

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Thomas Haaf**

**Immunozytogenetische Analysen an Interphase-Zellen und
Meiose-Stadien der Maus**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carmen Kiene

aus Boostedt

Würzburg, Dezember 2021

Referent: Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Koreferent: Prof. Dr. med. Manfred Gessler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2022

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung von 5-Methylcytosin	1
1.2 Meiose und Spermatogenese	7
1.3 Die Maus als Modellorganismus	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum.....	14
2.2 Materialien	14
2.2.1 Geräte und Software	14
2.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial	15
2.2.3 Puffer, Lösungen und Kulturmedien	17
2.3 Herstellung der Gewebepreparate.....	18
2.4 Zellkultur	19
2.5 C-Bänderung	21
2.6 5-Methylcytosin Immunofärbung.....	22
2.7 Mikroskopische Aufnahmen und Bildbearbeitung.....	23
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Metaphasechromosomen aus der Mitose	25
3.2 Interphasezellkerne	27
3.3 Zellkerne aus Testismaterial und Meiose-Stadien	32
4. Diskussion	41
4.1 Metaphasechromosomen aus der Mitose	41
4.2 Interphasezellkerne	43
4.3 Zellkerne aus Testismaterial und Meiose-Stadien	49
4.4 Methode	56

5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	59
I. Abkürzungsverzeichnis	
II. Abbildungsverzeichnis	
III. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von 5-Methylcytosin

Der Begriff „Epigenetik“ leitet sich aus dem Griechischen ab (griechisch ἐπί [epi], auf) und bedeutet wortwörtlich so viel wie „oberhalb/außerhalb der Genetik“ (Graw, 2015). Der Begriff wurde ursprünglich großzügig verwendet, um Prozesse zu beschreiben, die von der genotypischen Information zur phänotypischen Ausprägung führen (Waddington, 1940). Heutzutage definiert sich der Begriff als die Untersuchung mitotisch und/oder meiotisch vererbter Veränderungen der Genfunktion, welche nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können (Riggs et al., 1996). Es handelt sich hierbei um Veränderungen der Regulation der Genexpression, welche während der Entwicklung, Zelldifferenzierung und -proliferation entstehen und über Zellteilungen hinweg stabil sind (Jaenisch and Bird, 2003). Zu den bedeutendsten Mechanismen der epigenetischen Genregulation zählen DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und Interaktionen mit nicht-codierenden RNAs sowie deren Einfluss auf die Chromatinstruktur (Felsenfeld, 2014). Zusätzlich stehen diese Mechanismen in wechselseitiger Beziehung zueinander und beeinflussen sich gegenseitig, worauf weiter unten am Beispiel des Rett-Syndroms und der Inaktivierung des X-Chromosoms eingegangen wird.

Besonders DNA-Methylierung gilt heute als Hauptstabilisator der Genexpression und wird vor allem mit der Abschaltung von Genen in Verbindung gebracht (Jaenisch and Bird, 2003). Die Methylierung wird nach der Replikation der DNA durch spezifische Enzyme, die DNA-Methyltransferasen (DNMTs), durchgeführt und erfolgt an der C5-Position des Pyrimidinrings von Cytosin (Hermann et al., 2004). Als Produkt ergibt sich 5-Methylcytosin. Dabei dient S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) allen DNMTs als Methyl-Quelle.

Für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung nach der Replikation fungiert DNMT1: Sie bevorzugt hemimethylierte, also halbseitig-methylierte DNA und komplettiert das Methylierungsmuster auf dem neu synthetisierten DNA-Strang (Bestor, 2000, Reik et al., 2001). Die Neu-Methylierung unmethylierter DNA, die sogenannte de-novo-Methylierung, erfolgt durch DNMT3a und DNMT3b (Okano

et al., 1999). Bei der Etablierung maternaler genetischer Prägungen in der Keimbahn (genaueres dazu weiter unten) sind diese Enzyme auf ein weiteres Enzym, DNMT3L, angewiesen, welches selbst zwar keine enzymatische Aktivität aufweist, jedoch die Aktivität von DNMT3a und DNMT3b steigert (Bourc'his et al., 2001, Hata et al., 2002, Chen et al., 2005). DNMT2 katalysiert bevorzugt die Methylierung von Ribonukleinsäuren in tRNA, wobei Untersuchungen von Kaiser et al. (2016) zeigten, dass auch kurze DNA-Abschnitte effektiv methyliert werden, wenn diese anstelle von kurzen RNA-Abschnitten in tRNA integriert werden.

Genetische Analysen über die verschiedenen DNMTs weisen nach, dass DNA-Methylierung essentiell für die Entwicklung von Wirbeltieren ist (Jaenisch and Bird, 2003). Li et al. (1992) zeigten, dass ein Ausfall von DNMT1 in Mäusen zu einer insgesamt verminderten DNA-Methylierung sowie zu fehlerhafter Entwicklung mit embryonaler Letalität führt. Beim ICF-Syndrom handelt es sich um eine sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, deren Ursache auf Mutationen im *DNMT3B*-Gen beruht (Okano et al., 1999). Es kommt zur Hypomethylierung an perizentromerischen Chromosomenregionen und die Betroffenen leiden an Immunschwäche sowie fazialen Anomalien (ICF = immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies).

Im Genom von Säugern findet sich DNA-Methylierung vornehmlich an Cytosinphosphatidyl-Guanin-Dinukleotiden, kurz CpGs (Weber and Schübeler, 2007). Während nur ca. 3–8% aller Cytosin-Basen im Genom methyliert sind, weisen CpGs eine 60–90%ige Methylierung auf (Jeltsch, 2002). Lange Wiederholungen von CpGs finden sich in repetitiver DNA, wie beispielsweise in ribosomaler DNA oder an den Zentromerregionen, und sind dort in der Regel hypermethyliert (Graw, 2015). Im Gegensatz dazu sind sogenannte CpG-Inseln hauptsächlich hypomethyliert (Bird, 2002). Dabei handelt es sich um CpG-reiche DNA-Abschnitte mit einer Länge von ca. 500 bis 2000 Basenpaaren im Bereich von eukaryotischen Promotoren (Bird, 1986). Nahezu alle Haushaltsgene sowie gewebespezifische Gene und solche, die die Entwicklung regulieren, besitzen CpG-Inseln in ihren Promotoren (Deaton and Bird, 2011). Im unmethylierten Zustand kann das CpG-bindende Protein, welches als Aktivator der Transkription gilt, an diese CpG-Inseln binden (Lee et al., 2001). Werden die CpG-Inseln

jedoch mit der Zeit methyliert, kommt es zu einer dauerhaften Stilllegung der assoziierten Promotoren und Gene. An methylierten CpGs binden wiederum spezifische DNA bindende Proteine wie Methyl-CpG bindende Proteine (MeCP1 und 2), Methyl-CpG binding domain Proteine (MBD1–MBD4) oder Kaiso. Diese gelten als Repressoren der Transkription. Der Verlust eines dieser Methyl-CpG bindenden Proteine scheint jedoch weniger schwerwiegend zu sein als der Verlust einer DNMT, da die verbleibenden Methyl-CpG bindenden Proteine die entsprechende Funktion übernehmen können (Jaenisch and Bird, 2003).

Ein Beispiel für den Verlust eines Methyl-CpG bindenden Proteins mit Krankheitswert ist das Rett-Syndrom. Es wird verursacht durch eine spontane, X-chromosomal vererbte Mutation im *MECP2*-Gen (Amir et al., 1999). MeCP2 bindet methylierte DNA und führt entweder zur Aktivierung oder Repression der Gentranskription (Chahrour et al., 2008). Bei der Repression kommt es zum Zusammenwirken von MeCP2 mit Histon-Deacetylasen und anderen Chromatin-modifizierenden Enzymen und damit zu einer Verdichtung des Chromatins (Jones et al., 1998, Graw, 2015). Das Rett-Syndrom betrifft ca. 1:10.000 Frauen und geht mit geistiger Retardierung und motorischen Defiziten einher. Männliche Betroffene sind bei vollem Funktionsverlust nicht lebensfähig und versterben aufgrund einer Enzephalopathie (Buchovecky et al., 2013). Yusufzai and Wolffe (2000) stellten fest, dass alle Missense-Mutationen, also Mutationen, die zum Einbau einer falschen Aminosäure in das Protein führen, innerhalb der Methyl-bindenden Domäne zu einer verminderten Bindung an methylierte DNA führen. Außerdem wurde ermittelt, dass alle Nonsense-Mutationen, welche die Transkriptions-Repressions-Domäne von MeCP2 verkürzen, einerseits die Fähigkeit der Transkriptionshemmung beeinflussen und andererseits die Stabilität des Enzyms selbst stark herabsetzen. Die Symptome des Rett-Syndroms lassen sich im Mausmodell nachstellen (Buchovecky et al., 2013, Guy et al., 2001): Sowohl Mäuse mit vollständigem Funktionsverlust des *Mecp2*-Gens als auch Mäuse, in denen *Mecp2* nur im Gehirn gelöscht wurde, zeigen schwere neurologische Symptome, was auf den neurologischen Ursprung der Erkrankung schließen lässt. Die Sanierung von *Mecp2* in Mausmutanten führt auch nach Auftreten von Symptomen zu einer deutlichen Verbesserung der neurologischen

Defizite (Guy et al., 2007), was die Hoffnung auf kausale Therapiemöglichkeiten zulässt. Einen weiteren, wenn auch nur symptomatischen Therapieansatz zeigen Buchovecky et al. (2013) auf: Eine Hemmung der Cholesterinsynthese kann zur Verbesserung der Symptome führen, was therapeutisch durch Gabe von Statinen erreicht werden könnte.

DNA-Methylierung spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Säugetieren und damit bei der Dosiskompensation X-chromosomaler Gene (Graw, 2015). Damit wird eine gleiche Dosis an Genprodukten des X-Chromosoms sowohl im weiblichen als auch im männlichen Organismus erreicht. Für die Etablierung der X-Inaktivierung ist zunächst die regulatorische, nicht-codierende RNA *Xist* (englisch *X-inactive specific transcript*) zuständig (Csankovszki et al., 2001). *Xist* lagert sich an das zukünftig inaktivierte X-Chromosom an und führt dort zur Abschaltung der Transkriptionsmaschinerie (Wutz, 2011). In weiteren Schritten kommt es unter anderem zur Methylierung von CpG-Inseln sowie zur Hypoacetylierung von Histon H4. Vor allem letzteres trägt zur Bildung von Heterochromatin und damit zur Aufrechterhaltung der X-Inaktivierung bei (Csankovszki et al., 2001).

Das eukaryotische Genom kann grob in Euchromatin und Heterochromatin unterteilt werden. Als Chromatin bezeichnet man die Gesamtheit aus DNA und den daran gebundenen Proteinen, also Histonen und Nicht-Histon-Proteinen (Bi, 2014). Euchromatin liegt in der Interphase aufgelockert und weniger stark verpackt, sprich dekondensiert, als Heterochromatin vor. Es gilt allgemein als genreich und besser zugänglich für die Transkription oder für Nukleasen (Dillon and Festenstein, 2002, Graw, 2015). Im Gegensatz dazu ist Heterochromatin eher genarm und durch seine hohe Kondensation schwer zugänglich und transkriptionsinaktiv. Somit trägt die Chromatinstruktur zur epigenetischen Regulation des Genoms bei (Grewal and Jia, 2007). Heterochromatin kann weiterhin in fakultatives und konstitutives Heterochromatin unterteilt werden. Fakultatives Heterochromatin kann je nach Zelltyp oder Entwicklungsstadium heterochromatisch oder euchromatisch vorliegen. Die sich entsprechenden chromosomalen Abschnitte können also in zwei homologen Chromosomen unterschiedlich stark kondensiert sein, wie beispielsweise beim inaktivierten X-

Chromosom (Graw, 2015). Chromosomale Regionen, die während des gesamten Zellzyklus und auch in allen Zellen in beiden homologen Chromosomen kondensiert bleiben, werden als konstitutives Heterochromatin bezeichnet. Es findet sich unter anderem an Zentromeren und Telomeren und ist durch einen hohen Anteil repetitiver DNA-Elemente gekennzeichnet (Bi, 2014). Zudem zeichnet sich konstitutives Heterochromatin durch einen hohen Anteil an methylierter DNA sowie an trimethylierten Lysinresten an Position 9 des Histons H3 (H3K9me3) aus (Saksouk et al., 2014). Eine Methode zur Detektion von konstitutivem Heterochromatin der Zentromere ist die sogenannte C-Bänderung (Sumner, 1972), welche unter 2.4 genauer beschrieben wird.

Epigenetische Mechanismen sind neben genetischen Faktoren entscheidend bei der Entstehung von Krebserkrankungen (Esteller and Herman, 2002). Dazu gehören die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotoren von Tumorsuppressorgenen, was zu deren Abschaltung führt, ebenso wie die Aktivierung von Onkogenen durch Demethylierung (Esteller and Herman, 2002, Jones and Baylin, 2002). Eines der bekanntesten Beispiele für Tumorsuppressorgene ist das *BRCA1*-Gen (breast cancer 1, early onset), welches durch Methylierung inaktiviert wird und somit an der Entstehung von Mamma- und Ovarialkarzinomen beteiligt ist (Esteller et al., 2000). Außerdem ist 5-Methylcytosin selbst anfällig für Punktmutationen: Durch Desaminierung entsteht aus 5-Methylcytosin Thymin und damit ein Fehler, der von DNA-Reparaturenzymen nicht behoben wird (Graw, 2015). Methylierte CpGs gelten daher als Bereiche mit besonders hoher Mutationsrate sowohl in somatischen Zellen als auch in der Keimbahn (Hermann et al., 2004).

Eine wichtige Rolle spielt DNA-Methylierung des Weiteren bei der sogenannten genetischen Prägung, wobei der englischsprachige Begriff „Imprinting“ im Deutschen ebenfalls häufig gebraucht wird. Darunter versteht sich die unterschiedliche epigenetische Markierung von väterlichen und mütterlichen Allelen, welche zu einer monoallelischen, vom Geschlecht der Eltern abhängigen Genexpression führt (Bartolomei, 2009). Bei der Maus unterliegen etwa 150 Gene genetischer Prägung (Lee and Bartolomei, 2013). Geprägte Gene sind bedeutend für das Wachstum sowie für die Entwicklung eines Individuums.

Imprintingfehler können wiederum zu Erbkrankheiten wie dem Prader-Willi-Syndrom, dem Angelman-Syndrom oder dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom führen (Graw, 2015). Die allelspezifische DNA-Methylierung ist stabil und bleibt über Zellteilungen hinweg bestehen. Auch während der genomweiten Demethylierung kurz nach der Befruchtung einer Eizelle durch eine männliche Keimzelle sowie während der de-novo-Methylierung um die Implantationsphase herum bleiben diese Muster erhalten (Abramowitz and Bartolomei, 2012). Erst in den Keimzellen erfolgt eine weitere Welle der Demethylierung, welche auch die von Imprinting geregelten Gene betrifft. Bei der erneut folgenden de-novo-Methylierung werden dann die geschlechtsspezifischen Methylierungsmuster etabliert (Abramowitz and Bartolomei, 2012).

