.2.1 RNA-Isolierung . . . . .	44
4.2.2 Isolierung genomischer DNA . . . . .	44

4.2.3	Isolierung von PAC-DNA . . . . .	45
4.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	45
4.3	Klonierungen . . . . .	45
4.3.1	Klonierung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktions- onsspaltung . . . . .	45
4.3.2	Klonierung von PCR Fragmenten . . . . .	46
4.4	Sequenzierung mit dem LICOR 4000L-System (MWG BIOTECH)	47
4.5	Quantitative Real-Time-PCR mit dem LightCycler® von ROCHE	49
4.6	5'-Prime Race - Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes . .	52
4.7	Single Nucleotide Extension - Untersuchung der methylierungs- dichte genomischer DNA . . . . .	56
4.8	Bestimmung der Methylierungsrate von CpG-Orten in bisulfitmo- difizierter genomischer DNA . . . . .	58
4.8.1	Differentielle Modifizierung mit Bisulfit . . . . .	60
4.8.2	Pyrosequenzierung™-Bestimmung des Anteils methylier- ter und nichtmethylierter CpG-Orte . . . . .	63
4.8.3	Die Methylierungsrate . . . . .	66
4.9	Statistische Analysen . . . . .	66
4.10	Verwendete Primer . . . . .	67
4.10.1	Isolierung der <i>GSTA1</i> -PAC-Klone . . . . .	67
4.10.2	Echtzeit-RT-PCR . . . . .	67
4.10.3	Sequenzierung des 5'-untranslatierten <i>GSTA1</i> -Bereiches .	67
4.10.4	Sequenzierung von bisulfitmodifizierter genomischer DNA für die Untersuchung von Methylierungsstellen . . . . .	68
4.10.5	Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des <i>GSTA1</i> - 5'-untranslatierten Bereiches . . . . .	69
5.	<i>Ergebnisse</i> . . . . .	71
5.1	Körpermasseentwicklung von juvenilen Schweinen in Abhängig- keit von der Proteindiät . . . . .	71
5.2	Hepatische Transkriptionsniveaus von Genen der oxidativen Stres- santwort . . . . .	72
5.3	Korrelation der Körpermasse mit dem Transkriptionsniveau von Genen der oxid. Stressantwort . . . . .	73
5.4	DNA-Methylierung - möglicher Mechanismus der veränderten Genexpression . . . . .	76
5.4.1	Methylierungsgrad der hepatischen genomischen DNA in Abhängigkeit von der Diät . . . . .	76
5.4.2	Die Diät-abhängige Promotormethylierung von <i>GSTA1</i> einem Gen der oxidativen Stressantwort . . . . .	79
5.4.3	Diät-abhängige Transkriptionsraten der DNMT1 . . . . .	94

---

6. Diskussion . . . . .	95
6.1 Diät-assoziierte langanhaltende Veränderungen der oxidativen Stressantwort . . . . .	95
6.2 DNA-Methylierung - Mechanismus persistenter Genexpressions- veränderungen . . . . .	99
7. Zusammenfassung . . . . .	109
8. Summary . . . . .	113
Literaturverzeichnis . . . . .	115
 Anhang . . . . .	 149
A. Bezugsquellen . . . . .	151
A.1 Geräte . . . . .	151
A.2 Biologische Substanzen, Chemikalien, Lösungen und Puffer . . .	152



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AARE	Amino Acid Response Element
AC	Acetylierung
Acc. Nr.	Accession Number
AP1	Activator Protein 1
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
bp	Basenpaare
CAS	Casein
CANX	Calnexin
cDNA	Copy Desoxyribonucleic Acid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
dpm	dots per minute
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanosin, T = Thymidin)
DTT	Dithiothreitol
[3H]dCTP	Deoxycytidine 5'-tri-phosphate tetrasodium salt, [5,5'- <sup>3</sup> H]
EDTA	Ethylendiamin-Tetraazetat

FBN	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
FDR	Fals Discovery Rate
FP	Fütterungsperiode
GSTA1	Glutathion-S-Transferase A1
GR	Glukokortikoidrezeptor
HDAC	Histondeacetylase
HDL	High Density Lipoprotein
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatin-Protein 1
HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1
HSP	Heat Shock Protein
ICF	Immunodeficiency Centromeric Region Instability and Facial Anomalies
IGF	Insulin-like Growth-Faktor
kb	Kilobase(n)
LB	Luria Bertani
LDL	Low Density Lipoprotein
LT	Lebenstage
MBD	Methyl-Bindedomäne
MeCP	Methyl-CpG-Bindeproteine
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Methioninsynthase
MSRA	Methionin-Sulfoxid-Reduktase A
MTF	Methyltransferase
5MTHF	5Methyltetrahydrofolat
Nf $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B



---

OATP2	Organisches Anionentransport-Polypeptid 2
PAC	P1 Artificial Chromosome
PCR	Polymerase Chain Reaction
Repr.	Repressor of CAR1- Faktor
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SAM	S-Adenosylmethionin
SP1	Specificity protein 1
SPI	Sojaproteinisolat
TEMED	N', N', N', N' Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USF	Upstream Response Element
URS	Upstream Repression Sequence
YAC	Yeast Artificial Chromosome



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.1	Einfluss der maternalen Ernährung auf die fötale Entwicklung und Auswirkungen auf Erkrankungen in der postreproduktiven Lebensphase . . . . .	18
2.2	Physiologische Veränderungen, die zur metabolischen Programmierung und Erkrankungen in der postreproduktiven Lebensphase führen . . . . .	21
2.3	Oxidativer Stress - ein potentieller Mechanismus für ernährungsbedingte Langzeitstoffwechselveränderungen . . . . .	24
2.4	Cytosin Methylierung . . . . .	31
2.5	Der DNA-Methylierungsprozess . . . . .	34
2.6	Methylgruppenmetabolismus . . . . .	36
4.1	Aminosäuregehalt der Proteine in den experimentellen CAS- und SPI-Diäten . . . . .	42
4.2	Diäten und Tiere . . . . .	43
4.3	Beispiel für eine zweigipflige Schmelztemperaturkurve . . . . .	50
4.4	Schematische Darstellung der Sequenzierung von bisulfitmodifizierter genomischer DNA . . . . .	58
4.5	Die DNA Stränge sind nach der Bisulfitbehandlung nicht mehr komplementär . . . . .	59
4.6	Chemischer Ablauf der bisulfitinduzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil . . . . .	60
4.7	Das Prinzip der Pyrosequenzierung . . . . .	64
4.8	Pyrogramm™ . . . . .	65
5.1	Durchschnittliches Gewicht (kg) der Tiere der jeweiligen Fütterungsgruppe vor Beginn des Fütterungsversuches und nach den einzelnen Fütterungsperioden . . . . .	72
5.2	Hepatische Transkriptionsniveaus von Genen der oxidativen Stressantwort nach vierwöchiger Fütterung der SPI-Diät mit anschließender Rückumstellung auf die CAS-Diät im Vergleich zur CAS-Kontrollgruppe . . . . .	74

5.3	Verhältnis des Einbaus von 3H-dCTP in genomische DNA der Leber nach Restriktionsspaltung mit <i>HpaII</i> und <i>MspI</i> . . . . .	77
5.4	Einbau von 3H-dCTP in hepatische genomische DNA nach <i>BssHII</i> -Restriktionsspaltung . . . . .	78
5.5	ChemReaktionBis . . . . .	81
5.6	ChemReaktionBis . . . . .	82
5.7	Vergleich der mittleren Methylierungsraten der CpG-Stellen 1-21 des porcinen <i>GSTA1</i> -Gens zwischen der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe . . . . .	84
5.8	Vergleich der prozentualen Standardabweichungen der CpG-Stellen 1-21 des porcinen <i>GSTA1</i> -Gens von den mittleren Methylierungsraten der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe . . . . .	85
5.9	Clusteranalyse der CpG-Stellen hinsichtlich des Methylierungsverhaltens in der CAS-Gruppe (Diät 1.1) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2) . . . . .	87
5.10	CpG-Stellen die mit der <i>GSTA1</i> -Expression korrelieren . . . . .	89
5.11	Prozentuale Abweichungen der mittleren Methylierungsraten der CpG-Stellen 1-21 von ausgewählten Tieren beider Diätgruppen und die jeweiligen hepatischen <i>GSTA1</i> - mRNA-Mengen . . . . .	91
5.12	Modell für die Darstellung des Einflusses der SPI-Diät auf die Methylierung des <i>GSTA1</i> -Promotors in Zusammenhang mit der <i>GSTA1</i> -Expression . . . . .	93
5.13	Messung der porcinen hepatischen Transkriptionsraten der DNMT1 in der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe . . . . .	94
6.1	Molekulare Ursachen für die persistent verminderte Gewichtsentwicklung SPI-gefütterter Schweine . . . . .	97
6.2	DNA-Methylierung - ein potentieller Mechanismus für persistent gesteigerte Transkriptniveaus von Genen der oxidativen Stressantwort . . . . .	102

## TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Auswirkungen einer ontogenetisch frühen Proteinrestriktion . . .	22
2.2	Entwicklungs- und gewebespezifische Veränderungen von Methylierungen und deren Einfluss auf die Expression . . . . .	28
2.3	Syndrome und Krebserkrankungen, die durch Methylierungsdefunktionen im Imprinting-Mechanismus entstehen . . . . .	29
2.4	Beispiele für die Tumorentstehung durch DNA-Hypermethylierungen und die damit in Verbindung stehende Inaktivierung von Tumor-Suppressorgen . . . . .	31
4.1	PCR-Zyklus für die Sequenzierung mit dem <i>LICOR</i> . . . . .	48
4.2	LightCycler® PCR-Zyklus . . . . .	52
4.3	PCR-Zyklus für die Amplifikation des 5'-Race-Produktes . . . . .	55
4.4	PCR-Zyklus für die Amplifikation von bisulfitbehandelter DNA .	63
4.5	Isolierung der <i>GSTA1</i> -PAC-Klone . . . . .	67
4.6	Verwendete Primer für die Messung der Transkriptionsraten . . .	67
4.7	Verwendete Primer für die Sequenzierung des 5'-untranslatierten Bereiches . . . . .	67
4.8	Verwendete Primer für die Amplifizierung der PCR-Produkte . . .	68
4.9	Verwendete Primer für die Sequenzierung der Methylierungsstellen	68
4.10	Verwendete Primer für die Identifizierung des 5'-untranslatierten Bereiches . . . . .	69
5.1	Korrelationskoeffizienten aus dem hepatischen Transkriptionsniveau der untersuchten Gene und der Körpermasse der Schweine .	76



## 1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass Nahrungs- und Stoffwechselfaktoren während früher sensibler Entwicklungszeiträume zu Langzeiteffekten auf spätere physiologische und metabolische Prozesse führen können [1, 2, 3, 4]. Dieses Phänomen wird als *metabolische Programmierung* bezeichnet [5, 6]. Es wird gezeigt, dass vor allem der pränatale Ernährungsstatus in Beziehung zur Gesundheit und dem Krankheitsgeschehen adulter Individuen steht [7, 8, 9]. Verschiedene Untersuchungen an Kindern und wachsenden Tieren zeigen jedoch, dass das juvenile Alter ebenfalls sensitiv für ernährungsbedingte Prägungen des Stoffwechsels ist [10, 11, 12].

Zahlreiche epidemiologische und tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass eine Mangelernährung während der Prägephasen das Risiko für Herzgefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Typ 2-Diabetes und Fettleibigkeit erhöhen, wodurch auch das Risiko für eine frühe Sterblichkeit infolge von Herzinfarkt und Schlaganfall steigt [8, 13, 14, 15, 16, 17]. Ein bedeutender Faktor hierfür ist eine Proteinunterversorgung, hervorgerufen durch Hungerssituationen oder durch unausgewogene Ernährung [18, 19, 20].

Derzeit gibt es Hinweise darauf, dass eine unausgewogene Aminosäureversorgung an einer physiologisch nachteiligen Programmierung des Stoffwechsels beteiligt ist. Es ist bekannt, dass Sojaproteindiäten, die einen unausgewogenen Aminosäureanteil aufweisen, verglichen mit Milchproteindiäten, mit einem ausgewogenen Aminosäureanteil, signifikant das Wachstum, die Körperzusammensetzung und die Gesundheit von Individuen beeinflussen [21, 22, 23, 24]. In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Sojaproteinisolat (SPI)-Diät, die insbesondere durch eine unausgewogene Aminosäurezusammensetzung charakterisiert ist, im Vergleich zu einer Casein (CAS)-Vollwertdiät, unter anderem, zu einer signifikant gesteigerten Transkription von Genen der *oxidativen Stressantwort* in der Leber heranwachsender Schweine führt [25]. In der Literatur wird *oxidativer Stress* auch als Faktor für die Entstehung von physiologischen und metabolischen Langzeitveränderungen diskutiert [26, 27, 28].

Die zellularen und molekularen Mechanismen, die den Zusammenhang zwischen der frühen Entwicklung und den *metabolischen Syndromen* in der adulten Lebensphase erklären, sind noch weitgehend unbekannt, aber Gegenstand intensiver

Untersuchungen [29, 30, 31]. Das Verständnis der Interaktion der Nährstoffe mit der Genexpression könnte die Grundlage für das bessere Verständnis der *metabolischen Programmierung* sein [32].

Eine mögliche molekulare Ursache ist eine langanhaltende veränderte Expression physiologisch relevanter Gene. Ein möglicher Mechanismus langanhaltender Expressionsveränderungen ist die DNA-Methylierung, die bereits als Mechanismus der Genregulation bekannt ist. Die DNA-Methylierung beeinflusst die Chromatindichte und ist umgekehrt proportional mit der Genexpression assoziiert. Potentielle DNA-Methylierungsstellen sind bei Eukaryoten durch die Nukleotidfolge *CpG* gekennzeichnet [33, 34].

In dieser Arbeit soll an heranwachsenden Schweinen untersucht werden, ob eine unausgewogene Aminosäureversorgung, die in Form der SPI-Diät verabreicht wird, zu einer langanhaltenden Veränderung der Expression von Genen der *oxidativen Stressantwort* in der Leber heranwachsender Schweine führt als eine mögliche Ursache von diätischen Langzeitstoffwechseleffekten.

Als molekularen Mechanismus langanhaltender Stoffwechselveränderungen wird die Methylierung der hepatischen genomischen Gesamt-DNA sowie der Promotormethylierung eines ausgewählten Moleküls der *oxidativen Stressantwort* differnt gefütterter Schweine vergleichend untersucht.



## 2. STAND DER FORSCHUNG

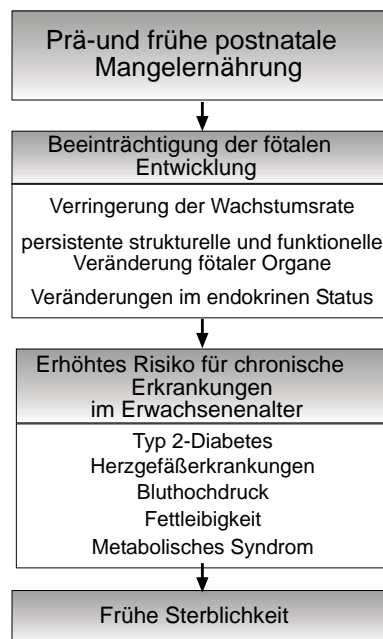
### 2.1 *Ernährungsbedingte Prägung des Stoffwechsels und der Gesundheit*

#### 2.1.1 *Pränatale metabolische Programmierung*

Die intrauterine Entwicklung und das Wachstum des Fötus ist von der maternalen Versorgung mit Nährstoffen über die Plazenta abhängig. Ein gestörter maternaler Metabolismus, eine für die Versorgung des Fötus inadäquate Ernährungsweise der Mutter oder ein beeinträchtigter maternal-fötaler Fluss über die Plazenta führen zu einer nachteiligen Versorgung des Fötus mit Nährstoffen [35]. Ein ungünstiges intrauterines Milieu kann sich auf die frühe postnatale Entwicklung auswirken und zu persistenten metabolischen Veränderungen während des gesamten Lebens führen, wodurch die Gesundheit im Erwachsenenalter beeinflusst wird [2, 3, 36] (siehe Abb. 2.1). Stoffwechselanpassungen des Embryos infolge von Unter- oder Mangelernährung stehen im Zusammenhang mit der Wirkung fötaler und plazentaler Hormone, die die Struktur und Physiologie einer Reihe von Organen und Geweben, einschließlich des endokrinen Pankreas, Leber und Blutgefäßen dauerhaft beeinflussen, wodurch die fötale Entwicklung beeinträchtigt wird [7, 18, 37, 38, 39, 40, 41]. Anhand zahlreicher Studien konnte gezeigt werden, dass infolge einer maternalen diätischen Restriktion während der Gestation, die Entwicklung des Fötus im Uterus gestört wird, was mit einem geringen Geburtsgewicht oder mit veränderten Körperproportionen des Neugeborenen assoziiert ist [4, 7, 14, 15, 17, 42, 43, 44].

Durch eine Verringerung des Wachstums passt sich der Fötus an eine Unterversorgung mit Nährstoffen an. Hierbei kommt es zu metabolischen Veränderungen, einer Umverteilung des Blutflusses und Veränderungen in der Produktion fötaler und plazentaler Hormone, die das Wachstum steuern [45].

Der katabole Stoffwechselmechanismus sorgt bei einer kurzen Phase der Unterernährung unmittelbar für eine kurzfristige Bereitstellung der benötigten Energie [46]. Eine längere Phase der Unterernährung führt zur Verringerung der Wachstumsrate. Dadurch wird der Verbrauch sowie die Umsetzung an Substraten redu-



**Abb. 2.1: Einfluss der maternalen Ernährung auf die fötale Entwicklung und Auswirkungen auf Erkrankungen in der postreproduktiven Lebensphase**  
[8, 14]

ziert, wodurch die Überlebenschance steigt. Dies wirkt sich jedoch nachteilig auf die Entwicklung von Organen aus, deren Funktion ein Leben lang beeinträchtigt sein kann. Hierfür kann eine irreversible reduzierte Zellzahl eine mögliche Ursache sein [47, 48].

Durch eine Umverteilung des Blutflusses zugunsten des Gehirns, wird eine ausreichende Versorgung und damit ein Schutz des lebenswichtigen Organs gewährleistet [49, 50]. Die unbeeinträchtigte Entwicklung des Gehirns geht auf Kosten der Versorgung anderer Organe [17].

Die Beeinträchtigung der fötalen Entwicklung, angezeigt durch ein reduziertes Geburtsgewicht, kann darüber hinaus in Verbindung mit Herzgefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Typ 2-Diabetes und Fettleibigkeit im späteren Leben stehen [51]. Das häufig assoziierte Auftreten von Typ 2-Diabetes (Glukoseintoleranz, Insulinresistenz), abdominaler Adiposität, erhöhtem Blutdruck und niedrigem HDL-Cholesteroll wird als *metabolisches Syndrom* bezeichnet. Das metabolische Syndrom steht ebenfalls in Zusammenhang mit einem verringertem Geburtsgewicht [52]. Individuen mit diesem Syndrom entwickeln ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [53, 54, 55, 56].

### 2.1.2 Frühe postnatale metabolische Programmierung

Im Vergleich zur pränatalen metabolischen Programmierung, gibt es derzeit nur wenige Studien über die „Programmierbarkeit“ des Metabolismus in der neonatalen Entwicklungsphase. Sie zeigen jedoch, dass die Säuglingsphase durchaus sensitiv für persistente metabolische Veränderungen infolge einer inadäquaten Ernährung ist [57].

Maternale Unterernährung während der Laktationsphase führte bei der Ratte zu dauerhaften Effekten auf das Glukose-Homöostase-System der Tiere. Adulte Ratten, deren Mutter in der Laktationsphase einer Proteinrestriktion ausgesetzt waren, sind durch einen verminderten Insulingehalt in isolierten pankreatischen Inselzellen und durch eine geringere Glukose-induzierte Insulinsekretion charakterisiert [58, 59, 60]. Diese irreversiblen Störungen im Glukose-Homöostase-Mechanismus stellen einen potentiellen Faktor für Diabetes im späteren Leben dar.

In einem anderen Versuch führte eine maternale Proteinrestriktion während der Laktation zu permanenten Veränderungen in der Insulin- und Glukokortikoidsekretion bei den Tieren. Die Verringerung an zirkulierendem Insulin und die erhöhte Konzentration an Corticosteron war mit einer späteren beeinträchtigten inflammatorischen Immunantwort assoziiert, was möglicherweise zu einer Prädisposition für chronische Krankheiten im Erwachsenenalter führt [61].

Der Fettstoffwechsel wird ebenfalls permanent durch eine Proteinrestriktion in der frühen postnatalen Phase beeinflusst. Es wurde ein reduzierter Plasma-Cholesterol-, HDL-Cholesterol- und Triacylglycerol-Wert gemessen. Dies stellt eine mögliche Ursache für später auftretende vaskuläre Erkrankungen dar [37].

Am Modell Ratte wurde außerdem gezeigt, dass eine verringerte Aufnahme an Nahrungsfaktoren, durch eine Erhöhung der Wurfgröße, zu einer verzögerten Reifung der Nachkommen führt [62].

Eine Programmierung der neonatalen pankreatischen Inselzellen konnte auch durch Verabreichung einer kohlenhydratangereicherten Milch beobachtet werden. Dies führte zu Hyperinsulinismus in Verbindung mit Fettleibigkeit [63, 64].

### 2.1.3 Ursachen für persistente physiologische und metabolische Veränderungen

#### 2.1.3.1 Hormonelle Einflüsse

Epidemiologische Untersuchungen und experimentelle Studien haben gezeigt, dass einzelne Gewebe und ganze Organsysteme durch die Ernährung „programmiert“ werden können, was zu nachteiligen Konsequenzen bezüglich der Funktion im späteren Leben führt. Bei der intrauterinen Programmierung spielen Hormone

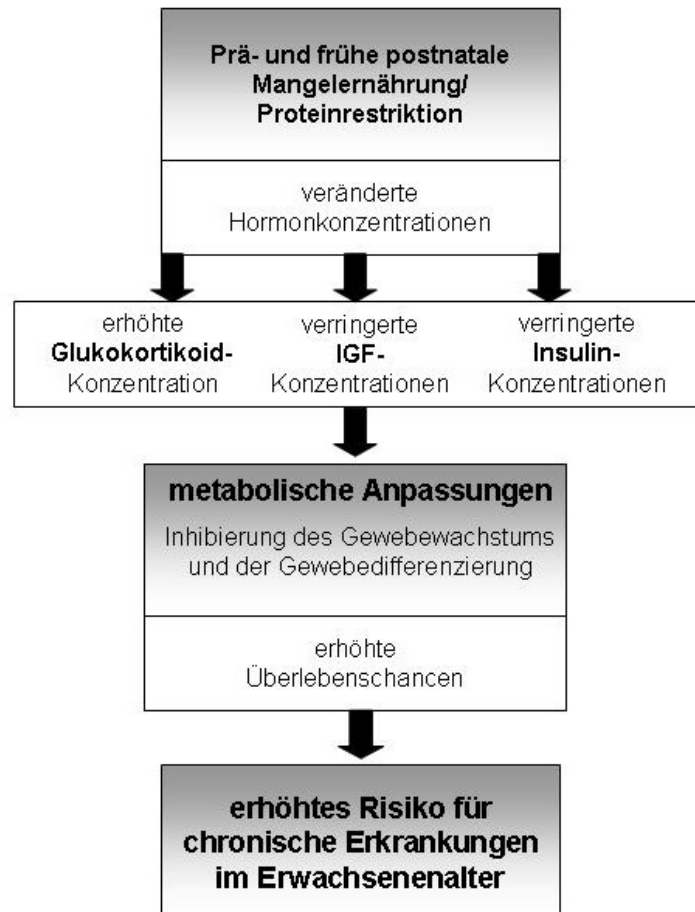
eine Rolle, die das fötale Wachstum und die Entwicklung einzelner fötaler Gewebe regulieren. Hormone wie Glukokortikoide, Insulin und *Insulin-like Growth-Faktor* (IGF) fungieren als Nährstoff- und Reifungssignale und passen die fötale Entwicklung an die vorherrschenden Bedingungen an. Dadurch werden die Chancen auf ein Überleben im Uterus und der Geburt maximiert, verursachen aber vermutlich die metabolische Programmierung und deren Konsequenzen [44] (siehe Abb. 2.2).

In zahlreichen Studien, vor allem am Modell Ratte, wird gezeigt, dass eine Proteinrestriktion, wie sie in Hungersituationen oder bei unausgewogener Ernährung vorkommt, während sensibler Prägezeiträume zu einer nachteiligen Programmierung des Stoffwechsels führt, was mit degenerativen Erkrankungen im Erwachsenenalter assoziiert ist (siehe Tab. 2.1).

Eine Ursache hierfür sind durch Proteinmangel veränderte Hormonexpressionsmuster, die sich nachteilig auf Wachstum und Entwicklung von Geweben auswirken. Die Leber als Zentrum der metabolischen Aktivität zeigt infolge einer pränatalen und frühen postnatalen Proteinrestriktion eine persistent veränderte Struktur und Funktion, was mit einer verringerten Plasma IGF-I Konzentration und einem Anstieg an Glukokortikoiden [76, 90] einhergeht. In Zusammenhang damit steht ein gestörter Lipidstoffwechsel mit erhöhten LDL-Cholesterol- und Fibrinogenwerten, die bedeutende Faktoren bei der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen sind und bei Menschen und Tieren festgestellt wurden, die bei der Geburt einen geringeren abdominalen Umfang aufwiesen, was auf eine gestörte Entwicklung der Leber hindeutet [14, 15]. Es wurden Insulin- sowie Glukagonresistenzen im Lebergewebe festgestellt, die durch eine gestörte Ausbildung der Rezeptoren verursacht wurde. Die Folge ist eine gestörte Glukosehomöostase, Faktor für später auftretenden Typ 2-Diabetes und dem metabolischen Syndrom [91, 92, 93].

J. Nerup 2003 [94] zeigt, dass es bei Rattenföten infolge einer maternalen Proteinmangeldiät von 8 % Proteinanteil, zu einer veränderten Proteinexpression in den Inselzellen des Pankreas kommt. Identifiziert wurden Proteine der Proteinsynthese und des Proteinmetabolismus, Proteinfaltung und Chaperone, RNA- und DNA-Metabolismus, des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung, Signaltransduktion, Signaltranskription, Zellstruktur, Glykolyse und Krebszyklus, der Energietransduktion und des Redoxpotentials. Weiterhin wird die Expression von Zellrezeptoren, Stoffwechselenzymen, Ionenkanälen und Ionentransportern durch Proteinmangel verändert [44].

Die veränderten Proteinsynthesemuster infolge des Proteinmangels sind auf eine veränderte Genexpression zurückzuführen. Ernährungsbedingte persistent veränderte Genexpressionsraten sind damit eine potentielle Ursache für veränderte Stoffwechseleffekte, die sich nachteilig auf die Gesundheit auswirken.



**Abb. 2.2: Physiologische Veränderungen, die zur *metabolischen Programmierung* und Erkrankungen in der postreproduktiven Lebensphase führen können.** Eine prä- und frühe postnatale Mangelernährung kann zu veränderten Hormonkonzentrationen führen, die dauerhafte metabolische Anpassungen zur Folge haben können. Das Phänomen der Diät-assoziierten physiologischen Langzeitwirkungen sichert das Überleben bei ungünstigen Nahrungsbedingungen, obwohl sich die Programmierung nachteilig auf die Gesundheit in der postreproduktiven Lebensphase auswirken kann [9, 44].

Tab. 2.1: Auswirkungen einer ontogenetisch frühen Proteinrestriktion

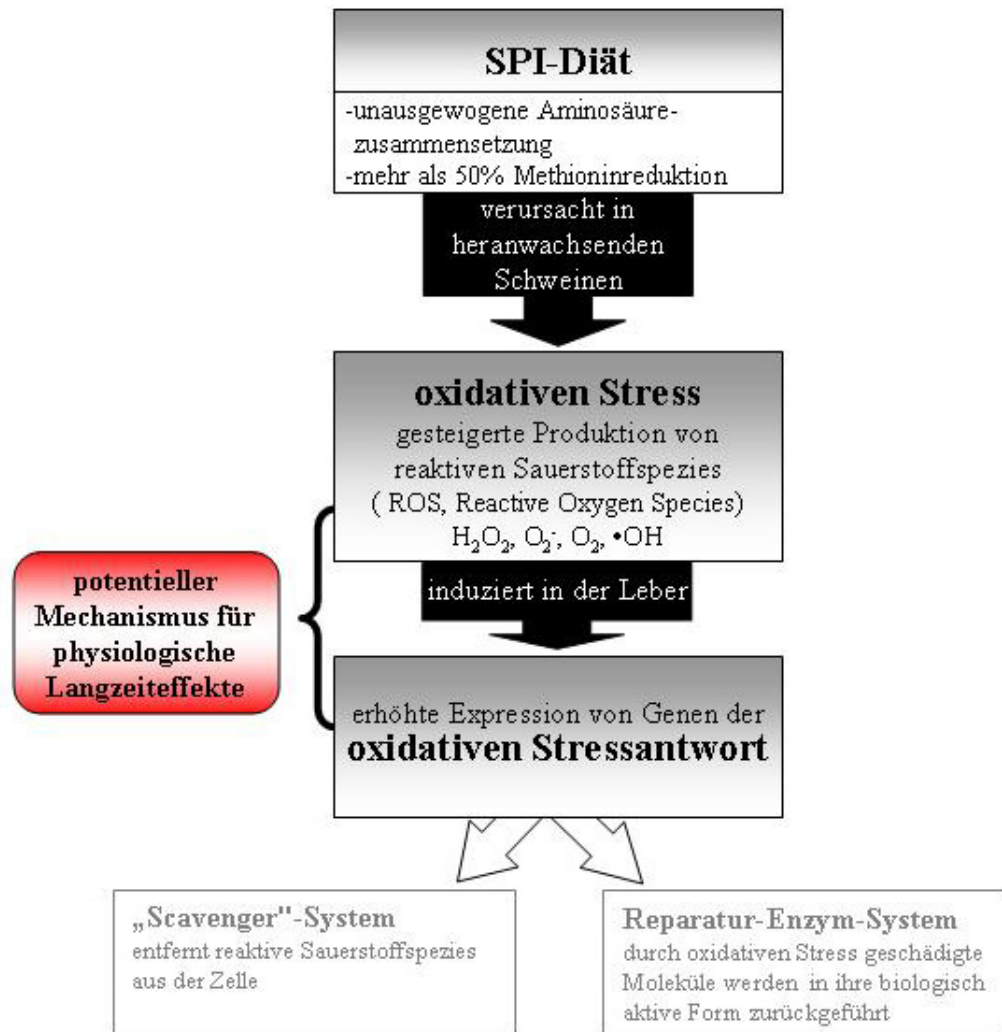
erhöhtes Risiko für	isokalorische Proteinrestriktion	Physiologische Veränderungen (*) vermindertes Geburtsgewicht	Ref.
Typ 2 Diabetes	5-8 %	geringeres Gewicht des Pankreas, Muskel, Leber (*)	[37]
	5-8 %	Verringerung der beta-Zellmasse im Pankreas	[65, 66]
	8 %	beeinträchtigte beta-Zell-Proliferation des Pankreas (*)	[67]
	5-8 %	Verringerung der Glukosetoleranz mit zunehmendem Alter (*)	
		Entwicklung zu Typ 2-Diabetes in adulter Lebensphase	[68]
	8 %	beeinträchtigte Insulinsekretion mit beeinträchtigter Glukosetoleranz	[69]
	5 %	beeinträchtigte beta-Zellfunktion, beeinträchtigte Glukosetoleranz, beeinträchtigte Insulinsekretion der pankreatischen beta-Zellen (*)	[70]
	8 %	Verringerung des Insulingehaltes in pankreatischen beta-Zellen, beeinträchtigte Insulinsekretion nach Glukoseverabreichung	[58]
	8 %	Entwicklung einer Insulinresistenz in alten männlichen Ratten (17 Monate) (*)	[71, 59]
			[72]
	8 %	Insulinresistenz im Skelettmuskel	[73]
	8 %	verminderte Glukoseumsetzung im oxidativen Muskel, moderat beeinträchtigte Insulinsekretion im oxidativen Muskel (*)	[74]
	8 %	Reduzierte Glukosetoleranz, Adipozyten-Insulinresistenz	[43]
	8 %	Veränderungen in der Aktivität Insulin-sensitiver Enzyme (erhöhte Glukokinaseaktivität, verringerte PEPCK-Aktivität)	[75]
	8 %	erhöhte Glukoseproduktion aus Laktat, erheblich reduzierte Glukokinasekonzentration in den distalen perivenösen Zellen der Leber, zweifache Vergrößerung der hepatischen Lobuli	[76]
	8 %	signifikant geringere kardiale Glukoseumsetzung	[77]
Herz-Kreislauf-Erkrankungen	8-9 %	erhöhter Blutdruck (*)	[78]
	8 %	Bluthochdruck; geringere körperliche Größe	[79]
	9 %	Bluthochdruck; reduzierte embryonale Zellzahl, induziert durch verringerte Proliferation	[80]
	9 %	Bluthochdruck; erhöhte Anzahl an Glukokortikoidrezeptoren in den Geweben; reduzierte maternale 11-betaHSD2-Aktivität (11-betaHSD2 ist der Inhibitor des Glukokortikoids)	[81, 82]
	9 %	Bluthochdruck; reduzierte 11-betaHSD2-Aktivität	[83]
	6 %	Bluthochdruck assoziiert mit einer abnormalen intrarenalen Renin-Angiotensin-System- (RAS) Ontogenese, spielt eine Rolle bei einer pathologisch konstitutiv veränderten renalen Hämodynamik oder Natrium Reabsorption	[84]
	9 %	veränderter Prostaglandin E(2)-Stoffwechsel (erhöhte lokale Konzentration assoziiert mit beeinträchtigtem Abbau), potentieller Faktor für renovaskuläre Resistenz und Bluthochdruck lebenslang erhöhter systolischer Blutdruck, assoziiert mit 2-3 -fachem Anstieg an Glukokortikoidrezeptoren; Verringerung der 11-beta-HSD2-Aktivität in der Plazenta	[85]
	9 %	salzsensitiver Bluthochdruck; reduzierte Glomerulizahl in der Niere	[81]
Osteoporose	6 %		[86]
	9 %	Verzögerung einer normalen Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen; möglicherweise Ursache für programmierte Osteoporose	[87]
Obesität		reduzierte Knochenmasse in späterer adulter Phase	[20]
	8 %	viszerale Adiposität in adulter Lebensphase, assoziiert mit einer Aufregulierung von Genen die am Kohlenhydrat- Lipid- und Protein-stoffwechsel beteiligt sind sowie Aufregulierung von Genen die an der Adipozyten Differenzierung, Angiogenese und an der Umgestaltung der extrazellulären Matrix beteiligt sind. (*)	[88]
	10 %	Beeinträchtigung der männlichen geschlechtlichen Reifung und Entwicklung bei der Ratte	[89]

### 2.1.3.2 Oxidativer Stress

Der *oxidative Stress* wird als ein potentieller Mechanismus der metabolischen Programmierung in Zusammenhang mit im Verlauf des Lebens auftretenden Krankheiten diskutiert [51, 95]. Oxidativer Stress ist der Zustand, in dem die zelluläre Redoxhomöostase, d. h. das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien auf Grund einer gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*) und/oder gestörter zellulärer Antioxidations-Mechanismen verändert ist [96]. Die ROS können Schädigungen der DNA verursachen [97], was möglicherweise zu einer permanenten Veränderung der Genexpression führt. Weiterhin kann es zu oxidativen Schädigungen von Membranlipiden [98], Lipidproteinen [99] und Proteinen [100] kommen, was zu Zerstörung und Funktionsverlust dieser Moleküle führen kann. Oxidativer Stress ist an pathophysiologischen Prozessen wie Proliferation, Neurodegeneration und einer veränderten Regulation der Genexpression beteiligt, die im Alter zu Erkrankungen führen können [101]. Insbesondere konnte eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und Herz-Kreislaufkrankungen hergestellt werden [28, 95, 101, 102]. Aber auch Alterserkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung [103, 104, 105], Parkinson [106, 107, 108], Rheumatoide Arthritis [109, 110] und Cataractogenese [111, 112] sind vermutlich mit ontogenetisch „frühem“ oxidativen Stress assoziiert.

Der Produktion von ROS sind Schutzmechanismen entgegengestellt, die der oxidativen Schädigung von Molekülen entgegenwirken. Man spricht hierbei von der *oxidativen Stressantwort*. Zum einen gibt es das *Scavenger*-System, welches reaktive Sauerstoffspezies aus der Zelle entfernt, zum anderen gibt es *Repair*-Moleküle, die durch oxidativen Stress geschädigte Moleküle in ihre biologisch aktive Form zurückführen [96].

In der Arbeit von Schwerin et. al. (2002) [25] wird gezeigt, dass oxidativer Stress ein potentieller Faktor für eine ernährungsbedingte metabolische Programmierung des Stoffwechsels ist (siehe Abb. 2.3). Eine Sojaproteinisolat (SPI)-basierte Diät, die im Vergleich zu einer Vollwert-Caseindiät (CAS) insbesondere durch eine unausgewogene Aminosäurezusammensetzung charakterisiert ist (Aminosäurezusammensetzung beider Diäten siehe Abb. 4.1), führt unter anderem zu einer veränderten Expression hepatisch exprimierter Gene der oxidativen Stressantwort bei heranwachsenden Schweinen. Die vermutlich durch den oxidativen Stress verursachten veränderten Transkriptionsraten könnten die Ursache für die phänotypischen und metabolischen Veränderungen infolge der SPI-Diät sein.



**Abb. 2.3: Oxidativer Stress - ein potentieller Mechanismus für ernährungsbedingte Langzeitstoffwechselveränderungen**

Eine Sojaprotein (SPI)-basierte Diät, die durch einen unausgewogenen Aminosäureanteil charakterisiert ist, verursacht in der Leber heranwachsender Schweine eine verstärkte Expression von Genen der oxidativen Stressantwort, bedingt durch die Induzierung von oxidativem Stress [25, 51, 95].



#### *2.1.4 Vererbbarkeit der metabolischen Programmierung*

Eine bedeutende Konsequenz der metabolischen Programmierung durch Nahrungsfaktoren ist ihre Vererbbarkeit. Dabei kann der veränderte Stoffwechsel nicht nur auf die direkten Nachkommen, sondern auch auf spätere Generationen vererbt werden [113]. Man spricht hierbei von multi- oder intergenerationalen Effekten der Programmierung.

Intergenerationale Studien zeigen, dass reduziertes Geburtsgewicht über mehrere Generationen weitergegeben wird und dies in Zusammenhang mit der Vererbung von Erkrankungen steht, die auf metabolische Programmierung zurückzuführen sind [114]. Mehrere humane epidemiologischen Studien liefern Hinweise für intergenerationale Effekte. Sie zeigen, dass Mütter, die ein geringeres Geburtsgewicht aufweisen, kleinere Nachkommen gebären [115, 116, 117, 118]. Bei Menschen, die von Ländern mit weitverbreiteter Mangelernährung in Länder mit guter Nahrungsversorgung emigrieren, kann es mehr als eine Generation dauern, bis das fötale Wachstum auf das Niveau des Einwanderungslandes steigt. Dies zeigt beispielsweise eine Studie, die das fötale Wachstum von indischen Auswanderern in Europa untersucht [119].

Am Modell Ratte wurde experimentell gezeigt, dass die frühe Ernährung ein Faktor für nachteilige Veränderungen des Stoffwechsels über Generationen ist. Hierbei wurde Ratten über 12 Generationen eine leichte Proteinmangeldiät verabreicht. Trotz einer ausgewogenen Ernährung blieb eine Prädisposition für adulte Krankheiten über drei Generationen erhalten. Erst danach kam es zu einer langsamen Normalisierung des Wachstums und der Entwicklung [120].

Intergenerationale Effekte der metabolischen Programmierung wurden auch bei Ratten der zweiten Generation festgestellt, deren Mutter während der Säuglingsphase eine kohlenhydratangereicherte Milch bekamen. In dieser Generation wurde, wie bei der Mutter, Hyperinsulinismus und Fettleibigkeit festgestellt [121].

## *2.2 DNA-Methylierung als möglicher Mechanismus der metabolischen Programmierung*

Die physiologischen und metabolischen Veränderungen, wie sie bei einer metabolischen Programmierung festgestellt wurden, sind auf veränderte Expressionsmuster von Proteinen (Stoffwechselenzyme, Hormone, Rezeptoren etc.) zurückzuführen, die auch eine Veränderungen von Geweben und Zellen zur Folge haben können. Veränderte Proteinexpressionsmuster unterliegen in den meisten Fällen einer veränderten Expression von Genen, eine mögliche Ursache für persistente Stoffwechseleffekte bei einer metabolischen Programmierung.

Auf Grund der gezielten und in späteren Generationen reversiblen Anpassung an die Umwelt werden epigenetische Mechanismen diskutiert, die nicht zu Veränderungen in der DNA-Sequenz führen. *Epigenetische DNA-Veränderungen* sind mitotisch und/oder meiotisch heritable (vererbare) Veränderungen in der Genfunktion, die nicht durch Veränderungen in der DNA-Nukleotidfolge erklärt werden können [122]. Zu den epigenetischen Veränderungen der DNA gehören die DNA-Methylierung, Histonacetylierung sowie Histonmethylierung.

Die DNA-Methylierung ist bereits als Mechanismus der Genregulation bekannt und steht in Zusammenhang mit veränderten Transkriptionsraten, was die DNA-Methylierung zu einem potentiellen Mechanismus für Langzeitstoffwechselveränderungen macht [123].

### 2.2.1 DNA-Methylierung

Bei den Wirbeltieren ist die DNA-Methylierung einer der Mechanismen, die die Genexpression supprimieren. Potentielle Methylierungsstellen sind durch die Nukleotidfolge *CpG* (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin) in der DNA-Sequenz gekennzeichnet. Das p wird angegeben, um GC von CG (von 5'- in 3'-Richtung) innerhalb des DNA-Stranges zu unterscheiden.

Die DNA-Methylierung ist nicht nur bei den Säugetieren und Wirbeltieren weit verbreitet, sondern kommen auch bei Invertebraten und Pflanzen vor. Im Genom von *Drosophila melanogaster* konnten lange Zeit keine Methylierungen nachgewiesen werden. Auf Grund verbesserter Nachweisverfahren wurden jetzt auch bei *Drosophila melanogaster* Methylierungen der DNA und auch eine Methyltransferase entdeckt. Die Methylierungsstellen beschränken sich hier nicht nur auf die Nukleotidfolge CpG. DNA-Methylierungen wurden hier an Retrotransposons und repetitiven Elementen gefunden [124]. Dies lässt auf eine Transkriptionskontrolle der DNA-Methylierung auf die beweglichen Elemente schließen. Keine detektierbaren Methylierungsstellen oder eine konventionelle Methyltransferase ist derzeit im Nematoden *Caenorhabditis elegans* nachweisbar [125].

Methylierungsstellen sind im gesamten Genom zu finden. ***Die Regulation der Transkription erfolgt hauptsächlich durch die Methylierung von CpG-Bindestellen im Promotor. Methylierungen im Promotorbereich vor Genen inhibieren die Transkription oder bringen sie vollständig zum Stillstand.*** Methylierungen im 3'-Bereich oder innerhalb des Gens, sind jedoch nicht direkt an einer Repression der Transkription beteiligt. DNA-Methylierungen sind stabil und werden bei der Zellteilung über die Mitose sowie auf die Nachkommen über Meiose vererbt [8, 125, 126, 127, 128, 129, 130]. Die Methylierungen sind nicht statisch. Sie unterliegen einer entwicklungs- und zellabhängigen aktiven Methylierung und Demethylierung [127, 131]. Während der Reifung der Keimzellen in Spermien oder

Oozyten kommt es zum Aufbau eines spezifischen DNA-Methylierungsmusters. [132, 133]. Nach der Fertilisation wird das DNA-Methylierungsmuster mitotisch von Zelle zu Zelle mit der Chromosomenduplikation weitergegeben. In den Keimzellen des neuen Organismus hingegen werden die DNA-Methylierungen durch einen unbekannten Mechanismus gelöscht [131, 134, 135] und erst mit der Reifung erneut etabliert [136, 137, 138, 139].

Methylierungen können sich mit der Entwicklung und Alterung verändern [126, 140]. Im erwachsenen Organismus ist die Menge und das Muster der Methylierungen gewebe- und zellspezifisch. Einige Beispiele für entwicklungs- und gewebe-spezifische Veränderungen von Methylierungen sind in der Tabelle 2.2 dargestellt.

**DNA-Methylierung und Imprinting** Die meisten autosomalen Gene werden von maternalen und paternalen Allelen des jeweils zugehörigen Chromosoms exprimiert. Es gibt jedoch eine Anzahl von Genen (mehr als 0,1 % aller Gene), die nur von einem Allel exprimiert werden. Entweder vom maternalen oder vom paternalen Chromosom. Dieses Phänomen wird als *Imprinting* von Genen bezeichnet [149, 150, 151].

Ein Schlüsselmechanismus des *Imprinting* ist die DNA-Methylierung. Die Stilllegung des maternalen oder paternalen Gens erfolgt durch Hypermethylierung von CpG-Bindestellen, wodurch die Expression ausgeschaltet wird [131, 152]. Durch die Methylierung einer Imprinting-Region, erfolgt auch die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei weiblichen Individuen [131, 153, 154]. Defekte im Imprinting-Mechanismus in den Clustern führen zu schwerwiegenden Syndromen [155] und Krebserkrankungen [156] (siehe Tabelle 2.3).

#### 2.2.1.1 CpG-Inseln

Im Genom von Wirbeltieren kommt die Nukleotidfolge CpG nur etwa ein fünftel so häufig vor wie man nach statistischen Abschätzungen auf Grund der Basenzusammensetzung erwarten würde. 5-Methylcytosin ist sehr anfällig für Mutationen. Es unterliegt einer spontanen und häufigen Deaminierung, wodurch das Cytosin zu Thymin umgewandelt wird. Diese Mutationen waren evolutiv zulässig, solange nicht regulierende Bereiche betroffen waren. CpG-Stellen in den Promotoren, die einen Einfluss auf die Regulation der Transkription ausüben, mussten auf Grund ihrer wichtigen Funktion erhalten bleiben [128]. Dabei sind die CpG-Bindestellen nicht gleichmäßig im Genom verteilt. Der Hauptanteil des Genoms besitzt relativ wenige CpG-Nukleotidfolgen [166]. Im 5'-regulatorischen Bereich der Gene findet man jedoch häufig einen CpG-Anteil, der den statistischen Erwartungen entspricht. Auf Grund des erhöhten Vorkommens der CpG-Nukleotidfolge

Tab. 2.2: Entwicklungs- und gewebespezifische Veränderungen von Methylierungen und deren Einfluss auf die Expression

Gen	Spezies	Effekt der gewebespezifischen Methylierung auf die Expression	Ref.
ALF TFII $\alpha/\beta$ - like factor	Mus musculus Homo sapiens	Expression in Testis und Spermien, keine Promotormethylierung, inaktiv in somatischen Geweben durch Methylierung	[141]
mLdhC Laktat Dehydro- genase C	Mus musculus	Expression im germinalen Epithelium der Testis, keine Promotormethylierung, inaktiv in somatischen Geweben durch Methylierung	[142]
OTR Oxytocin Re- zeptor	Homo sapiens	bei Expression im Myometrium hyp- omethyliert, im Vergleich dazu Hyper- methylierung in Leber und mononuklearen Blutzellen	[143]
TAT Tyrosinamino- transferase	Rattus norvegicus	hypermethyliert im Embryonalstadium, keine Expression in der Leber, De- methylierung und Expression während der letzten Tage vor der Geburt, weitere Demethylierung des Promotors beginnt während der Geburt, De- methylierung ist glukokortikoidinduziert	[144]
Leukoisalin (CD43)	Homo sapiens	exprimiert und hypomethyliert in Leukozyten wenn Gewebe leukozyten- reich, hypermethyliert wenn Gewebe leukozytenarm	[145]
IFN $\gamma$	Mus musculus	Promotor hypomethyliert in exprimieren- den Th1-T-Zell Klonen, methyliert in nicht- exprimierenden Th2-Klonen	[146]
Thymidinkinase	Herpes simplex	Gen ist hypomethyliert wenn exprimiert, Expression ist inhibiert durch vorangehen- de Methylierung	[147]
e-globin	Homo sapiens	unmethylierter Promotor exprimiert im Dottersack und fötaler Leber, Methylierung im späteren Stadium der fötalen Leber und in adultem Knochenmark verbunden mit Supp- rimierung	[147]
Vitellogenin	Hahn (Gallus gallus domesticus)	Methylierung des Gens in der Leber,  wird verringert nach Östrogenbehandlung was zur Expression führt	[147]
$\beta$ - und $\gamma$ - Casein	Rattus norvegicus	Gene sind in der Leber methyliert und werden nicht exprimiert, sind hypomethyliert während der Expression in der Milchdrüse	[147]
Östrogen- und Progesteron Rezeptor	Homo sapiens	Methylierung der Promotoren bei Brustkrebs führen zum Expressionsstillstand der Rezeptoren	[148]

Tab. 2.3: Syndrome und Krebserkrankungen, die durch Methylierungsfehlfunktionen im Imprinting-Mechanismus entstehen

Krankheit	Symptom	Ätiologie
Angelman-Syndrom	Intellektuelle Unfähigkeiten, subtile optische Veränderungen	Deletion eines Imprinting-Centers auf dem maternalen Chromosom 15q11-13 [157]
Prader-Willi-Syndrom	intellektuelle Unfähigkeiten, Fettleibigkeit	Deletion eines Imprinting-Centers auf dem paternalen Chromosom 15q11-13 [158]
Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS)	Organ-Überwachstum, Anfälligkeit für Tumore	Deregulation von Imprinted-Genen auf dem Chromosom 11p15-5, biallelische Expression von IGF2 (im Normalfall paternal exprimiert) Imprinting-Verlust von KCNQ10T1 [159]
Wilms-Tumor	Nierentumor, oft assoziiert mit BWS	Imprinting-Verlust von IGF2 auf Chromosom 11p15-5 [160]
Neuroblastom	entartete Zellen des autonomen Nervensystems	Imprinting-Defekt auf 1p36 und paternalem Chromosom 2 [161]
Akute myeloblastische Leukämie	gestörte Hämatopoese	Imprinting-Defekt auf paternalem Chromosom 7, [162] biallelische Expression von IGF2 [163]
Rhabdomyosarkom	Muskulartumor	Imprinting-Defekt auf dem maternalen Chromosom 11p15-5 [164]
sporadisches Osteosarkom	Knochentumor	Imprinting-Defekt auf dem maternalen Chromosom 13 [165]

spricht man hier von *CpG-Inseln* [167, 168]. In 98 % des gesamten Genoms kommen CpGs ungefähr 1 mal pro 80 Basenpaare vor. Im Gegensatz dazu besitzen CpG-Inseln, die 1-2 % des Genoms ausmachen, eine fünf mal höhere Häufigkeit an der Nukleotidfolge CpG [169, 170]. *CpG-Inseln zeichnen sich durch eine Aneinanderreihung der Nukleotidfolge CpG aus.*

Nahezu alle „Haushaltsgene“, aber auch einige gewebespezifisch exprimierte Gene besitzen CpG-Inseln im Promotor. Schätzungsweise die Hälfte der gesamten Gene der Mammalia weisen CpG-Inseln auf [171, 172].

CpG-Inseln im regulatorischen Bereich der Gene sind in normalen Zellen nicht methyliert. Der hypomethylierte Status korreliert mit aktiver Transkription. Methylierungen von CpG-Inseln führen zur Repression der Transkription [170, 173]. Die meisten CpGs außerhalb der Inseln sind zu 70-80 % methyliert [167, 174].

Eine signifikante Anzahl aller CpG-Inseln wird im Verlauf des Lebens methyliert. Dies steht im Zusammenhang mit dem Altern eines Organismus [126, 175] und ist ein potentieller Faktor für die Entstehung von Krebs [176].

Eine *Hypermethylierung* von CpG-Inseln und die dadurch entstehende Repression der Expression, konnte bei einer großen Anzahl von Genen festgestellt werden, die an einer Entstehung von Krebs beteiligt sind [177, 178]. Darunter fallen beispielsweise Gene der Zellregulation, DNA-Reparatur, Medikamentenresistenz, Detoxifikation, Differenzierung, Apoptose und Angiogenese. Eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Krebs spielt die Promotorhypermethylierung von *Tumor-Suppressorgenen* [130]. Beispiele für die Entstehung von Krebs durch die Repression von Tumor-Suppressorgenen infolge der Hypermethylierung von CpG-Inseln, sind in der Tabelle 2.4 dargestellt. Die extensive *Hypomethylierung* von DNA außerhalb von CpG-Inseln, wurde in vielen verschiedenen Tumortypen festgestellt [179, 180, 181, 182]. Die globale Demethylierung führt zu einer Aktivierung von Oncogenen, latenten Retrotransposons und Chromosomeninstabilität, was wesentlich zu einer Entstehung von Tumoren beiträgt [177, 178]. Weiterhin führt eine genomweite Hypomethylierung zu einer Verringerung der Chromosomenstabilität [183, 184].

### 2.2.2 Funktion der DNA-Methyltransferasen

Mit Hilfe einer *DNA-Methyltransferase* wird an die fünfte Position des Cytosins eine Methylgruppe transferiert, es entsteht Deoxymethylcytosin (Abb. 2.4).

Bei den Säugetieren sind derzeit drei DNA-Methyltransferasen (DNMT) identifiziert, die die Methylgruppen an das Cytosin des Dinukleotids CpG transferieren können. Dies sind die Enzyme DNMT1, DNMT3a und DNMT3b [131, 178, 196, 197]. Es gibt von diesen Methyltransferasen Subspezies sowie *Splice*-Varianten

Tab. 2.4: Beispiele für die Tumorentstehung durch DNA-Hypermethylierungen und die damit in Verbindung stehende Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen

<b>Tumor-Suppressor</b>	<b>Tumorart(en)</b>	<b>Ref.</b>
p16	Orales Karzinom	[185]
p57KIP2	Lungen- u.Brustkrebs	[186]
RASSF1A	Glioma Karzinogen, Brustkrebs Nierenzellkarzinom	[187, 188] [189]
p16/RASSF1A/hMHL1 GSTP	intra- und extrahepatisches Cholangiokarzinom	[190]
APC	Brustkrebs	[188]
DAP-Kinase	Brustkrebs	[188]
hDAB2IP	Lungenkrebs	[191]
Runx3	Darmkrebs	[192]
EXT1	Leukämie, Hautkrebs	[193]
PTEN	Brustkrebs	[194]
LOX	Magenkrebs	[195]

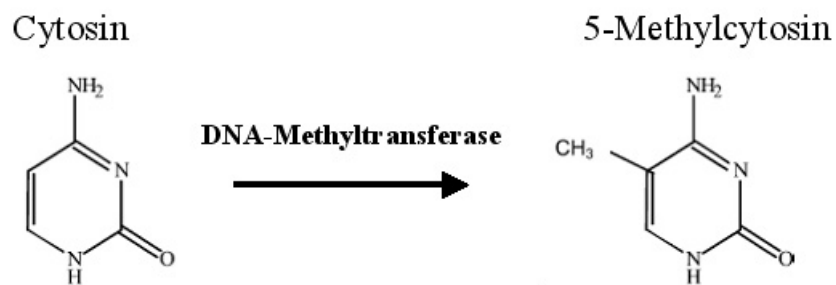


Abb. 2.4: **Cytosin Methylierung**

Die DNA-Methyltransferase katalysiert den Transfer der Methylgruppe an Cytosin. Es entsteht 5-Methylcytosin.

und promotorspezifische Varianten [129]. Die DNMT1, DNMT3a und DNMT3b sind essentiell für die embryonale Entwicklung. Bei der Maus ist die Eliminierung von einem dieser drei Gene aus der Keimzelle letal [198, 199, 200]. Maus-Embryonen, die homozygot für die Deletion von DNMT1 und DNMT3b sind, sterben noch vor der Geburt ab, während die Deletion der DNMT3a erst ungefähr 4 Wochen nach der Geburt zum Tod führt [199, 200]. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Methylierung für eine normale Entwicklung.

Die initiale DNA-Methylierung während der Keimzellentwicklung oder der frühen Embryonalentwicklung erfordert eine *de novo* DNA-Methyltransferaseaktivität [131]. DNMT3a und DNMT3b wurden als *de novo* DNA-Methyltransferasen identifiziert. [201, 202, 203, 204]. Die DNMT1 weist zwar auch eine geringe *de novo*-Aktivität auf, besitzt jedoch eine viel stärkere Präferenz zu hemimethylierter DNA, wie sie bei der mitotischen Zellteilung auftritt [205, 206, 207]. Die DNMT1 methyliert den neu synthetisierten DNA-Strang nach dem Muster des Elternstrangs während der mitotischen Zellteilung und sorgt damit für die Erhaltung der Methylierungsmuster, weshalb sie auch als *Erhaltungsmethylase* bezeichnet wird. DNMT3a und DNMT3b besitzen ebenfalls eine methylierungserhaltende Funktion. Sie erkennen schadhafte unmethylierte CpG-Stellen und methylieren sie *de novo* [202].

Fehlregulationen bei der Expression der DNA-Methyltransferasen führen zu schweren Erkrankungen des Organismus. Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass eine gestörte Regulation der DNA-Methyltransferasen zu einer Hypomethylierung des Genoms in der Zelle sowie zu einer Hypermethylierung von CpG-Stellen im Promotor führt. Dies ist eine molekulare Ursache für die Entstehung von Krebs [208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218].

Mutationen im DNMT3b-Gen verursachen Störungen in der Expression, was z.B. zur Ausbildung des *ICF-Syndroms* (*immunodeficiency centromeric region instability and facial anomalies*-Syndrom) führen kann. Dieses Syndrom ist durch eine ausgeprägte Immunschwäche charakterisiert, assoziiert mit Hypomethylierung und Chromosomeninstabilität [219].

Zu einer veränderten Expression der DNA-Methyltransferasen kommt es auch im Prozess der Alterung. Zum Beispiel ist die Expression von DNMT1 und DNMT3a in alternden humanen Fibroblasten reduziert. Im Gegensatz dazu steht eine erhöhte Expression der DNMT3b [220]. Veränderungen in der transkriptionalen Kontrolle der DNA-Methyltransferasen sind wahrscheinlich eine Ursache für alternierende Methylierungsmuster (Hyper- oder Hypomethylierung) in alternden Zellen und bei Zellen, die den Prozess der Tumorgenese durchlaufen [126].



### 2.2.3 Mechanismus der Gen-Inaktivierung durch Chromatinmodellierung

#### 2.2.3.1 DNA-Methylierung und Chromatinstruktur

Die supprimierende Wirkung der DNA-Methylierung auf die Genexpression ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die CpG-Methylierung die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren direkt verändern kann und somit die Bindung der Transkriptionsfaktoren verhindert [33, 34, 226, 227]. Das Bindungsvermögen einiger Transkriptionsfaktoren ist jedoch nicht methylierungssensitiv oder es befindet sich keine CpG-Bindestelle in der Erkennungssequenz des Transkriptionsfaktors [227].

Ein alternativer transkriptions-supprimierender Mechanismus ist die Bindung von Proteinen an methylierte CpG-Bindestellen über eine Methyl-Bindedomäne (MBD). Zu dieser Gruppe gehören die Methyl-CpG-Bindeproteine (MeCP) [228, 229]. Sie rekrutieren einen Proteinkomplex der zu einer dicht gepackten Chromatinstruktur führt, wodurch die Transkription inhibiert wird (siehe Abb. 2.5). Beispiele für Methyl-CpG-Bindeproteine sind MeCP1 und MeCP2. Das MeCP1 bindet an multiple aufeinanderfolgende CpG-Stellen, den sogenannten CpG-Inseln (siehe Abschnitt 2.2.1.1) [230, 231]. Im Vergleich dazu bindet das MeCP2 mit hoher Affinität an einzelne symmetrisch methylierte CpG-Dinukleotide [232, 233, 234]. Eine Mutation im MeCP2-Gen ist die Ursache für das *Rett-Syndrom*. Patienten mit diesem Syndrom sind intellektuell beeinträchtigt. Bei autistischen Kindern konnte ebenfalls einer Mutation im Gen des MeCP2 festgestellt werden [235, 236].

MeCP1 und MeCP2 bewirken die Bindung von transkriptionalen Repressorkomplexen. Bestandteil dieser Komplexe sind die *Histondeacetylasen* (HDAC) [237, 238, 239].

#### 2.2.3.2 Histonacetylierung

Die Histonacetylierung spielt bei der Chromatinmodellierung eine bedeutende Rolle. Die Acetylierung von Lysinresten im Schwanz der Histone H3 und H4, steht in Zusammenhang mit transkriptional aktivem Chromatin. Der Transfer der Acetylgruppe an das Lysin wird durch eine Acetyltransferase katalysiert. Die Deacetylierung der Histonschwänze ist ein Mechanismus der transkriptionalen Repression [221, 240].

Über die Bindung von MeCP-Proteinen werden Histondeacetylasen rekrutiert, die die Acetylgruppen vom Lysin der Histonschwänze abspalten. Dies führt zu dicht gepacktem, transkriptional inaktiven Chromatin [129, 173, 222, 241, 242].

In mehreren Arbeiten wird gezeigt, dass DNA-Methyltransferasen physisch

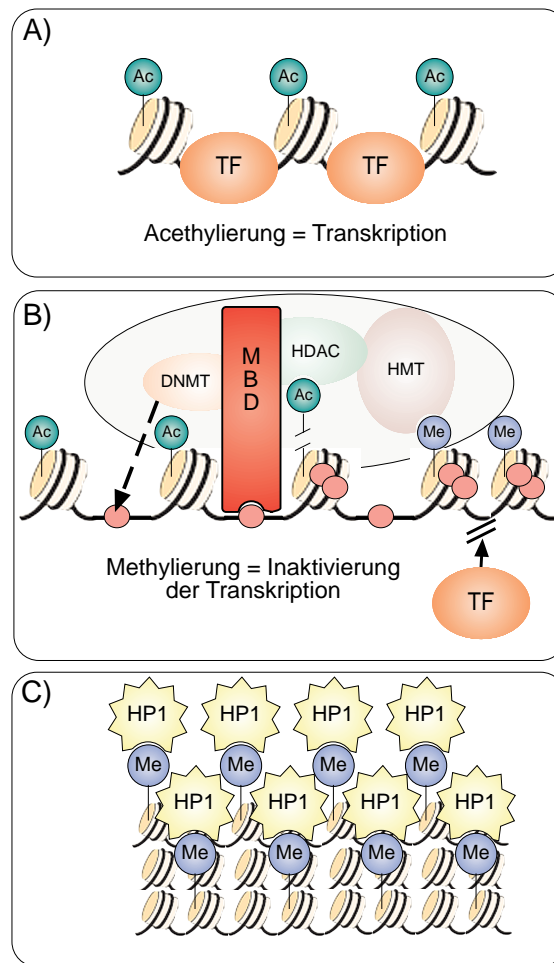


Abb. 2.5: Der DNA-Methylierungsprozess

**A)** Die *Acetylierung* von Lysin im Schwanz des Histon H3 und H4 (Ac) bewirkt eine Auflockerung der Chromatinstruktur. Transkriptionsfaktoren (TF) sowie der Transkriptionskomplex sind in der Lage an die DNA zu binden und die Genexpression einzuleiten bzw. zu verstärken.

**B)** Die *Methylierung* (Me) der DNA durch die DNA-Methyltransferasen (DNMT) führt zu einer Kondensierung der DNA. Durch die dichtgepackte Struktur der DNA ist es den Transkriptionsfaktoren (TF) nicht mehr möglich effizient an die DNA zu binden. Die Genexpression wird eingeschränkt oder stillgelegt. Die Kondensierung der DNA wird durch die Bindung von Proteinen an die Methylgruppen des Cytosins eingeleitet. Diese Proteine besitzen eine methylbindende Domäne (MBD). Die Anlagerung des methylbindenden Proteins führt zur Rekrutierung eines Proteinkomplexes, der die Transkription inhibiert. Bestandteil dieses Komplexes sind unter anderem DNA-Methyltransferasen (DNMT), Histondeacetylasen (HDAC) und Histonmethyltransferasen (HMT). Die HDAC deacetyliert die Lysinreste der Histone, wahrscheinlich als Vorbedingung für die Methylierung. Die Methylierung des Histon H3 durch die HMT führt dann zu einer verdichteten DNA-Struktur.

**C)** Die Methylierung der Histone bewirkt die Bindung eines Chromatin-Silencers, dem Protein **HP1** (Heterochromatin-Protein 1). An das gebundene HP1 bindet die HMT, wodurch die Histonmethylierung der DNA verstärkt wird. Dies führt zu einer supranukleosomalen Chromatinstruktur, die für die Stilllegung der Transkription verantwortlich ist.

**Abbildung und Text nach** [126, 131, 177, 221, 222, 223, 224, 225]

mit den Histondeacetylasen und dem Repressorkomplex in Verbindung stehen [241, 243, 244, 245, 246, 247, 248]. Dies weist auf eine Beteiligung der DNA-Methyltransferasen am transkriptionalen Repressorkomplex hin.

#### *2.2.3.3 Histonmethylierung*

Neueste Untersuchungen zeigen, dass der transkriptional inaktive Status des Chromatins mit einer Methylierung des Lysin 9 im Histonschwanz des Histons H3 assoziiert ist [249]. Es wird gezeigt, dass die Bindung von methylbindenden Proteinen an die methylierte DNA zu einer Methylierung des Histons H3 führt. Die Bindung der Methylgruppe erfolgt durch das Enzym Histonmethyltransferase (HMT) [250, 251].

Anhand der Untersuchungen wird deutlich, dass die Steuerung der Transkriptionsintensität durch die DNA-Methylierung selbst nur in einigen Fällen verursacht wird. Vielmehr ist die DNA-Methylierung Voraussetzung für das Ablaufen einer Reaktionskaskade, welche die Chromatinstruktur so verändert, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die kondensierte DNA nicht mehr möglich ist (siehe Abb. 2.5).

#### *2.2.4 DNA-Methylierung als möglicher molekularer Mechanismus für ernährungsbedingte persistente Stoffwechseleffekte*

Die DNA-Methylierung wird als molekularer Mechanismus für ernährungsbedingte persistente Stoffwechseleffekte diskutiert und ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen [252, 253, 254]. Die für die DNA-Methylierung benötigten Methylgruppen werden über eine Reaktionskaskade zur Verfügung gestellt, die stark ernährungsabhängig ist. Dieser Reaktionsweg wird als Methylgruppenmetabolismus bezeichnet [123, 252] (siehe Abb. 2.6). Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass die DNA-Methylierung von Methylendonatoren und Cofaktoren abhängt, die über die Nahrung aufgenommen werden müssen. Ein Mangel an Methylendonatoren und Cofaktoren, hervorgerufen durch Nahrungsmangel oder unausgewogener Ernährung, kann zu Methylierungsstörungen führen.

Die essentielle Aminosäure Methionin spielt als Vorläufer des wichtigsten Methyldonators, dem S-Adenosylmethionin (SAM), in der Methylierungsreaktion eine zentrale Rolle. Bis zu 60 % des hierfür benötigten Methionins wird über die Nahrung bereitgestellt. Das mit der Nahrung zugeführte Methionin wird direkt zu SAM umgewandelt. Über eine Methyltransferase (MTF) wird die Methylgruppe von SAM an das zu methylierende Produkt wie DNA, RNA oder Histone transferiert.

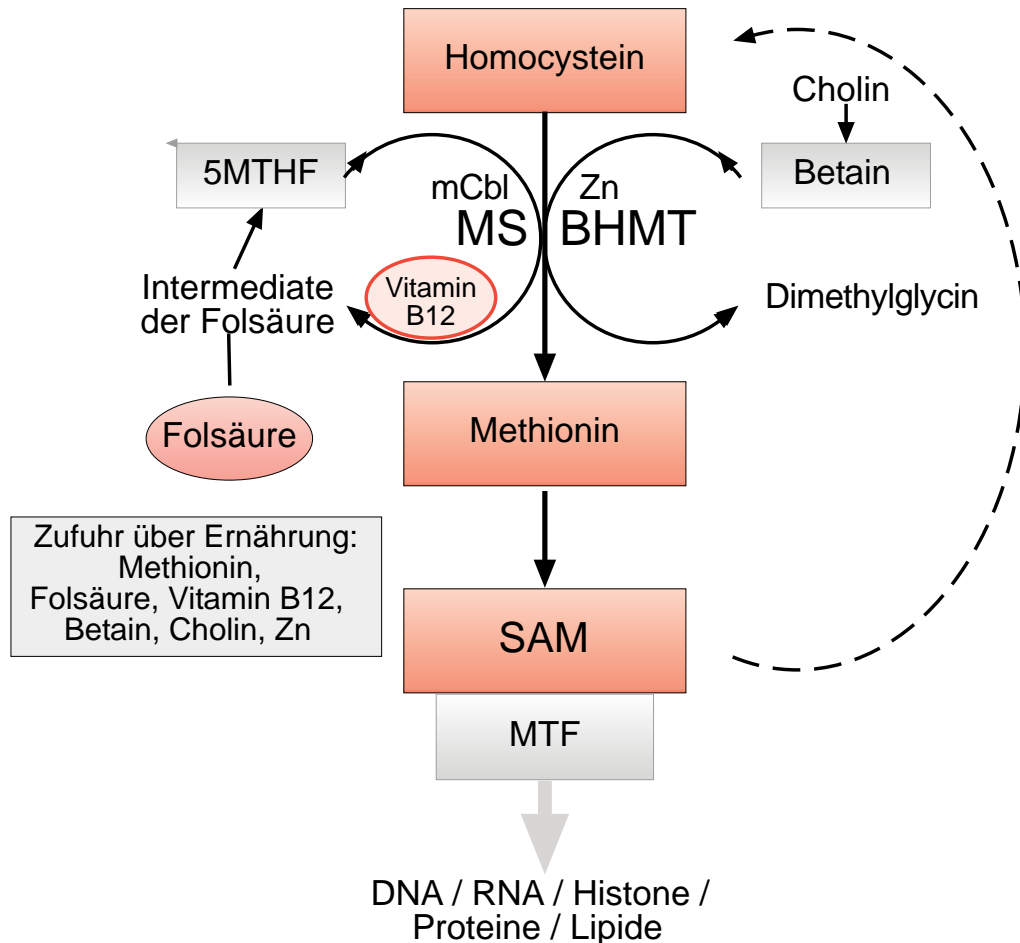


Abb. 2.6: **Methylgruppenmetabolismus**

Homocystein wird zu Methionin über zwei Wege umgewandelt, zum einen über die Methioninsynthase (MS), welche Methylcobalamin (mCbl) als Cofaktor benötigt. Dabei wird die Methylgruppe aus 5-Methyltetrahydrofolat (5MTHF) auf das Cystein übertragen. Das 5MTHF entsteht aus Folsäure über eine Kette von Intermediärprodukten [123]. Mit Hilfe von Vitamin B 12 entsteht aus dem 5MTHF nach der Methylabgabe ein Intermediärprodukt der Folsäure, welches wieder in den Zyklus eingeschleust und für die Synthese von 5MTHF wiederverwendet wird. Beim zweiten Weg wird mit Hilfe der Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT), welche Zink als Cofaktor benötigt, die Methylgruppe vom Betain auf das Cystein übertragen. Aus Betain entsteht dabei Dimethylglycine.

Das aus Homocystein entstandene oder mit der Nahrung aufgenommene Methionin wird zu S-Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt. SAM ist der Methylondonator, der mit Hilfe einer Methyltransferase (MTF) Methylgruppen an die DNA, RNA Histone oder auch Proteine und Lipide abgibt. SAM kann nach der Methylabgabe über einen Regenerierungsprozess zu Homocystein umgewandelt werden.

Abbildung und Text nach [123, 252]

Für die Methylierungsreaktion wird Methionin auch zu einem bedeutenden Anteil aus Homocystein synthetisiert. Dafür sind eine Reihe von Cofaktoren, die ebenfalls über die Nahrung aufgenommen werden müssen, von essentieller Bedeutung. Bei einem Mangel an Folsäure und deren Derivate, Betain und Cholin, Vitamin B12 aber auch Zink oder Methylcobalamin, kann die Methioninsynthese gestört sein. Dies wiederum beschränkt die Bildung von SAM, wodurch die Versorgung mit Methylgruppen eingeschränkt sein kann. Der Einfluss der Ernährung auf die DNA-Methylierung wurde bereits in einigen Tierversuchen untersucht, von denen im Folgenden einige Beispiele genannt werden.

Eine Methyl-donator-Mangeldiät führte bei Ratten zu einer Überexprimierung von Oncogenen wie *CMYK*, *CFOS*, und *HRAS*. Dies korreliert mit einer Hypomethylierung der DNA [255, 256, 257], was bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle spielen kann (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Bei einer Wiederaufnahme von Methyl-donatoren wird z.T. eine Normalisierung der DNA-Methylierung festgestellt, jedoch nicht für alle untersuchten CpG-Methylierungsstellen. Dies lässt vermuten, dass DNA-Methylierungsdefekte nach einem längeren Methyl-donator-Mangel irreversibel sein können [255]. Eine große Studie am Menschen zeigt, dass Methyl-donator-Mangel mit einem erhöhten Risiko für Leber- und Darmkrebs korreliert [258, 259]. Gleiche Effekte wurden bei einem Mangel an Folsäure beobachtet [260, 261]. Einige Arbeiten zeigen, dass bei der Maus, in einer frühen embryonalen Entwicklungsphase, ein Defizit an Faktoren, die für den Methylierungsprozess essentiell sind, zu veränderten Imprinting-Methylierungen führen. Dadurch kann eine veränderte Expression von Imprinted-Genen verursacht werden. Diese veränderte Expression von Imprinted-Genen wirkt sich letal auf den Embryo aus oder führt zu ernsthaften Erkrankungen (siehe auch Tabelle 2.3). In diesem Zusammenhang wurde auch ein geringeres Geburtsgewicht festgestellt [262, 263]. Das Genom des Embryos unterliegt in der Phase der Präimplantation einer extensiven Demethylierung. Nach der Implantation des Embryos werden die Methylierungen neu errichtet [131]. Diese DNA-Methylierungsmuster müssen über viele Zyklen bei einer rapiden zellularen Proliferation während der fötalen und frühen postnatalen Entwicklung stabil gehalten werden. Die Verfügbarkeit von diätischen Methyl-donatoren und Cofaktoren während dieser ontogenetischen Perioden ist daher für eine korrekt ablaufende Methylierung von großer Bedeutung [8, 29].

Ratten, die während der Säuglingsphase einem Nahrungsmangel ausgesetzt waren, zeigten eine beeinträchtigte Glukose-stimulierte Insulinsekretion, was bei diesem Versuch auf eine veränderte Expression von Imprinted-Genen in den Inselzellen des Pankreas hindeutet [264]. Eine weitere Studie bei Mäusen zeigt, dass die Periode nach dem Säugen ebenfalls sensitiv für eine veränderte allelische Expression von Imprinted-Genen ist, verursacht durch einen Mangel an den Methylierungsfaktoren Methionin, Cholin, Vitamin B12 und Folsäure [265].

Ein Modell für die Untersuchung von Methylierungsfunktionen wurde mit der

*Agouti viable (Avy/a)* mutanten Mauslinie geschaffen [266]. Ist der Promotor des *Agouti*-Gens methyliert, wird die Expression supprimiert und verursacht eine gelbe Färbung der Maus. Ist der Promotor nicht methyliert, wird das Gen exprimiert, die Fellfarbe der Maus ist bräunlich. Mit Fütterungsversuchen an trächtigen Mäusen mit einer Kontrolldiät und einer Diät die mit Folsäure, Betain, Cholin, Methionin, Zink und Vitamin B12 angereichert ist, konnte die Methylierung und Expression des *Agouti*-Gens und damit die Farbe der Nachkommen variiert werden [267]. Weiterhin konnte hierbei eine epigenetische Vererbbarkeit beobachtet werden [267, 268], was mit der Vererbbarkeit der phänotypischen Veränderungen, wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, korreliert. Dieses Experiment demonstriert, dass die Genexpression der Nachkommen durch die maternale Diät verändert werden kann.

Der Einfluss der Ernährung auf die DNA-Methylierung, die hier als Mechanismus der Genregulation identifiziert und charakterisiert wurde, macht die DNA-Methylierung zu einem potentiellen Mechanismus für die metabolische Programmierung. Eine nichtausreichende Versorgung mit Methionin, durch eine prä- oder frühe postnatale diätische Proteinrestriktion, kann die Ursache für veränderte Methylierungsmuster sein. Dies wiederum kann zu einer persistent veränderten Expression von Genen führen, die am Stoffwechsel beteiligt sind und veränderte Stoffwechseleffekte verursachen (siehe Abschnitt 2.1.3). Aber auch eine subtile Nährstoffmangelsituation, wie sie z.B. bei einseitiger vitaminarmer Ernährung auftritt, ist ein potentieller Faktor für Störungen im Methylierungsmechanismus. Das hierdurch auftretende Defizit an wichtigen Vitaminen und Cofaktoren, die für den Methylierungsmetabolismus essentiell sind, kann ebenso Störungen im Methylierungsmechanismus auslösen [123].

### 3. AUFGABENSTELLUNG

Es ist bekannt, dass Sojaproteindiäten, verglichen mit Milchproteindiäten, signifikant das Wachstum, die Körperzusammensetzung und die Gesundheit von Individuen nachteilig beeinflussen [21, 22, 23, 24, 269]. In der Arbeit von Schwerin et. al. [25] wurde gezeigt, dass eine Sojaproteinisolat (SPI)-basierte Diät, die durch eine unausgewogene Aminosäurezusammensetzung charakterisiert ist (siehe Abb. 4.1), im Vergleich zu einer Vollwert-Caseindiät (CAS), zu einer verstärkten Expression hepatisch exprimierter Gene der oxidativen Stressantwort bei heranwachsenden Schweinen führt (Zusammensetzung und Verabreichung der Diät siehe Abschnitt 4.1). Oxidativer Stress wird als ein potentieller Mechanismus für eine nachteilige Prägung des Stoffwechsels (metabolische Programmierung) diskutiert (siehe Abschnitt 2.1.3.2), was zu Entwicklungsstörungen und Auftreten von Krankheiten im Erwachsenenstadium führen kann (siehe Abschnitt 2.1).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine SPI-induzierte andauernde oxidative Stressreaktion Ursache für Wachstumsveränderungen bei heranwachsenden Schweinen ist. Dafür wird die Langzeitauswirkung der SPI-Diät auf die Gewichtsentwicklung sowie auf die hepatische Expression von fünf Genen der oxidativen Stressantwort bei juvenilen Schweinen untersucht. Eine Gruppe von Tieren wird hierfür vier Wochen mit der SPI-Diät gefüttert und anschließend für vier Wochen auf CAS rückumgestellt, danach erfolgt die Schlachtung der Tiere mit Probenahme. Die Kontrollgruppe bekommt ausschließlich die CAS-Vollwertdiät (siehe Abb. 4.2, Diät 2). Die Messung der Gewichtsentwicklung der SPI-Tiere im Vergleich zu den CAS-gefütterten Tieren erfolgt vor und nach den einzelnen Fütterungsperioden.

Die Transkriptionsraten der Gene der oxidativen Stressantwort beider Fütterungsgruppen werden über Echtzeit RT-PCR mit dem Roche-*LightCycler*® -System (siehe Abschnitt 4.5) ermittelt.

Als möglicher molekularer Mechanismus langanhaltender Veränderungen der Genexpression soll die DNA-Methylierung untersucht werden. Die Untersuchung erfolgt an Leberproben von Schweinen die vier Wochen mit der SPI-Diät gefüttert und im Anschluss daran geschlachtet wurden. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich die CAS-Diät (siehe Abb. 4.2, Diät 1).

Die Wirkung der SPI-Diät auf die Methylierungsdichte der hepatischen Gesamt-DNA sowie aller hepatischer CpG-Inseln, die regulatorisch auf die Genexpression wirken können, wird mit der *Single Nucleotide Extension*-Methode (siehe Abschnitt 4.7) über die Messung des Einbaus an [3H]dCTP in die DNA-Schnittstellen methylierungsabhängiger Restriktionsenzyme festgestellt.

Am Beispiel des hepatischen porcinen Glutathion-S-Transferase-Gens (GSTA1), eines Expressionsmarkers der oxidativen Stressantwort, soll der Promotor-Methylierungsstatus in Abhängigkeit von der Diät untersucht werden. Dies erfolgt durch die Untersuchung des Anteils methylierter Cytosinreste in allen CpG-Motiven im 5'-GSTA1-Promotorbereich nach Bisulfitbehandlung der DNA. Über eine sequenzspezifische Aufamplifizierung des jeweiligen CpG-Ortes mittels PCR und anschließender Messung des Anteils von zu Thymin konvertierten nicht-methylierten Cytosinresten mit der *Pyrosequenzierungs*<sup>TM</sup>-Methode (BIOTAGE), wird der Methylierungsstatus der CpG-Stelle festgestellt (siehe Abschnitt 4.8).

Der Einfluss der SPI-Diät im Vergleich zur Kontrolldiät auf die Transkriptmenge der DNMT1, die für die Aufrechterhaltung der Methylierungen verantwortlich ist, wird mittels Echtzeit RT-PCR mit dem Roche-*LightCycler*<sup>®</sup>-System untersucht.



## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Experimenteller Ansatz: Diäten und Tiere

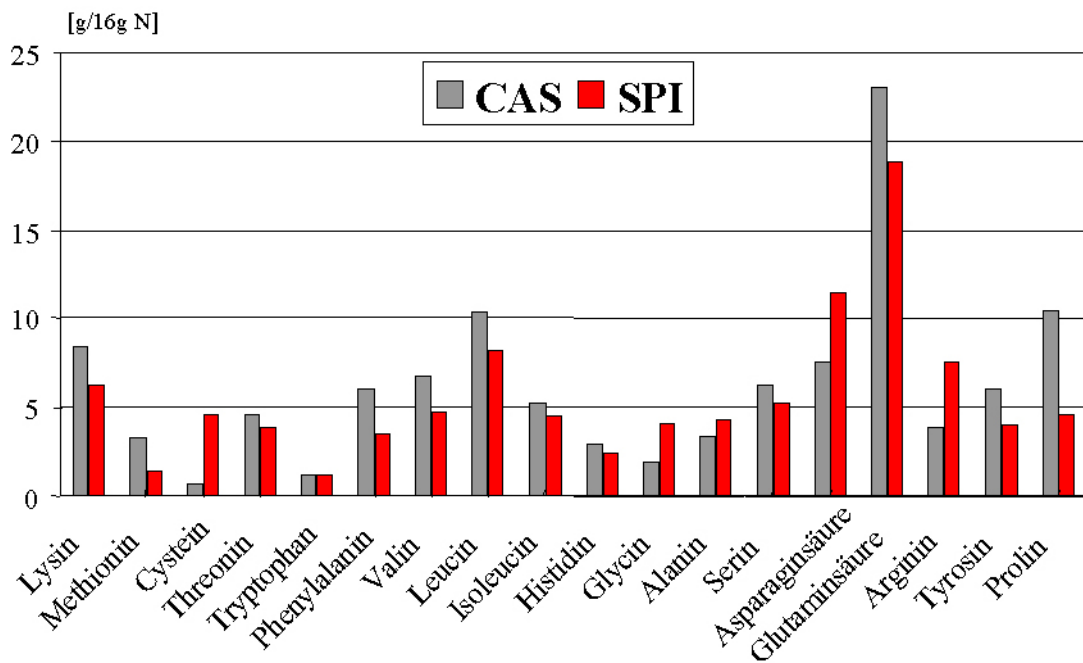
**Diäten** Das für die Fütterung verwendete Sojaproteinisolat (SPI) besitzt im Vergleich zur Caseindiät (CAS) ein unausgewogenes Aminosäuremuster. Besonders ausgeprägt ist der Methioninmangel in der SPI-Diät. Die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung zwischen den beiden Proteindiäten sind in der Abbildung 4.1 dargestellt.

Das CAS (Deutsches Milchkontor GmbH, Hamburg) und das hochaufgereinigtes SPI (SUPRO 1610, Interfood, Bad Homburg) waren die einzigen Proteinquellen in der experimentellen Fütterung. Im SPI wurden biologisch aktive Sojabestandteile wie Trypsin-Inhibitoren und Lektine durch Hitzebehandlung und einer Behandlung unter milden alkalischen Bedingungen minimiert. Die Konzentration an Isoflavonen und Trypsin-Inhibitoren lag bei 1-3 mg/g und weniger als 5,2 mg/g und war damit niedriger als bei anderen bereits eingesetzten SPI-Diäten [270].

Beide Diäten entsprechen einer Proteingabe von 50 % des erforderlichen Bedarfs, sind isoenergetisch und isonitrogen und stellen das 2,5-fache an der erforderlichen metabolisierbaren Energie bereit [ $3 \times 650 \text{ kJ ME}/(\text{kg Körpergewicht}^{0,62} \times \text{Tag})$ ] [25]. Die Vitamin- und Mineralstoffzusammensetzung ist bedarfsgerecht [271].

**Tiere** Die Untersuchung wurde an kastrierten männlichen Schweinen der *Deutschen Landrasse* durchgeführt. Nach der Entwöhnung bekamen sie für eine Woche eine für Ferkel übliche Starterdiät [25]. Für den Fütterungsversuch wurden Tiere mit einem Gewicht von ca. 2 kg ausgewählt. Während der experimentellen Fütterung wurden die Schweine in Stoffwechselkammern gehalten. Die Fütterung erfolgte einmal am Tag (um 8.00 Uhr). Der freie Zugang zu Futter und Wasser wurde von 8-14 Uhr ermöglicht.

**Untersuchung direkter diätischer Sojaproteinisolat (SPI)-Effekte** Für die Untersuchung direkter SPI-Effekte, im Vergleich zur CAS-Diät, wurden Proben



**Abb. 4.1: Aminosäuregehalt der Proteine in den experimentellen CAS- und SPI-Diäten**

Bei den meisten Aminosäuren zeigt die SPI-Diät gegenüber der CAS-Diät einen deutlichen Mangel. Die Ausnahme bilden Cystein, Glycin, Alanin, Arginin und Asparaginsäure, die in der SPI-Diät, im Vergleich zur CAS-Diät, in größeren Mengen vorkommen. Besonders ausgeprägt ist der Methioninmangel in der SPI-Diät.