Das An- und Abschalten von Genen durch DNA-Methylierung ist essenziell, um eine korrekte Zelldifferenzierung sicherzustellen. Für die Regulation zellspezifischer Gene kommt es zu einem dynamischen Wechsel zwischen Methylierung und Demethylierung (Suelves et al., 2016). Aus einer befruchteten Eizelle entwickelt sich schließlich ein komplexer multizellulärer Organismus mit mindestens 200 unterschiedlichen Zelltypen, in der Regel ohne dass es dabei zu Veränderungen der DNA-Sequenz selbst kommt (Shiota, 2004). Shiota et al. (2002) fanden bei einer genomweiten DNA-Analyse verschiedener Gewebe unterschiedliche Methylierungsmuster in mehreren CpG-Inseln, sogenannte gewebeabhängige und unterschiedlich methylierte Regionen. Vergleiche zwischen embryonalen Trophoblasten-Stammzellen, embryonalen Keimzellen sowie somatischen Zellen ergaben unterschiedliche, einzigartige Methylierungsprofile (Shiota, 2004). Shiota (2004) schlussfolgert, dass sich DNA-Methylierungsprofile während der Zelldifferenzierung verändern oder Veränderungen der DNA-Methylierungsprofile eine Zelldifferenzierung bewirken. Insgesamt resultiert während der Maturation eine globale Zunahme der Methylierung in Kombination mit Demethylierung in zellspezifischen DNA-Regionen (Suelves et al., 2016). Fehler bei epigenetischen Veränderungen während der Entwicklung oder auch beim Imprinting werden außerdem für Probleme beim Klonen von Säugetieren sowie bei der Infertilitätsbehandlung bei Menschen verantwortlich gemacht (Haaf, 2006).

Veränderungen der DNA-Methylierung laufen lebenslang ab: Im späten Erwachsenenalter kommt es zu einer globalen Verminderung der DNA-Methylierung in den ursprünglich stark methylierten CpG-Dinukleotiden, wohingegen ein stetiger Zuwachs der Methylierung an CpG-Inseln, welche ursprünglich eher schwach methyliert sind, zu verzeichnen ist (Jones et al., 2015). Zusätzlich beeinflussen nutritive Faktoren die Methylierung der DNA. Der Co-Faktor SAM bezieht seine Methylgruppen aus Methionin, Cholin, Folsäure und Vitamin B12, welche über die Nahrung bereitgestellt werden (Graw, 2015). Ein Mangel an solchen Methylendonatoren, allen voran Folsäure, führt zu genomweiter Hypomethylierung (Friso et al., 2002), womit wiederum weitere Krankheiten wie Krebserkrankungen oder neuropsychiatrische Symptome wie Fatigue oder Depression verknüpft sind (Van den Veyver, 2002).

1.2 Meiose und Spermatogenese

Die Meiose dient dem Zweck der Halbierung des Chromosomensatzes von einem doppelten, also diploiden ($2n$, n steht hierbei für den Ploidiegrad) auf einen einfachen, haploiden ($1n$) Chromosomensatz (Ohkura, 2015). Diploide Chromosomensätze finden sich bei Organismen mit geschlechtlicher Fortpflanzung, wo es zu der Vereinigung je eines einfachen mütterlichen und eines einfachen väterlichen Satzes bei der Befruchtung kommt. Die aus der Teilung der Zygote hervorgehenden Zellen besitzen allesamt einen diploiden Chromosomensatz (Ohkura, 2015). Für eine erneute geschlechtliche Fortpflanzung muss also bei der Entwicklung der Geschlechtszellen der Chromosomensatz auf einen haploiden Satz reduziert werden. Die Meiose besteht dazu aus zwei Zellteilungen mit einer vorausgehenden DNA-Replikation (Kerr et al., 2012). In der ersten meiotischen Teilung (Meiose I) kommt es zur Trennung der homologen Chromosomen und in der zweiten meiotischen Teilung (Meiose II) kommt es zur Trennung der Chromatiden. Damit entspricht die Meiose II einer normalen Mitose.

Zellen der Keimbahn, die in die Meiose eintreten, werden Meiocyten I genannt und besitzen einen doppelten, replizierten Chromosomensatz, bestehend aus den homologen mütterlichen und väterlichen Chromosomen und jeweils zwei

Schwesterchromatiden ($2n$ $4C$, C steht für die Anzahl der Chromatiden) (Graw, 2015). Die erste Reifeteilung beginnt mit der Prophase I, in welcher folgende drei Hauptereignisse ablaufen: (1) Die Paarung der homologen Chromosomen, (2) die Synapsis, welche den Prozess der Ausbildung des sogenannten synaptonemalen Komplexes beschreibt, und (3) die meiotische Rekombination, in der es zum reziproken Austausch von homologen Chromosomenabschnitten kommt (Pawlowski and Cande, 2005). Die Prophase I kann wiederum in fünf Stadien unterteilt werden, abhängig von der Chromosomenkonfiguration sowie vom Status des synaptonemalen Komplexes (Cohen and Pollard, 2001). Bei dem synaptonemalen Komplex handelt es sich um eine dreiteilige, proteinreiche Struktur, zusammengesetzt aus zwei lateralen und einem zentralen Element. Über diesen Komplex werden die Chromosomen während der Paarung zusammengehalten (Pawlowski and Cande, 2005).

Im ersten Stadium der Prophase I, dem Leptotän, wird das axiale Element als proteinreiches, lineares Verbindungselement zwischen zwei Schwesterchromatiden ausgebildet. Die Chromosomen sind in diesem Stadium bereits leicht verdichtet und erscheinen lichtmikroskopisch dünn und fadenähnlich. Das Chromatin ist in Schleifen um das axiale Element organisiert, aus welchem im Verlauf das laterale Element des synaptonemalen Komplexes entsteht (Cohen and Pollard, 2001). Zusätzlich wird ein sogenanntes (Chromosomen-) Bouquet (französisch, (Blumen-) Strauß) gebildet. Hierbei werden die Enden der Chromosomen, also die Telomere, an der inneren Membran der Kernhülle fixiert und an einem Knotenpunkt versammelt; sozusagen als Stiel des Straußes. Von dort aus ragen die Chromosomen schleifenartig in das Kernlumen hinein. Die hieraus resultierende, räumliche Nähe der Telomere aller Chromosomen dient der Erkennung homologer Chromosomen sowie dem Beginn ihrer Paarung (Jahn et al., 2010). Der Beginn der Paarung kennzeichnet den Eintritt in das Zygotän, das zweite Stadium der Prophase I. Entlang des axialen Elementes entstehen frühe Rekombinationsknoten, welche die Interaktion der Homologen vorantreiben. Nicht an allen dieser frühen Rekombinationsknoten kommt es später zum Crossing-over und damit zu einer echten Rekombination der Homologen. Die

Chromosomen kondensieren weiter, werden also kürzer und dicker. Paarweise vorliegende axiale Elemente werden nun als laterale Elemente bezeichnet und durch das entstehende zentrale Element des synaptonemalen Komplexes miteinander verbunden. Reißverschlussartig werden die homologen Chromosomen dadurch aneinandergesekelt. Dies beschreibt den Beginn der Synapsis, deren Komplettierung im dritten Stadium, dem Pachytän, erfolgt (Cohen and Pollard, 2001). Chromosomen, welche auf diese Weise in ihrer gesamten Länge gepaart sind, werden als Bivalente bezeichnet. Eine Ausnahme bilden die Geschlechtschromosomen, welche lediglich im Bereich ihrer pseudoautosomalen Regionen gepaart sind und als Sexbivalent bezeichnet werden.

Im Diplotän, dem vierten Stadium, verschwindet der synaptonemale Komplex und die homologen Chromosomen entfernen sich wieder voneinander. Bis zu ihrer endgültigen Trennung bleiben die Homologen nur noch über sogenannte Chiasmata (griechisch χίασμα [chiasma], Kreuzung) miteinander verbunden. Die Chiasmata zeigen die Stellen an, an denen Rekombinationsereignisse stattgefunden haben (Cohen and Pollard, 2001). Voraussetzung für die Rekombination sind im Leptotän auftretende DNA-Doppelstrangbrüche. In der Folge kann es durch Crossing-over, eine kreuzweise Überlagerung zweier Chromatiden im Pachytän, und anschließender Reparatur zum Austausch homologer Abschnitte zwischen den Chromosomen kommen (Pawlowski and Cande, 2005). Dies trägt zur genetischen Variabilität bei, da einzelne Chromosomen in der Folge sowohl väterliche als auch mütterliche Allele aufweisen können (Graw, 2015).

Im fünften und letzten Stadium der Prophase I, der Diakinese, liegen die Chromosomen vollständig kondensiert vor. Es kommt zur Auflösung der Kernmembran sowie zur Ausbildung des Spindelapparates. Außerdem beginnen die Kinetochore der Chromosomen sich in Richtung der Spindelpole zu orientieren. Kinetochore sind proteinreiche Strukturen im Bereich der Zentromere und dienen der Anheftung der Spindelfasern (Graw, 2015). Wichtig ist hierbei, dass sich Schwester-Kinetochore demselben Pol zuwenden und homologe Kinetochore gegenüberliegenden Polen, um die korrekte Aufteilung der

homologen Chromosomen zu gewährleisten (Ohkura, 2015). Während der Metaphase I, welche auf die Prophase I folgt, wird die Orientierung der Kinetochore abgeschlossen ebenso wie die Entwicklung des Spindelapparates. Spindelfasern binden die Kinetochore der Chromosomen, welche sich in einer Ebene in der Mitte des Zellkerns, der Äquatorialebene, angeordnet haben (Graw, 2015).

In der Anaphase I lösen sich die Chiasmata auf und es kommt zur vollständigen Trennung der homologen Chromosomen, wohingegen die Schwesterchromatiden miteinander verbunden bleiben. Die Aufteilung der mütterlichen und väterlichen Homologen auf die entgegengesetzten Pole erfolgt dabei zufällig, sodass die resultierenden Tochterzellen sowohl mütterliche als auch väterliche Chromosomen enthalten. Zusammen mit der Rekombination wird dadurch eine Durchmischung der elterlichen Allele erreicht, wodurch neue Gen- und damit auch neue Phänotypen entstehen (Graw, 2015).

Zum Abschluss der ersten Reifeteilung kommt es in der Telophase I mit der Bildung neuer Kernmembranen sowie der Dekondensation der Chromosomen. Im Ergebnis entstehen aus einer Meioocyte I zwei Meiozyten II mit jeweils einem haploiden Chromosomensatz und je zwei Chromatiden pro Chromosom ($1n\ 2C$). In der Regel folgt eine kurze Interphase ohne Replikation der Chromosomen, bevor die Zellen in die zweite Reifeteilung eintreten. Wie bereits erwähnt kommt es in der Meiose II zur Aufteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen wie in der Mitose. Während der Prophase II beginnt die erneute Kondensation der Chromosomen und die Ausbildung des Spindelapparates, was in der Metaphase II vollendet wird. Die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an (Graw, 2015). Hierbei ist wichtig, dass die Kinetochore von Schwesterchromatiden an gegenüberliegenden Spindelpolen befestigt werden (Ohkura, 2015). In der Anaphase II werden die Chromatiden voneinander getrennt und auf die beiden Spindelpole verteilt. Wie in der Telophase I erfolgt in der Telophase II die Ausbildung neuer Kernmembranen und die Dekondensation der Chromosomen. Am Ende der Meiose entstehen also vier Gameten mit jeweils einem haploiden Chromosomensatz, bestehend aus Ein-Chromatid-Chromosomen ($1n\ 1C$) (Graw, 2015).

In weiblichen Organismen läuft die Meiose während der Oogenese ab. Bei diesem Prozess entwickeln sich die weiblichen Gameten, die Oozyten oder Eizellen (Sanchez and Smitz, 2012). Der Prozess zur Entstehung der männlichen Gameten wird als Spermatogenese bezeichnet (Bergmann, 2005). Da im Rahmen dieser Arbeit die Meiose der männlichen Maus untersucht wurde, soll an dieser Stelle weiter auf die Spermatogenese eingegangen werden.

Unter Spermatogenese werden alle Abläufe zusammengefasst, welche die Entwicklung reifer Spermien aus den Stammzellen der Keimbahn, den Spermatogonien, beschreiben. Die Spermatogenese kann dazu in drei Abschnitte unterteilt werden: (1) Vermehrung durch mitotische Zellteilungen, (2) Reifung durch meiotische Teilungen und (3) Differenzierung der reifen Gameten. Für die mitotische Proliferation sind die Spermatogonien verantwortlich. Spermatogonien werden weiter in Typ A und Typ B Spermatogonien unterteilt. Spermatogonien Typ A bilden den lebenslangen Vorrat an Stammzellen, während Spermatogonien Typ B nach der Durchführung von Mitosen in die Meiose eintreten. Nach der DNA-Replikation werden die entsprechenden Keimzellen als primäre Spermatozyten bezeichnet (Spermatozyten I, $2n$ $4C$). Durch die erste Reifeteilung entstehen hieraus die sekundären Spermatozyten (Spermatozyten II, $1n$ $2C$). Die reifen Gameten werden als Spermatisden ($1n$ $1C$) bezeichnet und entstehen aus der zweiten Reifeteilung. Es folgt eine weitere Differenzierung der Spermatisden zu Spermatozoen ($1n$ $1C$), den funktionsfähigen Spermien. Dabei kommt es zur Ausbildung des Spermienkopfes, des Akrosoms, welches hydrolytische Enzyme enthält und für das Eindringen in die Eizelle von Bedeutung ist, sowie der Geißel und zur Abschnürung des überflüssigen Zytoplasmas (Bergmann, 2005).

In männlichen Säugetieren beginnt die Meiose während der Pubertät und läuft von dort an lebenslang ab, mit dem Ziel Millionen von Gameten zu produzieren (Griswold, 2016). Pro Stunde entstehen dabei schätzungsweise ein bis zwei Millionen Spermatozoen (Lüllmann-Rauch, 2009). Die Dauer der Spermatogenese variiert dabei zwischen den Spezies, beträgt im Mittel jedoch ungefähr 30 bis 50 Tage (Clermont, 1972).

1.3 Die Maus als Modellorganismus

Der Erforschung von physiologischen und pathologischen Geschehnissen und Abläufen am Menschen sind natürliche Grenzen gesetzt. Das vorsätzliche Herbeiführen von pathologischen oder toxischen Veränderungen am Menschen, beispielsweise durch Medikamente, ist dabei ethisch nicht vertretbar ebenso wie viele Untersuchungen oder Experimente an menschlichen Embryonen und Feten. Besonders genetische Untersuchungen gestalten sich als schwierig, da zum einen die Generationszeiten sehr lang sind und zum anderen eine gezielte Züchtung nicht möglich ist (Paigen, 2003). Zudem sind die meisten genetischen Erkrankungen nur selten (Guénet, 2011).