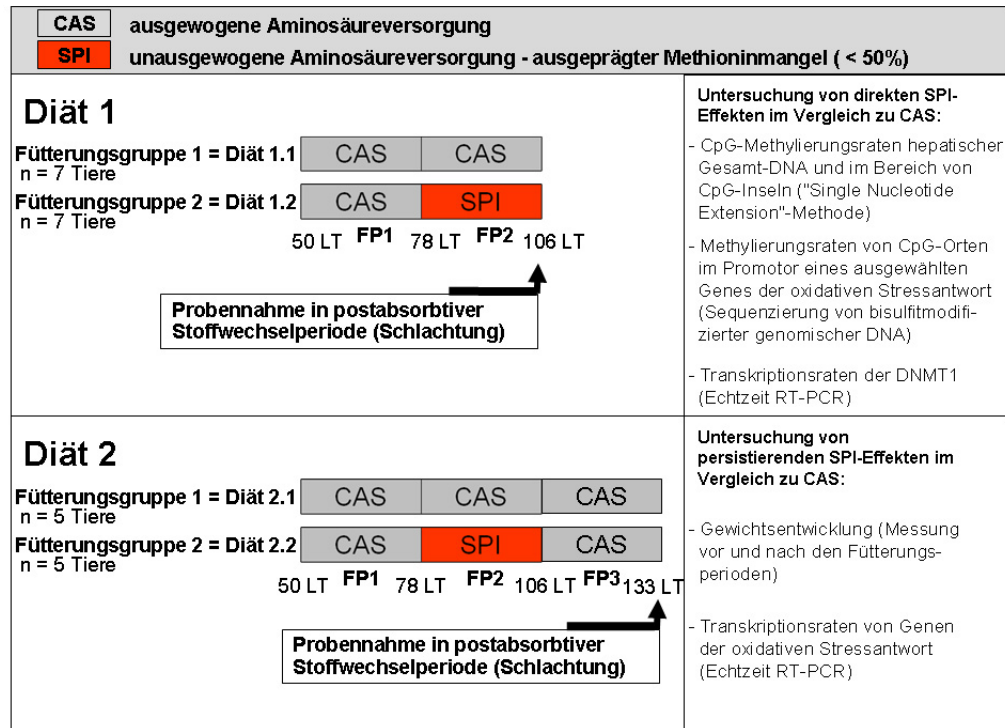


Abb. 4.2: Diäten und Tiere

Die Untersuchung von SPI-Diäteeffekten im Vergleich zur CAS-Diät erfolgte an heranwachsenden männlichen kastrierten Schweinen der *Deutschen Landrasse*.

**Diät 1** Proben von Tieren dieser Diät wurden für die Untersuchung von *direkten* SPI-Effekten verwendet. Jede Fütterungsgruppe bestand aus 7 Tieren.

**Diät 2** Proben von Tieren dieser Diät wurden für die Untersuchung von *persistierenden* SPI-Effekten verwendet. Jede Fütterungsgruppe bestand aus 5 Tieren.

**FP** sind die Fütterungsperioden, die entsprechend ihrer Folge nummeriert sind. **LT** sind die Lebensstage der Tiere.

CAS- und SPI-Diät unterscheiden sich im Aminosäureanteil (siehe Abb. 4.1), sind aber beide isonitrogen und isoenergetisch, besitzen einen bedarfsgerechten Vitamin- und Mineralstoffanteil und einen Proteinanteil von 50 %.

von Tieren der Diät 1 untersucht (siehe Abb. 4.2). Für eine Adaptation des Stoffwechsels wurden beide Gruppen (n = 7 Tiere) 4 Wochen mit der CAS-Diät gefüttert (Fütterungsperiode 1). Anschließend, in der Fütterungsperiode 2, wurde eine Gruppe (Fütterungsgruppe 2) für 4 Wochen auf die SPI-Diät umgestellt, die andere Gruppe (Fütterungsgruppe 1) bekam weiterhin die CAS-Diät, sie diente bei den Untersuchungen als Kontrollgruppe. Am 106. Tag erfolgte die Schlachtung der Tiere, 18-24 h nach der letzten Nahrungsaufnahme (postabsorptive Stoffwechselperiode). Dadurch wurden direkte Effekte, die durch die Nahrungsaufnahme auf die Genexpression wirken, bei den Messungen minimiert. Die durch die Nahrung aufgenommenen Nährstoffe sind nach ca. 12 h verdaut und absorbiert. Die Gewebeproben wurden gesammelt, sofort gefroren und bei -80 °C gelagert, bis die Gewebe für RNA- oder DNA-Isolierungen weiterverarbeitet wurden. Für Untersuchungen in dieser Arbeit wurde ausschließlich Lebergewebe verwendet.

**Untersuchung persistenter diätischer Sojaproteinisolat (SPI)-Effekte** Für die Untersuchung von langanhaltenden (persistenten) Effekten der SPI-Diät wurde den Schweinen (n = 5) die Diät 2 gefüttert (siehe Abb. 4.2). Die Fütterung in den ersten beiden Fütterungsperioden entspricht dem Ablauf wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Es folgt jedoch eine Rückumstellung auf CAS in der SPI-Fütterungsgruppe (Fütterungsperiode 3). Die Kontrollgruppe wird weiterhin mit CAS gefüttert. Die Schlachtung und Probennahme erfolgte am 133. Tag.

## 4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 4.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Lebergewebe erfolgte mit dem *RNeasy Mini KIT*® der Firma QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers.

### 4.2.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus dem Lebergewebe erfolgte mit dem *Genomic KIT*® der Firma QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 4.2.3 Isolierung von PAC-DNA

Ein PAC ist ein künstliches Chromosom, welches aus dem P1-Vektor des temperenten Bakteriophagen P1 entwickelt wurde (*P1 Artificial Chromosome*). Ein PAC erlaubt, im Gegensatz zu den Cosmiden, eine Klonierung von größeren Genomabschnitten (100 bis 300 kb) und ist stabiler als das YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) [272].

Die Isolierung von PAC-DNA aus Bakterienzellen erfolgte mit dem *QIAGEN®-Large-Construct KIT* nach dem Protokoll des Herstellers.

#### 4.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte mit dem *QIAprep® Miniprep KIT* der Firma QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers.

### 4.3 Klonierungen

#### 4.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktionsspaltung

Als Plasmidvektor wurde der *pBluescript® II KS(+)* Phagemid-Vektor von STRATAGENE eingesetzt.

**Restriktionsspaltung** Für die Spaltungen wurden *Enzym-KITs*, die aus den Komponenten Enzym und Puffer bestehen, von der Firma FERMENTAS verwendet. Die Spaltung der zu klonierenden DNA und der Vektor-DNA erfolgte nach folgendem Ansatz:

1. DNA 1-2 µg
2. Puffer (10 x) 1 µl
3. Enzym 10 U
4. ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen

Der Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei der jeweils spezifischen Inaktivierungstemperatur und Inaktivierungszeit. Der Spaltansatz wurde in einem 1,5 %-igem Agarosegel aufgetrennt.

**DNA-Elution aus Agarose** Die DNA-Elution des gewünschten Fragmentes aus einer DNA-Agarosegel-Auftrennung wurde mit dem *QIAquick® Spin KIT* von QIAGEN nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

**Ligation** Für eine optimierte Ligationsrate lag der Anteil der zu klonierenden DNA im Vergleich zur Vektor-DNA in einem 3-4 -fachen molaren Überschuss vor.

Die Ligation erfolgte mit dem *T4 DNA Ligase Tested User Friendly™ KIT* von USB nach folgendem Ansatz:

- |                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1. Vektor DNA             | 20-40 ng                        |
| 2. Insertions-DNA         | 3-10 -facher molarer Überschuss |
| 3. Ligationspuffer (10 x) | 1 µl                            |
| 4. T4 DNA Ligase (1u/µl)  | 1 µl                            |
| 5. ddH <sub>2</sub> O     | auf 10 µl auffüllen             |

Inkubation des Ligationsansatzes bei 4 °C über Nacht.

**Transformation** Die Transformation der rekombinanten DNA erfolgte in kompetente Zellen des Wirtszellstammes *XLI-Blue* von STRATAGENE. Hierfür wurde der *XLI-Blue Competent Cells KIT* (STRATAGENE) verwendet. Die Transformation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 4.3.2 Klonierung von PCR Fragmenten

PCR-Fragmente wurden in den Vektor *pGEM® T-Easy* von PROMEGA kloniert. Taq Polymerasen generieren an jedem synthetisierten PCR-Produkt einen 3'-A-Überhang. Der *pGEM® T-Easy* Vektor bietet eine offene *EcoRV*-Schnittstelle, die an beiden Enden einen 3'-T-Überhang aufweisen. Dies vereinfacht die Klonierung von PCR-Produkten. Eine Restriktion des Vektors entfällt.

**Ligation** Für eine optimierte Ligationsrate lag der Anteil der zu klonierenden DNA im Vergleich zur Vektor-DNA in einem 3-4 -fachen molaren Überschuss vor.

Die Ligation erfolgte mit dem *pGEM® T-Easy* System nach folgendem Ansatz:

- |    |                        |                                 |
|----|------------------------|---------------------------------|
| 1. | pGEM® T-Easy Vektor    | 20-40 ng                        |
| 2. | PCR-Produkt            | 3-10 -facher molarer Überschuss |
| 3. | Ligationspuffer (2 x)  | 5 µl                            |
| 4. | T4 DNA Ligase (3 u/µl) | 1 µl                            |
| 5. | ddH <sub>2</sub> O     | auf 10 µl auffüllen             |

Inkubation des Ligationsansatzes über Nacht bei 4 °C.

**Transformation** Die Transformation der rekombinanten DNA erfolgte in kompetente Zellen des Wirtszellstammes *JM109* von PROMEGA. Die Zellen sind Bestandteil des *pGEM® T-Easy Systems*. Die Transformation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 4.4 Sequenzierung mit dem LICOR 4000L-System (MWG BIOTECH)

Bei der Sequenzierung mit diesem System handelt es sich um eine Strangabbruch-Synthese nach Sanger, über eine PCR-Amplifikation, die auch als *Cycle-Sequenzierung* bezeichnet wird [273, 274]. Die Verwendung eines am 5'-Ende fluoreszenzmarkierten Primers (Markierung: 5'IRD-800, Firma MWG BIOTECH) ermöglicht die computergesteuerte Detektion der DNA-Banden. Über die Software *Base Image IR DataCollection 4.0* wird die Information ausgewertet und als Sequenz dargestellt. Der *LICOR* ermöglicht eine Sequenzierung von 1.000-1.500 bp in einem Sequenzierlauf.

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem *Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing KIT* von AMERSHAM BIOSCIENCES durchgeführt. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 300 ng DNA pro 1.000 bp eingesetzt. Für eine PAC-Sequenzierung wurden 1-2 µg PAC-DNA eingesetzt. Anstatt 2 pmol Primer kamen hier 5 pmol Primer hinzu.

Im Schritt 1 wurde folgender Mastermix pipettiert:

- |               |  |        |
|---------------|--|--------|
| 1.            | Plasmid-/PAC- DNA + ddH <sub>2</sub> O                           | 8,6 µl |
| 2.            | DMSO   | 0,4 µl |
| 3.            | Primer (2 pmol/µl)/(5 pmol/µl)<br>(5'IRD-800, Firma MWG BIOTECH) | 1 µl   |
| Gesamtvolumen |  | 10 µl  |

Im zweiten Schritt wurden die Strangabbruchsreaktionen vorbereitet. Jede Abbruchsreaktion erfolgt in einem separaten Reaktionsgefäß (Insgesamt 4: für

ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert.

1. In das entsprechende Reaktionsgefäß 3 µl des A,C,G oder T-Reagenzes vorlegen,
2. je 3 µl des Mastermix aus Schritt 1 hinzugeben, mischen,
3. jede Reaktion mit 6 µl Wachs überschichten,
4. die PCR-Reaktion wurde nach dem Zyklus durchgeführt, wie in Tabelle 4.1 dargestellt,
5. nach Ablauf der Reaktion jedem Ansatz 6 µl Formamid-Ladepuffer zusetzen.

Tab. 4.1: PCR-Zyklus für die Sequenzierung mit dem *LICOR-Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing KIT*

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sek	30
Annealing	X °C	30 sek	
Elongation	72 °C	1 min	

### Herstellung des PAA-Gels

1. Für das PAA-Gel 21 g Harnstoff in 32 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur lösen,
2. hinzufügen folgender Reagenzien:
  1. *Long Ranger Gel Solution 50 %* (FMC BioProducts) 4,3 ml
  2. 10 x TBE 5 ml
  3. DMSO 500 µl
  4. APS 10 % 350 µl
  5. TEMED 50 µl

**Gelelektrophorese** Zwischen zwei Glasplatten mit den Abmessungen 66 cm x 25 cm wurde unter Benutzung von zwei 0.4 mm Abstandhaltern die Sequenziergel-Lösung gefüllt und nach Einführung eines Vorkamms über einen Zeitraum von 2 h auspolymerisiert. Der Vorkamm wurde entfernt und das Gel in den DNA-Sequencer (*LICOR*) eingesetzt. Danach wurden insgesamt 1 Liter 1 x TBE-Puffer in die Elektrodenkammern gefüllt und der elektrische Stromkreis durch Anbringen der Kontakte geschlossen. Die Steuerung des Sequenzers erfolgte vollautomatisch durch einen gekoppelten Computer mit der Software *Base ImagIR V.4.0* (*LICOR*). Im Gel-Vorlauf wurde das Gel auf 50 °C äquilibriert und die Detektionsoptik kalibriert. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurden die



Sequenzierungsansätze 5 min. bei 70 °C (Thermocycler) inkubiert, um die DNA erneut zu denaturieren. Ein 48-zähliger „Haifischkamm“ wurde an der Gel-Oberkante aufgesetzt. Je 1 µl der Proben wurden in der Reihenfolge A, C, G und T aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese betrug ca. 14 h.

#### 4.5 Quantitative Real-Time-PCR mit dem LightCycler® von ROCHE

Die Untersuchung der Expressionsraten erfolgte über die Quantifizierung der mRNA-Moleküle im Gewebe. Die mRNA repräsentiert die Gesamtheit an aktiv transkribierten Genen in einer Zelle bzw. im Gewebe. Für die Messung der Expressionsraten wurde das LightCycler®-System von ROCHE eingesetzt. Die Quantifizierung der mRNA, die über die RT-PCR in cDNA umgeschrieben wurde, erfolgt hierbei durch Fluoreszenzmessungen von DNA-bindenden Fluorochromen (SYBR® Green).

**Bestimmung der Schmelztemperatur** Ausgehend von der Analyse des Schmelzverhaltens der PCR-Produkte wurde die Temperatur bestimmt, bei der die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR® Green im PCR-Zyklus gemessen wurde. Die Messung erfolgte nach jedem zweiten Elongationsschritt eines PCR-Zyklus. Bei PCR-Produkten mit einer eingipfligen Schmelzkurve wurde eine Messtemperatur bei 72 °C gewählt. Bei PCR-Produkten mit einer mehrgipfligen Schmelzkurve (siehe Abb. 4.3) wurden die Messtemperaturen der Fluoreszenz im Elongationsschritt anhand eines Primertests bestimmt. Eine mehrgipflige Schmelzkurve tritt bei der Entstehung unspezifischer PCR-Produkte oder bei der Entstehung von Primer-Dimeren auf. Deshalb wurde die Messtemperatur so gewählt, dass die unspezifischen PCR-Produkte aufgeschmolzen waren (*fluorescence acquisition temperature*) und nur das als Doppelstrang vorliegende spezifische PCR-Produkt gemessen wurde. Dies sichert eine präzise Quantifizierung der gewünschten PCR-Produkte. Die verwendeten Primer mit Fluoreszenzmessungs- und Annealingtemperatur sind im Abschnitt 4.10.2, Tabelle 4.6 dargestellt.

**Erstellen externer Standardkurven** Die Verwendung externer Standards mit einer bekannten Kopienzahl ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Ausgangskonzentration an cDNA der zu analysierenden Probe. Der verwendete Standard besteht aus einem in den Vektor pUC18 (AMERSHAM BIOSCIENCES) klonierten RT-PCR-Produkt des zu untersuchenden Gens. Von dem zuvor linearisierten rekombinanten Plasmid wurde eine Verdünnungsreihe von

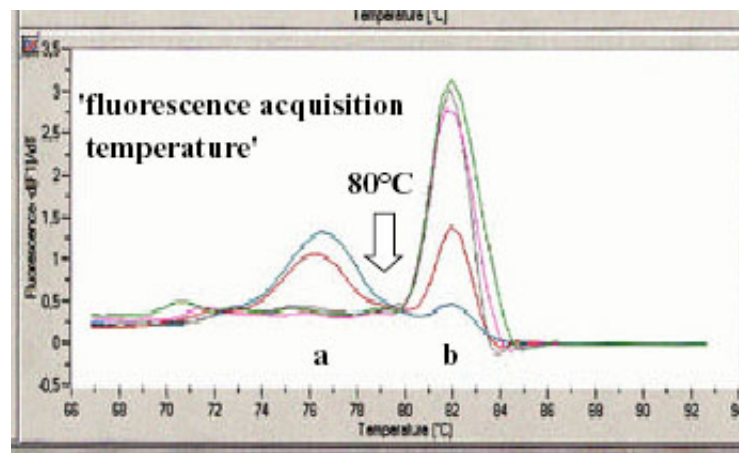


Abb. 4.3: Beispiel für eine zweigipflige Schmelztemperaturkurve

Die Fluoreszenzmessung zeigt eine zweigipflige Schmelzkurve. Die Amplitude *a* repräsentiert die Fluoreszenz von unspezifischen PCR-Produkten und/oder Primer-Dimeren, die jedoch bei einer Schmelztemperatur von 80 °C einzelsträngig vorliegen (*fluorescence acquisition temperature*). Das spezifische Produkt, Amplitude *b*, entsteht bei 80 °C weshalb die Messung der Fluoreszenz hier bei 80 °C durchgeführt wird.

$10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$  Kopien erzeugt. Der Externe Standard wurde mit jedem LightCycler® -Lauf gemessen. Der Standard wird bei der Probeneingabe in die Software gesondert ausgewiesen. Das Programm generiert von dem gemessenen Standard eine Standardkurve und vergleicht diese mit den Fluoreszenzwerten der Proben. Im Ergebnis wird die Zahl der Ausgangskopien von jeder gemessenen Probe angegeben.

#### Spaltung zur Linearisierung des Standard Plasmids

1. 1 µl Plasmid DNA in 20 µl ddH<sub>2</sub>O. aufnehmen,

Hinzugabe von Restriktionsenzym <i>XMN I</i> (10 U/µl) (MBI FERMENTAS)	0,5 µl
Puffer II (50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT)	2,5 µl
BSA (100 mg/ml) (MBI FERMENTAS)	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	1,75 µl

2. Spaltansatz über Nacht bei 37 °C inkubieren,
3. Hitzeinaktivierung des Enzyms 20 min bei 65 °C,
4. Kontrolle der linearisierten Plasmid-DNA auf einem 1,5 %-igem Agarosegel.

**Reverse Transkriptions (RT)-Reaktion** Für die Reverse Transkription wurde die aus Lebergewebe gewonnene mRNA (siehe Abschnitt 4.2.1) der Versuchstiere eingesetzt. Das Umschreiben der mRNA in die cDNA erfolgte mit der *M-MLV Reverse Transcriptase* der Firma PROMEGA. Als Adapter für die reverse Transkription wurde ein Oligo(dT)-*downstream*-Primer (ARK SCIENTIFIC) verwendet.

1. Zu 2 µg mRNA werden 0,5 µg des Primeradapters hinzugefügt und auf 13 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt,
2. Gemisch bei 70 °C 5 min inkubieren, anschließend auf Eis abschrecken,
3. zu dem Ansatz aus Schritt 3 werden folgende Komponenten (alle von der Firma *PROMEGA*) hinzugefügt:
 

1. M-MLV 5 x Reaktionspuffer	5 µl
2. dATP (10 mM)	1,25 µl
3. dCTP (10 mM)	1,25 µl
4. dGTP (10 mM)	1,25 µl
5. dTTP (10 mM)	1,25 µl
6. rRNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	0,63 µl
7. M-MLV RT (200 U/µl)	1 µl
4. Gemisch vorsichtig mischen, bei 42 °C 60 min inkubieren,
5. anschließende Inaktivierung der Enzyme bei 95 °C 5 min,
6. Verdünnung der cDNA auf 5 ng/µl,
7. Lagerung der cDNA bei -20 °C.

**LightCycler® PCR-Amplifikation** Die PCR-Amplifikationen wurden mit den Primern aus Tabelle 4.6 durchgeführt. Für alle LightCycler-Messungen wurden von jedem Tier je Primer 3 Messungen durchgeführt.

Hierfür wurde folgender Ansatz pipettiert:

- |  |         |
|--|---------|
| 1. ddH <sub>2</sub> O (MilliQ)                                 | 12,6 µl |
| 2. LightCycler - FastStart DNA Master SYBR Green I KIT (ROCHE) | 2,0 µl  |
| 3. MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                   | 2,4 µl  |
| 4. <i>forward</i> Primer (25 pmol/µl)                          | 0,5 µl  |
| 5. <i>reverse</i> Primer (25 pmol/µl)                          | 0,5 µl  |
| 6. 10 ng revers transkribierte Gesamt-mRNA                     | 2,0 µl  |

Die Reagenzien der Schritte 1-5 wurden zu einem Mastermix zusammenpipettiert und in die Kapillare überführt. In die Kapillare wurden zum Mastermix 2 µl (10 ng) revers transkribierte Gesamt-mRNA pipettiert. Die Kapillaren wurden an-zentrifugiert um Luftblasen aus der Kapillare zu entfernen. Der PCR-Zyklus ist in der Tabelle 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2: LightCycler® PCR-Zyklus

PCR-Schritt	Temperatur °C	Temperatur- transitionsrate °C/sek	Zeit sek	Anzahl der Zyklen	Fluoreszenz- messung
Initiale Denaturierung	95	20	10	1	keine
Denaturierung	95	20	15	45	keine
Annealing	X	20	10		keine
Elongation	X	2	15		nach jedem 2. Zyklus
Kühlung	40	20	30	1	keine

#### 4.6 5'-Prime Race - Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes

Die Identifizierung des regulatorischen *GSTA1*-Bereiches (Promotor) erfolgte über die Sequenzierung des 5'-Endes der mRNA. Der Beginn der 5'-Region der mRNA indiziert den Anfang des Promotors eines Gens. Hierfür wurde der *GeneRacer*<sup>TM</sup> KIT der Firma *INVITROGEN* eingesetzt. Dieses System gewährleistet die Amplifikation intakter mRNA, wodurch ein verfälschtes Ergebnis infolge der Sequenzierung von im 5'-Bereich geschädigter mRNA ausgeschlossen wird.

Die Isolierung intakter Transkripte beruht auf der Behandlung der Gesamt-RNA mit *CIP* (*Calf Intestinal Phosphatase*). Dieses Enzym baut die 5'-Phosphatgruppe geschädigter mRNA oder anderer Nukleinsäurefragmente ab (Dephosphorylierungsreaktion), wodurch diese für den weiteren Reaktionsverlauf inaktiviert werden. Intakte mRNA ist durch eine *5'-cap-Struktur* geschützt und wird von *CIP* nicht angegriffen.

Im nächsten Schritt erfolgt die Abspaltung der *5'-cap-Struktur* von der intakten mRNA. Dies geschieht mit dem Enzym *TAP* (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*). Übrig bleibt eine reaktive Phosphatgruppe am 5'-Ende der mRNA. An die freie Phosphatgruppe wird das *GeneRacer*<sup>TM</sup> *RNA Oligo* an das 5'-Ende der mRNA mit der T4 RNA Ligase ligiert. Dadurch wurde an das 5'-Ende der mRNA eine definierte Sequenz geknüpft, über die später die Sequenzierung des 5'-Bereiches der mRNA erfolgt. Die mRNA wird über die Reverse Transkription mit einem Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben. Über die PCR-Reaktion mit einem vom *GeneRacer*<sup>TM</sup> *RNA Oligo* abgeleiteten *forward* Primer und einem genspezifisch abgeleiteten *reverse* Primer wurde der 5'-Bereich des Transkripts amplifiziert. Das Produkt wurde über die Gelelektrophorese analysiert und anschließend aus dem Gel eluiert. Für die Sequenzierung wurde das Fragment in den Vektor *pGEM*® *T-Easy* kloniert und anschließend aus beiden Richtungen sequenziert.

**Dephosphorilierungsreaktion mit CIP**

1. Die Dephosphorilierungsreaktion erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

- |                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| 1. Gesamt RNA             | 3 µg                |
| 2. CIP-Puffer (10 x)      | 1 µl                |
| 3. RNase Out™ (40 U / µl) | 1 µl                |
| 4. CIP (10 U / µl)        | 1 µl                |
| 5. RNase-freies Wasser    | auf 10 µl auffüllen |

2. kurz vortexen, Inkubation 1 h bei 50 °C,

3. für die RNA Präzipitierung werden 90 µl RNase-freies Wasser und 100 µl Phenol:Chloroform Gemisch dazugegeben und 30 sek vortexen,

4. anschließend 5 min Zentrifugieren, bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Mikrozentrifuge,

5. überführen der wässrigen oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß (ca. 100 µl),

6. folgende Reagenzien hinzufügen:

- |                                 |        |                   |
|---------------------------------|--------|-------------------|
| 1. Mussel Glycogen (10 mg / ml) | 2 µl   |                   |
| 2. Sodium Acetate pH 5,2 (3 M)  | 10 µl  | gut durchmischen, |
| 3. 95 % Ethanol                 | 220 µl | kurz vortexen,    |

7. das Gemisch 10 min bei -80 °C einfrieren, oder optional über Nacht,

8. für die Pelletierung der RNA 20 min zentrifugieren, bei 4 °C und 14.000 rpm,

9. anschließend mit 500 µl 70 % Ethanol waschen, mehrere male invertieren und kurz vortexen,

10. Zentrifugieren 2 min bei 4 °C und 14.000 rpm,

11. abnehmen des Überstandes, trocknen des Pellets für 1-2 min bei Raumtemperatur,

12. Pellet in 7 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren.

**Entfernen der 5'-mRNA Cap-Struktur mit TAP**

1. Das Entfernen der 5'-mRNA Cap-Struktur erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

- |  |                     |
|--|---------------------|
| 1. RNA aus der Dephosphorilierungsreaktion | 7 µl                |
| 2. TAP-Puffer (10 x)                       | 1 µl                |
| 3. RNase Out™ (40 U / µl)                  | 1 µl                |
| 4. TAP (0,5 U / µl)                        | 1 µl                |
| 5. RNase-freies Wasser                     | auf 10 µl auffüllen |

2. kurz vortexen, Inkubation 1 h bei 37 °C,

3. die RNA-Präzipitierung erfolgte wie unter der Dephosphorilierungsreaktion Schritt 3-12 beschrieben.

### **Ligation des GeneRacer™ RNA Oligos an die „decappierte“ mRNA**

1. Zu dem prä-aliquotierten, lyophilisierten *GeneRacer™ RNA Oligo* (0,25 µg) wird die RNA aus dem vorhergehenden Schritt hinzugefügt,
2. Inkubation 5 min bei 65 °C zum Auflösen von RNA- Sekundärstrukturen,
3. anschließend 2 min auf Eis,
4. Hinzufügen der folgenden Reagenzien:
 

1. Ligase-Puffer 10 x	1 µl
2. ATP (10 mM)	1 µl
3. RNase Out™ (40 U / µl)	1 µl
4. T4 RNA Ligase (5 U / µl)	1 µl
5. RNase-freies Wasser	auf 10 µl auffüllen
5. Inkubation bei 37 °C für 1 h,
6. danach kurz anzentrifugieren und auf Eis stellen,
7. die RNA-Präzipitierung erfolgte wie unter der Dephosphorylierungsreaktion Schritt 3-12 beschrieben,
8. das DNA-Pellet wird in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

### **Reverse Transkription der mRNA** Die Reverse Transkription erfolgte mit dem GeneRacer™ Oligo(dT)-Primer.

1. 1 µl des GeneRacer™ Oligo(dT)-Primers und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) zur ligierten RNA aus dem vorhergehenden Schritt pipettieren,
2. Inkubation 5 min bei 65 °C für die Auflösung der RNA Sekundärstrukturen,
3. auf Eis abschrecken und für ca. 2 min stehen lassen, kurz anzentrifugieren,
4. folgende Reagenzien werden zu dem 12 µl ligierten RNA-Primermix dazugegeben:
 

1. First Strand Buffer (5X)	4 µl
2. DTT (0,1 M)	2 µl
3. RNase Out™ (40 U / µl)	1 µl
4. SuperScript™ II RT (200 U / µl)	1 µl
5. RNase-freies Wasser	auf 20 µl auffüllen,
5. durch Auf- und Abpipettieren gut mischen,
6. kurz anzentrifugieren und bei 42 °C 50 min inkubieren,
7. Inaktivierung der RT-Reaktion durch 5 min 70 °C,
8. auf Eis abschrecken und ca. 2 min stehen lassen, kurz anzentrifugieren,
9. Hinzufügen von 1 µl RNase H (2 U) zum Reaktionsmix, Inkubation bei 37 °C 20 min,

10. anschließend kurz an zentrifugieren und sofort für die PCR Amplifikation einsetzen, oder bei -20 °C lagern.

**PCR Amplifikation** Die Amplifikation des Race-Produktes am 5'-Ende erfolgte mit dem GeneRacer™ 5'-Primer als *forward* Primer. Der *reverse* Primer ist genspezifisch, abgeleitet von der porcinen *GSTA1*-cDNA (siehe Abschnitt 4.10.5, Tabelle 4.10). Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1. High Fidelity PCR Puffer (10 x)                             | 5 µl                 |
| 2. dATP (10 mM)  | 1 µl                 |
| 3. dCTP (10 mM)  | 1 µl                 |
| 4. dGTP (10 mM)  | 1 µl                 |
| 5. dTTP (10 mM)  | 1 µl                 |
| 6. GeneRacer™ 5'-Primer ( <i>forward</i> ) (10 pmol/µl )       | 3 µl                 |
| 7. GSP (gene specific) Primer ( <i>reverse</i> ) (10 pmol/µl ) | 1 µl                 |
| 8. Platinum® Taq DNA Polymerase<br>High Fidelity (5 U/ µl )    | 0,5 µl               |
| 9. MgSO <sub>4</sub> (50 mM)                                   | 2 µl                 |
| 10. 5'-Prime Race Produkt                                      | 2 µl                 |
| 11. ddH <sub>2</sub> O   | auf 50 µl auffüllen, |

Die PCR-Amplifikation erfolgte wie in Tabelle 4.3 dargestellt. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch analysiert.

Tab. 4.3: PCR-Zyklus für die Amplifikation des 5'-Race-Produktes

PCR-Schritt	Temperatur °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 min	1
	94	30 sek	5
	72	1,5 min	
	94	30 sek	5
	70	1,5 min	
Denaturierung	94	30 sek	25
Annealing	65	30 sek	
Elongation	70	1,5 min	
Elongation	70	10 min	1

**Klonierung in pGEM® T-Easy** Das PCR-Produkt wurde in den Vektor *pGEM® T-Easy* kloniert wie unter Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Abschnitt 4.2.4.

**Sequenzierung** Der 5'-Bereich des Race-Produktes wurde mit dem *LICOR* 4000L-System wie in Abschnitt 4.4 beschrieben sequenziert. Hierfür wurde das Produkt mit dem vektorspezifischen Primer T7 (siehe Abschnitt 4.10.5, Tabelle 4.10) sequenziert.

#### 4.7 „Single Nucleotide Extension“- Untersuchung der methylierungsdichte genomischer DNA

Diese Methode wurde zur Abschätzung von Veränderungen in der Methylierungsdichte genomischer DNA und innerhalb von CpG-Inseln entwickelt [275]. Sie basiert auf dem Einsatz von methylierungsabhängigen Restriktionsendonukleasen, die einen 5'-Guanin-Überhang nach der DNA-Spaltung erzeugen, welcher in einem zweiten Schritt mit radioaktiv markiertem [3H]dCTP aufgefüllt wird (*Single Nucleotide Extension*). Die Messung der Radioaktivität mittels Szintillationsmessung und der Vergleich zwischen den zu untersuchenden Gruppen gibt Auskunft über veränderte Methylierungsdichten. Die gemessene Radioaktivität (dpm) ist umgekehrt proportional zum Grad der DNA-Methylierung. Das heißt, je mehr methylierte Stellen in der DNA sind, desto weniger [3H]dCTP wird eingebaut, und um so geringer ist die messbare DNA-gebundene Radioaktivität.

Für die Untersuchung der hepatischen Gesamt-DNA wurden die Restriktionsenzyme *HpaII*, *MspI* und *BssHII* eingesetzt. *HpaII* schneidet nur unmethylierte Methylierungsstellen. *MspI* schneidet an methylierten und nichtmethylierten Methylierungsstellen. Mit den gemessenen Werten der Szintillationsmessung wird ein Faktor nach folgender Formel errechnet:  $[\text{dpm HpaII}:\text{dpm MspI} \times 100 \%]$ . Dieser Faktor gibt das Verhältnis der unmethylierten CpG-Stellen zu den gesamten CpG-Stellen an. Er gibt den Grad der Demethylierung an und ist damit umgekehrt proportional zum Methylierungsstatus.

Das Restriktionsenzym *BssHII* spaltet innerhalb von unmethylierten CpG-Inseln, die überwiegend im Promotorbereich der Gene lokalisiert sind. Sein Erkennungsmotiv für die DNA-Restriktion ist 5'-GCGCGC-3', welches der Teilsequenz von CpG-Inseln entspricht. Die gemessene Radioaktivität gibt hier den Grad der unmethylierten Stellen an, ist also umgekehrt proportional zum Methylierungsgrad. Verglichen wurden die Methylierungsmuster der hepatischen gesamt DNA der CAS- und der SPI-Gruppe (siehe Versuchsansatz I). Von jedem Tier wurden 3 *Single Nucleotide Extension*-Reaktionen durchgeführt.

**Spaltung der DNA mit methylierungsabhängigen Restriktionsenzymen** Die Spaltungen der genomischen DNA mit den jeweiligen Enzymen *HpaII*, *MspI* und



BssHII DNA erfolgte je Tier in einem 40 µl Ansatz. Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma MBI FERMENTAS bezogen.

1. genomische DNA 2 µg
2. Spaltpuffer (10 x) 4 µl
3. Enzym 10 U
4. ddH<sub>2</sub>O auf 40 µl auffüllen

Die Spaltung erfolgte bei allen Enzymen über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert. Die Inaktivierungsbedingungen für HpaII und MspI sind 20 min 65 °C. Für BssHII 20 min bei 80 °C. Vom Spaltansatz wurden 5 µl zur Kontrolle in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

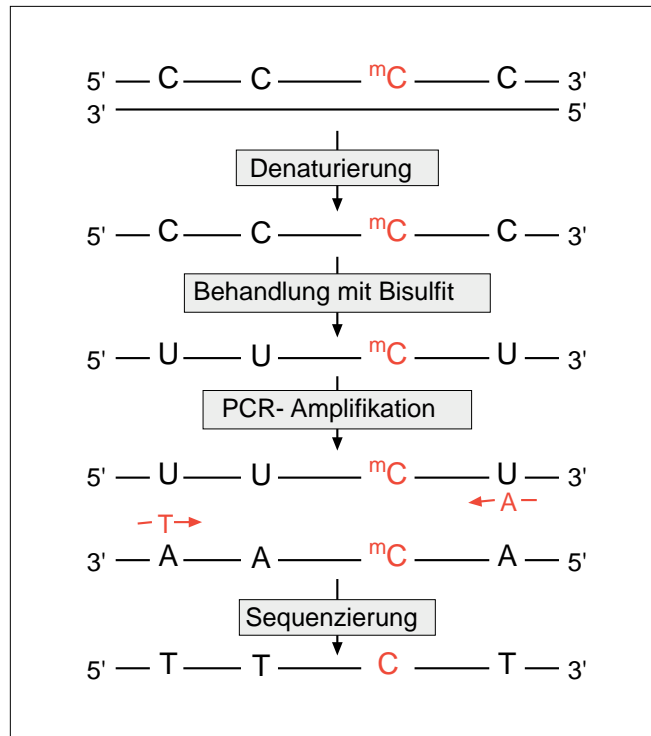
**Einbau von [3H]dCTP in Restriktionsschnittstellen** Für den Einbau des [3H]dCTP in den 5'-Guanin-Überhang wurde die *AmpliTaq*® DNA Polymerase von APPLIED BIOSYSTEMS eingesetzt. Das [3H]dCTP wurde in Form von *Deoxycytidine 5'-tri-phosphate tetrasodium salt* [5,5'-3H] mit einer spezifischen Aktivität von 60 Ci/mmol von der Firma NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS bezogen.

Für jedes Tier wurden 3 Einbaureaktionen nach folgendem Protokoll durchgeführt.

1. 5 µl (0,25 µg) gespaltene genomische DNA aus dem Restriktionsansatz wurden in die *Single Nucleotide Extension*-Reaktion eingesetzt,
2. dazu werden 20 µl des folgenden Reaktionsmix hinzugefügt:
  1. Puffer ohne Mg<sup>2+</sup> (10 x) 2,5 µl
  2. MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1 µl
  3. Taq Polymerase (5 u/µl) 0,05 µl
  4. [3H] dCTP (2,5 mCi/ml) 0,5 µl (21pmol; 1,25 µCi)
  5. ddH<sub>2</sub>O 15,95 µl
3. der Einbau des [3H]dCTP erfolgte im Zeitraum von 1 h bei 56 °C.

**Szintillationsmessung** Je 25 µl-Einbaureaktion wurden 2 x 10 µl entnommen und je auf ein *Whatman*® *chromatography paper, ion exchange* (DE81 23mm) von SIGMA-ALDRICH aufgetragen. Die Filter wurden unter einer Rotlichtlampe getrocknet und anschließend mit 5 x 2 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7 (nach Maniatis [276]), mit Hilfe einer Absaugvorrichtung gewaschen und nochmals unter Rotlicht getrocknet. Die Filter wurden in Szintillationsküvetten mit 5 ml *Rotiszint mini*® (ROTH) gelegt und eine Szintillationsmessung vorgenommen.

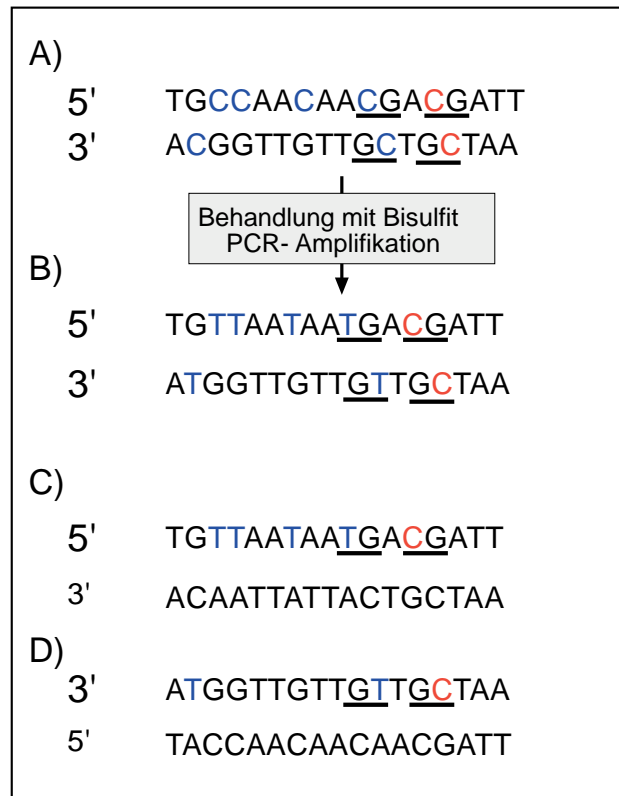
#### 4.8 Bestimmung der Methylierungsrate von CpG-Orten in bisulfitmodifizierter genomischer DNA



**Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Sequenzierung von bisulfitmodifizierter genomischer DNA**

Die genomische DNA muss für die Bisulfitbehandlung einzelsträngig vorliegen. Die **Denaturierung** erfolgt durch die Zugabe von NaOH und kurzzeitiger Erhitzung auf 95 °C. Durch die **Bisulfitbehandlung** werden nichtmethylierte Cytosine zu Uracil konvertiert. Methylierte Cytosine (<sup>m</sup>C) bleiben unverändert. Bei der hier dargestellten **PCR-Amplifikation** des 5'-Stranges wird im 3'-Strang komplementär zum Uracil Adenin eingebaut. Der 3'-Strang dient als Matrize für den 5'-Strang, es wird komplementär Thymin eingebaut. Deshalb wird aus dem Uracil des Bisulfit-Templates während der Amplifikation Thymin. Durch die **Pyrosequenzierung** wird die Umwandlung nichtmethylierter Cytosine zu Thymin, durch einen Vergleich mit der Ausgangssequenz dargestellt.

Grundlage dieser Methode ist die Eigenschaft des Bisulfits, Cytosin einzelsträngiger genomischer DNA in Uracil umzuwandeln, während methyliertes Cytosin (5-Methyl-Cytosin) durch die Methylgruppe geschützt ist und unverändert bleibt. Bei der anschließenden PCR-Reaktion werden die Uracil-Moleküle während der Amplifikation durch Thymin ersetzt (siehe Abb. 4.4). Die Sequenzierung der bisulfitbehandelten DNA und der Vergleich mit der unbehandelten DNA-Sequenz



**Abb. 4.5: Die DNA Stränge sind nach der Bisulfitbehandlung nicht mehr komplementär**

**A)** Dargestellt ist die unbehandelte doppelsträngige DNA. Blau markiert sind die Cytosine, die durch eine Bisulfitbehandlung mit anschließender PCR-Amplifikation in Thymin umgeschrieben werden (siehe auch Abb. 4.4). Unterstrichen sind zwei potentielle Methylierungsstellen. Das Cytosin der ersten Methylierungsstelle ist nicht methyliert (blau markiert), das Cytosin der zweiten Methylierungsstelle ist methyliert (rot markiert) und wird während der Bisulfitbehandlung nicht konvertiert. **B)** Nach der Bisulfitbehandlung sind die beiden DNA-Stränge nicht mehr komplementär. Für eine Methylierungsanalyse müssen beide Stränge einzeln untersucht werden. **C)** Dargestellt ist der 5'-Strang der bisulfitbehandelten DNA. Für die Generierung der PCR-Primer wurde der komplementäre 3'-Strang generiert. Ausgehend von dieser Sequenz wird das Primerpaar für die PCR-Amplifikation abgeleitet. **D)** Dargestellt ist der 3'-Strang der bisulfitbehandelten DNA mit generiertem komplementären 5'-Strang. Die Untersuchung der Methylierungsstellen dieses Stranges erfolgt mit Primern, die spezifisch von dieser Sequenz abgeleitet werden.

zeigt, ob ein Cytosin methyliert ist, oder zu Thymin umgewandelt wurde und damit nicht methyliert ist.

Zu beachten ist, dass die beiden bisulfitmodifizierten DNA-Stränge nicht mehr komplementär zueinander sind, weshalb strangspezifische Primer für die PCR-Amplifizierung abgeleitet werden müssen (siehe Abb. 4.5). Mit dieser Methode ist damit nur die Methylierungsanalyse eines Einzelstranges möglich. Bei der Ableitung der Primer muss darauf geachtet werden, dass möglichst keine CpG-Methylierungsstellen in der Sequenz enthalten sind. Sich im Primer-Bindungsbereich befindende Cytosine müssen zu Thymin konvertiert werden [277, 278, 279, 280].

#### 4.8.1 Differentielle Modifizierung mit Bisulfit

Der chemische Ablauf der hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil ist im Bild 4.6 dargestellt. Die Sulphonierung zu Cytosinsulphonat und die sich spontan anschließende hydrolytische Desaminierung geschieht durch die Inkubation der denaturierten DNA in einer 3 M Bisulfitlösung. Die effektive Umsetzung von Cytosin zu Uracilsulphonat erfolgt bei einem pH-Wert von 5-5,5. Die Alkali-Desulphonierung des Uracilsulphonats zu Uracil erfolgt durch die Zugabe von NaOH und Inkubation bei 37 °C [281].