Daher bietet es sich an entsprechende Experimente ersatzweise an Modellorganismen durchzuführen. Als vorteilhafte Eigenschaften sollte ein solches Modell kurze Generationszeiten aufweisen und die Züchtung auch durch Inzucht ermöglichen. Nicht zu vernachlässigen ist auch, dass die Haltung einfach und kostengünstig sein sollte, was vor allem bei kleinen Tieren der Fall ist. Bei der Maus (*Mus musculus*) handelt es sich um ein Säugetier, welches diese Kriterien erfüllt und dessen Genom außerdem noch weitestgehend dem des Menschen entspricht (Paigen, 2003). Die Genome von Maus und Mensch weisen dabei einen hohen Grad der Syntenie auf: In über 90% können die Genome in korrespondierende Abschnitte unterteilt werden, in denen die Reihenfolge der Gene einander entspricht. Dies ist auf evolutionär konservierte Regionen ausgehend vom jüngsten gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen. Die Syntenie spiegelt sich auch auf chromosomaler Ebene wider, wo Bereiche der 20 Maus-Chromosomen den 23 menschlichen Chromosomen zugeordnet werden können (Waterston et al., 2002). Die 40 Chromosomen der Maus ($2n$), darunter die 19 Autosomenpaare sowie die Geschlechtschromosomen X und Y, sind allesamt akrozentrisch. Ihr Zentromer befindet sich am oberen Ende jedes Chromosoms im Bereich der Telomere (Waterston et al., 2002).

Weiterhin ähneln sich Maus und Mensch in den frühen Abschnitten der Embryonalentwicklung ebenso wie im Ablauf verschiedener biologischer Prozesse wie der Oogenese, Spermatogenese, Befruchtung und Organentwicklung (Graw, 2015). Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit

wurden aufgrund der Ähnlichkeit zum Menschen und der leichteren Zugänglichkeit an Zellen und Geweben der Maus durchgeführt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Metaphasechromosomen, Interphasezellkerne verschiedener Gewebe sowie Meiose-Stadien der Maus (*Mus musculus*) hinsichtlich ihrer zytogenetischen Methylierungsmuster untersucht. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde hypermethylierte DNA erfasst. Dabei wurde nach einer etablierten Methode von Schmid et al. (2015a) vorgegangen, einer abgewandelten Methode von Miller et al. (1974), bei welcher ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper gegen 5-Methylcytosin verwendet wurde. Durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper, welcher den Anti-5-Methylcytosin-Antikörper bindet, können die hypermethylierten Regionen mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Zusätzlich wurden C-Bänderungspräparate von Metaphasechromosomen und Meiose-Stadien hergestellt, um einen Vergleich zwischen konstitutivem Heterochromatin und hypermethylierter DNA ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Für die vorliegende Arbeit ist kein Ethik- und Tierversuchsvotum notwendig, da keine Kriterien vorliegen, die eine Begutachtung erfordern. Es handelt sich weder um eine Studie nach Arzneimittelgesetz noch um eine Studie, die den Kriterien der Deklaration von Helsinki entspricht, da keine Forschung am Menschen betrieben wurde. Die Versuche wurden an fixierten Maus-Zellsuspensionen bzw. kryokonservierten Zelllinien des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg durchgeführt. Dieses Material stammt aus den 1970er bzw. 1980er Jahren. Tierversuche im eigentlichen Sinn wurden nicht gemacht.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte und Software

Adobe (Dublin, Irland)	Adobe Photoshop CS 4 Adobe Illustrator CS 5
AEG (Nürnberg)	Gefrierschrank
AHF Analystechnik (Tübingen)	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) HC Filterset Tetramethylrhodamine-5-(and 6)- isothiocyanat (TRITC) HC Filterset
Applied Spectral Imaging (Edingen)	BandView® 6.0 Case Data Manager 6.0 CCD-Kamera (Modell: CCD-1300DS) FISHView® 6.0
Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)	Kühlschrank
BRAND GMBH + CO KG (Wertheim)	accu-jet®
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Gilson (Middleton, USA)	Pipetman 2 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl
Heraeus (Hanau)	CO ₂ -Begasungsbrutschrank Sterilbank Lamin Air® HB 2448

Heraeus (Hanau)	Megafuge 1.0
HN Sunlight GmbH Original Hanau (Hanau)	STERISOL®-Strahler NN30/89
Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA®-Werke (Staufen)	Magnetrührer mit Heizplatte (Typ RET)
KNF (Freiburg)	Laboport Vakuummembranpumpe
LEJ (Leistungselektronik, Jena)	LQ-HXP 120-2/100 26 B
MEDAX GmbH & Co. KG (Neumünster)	Wärmeplatte
Memmert (Schwabach)	Inkubator
Mettler-Toledo GmbH (Gießen)	PM460 Delta Range®
OLYMPUS (Hamburg)	Stereolupe OLYMPUS CK2
Siemens-Elektrogeräte GmbH (München)	Kühlschrank
Thermo Scientific (Waltham, USA)	Brutschrank HeraCell 240
ZEISS (Jena)	Axio Imager.A1 mit Fluoreszenz-Objektiven EC Plan-NEOFLUAR 20x, 100x
	Axioskop mit Phasenkontrastobjektiven Plan-APOCHROMAT 20x, Plan-NEOFLUAR 100x
	Fluoreszenz-Lampe HBO 50W 447216

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

AppliChem (Darmstadt)	Bariumhydroxid-Octahydrat (Ba(OH) ₂ x 8 H ₂ O)
	Immersionsöl fluoreszenzfrei
	Kaliumchlorid (KCl)
	Trinatriumcitrat-Dihydrat
	Tween® 20

Bode (Hamburg)	Sterillium®
Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, USA)	FALCON™ Canted-Neck Flasks 25 cm ²
Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)	Essigsäure Giemsa-Stammlösung Methanol Roti®-Histokitt II Salzsäure (HCl)
Corning Incorporated (Corning, USA)	Cell Culture Flasks Canted Neck 75 cm ²
Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)	Safe-Lock Tubes 1 ml
Fresenius AG (Schweinfurt)	Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O) Ampuwa®
Hartenstein (Würzburg)	Deckgläser Pasteurpipetten
Life Technologies GmbH (Darmstadt)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 1x)
Menzel-Gläser (Braunschweig)	Objektträger
Merck (Darmstadt)	Diethylether
PAA (Pasching, Österreich)	Penicillin/Streptomycin (100x) Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA, 10x)
PAN Biotech GmbH (Aidenbach)	Bovine Serum Albumine (BSA) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) w/o Calcium, w/o Magnesium
Sarstedt (Nürnberg)	Zentrifugenröhrchen 15 ml Biospere Filter Tips 2 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl
Schülke (Norderstedt)	terralin® liquid

Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)	Fetal Bovine Serum (FKS) Imprint® Monoclonal Anti-5-methyl- cytosine (33D3) antibody produced in mouse Sekundärantikörper Rabbit-anti- mouse-TRITC
Vector Laboratories (Linaris, Wertheim)	Vectashield with DAPI, 1,5 µg/ml
ZEISS (Jena)	Immersol™ 518F

2.2.3 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Fixativ	30 ml Methanol 10 ml Essigsäure (100%)
Zellkultur	
DMEM-Komplett-Medium	200 ml DMEM (1x) 25 ml FKS 2 ml Penicillin/Streptomycin
Trypsinlösung	90 ml DPBS 10 ml Trypsin-EDTA
0,075 M KCl	5,6 g KCl 1 l ddH ₂ O
C-Bänderung	
Gesättigte Bariumhydroxid-Lösung	5 g Ba(OH) ₂ x 8 H ₂ O 100 ml ddH ₂ O
2x SSC	176,4 g Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O 350,6 g NaCl ad 2 l ddH ₂ O, pH 7 einstellen
Phosphatpuffer für Giemsa- Färbelösung	18 g KH ₂ PO ₄ 20,7 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 2 l ddH ₂ O, pH 6,88 einstellen
Giemsa-Färbelösung (10 %)	10 ml Giemsa-Stammlösung 90 ml Phosphatpuffer

5-Methylcytosin Immunofärbung

Blocking-Puffer	500 ml DPBS
	1,5 g BSA
	0,5 ml Tween™ 20
Wasch-Puffer	500 ml DPBS
	1,5 g BSA

2.3 Herstellung der Gewebepreparate

Das verwendete Zellmaterial der männlichen Hausmaus (*Mus musculus* ♂) entstammt dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, wo es in eisgekühltem Fixativ (Methanol/Essigsäure 3:1) bei -20°C aufbewahrt wurde. Dabei handelt es sich um Zellsuspensionen von Knochenmark und Testis sowie um Gewebeproben von Milz, Niere, Leber, Dünndarm, Lunge, Skelettmuskel und Gehirn.

Objektträger, die zur Herstellung der Präparate verwendet wurden, wurden zunächst unter fließendem destilliertem Wasser für 5 min gewaschen. Von den jeweiligen Zellsuspensionen von Knochenmark oder Testis konnten direkt 3–4 Tropfen mit einer Pasteurpipette auf nasse Objektträger getropft werden. Hierbei platzen die aufgequollenen, fixierten Zellen und Chromosomen der Mitose bzw. Meiose werden freigegeben. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet.

Um die Zellen der restlichen Gewebe aufbringen zu können, erfolgte eine Aufbereitung der Proben auf der Wärmeplatte. Die Wärmeplatte wurde auf eine Temperatur von ca. 39°C gebracht. Objektträger wurden aufgelegt und 50%ige Essigsäure aufgetropft. Darin wurden nun fixierte Gewebestückchen hineingesetzt und mittels Skalpell zerkleinert. Das Einwirken der Essigsäure führt zum Lösen einzelner Zellen aus dem Zellverband, um Zellkerne einzeln analysieren zu können. Mithilfe einer Pasteurpipette wurde die Zellsuspension auf Objektträgern verteilt. Auch diese wurden anschließend an der Luft getrocknet.

2.4 Zellkultur

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfordert sterile Bedingungen, um bakterielle oder Pilzkontaminationen zu vermeiden. Daher fanden alle folgenden Schritte unter einer Sterilbank statt. Vor jedem Arbeitsbeginn wurde die Sterilbank für ca. 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Zusätzlich wurden autoklavierte Glaspipetten verwendet, welche vor dem Gebrauch abgeflammt wurden. Auch Deckel und Flaschenhalse von Medium- und Kulturflaschen wurden zur Kontaminationsprophylaxe abgeflammt.

Bei den für die Zellkultur verwendeten Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus dem Peritoneum einer weiblichen Hausmaus (*Mus musculus* ♀). Diese standen im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg zur Verfügung, wo sie bei -195°C in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Zur Kultivierung wurde ein DMEM-Komplett-Medium angesetzt, bestehend aus 200 ml DMEM, 25 ml FKS sowie 2 ml Penicillin/Streptomycin. Vor der Verwendung mussten alle Medien und Lösungen ebenso wie die eingelagerte, kryokonservierte Zelllinie im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden, um gute Wachstumsbedingungen zu erreichen. Jeweils 1 ml der Zellsuspension und 4 ml DMEM-Komplett-Medium wurden auf den beschichteten Boden von 50 ml Zellkulturflaschen übertragen. Die Lagerung erfolgte waagrecht im Brutschrank bei 37°C und 5,0% CO_2 -Begasung. Zur Gewährleistung der Begasung wurden die Deckel der Zellkulturflaschen nicht komplett verschlossen. Am darauffolgenden Tag wurde das Nährmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt, um das Einfriermedium weitestgehend zu entfernen.

In der Folge wurde alle drei bis vier Tage der Wechsel des Komplett-Mediums durchgeführt. Das verbrauchte Nährmedium wurde verworfen und die Kulturflasche mit 4 ml frischem Nährmedium wieder aufgefüllt. Dadurch werden abgestorbene Zellen und Gewebestückchen entfernt und die Nährstoffversorgung der vitalen Zellen gewährleistet. Das Wachstum der Zellkultur wurde unter dem Invertmikroskop begutachtet. War der Boden der Kulturflasche zu ungefähr drei Vierteln mit Zellen bedeckt, erfolgte das Umsetzen der Zellen in eine neue Kulturflasche. Als Vorbereitung dafür wurden zunächst 5 ml DPBS aus einer 50 ml Flasche abgenommen und 5 ml Trypsin-EDTA hinzu

pipettiert, um eine Trypsinlösung (10% Trypsin, 90% DPBS) zu erhalten. Aus der umzusetzenden Kulturflasche wurde das Nährmedium abgenommen und 4 ml der auf 37°C erwärmten Trypsinlösung hineingegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für ca. 5 min bei 37°C. Die Trypsinlösung führt zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden. Zusätzlich kann ein seitliches Anschlagen der Kulturflasche nötig sein. Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, welches mit 5 ml DMEM-Komplett-Medium befüllt war. Das darin enthaltene FKS schützt die Zellen vor dem Verdau durch Trypsin, indem es dessen Inaktivierung bewirkt. Zeigte sich unter dem Invertmikroskop eine unvollständige Ablösung der Zellen, wurden erneut 4 ml Trypsinlösung in die Kulturflasche gegeben und das Procedere wiederholt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in dasselbe Zentrifugenröhrchen überführt wie die vorherige Zellsuspension aus derselben Kulturflasche. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann bei 1100 rpm für 8 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 4 ml Komplett-Medium resuspendiert und die Suspension in neue Kulturflaschen überführt. Die weitere Inkubation erfolgte abermals im Brutschrank bei 37°C und 5,0% CO₂-Atmosphäre.

Für die Herstellung von Präparaten war ein Abbruch der Zellkultur nötig. Dazu wurde das Nährmedium der entsprechenden Kulturflasche abgesaugt und diese unter Zugabe von 3 ml Trypsinlösung für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Um die Zellen möglichst komplett vom Flaschenboden zu lösen, wurde die Kulturflasche seitlich angestoßen. Es folgte das Überführen der Zellsuspension in ein mit 3 ml DMEM-Komplett-Medium befülltes Zentrifugenröhrchen. Eine erneute Inkubation mit Trypsinlösung war wie schon beim Umsetzen erforderlich, sollten sich nicht alle Zellen von Flaschenboden gelöst haben. Nach der Zentrifugation für 8 min bei 1400 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml hypotoner Lösung (0,075 M KCl) suspendiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden für ca. 10 min bei 37°C in den Brutschrank gestellt und danach für 8 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet daraufhin in 10 ml eisgekühltem Fixativ (Methanol/Essigsäure 3:1) vorsichtig resuspendiert, um die Bildung von Zellklumpen zu vermeiden. Die Zentrifugenröhrchen wurden über Nacht bei -20°C im Eisfach aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die fixierten

Zellen für 8 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in ca. 0,5 ml frischem Fixativ gelöst. Mithilfe einer Pasteurpipette wurde die Zellsuspension durchmischt und anschließend wurden 3–4 Tropfen der Suspension auf einen nassen Objektträger aufgetropft. Dieser wurde vorher für 5 min unter fließendem destillierten Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und die fixierten Zellen weiter bei -20°C im Eisfach gelagert.

2.5 C-Bänderung

Mithilfe der C-Bänderung lässt sich konstitutives Heterochromatin im Genom darstellen. Heterochromatin ist kompakter und dichter mit Proteinen bepackt als Euchromatin. Deshalb werden durch die Behandlung mit HCl sowie mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ mehr Proteine und mehr DNA aus den euchromatischen Bereichen herausgelöst als aus den heterochromatischen. Durch die abschließende Giemsa-Färbung, welche DNA anfärbt, erscheinen heterochromatische Abschnitte dunkler als euchromatische. Aus diesem Grund wird Heterochromatin als C-Band-positiv bezeichnet.

Für die C-Band-Technik wurden Knochenmark- und Testis-Präparate verwendet, welche mindestens zwei Tage zuvor aufgetropft worden sind. Empirisch zeigte sich, dass sich damit bessere Resultate erzielen lassen als mit frischen Präparaten.