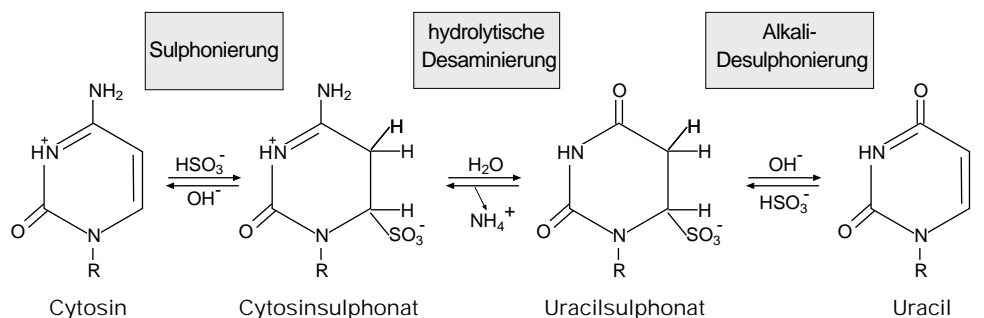


Abb. 4.6: Chemischer Ablauf der bisulfitinduzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil

#### Denaturierung der DNA

1. 1 µg genomische DNA wurden in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, so dass ein Endvolumen von 70 µl entsteht,
2. Zugabe von 8 µl 3 M NaOH,

3. 20 min Inkubation bei 37 °C,
4. anschließend 5 min 95 °C,
5. zum Abschluss des Denaturierungsprozesses die DNA auf Eis abschrecken und 2 min stehen lassen.

**Sulphonierung und hydrolytische Desaminierung** Die für die Reaktion benötigte Bisulfitlösung wird wie folgt angesetzt:

- |  |        |
|--|--------|
| 1. Natriumbisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )               | 4,5 g  |
| 2. Hydrochinon ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) (40 mM)<br>(SIGMA) | 500 µl |
| 3. NaOH (10 M)   | 300 µl |
| 4. RNase-freies $\text{H}_2\text{O}$ (DESTAMAT, autoklaviert)          | 7,5 ml |

Das Wasser wird zum Natriumbisulfit hinzugefügt. Festes Metabisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) zerfällt in wässriger Lösung zu  $12\text{NaHSO}_3$  (Voraussetzung für die Sulphonierungsreaktion) und  $3\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Um nichtspezifische Nebenreaktionen die zur Oxidation des Bisulfits führen können zu verhindern, muss im Wasser gelöstes  $\text{O}_2$  gründlich entfernt werden. Zum einen geschieht dies durch die Verwendung entgastem Wassers, in diesem Fall durch stehen lassen des Wassers im Kühlschrank mit leicht geöffnetem Deckel über Nacht, zum anderen wird dies durch die Zugabe des frisch angesetzten Hydrochinons erreicht. Dieses a,b -ungesättigte Di-Keton wird durch Oxidation in das nahezu energetisch gleichwertige *p*-Benzochinon überführt und wirkt somit als Inhibitor der Bisulfitoxidation. Durch Zugabe von 10 M NaOH wird die Bisulfitlösung anschließend auf pH 5.0 justiert, erst jetzt beginnt sich das Natriumbisulfit zu lösen.

1. Die denaturierte DNA wird in 1 ml Bisulfitlösung überführt und durch Invertieren der Reaktionsgefäße gut gemischt,
2. das Reaktionsgemisch wird mit 3 Tropfen Mineralöl (SIGMA) als Verdunstungsschutz überschichtet,
3. die Inkubation erfolgt 20 h über Nacht bei 55 °C unter Lichtausschluss.

**Isolierung der DNA aus der Bisulfitlösung** Die Isolierung der DNA aus der Bisulfitlösung wurde mit dem *GeneClean®KIT* der Firma QBIOSCI nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

**Desulphonierung** Zur DNA aus dem vorhergehenden Schritt werden 11 µl 3 M NaOH dazugegeben. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 20 min bei

37 °C. Hierbei findet die Desulphonierung des Uracilsulphonats zu Uracil statt (siehe Abb. 4.6).

### **DNA-Fällung und Aufreinigung**

1. Zur DNA aus dem vorhergehenden Schritt 74 µl 7,5 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (Ammoniumacetat) pH 7 hinzufügen, durch Invertieren mischen,
2. Hinzugabe von 460 µl 99 % Ethanol, mischen,
3. über Nacht bei -80 °C inkubieren,
4. den Fällungsansatz in der Mikrozentrifuge 1 h bei 4 °C zentrifugieren,
5. den Überstand verwerfen und das Pellet mit 200 µl 70 %-igem Ethanol waschen, Zentrifugation 10 min bei 4 °C,
6. durch nochmaliges Anzentrifugieren den restlichen Alkohol mit der Pipette entfernen,
7. lösen des Pellets in 30 µl 1mM Tris pH 7,5,
8. DNA aliquotieren und bei -20 °C lagern.

**PCR-Amplifizierung** Die PCR-Reaktion wurde mit dem *AmpliTaq Gold® Polymerase KIT* von APPLIED BIOSYSTEMS durchgeführt.

Bei der Ableitung eines Primerpaares ist zu beachten, dass der Primer, der in entgegengesetzter Leserichtung zum späteren Sequenzierprimer liegt, biotinyliert ist. Dies ist Voraussetzung für die Bindung an die Streptavidin Sepharose™ bei der PCR-Aufreinigung.

Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 1. GeneAmp®10 x PCR-Puffer II (ohne MgCl <sub>2</sub> ) | 2,5 µl              |
| 2. MgCl <sub>2</sub> Lösung (25mM)                      | 1,5 µl              |
| 3. dNTP Gemisch (je 100 mM)                             | 0,2 µl              |
| 4. Oligo <i>forward</i>                                 | 0,5 µl              |
| 5. Oligo <i>reverse</i>                                 | 0,5 µl              |
| 6. AmpliTaq Gold®Polymerase (5 U / µl)                  | 0,1 µl              |
| 7. Template 1,5 - 5 µl                                  | x µl                |
| 8. ddH <sub>2</sub> O                                   | auf 25 µl auffüllen |

Die PCR-Amplifikation erfolgte wie in Tabelle 4.4 dargestellt. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch analysiert. Die verwendeten Primer und deren Sequenz sind der Tabelle 4.9 zu entnehmen.

Tab. 4.4: PCR-Zyklus für die Amplifikation von bisulfitbehandelter DNA

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	6 min	1
Denaturierung	95 °C	45 sek	45-48
Annealing	X °C	45 sek	
Elongation	70 °C	1 min	
Elongation	70 °C	10 min	1

#### 4.8.2 Pyrosequenzierung<sup>TM</sup>-Bestimmung des Anteils methylierter und nichtmethylierter CpG-Orte

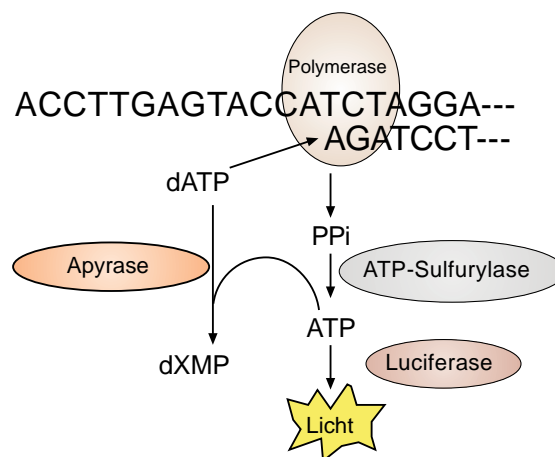
Die Sequenzierung der bisulfitbehandelten DNA erfolgte mit dem *Pyrosequencer*<sup>TM</sup>-System von BIOTAGE. Dieses System ermöglicht die Messung des Verhältnisses von Cytosin zu Thymin in einer CpG-Methylierungsstelle nach der Bisulfitbehandlung, wodurch auf das Verhältnis von methylierten zu nichtmethylierten Cytosinen rückgeschlossen werden kann. Das Verhältnis wird prozentual angegeben [282, 283].

Die Pyrosequenzierung ist eine DNA-Sequenzierungstechnik die auf der Detektion von freigesetzten Pyrophosphaten (PPi) während der DNA-Synthese basiert. In einer Kaskade von enzymatischen Reaktionen wird Licht generiert, dessen Intensität proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide steigt [284].

Für die Sequenzierung von Methylierungsstellen muss die Sequenz der DNA bekannt sein. Ein Sequenzierprimer ist Voraussetzung für die komplementäre Einbaureaktion der Nukleotide durch die DNA-Polymerase. Erfolgt der Einbau eines komplementären Nukleotids durch die DNA-Polymerase in den an die Template-DNA hybridisierenden Primerstrang, wird ein Pyrophosphatmolekül frei (siehe Abb. 4.7). Dieses Pyrophosphat wird durch die ATP-Sulfurylase zu ATP konvertiert. ATP stellt die Energie für die Luciferase zur Verfügung, welche Luciferin oxidiert. Diese Reaktion führt zur Erzeugung von Licht. Das emittierte Licht wird von einer CCD- (Charge Coupled Device) Kamera aufgenommen. Das Signal wird digitalisiert und in einem Pyrogramm<sup>TM</sup> dargestellt. Die Höhe eines Peaks ist Proportional zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide. Apyrase, ein nukleotidabbauendes Enzym baut kontinuierlich ATP und nichteingebaute dNTP's ab. Dadurch wird das Licht nach einer bestimmten Reaktionszeit „abgeschaltet“ und die Reaktionslösung wird regeneriert. Das nächste dNTP kann hinzugefügt werden. Das Hinzufügen der Enzyme und der dNTP's erfolgt automatisch durch einen Pipettierautomaten.

Die Sequenz des Abschnittes dessen Methylierungsstelle untersucht werden soll, wird in die *PSQ*<sup>TM</sup>96 MA Software Version 2.0.2 eingegeben und die CpG-Methyl-

ierungsstelle gesondert ausgewiesen. An dieser Stelle wird nacheinander C und T in die Probe pipettiert. Die Messung der Lichtintensität, die im Pyrogramm™ dargestellt wird, gibt Auskunft über den Anteil von methylierten zu nichtmethylierten Cytosinen (siehe Abb. 4.8). Der Anteil wird von der Software berechnet und angegeben.



**Abb. 4.7: Das Prinzip der Pyrosequenzierung**

Über eine Enzymkaskade wird durch den Einbau eines Nukleotids in den neu-synthetisierten Strang Licht freigesetzt. Die Intensität des Lichtes ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. (Bild nach [284])

**Aufreinigung der PCR-Produkte** Die PCR-Produkte werden vor der Sequenzierung aufgereinigt. Dafür wird das PCR-Produkt an Sepharosekügelchen (Streptavidin Sepharose™ High Performance, AMERSHAM BIOSCIENCES) gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Die Proben werden in einer „96 Well“-Platte vorbereitet.

1. 20-40 µl PCR-Produkt werden für die Reinigung eingesetzt, bei Einsatz von weniger als 40 µl PCR-Produkt wird mit ddH<sub>2</sub>O auf 40 µl aufgefüllt,
2. zu der Probe 40 µl Sepharoselösung pipettieren, die wie folgt verdünnt wurde:
 

Binding Puffer pH 7,6	37 µl
(10 Mm Tris-HCL; 2 M NaCl; 1mM EDTA; 0,1 % Tween 20)	
Streptavidin Sepharose™	3 µl,
3. schütteln des Probe-Sepharose-Gemisches in der Platte 5 min bei 1.400 rpm im *Thermomixer 5436* EPPENDORF,



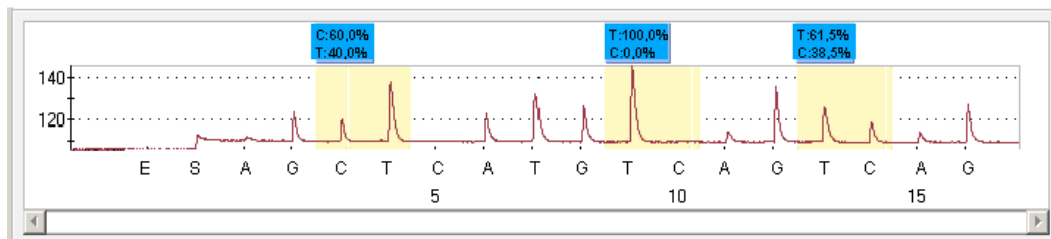


Abb. 4.8: Pyrogramm™

Im Pyrogramm ist die Lichtintensität nach einem eingebauten Nukleotid dargestellt. Die gelb hinterlegten Bereiche markieren die potentiellen Methylierungsstellen. Weil theoretisch die Möglichkeit besteht, dass das Cytosin demethyliert aber auch methyliert ist, werden beide Nukleotide (C,T) nacheinander in die Reaktion gegeben. Die Amplituden werden ausgemessen, das Ergebnis ist über den Methylierungsstellen in der blauen Box aufgeführt.

Die mittlere der im Bild dargestellte potentielle Methylierungsstelle ist keine CpG-Methylierungsstelle, sondern ist in der Originalsequenz ein Cytosin. Die Markierung dieses Cytosins als Methylierungsstelle dient als Kontrolle für die Vollständigkeit der Bisulfitbehandlung. Wie hier abgebildet, ist das Cytosin zu 100 % zu Thymin umgewandelt worden. Die Bisulfitumsetzung war vollständig.

4. die an die Sepharose gebundene DNA wird mit dem Probentool über die Vakuumanlage an den sich im Probentoolfinger befindenden Filter angesaugt (der Aufbau und die Funktionsweise der *Vacuum Prep Worktable* sind in „*Sample Preparation Guidelines for the PSQ™96 and PSQ 96MA Systems*“ beschrieben),
5. waschen des Probentools für je 5 sek in den entsprechenden Lösungen, die sich in den dafür vorgesehenen Wannen in der *Worktable* befinden:
  1. ddH<sub>2</sub>O
  2. 70 % Ethanol
  3. Denaturierungslösung (0,2 M NaOH)
  4. Waschlösung pH 7,6 (10 mM Tris-Acetat),
6. nach dem 4. Waschschrift das Vakuum ausschalten und die *Probenfinger* des *Probentools* in die *PSQ HS 96 Platte* mit der vorbereiteten Primerlösung eintauchen und die DNA lösen,
7. Vakuum anschalten und Probentool in dest. H<sub>2</sub>O waschen,
8. für das Annealing der Primer an die DNA, die Proben 2 min bei 80 °C inkubieren, anschließend auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

#### Vorbereiten der PSQ HS 96 Platte mit Primerlösung

1. Die verwendeten Sequenzierprimer werden auf 10 pmol / µl verdünnt,

2. 1,6 µl Primer werden in 38,4 µl *Annealing Puffer* pH 7,6 (20 mM Tris-Acetat; 2 mM Magnesium-Acetat-Tetrahydrat) aufgenommen,
3. je Probe werden 40 µl Puffer-Primer-Gemisch in ein *Well* der *PSQ HS 96 Platte* pipettiert.

**Sequenzierung mit dem Pyrosequencer™** Die Berechnung der Menge an zuzuführenden dNTP's sowie Substrat und Enzym für die Sequenzierung wird von der *PSQ™96 MA Software Version 2.0.2* automatisch durchgeführt, nachdem die Sequenz eingegeben wurde. Die dNTP's, Substrat und Enzym werden in die Kartusche des Pipettierautomaten pipettiert. Anschließend erfolgt der vollautomatische Sequenzierungslauf.

#### 4.8.3 Die Methylierungsrate

Die Methylierung von CpGs kann von Zelle zu Zelle eines Gewebes unterschiedlich sein, das heißt, in manchen Zellen ist das untersuchte CpG methyliert, in anderen nicht. Eine Zunahme oder Abnahme des Anteils an Zellen mit einer CpG-Methylierung kann zu einer veränderten Genexpression führen. Ein einheitlicher Methylierungsstatus in allen untersuchten Zellen eines Gewebes ist ebenfalls möglich.

Mit dem Pyrosequenzier™ -System wird das Verhältnis von methylierten zu nichtmethylierten CpG-Stellen aus dem Gemisch von DNA-Molekülen, die aus vielen Zellen eines Gewebes isoliert wurden, ermittelt.

Eine Zunahme der ermittelten Methylierungsrate zeigt einen zunehmenden Anteil an methylierten CpGs, was in Verbindung mit einer Expressionshemmung steht, eine Abnahme der Methylierungsrate zeigt einen abnehmenden Anteil an methylierten CpGs, was in Verbindung mit einer Expressionssteigerung steht (siehe Abschnitt 2.2.1)

### 4.9 Statistische Analysen

Für alle Analysen wurde das SAS/STAT Softwarepaket [285] genutzt. Gebildete Mittelwerte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden hinsichtlich der statistischen Signifikanz mit dem Studentischen t-Test überprüft. Die Signifikanzgrenze wurde  $< 0.05$  gesetzt. Hierarchische Clusteranalysen wurden mit dem *Varclus*-Verfahren nach Standardisierung aller Werte durchgeführt.

## 4.10 Verwendete Primer

### 4.10.1 Isolierung der GSTA1-PAC-Klone

Tab. 4.5: Isolierung der GSTA1-PAC-Klone

Nr.	Bezeichnung der Primer	abgeleitet von ACC-Nr.	Position bp	Primersequenz 5'- 3'	Annealing temp. °C	Produkt-Länge bp
1	s-I-048F	Z69585	317	GCGTCCTTCCCGTAGAGGTTGTA	60	122
2	s-I-048R	Z69585	195	AAAATGATGGGAGTTTGCTGTTC	60	

### 4.10.2 Echtzeit-RT-PCR

Tab. 4.6: Verwendete Primer für die Messung der Transkriptionsraten

Protein	Bezeichnung der Primer	abgeleitet von ACC-Nr.	Primersequenz 5'- 3'	Annealing temp. °C	Fluoreszenz-messpunkt °C	Produkt-Länge bp
GSTA1	fbn-s-048 for rev	F14639	GCGTCCTTCCCGTAGAGGTTGTA AAAATGATGGGAGTTTGCTGTTC	60	81	124
MSR	fbn-s-060 for rev	U37150	ACATGATCCAAAACATTTCA GGCTTTGTGAAGTACACAAA	60	77	146
CANX	fbn-s-004 for rev	M94859	TCACATCTTCCACTGTGTTG CAGACTGCAAGCTGCACAGT	55	81	232
OATP2	fbn-s-013 for rev	AF205071	GAGCCAATAAGAGGTGATGACAGAG TTGAATACACAACAGCAGAAGAAAT	55	74	85
HSF1	fbn-s-022 for rev	AF059275	ACTGTTTATTCTATCAGATG AAATGTTTACTATATACAAT	50	74	127

### 4.10.3 Sequenzierung des 5'-untranslatierten GSTA1-Bereiches

Tab. 4.7: Verwendete Primer für die Sequenzierung des 5'-untranslatierten Bereiches

Nr.	Bezeichnung der Primer	abgeleitet von ACC-Nr.	Position bp	Primersequenz 5'- 3'	Annealing temp. °C
1	GST-Seq-1-rev	Z69585	23	GCTGTCTCCCACTTGGCTCAG	62
2	GST-Seq-2-rev	Z69585	53	GTCTGCTGGTCTCTCTCAACCT	65
3	GST-Seq-3-rev	Z69585	96	GCCATTGAAATAGTGAAGAATGG	60
4	GST-Seq-4-rev	Z69585	118	GGATACACTCCATTCTGCCTCGGCCATTG	65
5	GST-Seq-5-rev	GSTA1-Promotor	-599	CACACTCTGAGCAGCCTTCTTA	60
6	GST-Seq-6-rev	GSTA1-Promotor	-817	CTCATCTGCGACATACACCACA	60
7	GST-Seq-7-for	GSTA1-Promotor	-243	CGGCTGGCAGAGAGTGTCGAAT	60

#### 4.10.4 Sequenzierung von bisulfitmodifizierter genomischer DNA für die Untersuchung von Methylierungsstellen

Tab. 4.8: Verwendete Primer für die Amplifizierung der PCR-Produkte

\* = 5'-Biotinylierung

Nr.	Bezeichnung der Primer	Posit. im GSTA1-Promotor bp	Primersequenz 5'- 3'	Anneal. temp. °C	Produkt-Länge bp	beinhaltet CpGs
1	GST-for	-1807	*TTTGTGAGAGAGGAAGGTATTTAAG	55	210	1-4
2	GST-rev	-1598	AAACCTCCTAAAAATATACAAAACC			
3	GST-6-for	-1562	*TTTTTAGTTTTTTGGTAGTTTTAGA	55	248	5-8
4	GST-6-rev	-1315	CCTAAAATTTAATATACCCACAT			
5	GST-5-for	-1236	*ATTGTTGAAGAAGGGGTATG	55	194	9,10
6	GST-5-rev	-1043	TCCATAAACAATAAATCTCT			
7	GST-4-for	-895	*TTGGGGTTTAATTTTTTGGTT	55	312	11-14, 15-17
8	GST-4-rev	-584	TTCTTTCCTCTCTACCACTC			
9	GST-3-for	-396	GTAATTTAATGAAAGAGAATTTTAGAG	55	181	18-21
10	GST-3-rev	-216	*AAATTAATTAAACACTCTCTACCAAC			

Tab. 4.9: Verwendete Primer für die Sequenzierung der Methylierungsstellen

Nr.	Bezeichnung der Primer	Posit. im GSTA1-Promotor (bp)	Primersequenz 5'- 3'	Sequenzierung der CpG-Orte
1	GST-seq-P1/2-rev	-1745	AAAACACATACTAACC	1,2
2	GST-seq-P3/4-rev	-1679	CCCCCAAATATATAAAC	3,4
3	GST-seq-P5-rev	-1499	ATAAAAATAAAACAACCCC	5
4	GST-seq-P6-rev	-1445	ATAAAAAAAATCCAC	6
5	GST-seq-P7-rev	-1416	TCCAATAACAATTAACTTC	7
6	GST-seq-P8-rev	-1378	AAATAAAAACATCCTAAAT	8
7	GST-seq-P9-rev	-1187	CACAACTAATATAAAACCC	9
8	GST-seq-P10-rev	-1071	AAACCTTAATCTTAATTC	10
9	GST-seq-P11-rev	-827	ACATACACCACAACCTCAC	11
10	GST-seq-P12-rev	-804	ACCACATCTAAAACCTCATCT	12
11	GST-seq-P13-rev	-757	ATCTAATTAATCTATAACC	13
12	GST-seq-P14/15-rev	-712	TTTTTTAAAACCTACACCT	14,15
13	GST-seq-P16/2-16/1-rev	-617	CCTACCCTCAAAACCTTTAC	16,17
14	GST-seq-P17-for	-348	TTAGTTTTTTTTATTTTAT	18
15	GST-seq-P18-for	-297	TTTAGTTTATGAAAATTTTT	19
16	GST-seq-P19-for	-274	TAAGTTTTTTTTT	20
17	GST-seq-P20-for	-257	ATGCCCTTTTTCAT	21

#### 4.10.5 Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des GSTA1-5'-untranslatierten Bereiches

Tab. 4.10: Verwendete Primer für die Identifizierung des 5'-untranslatierten Bereiches

Nr.	Bezeichnung der Primer	abgeleitet von ACC-Nr.	Position bp	Primersequenz 5' - 3'	Annealing temp. °C
1	GeneRacer <sup>TM</sup> 5' - Primer	GeneRacer <sup>TM</sup> 5' - Oligo		CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	65
2	5' P-Race-1-rev	Z69585	259	GCACCAGCTTCATCCCGTCAATCTC	65
3	T7	pGEM®-Teasy - Vektor		GTAATACGACTCACTATAGGGC	56



## 5. ERGEBNISSE

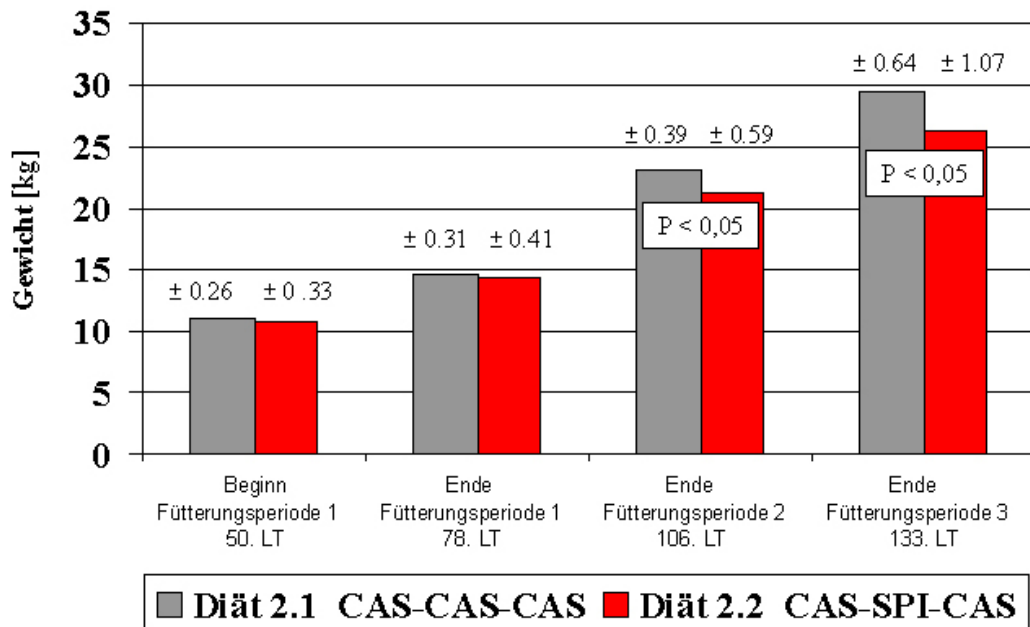
### *5.1 Körpermasseentwicklung von juvenilen Schweinen in Abhängigkeit von der Proteindiät*

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Körpermassezunahme von juvenilen Schweinen unter dem direkten Einfluss einer Aminosäuremangeldiät (SPI), im Vergleich zur Aminosäurevollwert-Kontrolldiät (CAS) und vier Wochen nach Rückumstellung der Mangeldiät auf die Vollwertdiät zu untersuchen. Hierzu wurden 10 Schweine im Alter von 50 Lebenstagen (Körpergewicht  $11,0 \pm 0,3$  kg) in ein vergleichendes Fütterungsexperiment einbezogen. Fünf Tiere erhielten für 12 Wochen eine semisynthetische CAS-basierte Kontrolldiät, während die anderen fünf Tiere für vier Wochen (50.-80. Lebenstag) mit der CAS-Kontrolldiät, zwischen dem 80. und 106. Lebenstag mit der SPI-Diät und anschließend zwischen dem 106. und 133. Lebenstag wiederum mit der CAS-Kontrolldiät gefüttert wurden (siehe Abb. 4.2, S.43, Diät 2). Die Körpermassen der Schweine wurden zu Beginn und zum Ende einer jeden Fütterungsperiode bestimmt. Die mittlere Körpermasse der Tiere, in Abhängigkeit von Fütterung und Zeitpunkt, sind in der Abbildung 5.1 dargestellt.

Während sich die mittlere Körpermasse vor und nach der ersten Fütterungsperiode (für beide Gruppen CAS-Fütterung) zwischen beiden Gruppen nicht unterschied, wiesen die SPI-gefütterten Tiere am Ende der zweiten Fütterungsperiode, im Vergleich zur CAS-Gruppe, signifikant verminderte Körpermassen auf. Die mittlere Körpermasse der vier Wochen SPI-gefütterten Tiere lag mit  $21,19 \pm 0,41$  kg um 8 % signifikant unter der mittleren Körpermasse der ausschließlich CAS-gefütterten Tiere ( $P < 0,05$ ). Diese SPI-gefütterten Tiere wiesen auch vier Wochen nach der Rückumstellung der SPI-Diät auf die CAS-Diät, im Vergleich zu den permanent CAS-gefütterten Tieren, signifikant verminderte Körpermassen auf. Die mittlere Körpermasse der temporär SPI-gefütterten Tiere lag mit  $26,19 \pm 1,07$  kg etwa 11 % unter der mittleren Körpermasse der permanent CAS-gefütterten Tiere.

Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass die SPI-Diät, im Vergleich zur CAS-Diät, eine persistent verminderte Gewichtsentwicklung verursacht, wodurch ein nach-

teiliger persistenter Einfluss der SPI-Diät auf die Entwicklung der Tiere deutlich wird.



**Abb. 5.1: Mittlere Körpermasse von Schweinen der jeweiligen Fütterungsgruppe vor Beginn des Fütterungsversuches und nach den einzelnen Fütterungsperioden**

Die mittleren Gewichte der SPI-gefütterten Tiere sind rot und die der CAS-Kontrolltiere grau dargestellt. Der erste Messpunkt entspricht dem mittleren Gewicht der Tiere vor dem Fütterungsversuch ( $11,0 \pm 0,3$  kg). Fütterungsperiode 1 ist die anfängliche Fütterung beider Gruppen mit CAS. Fütterungsperiode 2 ist die anschließende temporäre Fütterung der einen Tiergruppe mit SPI, die Kontrollgruppe wird weiterhin mit CAS gefüttert. In Fütterungsperiode 3 erfolgt die Rückumstellung der temporär SPI-gefütterten Gruppe auf CAS. LT sind die Lebenstage der Schweine zu den Fütterungszeitpunkten.

## 5.2 Hepatische Transkriptionsniveaus von ausgewählten Genen der oxidativen Stressantwort nach temporärer Fütterung der SPI-Diät beim Schwein

Als ein möglicher molekularer Mechanismus, der zu langanhaltenden physiologischen Veränderungen führt (siehe Abschnitt 2.1.3.2), wurde die oxidative Stressre-



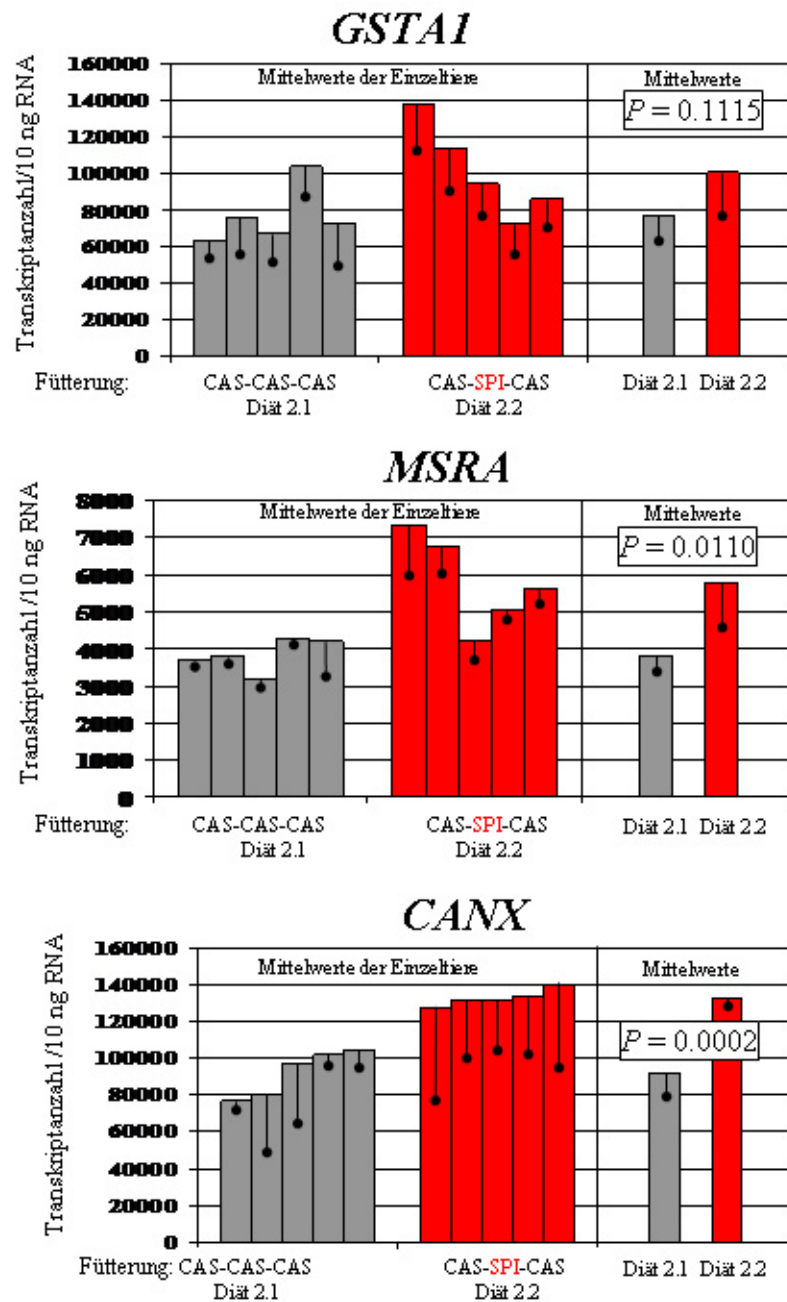
aktion untersucht. Dazu wurde die hepatische Expression von fünf mit dem oxidativen Stress assoziierten Genen, die erhöhte Expressionsniveaus nach chronischer SPI-Aufnahme zeigten [25], mittels RT-PCR (LightCycler™) analysiert. Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit den jeweiligen Primern (siehe Tab. 4.6). Untersucht wurden die Gene der Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1), sie ist in zelluläre Entgiftungsprozesse involviert, Methionin-Sulfoxid-Reduktase A (MSRA), die an der Reparatur oxidierten, physiologisch wichtiger Makromoleküle beteiligt ist, das Calnexin (CANX) und der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1), die beide an der Regulation der zellulären Stressantwort und Proteinreparatur beteiligt sind sowie das Organische Anionentransport-Polypeptid 2 (OATP2), das den Cholesterolefflux aus dem Gewebe in die Leber und seine Exkretion fördert.

In Schweinen (133. Lebenstag), welche temporär mit der SPI-Diät gefüttert wurden (78.-106. Lebenstag), war das hepatische Transkriptionsniveau dieser fünf Gene, im Vergleich zur CAS-Kontrollgruppe, auf 150 bis 250 % erhöht (siehe Abb. 5.2). Diese Unterschiede waren für *CANX*, *MSRA*, *HSF1* und *OATP2* signifikant ( $P < 0,05$ ), während *GSTA1* eine Schwellenwertsignifikanz ( $P < 0,1$ ) zeigte. Damit konnte ein persistenter Einfluss der SPI-Diät auf eine erhöhte Transkriptionsrate bei Genen der oxidativen Stressantwort festgestellt werden.

Im Vergleich zur CAS-Kontrolle wiesen die Zeitweise SPI-gefütterte Tiere eine höhere individuelle Variabilität auf (siehe Abb. 5.2). Das hepatische Transkriptionsniveau der untersuchten Gene variierte zwischen dem 78. und 106. Lebenstag der SPI- und anschließend CAS-gefütterten Schweine, zwischen Werten, die mit denen der ausschließlich CAS-gefütterten Tiere vergleichbar waren und Werten, die um das 6-fache über den geringsten Transkriptionsraten der CAS-Gruppe lagen. Auf der Grundlage der hohen individuellen Variabilität wurde im folgenden Abschnitt der korrelative Zusammenhang zwischen der Körpermasseentwicklung und der hepatischen Transkriptionsniveaus der untersuchten Expressionsmarkergene ermittelt, wodurch der Einfluss des zellulären bzw. oxidativen Stresses auf die Körpermasseentwicklung untersucht wurde.

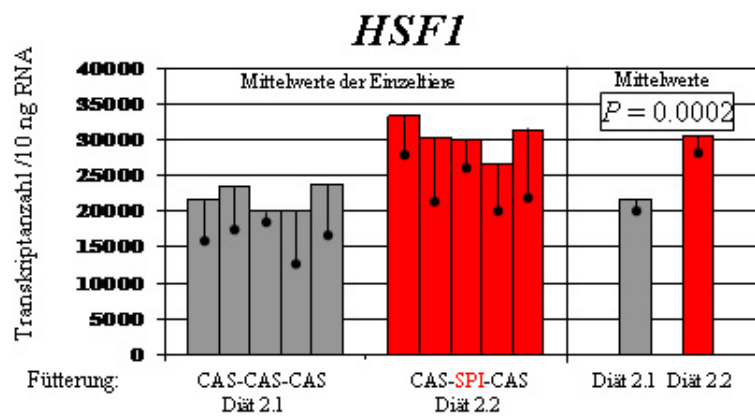
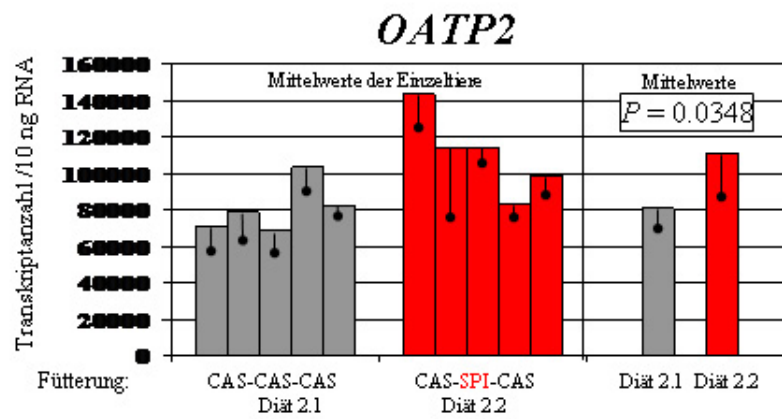
### 5.3 Korrelation der Körpermasse mit dem hepatischen Transkriptionsniveau von Genen der oxidativen Stressantwort

In der Tabelle 5.1 sind die signifikanten Korrelationskoeffizienten ( $P < 0,05$ ) zwischen den hepatischen Transkriptionsniveaus von *GSTA1*, *MSRA*, *HSF1*, *CANX* und *OATP2* und der Körpermasse der in den Fütterungsversuch einbezogenen Schweine am 133. Lebenstag dargestellt (Abb. 4.2, Diät 2). Die Korrelation zwi-



**Abb. 5.2: Hepatische Transkriptionsniveaus von Genen der oxidativen Stressantwort nach vierwöchiger Fütterung der SPI-Diät mit anschließender Rückumstellung auf die CAS-Diät (Diät 2.1) im Vergleich zur CAS-Kontrollgruppe (Diät 2.2)**

Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzeltiere (linker Teil) sind aus drei Echtzeit-PCR-Messungen eines Tieres gebildet. Die Gesamtmittelwerte und deren Standardabweichung (rechter Teil) setzen sich aus den Mittelwerten der Einzeltiere der jeweiligen Fütterungsgruppe zusammen.



schen den beiden Parametern ist umgekehrt proportional, was durch den negativen Korrelationskoeffizienten angezeigt wird. Damit wird deutlich, dass eine langanhaltende verminderte Körpermasseentwicklung temporär SPI-gefütterter Schweine (78.-106. Lebenstag) mit einer persistent gesteigerten Antwort auf den oxidativen Stress, repräsentiert durch die persistent erhöhten Transkriptionsniveaus von Genen der oxidativen Stressantwort, in Zusammenhang steht.

**Tab. 5.1: Korrelationskoeffizienten aus dem hepatischen Transkriptionsniveau der untersuchten Gene (Transkriptzahl/10ng) und der Körpermasse der Schweine (kg)**

Gene der oxidativen Stressantwort	<i>GSTA1</i>	<i>MSRA</i>	<i>HSF1</i>	<i>CANX</i>	<i>OATP2</i>
<b>Korrelationskoeffizient (r)</b>	-0,54*	-0,70*	-0,49*	-0,82*	-0,63*
* signifikant mit $P < 0,05$					

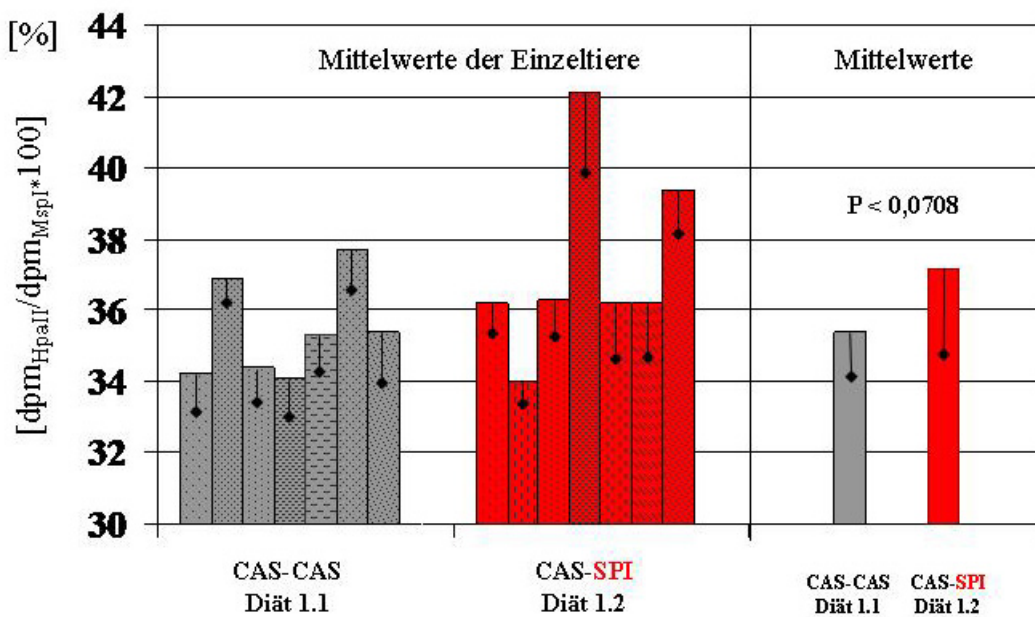
#### 5.4 DNA-Methylierung - möglicher Mechanismus der veränderten Genexpression

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine langanhaltende diätbedingte oxidative Stressreaktion signifikant mit der beobachteten persistenten Wachstumsminde- rung heranwachsender Schweine korreliert ist. Als mögliche molekulare Ursache der langanhaltenden diätassoziierten Veränderungen der Expression der in den oxidativen Stress involvierten Gene, wurde deshalb die DNA-Methylierung untersucht, die als ein Mechanismus der Genregulation bekannt ist.

##### 5.4.1 Methylierungsgrad der hepatischen genomischen DNA in Abhängigkeit von der Diät

Die Untersuchung des Diät-beeinflussten Methylierungsgrades des gesamten hepatischen Genoms erfolgte mit der *Single Nucleotide Extension*-Methode (siehe Abschnitt 4.7). In der Abbildung 5.3 ist das Verhältnis der unmethylierten CpG-Stellen zu den gesamten CpG-Stellen der hepatischen genomischen DNA in Prozent dargestellt. Hierfür wurde die DNA-gebundene Radioaktivität (dpm) der genomischen DNA, nach der Restriktion mit *HpaII* (methylierungsabhängig) und *MspI* (methylierungsunabhängig) und anschließendem Auffüllen der überstehenden Enden mit  $[3H]dCTP$ , gemessen. Auf Grund der methodischen Bedingungen

(siehe Abschnitt 4.7) ist der berechnete Faktor umgekehrt proportional zum Grad des DNA-Methylierungsstatus und zeigt den Grad der Demethylierung an. Der Mittelwertvergleich des Verhältnisses des gemessenen  $[3H]dCTP$ -Einbaus nach *HpaII*- und *MspI*-Restriktionsspaltung gibt einen Hinweis darauf, dass es infolge der SPI-Diät zu einer Demethylierung der hepatischen Gesamt-DNA kommt ( $P < 0,0708$ ).



**Abb. 5.3: Verhältnis des Einbaus von  $[3H]dCTP$  in genomische DNA der Leber nach Restriktionsspaltung mit *HpaII* und *MspI***

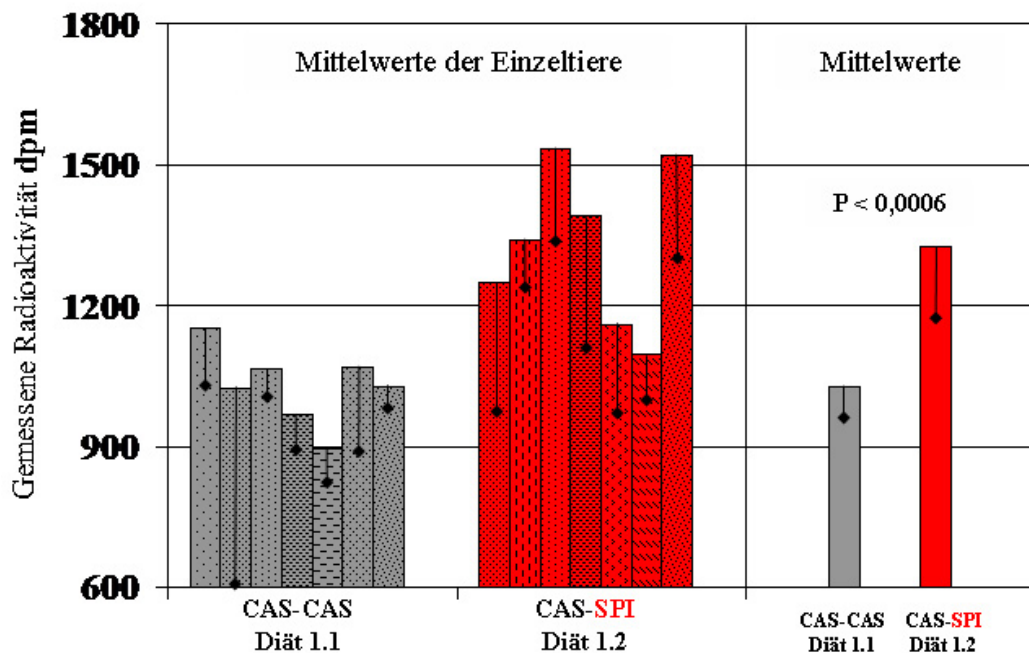
Der errechnete Faktor [%] zeigt den Grad der Demethylierung der hepatischen genomischen DNA an. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzeltiere (linker Teil) sind aus der Messung von 3 *Single Nucleotide Extension*-Ansätzen eines Tieres gebildet. Die Gesamt-Mittelwerte und deren Standardabweichung (rechter Teil) setzen sich aus den Mittelwerten der Einzeltiere der jeweiligen Fütterungsgruppe zusammen.

**Methylierung der Gesamt-DNA im Bereich der CpG-Inseln** CpG-Inseln sind aufeinanderfolgende CpG-Methylierungsstellen (z.B. 5' -CGCGCGCGCG- 3'), die hauptsächlich in den Promotoren von Genen lokalisiert sind und genregulatorische Funktion besitzen. Das Restriktionsenzym *BssHII* ist methylierungsabhängig. Sein Erkennungsmotiv für die DNA-Restriktion ist 5' -GCGCGC- 3', die der Teilsequenz von CpG-Inseln entspricht. Der Einsatz dieses Enzyms in die *Single Nucleotide Extension*-Methode ermöglichte eine spezifischere Messung von

regulatorisch relevanten Methylierungsstellen der hepatischen DNA (siehe CpG-Inseln, Abschnitt 2.2.1.1).

Das Ergebnis der Untersuchung ist in der Abbildung 5.4 dargestellt. Die Höhe des gemessenen  $[3H]dCTP$ -Einbaus nach BssHII-Spaltung ist umgekehrt proportional zum Methylierungsgrad der CpG-Inseln, so dass auch hier der Status der Demethylierung dargestellt ist. Der Vergleich der Mittelwerte zeigt eine signifikante hepatische Demethylierung von CpG-Inseln in der SPI-Gruppe ( $P < 0,0006$ ).

In beiden *Single Nucleotide Extension*-Experimenten wurde eine Abnahme der Methylierung von hepatischer Gesamt-DNA infolge der SPI-Diät festgestellt.



**Abb. 5.4: Einbau von  $[3H]dCTP$  in hepatische genomische DNA nach BssHII-Restriktionsspaltung**

Die gemessene Radioaktivität [dpm] zeigt den Grad der Demethylierung der hepatischen genomischen DNA in CpG-Inseln an. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzeltiere (linker Teil) sind aus der Messung von 3 *Single Nucleotide Extension*-Ansätzen eines Tieres gebildet. Die Gesamtmittelwerte und deren Standardabweichung (rechter Teil) setzen sich aus den Mittelwerten der Einzeltiere der jeweiligen Fütterungsgruppe zusammen.

#### 5.4.2 Die Diät-abhängige Promotormethylierung von *GSTA1* einem Gen der oxidativen Stressantwort

Auf Grund der langanhaltenden Erhöhung der *GSTA1*-Transkriptionsraten bei den temporär SPI-gefütterten Tieren (siehe Abb. 4.2 Diät 2) und seiner Schlüsselrolle in der oxidativen Stressantwort als Expressionsmarker [96] wurde *GSTA1* als Modellgen für die Untersuchung der DNA-Methylierung als möglichen Mechanismus für persistente Stoffwechseleffekte ausgewählt. *GSTA1* wird durch oxidativen Stress stark induziert, weshalb *GSTA1* ein Indikator für auftretenden oxidativen Stress ist [96].

Untersucht wurde der Promotorbereich der *GSTA1*, weil sich die Methylierungen in diesem Bereich regulatorisch auf die Genexpression auswirken können (siehe Abschnitt 2.2.1). Es wurden DNA-Proben von Tieren verwendet die 4 Wochen (78.-106. Lebenstag) eine SPI-Diät erhalten haben (siehe Abb. 4.2 Diät 1) und im Anschluss daran geschlachtet wurden.

##### 5.4.2.1 Identifizierung und Charakterisierung der 5'- *GSTA1*-Promotorregion

Die 5'-Promotorsequenz des porcinen *GSTA1*-Gens war zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht bekannt. Deshalb wurde die in diesem Abschnitt näher beschriebene Strategie zur Sequenzierung dieses DNA-Bereiches verfolgt.

**Isolierung der PAC-Klone die das Gen der *GSTA1* enthalten** Die Isolierung der PAC-Klone aus einer porcinen PAC-Bibliothek der *Deutschen Landrasse* [286] erfolgte vom Tierärztlichen Institut der Georg-August-Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von B. Brenig. Für das PCR-Screening wurden die Primer *s-I-048F* und *s-I-048R* verwendet (siehe Tabelle 4.5, Nr. 1, 2). Es wurden 2 PAC-Klone identifiziert, die das Gen der *GSTA1* enthalten (PP68G10, PP98A11).

**Sequenzierung des 5'- regulatorischen Bereiches** Als Grundlage für die Ableitung der ersten Sequenzierprimer für die Sequenzierung des regulatorischen Bereiches von *GSTA1* diente eine cDNA der *GSTA1* aus der Datenbank *EMBL* mit der ACC-Nr. Z69585. Die Sequenzierungsreaktion für die Direktsequenzierung der PAC-Klone wurde wie unter Abschnitt 4.4 beschrieben durchgeführt. Sequenzüberlagerungen verhinderten das eindeutige Lesen der Sequenz, weshalb eine Direktsequenzierung der *GSTA1*-PAC-Klone nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. *Bam*HI-Restriktionsfragmente (0,5-6,5 kb) des PAC-Klons PP98A11 wurden in einen Plasmidvektor subkloniert. Durch das *Screening* mit

dem *LICOR*, unter Verwendung des Sequenzierprimers *GST-Seq-1-rev* (siehe Tab. 4.7), konnten 4 Klone identifiziert werden, die den regulatorischen Bereich des *GSTA1*-Gens beinhalten. Die Erweiterung der Sequenz erfolgte 1853 bp in 5'-Richtung, vom 5'-Bereich der porcinen *GSTA1*-cDNA aus, mit den Primern 5-7 aus der Tabelle 4.7.

**Darstellung des Transkriptionsstartpunktes** Die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes der *GSTA1* erfolgte wie unter Abschnitt 4.6 beschrieben. Mit dem *GeneRacer*<sup>TM</sup> 5'-Primer als *forward* Primer und dem genspezifischen Primer *5'P-Race-1-rev* als *reverse* Primer (siehe Tab. 4.10) wurde ein ca. 300 bp langes PCR-Produkt generiert, welches in den *pGEM® T-Easy*-Vektor kloniert wurde (siehe Abschnitt 4.3.2). Mit dem vektorspezifischen Primer T7 (siehe Tab. 4.10) erfolgte die Sequenzierung eines positiven Klon.

Durch den DNA-Sequenzvergleich zwischen dem *Race*-Produkt und dem *GeneRacer*<sup>TM</sup>-RNA-Oligo wurde der Startpunkt des Promotors ermittelt. Das 3'-Ende des *GeneRacer*<sup>TM</sup>-RNA-Oligos zeigt den Beginn des Transkriptionsstartpunktes (+1) und den Beginn des regulatorischen Bereiches (-1) an. In der Abbildung 5.5 ist der durch Sequenzvergleich zwischen dem *Race*-Produkt und der isolierten *GSTA1*-Sequenz ermittelte Transkriptionsstartpunkt und Promotorbeginn dargestellt. Die isolierte *GSTA1*-Sequenz zeigt im 3'-Bereich eine 34 bp lange vollständige Übereinstimmung mit der bekannten *GSTA1*-cDNA (ACC-Nr. Z69585) (siehe Abb. 5.5).

Insgesamt wurden 1.812 bp des *GSTA1*-Promotors isoliert. Im regulatorischen Bereich [-22 bis -16] liegt eine TATA-Box, charakteristisch für eukaryotische Promotoren. In der Abbildung 5.6 ist die isolierte Promotorsequenz [-1812 bis -1] mit den 21 CpG-Methylierungsstellen dargestellt. CpG-Inseln sind nicht vorhanden.

#### 5.4.2.2 Mittlere Methylierungsraten der CpG-Methylierungsstellen 1-21 im *GSTA1*-Promotorbereich in Abhängigkeit von der Diät

Für die Untersuchung, ob die SPI-induzierte erhöhte Transkriptionsrate der *GSTA1* mit einer veränderten Methylierung von CpG-Stellen im sequenzierten Promotorbereich [-1812 bis -1] einhergeht, wurden von jedem Tier die Methylierungsraten aller in diesem Bereich nachgewiesenen 21 CpG-Stellen (siehe Abb. 5.6) gemessen. Dafür wurde die isolierte hepatische genomische DNA der Tiere mit Bisulfit behandelt (siehe Abschnitt 4.8.1), die entsprechende CpG-Stelle mit Hilfe flankierender Primer PCR amplifiziert und anschließend die Methylierungsraten mit dem *Pyrosequenziersystem*<sup>TM</sup> ermittelt. Die Methylierungsrate gibt aus dem Gemisch von DNA-Molekülen, die aus den Zellen eines Gewebes isoliert





5'-	GT	-1810 ACCTTTGAGA	-1800 GAGGAAGGTA	-1790 CTCAAGCTTT	-1780 GATGGGTGAG	-1770 GGATGAGG	-1760 GGCTAGCATG
-1750 TGCTTCCCAG	-1740 CTCCTGGGCT	-1730 GTGGGGCAGG	-1720 GAGCTTCCTG	-1710 GAGGGCTGT	-1700 ACGGCTTAC	-1690 ACACCTGGGG	
-1680 GGCTTCCAAC	-1670 AACAGGATGA	-1660 ATTCTCTCAC	-1650 TCTTCTGGGG	-1640 CCTGAAGTCC	-1630 AAAGTCAAGG	-1620 TCCTGCATAT	
-1610 CCTCAGGAGG	-1600 CTCTTTGGGG	-1590 AGTTGGGGGG	-1580 AGAGGGTCTCT	-1570 TTATGCCTCT	-1560 TCCAGCTTCT	-1550 GGCAGCTCTA	
-1540 GACATCCTTC	-1530 CTCTCCTTGG	-1520 CTGGGGCTG	-1510 CCTCACTTTA	-1500 ATCTCTACCT	-1490 CTTTCTTCAG	-1480 ATCACCTCAA	
-1470 GCTGTGCTG	-1460 CTGTGATTTT	-1450 CTCTACTGTT	-1440 CATATAAGC	-1430 TCAACTGTCA	-1420 TTGGACTTAT	-1410 GGCCCATTT	
-1400 CATAAACCCAG	-1390 GATGCTCTCA	-1380 CCTCAAGTTC	-1370 TTTAACTACC	-1360 ACCTGCAAAA	-1350 ACCCCTTTTAC	-1340 TAAATGTGGG	
-1330 CACATCAAAT	-1320 TCTAGGTATT	-1310 TCAACATGGA	-1300 CCAACCTTTT	-1290 TAGAGGTCAC	-1280 CATTCTACCC	-1270 ACAACAGATG	
-1260 AGAGATGAAA	-1250 AAAAATTGTT	-1240 CCTAATTGCT	-1230 GAAGAAGGGG	-1220 TATGAGCACA	-1210 TGGAGGGTTC	-1200 TATACCCAGC	
-1190 TGTGTACTTT	-1180 GCACCTGTCA	-1170 GAAATTCTCC	-1160 CCTTAATAAC	-1150 TTTAAAAAAG	-1140 CTCTGTTATG	-1130 TACTGAGCTG	
-1120 CTAGTATTTG	-1110 CCAGACCATG	-1100 GGGACTGAC	-1090 TGAAATCAAG	-1080 ATCAAGGCC	-1070 AGCTACCAGG	-1060 AGCTCACCGT	
-1050 CTATGGGAGA	-1040 AATGATATAG	-1030 ACTTGATTAT	-1020 TTAATTAATT	-1010 TAATTAATAA	-1000 AAAATGTGTA	-990 ACATCAAAAT	
-980 AAATGTAGGA	-970 AAAAAAAAAA	-960 CACAGTATGG	-950 GGAGGAGTTC	-940 CTGTTGTGGC	-930 TCAGTGGCTA	-920 ACCAATCCGA	
-910 CTAGGAACCA	-900 TGAGGCTGGG	-890 GTTCAATCCC	-880 TGGCCTTGCT	-870 CAGTGGGCTA	-860 AGGACCTGGC	-850 AGTGCCTGA	
-840 GCTGTGGTGT	-830 ATGTGACAGA	-820 TGAGTCTCAG	-810 ATGTGGTGTT	-800 GCAGTGGCTG	-790 TGGTGTAGGC	-780 CTGGGCTAC	
-770 AGATCCAATT	-760 AGACCCCTAG	-750 CCTGGGAAC	-740 CCCATATG	-730 CAGGTGCAGC	-720 CCTAAAAAAG	-710 GGCAAAACAA	
-700 AACAGTATAG	-690 GGGAAACACA	-680 GTAGTAGCTC	-670 ACAGTGGAGT	-660 ATTTCAAACA	-650 GAACAAAGAG	-640 TGAGCAAAAG	
-630 GCCCTGAGGG	-620 TAGGAAGGCT	-610 GCTCAGAGTG	-600 TGGCAGAGAG	-590 GAAAGAACAT	-580 AAAAAATTGC	-570 TTTTCCAGAC	
-560 CTAGCAGAAA	-550 GATACAGGTA	-540 CACACTGAAG	-530 GTGAATTCT	-520 GATAACACAC	-510 TACTTTTTTC	-500 ATAGAAGTAT	
-490 GTTTCATACA	-480 ATGTTTAGGA	-470 CATCTTATA	-460 ATAAGAAAAA	-450 ATGATTATT	-440 ATGTGTCTGA	-430 TATTCCTCT	
-420 TACTGGATGT	-410 CCTATATTTT	-400 AACTGCAACC	-390 CAATGAAAGA	-380 GAATTCCAGA	-370 GATGCTCTGC	-360 CCTTTAATGG	
-350 CACCAGCTCC	-340 CTCTACCCCA	-330 CTGTAGAGGT	-320 TTTTCATTCC	-310 CTTTGTCTCT	-300 ACATCCAGTT	-290 CATGAAAACC	
-280 TTCGCTAAG	-270 TTTTTTTTT	-260 AAATGCCCT	-250 TTTTCATG	-240 CTGGCAGAGA	-230 GTGTCCAATC	-220 AACCTGAAAT	
-210 TTTGTGTCTA	-200 ATCTTTAATT	-190 GCCAACCTTG	-180 AAAAAACATA	-170 TGAGCTAGAT	-160 ATACCCTCAT	-150 GAGAGAATGA	
-140 CTTATCATTT	-130 TTTATCTTAA	-120 TCTAGCACAG	-110 AACCCTTGGC	-100 CCTGGACACT	-90 GTGGGAGTGG	-80 CTTTAACCTG	
-70 AGAGGCTCTC	-60 CCCTCAGAGA	-50 GGAGGAGTTA	-40 TCAACTGCA	-30 ACAACAGCTT	-20 ATAAACCCAT	-10 GTGAACCTGC	-3'

Abb. 5.6: CpG-Orte im *GSTA1*-5'-Promotorbereich [-1812 bis -1]

Die potentiellen Methylierungsstellen (Nukleotidfolge CG), die hinsichtlich ihres Methylierungsstatus in Abhängigkeit von der Diät (CAS und SPI) untersucht wurden, sind rot dargestellt. Zur Orientierung sind die CpGs von 5' in 3'-Richtung durchnummeriert. Es sind keine CpG-Inseln vorhanden.

und regionspezifisch aufamplifiziert wurden, das Verhältnis von methylierten zu nichtmethylierten CpG-Stellen in [%] an (siehe Methylierungsrate, S.66). In der Abbildung 5.7 sind die mittleren Methylierungsraten der CpG-Stellen der [-1812 bis -1]-*GSTA1*-Promotorregion der CAS-Gruppe (Diät 1.1) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2) vergleichend dargestellt.

Im Vergleich der CpG-Stellen untereinander gibt es deutliche Unterschiede in der Methylierung. Die Methylierungsraten je CpG variieren von durchschnittlich 6 % in CpG 15 bis zu durchschnittlich 84 % in CpG 12. Die Methylierung der CpGs 3, 13 und 15-21 liegen unter einem Methylierungsmittelwert von 50 %. Die anderen CpGs liegen bei einer Methylierungsrate von über 50 %. Möglicherweise ist dies mit einer unterschiedlichen regulatorischen Bedeutung der CpG-Orte verbunden. In der Abbildung 5.8 sind die prozentualen Standardabweichungen [S %] der durchschnittlichen Methylierungsraten der CpG-Stellen 1-21 zwischen der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe dargestellt. Beim Vergleich der CpGs ist eine starke Variabilität in den prozentualen Standardabweichungen der Methylierungsraten zwischen den einzelnen CpG-Stellen erkennbar. Die Standardabweichungen der Positionen 2, 13, 15-17 und 20-21 liegen über einer 10 %igen Abweichung vom Mittelwert. Eine besonders starke Abweichung liegt bei der Position 13 und bei der Position 15 vor. Hohe [S %]-Werte weisen auf hohe individuelle Unterschiede bei den Methylierungsraten der entsprechenden CpG-Orte und auf eine mögliche funktionelle Bedeutung hin. Die Annahme einer möglichen funktionellen Bedeutung der Methylierungsstellen mit hohen [S %]-Werten wird dadurch unterstützt, dass die Häufigkeit der Methylierungsstellen mit einem [S %] > 10 % unter den CpG-Orten mit einer mittleren Methylierungsrate < 50 % signifikant erhöht ist (Demethylierung entspricht Aktivierung). Sechs von neun CpG-Orten (CpG 13-17 und 20-21), mit mittleren Methylierungsraten < 50 %, weisen Standardfehler der Methylierungsraten von > 10 % auf. Sie befinden sich im Promotorbereich von [-780 bis -21], ein Indiz für die Beteiligung dieser Region an der *GSTA1*-Expressionsregulation.

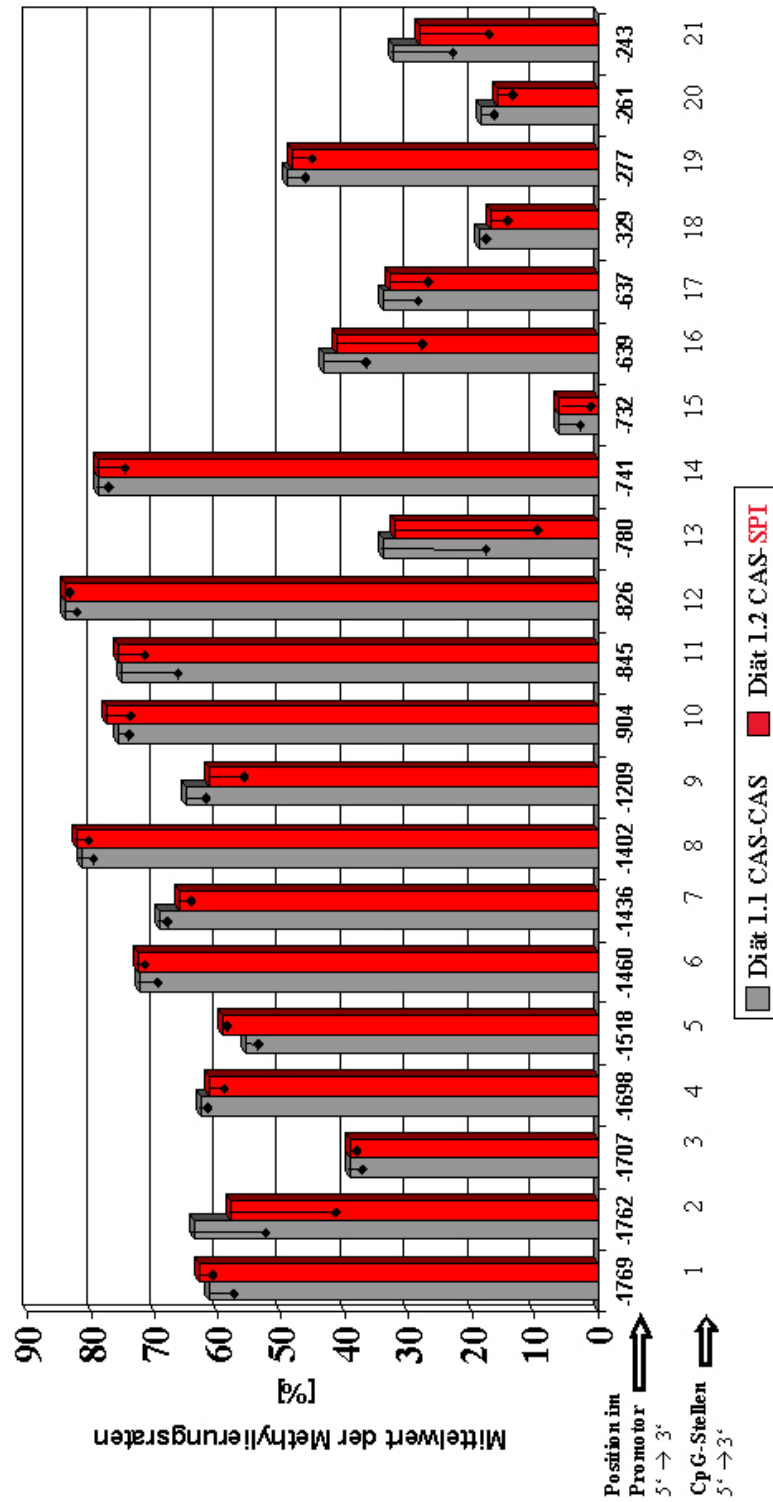


Abb. 5.7: Vergleich der mittleren Methylierungsrate der CpG-Stellen 1-21 des porcinen *GSTA1*-Gens zwischen der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe

Die mittlere Methylierungsrate jeder CpG-Stelle setzt sich aus den Methylierungsrate der Einzelreihe der entsprechenden Fütterungsgruppe zusammen. Die mittleren CpG-Methylierungsrate der CAS-Gruppe (Diät 1.1) sind grau dargestellt, die der SPI-Gruppe (Diät 1.2) rot. Die Methylierungsrate gibt das Verhältnis von methylierten zu nichtmethylierten CpG-Stellen der amplifizierten DNA-Moleküle an (siehe Abschnitt 4.8.2, S.66).

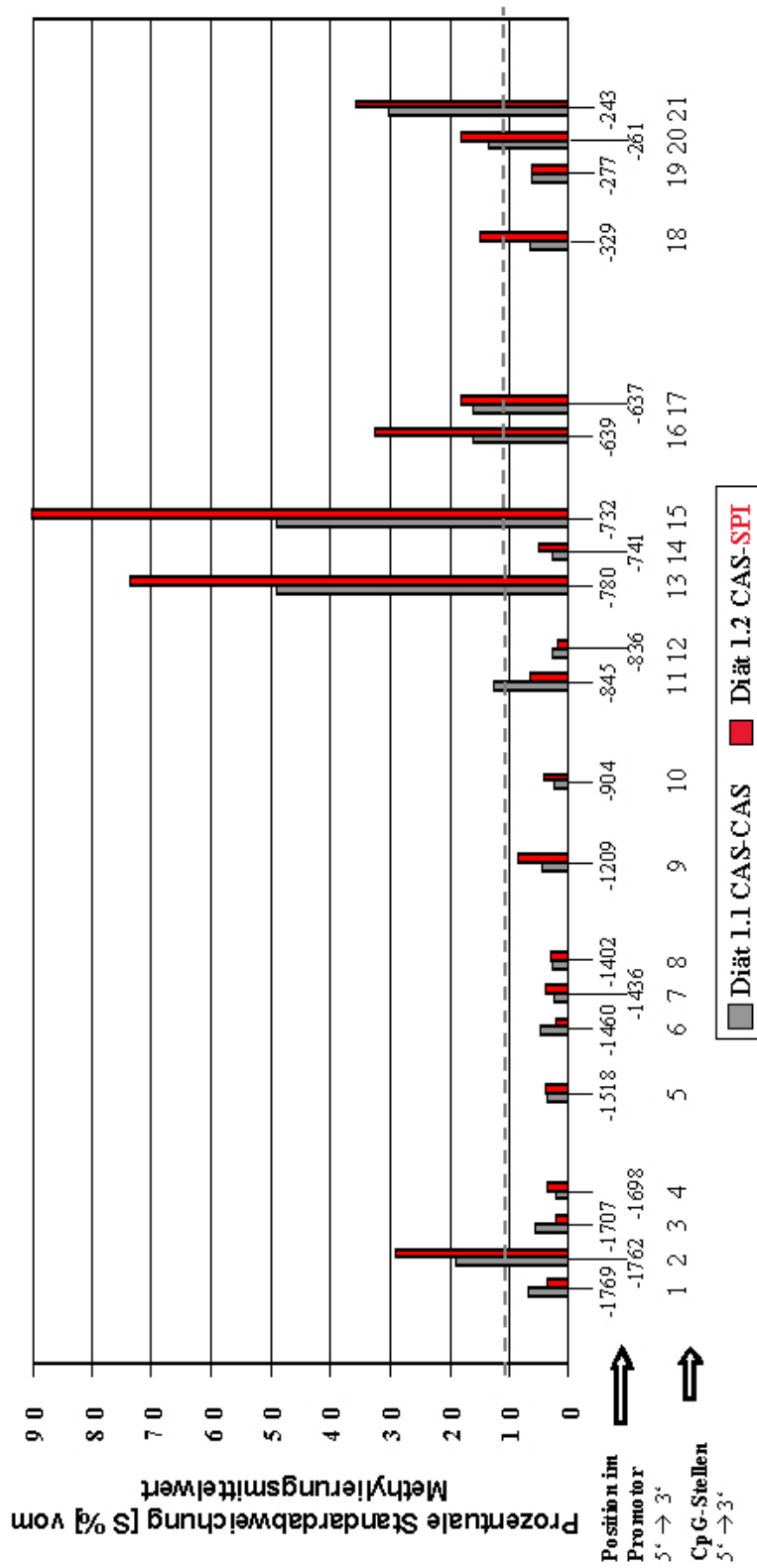


Abb. 5.8: Vergleich der prozentualen Standardabweichungen [S %] der CpG-Stellen 1-21 des porcinen *GSTA1*-Gens von den mittleren Methylierungsdaten der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe

Die prozentualen Standardabweichungen der Methylierungsdaten [S %] zwischen der CAS-Gruppe (Diät 1.1, grau) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2, rot) der jeweiligen CpG-Stelle zeigen die Abweichung vom jeweiligen CpG-Methylierungsmittelwert aus Abb. 5.7. Die Verteilung der CpG-Orte entspricht in etwa ihrer tatsächlichen Verteilung im *GSTA1*-Promotor.

Unter Verwendung des konservativen statistischen Verfahrens der *Fals Discovery Rate* (FDR)-Korrektur konnten keine signifikanten Unterschiede in den mittleren Methylierungsraten der einzelnen CpG-Orte zwischen beiden Fütterungsgruppen nachgewiesen werden ( $q \geq 0,15$ ). Obwohl es keine statistisch zu sichernden Unterschiede in den Methylierungsraten einzelner CpG-Stellen zwischen beiden Fütterungsgruppen gibt, wird eine tendenziell verringerte Methylierung in der SPI-Gruppe deutlich. Vierzehn der 21 CpGs (2-4, 7, 9, 12, 13, 15-21) zeigen in der SPI-Gruppe eine geringere Methylierungsrate, im Vergleich zu der CAS-Gruppe (siehe Abb. 5.7).

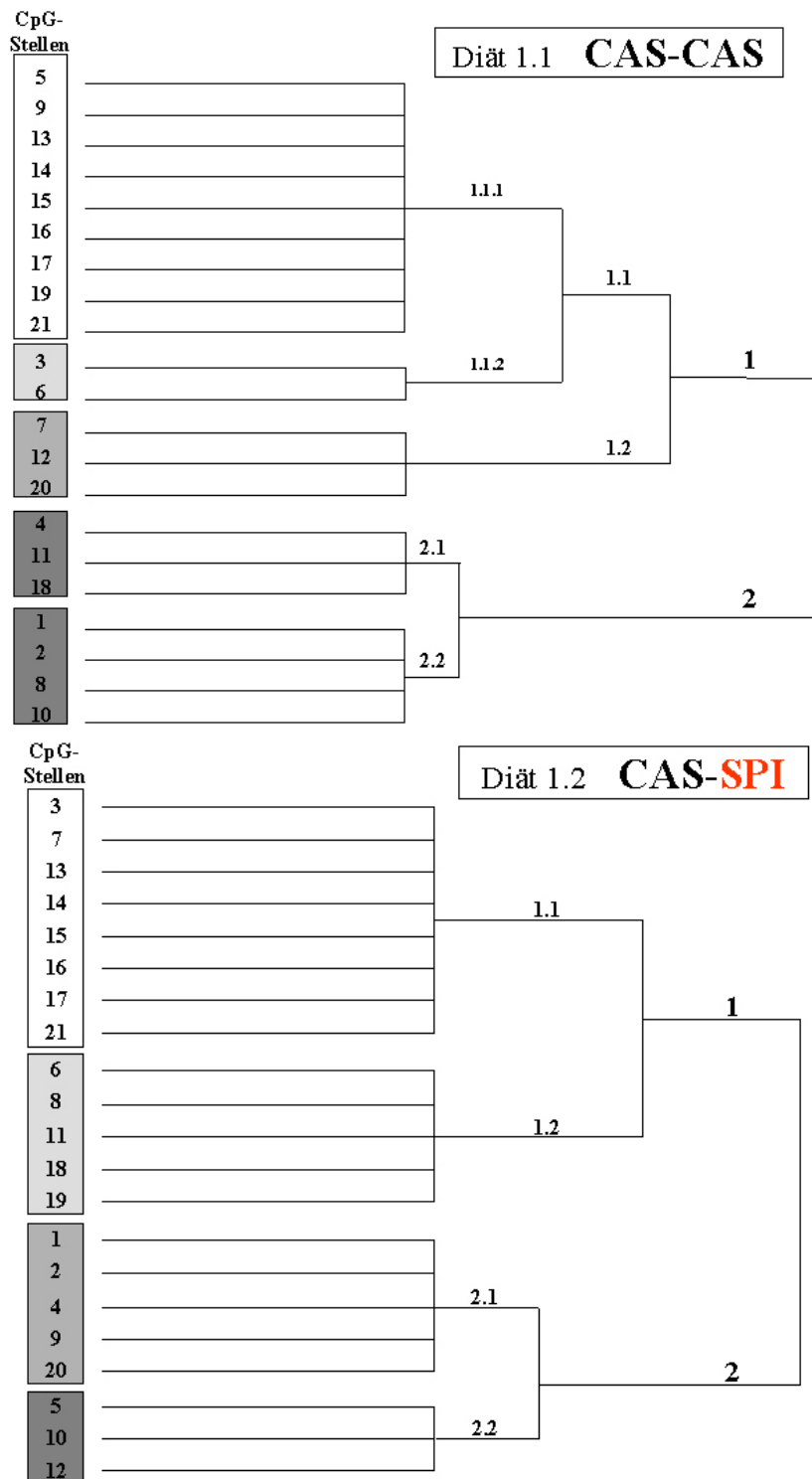
Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die prozentualen Standardabweichungen in der SPI-Gruppe zum Teil deutlich über denen der CAS-Gruppe stehen (siehe Abb. 5.8). Beispielsweise betragen an der CpG-Stelle 2 die prozentualen Standardabweichungen in der SPI-Gruppe 153 % vom Wert der CAS-Gruppe. An der CpG-Stelle 13 beträgt [S %] in der SPI-Gruppe 150 % des Wertes der CAS-Gruppe und bei CpG 15 sind es 183 %. Besonders groß ist der Unterschied bei CpG 16, hier beträgt der Wert der SPI-Gruppe 204 % des Wertes der CAS-Gruppe.

Die erhöhten [S %] von einzelnen CpG-Stellen in der SPI-Gruppe zeigen eine erhöhte Variabilität der Methylierungsraten im Vergleich zur CAS-Gruppe, was auf eine individuelle Wirkung der SPI-Diät aber auch auf eine Coregulation einiger CpG-Stellen hindeutet.

#### 5.4.2.3 Diätabhängige hierarchische Clusteranalyse der CpG-Stellen im *GSTA1*-Promotor hinsichtlich des Methylierungsverhaltens

Die diätabhängige Coregulation der CpG-Stellen in Hinsicht auf ihr Methylierungsverhalten wurde mittels hierarchischer Clusteranalyse untersucht. Die hierarchische Clusteranalyse erlaubt die Darstellung von CpG-Orten mit eng korreliertem Methylierungsverhalten durch die Zuordnung von gleichen und benachbarten Clustern. Für die Darstellung diätabhängiger Unterschiede im Methylierungsmuster wurde die Clusteranalyse der Methylierungsraten der CpG-Stellen der CAS-Gruppe (Diät 1.1) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2) getrennt analysiert. Die Ergebnisse sind in einem *Baum*-Diagramm dargestellt (siehe Abb. 5.9). Je enger die räumliche Zuordnung der CpG-Orte, desto größer ist die Korrelation hinsichtlich des Methylierungsverhaltens. Die Methylierungen der CpGs eines *Clusters* (Gruppe) verhalten sich ähnlich und sind coreguliert.

Sowohl in der CAS-Gruppe als auch in der SPI-Gruppe wird deutlich, dass die CpG-Orte auf Grund ihres Methylierungsverhaltens einzelnen Clustern zugeordnet werden können und offensichtlich coreguliert sind. Anhand des Diagramms wird gezeigt, dass es infolge der SPI-Diät im Vergleich zur CAS-Diät zu einigen Veränderungen in der Anordnung der CpG-Stellen kommt. Zum Beispiel korre-



**Abb. 5.9: Clusteranalyse der CpG-Stellen hinsichtlich des Methylierungsverhaltens in der CAS-Gruppe (Diät 1.1) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2)**

Je enger die räumliche Nähe der CpGs zueinander, desto ähnlicher ist ihr Methylierungsverhalten. Die Einteilung in Gruppen (*Cluster*), die aus einem Zweig entspringen, zeigt deren Ähnlichkeiten im Methylierungsverhalten, sie sind coreguliert. Infolge der SPI-Diät kommt es zu Veränderungen von CpGs in der *Cluster*-Position, verursacht durch ein verändertes Methylierungsverhalten.

liert in der CAS-Gruppe das Methylierungsverhalten der CpGs 5, 9, 13-17, 19 und 21, die sich in einem *Cluster* befinden. In der SPI-Gruppe sind die CpGs 5, 9 und 19 in weiter entfernten Zweigen zu finden, verursacht durch ein verändertes Methylierungsverhalten. Es ist aber auch zu erkennen, dass sich das Methylierungsverhalten einiger CpGs, wie z.B. 13-17 und 21, infolge der SPI-Diät nicht verändert.

Die Veränderungen im Methylierungsverhalten der CpGs infolge der SPI-Diät weist auf deren diätabhängige Coregulation hin. Dadurch wird ein Einfluss der SPI-Diät auf die CpG-Methylierung deutlich.

#### 5.4.2.4 Korrelation der Methylierung einzelner CpG-Stellen des GSTA1-Promotors mit der GSTA1-Expression

Die hierarchische Clusteranalyse hat gezeigt, dass es diätspezifische Veränderungen in der Coregulationen zwischen den CpG-Stellen hinsichtlich ihres Methylierungsverhaltens gibt (siehe Abschnitt 5.4.2.3). Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse soll der Zusammenhang zwischen dem Methylierungsverhalten der CpG-Stellen und der GSTA1-Expression gemessen werden. Dabei wird untersucht, ob sich zwei Messreihen gleich entwickeln d.h., ob hohe Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen Datensatzes zusammenhängen (positive Korrelation), ob niedrige Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (negative Korrelation) oder ob zwischen den Werten der beiden Datensätze kein Zusammenhang besteht. Es wird ein Korrelationskoeffizient  $[r]$  ausgewiesen, der nach einem Bestimmtheitsmaß die Signifikanz einer Korrelation anzeigt. Das hier verwendete Bestimmtheitsmaß für 7 Tiere liegt bei  $r > 0,6$ . Damit ist die Korrelation einer CpG-Methylierungsstelle mit der Expression bei einem  $r > 0,6$  als signifikant anzunehmen. Bei einer signifikanten Korrelation kann statistisch davon ausgegangen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der CpG-Methylierungsrate und der GSTA1-Expression gibt.

In der Abbildung 5.10 sind die CpG-Stellen, die mit der hepatischen GSTA1-Expression korrelieren ( $r \geq 0,6$ ), dargestellt. Zu beachten ist, dass die Korrelationskoeffizienten, bis auf CpG 21, negativ sind. Das heißt, je geringer die Methylierungsrate, desto größer wird die Expressionsrate. Dies entspricht den Literaturangaben, die zeigen, dass eine Verringerung der Methylierung mit einer Expressionssteigerung einhergeht [34]. Setzt man die Ergebnisse der Korrelationsanalyse mit der der Clusteranalyse in Beziehung wird deutlich, dass die CpG-Stellen, die sich im Cluster 1.1 befinden, gehäuft mit der GSTA1-Expression korrelieren (siehe Abb. 5.10).

Weiterhin ist zu erkennen, dass es infolge der SPI-Diät zu Veränderungen in der Korrelation zwischen CpG-Methylierung und der GSTA1-Expression kommt, ein



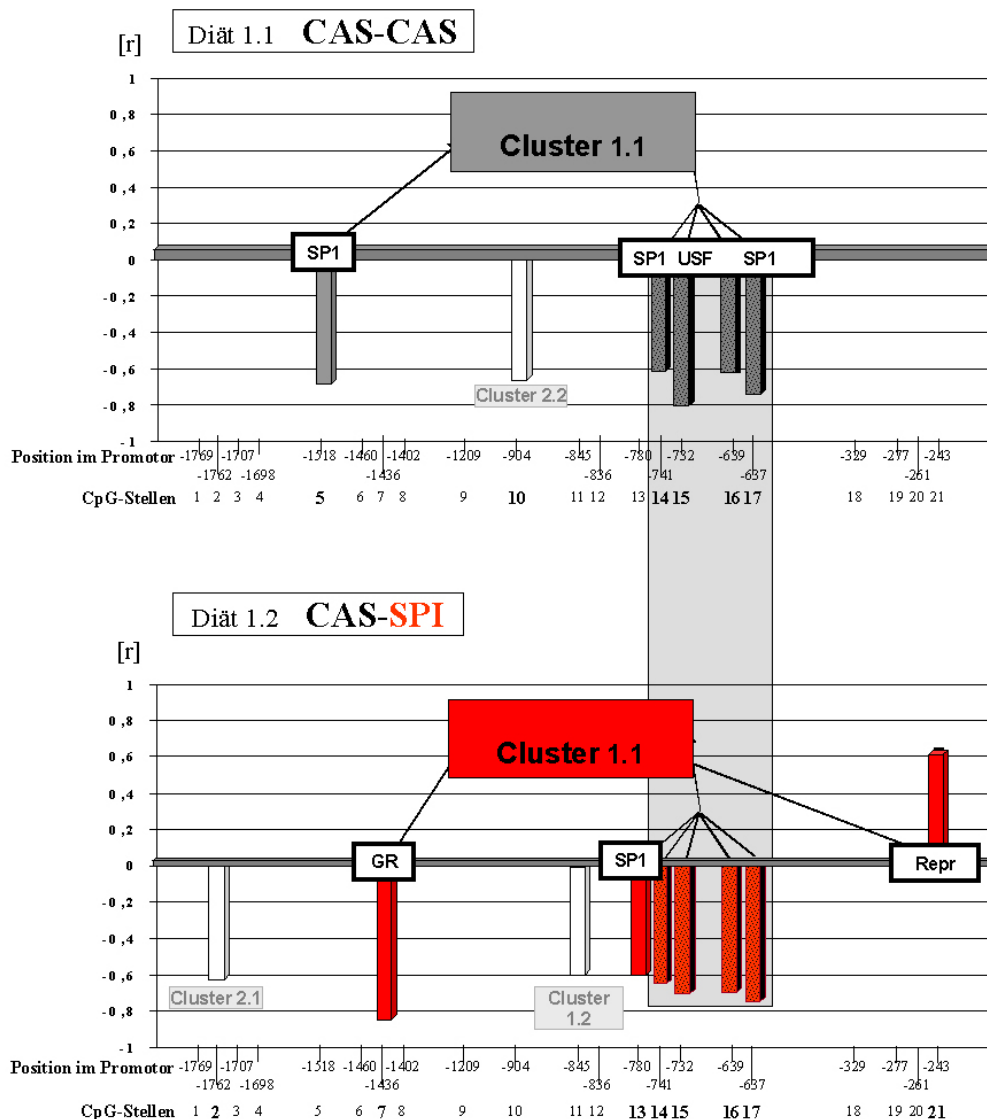


Abb. 5.10: CpG-Stellen die mit der GSTA1-Expression korrelieren

Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten  $[r]$  der CpG-Stellen ab  $r \geq 0,6$ . Die meisten CpGs, die mit der Expression korrelieren, befinden sich im Cluster 1.1. Dies gilt für beide Fütterungsgruppen. Die CpG-Stellen 14, 15, 16 und 17 sind in ihrem Methylierungsverhalten und der Korrelation zur Expression konserviert. Die *FDR* ergab, dass der Einfluss dieser CpGs nicht fütterungsabhängig ist. Daher ist anzunehmen, dass die CpGs 14-17 an der Grundexpression beteiligt sind. In der SPI-Gruppe korrelieren die CpGs 7, 13 und 21 mit der Expression. Vermutlich tragen sie zur Expressionssteigerung bei. Die mit den CpG-Stellen überlagernden potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind schwarz gerahmt (SP1, Specificity protein 1; USF, Upstream Response Element; GR, Glukokortikoidrezeptor; Repr, Repressor of CAR1-Faktor).

weiterer Hinweis auf die diätspezifische Regulation der GSTA1-Expression. Die CpG-Stellen 14-17 bleiben unverändert.