Als Vorbereitung wurden mithilfe eines Magnetrührers 5 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml ddH₂O gelöst, um eine gesättigte Bariumhydroxid-Lösung herzustellen. Diese wurde dann durch einen Faltenfilter in eine Küvette filtriert und in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zusätzlich wurde eine zweite Küvette mit 2x SSC befüllt, welche im Wasserbad auf 60°C erhitzt wurde.

Die Präparate wurden im nächsten Schritt in 0,2 N HCl für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend einer gründlichen Waschung mit H₂O unterzogen. Vor Gebrauch der gesättigten Bariumhydroxid-Lösung wurde der BaCO_3 -Niederschlag auf der Oberfläche der Lösung mit einem Filterpapier abgeschöpft. Die Präparate wurden daraufhin für 2 min in der Bariumhydroxid-Lösung bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung in 0,2 N HCl, um

Reste des Bariumhydroxids vom Objektträger zu lösen. Nachdem die Präparate erneut in H₂O gewaschen wurden, wurden sie für 75 min bei 60°C in 2x SSC inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in H₂O und die Färbung mit 10% Giemsa-Lösung für ca. 10 min. Im Anschluss wurden die Präparate noch einmal in H₂O gespült und an der Luft getrocknet. Die Eindeckung erfolgte mit 3 Tropfen Histokitt pro Objektträger und einem Deckglas. Zur Auswertung wurden die Präparate unter dem Hellfeldmikroskop untersucht.

2.6 5-Methylcytosin Immunofärbung

Die 5-Methylcytosin Immunofärbung dient der Darstellung hypermethylierter Regionen der DNA. Die Präparate, welche für die 5-Methylcytosin Immunofärbung genutzt wurden, wurden mindestens über eine Nacht getrocknet, um ein Ablösen der Zellen bei den einzelnen Färbeschritten zu verhindern. Mit der aufgetropften Seite nach oben wurden die Objektträger in ein UV-beständiges Kunststoffschälchen gelegt und dieses dann mit DPBS gefüllt. Die Präparate wurden daraufhin mit einem Abstand von 20 cm unter eine UV-Lampe gestellt und für 3 h bestrahlt. Durch die UV-Bestrahlung kommt es zur Denaturierung der chromosomalen DNA, sodass diese einzelsträngig vorliegt. Dies ist entscheidend, da der primäre Antikörper nur an einzelsträngige DNA binden kann. Nach der Bestrahlung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 1 h in einer Küvette mittels Blocking-Puffer (DPBS/0,3% BSA/0,1% Tween™ 20) geblockt, was zur Proteinabsättigung als Voraussetzung für die spezifische Bindung des Antikörpers führt. Der primäre Antikörper (Imprint® Monoclonal Anti-5-methylcytosine (33D3) antibody produced in mouse) wurde vor seiner Verwendung im Verhältnis 1:1000 mit dem Blocking-Puffer verdünnt. Von dem verdünnten Antikörper wurden 70 µl auf jeweils einen Objektträger getropft, dieser dann mit einem Deckglas abgedeckt und in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach wurde das Deckglas vorsichtig entfernt. In einer Küvette erfolgte eine zweimalige Waschung in einem Wasch-Puffer (DPBS/0,3% BSA) für jeweils 5 min, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Während der primäre Antikörper an 5-Methylcytosin bindet, richtet sich der verwendete sekundäre Antikörper (Rabbit-Anti-Mouse

IgG-TRITC) gegen den primären. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC konjugiert, wodurch dieser unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierbar ist. Zusätzlich wird durch den sekundären Antikörper das Signal verstärkt. Im Verhältnis 1:200 mit dem Wasch-Puffer verdünnt wurden 70 µl sekundärer Antikörper pro Objektträger aufgetropft. Dieser wurde wiederum mit einem Deckglas bedeckt für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas erneut vorsichtig entfernt und der Objektträger zweimal für 5 min in DPBS gewaschen. Als Eindeckmedium wurden 70 µl Antifade Lösung Vectashield mit DAPI (1,5 µg/ml) verwendet. Bei DAPI handelt es sich um einen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der vorzugsweise mit Adenin-Thymin-reicher Doppelstrang-DNA der kleinen Furche interagiert. Nach der Abdeckung mit einem Deckglas wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ferner wurden die Präparate bei Dunkelheit und 4°C in einem Kühlschrank gelagert.

2.7 Mikroskopische Aufnahmen und Bildbearbeitung

Sowohl die Präparate der C-Bänderung als auch die der 5-Methylcytosin Immunofärbung wurden mit einem Axio Imager.A1 Mikroskop ausgewertet. Außerdem wurden ein 20x EC Plan-NEOFLUAR Objektiv sowie ein 100x EC Plan-NEOFLUAR Immersionsöl Objektiv genutzt.

Die Präparate der C-Bänderung wurden zunächst mit eingestelltem Hellfeld und 20x Objektiv auf geeignete Metaphasen und Zellkerne untersucht. Diese wurden dann mit Immersionsöl und einem 100x Objektiv vergrößert. Mittels CCD-Kamera wurde eine Aufnahme der Metaphasen und Zellkerne erstellt. Das Programm BandView® sowie die Funktion Image Enhancement wurden zur Bearbeitung und Optimierung der Aufnahme verwendet. Von ausgewählten Metaphasen wurde außerdem ein Karyotyp gelegt.

Die Immunfluoreszenzpräparate der 5-Methylcytosinfärbung wurden mit dem 20x Objektiv und eingestelltem DAPI-Filter untersucht. Geeignete Metaphasen und Zellkerne wurden unter der Verwendung von Immersionsöl und einem 100x Objektiv im Bildausschnitt zentriert sowie mit der CCD-Kamera aufgenommen.

Zusätzlich zur Aufnahme im blauen Farbkanal mit DAPI-Filter wurde eine weitere im roten Farbkanal mit TRITC-Filter gemacht. Mithilfe des Programms FISHView® wurden beide Aufnahmen übereinandergelegt und dann mit dem Werkzeug Color Control bearbeitet, um störendes Hintergrundrauschen zu beseitigen. Auch hier wurde von geeigneten Metaphasen ein Karyotyp gelegt. Alle angefertigten Aufnahmen wurden mit dem Programm Case Data Manager verwaltet. Des Weiteren wurden die Aufnahmen im TIFF-Format gespeichert, sodass eine Gesamtaufnahme mittels Adobe Photoshop CS 4 erstellt und bearbeitet werden konnte. Im Adobe Illustrator CS 5 wurden die Aufnahmen zur endgültigen Abbildung (Abb.) beschriftet.

3. Ergebnisse

3.1 Metaphasechromosomen aus der Mitose

Die Untersuchung hypermethylierter Regionen an Metaphasechromosomen erfolgte an Knochenmarkspräparaten der männlichen Hausmaus sowie an Peritoneumszellen der weiblichen Hausmaus aus der Zellkultur. Diese Präparate eignen sich besonders gut für die Analyse von Chromosomen, da sowohl die Zellen des Knochenmarks als auch die der Zellkultur mitotisch aktiv sind und damit auch Metaphasen enthalten. Außerdem wurden C-Bänderungen an den Knochenmarkspräparaten durchgeführt, um einen Vergleich zu Regionen mit konstitutivem Heterochromatin zu ziehen, die das Y-Chromosom mitefassen.

Abb. 1 zeigt repräsentative Metaphasechromosomen aus dem Knochenmark, aus denen nach subjektiver Größeneinschätzung und Bänderung ein Karyotyp gelegt wurde. Bei der Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin weisen bis auf das Chromosomenpaar 15 und das Y-Chromosom alle Chromosomen ein Fluoreszenzsignal auf. Dabei findet sich das Signal ausnahmslos am Zentromer der akrozentrischen Chromosomen. Keines der Chromosomen besitzt ein Signal außerhalb der Zentromerregion. Die Signale sind deutlich zu erkennen, wobei sie in Abb. 1a insgesamt stärker ausgeprägt sind als in Abb. 1b. Zudem finden sich scheinbare Polymorphismen zwischen homologen Chromosomen: in Abb. 1a betreffend die Chromosomenpaare 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 16 und 18 sowie in Abb. 1b betreffend die Paare 2, 6, 9, 14 und 16. Auch weisen die Chromosomenpaare 3 und 5 sowie das X-Chromosom in Abb. 1a starke und in Abb. 1b schwache Fluoreszenzsignale auf. Diese feinen quantitativen Unterschiede sind jedoch eher auf methodische Ursachen, wie Unterschiede beim Nachweis des Antikörpers, als auf tatsächliche Unterschiede der Methylierung zurückzuführen.

In der C-Bänderung weisen alle Chromosomen ein deutliches Signal am Zentromer auf, wobei das Y-Chromosom in seiner Gesamtheit angefärbt wird (Abb. 1c und d). In 1d ist das Y-Chromosom im Bereich des Zentromers etwas stärker angefärbt als in den Armen, wohingegen das Y-Chromosom in 1c eine

homogene Färbung hoher Intensität vorweist. Weitere Polymorphismen finden sich hier nicht.

Der Vergleich zwischen beiden Färbungen zeigt in allen 5-Methylcytosin-positiven Bereichen eine positive C-Bande. Lediglich die Bereiche der C-Banden des Y-Chromosoms und des Chromosoms 15 weisen keine entsprechenden 5-Methylcytosin-positive Signale auf.

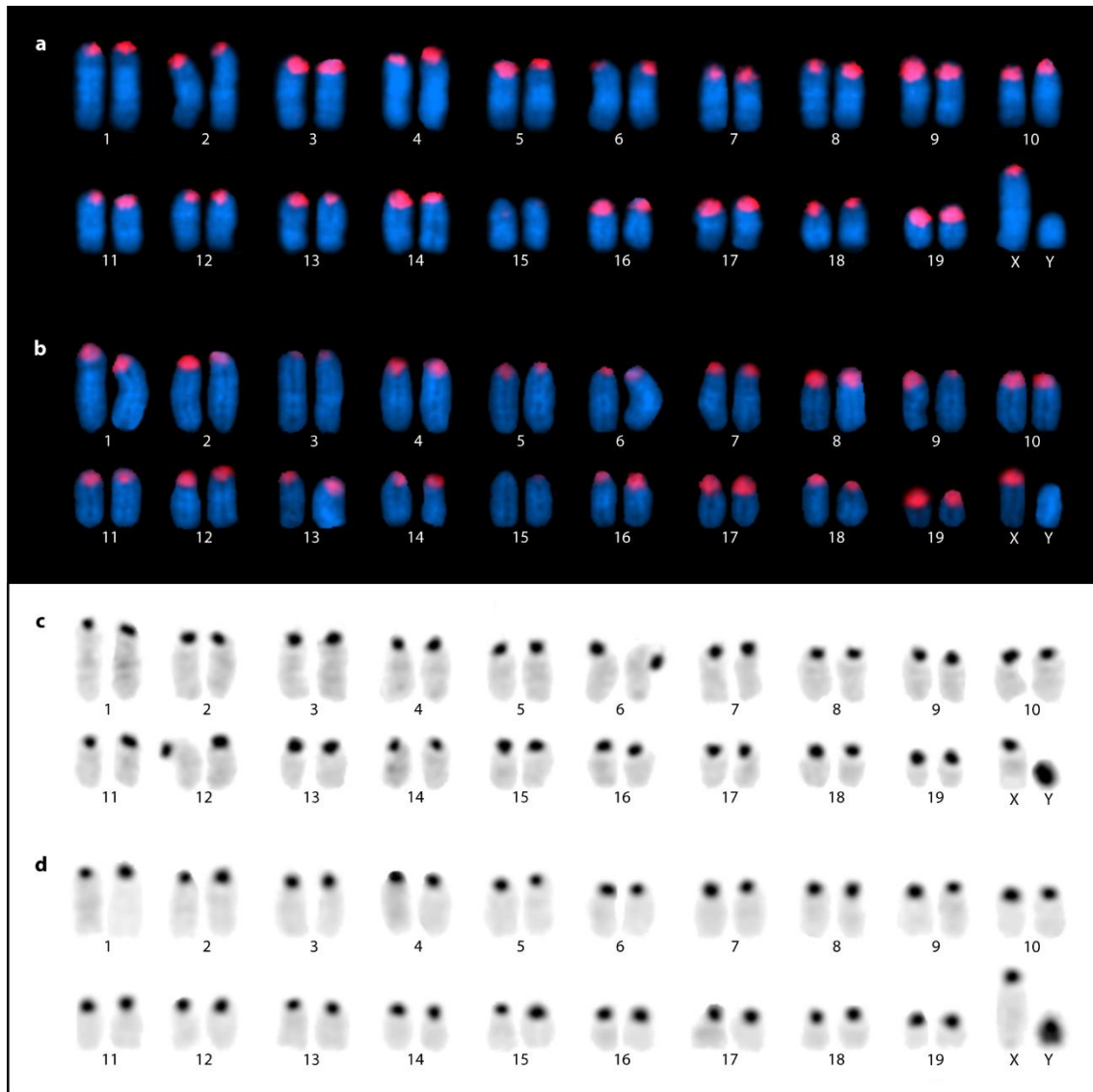


Abb. 1 Karyotypen von Knochenmarkszellen einer männlichen Maus. **a, b** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung. **c, d** C-Bänderung.

Die 5-Methylcytosin Immunofärbung an weiblichen Peritoneumszellen ist in Abb. 2 dargestellt. Auch hier weisen alle Chromosomen bis auf das Chromosom 15 ein Fluoreszenzsignal am Zentromer auf. Die Stärke des Signals unterscheidet

sich hierbei vor allem zwischen Chromosomenpaaren verschiedener Metaphasen und weniger zwischen den homologen Chromosomen. So zeigen die Chromosomen bei den repräsentativ ausgewählten Metaphasen in Abb. 2a insgesamt schwächere Banden als in Abb. 2b. Vor allem bei den Chromosomenpaaren 1, 3, 4, 5, 6, 8 sowie den X-Chromosomen ist der Unterschied sichtbar. Scheinbare Polymorphismen zwischen homologen Chromosomen fallen in Abb. 2a bei den Chromosomenpaaren 3, 6, 7 und 13 auf: Während an einem Chromosom deutlich zwei Signale zu erkennen sind, scheint bei dem homologen Chromosom nur eine Chromatide ein Signal zu tragen. Beim Chromosomenpaar 1 in Abb. 2a weisen beide Homologen nur an einer Chromatide ein sicheres Signal auf. Dies resultiert auch hier am ehesten durch die Nachweismethode.