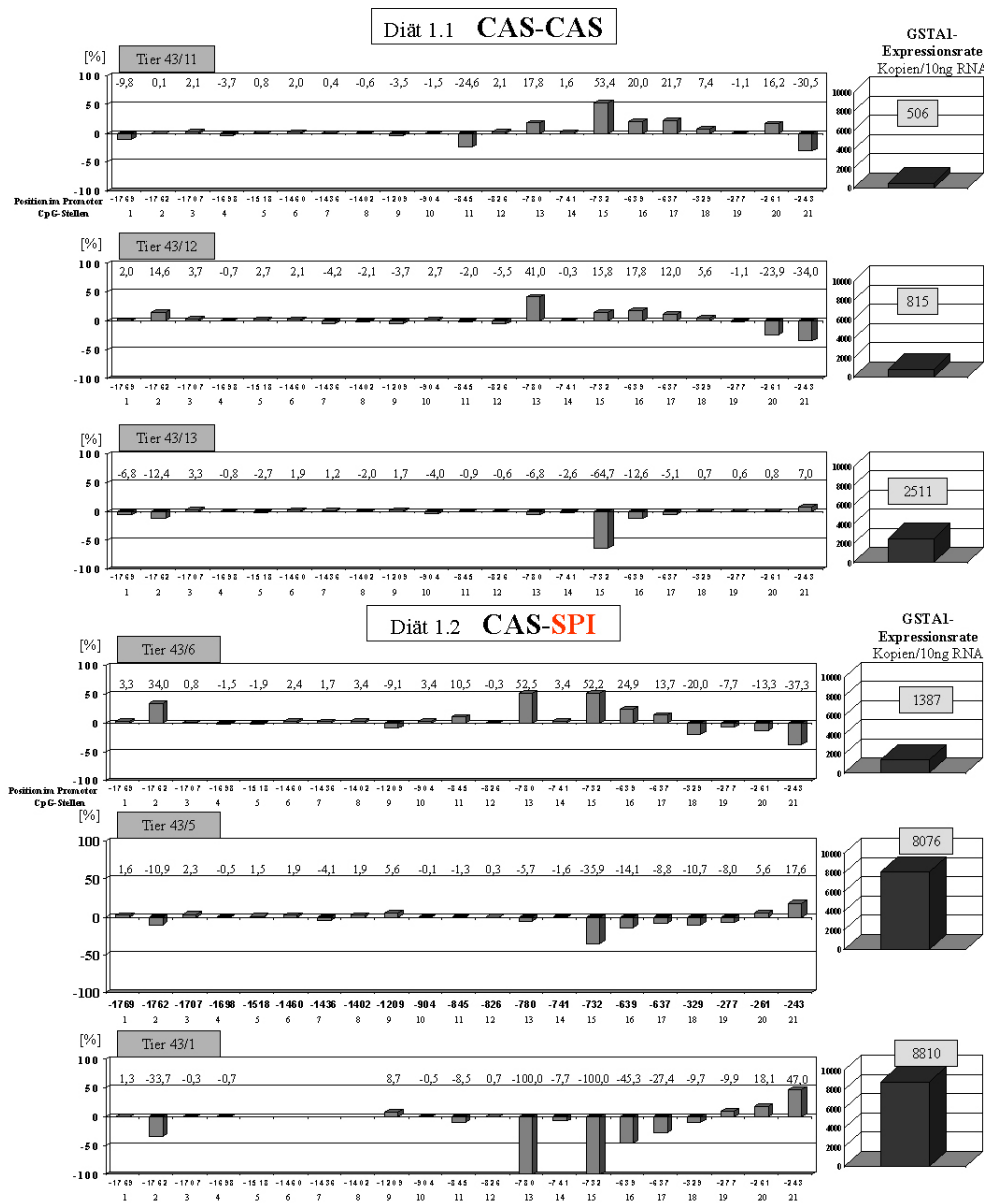
Die gefundenen Korrelationen zwischen CpG-Methylierung und GSTA1-Expression sind mit der Varianzanalyse mittels FDR überprüft worden. Es konnten die Korrelationen der CpGs 14, 15, 16 und 17 mit einer schwachen Signifikanz von  $q = 0,09$  bestätigt werden. Der Einfluss ist nicht fütterungsabhängig, vermutlich sind sie an der Grundexpression der GSTA1 beteiligt. Bei den restlichen CpG-Stellen konnten die Korrelationen nicht signifikant mit der FDR bestätigt werden. Die CpG-Methylierungsstellen des Clusters 1.1 überlagern mit potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 5.10), die für die Expressionsregulation von Bedeutung sein können.

#### *5.4.2.5 Korrelation des Methylierungsstatus des GSTA1-Promotors (summativ Methylierung aller CpG-Stellen) mit den GSTA1-Transkriptionsniveaus*

Auf Grund der beobachteten Korrelation zwischen den Methylierungsraten einzelner CpG-Orte mit der GSTA1-Expression (siehe Abschnitt 5.4.2.4) wurde in Ergänzung zur Korrelation des Methylierungsgrades einzelner CpG-Orte der summativ Einfluss der Methylierungsraten aller analysierten CpGs des porcinen GSTA1-Promotors auf die Expression der GSTA1 untersucht.

Dafür wurden in der Abbildung 5.11 die prozentualen Abweichungen vom Mittelwert der Methylierungsraten der CpG-Stellen einzelner Tiere der CAS-Gruppe (Diät 1.1) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2), im Vergleich zum jeweiligen Expressionsniveau der hepatischen GSTA1, dargestellt.

Vergleicht man die Häufigkeit von positiven und negativen Abweichungen der Methylierungsraten aller CpG-Orte des GSTA1-Promotors wird es offensichtlich, dass sich die Einzeltiere in der Häufigkeit von CpG-Orten mit positiven bzw. negativen Abweichungen der Methylierungsraten vom Mittelwert unterscheiden. Bei den Tieren der SPI-Gruppe ist die Anzahl von CpGs mit einer unterdurchschnittlichen Methylierung erhöht. Bei diesen Tieren gibt es auch augenscheinlich stärkere negative Abweichungen vom Mittelwert als bei den Tieren der CAS-Gruppe. Beispielsweise beträgt bei der Position 13 die Abweichung vom Methylierungsmittelwert bei Tier 43/13 der CAS-Gruppe -6,8 % und bei Tier 43/1 aus der SPI-Gruppe -100 %. Stärker absinkende Abweichungen vom Methylierungsmittelwert, im Vergleich zur CAS-Gruppe, findet man auch bei den CpG-Stellen 2 und 14-18. Der Vergleich der Methylierungsraten hinsichtlich der Abweichung vom Methylierungsmittelwert zeigt, dass Tiere mit einer überwiegenden Anzahl hypomethylierter CpG-Orte erhöhte hepatische GSTA1-Transkriptionsniveaus aufweisen.



**Abb. 5.11: Prozentuale Abweichungen der mittleren Methylierungsrate der CpG-Stellen 1-21 von ausgewählten Tieren beider Diätgruppen und die jeweiligen hepatischen *GSTA1*-mRNA-Mengen**

Dargestellt sind die prozentualen Abweichungen vom Methylierungsmittelwert in [%] der CpG-Stellen 1-21 von ausgewählten Tieren der CAS-Gruppe (Diät 1.1) und der SPI-Gruppe (Diät 1.2), korrespondierend zum jeweils gemessenen Transkriptionsniveau. Der Wert 0 im Diagramm stellt den mittleren Methylierungswert dar. Abweichungen in den positiven Bereich sind die Werte, die oberhalb der durchschnittlichen Methylierungsrate liegen. Abweichungen in den negativen Bereich liegen unterhalb der durchschnittlichen Methylierungsrate in der jeweiligen CpG-Position. Eine augenscheinliche Zunahme an unterdurchschnittlich methylierten CpGs führt zu einer *GSTA1*-Transkriptionssteigerung.

Mit dem Ziel den summativen Effekt des Methylierungsgrades aller CpG-Stellen des porcinen GSTA1-Promotors auf die hepatische GSTA1-Transkriptmenge in Abhängigkeit von der Transkriptmenge zu bestimmen, wurde das folgende Modell entwickelt und genutzt:

$$\text{Expression} = a + b \times 1/(\text{Qpn})^2$$

Dabei ist Qpn definiert als Quotient aus der Summe der überdurchschnittlich methylierten CpGs und der Summe der unterdurchschnittlich methylierten CpGs, nach Standardisierung. Ergibt sich ein  $\text{Qpn} > 1$ , gibt es mehr überdurchschnittliche als unterdurchschnittlich methylierte CpGs und umgekehrt. Die Korrelation zwischen Methylierung und Expression, die sich aus diesem Modell ergibt, gilt mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,85. Ein Bestimmtheitsmaß von 0,85 bedeutet, dass 85 % der Streuung der Expression durch die Methylierung erklärt werden kann, der Zusammenhang ist damit als hoch einzustufen.

Der Kurvenverlauf der Abbildung 5.12 zeigt, dass ein überwiegend unterdurchschnittlicher Methylierungsgrad aller untersuchten CpG-Stellen des porcinen GSTA1-Promotors ( $\text{Qpn} < 1$ ) mit einer zunehmenden Transkription des porcinen GSTA1-Gens gekoppelt ist.

Vier Tiere der SPI-Gruppe weisen eine überwiegende Anzahl unterdurchschnittlich methylierter CpG-Stellen ( $\text{Qpn} \ll 1$ ) auf, die mit erhöhten Transkriptionsraten assoziiert sind (ca. 3900 bis 8800 Kopien/10 ng RNA), während drei Tiere Qpn-Werte aufweisen, die im Bereich der CAS-Tiere liegen. Die Transkriptionsraten befinden sich entsprechend auf dem Niveau der CAS-Gruppe ( $< 3000$  Kopien/10 ng RNA).

Die beobachtete differente Methylierung des GSTA1-Promotors könnte den individuellen Einfluss der SPI-Diät auf die GSTA1-Expression erklären.

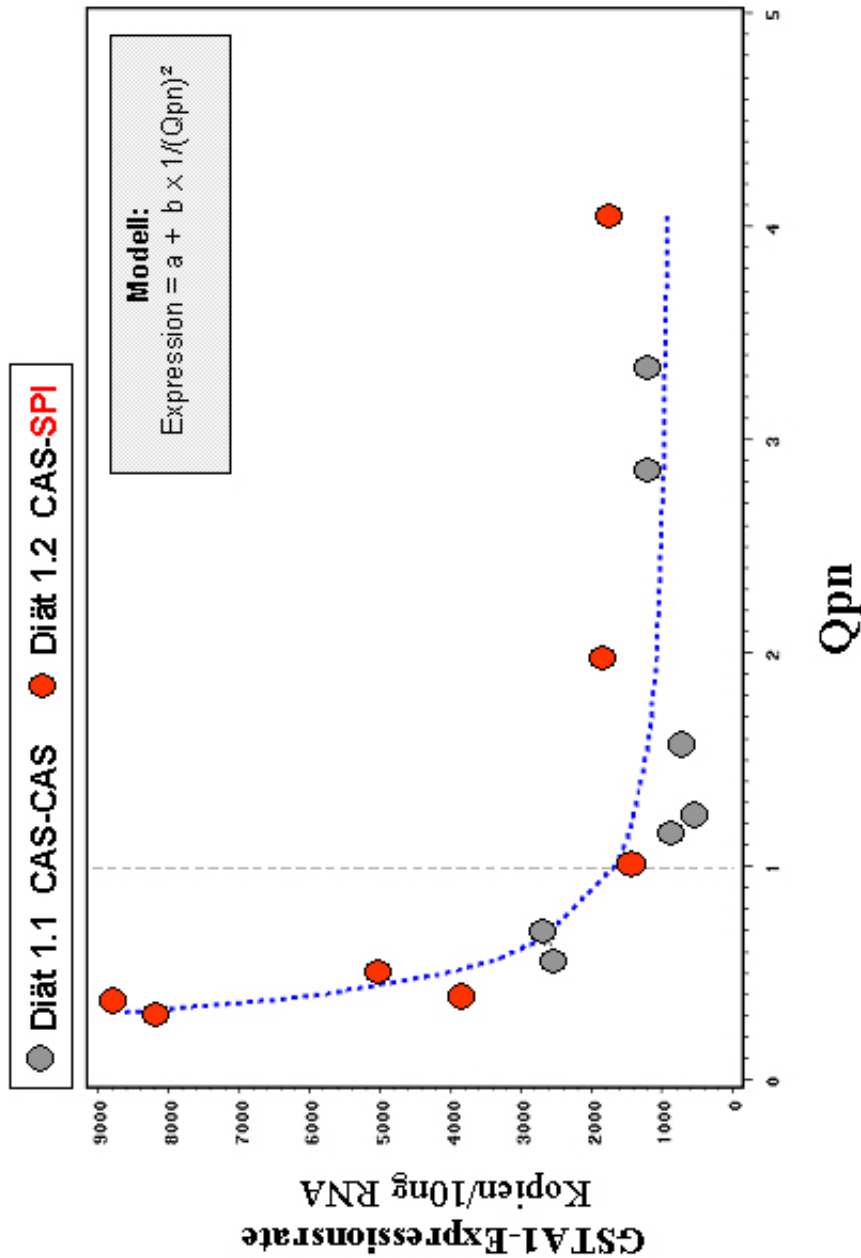
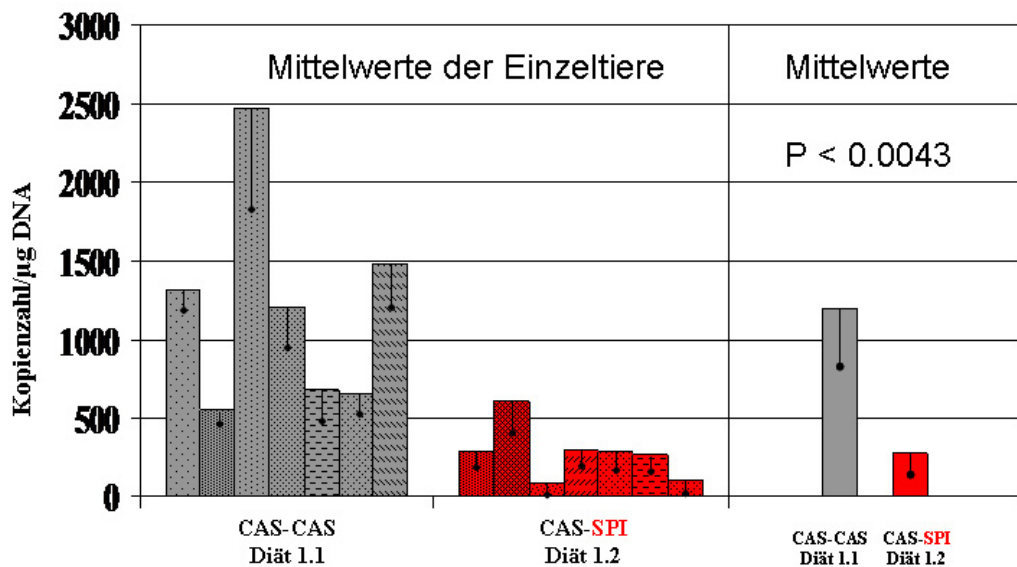


Abb. 5.12: Modell für die Darstellung des Einflusses der SPI-Diät auf die Gesamtmethylierung des *GSTA1*-Promotors [-1812 bis -1] in Zusammenhang mit der *GSTA1*-Expression

*Qpn* ist der Quotient aus der Summe der überdurchschnittlich methylierten CpGs und der Summe der unterdurchschnittlich methylierten CpGs (nach Standardisierung). Ist *Qpn* < 1 ist die unterdurchschnittliche Methylierung der CpGs größer als die überdurchschnittliche Methylierung. Vier Tiere der SPI-Gruppe reagieren auf die Diät mit einer unterdurchschnittlichen Methylierung der CpG-Stellen (*Qpn* < 1), was mit erhöhten Transkriptionsraten assoziiert ist (ca. 3900 bis 8800 Kopien/10 ng RNA).

### 5.4.3 Diät-abhängige Transkriptionsraten der DNMT1

Als mögliche molekulare Ursache differenter Methylierungsraten des *GSTA1*-Promotors wurde das Expressionsniveau der DNMT1, die für die Aufrechterhaltung von Methylierungsmustern verantwortlich ist, mit dem *LightCycler*<sup>TM</sup>-System untersucht. Das Ergebnis ist in der Abbildung 5.13 dargestellt. Der Mittelwert zeigt, dass die *DNMT1*-Transkriptionsrate in der SPI-Gruppe signifikant abnimmt ( $P < 0,0043$ ), sie ist im Vergleich zur CAS-Gruppe um das 4,3-fache gesunken. Allerdings korrelieren die stark verminderten *DNMT1*-Transkriptionsniveaus nicht direkt mit den beobachteten erhöhten *GSTA1*-Expressionsniveaus.



**Abb. 5.13: Messung der porcinen hepatischen Transkriptionsraten der DNMT1 in der CAS-Gruppe und der SPI-Gruppe**

Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzeltiere (linker Teil) sind aus drei Echtzeit-PCR-Messungen eines Tieres gebildet. Die Gesamt-Mittelwerte und deren Standardabweichung (rechter Teil), setzen sich aus den Mittelwerten der Einzeltiere der jeweiligen Fütterungsgruppe zusammen.

## 6. DISKUSSION

### *6.1 Diät-assoziierte langanhaltende Veränderungen der oxidativen Stressantwort - mögliche Ursache einer persistenten Wachstumsminderung bei juvenilen wachsenden Schweinen*

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine temporäre Aufnahme einer SPI-basierten Diät (unausgewogene Aminosäurezusammensetzung), im Vergleich zu einer CAS-basierten Diät (Aminosäurevollwertdiät), zu langanhaltenden Veränderungen der oxidativen Stressreaktion bei wachsenden Schweinen führt, ob diese mit Veränderungen des Wachstums assoziiert sind und welche molekularen Prozesse diesen zugrunde liegen. In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine vierwöchige SPI-Fütterung signifikant die oxidative Stressreaktivität erhöht, was mit einem verminderten Wachstum und komplexen Veränderungen der hepatischen Genexpression im Vergleich zur CAS-Diät verbunden war [25, 269]. Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit die Persistenz der SPI-assoziierten Änderungen der Genexpression nach vierwöchiger Fütterung der SPI-Diät mit anschließender vierwöchiger Rückumstellung der Fütterung auf die CAS-Diät untersucht. Die Kontrolltiere erhielten permanent die CAS-Diät. Im Vergleich zur CAS-Kontrollgruppe wiesen die temporär SPI-gefütterten Tiere vier Wochen nach Rückumstellung auf die CAS-Diät weiterhin erhöhte hepatische Expressionsniveaus von Genen auf, die in die zelluläre bzw. oxidative Stressantwort involviert sind.

GSTA1 (Glutathion-S-Transferase A1) gehört zur Familie der Glutathion-S-Transferasen, die die Bindung von vielen hydrophoben und elektrophilen reaktiven Molekülen an reduziertes Glutathion katalysieren. Es wird gezeigt, dass Ratten, die eine verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen wie Glutathion-S-Transferasen zeigen, eine erhöhte mikrosomale Lipid-Peroxidation aufweisen [287]. Verschiedene andere Studien zeigen, dass beim Menschen die Syntheserate und der Flux von Glutathion und Komponenten des Glutathionzyklus verändert werden, wenn ein ernährungsbedingter Mangel an schwefelhaltigen Aminosäuren vorliegt [288, 289]. Eine verminderte Glutathionkonzentration, bedingt durch die SPI-Diät, könnte mit einer erhöhten Expression der GSTA1 assoziiert sein

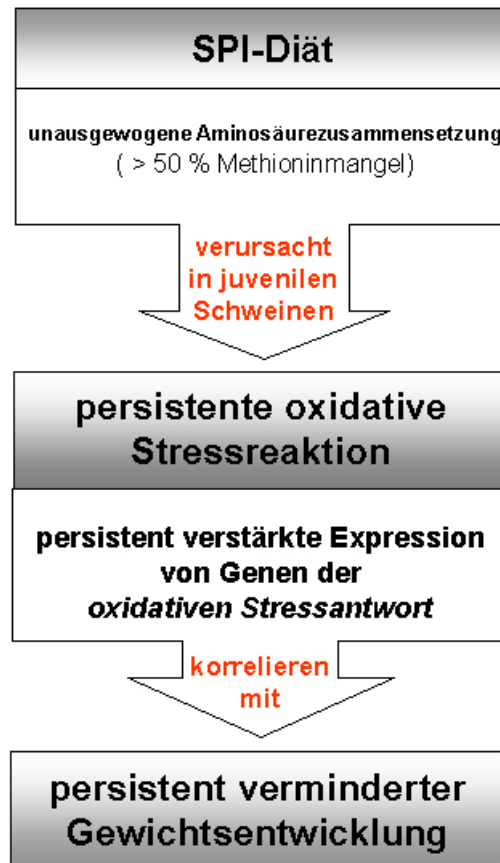
[25]. Die MSRA (Methionin-Sulfoxid-Reduktase A) katalysiert die Reduktion von Methionin-Sulfoxid zu Methionin in Proteinen [290, 291]. Peptid-gebundenes Methionin wird durch oxidative Sauerstoffspezies leicht zu Methionin-Sulfoxid oxidiert [291], wodurch die Funktionalität der Proteine beeinträchtigt wird oder verlorenght. Beispielsweise ist die Methylierung eines Methioninrestes in den amyloiden  $\beta$ -Peptiden an der Neurodegeneration bei der Alzheimer Krankheit beteiligt [292]. OATP2 (Organisches Anion Transport Polypeptid 2) unterstützt den Cholesterolausstrom aus dem Gewebe zur Leber für die dort erfolgende Exkretion, wodurch oxidierte Lipide ausgeschieden werden. Des weiteren ist OATP2 am Transport der Taurocholsäure beteiligt [293], einem biologischen Detergenz das in der Leber aus Cholesterol synthetisiert wird. CANX (Calnexin) gehört zum *Repair-enzym*-System der oxidativen Stressantwort und spielt als Chaperon bei der zellularen Stressantwort eine Rolle [294]. HSF1 (*Heat Shock Transcription Factor*) ist ein durch zellularen Stress induzierter Hauptregulator für Chaperone, z.B. vom *Heat Shock Protein* (HSP) und von Komponenten der Protein-Homöostase [295, 296]. Er selbst wird durch HSPs und Co-Chaperone rückreguliert (*Feedback-Regulation*) [297]. Die gemessene persistent erhöhte Transkriptionsrate des HSF1 bedingt möglicherweise die erhöhte CANX-Transkription.

Obwohl die beobachtete Aufregulation dieser Gene geringer als nach chronischer SPI-Fütterung war, weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine langanhaltende erhöhte oxidative Stressreaktion hin. Die persistent erhöhte oxidative Stressantwort war signifikant mit einem verminderten Wachstum der Schweine korreliert, ein Indiz dafür, dass die oxidative Stressreaktion, hervorgerufen durch die SPI-Diät, zu langanhaltenden physiologischen Veränderungen führt (metabolische Programmierung) (siehe Abb. 6.1). Dies befindet sich in Übereinstimmung mit einer Vielzahl an Untersuchungen, welche auf die Bedeutung des oxidativen Stresses als Teil pathophysiologischer Mechanismen hinweisen und gezeigt haben, dass eine erhöhte oxidative Stressreaktivität signifikant mit Proliferations- und Neurodegenerationsprozessen sowie der Regulation der Proteinbiosynthese assoziiert sind, was zu nachteiligen metabolischen Konsequenzen führen kann [298, 287, 299, 103, 300, 301].

Die beobachteten SPI-assoziierten Genexpressionsveränderungen sind vermutlich auf die unausgewogene Aminosäurezusammensetzung des Sojaproteinisolates im Vergleich zum Casein zurückzuführen. Der Gehalt der Aminosäuren Methionin, Prolin, Phenylalanin und Tyrosin war in der SPI-Diät signifikant vermindert, während die Aminosäuren Cystein, Glycin, Asparaginsäure und Arginin in erhöhter Konzentration vorlagen. Biologisch aktive Sojabestandteile, wie z.B. Trypsininhibitoren und Lektine, waren nach Hitze- und alkalischer Behandlung um das mehr als 200-fache im Vergleich zu anderen SPI-Diäten [270] vermindert.

In bisherigen anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass veränderte





**Abb. 6.1: Molekulare Ursachen für die persistent verminderte Gewichtsentwicklung SPI-gefütterter Schweine**

Die SPI-Diät, mit ihrem unausgewogenen Aminosäureanteil, führt im Vergleich zur CAS-Diät, die eine ausgewogene Aminosäurezusammensetzung aufweist, bei heranwachsenden Schweinen zu persistent erhöhten Transkriptionsraten von hepatischen Genen, die an der oxidativen Stressreaktion beteiligt sind, was mit der hier beobachteten anhaltenden verminderten Körpermasseentwicklung in den SPI-gefütterten Tieren signifikant korreliert. Damit wurde gezeigt, dass der SPI-Diät verursachte oxidative Stress und die damit in Zusammenhang stehende Aufregulation von Genen der oxidativen Stressantwort eine Ursache für die beeinträchtigte Gewichtsentwicklung der Schweine ist.

diätische Konzentrationen verschiedener Aminosäuren die Regulation der Genexpression beeinflussen [302, 30, 31].

In humanen Zellen bewirkt ein Methionin- und in geringerem Maße ein Cysteinmangel eine Überexpression der Asparaginsynthetase des CCAAT/Enhancer-bindenden Proteins und der C-Jun-N-terminalen Kinase 1 [303, 304]. Ferner führt ein Arginin- und Cysteinmangel zur Induktion der mRNA des *Insulin-Like Growth-Faktor*-bindenden Proteins [305]. Viele semisynthetische experimentelle Diäten sind durch eine Unausgewogenheit in den schwefelhaltigen Aminosäuren charakterisiert, welche die Tiere zur Synthese eines beträchtlichen Teils des Cysteinbedarfs aus Methionin veranlassen.

Hohe Konzentrationen an Homocystein beeinflussen die Niveaus von zwei Hauptmediatoren der zellulären Methylierung, S-Adenosyl-Methionin (SAM) und Methylentetrahydrofolat (MTF) [306]. S-Adenosyl-Methionin ist der Methylendonator für die Methylierung von neu synthetisierter DNA und reguliert dadurch die Chromatinstruktur und die damit in Verbindung stehende Genexpression. Das Gleichgewicht zwischen S-Adenosyl-Methionin und methylierten Derivaten der Folsäure kann dabei von kritischer Bedeutung für die Entwicklung differenzierender Zellen und der Langzeitregulation der Genexpression sein [307].

In der vorliegenden Arbeit wird auf Grund der stark verminderten Gehalte biologisch aktiver Sojabestandteile davon ausgegangen, dass die beobachteten Veränderungen auf die im Vergleich zum Casein unbalancierte Aminosäurezusammensetzung des Sojaproteinisolates zurückzuführen sind. Im Vergleich zur Caseindiät ist das Sojaproteinisolat durch eine weniger als halb so hohe Methioninkonzentration und einer doppelt so hohen Cystein- und Argininkonzentration charakterisiert.

Eine verminderte Methioninversorgung könnte die beobachteten metabolischen Langzeitveränderungen erklären. In Tierversuchen wird gezeigt, dass eine unausgewogene Versorgung mit Methionin zu physiologischen Langzeiteffekten, wie z.B. vermindertes Wachstum, führen kann [308]. In Bezug auf den oxidativen Stress wurde berichtet, dass ein Methioninmangel zu einer erhöhten myokardialen antioxidanten Enzymaktivität führt [309]. In Mäusen, die eine Methioninmangeldiät erhalten, war eine Leberzerstörung mit einem hundertfachen Gehalt an Lipidperoxidasen verbunden [310]. Darüber hinaus führte eine begrenzte diätische Methioninaufnahme zur signifikanten Reduktion der Syntheserate und Gewebekonzentration von Glutathion, ein Hauptakteur des antioxidativen Abwehrsystems, veränderter Leukotriensynthese und Gamma-Glutamyl-Tanspeptidase-kontrollierten Aminosäuretransport [288, 311, 312].

Zahlreiche Fütterungsversuche mit Methylendonatormangeldiäten zeigten, dass es zu langanhaltenden Veränderungen in der DNA-Methylierung kommt, was mit der Entstehung von Geburtsdefekten und später auftretenden Krankheiten assoziiert ist [255, 259, 313, 314].

## 6.2 Die DNA-Methylierung - molekularer Mechanismus persistenter Genexpressionsveränderungen

Eine dauerhaft veränderte Expression von Genen ist eine Ursache für persistente Stoffwechselveränderungen, die sich nachteilig auf den Organismus auswirken können [25, 94]. Ein möglicher molekularer Mechanismus ist die DNA-Methylierung, die als ein Mechanismus der DNA-Expressionsregulation bekannt ist. Der Methylierungsgrad der DNA korreliert invers mit der DNA-Expression. Anhand von Schweinen, die vier Wochen mit der SPI-Diät gefüttert und im Anschluss daran geschlachtet wurden, wurde untersucht, ob sich die DNA-Methylierung im Vergleich zur CAS-Kontrollgruppe verändert.

Die Untersuchung der Methylierungen der hepatischen Gesamt-DNA zeigte, dass die SPI-Diät, im Vergleich zur CAS-Diät, eine Verringerung der Gesamt-DNA-Methylierung in der Leber der Schweine verursacht.

Die Untersuchung der hepatischen Gesamt-DNA im Bereich der CpG-Inseln, durch den Einsatz des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *Bss*HII (Erkennungsmotiv 5'-GCGCGC-3'), zeigte eine signifikante Verringerung der Methylierungsrate in der SPI-Gruppe im Vergleich zur CAS-Gruppe. Dies ist aus der signifikant höheren Einbaurate an [<sup>3</sup>H]dCTP in die Schnittstellen von *Bss*HII gespaltenen DNA bei SPI-gefütterten Tieren, im Vergleich zu CAS-gefütterten Tieren, zu erkennen ( $1327,1 \pm 169,75$  dpm gegen  $1208,0 \pm 81,51$  dpm,  $P < 0,0006$ ) (siehe Abb. 5.4). Die Methylierung aller CpG-Orte der hepatischen genomischen DNA ist in der SPI-Gruppe, im Vergleich zu den CAS-gefütterten Tieren, tendenziell verringert. Die durchschnittliche prozentuale Methylierungsrate der SPI-Gruppe, die durch den kombinierten Einsatz des methylabhängigen Restriktionsenzym *Hpa*II, mit dem methylierungsunabhängigen Restriktionsenzym *Msp*I in die *Cytosine Extension*-Methode ermittelt wurde, ist im Vergleich zu den CAS-Tieren leicht gesunken (35,3 % gegen 37,1 %,  $P < 0,0708$ ) (siehe Abb. 5.3).

Die leichte Demethylierung aller CpG-Methylierungsstellen der hepatischen genomischen DNA weist auf eine Veränderung in der Genexpression infolge der SPI-Diät hin. Die DNA-Demethylierung ist mit einer Expressionssteigerung von Genen assoziiert [131]. Der Nachteil bei der Messung des Gesamtmethylierungsstatus ist jedoch, dass der Methylierungsstatus auch von CpG-Orten außerhalb der Promotoren, die meist nicht an der Genregulation beteiligt sind und von Methylierungsänderungen nicht betroffen sind, die Methylierungsrate mitbestimmen.

Die Untersuchung des Methylierungsstatus der CpG-Inseln bringt hierbei aussagekräftigere Ergebnisse. CpG-Inseln, die hauptsächlich in den Promotorbereichen vorkommen, sind an der Regulation der Genexpression beteiligt. Eine Demethylierung der CpG-Inseln führt zur Expressionssteigerung eines Gens [170, 175].

Statistische Schätzungen geben an, dass die Hälfte aller Säugetiergene in den Promotoren CpG-Inseln enthalten, darunter nahezu alle Haushaltsgene und einige gewebespezifisch regulierte Gene [171, 172]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die hier gezeigte signifikante Demethylierung von CpG-Inseln der hepatischen genomischen DNA infolge der SPI-Diät eine breite Induzierung der Expression hepatischer Gene verursacht, wodurch die DNA-Methylierung als molekularer Mechanismus langanhaltender Veränderungen der hepatischen Genexpression wahrscheinlich gemacht wird.

Für die Untersuchung der DNA-Methylierung, in Verbindung mit oxidativer Stressantwort, wurde *GSTA1* als Modellgen ausgewählt. *GSTA1* ist durch oxidativen Stress stark induzierbar und ist damit ein Schlüsselgen für die Indikation von oxidativem Stress [315]. Die Transkriptionsrate der *GSTA1* steigt infolge der direkten SPI-Diät stark an [25] und zeigt eine signifikant persistent erhöhte Transkriptionsrate. In der Literatur wird bereits beschrieben, dass die DNA-Methylierung bei der Expression der humanen Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1), ein naher Verwandter der *GSTA1* [316], eine Rolle spielt [317, 318, 319].

Im sequenzierten *GSTA1*-Promotorbereich [-1812 bis -1] wurde die Methylierungsrate von 21 CpG-Stellen, durch die quantitative *Methyl Single Nucleotide*-Analyse mit dem *Pyrosequencing*<sup>TM</sup>-System, nach einer PCR mit bisulfitbehandelter DNA, analysiert (Abb. 5.7). Die Statistische Analyse der Methylierungsmittelwerte der einzelnen CpG-Stellen ergab keine signifikant unterschiedlichen CpG-Methylierungsraten zwischen beiden Diätgruppen.

Mit Hilfe der Clusteranalyse, die das Methylierungsverhalten der CpG-Stellen auf Ähnlichkeiten hin untersucht, wird jedoch gezeigt, dass es durch die SPI-Diät zu Veränderungen in der Coregulation einzelner CpGs hinsichtlich des Methylierungsstatus kommt, angezeigt durch Veränderungen in der Clusterung (siehe Abb. 5.9). Dies deutet auf einen Einfluss der SPI-Diät auf die CpG-Methylierung hin. Der Vergleich der prozentualen Standardabweichungen [S %] der einzelnen CpGs zwischen beiden Fütterungsgruppen (Abb. 5.8) zeigt, dass die Methylierungsraten in der SPI-Gruppe stärker variieren als in der CAS-Gruppe, was den stärkeren individuellen Einfluss der SPI-Diät auf eine veränderte Methylierung einer CpG-Stelle verdeutlicht. Stärkere individuelle Unterschiede in den Reaktionen der Tiere, zum Beispiel auf Expressionsniveaus infolge der SPI-Diät, im Vergleich zur CAS-Diät, werden bereits in der Arbeit von Schwerin et. al 2002 [25] und Jung-hans et. al 2004 [269] beschrieben.

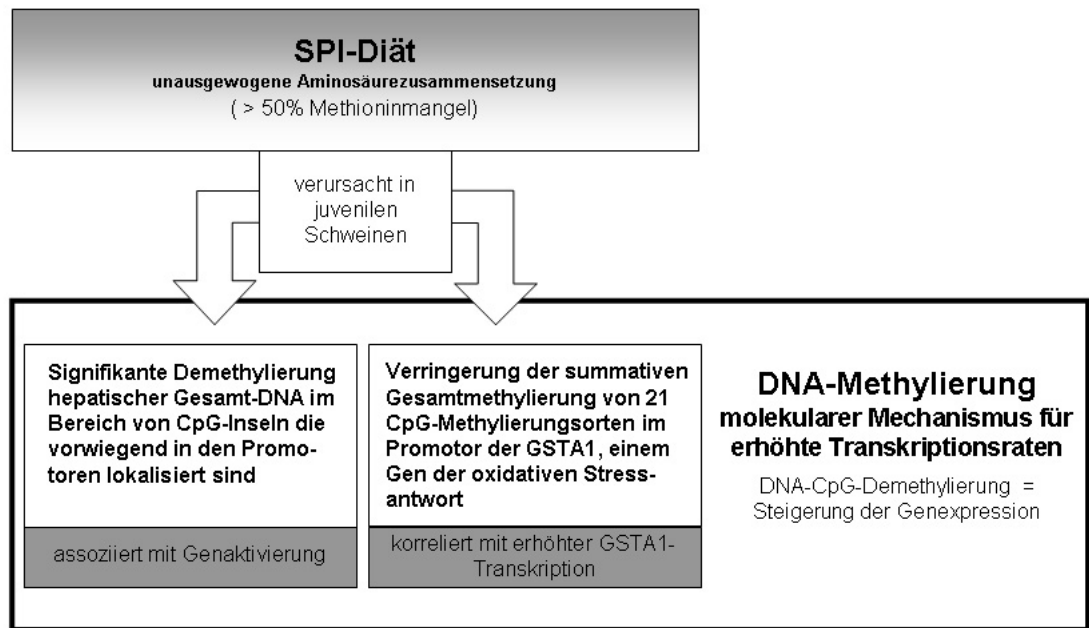
Anhand von Einzeltieren wird gezeigt, dass die Zunahme an unterdurchschnittlich methylierten CpG-Stellen sowie eine verstärkte Demethylierung einzelner CpG-Stellen mit einer erhöhten *GSTA1*-Expression korrespondieren (siehe Abb.

5.11). Die SPI-Diät verursacht bei einzelnen Tieren augenscheinlich eine verstärkte unterdurchschnittliche Methylierung der CpG-Stellen, im Vergleich zu CAS-gefütterten Tieren, was mit einer signifikant erhöhten *GSTA1*-Transkription einhergeht.

In einem Modell (siehe Abb. 5.12), in dem die Gesamtmethylierung des *GSTA1*-Promotorbereiches von [-1812 bis -1] aller Tiere beider Fütterungsgruppen mit der *GSTA1*-Expression in Beziehung gesetzt ist, wird gezeigt, dass die Gesamtmethylierung mit der Expression signifikant korreliert ( $B = 0,85$ ). Gibt es mehr unterdurchschnittlich als überdurchschnittlich methylierte CpGs ( $Q_{pn} < 1$ ), steigt die Expression exponentiell an. In der SPI-Gruppe ist der Anteil an Tieren mit einer unterdurchschnittlichen CpG-Methylierung im Vergleich zur CAS-Gruppe erhöht. Vier von sieben Tieren zeigen eine unterdurchschnittliche Methylierung des untersuchten Promotorbereiches, was signifikant mit der gesteigerten hepatischen *GSTA1*-Transkriptionsrate (3900 bis 8800 Kopien/10 ng RNA) korreliert. Dies zeigt den individuellen Einfluss der SPI-Diät auf eine verstärkte *GSTA1*-Expression im Zusammenhang mit einer unterdurchschnittlichen Methylierung des untersuchten Promotorbereiches. Die erhöhten hepatischen *GSTA1*-Transkriptionsraten sind damit nicht auf eine signifikante Reduzierung der Methylierung einzelner CpG-Stellen zurückzuführen, sondern auf eine geringfügig verringerte, unterdurchschnittliche Methylierungsrate aller CpG-Stellen innerhalb des untersuchten Promotorbereiches. Dies korrespondiert mit Ergebnissen die zeigen, dass der Methylierungsstatus der einzelnen CpG-Stellen, durch die vielfachen Zellgenerationen infolge der Methylierungs-Aufrechterhaltungsfunktion der DNMT1 stabil ist [125].

Die hier festgestellte signifikante Demethylierung von an der Genregulation beteiligten CpG-Inseln der hepatischen Gesamt-DNA sowie die Verringerung des Gesamt-Methylierungsstatus des *GSTA1*-Promotors, der mit der erhöhten *GSTA1*-Expression korreliert, zeigt die Beteiligung der DNA-Methylierung an der diätabhängigen Expressionsregulation, was sie zu einem molekularen Mechanismus für persistente Transkriptionsveränderungen macht (siehe Abb. 6.2).

Der ausgeprägte Mangel an Methionin, dem Methylgruppendonator für S-Adenosylmethionin (SAM) (siehe Abb. 2.6), in der SPI-Diät, ist eine wahrscheinliche Ursache für die festgestellte Demethylierung hepatischer genomischer DNA sowie der unterdurchschnittlichen Gesamtmethylierung im sequenzierten *GSTA1*-Promotorbereich infolge der SPI-Diät. In zahlreichen Arbeiten wird gezeigt, dass ein Mangel an Methionin in der zugeführten Nahrung am Gen-Demethylierungsmechanismus beteiligt ist, was zu Veränderungen in der Genexpression führt [255, 259, 313, 314] (siehe auch Abschnitt 2.2.4). Eine verabreichte Methioninmangeldiät führte zu einer CpG-Stellen-Demethylierung und Aufregulierung



**Abb. 6.2: DNA-Methylierung - ein potentieller Mechanismus für persistent gesteigerte Transkriptniveaus von Genen der oxidativen Stressantwort**

Als möglicher molekularer Mechanismus für die erhöhten Transkriptniveaus der Gene der oxidativen Stressantwort in der Leber beim Schwein kann die DNA-Methylierung in Betracht gezogen werden. Direkt nach der Fütterung der SPI-Diät kommt es, im Vergleich zur CAS-Kontrollgruppe, zu einer signifikanten Demethylierung von an der Genregulation beteiligten CpG-Inseln in der hepatischen Gesamt-DNA, was mit einer Induktion der Genexpression assoziiert ist. Weiterhin führt die SPI-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer geringfügigen Abnahme der CpG-Gesamt-methylierung im *GSTA1*-Promotor [-1812 bis -1], einem Gen der oxidativen Stressantwort, was signifikant mit der erhöhten *GSTA1*-Expression korreliert.

von in der Leber exprimierten Genen, die an der Wachstumsregulierung beteiligt sind [255]. DNA-Demethylierungen infolge von Methioninmangel steht ebenfalls in Verbindung mit einer Aktivierung von Genen, die bei der Entstehung von Krebs, Karzinomen und Tumoren, unter anderem in der Leber, eine Rolle spielen [320, 321, 322, 323, 324, 325]. Der Methioninmangel der SPI-Diät könnte die signifikante Verringerung der DNMT1-Transkriptionsraten bei den SPI-gefütterten Schweinen bewirken. Methioninmangel führt unter zellularem Stress zu einer Verringerung der DNMT1-Aktivität [326].

Das signifikant niedrigere hepatische DNMT1-Transkriptniveau von permanent SPI-gefütterten Schweinen, im Vergleich zu CAS-gefütterten Schweinen ( $276,6 \pm 169,63$  gegen  $1194,1 \pm 669,39$  Kopienzahl/ $\mu\text{g}$  RNA;  $P < 0,004$ ) (siehe Abb. 5.13), könnte der generelle Grund für die leichte Verringerung der CpG-Gesamt-methylierung im untersuchten regulatorischen Bereich sein, möglicherweise durch die Beeinflussung der Methylierungsaufrechterhaltung der DNMT1 [126], was jedoch nicht den tierspezifischen Einfluss erklärt. Alle Tiere der SPI-Gruppe zeigen im Vergleich zur CAS-Gruppe eine erniedrigte DNMT1-Transkription, aber nicht alle Tiere der SPI-Gruppe reagieren im Vergleich zur CAS-Gruppe mit einer Demethylierung der untersuchten CpG-Stellen. Außerdem konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der DNMT1-Transkriptionsrate und dem erhöhten Expressionsniveau von *GSTA1* in SPI-gefütterten Tieren festgestellt werden. Wahrscheinlich gibt es derzeit unbekannte Komponenten für den Methylierungsaufrechterhaltungsprozess, wie z.B. Faktoren, die den Zugang der DNMT1 zu spezifischen chromosomalen Regionen beeinflussen. Bei Maus und Mensch wird gezeigt, dass für die Gewährleistung einer ungestört ablaufenden Methylierung auch andere Faktoren gebraucht werden: Mutationen in den humanen *ATRX* [327] und murinen *Lsh2*-Genen [328], welche beide für verwandte Proteine des *Chromatin Remodelling Protein* SNF2 kodieren, führen zu signifikanten Effekten auf das globale DNA-Methylierungsmuster.

Eine Regulation der *GSTA1*-Transkription über *Amino Acid Response Elements* (AARE) ist im hier sequenzierten Promotorbereich [-1812 bis -1] nicht zu erkennen. AARE sind Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die durch das Fehlen von Aminosäuren aktiviert werden. Die SPI-Diät hat einen ausgeprägten Mangel an Methionin und eine leicht verringerte Konzentration an Histidin (siehe Abb. 4.1, S. 42). Der Mangel an Methionin, Histidin, Asparagin sowie Cystein kann zur Initiierung eines spezifischen Signalweges führen, der ein AARE-Bindeprotein aktiviert. Die Anlagerung des AARE-Bindeprotein an das AARE verstärkt die Transkription des entsprechenden Gens [31]. Die Untersuchung der AARE in verschiedenen Genen zeigt, dass es eine *Core*-Sequenz mit der Nukleotidfolge CATCA gibt [31, 329, 330, 331]. Die Analyse des sequenzierten

*GSTA1*-Promotorbereiches erbrachte keine Übereinstimmung mit der Sequenz des AARE-Elementes.