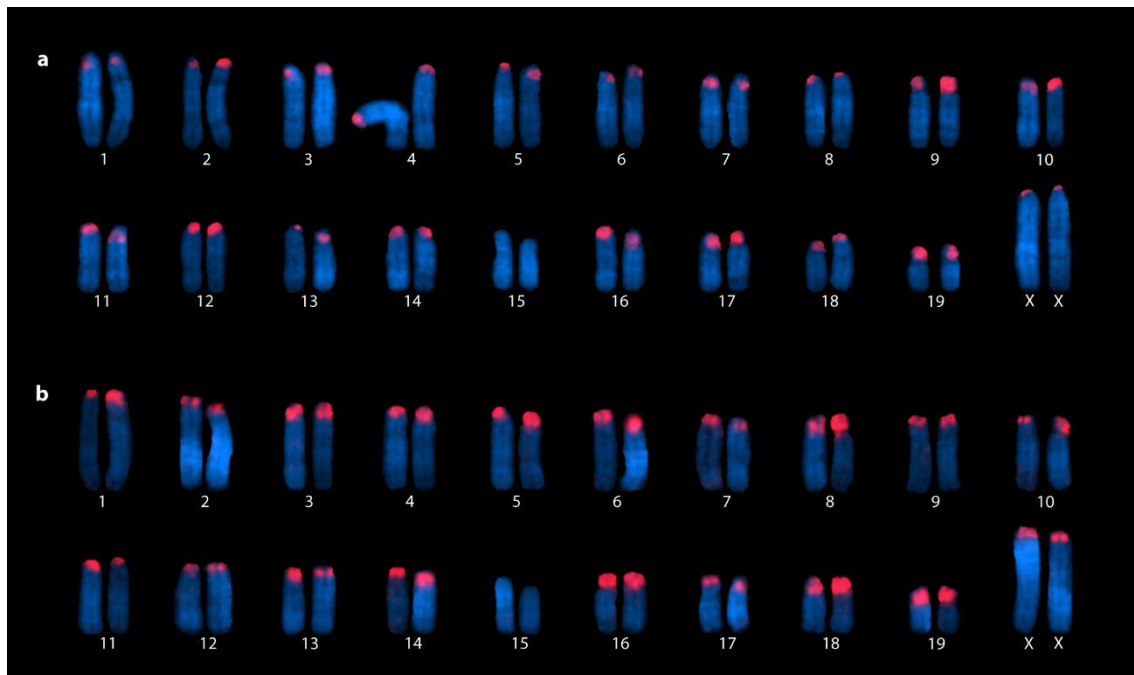


Abb. 2 Karyotypen von Peritoneumszellen einer weiblichen Maus. **a**, **b** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung.

3.2 Interphasezellkerne

Zellen in adulten, ausdifferenzierten Geweben durchlaufen in der Regel keine Zellteilungen und befinden sich dauerhaft in der Interphase, der sogenannten G₀-Phase (Graw, 2015). Metaphasen waren in den Präparaten aus Milz, Niere, Peritoneum, Lunge, Dünndarm, Skelettmuskel, Gehirn und Leber nicht zu finden,

sodass die Untersuchung hypermethylierter Regionen an Interphasezellkernen erfolgte. Zusätzlich wurden Interphasezellkerne aus dem Knochenmark sowie aus den Zellkulturen des Peritoneums analysiert. Die Zellkerne entstammen dabei mit Ausnahme der Zellkerne aus der Zellkultur, welche aus einem weiblichen Tier stammen, der männlichen Hausmaus.

Die rundlichen, DAPI-gefärbten Zellkerne des Knochenmarks weisen insgesamt eine homogene Färbung auf (Abb. 3a und b). Einzelne Zellkerne weisen punktförmige Verdichtungen höherer Intensität auf (Abb. 3b). Diese DAPI-Verdichtungen kennzeichnen sogenannte Chromozentren (Mayer et al., 2005, Podgornaya et al., 2018). Hierbei handelt es sich um Anhäufungen von zentromerischem und perizentromerischem Heterochromatin (Mayer et al., 2005). Die roten Fluoreszenzsignale in Abb. 3a und b finden sich unregelmäßig begrenzt in drei bis fünf Hauptbereichen, die fleckenartig über den gesamten Zellkern verteilt sein können. Außerdem fallen vereinzelt diffuse Signale auf, wie in Abb. 3a zwischen 12 und 2 Uhr. In Abb. 3b decken sich die Signale mit den Chromozentren, wobei nicht jedes Chromozentrum ein Signal aufweist. In der C-Bänderung finden sich in den Knochenmarkszellkernen Signale hoher und etwas geringerer Intensität (Abb. 3c und d). Die schwächeren Banden sind fleck- oder fadenartig über den gesamten Kern verteilt, während sich die starken Banden fleck- und punktförmig auf den schwächeren Banden verteilen. Die Zahl und Größe insbesondere der starken Banden zeigt deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Kernen. In 3c finden sich sehr viele, kleinere Signale, wohingegen in 3d weniger, größere Signale auszumachen sind. Dabei entsprechen die stärkeren Banden den C-Banden im eigentlichen Sinne.

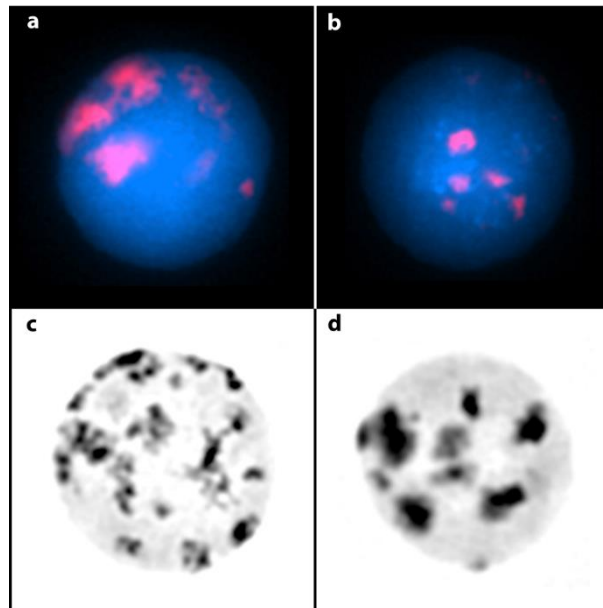


Abb. 3 Interphasezellkerne aus dem Knochenmark einer männlichen Maus. **a, b** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung. **c, d** C-Bänderung.

Im Folgenden wurden repräsentative Interphasezellkerne der verschiedenen Gewebe ausgewählt, jedoch ohne dass eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp möglich ist (s. 4.2). Außerdem ist anzumerken, dass eine eindeutige Bestimmung der Anzahl der Fluoreszenzsignale nicht immer möglich war, da eine klare Abgrenzbarkeit nicht gegeben war.

Zellkerne aus Milzgewebe in Abb. 4a und b zeigen eine homogene DAPI-Färbung, teilweise mit angedeuteten Chromozentren (Abb. 4b). Das Fluoreszenzsignal findet sich konzentriert auf vier bis sechs größere Stellen, welche in Abb. 4b nicht deckungsgleich mit den Chromozentren sind.

Die Zellkerne des Nierengewebes stellen sich insgesamt heterogen dar. In Abb. 4c besitzt der kleine, rundliche Kern eine homogene DAPI-Färbung mit siebzehn kleinen fleckförmigen Signalen über das gesamte Lumen verteilt. Der große, rundliche Kern in Abb. 4d weist eine inhomogene DAPI-Färbung auf: 21 punktförmige Chromozentren verteilen sich auf dem schwächer angefärbten Kern. Es finden sich zehn Fluoreszenzsignale, größtenteils punktförmig, die allesamt deckungsgleich mit Chromozentren sind. Damit weisen elf Chromozentren kein Signal auf.

Im Peritoneum zeigen die einzelnen, rundlichen Zellkerne ein untereinander ähnliches Erscheinungsbild mit relativ gleichmäßiger DAPI-Färbung (Abb. 4e und f). Die Fluoreszenzsignale sind über den gesamten Zellkern verteilt und variieren in der Anzahl. In Abb. 4e zeigen sich um die 30 Signale. Die genaue Anzahl ist allerdings nicht bestimmbar, da keine eindeutigen Abgrenzungen zu erkennen sind. In Abb. 4f lassen sich zwölf Signale unterschiedlicher Größe sowie weitere kleine Signalpunkte ausmachen.

Im Lungengewebe finden sich wiederum verschiedenartige Zellkerne, was sowohl die Größe als auch die Färbung betrifft. Der große Zellkern in Abb. 4g weist eine gleichmäßige, eher blasse DAPI-Färbung mit einzelnen, punktförmigen Verdichtungen auf, welche sich alle mit Fluoreszenzsignalen decken. Es finden sich vierzehn, vornehmlich runde, mittelgroße Signale sowie drei vergleichsweise sehr kleine Signale. Der Zellkern in 4h ist deutlich kleiner und weist fünf deutliche Chromozentren auf, wovon jeweils zwei ein starkes Fluoreszenzsignal tragen. Des Weiteren zeigt sich ein zusätzliches starkes Signal sowie viele kleine, punktförmige Signale außerhalb der Chromozentren. Die kleinen Signale liegen dabei vor allem randständig.

Bei den Zellkernen aus dem Dünndarm finden sich sowohl runde als auch ovale Kerne. Bei beiden zeigen sich vereinzelt rundliche Chromozentren bei sonst homogener DAPI-Färbung. Der runde Zellkern in Abb. 4i zeigt sechszehn Fluoreszenzsignale, welche im Bereich der DAPI-Verdichtungen liegen. Der ovale Zellkern in Abb. 4j weist, je nach Zählweise, sechs bis acht Signale auf. Die Signale sowohl in Abb. 4i als auch in 4j variieren leicht in ihrer Größe. Daher ist nicht eindeutig festzulegen, ob im unteren Bereich des ovalen Kerns ein oder tendenziell eher drei Signale liegen. Außerdem sind die Signale hier nicht deckungsgleich mit den wenigen Chromozentren.

Die ovalen Zellkerne der Skelettmuskulatur in Abb. 4k und l zeigen eine eher inhomogene DAPI-Färbung mit jeweils fünfzehn bzw. dreizehn runden Verdichtungen. Die kleinen punktförmigen Fluoreszenzsignale in beiden Kernen sind diffus über den gesamten Zellkern verteilt, wobei diese zum einen randständig und zum anderen zentral konzentriert sind. Dabei decken sich die Bereiche mit hoher Signaldichte nicht in jedem Fall mit den Chromozentren.

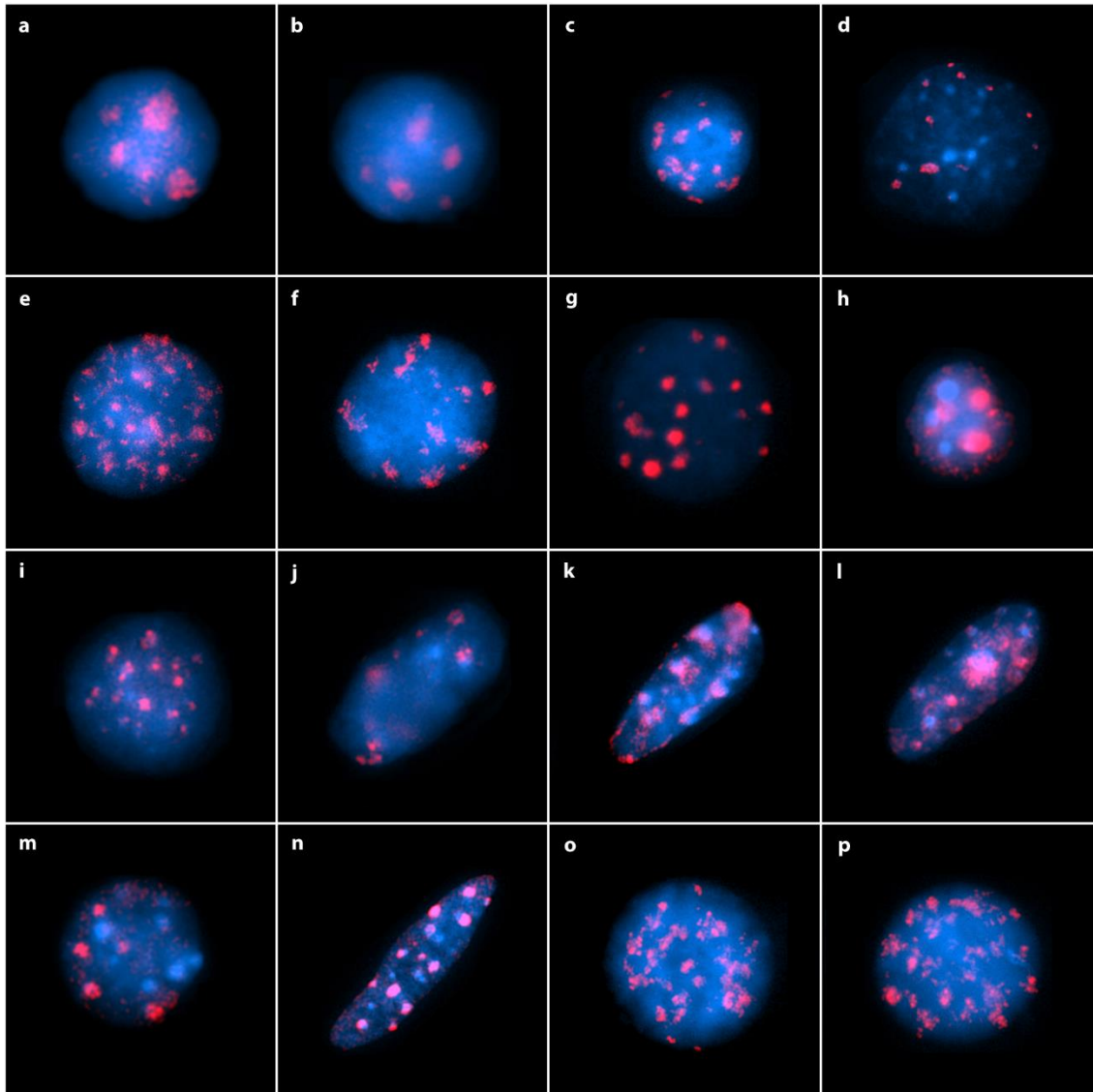


Abb. 4 Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Interphasezellkernen. **a, b** Milz, **c, d** Niere, **e, f** Peritoneum, **g, h** Lunge, **i, j** Dünndarm, **k, l** Skelettmuskel, **m, n** Gehirn, **o, p** Zellkultur des Peritoneums.

Auch unter den Zellkernen des Gehirns finden sich runde und ovale Kerne. Der runde Zellkern in Abb. 4m zeigt 14 Chromozentren bei ansonsten homogener Färbung. Es finden sich fünf größere Fluoreszenzsignale, welche deckungsgleich mit Chromozentren sind, sowie zusätzlich kleine, diffuse, punktförmige Signale im Bereich des gesamten Zellkerns. In Abb. 4n weist der ovale Kern siebzehn runde Chromozentren auf, wovon wiederum dreizehn ein deutliches Fluoreszenzsignal zeigen. Zusätzlich lassen sich viele, sehr kleine punktförmige Signale ausmachen. Sowohl in Abb. 4m als auch in 4n weisen somit nicht alle Chromozentren ein Fluoreszenzsignal auf.

Beide Zellkerne aus der Zellkultur des Peritoneums in Abb. 4o und p zeigen eine homogene DAPI-Färbung des gesamten, runden Kerns. Chromozentren sind allenfalls in Abb. 4p auf 3 Uhr auszumachen. Beide Zellkerne weisen mindestens 20 diffuse, fleckenartige Fluoreszenzsignale auf, ohne dass hierbei eine genaue Anzahl an Signalen bestimmt werden kann. Die Signale sind jeweils über den gesamten Zellkern verteilt.

Die Zellkerne der Leber zeigen bereits in ihrer Größe eine große Variabilität. Neben Zellkernen (Abb. 5b), die in der Größe vergleichbar mit den Zellkernen anderer Gewebe wie in Abb. 4 sind, kommen auch Zellkerne (Abb. 5a) vor, die um ein Vielfaches größer sind. Die großen Zellkerne zeigen eine weniger intensive DAPI-Färbung mit vielen, in diesem Fall (Abb. 5a) über zwanzig, punktförmigen Chromozentren. Die zumeist sehr kleinen, punktförmigen Fluoreszenzsignale finden sich in Bereichen der Chromozentren, sind jedoch in ihrer Anzahl deutlich geringer als diese. Im Gegensatz dazu zeigt der Zellkern in Abb. 5b eine deutlich homogenere und intensivere DAPI-Färbung mit einzelnen Verdichtungen. Es finden sich sieben rundliche Signale, davon vier größere und drei kleinere, welche deckungsgleich mit den Chromozentren sind.

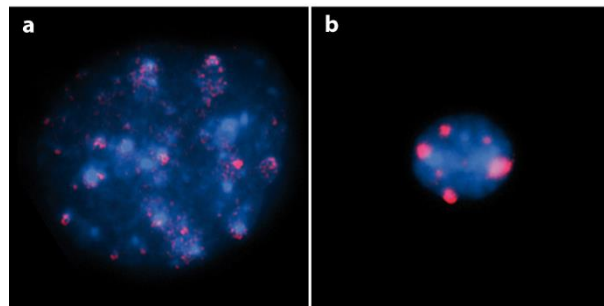


Abb. 5 a, b Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Interphasezellkernen der Leber.

3.3 Zellkerne aus Testismaterial und Meiose-Stadien

In den Färbungen des Testismaterials finden sich neben Zellkernen von Zellen des Interstitiums ebenfalls die Stadien der Spermatogenese. Die Zuordnung der Stadien der Spermatogenese und insbesondere der Meiose erfolgt anhand der morphologischen Zuordnung von Oud et al. (1979).

Im gesamten Untersuchungsmaterial des Testis ließ sich keine spermatogoniale Metaphase mit vollständigem Chromosomensatz in der Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin finden, sodass in Abb. 6a eine Metaphase mit 39 Chromosomen dargestellt ist. Außerdem war es sowohl bei der Immunofärbung als auch bei der C-Bänderung nicht möglich einen Karyotyp zu legen, da die Chromosomen zu dicht aneinander lagen und eine eindeutige Trennung der einzelnen Chromosomen nicht erfolgen konnte.

Von den 39 Chromosomen der spermatogonialen Metaphase (Abb. 6a) weisen 18 ein Fluoreszenzsignal auf. Dabei finden sich sowohl Signale mit hoher Intensität als auch Signale mit schwacher Intensität. Sind Signale vorhanden, so sind diese ausnahmslos am Zentromer zu finden. Kein Chromosom weist mehr als ein rotes Signal auf.

Bei der C-Bänderung in Abb. 6b tragen alle 40 Chromosomen mit Ausnahme des Y-Chromosoms ein klares Signal am Zentromer. Das Y-Chromosom weist hingegen eine vollständige homogene Färbung auf, welche eine geringere Intensität aufweist als die Signale, jedoch eine höhere Intensität als die Arme der übrigen Chromosomen.

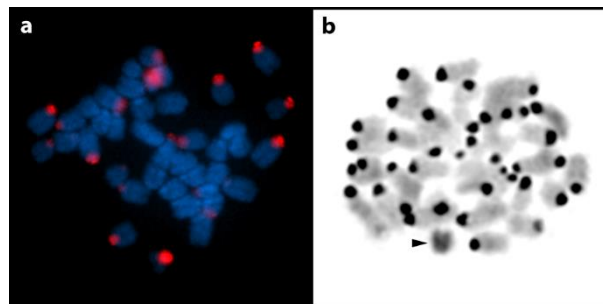


Abb. 6 Spermatogoniale Metaphase. **a** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung. **b** C-Bänderung mit Kennzeichnung des Y-Chromosoms.

In Abb. 7a und b zeigen die primären Spermatozyten eine vergleichsweise geringe Intensität der DAPI-Färbung. Bereiche mit stärkerer Intensität sind in Abb. 7b deckungsgleich mit den roten Fluoreszenzsignalen. In Abb. 7a finden sich sieben eindeutige Fluoreszenzsignale, wovon eines deutlich stärker ausgeprägt ist als die anderen. In Abb. 7b zeigen sich elf eindeutige Signale, wovon drei Signale eine starke Intensität aufweisen.

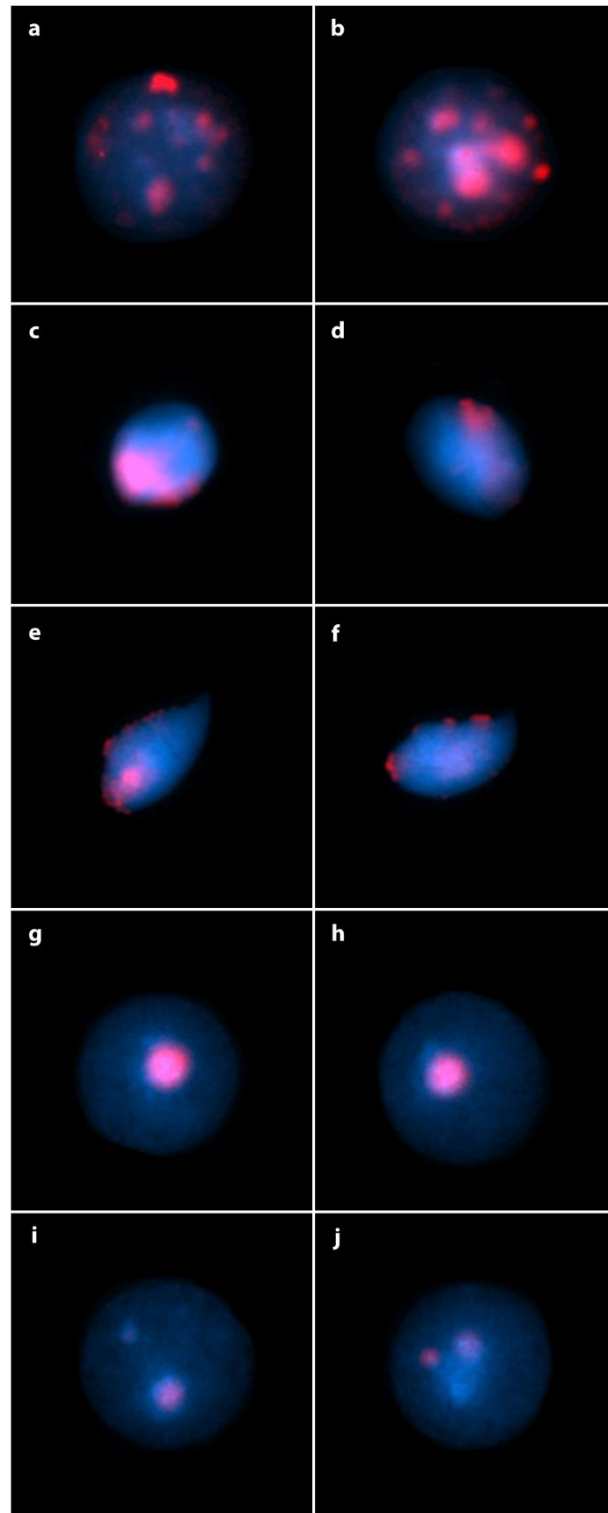


Abb. 7 Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Zellkernen aus Testismaterial der Maus. **a, b** Primäre Spermatozyten, **c, d** Spermatiden, **e, f** Spermatozoen, **g, h, i, j** Sertoli-Zellen.

Die Spermatiden in Abb. 7c und d weisen einen kleinen, runden Zellkern mit hoher DAPI-Intensität auf. In beiden Zellkernen findet sich ein deutliches, randständiges Fluoreszenzsignal.

Das typische Erscheinungsbild der Maus-Spermatozoen ist in Abb. 7e und f zu erkennen. Der ovale Zellkern ist zu einer Seite hin abgerundet und zur anderen Seite, dem Bereich des Akrosoms, hin spitz und gekrümmt. Er weist eine homogene DAPI-Färbung auf. Sowohl in Abb. 7e als auch in Abb. 7f findet sich das Hauptfluoreszenzsignal im Bereich der Rundung. Sehr kleine, punktförmige Signale, teils einzeln, teils perlenschnurartig, finden sich in beiden Zellkernen im Randbereich.

Die Zellkerne der Sertoli-Zellen in Abb. 7g, h und i weisen eine homogene DAPI-Färbung mit einem (Abb. 7g und h) bzw. zwei (Abb. 7i) runden Chromozentren auf. Die Fluoreszenzsignale in Abb. 7g und h sind deckungsgleich mit den Chromozentren. In Abb. 7i befindet sich ein schwaches Fluoreszenzsignal im größeren Chromozentrum. Der Sertoli-Zellkern in Abb. 7j weist zentral einen Bereich mit stärkerer DAPI-Färbung auf, in dessen Randbereich wiederum drei Chromozentren liegen. Zwei dieser Chromozentren weisen ein schwaches rotes Signal auf.

Die C-Bänderung der Spermatozoen (Abb. 8a und b) zeigt eine inhomogene Färbung des Zellkerns. In kleinen Bereichen, vor allem im Bereich der Rundung, findet sich keine Färbung, während sich viele kleine, starke Signale mittig und randständig zeigen. In Abb. 8a finden sich die starken Signale hauptsächlich mittig, in Abb. 8b eher randständig. Im Bereich des Akrosoms findet sich eine relativ homogene Färbung mittlerer Intensität.

In Abb. 8c und d weisen die Zellkerne der Sertoli-Zellen in der C-Bänderung eine homogene Färbung mit jeweils drei (Abb. 8c) bzw. zwei (Abb. 8d) deutlichen, runden Signalen auf.

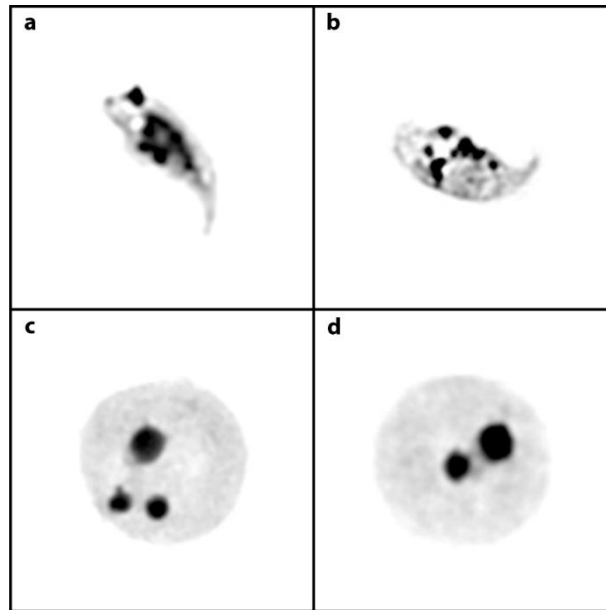


Abb. 8 C-Bänderung an Zellkernen aus Testismaterial der Maus. **a, b** Spermatozoen, **c, d** Sertoli-Zellen.

Bei den Meiose-Stadien lässt sich aufgrund der DAPI-Färbung der DNA die Kondensation der Chromosomen gut nachvollziehen. Somit können insbesondere die Stadien der Prophase I identifiziert werden.

Abb. 9a zeigt mit dem Leptotän die beginnende Verdichtung des Chromatins. Zudem finden sich elf punktförmige Fluoreszenzsignale. Bereits hier lässt sich der Übergang in das Bouquet-Stadium erkennen: In einem Bereich des Zellkerns zeigt sich ein Chromozentrum, welches als Knotenpunkt zur Anheftung für die Telomere zu dienen scheint.

In Abb. 9b ist die Verdichtung des Chromatins weiter vorangeschritten. Die Chromosomen scheinen schleifenartig in das Lumen zu ragen, ausgehend vom Knotenpunkt im unteren, rechten Quadranten. Die vorhandenen Fluoreszenzsignale konzentrieren sich scheinbar in einem Bereich des Zellkerns. Zusätzlich sind weitere sehr kleine Signale im Kernlumen vorhanden.

Mit der weiteren Kondensierung schreitet auch die Paarung der Chromosomen weiter voran. In Abb. 9c liegen die vorhandenen Fluoreszenzsignale größtenteils paarweise zusammen. Es finden sich vier Paare auf ca. 3, 4, 7 und 8 Uhr sowie drei einzelne Signale.

Im Diplotän (Abb. 9d) sind die Paarungen nicht mehr auf der gesamten Chromosomenlänge vorhanden; es finden sich elf einzelne rote Signale. Jedoch scheinen die Chromosomen über einzelne Knotenpunkte noch miteinander in Verbindung zu stehen.

Die Metaphase I (Abb. 9e, f und g) zeigt vollständig kondensierte Chromosomen. Die Homologen liegen paarweise zusammen und sind in einem kleinen Bereich miteinander verbunden. Es finden sich jeweils 20 Chromosomenpaare. Bis auf das Sexbivalent, erkennbar an der Asymmetrie, ist keine Zuordnung zu einem bestimmten Chromosomenpaar möglich. Die Fluoreszenzsignale befinden sich an den freien Enden der Chromosomen, sodass die Signale der homologen Chromosomen zu gegenüberliegenden Seiten zeigen. Einzig in Abb. 9e sind zwei Chromosomenpaare zu finden, bei denen das Signal scheinbar im Bereich, in dem die Homologen miteinander in Verbindung stehen, auftritt. Dies betrifft zum einen das zentral gelegene Chromosomenpaar und zum anderen das Chromosomenpaar auf 3 Uhr. Weiterhin ist auffällig, dass Chromosomenpaare vorliegen, bei denen ein Chromosom ein Fluoreszenzsignal trägt und das homologe Chromosom kein Signal. Dies betrifft neben dem Sexbivalent in Abb. 9e und f neun Paare in Abb. 9e und f sowie fünf Paare in Abb. 9g. In Abb. 9e finden sich acht Paare, bei denen beide Homologen ein Signal tragen, in Abb. 9f zwei Paare und in Abb. 9g sieben Paare. Dass keines der beiden Homologen ein Signal aufweist, trifft in Abb. 9e auf zwei Paare, in Abb. 9f auf acht Paare und in Abb. 9g ebenfalls auf acht Paare, darunter das Sexbivalent, zu. Insgesamt ergeben sich somit 26 Fluoreszenzsignale für Abb. 9e, 14 für Abb. 9f und 19 für Abb. 9g.