Innerhalb des untersuchten Promotorbereiches unterscheiden sich die Methylierungsraten der CpG-Stellen zum Teil erheblich (siehe Abb. 5.7), sie schwanken zwischen 6 % und 82 %. Der proximale Promotorbereich von [-780 bis -243] ist im Vergleich zum nachfolgenden Bereich hypomethyliert. Die Methylierungsrate liegt bei acht von neun CpGs unter 50 %. Die Hypomethylierung dieses Bereiches weist auf dessen wichtige Bedeutung bei der hepatischen *GSTA1*-Expression hin, weil die Demethylierung von regulatorischen DNA-Bereichen in Zusammenhang mit Expressionsaktivierung steht.

Die prozentualen Standardabweichungen [S %] (siehe Abb. 5.8) zeigen, dass die Methylierungsraten der meisten demethylierten CpG-Stellen stärker variieren, als die der CpGs, deren Methylierungsraten über 50 % liegen. Ein Hinweis auf deren Funktionalität bei der *GSTA1*-Expression.

Tatsächlich befindet sich der größte Anteil der CpGs, deren Methylierungsverhalten mit der *GSTA1*-Expression korreliert ( $r \geq \pm 0,6$ ), im hypomethylierten Bereich von [-780 bis -243] (siehe Abb. 5.10). Hier befinden sich die CpGs 14-17, für die es Hinweise gibt, dass sie an der *GSTA1*-Grundexpression beteiligt sind. Die Überprüfung der Korrelation mit der *GSTA1*-Expression, mittels FDR-Analyse, bestätigt den signifikanten Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der CpGs 14-17 und der *GSTA1*-Expression. Dieser Zusammenhang ist nicht fütterungsabhängig ( $q = 0,09$ ), was darauf hindeutet, dass sie an der *GSTA1*-Grundexpression beteiligt sind.

Dies wird auch im Zusammenhang mit der Clusteranalyse deutlich (siehe Abb. 5.9), die die Ähnlichkeiten der CpG-Stellen hinsichtlich des Methylierungsverhaltens darstellt. Die CpGs 14-17 befinden sich in konservierter Position in beiden Fütterungsgruppen im Cluster 1.1. In diesem Cluster befinden sich die meisten CpG-Stellen dessen Methylierungsverhalten mit der *GSTA1*-Expression korrelieren. In der SPI-Gruppe befinden sich die CpGs 7, 13 und 21 im Cluster 1.1, die auch hier mit der *GSTA1*-Expression korrelieren. Die FDR-Analyse konnte die Korrelation nicht bestätigen, was möglicherweise am zu geringen Stichprobenumfang liegt. Da sie sich aber wie die Positionen 14-17 verhalten, kann davon ausgegangen werden, dass sie an der Expressionsregulation beteiligt sind, und in der SPI-Gruppe zur Steigerung der *GSTA1*-Expression beitragen.

Neben dem hypomethylierten proximalen Promotorbereich scheinen auch einzelne CpG-Stellen aus der hypermethylierten Promotorregion für die *GSTA1*-Expressionsregulation von Bedeutung zu sein. In der CAS-Gruppe ist das das CpG 5 und in der SPI-Gruppe CpG 7. Beide korrelieren mit der Expression und sind im Cluster 1.1 der jeweiligen Fütterungsgruppe angesiedelt.



Bis auf eine Ausnahme korreliert die Methylierung der sich im Cluster 1.1 befindenden CpGs negativ mit der GSTA1-Expression. Die Analyse hinsichtlich potentieller Transkriptionsfaktoren zeigt, dass sie sich innerhalb der Bindesequenzen regulatorischer Faktoren befinden (siehe Abb. 5.10). Die Demethylierung der CpG-Stellen führt möglicherweise zur effizienteren Bindung der Transkriptionsfaktoren, wie es in der Literatur beschrieben wird [33, 34, 226, 227]. Eine Ausnahme ist **CpG 21**, dessen Methylierung positiv mit der Expression korreliert. Sie ist mit der Bindesequenz des potentiellen Transkriptionsfaktoren *Repressor of CAR1-Faktor* belegt. Dieser Faktor ist bekannt als Repressor des Arginase-Gens bei *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenz des Repressors ist eine ubiquitäre *Upstream Repression Sequence (URS)* die vor Genen der Hefe, aber auch bei einer Vielzahl anderer Spezies wie z.B. Mensch, Huhn sowie Viren gefunden wurde [332]. Die Deletion dieses Elementes resultiert in ein hohes Expressionsniveau des *CAR1*-Gens, ohne induzierende Faktoren [333]. Eine stärkere Methylierung der CpG-Stelle 21 könnte eine Verringerung der Bindung dieses Repressors zur Folge haben, wodurch möglicherweise die Expression der GSTA1 verstärkt wird. Die **CpGs 5, 13, 14 und 17** überlagern mit der Bindesequenz für den Transkriptionsfaktor SP1 (*Specificity Protein 1*). SP1 ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der für die Expressionsregulation vieler Gene in verschiedenen Geweben und Zelltypen von großer Bedeutung ist [334, 335, 336, 337]. In der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, dass SP1 eine Rolle bei der Expressionsregulation von Glutathion-S-Transferasen spielt. Es wurde die Bindung von SP1 am humanen *GSTA1*-Promotor festgestellt [338] sowie die Bedeutung von SP1 für die Expression der humanen *GSTP1* [339] und der murinen *GSTM2* [340]. SP1 ist methylierungssensitiv [341, 342, 343] und könnte deswegen im hypomethylierten Bereich von [-780 bis -243] von Bedeutung sein. Möglicherweise ist SP1 hier an der Aufrechterhaltung des demethylierten Zustandes beteiligt. Das Ausschalten von SP1 durch Mutationen oder Deletionen zieht eine Methylierung von CpG-Bindestellen nach sich und verhindert die Bindung von anderen methylierungssensitiven Transkriptionsfaktoren an den Promotor [342, 344]. SP1 scheint eine Rolle bei der Grundexpression aber auch bei der Transkriptionsverstärkung durch die SPI-Diät eine Rolle zu spielen. Es bindet an die für die Grundexpression potentiell wichtigen CpGs 5, 14 und 17, aber auch an der CpG-Stelle 13, welche in der SPI-Gruppe in das Cluster 1.1 übergeht und hier mit der Expression korreliert.

**Die CpG-Stelle 15**, in der Position -732, ist im Mittelwert nur zu 6 % methyliert. Die Methylierungsstelle 15 überlagert mit der potentiellen Bindestelle für den Transkriptionsfaktor USF (*Upstream Response Element*). USF wurde als Transkriptionsfaktor bei Genen des Cholesterol- und Fettsäuremetabolismus beschrieben. Veränderungen in der USF-Aktivität, in Verbindung mit dem Cholesterol- und Fettsäuremetabolismus, trägt zum metabolischen Syndrom bei [345, 346]. USF wird durch die MAP-Kinase p38 durch Phosphorylierung aktiviert. [347].

Die Kinase p38 wiederum wird durch Stress wie oxidativen Stress induziert [348, 349, 350, 351]. Auf Grund der Induzierbarkeit des Transkriptionsfaktors USF durch oxidativen Stress, ist er ein möglicher regulatorischer Faktor für die *GSTA1*-Transkription, von der gezeigt wird, dass sie durch oxidativen Stress induzierbar ist [25]. Die Notwendigkeit von USF für die *GSTA1*-Expression würde die starke Demethylierung der CpG-Stelle 15 erklären.

Auf der **CpG-Stelle 7** im hypermethylierten Bereich, befindet sich die potentielle Bindestelle für den Glukokortikoidrezeptor (GR). GR spielt eine Rolle bei der Aktivierung von antiinflammatorischen Genen, zu denen auch die Gene der oxidativen Stressantwort zählen [352]. Die Aktivierung des GR erfolgt durch Glukokortikoide, die einer Entzündungsreaktion entgegenwirken. Der aktivierte GR wandert in den Nukleus und bindet dort an der sogenannten GRE (*Glukokortikoid Response Element*) -Region im Promotor. Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Coaktivatoren mit Histonacetylierungsaktivität [353, 354]. Die Acetylierung der Histone führt zur Auflockerung der Chromatinstruktur, was die Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren ermöglicht, wodurch die Transkription angeschaltet bzw. verstärkt wird [355]. Das Erscheinen von CpG 7 im Cluster 1.1 der SPI-Gruppe (welches mit der Expression in Verbindung steht) sowie der hohen Korrelation mit der Expression deutet darauf hin, dass die Bindung von GR für eine verstärkte Transkription notwendig ist.

Im hypomethylierten Bereich des *GSTA1*-Promotors [-780 bis -243], außerhalb der CpG-Methylierungsstellen, gibt es mögliche Bindesequenzen für Transkriptionsfaktoren, die in der Literatur als potentielle Regulatoren für die Glutathion-S-Transferase-Expression diskutiert werden. In Betracht gezogen werden die Transkriptionsfaktoren AP1 (Activating protein-1), NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) und SP1 [338, 356].

Im humanen *GSTA1*-Gen konnte die Bindung von SP1 an seine Bindestelle in der Position -52 nachgewiesen werden [356]. Ebenso die SP1-vermittelte Aktivierung der humanen GSTP1 (ein verwandtes Protein der *GSTA1*), durch die Bindung an der Position [-57 bis -49] [339]. Eine SP1-Bindestelle in der Position -56 ist auch im untersuchten porcinen *GSTA1*-Promotor zu finden. Möglicherweise trägt sie hier zur Expressionsregulation bei.

Eine regulatorische Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1 mit der Bindungssequenz in Position [-75 bis -65] wurde beim humanen *GSTP1*-Gen gezeigt [357]. Eine AP1-Erkennungssequenz in der Position [-75 bis -65], ist auch in dem hier untersuchten porcinen *GSTA1*-Gen zu finden. Damit kann eine regulatorische Aktivität von AP1 für die Expression der porcinen *GSTA1* in Betracht gezogen werden. AP1 ist ein ubiquitäres regulatorisches Protein, welches die Transkription von Genen als Antwort auf Stimuli aus der Umwelt aktiviert [358].

Weiterhin wird in der Literatur eine Funktion des Transkriptionsfaktors NF-

$\kappa$ B bei der Glutathion-S-Transferase-Expression beschrieben [358]. Im porcinen *GSTA1*-Promotor gibt es im hypomethylierten Bereich eine Bindestelle für NF $\kappa$ B in der Position [-359 bis -350]. NF- $\kappa$ B wird infolge zellulärer Stressbedingungen aktiviert [203, 359, 360] und ist ein Transkriptionsfaktor der eine Vielzahl von Genen reguliert, die an der Steuerung von immunologischen und inflammatorischen Prozessen beteiligt sind [361].

Von den Transkriptionsfaktoren AP1 und NF- $\kappa$ B gibt es zahlreiche Studien die zeigen, dass sie durch oxidativen Stress induziert werden [362, 363, 364, 365, 366, 367]. Damit wird die Annahme verstärkt, dass AP1 und NF- $\kappa$ B an der Induktion der porcinen *GSTA1*-Expression durch oxidativen Stress beteiligt sind.



## 7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine vorübergehende Fütterung einer Diät mit unausgewogenem Aminosäuremuster (Soja Protein Isolat, SPI), im Vergleich zu einer Diät mit ausgewogenem Aminosäuregehalt (Casein, CAS), zu langanhaltenden Effekten auf die oxidative Stressantwort führt und ob dies mit Veränderungen in der hepatischen Genexpression und verändertem Wachstum in juvenilen Schweinen assoziiert ist. Eine andauernde erhöhte oxidative Stressreaktion, verursacht durch die temporäre SPI-Diät, ist ein möglicher molekularer Mechanismus für eine andauernde diätinduzierte Beeinträchtigung des Wachstums in heranwachsenden Schweinen. Darüber hinaus wurde die DNA-Methylierung als möglicher Mechanismus einer langanhaltend veränderten Genexpression untersucht.

Die Persistenz der mit dem oxidativen Stress assoziierten Expression von Genen der oxidativen Stressantwort und der Wachstumsentwicklung wurde an heranwachsenden Schweinen untersucht, die vier Wochen lang mit der SPI-Diät gefüttert wurden (78.-106. Lebenstag) und anschließend die vierwöchige CAS-Vollwertdiät erhalten haben (106.-133. Lebenstag). Die Kontrollgruppe bekam ausschließlich die CAS-Diät. Die Analyse der Transkriptionsraten mittels Echtzeit RT-PCR zeigte, dass die temporäre Fütterung der SPI-Diät, im Vergleich zur CAS-Diät, zu langanhaltenden Aufregulationen von Genen der oxidativen Stressantwort führt (Glutathion-S-Transferase A1, *GSTA1*; Methionin-Sulfoxid-Reduktase A, *MSRA*; Calnexin, *CANX*; Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1, *HSF1*; Organisches Anionentransport-Polypeptid 2, *OATP2*).

Die andauernden erhöhten Transkriptionsraten der untersuchten Gene der oxidativen Stressantwort korrelierten signifikant mit der hier beobachteten persistent verminderten Körpermasseentwicklung der temporär SPI-gefütterten Schweine. Die hepatischen Transkriptionsniveaus von Genen der oxidativen Stressantwort (*GSTA1*, *MSRA*, *CANX*, *HSF1*, *OATP2*) sind negativ mit dem Körpergewicht der heranwachsenden Schweine korreliert ( $r = -0,49$  bis  $-0,82$ ;  $P < 0,05$ ). Damit wurde die anhaltende oxidative Stressreaktion als ein molekularer Mechanismus für eine SPI-diätassoziierte Wachstumsminde rung bei juvenilen Schweinen identifiziert.

Eine mögliche molekulare Ursache der langanhaltenden diätassoziierten Veränderungen der Expression der in den oxidativen Stress involvierten Gene ist die DNA-Methylierung. Eine DNA-Demethylierung in den Promotoren ist mit gesteigerter Genexpression assoziiert. Die Methylierung der gesamten hepatischen DNA und die hepatische Methylierung von CpG-Dinukleotiden innerhalb des *GSTA1*-Promotorbereiches erfolgte an juvenilen Schweinen, die direkt im Anschluss an eine vierwöchige SPI-Diät (78.-106. Lebenstag) geschlachtet wurden. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich die CAS-Diät.

Die gesamte hepatische DNA-Methylierung von CpG-Inseln, die mit der *Cytosin Extension*-Methode durch den Einsatz des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *Bss*HII und anschließend auffüllen mit  $[3H]dCTP$  untersucht wurde, war in den SPI-gefütterten juvenilen Schweinen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $1327,1 \pm 169,75$  dpm gegen  $1208,0 \pm 81,51$  dpm,  $P < 0,0006$ ). Dies weist auf eine SPI-induzierte DNA-Demethylierung und auf die Methylierung als molekularen Mechanismus langanhaltender Veränderungen der hepatischen Genexpression hin.

Für die Untersuchung, ob die DNA-Methylierung mit der oxidativen Stressantwort assoziiert ist, wurden die Methylierungsraten von 21 CpG-Stellen im Promotorbereich [-1812 bis -1] der porcinen *GSTA1*, einem Indikatorgen der oxidativen Stressantwort, untersucht. Die Bestimmung der CpG-Methylierung erfolgte über eine Messung des Anteils von zu Thymin konvertierten nichtmethylierten Cytosinresten PCR-amplifizierter bisulfitbehandelter DNA mit der Pyrosequenzierung<sup>TM</sup>. Die Analyse der Daten ergab, dass die erhöhte hepatische Transkriptionsrate der *GSTA1* infolge der SPI-Diät nicht auf eine signifikant reduzierte Methylierung einzelner CpG-Methylierungsstellen zurückzuführen ist, sondern auf eine geringfügig verminderte Gesamtmethylierung aller CpG-Orte innerhalb der *GSTA1*-Promotorregion [-1812 bis -1]. Die Anzahl unterdurchschnittlich methylierter CpG-Orte des *GSTA1*-Promotors sind hoch signifikant mit dem hepatischen *GSTA1*-Transkriptionsniveau korreliert ( $B = 0,85$ ). Damit konnte die DNA-Methylierung als molekularer Mechanismus langanhaltender Diät-assoziiierter Veränderungen der Genexpression wahrscheinlich gemacht werden.

Das signifikant verringerte hepatische *DNMT1*-Transkriptionsniveau der SPI-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $276,6 \pm 169,63$  gegen  $1194,1 \pm 669,39$  Kopien/ $\mu g$  RNA;  $P < 0,004$ ), welches über Echtzeit RT-PCR ermittelt wurde, weist darauf hin, dass das verminderte DNMT1-Transkriptionsniveau eine notwendige Voraussetzung für die Abnahme der DNA-Methylierung darstellt, aber nicht die tierspezifischen Unterschiede erklärt. Eine direkte Korrelation der stark vermindert-

ten *DNMT1*-Transkriptionsniveaus bei den SPI-gefütterten Tieren mit der erhöhten *GSTA1*-Expression konnte nicht festgestellt werden. Möglicherweise spielen zusätzliche Faktoren eine Rolle, die den Zugang der DNMT1 an spezifische chromosomale Regionen beeinflussen können.

Wir vermuten, dass der ausgeprägte Methioninmangel der SPI-Diät (mehr als 50 % methioninreduziert im Vergleich zur CAS-Diät) die mögliche Ursache für die hier beobachtete SPI-bedingte persistent veränderte hepatische Expression von Genen der oxidativen Stressantwort in heranwachsenden Schweinen ist. Methionin ist der Vorläufer von S-Adenosylmethionin (SAM), dem generellen biologischen Methylendonator. DNA-Hypomethylierung von CpG-Dinukleotiden, die vermutlich durch eine reduzierte Konzentration an S-Adenosylmethionin hervorgerufen werden, können zu Veränderungen in der Genexpression führen, ohne die Primärsequenz der DNA zu verändern.





## 8. SUMMARY

The present study was conducted to study whether a temporary consumption of a soy protein isolate (SPI) based diet as compared to a casein (CAS) based diet results in persistent effects on oxidative stress response and whether these alterations are associated with changes in hepatic gene expression patterns and growth in juvenile pigs. The SPI diet is characterized by an imbalanced amino acid pattern, the CAS control diet has a balanced amino acid composition. A raised oxidative stress reaction as a result of the temporary SPI diet is a possible mechanism for a prolonged diet-induced growth retardation in juvenile pigs. Furthermore, the DNA methylation was investigated as a possible mechanism for persistent changes in gene expression.

The persistence of oxidative stress associated hepatic gene expression and growth was investigated in growing pigs upon temporary consumption of the SPI diet for four weeks (at age 78-106 days) and subsequent switch-back to CAS diet (at age 106-133 days). At age 133 days the pigs were killed. The control animals were chronically fed CAS diet. Transcription analysis by real time RT-PCR showed that temporary feeding of SPI diet to growing pigs resulted in prolonged up-regulation of genes involved in oxidative stress response (glutathione-S-transferase A1, *GSTA1*; methionine-sulfoxide-reductase A, *MSRA*; calnexin, *CANX*; heat shock transcription factor 1, *HSF1*; organic anion transport polypeptide 2, *OATP2*) as compared to the CAS diet.

The persistent diet associated elevation of oxidative stress response was significantly associated with growth retardation observed here. Hepatic transcript levels of the genes involved in oxidative stress response (*GSTA1*, *MSRA*, *CANX*, *HSF1*, *OATP2*) were negatively correlated with body weight in growing pigs ( $r = -0,49$  to  $-0,82$ ;  $P < 0,05$ ). These findings identified the SPI diet associated prolonged oxidative stress response as a molecular mechanism of persistent growth retardation in juvenile pigs.

DNA methylation is a possible mechanism for diet associated persistent alterations of hepatic expressions of genes involved in oxidative stress response. In pro-

motor regions DNA methylation is negative correlated with gene expression. The entire hepatic DNA methylation and hepatic methylation of cytosine sites in CpG dinucleotides within the [-1812 to -1] *GSTA1* promotor region was investigated in growing pigs, which were fed the SPI diet for four weeks (at age 78-106 days), after this the pigs were killed. The control animals were chronically fed CAS diet.

The entire hepatic DNA methylation of CpG islands studied by the “cytosine extension method” using the methylation sensitive restriction enzyme *Bss*HII, was significantly lower in SPI fed animals according to the significantly higher mean [<sup>3</sup>H]dCTP incorporation in *Bss*HII digested DNA of pigs fed the SPI diet in comparison with CAS fed animals ( $1327,1 \pm 169,75$  dpm to  $1208,0 \pm 81,51$  dpm,  $P < 0,0006$ ). These indicates a SPI induced DNA demethylation and DNA methylation as a possible mechanism of prolonged changes in hepatic gene expression.

To study DNA methylation associated with oxidative stress response we have quantified methylation rate (proportion of C residues of quantified T and C residues) at 21 CpG sites within the porcine *GSTA1* promotor region [-1812 to -1] by quantitative methyl-single nucleotide analysis with Pyrosequencing™ after bisulphite PCR. Statistical analysis of the individual CpG site methylation rate reveal that increased hepatic transcript levels are not due to significantly reduced methylation rate of distinct CpG sites, but to insignificantly decreased predominantly below-average methylation rates of all CpG-sites within the [-1812 to -1] *GSTA1* promotor region. The number of below-average methylated CpG sites is significant correlated with *GSTA1* transcription ( $B = 0,80$ ). This reveals the DNA methylation as a potential molecular mechanism for diet associated persistent changes in gene expression.

The significantly lower hepatic DNMT1 transcript level in pigs permanently fed SPI diet in comparison to CAS fed pigs ( $276,6 \pm 169,63$  to  $1194,1 \pm 669,39$  cyps/μg RNA;  $P < 0,004$ ) indicates the decreased *DNMT1* transcript level as a condition for DNA demethylation but it does not explain animal specific response. There is no direct correlation between significant lowered DNMT1 transcription levels and elevated *GSTA1* expression rates in SPI fed animals. Likely, there are other yet unknown components to the maintenance process as factors that modify access of DNMT1 to specific chromosomal regions.

We assume that the deficient methionine supply due to the SPI diet (less than half concentration of methionine as compared to the CAS diet) could explain the observed hepatic long term gene expression alterations in growing pigs. Methionine is the precursor for S-adenosylmethionine (SAM), the principal biological

methyl donor. Hypomethylation of DNA, as suggested by a reduced concentration of S-adenosylmethionine, at cytosine sites in CpG dinucleotides can lead to changes in gene expression and function without altering the primary sequence of DNA.



## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Koletzko B, Aggett PJ, Bindels JG, Bung P, Ferré P, Gil A, Lentze MJ, Roberfroid M, and Strobel S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *Br J Nutr.*, 80:S5–S45, 1998.
- [2] Newnham JP, Moss TJ, Nitsos I, Sloboda DM, and Challis JR. Nutrition and the early origins of adult disease. *Asia Pac J Clin Nutr.*, 11:537–542, 2002.
- [3] Holemans K, Aerts L, and Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig.*, 10:392–399, 2003.
- [4] Bertram CE and Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull.*, 60:103–121, 2001.
- [5] Barker DJ. Mothers, babies and disease in later life. *London: BMJ Publishing Group, London, ISBN 0727908359*, 1994.
- [6] Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, and Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Twin Res.*, 5:293–298, 2001.
- [7] Holness MJ, Langdown ML, and Sugden MC. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of type 2 diabetes mellitus. *Biochem J.*, 3:657–665, 2000.
- [8] Waterland Robert A and Garza Cutberto. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr.*, 69:179–197, 1999.
- [9] Barker DJ. Mothers, babies and disease in later life. *Edinburgh: Harcourt Brace and Co Ltd*, 1998.
- [10] Rolland-Cachera MF, Deheeger M, and Akrouit M andBellisle F. Influence of macronutrients on adiposity development: a follow up study of nutrition

- and growth from 10 months to 8 years of age. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 19:573–578, 1995.
- [11] Close WH, Berschauer F, and Heavens RP. The influence of protein: energy value of the ration and level of feed intake on energy and nitrogen metabolism of growing pig: energymetabolism. *Br J Nutr.*, 49:255–269, 1983.
- [12] Kim S-H, Mauron J, Gleason R, and Wurtman R. Selection of carbohydrate to protein ratio and correlations with weight gain and body fat in rats allowed three dietary choices. *Internat J Vit Nutr Res.*, 61:166–179, 1991.
- [13] Ozanne SE and Hales CN. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab.*, 13:2002, 368.
- [14] Godfrey KM. and Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.*, 71:1344–1352, 2000.
- [15] Barker DJ. and Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod.*, 2:105–112, 1997.
- [16] Lucas A. Programming by early nutrition: An experimental approach. *Symposium: The Effects of Childhood diet on adult health and disease*, 1:401–406, 1998.
- [17] Barker DJ. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull.*, 60:69–88, 2001.
- [18] Ozanne SE. Programming of hepatic and peripheral tissue insulin sensitivity by maternal protein restriction. *Biochem Soc Trans.*, 27:94–97, 1999.
- [19] Kalkhoff RK. Impact of maternal fuels and nutritional state on fetal growth. *Diabetes*, 40:61–65, 1991.
- [20] Roach HI Mehta Gand, Langley-Evans S, Taylor P, Reading I, Oreffo RO, Aihie-Sayer A, Clarke NM, and Cooper C. Intrauterine exposure to a maternal low protein diet reduces adult bone mass and alters growth plate morphology in rats. *Calcif Tissue Int.*, 71:493–498, 2002.
- [21] Loehrke B, Saggau E, Schadereit R, Beyer M, Bellmann O, Kuhla S, and Hagemeister H. Activation of skeletal muscle protein breakdown following consumption of soyabean protein in pigs. *Br J Nutr.*, 85:447–457, 2001.
- [22] Saggau E, Schadereit R, Beyer M, Susenbeth A, Voigt J, and Hagemeister H. Effects of dietary protein qualities on protein turnover in growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.*, 84:29–42, 2000.

- 
- [23] Desai M, Byrne CD, Meeran K, Martenz ND, Bloom SR, and Hales CN. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am J Physiol.*, 273:G899–G904, 1997.
- [24] Junghans P, Beyer M, Saggau E, Derno M, Jentsch W, Voigt J, and Hennig U. Estimate of the postabsorptive protein and fat metabolism in growing pigs after long-term feeding of diets with soy protein isolate or casein using a <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-amino acid approach. *Proceedings of the 14th Symposium on Energy Metabolism of Farm Animals, 14.09 - 20.09.97, Newcastle, Northern Ireland*. In: McCracken KJ; Unsworth EF; Wylie ARG eds. *Energy metabolism in farm animals*. Wallingford CAB International, 1:181–184, 1998.
- [25] Schwerin M, Dorroch U, Beyer M, Swalve H, Metges CC, and Junghans P. Dietary protein modifies hepatic gene expression associated with oxidative stress responsiveness in growing pigs. *FASEB J.*, 16:1322–1341, 2002.
- [26] Franco Mdo C, Dantas AP, Akamine EH, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Tostes RC, Carvalho MH, and Nigro D. Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 40:501–509, 2002.
- [27] Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, and Walker M. Tracing the origins of fetal origins of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses.*, 66:38–44, 2006.
- [28] Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, and Brochu M. Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol.*, 565:197–205, 2005.
- [29] Waterland R and Garza CG. Potential for metabolic imprinting by nutritional perturbation of epigenetic gene regulation. In: *Public health issues in infant and child nutrition* (Black, R and Michaelson KF, eds.), Lippincott Williams and Wilkins, New York, 48:317–333, 2002.
- [30] Bruhat A, Jousse C, and Farfournoux P. Amino acid limitation regulates gene expression. *Proc Nutr Soc.*, 58:625–632, 1999.
- [31] Farfournoux P, Bruhat A, and Jousse C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J.*, 351:1–12, 2000.
- [32] Hesketh JE, Vasconcelos MH, and Bermanno G. Regulatory signals in messenger rna: determinants of nutrient-gene interaction and metabolic compartmentation. *Brit J Nutr.*, 80:307–321, 1998.

- [33] Davey C, Pennings S, and Allan J. CpG methylation remodels chromatin structure in vitro. *J Mol Biol.*, 267:276–288, 1997.
- [34] Meehan R, Lewis J, Cross S, Nan X, Jeppesen P, and Bird A. Transcriptional repression by methylation of cpg. *J Cell Sci Suppl.*, 16:9–14, 1992.
- [35] Owens JA, Owens PC, and Robinson JS. Experimental fetal growth retardation: Metabolic and endocrine aspects. In: *Gluckman PD, Johnston BM, Nathanielsz PW, editors. Research in perinatal medicine (VIII). Advances in fetal physiology: reviews in honor of G.C. Liggins. Ithaca (New York)Perinatology Press*, 1:263–286, 1989.
- [36] Aerts L and Van Assche FA. Intra-uterine transmission of disease. *Placenta.*, 24:905–911, 2003.
- [37] Lucas A, Baker BA, Desai M, and Hales CN. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *Br J Nutr.*, 76:605–612, 1996.
- [38] Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab.*, 13:364–368, 2002.
- [39] Greenwood PL and Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod Suppl.*, 61:195–206, 2003.
- [40] Fowden AL and Hill DJ. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br Med Bull.*, 60:123–142, 2001.
- [41] Hill DJ and Duvillie B. Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatr Res.*, 48:269–274, 2000.
- [42] Bertram CE and Hanson MA. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction.*, 124:459–467, 2002.
- [43] Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL, and Nave BT. Impaired pi 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 280:E534–539, 2001.
- [44] Fowden AL and Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction.*, 127:515–526, 2004.
- [45] Fowden AL. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev.*, 7:351–363, 1995.
- [46] Harding JE and Johnston BM. Nutrition and fetal growth. *Reprod Fertil Dev.*, 7:539–547, 1995.



- 
- [47] McCance RA. Critical periods of growth. *Proc Nutr Soc.*, 35:309–313, 1976.
- [48] Widdowson EM. Cellular growth and function. *Proc Nutr Soc.*, 35:357–362, 1976.
- [49] Campbell AG, Dawes GS, Fishman AP, and Hyman AI. Regional redistribution of blood flow in the foetal lamb. *J Physiol.*, 191:120P–121P, 1967.
- [50] Rudolph AM. The fetal circulation and its response to stress. *J Dev Physiol.*, 6:11–19, 1984.
- [51] Khan IY, Lakasing L, Poston L, and Nicolaides KH. Fetal programming for adult disease: where next? *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 13:292–299, 2003.
- [52] Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, and Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome x): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.*, 36:62–67, 1993.
- [53] Prabhakaran D and Anand SS. The metabolic syndrome: an emerging risk state for cardiovascular disease. *Vasc Med.*, 9:55–68, 2004.
- [54] McLaughlin T, Allison G, Abbasi F, Lamendola C, and Reaven G. Prevalence of insulin resistance and associated cardiovascular disease risk factors among normal weight, overweight, and obese individuals. *Metabolism.*, 53:495–499, 2004.
- [55] El-Atat F, McFarlane SI, and Sowers JR. Diabetes, hypertension, and cardiovascular derangements: pathophysiology and management. *Curr Hypertens Rep.*, 6:215–223, 2004.
- [56] Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med.*, 6:11–18, 2003.
- [57] HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn.*, 200:163–175, 1994.
- [58] Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ, and Malaisse WJ. Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology.*, 136:2631–2634, 1995.
- [59] Dahri S, Reusens B, Remacle C, and Hoet JJ. Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. *Proc Nutr Soc.*, 54:345–356, 1995.

- [60] Heywood WE, Mian N, Milla PJ, and Lindley KJ. Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin Sci*, 107:37–45, 2004.
- [61] Barja-Fidalgo C, Souza EP, Silva SV, Rodrigues AL, Anjos-Valotta EA, Sannomyia P, DeFreitas MS, and Moura AS. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res.*, 52:470–476, 2003.
- [62] Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, and Delemarre van de Waal HA. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res.*, 48:803–807, 2000.
- [63] Aalinkeel R, Srinivasan M, Song F, and Patel MS. Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 281:E640–648, 2001.
- [64] Srinivasan M, Laychock SG, Hill DJ, and Patel MS. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp Biol Med.*, 228:12–23, 2003.
- [65] Bertin E, Gangnerau MN, Bellon G, Bailbe D, Arbelot De Vacqueur A, and Portha B. Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 283:R623–630, 2002.
- [66] Joannette EA, Reusens B, Arany E, Thyssen S, Remacle RC, and Hill DJ. Low-protein diet during early life causes a reduction in the frequency of cells immunopositive for nestin and cd34 in both pancreatic ducts and islets in the rat. *Endocrinology.*, 145:3004–3013, 2004.
- [67] Snoeck A, Remacle C, Reusens B, and Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate.*, 57:107–118, 1990.
- [68] Hales CN, Desai M, Ozanne SE, and Crowther NJ. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.*, 24:341–350, 1996.
- [69] Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, and Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes*, 40:115–120, 1991.

- 
- [70] Wilson MR and Hughes SJ. The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J Endocrinol.*, 154:177–185, 1997.
- [71] Sener A, Reusens B, Remacle C, Hoet JJ, and Malaisse WJ. Nutrient metabolism in pancreatic islets from protein malnourished rats. *Biochem Mol Med*, 59:62–67, 1996.
- [72] Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, and Hales CN. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res.*, 2:139–143, 2001.
- [73] Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, Hartil K, Petry CJ, Buckley AJ, and Mosthaf-Seedorf L. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase c zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol.*, 177:235–241, 2003.
- [74] Holness MJ. Impact of early growth retardation on glucoregulatory control and insulin action in mature rats. *Am J Physiol.*, 270:E946–954, 1996.
- [75] Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry CJ, Lucas A, and Hales CN. Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am J Physiol.*, 272:G1083–90, 1997.
- [76] Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, Going TC, and Bailey RA. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.*, 100:1768–1774, 1997.
- [77] Holness MJ, Priestman DA, and Sugden MC. Impact of protein restriction on the regulation of cardiac carnitine palmitoyltransferase by malonyl-coa. *J Mol Cell Cardiol.*, 30:1381–1390, 1998.
- [78] Langley-Evans SC. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *nt J Food Sci Nutr.*, 51:11–17, 2000.
- [79] Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, and Hales CN. Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clin Sci (Lond).*, 93:147–52, 1997.
- [80] Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, and Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development.*, 127:4195–4202, 2000.

- 
- [81] Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, and Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, 142:2841–2853, 2001.
- [82] Langley-Evans SC, Gardner DS, and Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr*, 126:1578–1585, 1996.
- [83] Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, and Seckl JR. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*, 17:169–172, 1996.
- [84] Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soye C, Seth D, and Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287:F262–726, 2004.
- [85] Sherman RC, Jackson AA, and Langley-Evans SC. Long-term modification of the excretion of prostaglandin e(2) by fetal exposure to a maternal low protein diet in the rat. *Ann Nutr Metab*, 43:98–106, 1999.
- [86] Rasch R, Woods LL, Weeks DA. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*, 65:1339–1348, 2004.
- [87] Oreffo RO, Lashbrooke B, Roach HI, Clarke NM, and Cooper C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*, 33:100–107, 2003.
- [88] Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, and Yang K. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in the offspring of maternal protein restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288:E663 – E673, 2005.
- [89] Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, and Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*, 563:275–284, 2005.
- [90] El-Khattabi I, Gregoire F, Remacle C, and Reusens B. Isocaloric maternal low-protein diet alters igf-i, igfbps, and hepatocyte proliferation in the fetal rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285:E991–E1000, 2003.

- 
- [91] Poore KR and Fowden AL. Insulin sensitivity in juvenile and adult large white pigs of low and high birthweight. *Diabetologia.*, 47:340–348, 2004.
- [92] Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, and Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol.*, 270:E559–564, 1996.
- [93] Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, and Hales CN. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans.*, 23:331–335, 1995.
- [94] Sparre T, Reusens B, Cherif H, Larsen MR, Roepstorff P, Fey SJ, Mose Larsen P, Remacle C, and Nerup. Intrauterine programming of fetal islet gene expression in rats—effects of maternal protein restriction during gestation revealed by proteome analysis. *Diabetologia.*, 46:1497–1511, 2003.
- [95] Franco Mdo C, Dantas AP, Akamine EH, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Tostes RC, Carvalho MH, and Nigro D. Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 40:501–9, 2002.
- [96] Klatt P and Lamas S. Regulation of protein function by s-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.*, 267:4928–4944, 2000.
- [97] Beckman KB and Ames BN. Oxidative decay of dna. *J Biol Chem.*, 272:19633–19636, 1997.
- [98] Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.*, 41:1819–1828, 1995.
- [99] Esterbauer H and Ramos P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of ldl. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 127:31–64, 1996.
- [100] Berlett BS and Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.*, 272:20313–20316, 1997.
- [101] Napoli C and Palinski W. Neurodegenerative diseases: insights into pathogenic mechanisms from atherosclerosis. *Neurobiol Aging.*, 26:293–302, 2005.
- [102] Racasan S, Braam B, van der Giezen DM, Goldschmeding R, Boer P, Koomans HA, and Joles JA. Perinatal l-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.*, 44:83–88, 2004.

- [103] Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, and Butterfield DA. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for alzheimer's a beta(1–42) and a beta(25–35). *J Am Chem Soc.*, 123:5625–5631, 2001.
- [104] Aslan M and Ozben T. Reactive oxygen and nitrogen species in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.*, 1:111–119, 2004.
- [105] Heininger K. A unifying hypothesis of alzheimer's disease. iv. causation and sequence of events. *Department of Neurology*, 11:213–328, 2000.
- [106] Mandel S, Packer L, Youdim MB, and Weinreb O. Proceedings from the third international conference on mechanism of action of nutraceuticals. *J Nutr Biochem.*, 16:513–520, 2005.
- [107] Hald A and Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol.*, 193:279–90, 2005.
- [108] Maguire-Zeiss KA, Short DW, and Federoff HJ. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in parkinson's disease? *Brain Res Mol Brain Res.*, 134:18–23, 2005.
- [109] Karatas F, Ozates I, Canatan H, Halifeoglu I, Karatepe M, and Colakt R. Antioxidant status and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Indian J Med Res.*, 118:178–181, 2003.
- [110] Yardim-Akaydin S, Sepici A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B, and Sepici V. Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radic Res.*, 38:623–628, 2004.
- [111] Tarwadi K and Agte V. Linkages of antioxidant, micronutrient, and socioeconomic status with the degree of oxidative stress and lens opacity in indian cataract patients. *Nutrition.*, 20:261–7, 2004.
- [112] Marsili S, Salganik RI, Albright CD, Freel CD, Johnsen S, Peiffer RL, and Costello MJ. Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress. *Exp Eye Res.*, 79:595–612, 2004.
- [113] Drake AJ and Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol.*, 180:1–16, 2004.
- [114] Hoet JJ and Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol.*, 514:617–627, 1999.
- [115] Hackman E, Emanuel I, van Belle G, and Daling J. Maternal birth weight and subsequent pregnancy outcome. *JAMA.*, 250:2016–2019, 1983.

- 
- [116] Carr-Hill R, Campbell DM, Hall MH, and Meredith A. Is birth weight determined genetically? *Br Med J (Clin Res Ed)*., 295:687–689, 1987.
- [117] Klebanoff MA, Meirik O, and Berendes HW. Second-generation consequences of small-for-dates birth. *Pediatrics*., 84:343–347, 1989.
- [118] Emanuel I, Filakti H, Alberman E, and Evans SJ. Intergenerational studies of human birthweight from the 1958 birth cohort. 1. evidence for a multigenerational effect. *Br J Obstet Gynaecol*., 99:67–74, 1992.
- [119] Dhawan S. Birth weights of infants of first generation asian women in britain compared with second generation asian women. *BMJ*., 311:86–88, 1995.
- [120] Stewart RJ and Sheppard H, Preece R, and Waterlow JC. The effect of rehabilitation at different stages of development of rats marginally malnourished for ten to twelve generations. *Br J Nutr*., 43:403–412, 1980.
- [121] Patel MS and Srinivasan M. Metabolic programming: causes and consequences. *J Biol Chem*., 277:1629–1632, 2002.
- [122] Wu Ct and Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*., 293:1103–1105, 2001.
- [123] Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr*., 22:255–282, 2002.
- [124] Salzberg A, Fisher O, Siman-Tov R, and Ankri S. Identification of methylated sequences in genomic dna of adult drosophila melanogaster. *Biochem Biophys Res Commun*., 322:465–469, 2004.
- [125] Bird A. Dna methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*., 16:6–21, 2002.
- [126] Richardson B. Impact of aging on dna methylation. *Ageing Res Rev*., 2:245–261, 2003.
- [127] Reik W, Santos F, and Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*., 59:21–32, 2003.
- [128] Urnov FD. Methylation and the genome: the power of a small amendment. *J Nutr*., 132:2450S–2456S, 2002.
- [129] Meehan RR. Dna methylation in animal development. *Semin Cell Dev Biol*., 14:53–65, 2003.

- [130] Robertson KD and Jones PA. Dna methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21:461–467, 2000.
- [131] Reik W and Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.*, 2:21–32, 2001.
- [132] Sleutels F and Barlow DP. The origins of genomic imprinting in mammals. *Adv Genet.*, 46:119–163, 2002.
- [133] Ferguson-Smith AC and Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science.*, 293:1086–1089, 2001.
- [134] Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, and Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature.*, 403:501–502, 2000.
- [135] Santos F, Hendrich B, Reik W, and Dean W. Dynamic reprogramming of dna methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol.*, 241:172–82, 2002.
- [136] Brandeis M, Kafri T, Ariel M, Chaillet JR, McCarrey J, Razin A, and Cedar H. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J.*, 12:3669–3677, 1993.
- [137] T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, and Razin A. Developmental pattern of gene-specific dna methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev.*, 6:705–714, 1992.
- [138] T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, Niwa K, Kawase Y, Kono T, Matsuda Y, Fujimoto H, Shibata H, Hayashizaki Y, and Sasaki H. The paternal methylation imprint of the mouse h19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells.*, 5:649–659, 2000.
- [139] Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, and Bartolomei MS. The h19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet.*, 9:2885–2894, 2000.
- [140] Issa JP. Age-related epigenetic changes and the immune system. *Clin Immunol.*, 109:103–8, 2003.
- [141] Xie W, Han S, Khan M, and DeJong J. Regulation of alf gene expression in somatic and male germ line tissues involves partial and site-specific patterns of methylation. *J Biol Chem.*, 277:17765–17774, 2002.
- [142] Kroft TL, Jethanandani P, McLean DJ, and Goldberg E. Methylation of cpg dinucleotides alters binding and silences testis-specific transcription directed by the mouse lactate dehydrogenase c promoter. *Biol Reprod.*, 65:1522–1527, 2001.



- 
- [143] Kusui C, Kimura T, Ogita K, Nakamura H, Matsumura Y, Koyama M, Azuma C, and Murata Y. Dna methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 289:681–686, 2001.
- [144] Grange T, Cappabianca L, Flavin M, Sassi H, and Thomassin H. In vivo analysis of the model tyrosine aminotransferase gene reveals multiple sequential steps in glucocorticoid receptor action. *Oncogene.*, 24:3028–3038, 2001.
- [145] Kudo S. Methyl-cpg-binding protein mecp2 represses sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol.*, 18:5492–5499, 1998.
- [146] Young HA, Ghosh P, Ye J, Lederer J, Lichtman A, Gerard JR, Penix L, Wilson CB, Melvin AJ, and McGurn ME. Differentiation of the t helper phenotypes by analysis of the methylation state of the ifn-gamma gene. *J Immunol.*, 153:3603–3610, 1994.
- [147] Hawkins JD. *Gene structure and expression*. Cambridge University Press, Cambridge, 2nd edition, 1991.
- [148] Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP, and Davidson NE. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' cpg islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res.*, 2:805–810, 1996.
- [149] Pfeifer K. Mechanisms of genomic imprinting. *Am J Hum Genet.*, 67:777–787, 2000.
- [150] Reik W, Dean W, and Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.*, 293:1089–1093, 2001.
- [151] Tycko B and Efstratiadis A. Genomic imprinting: piece of cake. *Nature.*, 417:913–914, 2002.
- [152] Li E, Beard C, and Jaenisch R. Role for dna methylation in genomic imprinting. *Nature.*, 366:362–365, 1993.
- [153] Park Y and Kuroda MI. Epigenetic aspects of x-chromosome dosage compensation. *Science.*, 293:1083–1085, 2001.
- [154] Csankovszki G, Nagy A, and Jaenisch R. Synergism of xist rna, dna methylation, and histone hypoacetylation in maintaining x chromosome inactivation. *J Cell Biol.*, 153:773–784, 2001.