In der Metaphase II (Abb. 9h, i und j) sind die kondensierten Schwesterchromatiden miteinander verbunden. Pro Metaphase finden sich jeweils 20 Chromosomen, jedoch ohne mögliche Zuordnung zu einem bestimmten Chromosom. Ist ein Fluoreszenzsignal vorhanden, so befindet es sich im Bereich, in dem die Chromatiden miteinander in Verbindung stehen, also im Zentromerbereich. Wie auch schon in der Metaphase I finden sich auch in der Metaphase II Polymorphismen in Bezug auf die Stärke und Anzahl der Signale. In Abb. 9h zeigen fünf Chromosomen ein starkes Signal, neun ein mäßiges

Signal und sechs ein schwaches bzw. kein Signal. Jeweils fünf Chromosomen weisen in Abb. 9i ein starkes und ein mäßiges Signal auf. Die verbleibenden zehn Chromosomen zeigen ein schwaches bis kein Signal. In Abb. 9j weisen wiederum neun Chromosomen ein starkes Signal auf, sechs ein mäßiges und fünf ein schwaches bzw. kein Fluoreszenzsignal. Auch hierbei ist jedoch zu beachten, dass scheinbare Polymorphismen am ehesten auf Unterschiede beim Antikörpernachweis zurückzuführen sind. Dies gilt auch für den Eindruck, dass sich sowohl in Metaphase I als auch in Metaphase II teilweise einzelne rote Signale den einzelnen Schwesterchromatiden zuordnen lassen.

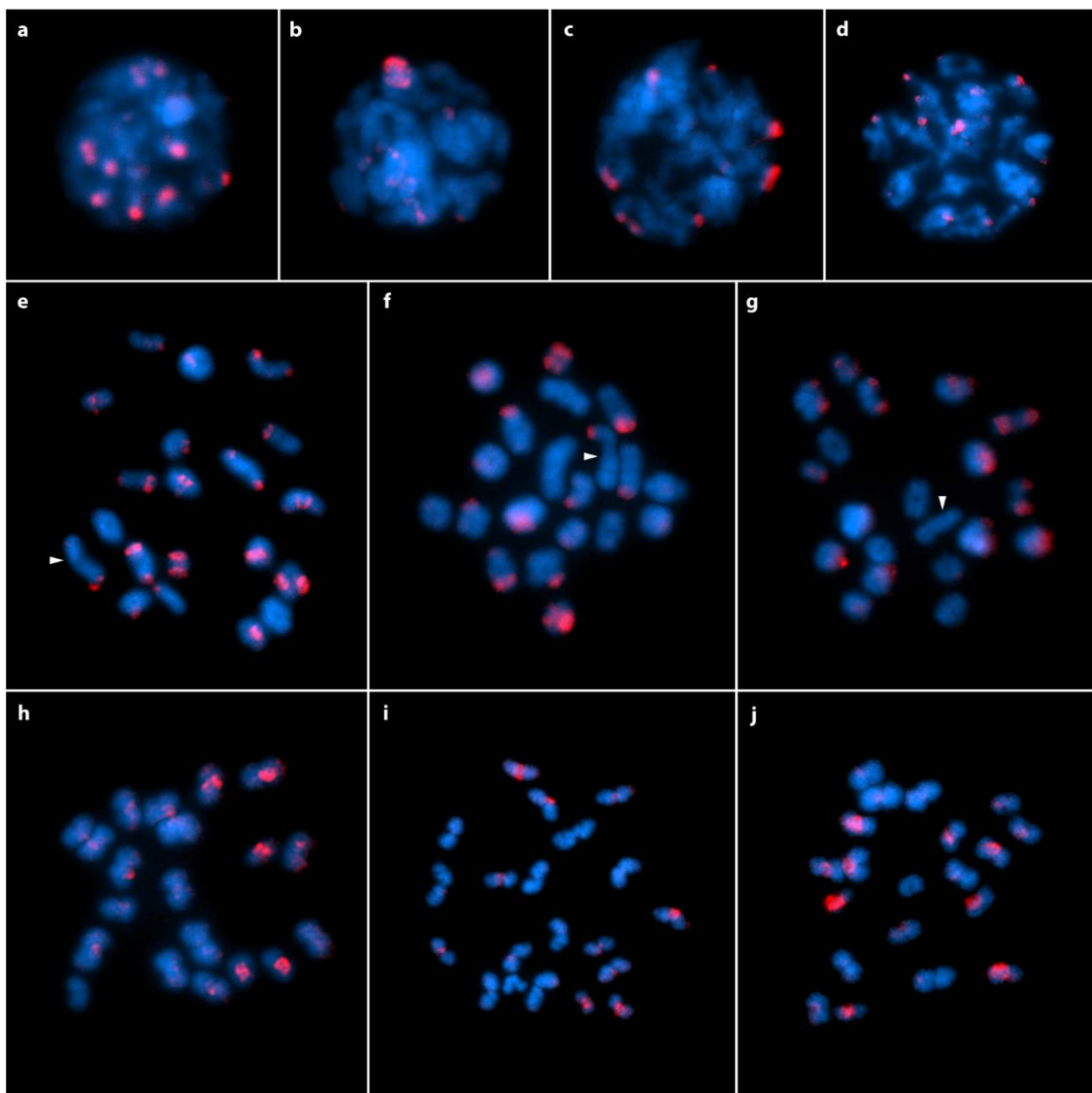


Abb. 9 Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Meiose-Stadien. Stadien der Prophase I: **a** Leptotän, **b** Bouquet, **c** Pachytän, **d** Diplotän. **e**, **f**, **g** Metaphase I mit Kennzeichnung des Sexbivalents. **h**, **i**, **j** Metaphase II.

Auch in der C-Bänderung lässt sich in der Prophase I ein Fortschreiten der Kondensation der Chromosomen erkennen (Abb. 10a, b und c). Sehr deutlich lässt sich in allen Stadien das Y-Chromosom detektieren. Es trägt ein deutliches Signal und lässt sich in der Gesamtheit stärker anfärben als die übrigen Chromosomen. Die paarweise Zuordnung der Chromosomen scheint in Abb. 10a zu beginnen, in Abb. 10b weiter vorangeschritten und in Abb. 10c wieder rückläufig zu sein. Insbesondere in Abb. 10b sind die deutlich erkennbaren C-Banden paarweise angeordnet. Aufgrund der teilweise vorhandenen Überlagerung lässt sich die Anzahl der C-Banden nicht eindeutig bestimmen. Es finden sich in Abb. 10a mindestens 39, in Abb. 10b mindestens 36 und in Abb. 10c mindestens 38 Signale.

Eine eindeutige Bestimmung der Anzahl der C-Banden ist jedoch sowohl in der Metaphase I (Abb. 10d und e) als auch in der Metaphase II (Abb. 10f, g, h und i) möglich. Mit Ausnahme eines Chromosomenpaares in Abb. 10d auf 9 Uhr, welches nur ein Signal aufweist, besitzt jedes Paar der Metaphase I zwei deutliche C-Banden. In der Metaphase II findet sich an jedem Chromosom eine klar erkennbare C-Bande. Größtenteils sind auch einzelne Signale für die jeweiligen Schwesterchromatiden auszumachen.

In der Metaphase I befinden sich die C-Banden gegenüberliegend an den Enden der gepaarten 40 Chromosomen, also im Bereich der Zentromere. Bei kleinen Chromosomenpaaren, beispielsweise in Abb. 10d im Randbereich auf 4 Uhr, liegen die C-Banden dabei näher aneinander. Das Sexbivalent ist in beiden Metaphasen eindeutig anhand der deutlichen Färbung des Y-Chromosoms und der damit einhergehenden Asymmetrie zu erkennen.

Das Y-Chromosom ist auch in der Metaphase II eindeutig zu erkennen. Es weist keine deutliche C-Bande auf, ist jedoch in der Gesamtheit stärker angefärbt als die übrigen Chromosomen (Abb. 10h und i). In Abb. 10f und g fehlt das Y-Chromosom, da stattdessen ein X-Chromosom vorhanden ist. Es lässt sich jedoch morphologisch nicht von den Autosomen unterscheiden. In der Metaphase II befinden sich die C-Banden ebenfalls im Zentromerbereich, über den die Schwesterchromatiden miteinander in Verbindung stehen. Insgesamt

finden sich jeweils 20 Chromosomen mit jeweils zwei Schwesterchromatiden in jeder Metaphase II.

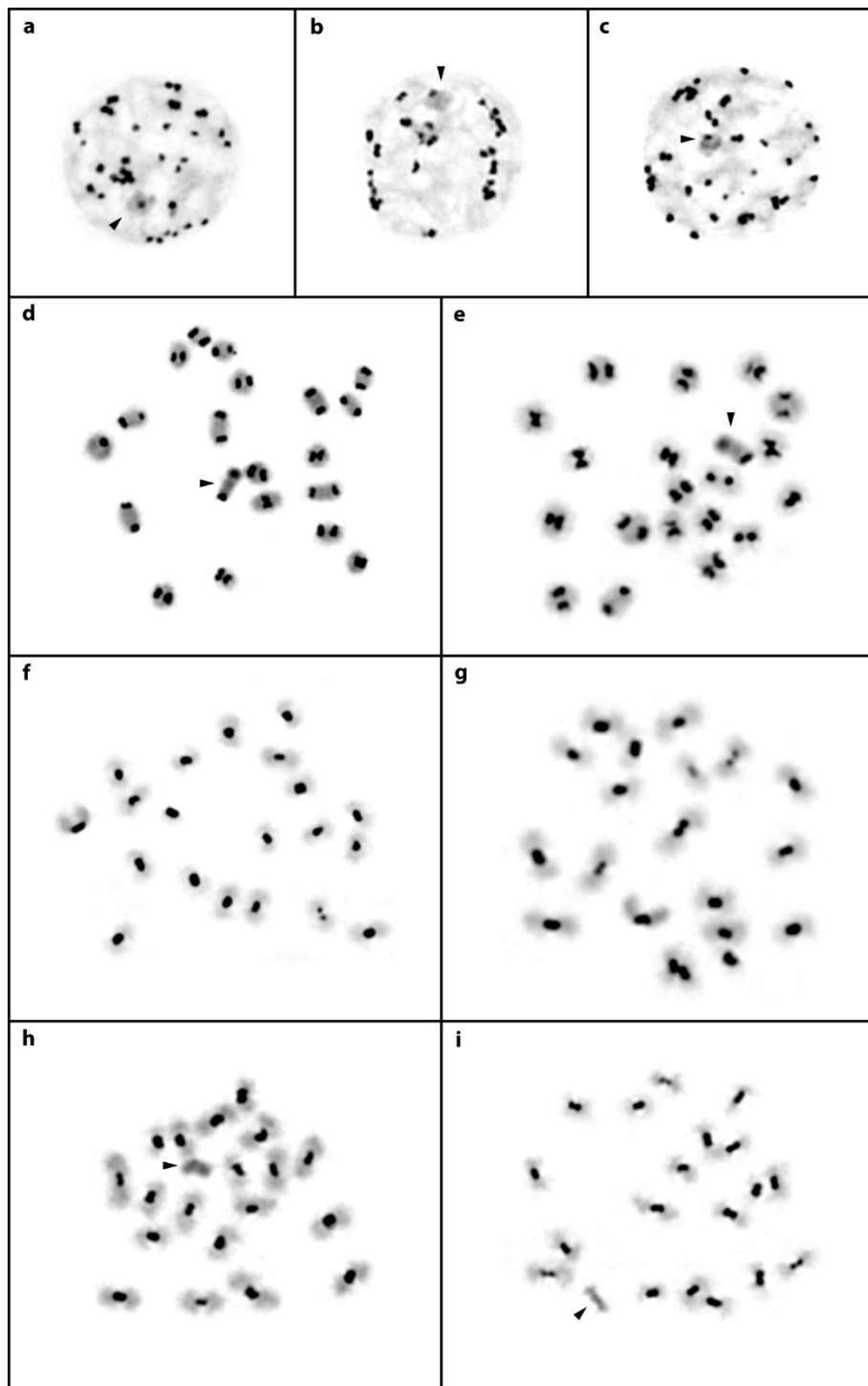


Abb. 10 C-Bänderung an Meiose-Stadien. Stadien der Prophase I: **a** Zygotän, **b** Pachytän, **c** Übergang Diplotän mit Kennzeichnung des Y-Chromosoms. **d**, **e** Metaphase I mit Kennzeichnung des Sexbivalents. Metaphase II: **f**, **g** mit X-Chromosom, **h**, **i** mit Kennzeichnung des Y-Chromosoms.

4. Diskussion

4.1 Metaphasechromosomen aus der Mitose

Die etablierte Methode der 5-Methylcytosin Immunofärbung lieferte sowohl an den Chromosomen aus der Knochenmarkszellsuspension als auch an den Chromosomen aus der Zellkultur verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse. Es ließen sich jeweils mehrere, vollständige Metaphasen mit eindeutigen Fluoreszenzsignalen nachweisen. Mit Ausnahme des Y-Chromosoms sowie des Chromosomenpaares 15 lassen sich an allen Chromosomen Signale im Zentromerbereich nachweisen. Auch weisen alle Chromosomen eine positive C-Bande im Bereich des Zentromers auf, wobei das Y-Chromosom in seiner Gesamtheit angefärbt wird. Somit ergibt sich für alle Chromosomen bis auf die genannten Ausnahmen eine Übereinstimmung des konstitutiven Heterochromatins mit hypermethylierten DNA-Bereichen. Die hohe Konzentration von 5-Methylcytosin in C-Banden-positiven Regionen des zentromerischen Heterochromatins entspricht den Ergebnissen von Miller et al. (1974). Bei der Maus besteht die DNA im zentromerischen Heterochromatin aus sogenannter Satelliten-DNA (Pardue and Gall, 1970). Hierbei handelt es sich um hochrepetitive DNA-Sequenzen, welche in ihrer Größe zwischen fünf und einigen hundert Basenpaaren variieren können (Saksouk et al., 2015). Miller et al. (1974) folgern aus ihren Ergebnissen, dass die Satelliten-DNA der Maus eine hohe Konzentration an 5-Methylcytosin aufweist, was wiederum mit den Ergebnissen von Salomon et al. (1969) übereinstimmt.

Zentromere spielen eine fundamentale Rolle während der Zellteilung. Die primäre Funktion besteht in der Anheftung der Proteinkomplexe des Kinetochors, welche wiederum der Anheftung der Spindelmikrotubuli dienen, sowie in der Stabilisierung der Paarung der Schwesterchromatiden (Hernandez-Saavedra et al., 2017). Die genaue Funktion von DNA-Methylierung im Bereich des zentromerischen Heterochromatins ist noch weitestgehend unbekannt (Saksouk et al., 2015). DNA-Methylierung in diesem Bereich kontrolliert und stabilisiert die räumliche Organisation und Interaktion mit der Kernhülle (Saksouk et al., 2014). Außerdem schützt sie vor Umwandlung in fakultatives Heterochromatin (Saksouk

et al., 2014). Insgesamt scheint DNA-Methylierung im Bereich der Zentromere im komplexen Zusammenspiel mit weiteren epigenetischen Mechanismen, insbesondere der Histon-Modifikation, die Struktur des Heterochromatins zu beeinflussen, sodass eine exakte Funktionsbestimmung der einzelnen Komponenten äußerst kompliziert ist (Grewal and Jia, 2007, Saksouk et al., 2015).