- [155] Walter J and Paulsen M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol.*, 14:101–110, 2003.
- [156] Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, and Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol.*, 154:635–647, 1999.
- [157] Clayton-Smith J and Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet.*, 40:87–95, 2003.
- [158] Varela MC, Lopes GM, and Koiffmann CP. Prader-willi syndrome with an unusually large 15q deletion due to an unbalanced translocation t(4;15). *Ann Genet.*, 47:267–273, 2004.
- [159] Weksberg R, Smith AC, Squire J, and P. Beckwith-wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet.*, 12:R61–68, 2003.
- [160] Dao D, Walsh CP, Yuan L, Gorelov D, Feng L, Hensle T, Nisen P, Yamashiro DJ, Bestor TH, and Tycko B. Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7: inclusion of h19/igf2 in the minimal wt2 region, gene specificity of h19 silencing in wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of h19 imprinting. *Hum Mol Genet.*, 8:1337–1352, 1999.
- [161] Caron H, van Sluis P, van Hove M, de Kraker J, Bras J, Slater R, Mannens M, Voute PA, Westerveld A, and Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with n-myc amplification. *Nat Genet.*, 4:187–190, 1993.
- [162] Katz F, Webb D, Gibbons B, Reeves B, McMahon C, Chessells J, and Mitchell C. Possible evidence for genomic imprinting in childhood acute myeloblastic leukaemia associated with monosomy for chromosome 7. *Br J Haematol.*, 80:332–336, 1992.
- [163] Wu HK, Weksberg R, Minden MD, and Squire JA. Loss of imprinting of human insulin-like growth factor ii gene, igf2, in acute myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.*, 231:466–472, 1997.
- [164] Scrable H, Cavenne W, Ghavimi F, Lovell M, Morgan K, and Sapienza C. A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86:7480–7484, 1989.
- [165] Toguchida J, Ishizaki K, Sasaki MS, Nakamura Y, Ikenaga M, Kato M, Sugimoto M, Kotoura Y, and Yamamoto T. Preferential mutation of paternally derived rb gene as the initial event in sporadic osteosarcoma. *Nature.*, 338:156–158, 1989.

- 
- [166] Cooper DN and Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of cpg dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet.*, 83:181–188, 1989.
- [167] Bird A. The essentials of dna methylation. *Cell.*, 70:5–8, 1992.
- [168] Jones PA and Takai D. The role of dna methylation in mammalian epigenetics. *Science.*, 293:1068–1070, 2001.
- [169] Gardiner-Garden M and Frommer M. Cpg islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.*, 196:261–82, 1987.
- [170] Bird AP. Cpg-rich islands and the function of dna methylation. *Nature.*, 321:209–213, 1986.
- [171] Antequera F and Bird A. Number of cpg islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90:11995–11999., 1993.
- [172] Antequera F and Bird A. Cpg islands. *EXS.*, 64:169–185, 1993.
- [173] Bird AP and Wolffe AP. Methylation-induced repression–belts, braces, and chromatin. *Cell.*, 99:451–454, 1999.
- [174] Bird A, Taggart M, Frommer M, and Miller OJ and. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, cpg-rich dna. *Cell.*, 40:91–9, 1985.
- [175] Issa JP. Cpg-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 249:101–118, 2000.
- [176] Baylin SB and Herman JG. Dna hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.*, 16:168–174, 2000.
- [177] Stratthdee G and Brown R. Aberrant dna methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med.*, 2002:1–17, 2002.
- [178] Costello JF and Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.*, 38:285–303, 2001.
- [179] Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Muller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Muller-Holzner E, Zeimet AG and Laird PW, and Ehrlich M. Dna hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res.*, 64:4472–4480, 2004.
- [180] Pereira MA and Wang W, Kramer PM, and Tao L. Dna hypomethylation induced by non-genotoxic carcinogens in mouse and rat colon. *Cancer Lett.*, 212:145–151, 2004.

- [181] de Capoa A, Grappelli C, Volpino P, Bononi M, Musolino A, Ciardi A, Cavallaro A, and Cangemi V. Nuclear methylation levels in normal and cancerous thyroid cells. *Anticancer Res.*, 24:1495–1500, 2004.
- [182] de Capoa A, Musolino A, Della Rosa S, Caiafa P, Mariani L, Del Nonno F, Vocaturo A, Donnorso RP, Niveleau A, and Grappelli C. Dna demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep.*, 10:545–549, 2003.
- [183] Ehrlich M. Dna hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr.*, 132:2424S–2429S, 2002.
- [184] Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, and Ehrlich M. Dna hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from icf syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet.*, 89:121–128, 2000.
- [185] Venter von Zeidler S, Miracca EC, Nagai MA, and Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med.*, 14:807–811, 2004.
- [186] Kobatake T, Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, Dote H, Kikuchi T, Toyota M, Ouchida M, Aoe M, Date H, Pass HI, Doihara H, and Shimizu N. Aberrant methylation of p57kip2 gene in lung and breast cancers and malignant mesotheliomas. *Oncol Rep.*, 12:1087–1092, 2004.
- [187] Gao Y, Guan M, Su B, Liu W, Xu M, and Lu Y. Hypermethylation of the rassf1a gene in gliomas. *Clin Chim Acta.*, 349:173–179, 2004.
- [188] de Caceres II Al-Saleem T Cairns P. Dulaimi E, Hillinck J. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.*, 10:6189–6193, 2004.
- [189] Tokinaga K, Okuda H, Nomura A, Ashida S, Furihata M, and Shuin T. Hypermethylation of the rassf1a tumor suppressor gene in japanese clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 12:805–810, 2004.
- [190] Yang B, House MG, Guo M, Herman JG, and Clark DP. Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol.*, 18:412–420, 2005.
- [191] Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, Dote H, Ouchida M, Hanabata T, Aoe M, Date H, Gazdar AF, and Shimizu N. Aberrant promoter methylation

- of human dab2 interactive protein (hdab2ip) gene in lung cancers. *Int J Cancer*, 113:59–66, 2004.
- [192] Goel A, Arnold CN, Tassone P, Chang DK, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, and Boland CR. Epigenetic inactivation of runx3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer*, 112:754–759, 2004.
- [193] Ropero S, Setien F, Espada J, Fraga MF, Herranz M, Asp J, Benassi MS, Franchi A, Patino A, Ward LS, Bovee J, Cigudosa JC, Wim W, and Esteller M. Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (ext1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Hum Mol Genet.*, 13:2753–2765, 2004.
- [194] Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH, and Bose S. Pten promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer*, 112:407, 2004.
- [195] Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, Kaminishi M, Sugimura T, and Ushijima T. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.*, 64:6410–6415, 2004.
- [196] Chen T and Li E. Structure and function of eukaryotic dna methyltransferases. *Curr Top Dev Biol.*, 60:55–89, 2004.
- [197] Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by dna methylation during mammalian development. *Cell Biochem.*, 88:899–910, 2003.
- [198] Attwood JT, Yung RL, and Richardson BC. Dna methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.*, 59:241–257, 2002.
- [199] Haber DA Li E. Okano M, Bell DW. Dna methyltransferases dnmt3a and dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.*, 99:247–257, 1999.
- [200] Li E, Bestor TH, and Jaenisch R. Targeted mutation of the dna methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.*, 69:915–926, 1992.
- [201] Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, and Tajima S. Dnmt3l stimulates the dna methylation activity of dnmt3a and dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem.*, 279:27816–27823, 2004.
- [202] Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, and Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by dnmt3a and dnmt3b. *Mol Cell Biol.*, 23:5594–5605, 2003.

- [203] Hata K, Okano M, Lei H, and Li E. Dnmt3l cooperates with the dnmt3 family of de novo dna methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development.*, 129:1983–1993, 2002.
- [204] Okano M, Xie S, and Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian dna (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.*, 19:219–220, 1998.
- [205] Hermann A, Goyal R, and Jeltsch A. The dnmt1 dna-(cytosine-c5)-methyltransferase methylates dna processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem.*, 279:48350–48359, 2004.
- [206] Fatemi M, Hermann A, Gowher H, and Jeltsch A. Dnmt3a and dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of dna. *Eur J Biochem*, 269:4981–4984, 2002.
- [207] Pradhan S Jeltsch A. Fatemi M, Hermann A. The activity of the murine dna methyltransferase dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the n-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated dna. *J Mol Biol.*, 309:1189–1199, 2001.
- [208] Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, and Hirohashi S. Increased dna methyltransferase 1 (dnmt1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent dna hypermethylation of multiple cpg islands in gastric cancers. *Am J Pathol.*, 164:689–699, 2004.
- [209] Nakagawa T, Kanai Y, Saito Y, Kitamura T, Kakizoe T, and Hirohashi S. Increased dna methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.*, 170:2463–2466, 2003.
- [210] De Marzo AM, Marchi VL, Yang ES, Veeraswamy R, Lin X, and Nelson WG. Abnormal regulation of dna methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.*, 59:3855–3860, 1999.
- [211] Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, and Hirohashi S. Mutation of the dna methyltransferase (dnmt) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer Lett.*, 192:75–82, 2003.
- [212] Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, and Minna JD. Rna interference-mediated knockdown of dna methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res.*, 64:3137–3143, 2004.

- 
- [213] Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG and Herman JG, and Davidson NE. Specific inhibition of dnmt1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (er) in er-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther.*, 2:552–655, 2003.
- [214] Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, and Baylin SB. Inhibition of dna methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res.*, 63:7089–7093, 2003.
- [215] Melki JR and Clark SJ. Dna methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol.*, 12:347–57, 2002.
- [216] Leu YW, Rahmatpanah F, Shi H, Wei SH, Liu JC, Yan PS, and Huang TH. Double rna interference of dnmt3b and dnmt1 enhances dna demethylation and gene reactivation. *Cancer Res.*, 63:6110–6115, 2003.
- [217] Girault I, Tozlu S, Lidereau R, and Bieche I. Expression analysis of dna methyltransferases 1, 3a, and 3b in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res.*, 9:4415–4422, 2003.
- [218] Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, and Hirohashi. Overexpression of a splice variant of dna methyltransferase 3b, dnmt3b4, associated with dna hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99:10060–10065, 2002.
- [219] Ehrlich M. The icf syndrome, a dna methyltransferase 3b deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol.*, 109:17–28, 2003.
- [220] Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, and Tollefsbol TO. Transcriptional control of the dna methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem.*, 252:33–43, 2003.
- [221] Ng HH and Bird A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem Sci.*, 25:121–126, 2000.
- [222] Feinberg AP and Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.*, 4:143–153, 2004.
- [223] Lusser A. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr Opin Plant Biol.*, 5:437–443, 2002.
- [224] Jain PK. Epigenetics: the role of methylation in the mechanism of action of tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci.*, 983:71–83, 2003.

- [225] Nakao M. Epigenetics: interaction of dna methylation and chromatin. *Gene.*, 278:25–31, 2001.
- [226] Iguchi-Ariga SM and 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.
- [227] Tate PH and Bird AP. Effects of dna methylation on dna-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.*, 3:226–231, 1993.
- [228] Ballestar E and Wolffe AP. Methyl-cpg-binding proteins. targeting specific gene repression. *Eur J Biochem.*, 268:1–6, 2001.
- [229] Roloff TC, Ropers HH, and Nuber UA. Comparative study of methyl-cpg-binding domain proteins. *BMC Genomics.*, 4:1–9, 2003.
- [230] Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, and Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to dna containing methylated cpgs. *Cell.*, 58:499–507, 1989.
- [231] Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, and Bird A. Mbd2 is a transcriptional repressor belonging to the mecp1 histone deacetylase complex. *Nat Genet.*, 23:5–6, 1999.
- [232] Nan X, Meehan RR, and Bird A. Dissection of the methyl-cpg binding domain from the chromosomal protein mecp2. *Nucleic Acids Res.*, 21:4886–4892, 1993.
- [233] Nan X, Tate P, Li E, and Bird A. Dna methylation specifies chromosomal localization of mecp2. *Mol Cell Biol.*, 16:414–421, 1996.
- [234] Klose RJ and Bird AP. Mecp2 behaves as an elongated monomer that does not stably associate with the sin3a chromatin remodeling complex. *J Biol Chem.*, 279:46490–46496, 2004.
- [235] Neul JL and Zoghbi HY. Rett syndrome: a prototypical neurodevelopmental disorder. *Neuroscientist.*, 2004:118–128, 2004.
- [236] Dragich J, Houwink-Manville I, and Schanen C. Rett syndrome: a surprising result of mutation in mecp2. *Hum Mol Genet.*, 9:2365–2375, 2000.
- [237] Kimura H and Shiota K. Methyl-cpg-binding protein, mecp2, is a target molecule for maintenance dna methyltransferase, dnmt1. *J Biol Chem.*, 278:4806–4812, 2003.



- 
- [238] Feng Q, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Zhang Y. Identification and functional characterization of the p66/p68 components of the mecp1 complex. *Mol Cell Biol.*, 22:536–546, 2002.
- [239] Feng Q and Zhang Y. The mecp1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev.*, 15:827–832, 2001.
- [240] Verdin E, Dequiedt F, and Kasler HG. Class ii histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.*, 19:286–293, 2003.
- [241] Jones PL, Veenstra GJ and Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, and Wolffe AP. Methylated dna and mecp2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.*, 19:187–191, 1998.
- [242] Hendrich B and Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-cpg binding proteins. *Mol Cell Biol.*, 18:6538–6547, 1998.
- [243] Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, and Kouzarides T. Dna methyltransferase dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet.*, 24:88–91, 2000.
- [244] Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, and Robertson KD. Dnmt3b interacts with hsnf2h chromatin remodeling enzyme, hdacs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun.*, 318:544–555, 2004.
- [245] Ling Y, Sankpal UT, Robertson AK, McNally JG, Karpova T, and Robertson KD. Modification of de novo dna methyltransferase 3a (dnmt3a) by sumo-1 modulates its interaction with histone deacetylases (hdacs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res.*, 32:598–610, 2004.
- [246] Rountree MR, Bachman KE, and Baylin SB. Dnmt1 binds hdac2 and a new co-repressor, dmap1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet.*, 25:269–277, 2000.
- [247] Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, and Wolffe AP. Dnmt1 forms a complex with rb, e2f1 and hdac1 and represses transcription from e2f-responsive promoters. *Nat Genet.*, 25:338–42, 2000.
- [248] Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, and Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.*, 20:2536–2544, 2001.

- [249] Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev.*, 12:198–209, 2002.
- [250] Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, and Kouzarides T. The methyl-cpg-binding protein mecp2 links dna methylation to histone methylation. *J Biol Chem.*, 278:4035–4040, 2003.
- [251] Sarraf SA and Stancheva I. Methyl-cpg binding protein mbd1 couples histone h3 methylation at lysine 9 by setdb1 to dna replication and chromatin assembly. *Mol Cell.*, 15:595–605, 2004.
- [252] Johanning GL, Heimbürger DC, and Piyathilake CJ. Dna methylation and diet in cancer. *J Nutr.*, 132:3814S–3818S, 2002.
- [253] Waterland RA and Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition.*, 20:63–68, 2004.
- [254] Mathers JC. Nutrition and cancer prevention: diet-gene interactions. *Proc Nutr Soc.*, 62:605–610, 2003.
- [255] Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, and Wainfan E. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis.*, 14:551–557, 1993.
- [256] Wainfan E and Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on dna methylation and gene expression. *Cancer Res.*, 52:2071s–2077s, 1992.
- [257] Okoji RS, Yu RC, Maronpot RR, and Froines JR. Sodium arsenite administration via drinking water increases genome-wide and ha-ras dna hypomethylation in methyl-deficient c57bl/6j mice. *Carcinogenesis.*, 23:777–785, 2002.
- [258] Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, and Colditz GA nad Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst.*, 87:265–273, 1995.
- [259] Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, Speizer FE, and Willett WC. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst.*, 85:875–884, 1993.
- [260] Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, and Selhub J. A common

- mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic dna methylation through an interaction with folate status. *PNAS*, 99:5606–5611, 2002.
- [261] Jhaveri MS, Wagner C, and Trepel JB. Impact of extracellular folate levels on global gene expression. *Mol Pharmacol.*, 60:1288–1295, 2001.
- [262] Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, and Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted h19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.*, 62:1526–1535, 2000.
- [263] Khosla S, Dean W, Reik W, and Feil R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update.*, 7:419–427, 2001.
- [264] Waterland RA and Garza C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J Nutr.*, 132:357–364, 2002.
- [265] Waterland RA and Jirtle RL. Developmental relaxation of insulin-like growth factor 2 imprinting in kidney is determined by weanling diet. *Pediatr Res.*, 53::5A, 2003.
- [266] Waterland RA and Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.*, 23:5293–5300, 2003.
- [267] Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, and Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in avy/a mice. *FASEB J.*, 12:949–957, 1998.
- [268] Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, and Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet.*, 23:314–318, 1999.
- [269] Junghans P, Derno M, Jentsch W, Kuhla S, and Beyer M. Effect of a soy protein diet on protein and energy metabolism and organ development in protein-restricted growing pigs. *Arch Anim Nutr.*, 58:453–61, 2004.
- [270] Deutz NE, Bruins MJ, and Soeters PB. Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *J Nutr.*, 128:2435–45, 1998.
- [271] Schmitz M, Hagemeister H, and Erbersdobler HF. Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs. *J Nutr.*, 121:1575–1580, 1991.

- [272] Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, and de Jong PJ. A new bacteriophage p1-derived vector for the propagation of large human dna fragments. *Nat Genet.*, 6:84–89, 1994.
- [273] Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74:5463–5467, 1977.
- [274] Chan EY. Advances in sequencing technology. *Mutat Res.*, 573:13–40, 2005.
- [275] Pogribny I, Yi P, and James SJ. A sensitive new method for rapid detection of abnormal methylation patterns in global dna and within cpg islands. *Biochem Biophys Res Commun.*, 262:624–628, 1999.
- [276] Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J. Molecular cloning. a laboratory manual. *2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-309-6*, 1, 1989.
- [277] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, and Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual dna strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89:1827–1831, 1992.
- [278] Boyd VL and Zon G. Bisulfite conversion of genomic dna for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increased throughput. *Anal Biochem.*, 326:278–280, 2004.
- [279] Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, and Clark SJ. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods.*, 27:101–107, 2002.
- [280] Grunau C, Clark SJ, and Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.*, 29:E65 4–7, 2001.
- [281] Dahl HH and Hutchison WM. Analysis of in vivo methylation. *Methods Mol Biol.*, 130:47–57, 2000.
- [282] Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, and Krahe R. Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of cpg sites. *Biotechniques.*, 35:146–150, 2003.
- [283] Tost J, Dunker J, and Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in cpg islands by pyrosequencing. *Biotechniques.*, 35:152–156, 2003.

- 
- [284] Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on dna sequencing. *Genome Res.*, 11:3–11, 2001.
- [285] Sas/stat user's guide, version 6, fourth edition, volume 1. *SAS Institute Inc, Cary, NC*, 1, 1990.
- [286] Al-Bayati HK, Duscher S, Kollers S, Rettenberger G, Fries R, and Brenig B. Construction and characterization of a porcine p1-derived artificial chromosome (pac) library covering 3.2 genome equivalents and cytogenetical assignment of six type i and type ii loci. *Mamm Genome.*, 10:569–72, 1999.
- [287] Khan N, Sharma S, Alam A, Saleem M, , and Sultana S. Tephrosia purpurea ameliorates n-diethylnitrosamine and potassium bromate-mediated renal oxidative stress and toxicity in wistar rats. *Pharmacol. Toxicol.*, 88:294–299, 2001.
- [288] Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Yu YM, Lu XM, Zurakowski D, Tompkins RG, Ajami AM, Young VR, and Castillo L. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:5071–5076, 2000.
- [289] Metges CC, Yu YM, Cai W, Lu XM, Wong S, Regan MM, Ajami A, and Young VR. Oxoproline kinetics and oxoproline urinary excretion during glycine-or sulfur amino acid-free diets in humans. *Am. J. Physiol.*, 278:E868–E876, 2000.
- [290] Schoneich C. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.*, 1703:111–119, 2004.
- [291] Stadtman ER, Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB, and Levine RL. Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta.*, 1703:135–410, 2005.
- [292] Butterfield DA and Kanski J. Methionine residue 35 is critical for the oxidative stress and neurotoxic properties of alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42. *Peptides.*, 23:1299–1309, 2002.
- [293] Hsiang B, , Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, , and Kirchgessner T. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (oatp2). identification of a liver-specific human organic anion polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-coa reductase inhibitor transporters. *J. Biol. Chem.*, 274:37161–37168, 1999.
- [294] David V, Hochstenbach F, Rajagopalan S, and Brenner MB. Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmatic reticu-

- lum suggests a chaperone function for human integral membrane protein ip90 (calnexin). *J. Biol. Chem.*, 268:9585–9592, 1993.
- [295] Westerheide SD and Morimoto RI. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem.*, 280:33097–33100, 2005.
- [296] Pirkkala L, Nykanen P, and Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.*, 15:1118–1131, 2001.
- [297] Voellmy R. Feedback regulation of the heat shock response. *Handb Exp Pharmacol.*, 172:43–68, 2006.
- [298] Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, and Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1a knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 98:5560–5565, 2001.
- [299] Vasquez OL, Almeida A, and Bolanos JP. Depletion of glutathione up-regulates mitochondrial complex i expression in glial cells. *J Neurochem.*, 76:1593–1596, 2001.
- [300] Go VL, Butrum RR, and Wong DA. Diet, nutrition, and cancer prevention: the postgenomic era. *J Nutr.*, 133:3830S–3836S, 2003.
- [301] Abrescia P and Golino P. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, 3:159–171, 2005.
- [302] Anthony JC, Anthony TG, Kinball SR, and Jefferson LS. Signalling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr.*, 131:856S–860S, 2001.
- [303] Aubel C, Dehez S, Chabanon H, Seva C, Ferrara M, and Brachet P. Activation of c-jun n-terminal kinase 1 (jnk-1) after amino acid deficiency in hela cells. *Cell Signal*, 13:417–423, 2001.
- [304] Jousse C, Bruhat A, Ferrara M, and Farfournoux P. Evidence for multiple signaling pathways un the regulation of gene expression by amino acids in human cell lines. *J Nutr.*, 130:1555–1560, 2000.
- [305] Jousse C, Bruhat A, Ferrara M, and Farfournoux P. Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like-growth-factor-binding protein 1 expression. 15:147–153, 1998.
- [306] Le Leu RK, McIntosh GH, and Young GP. Ability of endogenous folate from soy protein isolate to maintain plasma homocysteine and hepatic dna

- methylation during methyl group depletion in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 44:457–464, 1998.
- [307] Rees WD. Manipulating the sulfur amino acid content of the early diet and its implications for long-term health. *Proc Nutr Soc.*, 61:71–77, 2002.
- [308] Rees WD, Wilson FA, and Maloney CA. Sulfur amino acid metabolism in pregnancy: the impact of methionine in the maternal diet. *J Nutr.*, 136:1701S–1705S, 2006.
- [309] Seneviratne CK, Li T, Khaper N, and Singal PK. Effects of methionine on endogenous antioxidants in the heart. *Am J Physiol.*, 277:H2124–H2128, 1999.
- [310] Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, and Robertson GR. Cyp2e1 and cyp4a as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.*, 105:1067–1075, 2000.
- [311] Taniguchi M, Yasutake A, and Takedomi K. Effects of dietary sulfur-containing amino acids on oxidative damage in rat liver caused by n-nitrosodimethylamine administration. *Brit J Nutr.*, 84:211–217, 2000.
- [312] Wang ST, Chen HW, Sheen LY, and Lii CK. Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione s-transferase isoenzymes in rat hepatocytes. *J Nutr.*, 127:2135–2141, 1997.
- [313] Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, and Grant G. Dna stability and genomic methylation status in colonocytes isolated from methyl-donor-deficient rats. *Eur J Nutr.*, 39:106–111, 2000.
- [314] Weaver IC, Szyf M, and Meaney MJ. From maternal care to gene expression: Dna methylation and the maternal programming of stress responses. *Endocrinology Research*, 28:699, 2002.
- [315] Raza H, Robin MA, Fang JK, and Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione s-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J.*, 366:45–55, 2002.
- [316] Salinas AE and Wong MG. Glutathione s-transferases—a review. *Curr Med Chem.*, 6:279–309, 1999.
- [317] Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar A, Piantadosi S, DeWeese TL, De Marzo AM, and Nelson WG. Reversal of gstp1 cpg island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione

- s-transferase (gstp1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res.*, 61:8611–8616, 2001.
- [318] Singal R, van Wert J, and Bashambu M. Cytosine methylation represses glutathione s-transferase p1 (gstp1) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 61:4820–4826, 2001.
- [319] Zhang YJ, Chen Y, Ahsan H, Lunn RM, Chen SY, Lee PH, Chen CJ, and Santella RM. Silencing of glutathione s-transferase p1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 221:135–143, 2005.
- [320] Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, Huang Y, Young D, and Jacob ST. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of dna methyltransferases and methyl cpg binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of f344 rats. *J Nutr.*, 136:1522–7, 2006.
- [321] James SJ, Pogribny IP, Pogribna M, Miller BJ, Jernigan S, and Melnyk S. Mechanisms of dna damage, dna hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr.*, 133:3740S–3747S, 2003.
- [322] Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, and Gueant JL. Effects of vitamin b12 and folate deficiencies on dna methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med.*, 41:1012–1019, 2003.
- [323] Dizik M, Christman JK, and Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis.*, 12:1307–1312, 1991.
- [324] Ross SA. Diet and dna methylation interactions in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.*, 983:197–207, 2003.
- [325] Pogribny IP, Poirier LA, and James SJ. Differential sensitivity to loss of cytosine methyl groups within the hepatic p53 gene of folate/methyl deficient rats. *Carcinogenesis.*, 16:2863–2867, 1995.
- [326] Batra V and Mishra KP. Modulation of dna methyltransferase profile by methyl donor starvation followed by gamma irradiation. *Mol Cell Biochem.*, 294:1–2, 2007.
- [327] Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, and Higgs DR. Mutations in atrx, encoding a swi/snf-like protein, cause diverse changes in the pattern of dna methylation. *Nat Genet.*, 24:368–371, 2001.



- 
- [328] Dennis K, Fan T, Geiman T, Yan Q, and Muegge K. Lsh, a member of the snf2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev.*, 15:2940–2944, 2001.
- [329] Sato H, Nomura S, Maebara K, Sato K, Tamba M, and Bannai S. Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325:109–116, 2004.
- [330] Palii SS, Chen H, and Kilberg MS. Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system a gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:3463–3471, 2004.
- [331] Averoust J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, and Fafournoux P. Induction of chop expression by amino acid limitation requires both atf4 expression and atf2 phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:5288–5297, 2004.
- [332] Sumrada RA and Cooper TG. Ubiquitous upstream repression sequences control activation of the inducible arginase gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 84:3997–4001, 1998.
- [333] Luche RM, Sumrada R, and Cooper TG. A cis-acting element present in multiple genes serves as a repressor protein binding site for yeast car1 gene. *Mol Cell Biol.*, 10:3884–3895, 1990.
- [334] Chu S and Ferro TJ. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene.*, 348:1–11, 2005.
- [335] Li L, He S, Sun JM, and Davie JR. Gene regulation by sp1 and sp3. *Biochem Cell Biol.*, 82:460–71, 2004.
- [336] Resendes KK and Rosmarin AG. Sp1 control of gene expression in myeloid cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 14:171–181, 2004.
- [337] Samson SL and Wong NC. Role of sp1 in insulin regulation of gene expression. *J Mol Endocrinol.*, 29:265–79, 2002.
- [338] Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, and Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hg-sta1 promoter. *Pharmacogenetics.*, 12:277–286, 2002.
- [339] Moffat GJ, McLaren AW, and Wolf CR. Sp1-mediated transcriptional ac-

- tivation of the human pi class glutathione s-transferase promoter. *J Biol Chem.*, 271:1054–1060, 1996.
- [340] Kumar A and Reddy EP. Genomic organization and characterization of the promoter region of murine gstm2 gene. *Gene.*, 270:221–229, 2001.
- [341] Clark SJ, Harrison J, and Molloy PL. Sp1 binding is inhibited by (m)cp(m)cpG methylation. *Gene.*, 195:67–71, 1997.
- [342] Mancini DN, Singh SM, Archer TK, and Rodenhiser DI. Site-specific dna methylation in the neurofibromatosis (nf1) promoter interferes with binding of creb and sp1 transcription factors. *Oncogene.*, 28:4108–4119, 1999.
- [343] Butcher DT, Mancini-DiNardo DN, Archer TK, and Rodenhiser DI. Dna binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the brca1 promoter. *Int J Cancer.*, 111:669–678, 2004.
- [344] Macleod Dand Charlton J, Mullins J, and Bird AP. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the cpG island. *Genes Dev.*, 8:2282–2292, 2004.
- [345] Shoulders CC and Naoumova RP. Usf1 implicated in the aetology of familial combined hyperlipidaemia and the metabolic syndrome. *Trends in Molecular Medicine*, 10:362–365, 2004.
- [346] Griffin MJ and Sul HS. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of usf and srebp-1c. *IUBMB Life.*, 56:595–600, 2004.
- [347] Galibert MD, Carreira S, and Goding CR. The usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-reponsive 38 kinase and mediates uv-induced tyrosinase expression. *EMBO J.*, 20:5022–5031, 2001.
- [348] Chen J, Errico SL, and Freed WJ. Reactive oxygen species and p38 phosphorylation regulate the protective effect of delta(9)-tetrahydrocannabinol in the apoptotic response to nmda. *Neurosci Lett.*, 389:99–103, 2005.
- [349] Blanc A, Pandey NR, and Srivastava AK. Synchronous activation of erk 1/2, p38mapk and pbk/akt signaling by h2o2 in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *Int J Mol Med.*, 11:229–234, 2003.
- [350] Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, and Matsumoto K. The c.elegans p38 mapk pathway regulates nuclear localization of the transcription factor skn-1 in oxidative stress response. *Genes Dev.*, 19:2278–2283, 2005.

- 
- [351] Yu W, Akishita M, Xi H, Nagai K, Sudoh N, Hasegawa H, Kozaki K, and Toba K. Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 map kinase inhibition. *Clin Chim Acta.*, 364:328–334, 2006.
- [352] Rahmann I. Oxidative stress, chromatin remodelling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36:95–109, 2003.
- [353] Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles prize lecture 2005. *British Journal of Pharmacology*, 148:245–254, 2006.
- [354] Adcock IM, Kaz I, and Barnes PJ. Glucocorticoids effects on gene transcription. *Proc Am Thorac Soc*, 1:247–254, 2004.
- [355] Urnov FD and Wolffe AP. Chromatin remodeling and transcriptional activation. *Oncogene.*, 20:2991–3006, 2001.
- [356] Desmots F, Rauch C, Henry C, Guillouzo A, and Morel F. Genomic organization, 5'-flanking region and chromosomal localization of the human glutathione transferase a4 gene. *Biochem J.*, 336:437–442, 1998.
- [357] Duvoix A, Schnekenburger M, Delhalle S, Blasius R, Morceau F, Borchiche P, Dicato M, and Diederich M. Expression of glutathione s-transferase p1-1 in leukemic cells is regulated by inducible ap1-binding. *Cancer Letters*, 216:207–219, 2004.
- [358] Pinkus R, Weiner LM, and Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of ap1, nf-kb, and glutathione s-transferase gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:13422–13429, 1996.
- [359] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, and Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23:599–622, 2005.
- [360] Mercurio F and Manning AM. Nf-kappaB as primary regulator of the stress response. *Oncogene.*, 45:3163–6171, 1999.
- [361] Li N and Karin M. Is nf-kappaB the sensor of oxidative stress? *The FASEB journal.*, 13:1137–1143, 1999.
- [362] van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, and Bast A. Transcription factor nf-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr.*, 86:121–127, 2001.
- [363] Haddad J. Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription fac-

- tors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kb. *Critical Care.*, 6:481–490, 2001.
- [364] Kroncke KD. Nitrosative stress and transcription. *Biol Chem.*, 384:1365–1377, 2003.
- [365] Dhar A, Young MR, and Colburn NH. The role of ap1, nf-kappab and ros/nos in skin carcinogenesis: the jb6 model is predictive. *Mol Cell Biochem.*, 234:185–193, 2002.
- [366] Rahmann I. Regulation of nuclear factor-kappa b, aktivator protein a1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochem Pharmacol.*, 60:1041–1049, 2000.
- [367] Gius D, Botero A, Shah S, and Curry HA. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors nf-kappab and ap1. *Toxicol Lett.*, 106:93–106, 1999.

## ANHANG



## A. BEZUGSQUELLEN

### A.1 Geräte

#### **Zentrifugen**

Zentrifuge 5417 C mit dem F 45-30-11 Festwinkelrotor 45 Grad (EPPENDORF, Hamburg);

Mikrozentrifuge mit dem 12 x 1,5 ml Rotor (DENVER INSTRUMENT COMPANY, Arvada, Colorado, USA);

J2 HS-Beckmann Kühlzentrifuge mit dem Rotor JA14 und JA 20 (BECKMANN, München);

#### **Gelelektrophoresekammern**

Horizontalelektrophoresekammer D3 (AGS, Heidelberg);

Vertikalelektrophoresekammer Macrophor sequencing system (PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Schweden);

#### **Elektrophoresestromquelle**

Gene Power Supply GPS 200/400 (PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Schweden);

GP 251 D (SEBIA, Paris, Frankreich)

#### **Vortexer**

Vortex Genie 2TM G 560 E (SCIENTIFIC INDUSTRIES, Bohemia, USA)

#### **Thermo-Schüttler**

Thermomixer 5436 (EPPENDORF, Hamburg)

#### **pH-Meter**

Microprozessor pH-Meter pH 537 (WTW; Weilheim)

#### **Kulturmediumschüttler**

CERTOMAT®U (B.BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, Melsungen)

**PCR-Geräte**

PCR express thermal cycler (HYBAID, Ashford, UK);  
TRIO-Thermoblock TB 1 (BIOMETRA, Göttingen)

**Spektralphotometer**

GeneQuant RNA/DNA Calculator (PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Schweden)

**Sequenzierautomat**

LICOR 4000L (MWG BIOTECH, Ebersberg);  
Pyrosequencer™ -System (BIOTAGE, Uppsala, Schweden)

**Wasserbäder**

Medingen W6 (Prüfwerk Medingen, Medingen)

**Magnetrührer**

OberflächenTemp.Heizplatte IKAMAG RET (JANKE und KUNKEL, Staufen)

**UV-Tisch**

TFP 20 M (Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich)

**Gelaufnahmetechnik**

Gelprint 2000 I (MWG-BIOTECH, Ebersberg)

## *A.2 Biologische Substanzen, Chemikalien, Lösungen und Puffer*

### *Agarosegelelektrophorese*

peq Gold Universal Agarose (PEQLAB, Erlangen);  
10 x TAE-Puffer (48,46 g TRIS-Azetat (ROTH, Karlsruhe) 3,72 g EDTA (ROTH, Karlsruhe) auf 1 l Wasser auffüllen;  
Essigsäure (ROTH, Karlsruhe);  
Ethidiumbromid (SERVA, Heidelberg);  
Ladepuffer [50% Glycerin (FLUKA, Deisenhofen) 0,1% Bromphenolblau (SERVA, Heidelberg) 20 mM EDTA (ROTH, Karlsruhe) 10 mM TRIS, pH 8,0 (ROTH, Karlsruhe)]



### *Isolierung von Nukleinsäuren*

**RNA-Isolierung** RNeasy Mini KIT® (QIAGEN)

**Isolierung genomischer DNA** Genomic KIT® (QIAGEN)

**Isolierung von PAC-DNA** QIAGEN®Large-Construct KIT (QIAGEN)

**Isolierung von Plasmid-DNA** QIAprep® Miniprep KIT (QIAGEN)

### *Klonierungen*

#### **Aufzuchtmedien**

LB-Medium [172 mM NaCl; 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; ad Aqua bi-destillata; alles autoklavieren] mit 25 g/l Ampicillin (ROTH, Karlsruhe);

LB-Platten (LB-Medium; 2% Selectagar; ad Aqua bidestillata; alles autoklavieren) mit 25 g/l Ampicillin (ROTH, Karlsruhe);

SOC-Medium (STRATAGENE, Heidelberg)

#### **Klonierung von DNA-Fragmenten:**

pBluescript® II KS(+) Phagemid-Vektor (STRATAGENE, Heidelberg)

#### **Restriktionsspaltung**

Enzym-KITs (FERMENTAS)

#### **DNA-Elution aus Agarose**

QIAquick® Spin KIT (QIAGEN)

#### **Ligation**

T4 DNA Ligase Tested User Friendly™ KIT (USB)

#### **Transformation**

XL1-Blue Competente Cells KIT (STRATAGENE, Heidelberg)

#### **Klonierung von PCR Fragmenten:**

Vektor pGEM® T-Easy (PROMEGA, Mannheim)

#### **Ligation**

pGEM® T-Easy-System (PROMEGA, Mannheim)

#### **Transformation**

Wirtszelle JM109 (PROMEGA, Mannheim);

pGEM® T-Easy-System (PROMEGA, Mannheim)

### *Sequenzierung mit dem LICOR 4000L-System (MWG BIOTECH)*

5'IRD-800-Primermarkierung (MWG BIOTECH, Ebersberg);

Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing KIT (AMERSHAM BIOS-

CIENCES);

DMSO (GIBCO, Karlsruhe);

### **PAA-Gel**

Long Ranger Gel Solution (FMC BioProducts, Maine USA)

Harnstoff (SIGMA, Taufkirchen);

10 x TBE [108 g TRIS (ROTH, Karlsruhe), 55 g Borsäure (GIBCO, Karlsruhe)

40 ml 0,5 M EDTA (ROTH, Karlsruhe) auf 1 L ddH<sub>2</sub>O auffüllen];

DMSO (GIBCO, Karlsruhe);

APS (Ammoniumpersulfat) (SERVA, Heidelberg);

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) (BIORAD, München)

### *Quantitative Real-Time-PCR mit dem LightCycler® von ROCHE*

#### **Erstellen externer Standardkurven**

Vektor pUC18 (AMERSHAM BIOSCIENCES);

Restriktionsenzym XMN I (10U/ µl) (MBI FERMENTAS);

Puffer II (50 mM NaCl (ROTH, Karlsruhe), 10 mM Tris (ROTH, Karlsruhe), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (BOEHRINGER, Mannheim), 1 mM DTT (Dithiotreitol) (BOEHRINGER, Mannheim);

BSA (100 mg/ml, (MBI FERMENTAS);

#### **Reverse Transkriptions (RT)-Reaktion**

M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA, Mannheim);

M-MLV 5 x Reaktionspuffer (PROMEGA, Mannheim);

dATP (10 mM) (PROMEGA, Mannheim);

dCTP (10 mM) (PROMEGA, Mannheim);

dGTP (10 mM) (PROMEGA, Mannheim);

dTTP (10 mM) (PROMEGA, Mannheim);

rRNasin® Ribonuclease Inhibitor (PROMEGA, Mannheim);

Oligo(dT)-*downstream*- Primer (ARK SCIENTIFIC, Darmstadt);

#### **LightCycler® PCR-Amplifikation**

LightCycler - FastStart DNA Master SYBR Green I KIT (ROCHE);

MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (ROCHE)

### **5'-Prime Race**

GeneRacer™KIT (INVITROGEN)

### *Single Nucleotide Extension*

Restriktionsenzyme (MBI FERMENTAS);

[3H]dCTP in Form von *Deoxycytidine 5'-tri-phosphate tetrasodium salt*, [5,5'-3H] mit einer spezifischen Aktivität von 60 Ci/mmol (NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS);

AmpliTaQ® DNA-Polymerase KIT (APPLIED BIOSYSTEMS);

Whatman® chromatography paper, ion exchange (DE81 23mm) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim);

Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim);

Rotiszint mini®(ROTH, Karlsruhe)

### *Bestimmung der Methylierungsrate von CpG-Orten in bisulfitmodifizierter genomischer DNA*

Natriumhydroxid (NaOH) (ROTH, Karlsruhe);

Natriumbisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) (SIGMA, Taufkirchen);

Hydrochinon ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) (SIGMA, Taufkirchen);

Mineralöl (SIGMA, Taufkirchen);

Geneclean®KIT (QBIOSYSTEMS);

Ammoniumacetat ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) (ROTH, Karlsruhe);

99% Ethanol (WALTER, Kiel);

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)(ROTH, Karlsruhe);

AmpliTaQ Gold® Polymerase KIT (APPLIED BIOSYSTEMS);

Streptavidin Sepharose™High Performance KIT (AMERSHAM BIOSCIENCES)



## DANKSAGUNG

Ich möchte all denen danken, die mich auf dem Weg bis zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. M. Schwerin, der diese Arbeit angeregt und ermöglicht hat. Trotz der wenigen Zeit die ihm als Institutsleiter des FBN-Dummerstorf zur Verfügung stand, hat er es immer Möglich gemacht Zeit für die Lösung von Problemen und der Beantwortung von Fragen zu erübrigen. Wertvolle Anregungen zum Fortgang der Arbeit waren stets das Resultat der Konsultationen. Ganz besonders möchte ich sein Engagement bei der Auswertung der Ergebnisse hervorheben.

Die statistische Unterstützung durch Dr. G. Nürnberg vom FBN-Dummerstorf war für die Auswertung der Ergebnisse von großer Wichtigkeit.

Frau Prof. E. Siegl vom Fachbereich Immunologie/Genetik der Universität Rostock stellte sich nicht nur als Gutachterin dieser Arbeit zur Verfügung, sondern gab durch das Korrekturlesen wertvolle Impulse für die Vollendung der schriftlichen Fassung. Bei ihr möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Fachbereiches Molekularbiologie für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Annette Jugert und Joana Bittner bedanken, die ihren reichen Erfahrungsschatz in der praktischen molekularbiologischen Arbeit immer mit freundlicher Hilfsbereitschaft zur Verfügung gestellt haben. Auch für die Unterstützung durch Dr. Christina Walz, Dr. Siriluck Wimmers und der Arbeitsgruppe Vanselow möchte ich mich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, ohne deren Unterstützung eine Promotion kaum möglich gewesen wäre. Ohne ihren Zuspruch und ihren Aufmunterungen wäre so manchesmal der Mut versiegt. Sie haben mir nach der Geburt meiner Tochter Friederike geholfen die Arbeit und Familie zu vereinen. Meinem Mann Mirko danke ich für seine unendliche Geduld und Unterstützung bei der Arbeit mit dem Computer und der Auseinandersetzung mit biologischen Fragestellungen. Ulla und Rosi, danke für die Kommas, ich bedaure sehr, dass eure Eltern euch kein Studium ermöglicht haben.



## EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Klingendorf, den 25. Januar 2008





## WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF

### *Angaben zur Person*

Name: Bianka Kurts-Ebert geb. Kurts  
19. Februar 1975, Neindorf  
Familienstand: verheiratet  
Anschrift: Kleiner Horst 3, 18196 Klingendorf  
E-Mail: [bianka.kurts-ebert@gmx.de](mailto:bianka.kurts-ebert@gmx.de)

### *Bildungsweg*

1981-1991 Besuch der POS „Herrman Matern“ in Hornhausen  
1991-1993 Gymnasium in Oschersleben  
1993-2000 Studium der Biowissenschaften an der Universität Rostock  
und Erlangung des Diploms  
2001-2003 Stipendiat im Medizinische Graduiertenkolleg „Interzellu-  
lare Kommunikation und Signaltransduktion bei pathophy-  
siologischen Prozessen“  
seit 2003 Weiterführung der Arbeit durch das Forschungsinstitut für  
die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) Dum-  
merstorf

Klingendorf, 25. Januar 2008