Das Fehlen von 5-Methylcytosin-positiven Signalen am Chromosomenpaar 15 der Knochenmarkszellen und auch der Peritoneumszellen weicht von den Ergebnissen von Miller et al. (1974) ab, wo lediglich schwache Fluoreszenzsignale an den Chromosomen 1 und 3 beschrieben wurden. In den hier durchgeführten Färbungen zeigen sich, wie unter 3.1 beschrieben, Polymorphismen an verschiedenen Chromosomen, jedoch ist keine generelle Signalmindering an den Chromosomen 1 und 3 festzustellen. Die Reproduzierbarkeit des fehlenden Signals am Chromosomenpaar 15 lässt einen technischen Fehler unwahrscheinlich erscheinen. Festzuhalten bleibt jedoch, dass die Zuordnung der Chromosomen anhand subjektiver Größeneinschätzung und Bänderung bei der DAPI-Gegenfärbung erfolgte. Daher besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem Chromosomenpaar mit fehlendem Fluoreszenzsignal um ein anderes als das Paar 15 handeln könnte. Ebenso denkbar wäre durch falsche Zuordnung, dass jeweils verschiedene Chromosomenpaare oder auch einzelne Chromosomen verschiedener Paare in den Metaphasen kein Fluoreszenzsignal aufweisen. Um dies auszuschließen, könnten weitere Untersuchungen an den Präparaten erfolgen. Insbesondere mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung könnte das Chromosom 15, aber auch andere Chromosomen, spezifisch nachgewiesen werden. Ob die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in einem Schritt mit der 5-Methylcytosin Immunofärbung angewendet werden kann, oder ob ein Zwischenschritt zur Entfärbung notwendig ist, müsste in Versuchen erprobt werden.

Neben dem Chromosomenpaar 15 zeichnet sich auch das Y-Chromosom durch die Abwesenheit von 5-Methylcytosin-positiven Signalen aus. Gleichzeitig weisen die genannten Autosomen eine deutliche C-Bande im Bereich des Zentromers auf und das Y-Chromosom ist in seiner Gesamtheit angefärbt. Das Fehlen von

5-Methylcytosin-positiven Signalen bei gleichzeitig vorhandener positiver C-Bänderung ließ sich auch bei anderen Arten beobachten: Mit derselben Methode zeigte sich dies auch beim Indischen Muntjak (Schmid et al., 2015a), bei Vögeln (Schmid and Steinlein, 2017), Fischen (Schmid et al., 2015b) sowie Amphibien (Schmid and Steinlein, 2016). Dies lässt darauf schließen, dass die DNA-Methylierung nicht essenziell für die Bildung von konstitutivem Heterochromatin ist.

4.2 Interphasezellkerne

Die 5-Methylcytosin Immunofärbung an Interphasezellkernen weist in allen untersuchten Geweben positive Fluoreszenzsignale auf. Insgesamt lässt sich eine große Heterogenität der verschiedenen Gewebe und auch der einzelnen Zellkerne desselben Organs feststellen.

Bereits die äußere Form der Zellkerne variiert: Während die Zellkerne des Knochenmarks, der Milz, der Niere, des Peritoneums, sowohl aus der Zellkultur als auch aus der Zellsuspension, und der Leber rund sind, finden sich in der Skelettmuskulatur ovale Zellkerne (Abb. 3, 4 und 5). Im Dünndarm und im Gehirn finden sich runde sowie ovale Zellkerne (Abb. 4).

Auch die Größe der Zellkerne variiert. Besonders auffällig ist dies bei den Zellkernen der Leber (Abb. 5): Im zweidimensionalen Bild ist der Durchmesser des großen Zellkerns in Abb. 5a mehr als doppelt so groß wie der des kleineren Zellkerns in Abb. 5b. Übertragen auf das Volumen bedeutet dies, dass der große Zellkern mehr als achtmal so groß ist wie der kleine Zellkern. Mögliche Gründe werden weiter unten erläutert.

Des Weiteren unterscheiden sich die Kerne in der DAPI-Gegenfärbung. Häufig findet sich eine homogene Färbung des Zellkerns, wie beim Knochenmark in Abb. 3a, der Milz in Abb. 4a und dem Peritoneum in Abb. 4o und p. Jedoch finden sich ebenfalls Kerne, die deutliche Chromozentren aufweisen. Besonders auffällig sind diese bei der Lunge in Abb. 4h und beim Gehirn in 4m.

Die größte Diversität lässt sich anhand der roten Fluoreszenzsignale ausmachen. Einige Zellkerne besitzen rund eine Handvoll Signale (Abb. 3a, b, 4a, b, j und 5b), während andere eine mit über 20 Signalen (Abb. 4e, o, p und 5a) deutlich höhere

Zahl aufweisen. Die Fluoreszenzsignale der übrigen Zellkerne liegen anzahlmäßig dazwischen. Es lassen sich jedoch keine Zellkerne finden, die eindeutig 40 oder mehr Fluoreszenzsignale aufweisen.

Ebenfalls variiert die Größe der Signale. Zum einen lassen sich große fleckenartige Signale wie bei den Interphasezellkernen des Knochenmarks in Abb. 3a, der Milz in Abb. 4a und der Lunge in Abb. 4h ausmachen. Zum anderen finden sich vergleichsweise winzige, punktförmige Signale wie bei der Niere in Abb. 4d und der Leber in Abb. 5a. Zwischen diesen beiden Extremen verteilt sich die Größe der Signale. Viele Zellkerne zeigen sowohl große als auch kleine Signale wie die Lunge in 4h und das Gehirn in 4m und n. Auch wenn es Zellkerne mit wenigen großen Signalen (Abb. 3a und 4a) und Zellkerne mit vielen kleinen Signalen (Abb. 4i und 5a) gibt, scheint kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Größe und Anzahl der Fluoreszenzsignale zu bestehen, da es ebenfalls Kerne mit wenigen kleinen Signalen (Abb. 4d und j) gibt.

In Bezug auf die Form der Fluoreszenzsignale zeigt sich ebenfalls eine Diversität. Es finden sich einerseits klar begrenzte (Abb. 3b, 4g und 5b), andererseits scheinbar ineinander übergehende Signale (Abb. 4o und p). Neben runden Signalen (Abb. 4g, n und 5b) gibt es unförmige, fleckenartige, diffuse Signale (Abb. 3a, 4a, e, o, p). Insbesondere die Kerne der Skelettmuskulatur (Abb. 4k und l) weisen vereinzelt klar begrenzte, runde Signale sowie viele diffuse, nicht klar abgrenzbare Signale auf.

Die meisten Zellkerne zeigen Fluoreszenzsignale hoher Intensität. Eine geringere Intensität der Signale findet sich bei einem Zellkern der Milz (Abb. 4b) und der Leber (Abb. 5a). Aber auch Kerne mit Signalen hoher Intensität zeigen daneben Signale geringerer Intensität wie bei der Lunge (Abb. 4h) und des Dünndarms (Abb. 4j).

Insgesamt gilt es in Bezug auf die Heterogenität der Fluoreszenzsignale zu berücksichtigen, dass feine quantitative Unterschiede vorwiegend aus methodischen Unterschieden beim Antikörpernachweis resultieren (vergleichbar mit 3.1 und 3.3).

Eine räumliche Zuordnung der Fluoreszenzsignale in Bezug auf Zellkernmitte bzw. Zellkernhülle ist nicht möglich, da es sich in der vorliegenden Arbeit um zweidimensionale Bilder handelt.

Im Vergleich zwischen Auftreten des Fluoreszenzsignals und Vorhandensein von Chromozentren lassen sich ebenfalls Unterschiede feststellen. Es finden sich Zellkerne, bei denen die Chromozentren deckungsgleich mit den Fluoreszenzsignalen sind, wie bei der Niere in Abb. 4d und der Lunge in Abb. 4g. Im Gegensatz dazu weisen die meisten Kerne auch Chromozentren ohne Signale auf, wie bei der Lunge in Abb. 4h, der Skelettmuskulatur in Abb. 4k und l sowie beim Gehirn in Abb. 4m und n und der Leber in Abb. 5a und b. Vereinzelt treten bei den genannten Beispielen mit Ausnahme der Leber auch Signale außerhalb der Chromozentren auf.

Während der Zelldifferenzierung kommt es zu Veränderungen der DNA-Methylierung (Suelves et al., 2016, Rulands et al., 2018), sodass sich differenzierte Zellen durch heterogene Methylierungsmuster auszeichnen (Lee et al., 2014). Die große Diversität der Zellkerne ließe sich also dadurch erklären, dass sie unterschiedlichen Geweben und damit histologisch differenzierten Zelltypen entstammen.

Andererseits gibt es auch Ähnlichkeiten zwischen Zellkernen unterschiedlicher Gewebe wie beispielsweise zwischen Knochenmark (Abb. 3a und b) und Milz (Abb. 4a und b). Histologisch erfolgt eine Unterteilung in vier Gewebetypen: Epithel-, Nerven-, Muskel- sowie Binde- und Stützgewebe (Lüllmann-Rauch, 2009). Das Knochenmark ebenso wie alle weiteren hier verwendeten Organe sind aus diesen vier Gewebetypen aufgebaut und weisen demnach verschiedene Zelltypen auf. Die Ähnlichkeit zwischen Knochenmark und Milz ließe sich damit erklären, dass beide Gewebe histologisch vergleichbar aufgebaut sind: Zum einen bestehen sie im Grundgerüst aus Bindegewebe, zum anderen enthalten sie viele Blutzellen (Lüllmann-Rauch, 2009). Daraus schlussfolgern ließe sich, dass es sich bei den ausgewählten Zellkernen zufälligerweise um denselben Zelltyp handelt oder, dass sich die Zellkerne unterschiedlicher Zelltypen in diesen Geweben sehr ähneln.

Aus demselben Grund ließe sich auch das gleichartige Erscheinungsbild der vier Zellkerne aus Peritoneum (Abb. 4e, f, o und p) begründen, welches aus einschichtigem Plattenepithel und einer dünnen Bindegewebsschicht aufgebaut ist (Lüllmann-Rauch, 2009). Alle vier zeigen eine gleichmäßige DAPI-Färbung und über den gesamten Kern diffus verteilte Fluoreszenzsignale, welche nicht eindeutig voneinander abgrenzbar sind.

Im Gegensatz dazu finden sich bei der Niere (Abb. 4c und d), bei der Lunge (Abb. 4g und h), beim Dünndarm (Abb. 4i und j), beim Gehirn (Abb. 4m und n) und bei der Leber (Abb. 5a und b) Unterschiede zwischen den Zellkernen. Durch den histologisch sehr komplexen Aufbau dieser Organe ist eine Zuordnung der einzelnen Kerne zu einem bestimmten Zelltyp nicht möglich. Um dies zu erreichen, könnte eine mikroskopische Präparation zur Gewinnung des Zellmaterials erfolgen oder es könnten Marker eingesetzt werden, um bestimmte Zelltypen zu identifizieren. Einzig der große Zellkern in Abb. 5a lässt sich aufgrund seiner Größe mit hoher Wahrscheinlichkeit als Hepatozyt einordnen: Hepatozyten können Zellkerne aufweisen, welche diploid, tetraploid oder oktaploid sein können, und sind damit die einzigen Zellen der Leber mit möglicher Polyploidie (Lüllmann-Rauch, 2009). Die Größe des Zellkerns ließe sich also durch Polyploidie erklären. Bemerkenswerterweise finden sich auch bei diesem Kern (Abb. 5a) nicht mehr als 40 Signale.

Unter der Annahme, dass von den 40 vorhandenen Chromosomen alle bis auf das Y-Chromosom und das Chromosomenpaar 15 ein Fluoreszenzsignal aufweisen, sind pro Zellkern maximal 37 bzw. bei Zellen aus dem weiblichen Organismus 38 Signale zu erwarten. Eine geringere Zahl ließe sich darauf zurückführen, dass eine Demethylierung erfolgt sein könnte und bzw. oder, dass Signale sich überlagern bzw. sich in spezifischen Bereichen innerhalb des Zellkerns konzentrieren. Die Anordnung in bestimmten Bereichen erscheint besonders plausibel bei Kernen, die große, fleckenartige Signale aufweisen, wie beim Knochenmark (Abb. 3a), bei der Milz (Abb. 4a) und der Lunge (Abb. 4h).

Wie bereits unter 3.2 erwähnt, handelt es sich bei den zu beobachtenden Chromozentren um Zusammenschlüsse von zentromerischem und perizentromerischem Heterochromatin. Mayer et al. (2005) zeigten, dass sich die

Verteilung von perizentromerischem Heterochromatin innerhalb des Zellkerns und damit die Bildung von Chromozentren während der Zelldifferenzierung verändert. Die räumliche Organisation von Chromozentren ist somit dynamisch und zelltypspezifisch. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf die vorliegende Arbeit übertragen: Auch hier finden sich je nach Zelltyp unterschiedliche Muster in der DAPI-Färbung. In Bezug auf die Fluoreszenzsignale ließe sich damit sagen, dass DNA-Methylierung in Interphasezellkernen meist im Bereich von zentromerischem und perizentromerischem Heterochromatin vorkommt. Brero et al. (2005) konnten zeigen, dass es während der Myogenese, der Bildung von Muskelgewebe, zur Ausbildung von großen Chromozentren kommt, welche mit dem vermehrten Vorkommen von perizentromerischer DNA-Methylierung und von MeCP2 einhergeht.

In den hiesigen Ergebnissen finden sich wie bereits erwähnt auch Chromozentren ohne DNA-Methylierung. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass es zum einen zu einer Demethylierung von Chromozentren gekommen ist und zu anderem, dass DNA-Methylierung für die Bildung von Chromozentren nicht essenziell ist.

Unter dem Verdacht der Polyploidie des Zellkerns in Abb. 5a, ließe sich auch eine höhere Anzahl an Fluoreszenzsignalen vermuten. Dies konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Xia et al. (2015) konnten zeigen, dass die globale DNA-Methylierung der Leber der Maus tageszeitlichen Schwankungen unterliegt: Die niedrigste Konzentration fand sich zu Tagesbeginn, wohingegen sich die höchste Konzentration bei Tagesende zeigte. Somit könnte der Entnahmezeitpunkt der Leber aus dem Versuchstier die geringere Anzahl an Fluoreszenzsignalen erklären. Die Entnahme für das hier verwendete Zellmaterial fand in der ersten Tageshälfte statt, wobei sich der genaue Zeitpunkt nachträglich nicht mehr bestimmen ließ.

Die beobachteten Unterschiede in der Zellkernform lassen sich durch eine gegebene Verformbarkeit und hieraus resultierende Anpassung an die Zellform

erklären (Lüllmann-Rauch, 2009). Auch Mayer et al. (2005) stellten fest, dass die Form der Zellkerne abhängig vom Zelltyp ist.

Mittels C-Bänderung erfolgt die Darstellung des konstitutiven Heterochromatins bei Interphasezellkernen des Knochenmarks (Abb. 3c und d). Dabei entsprechen die Signale mit hoher Intensität dem konstitutiven Heterochromatin. In Abb. 3c findet sich eine größere Anzahl kleiner Signale, wohingegen sich in Abb. 3d eine geringere Anzahl größerer Signale findet. Konstitutives Heterochromatin befindet sich bei der Maus am Zentromer. Es ist folglich auch in der C-Bänderung zu sehen, dass es zur Zusammenlagerung von zentromerischem und perizentromerischem Heterochromatin, sprich zur Bildung von Chromozentren, kommt. Die Unterschiede in der C-Bänderung zwischen Abb. 3c und d könnten also auch dadurch zu erklären sein, dass es sich hierbei um unterschiedliche Zelltypen handelt.

Ein genauer Vergleich zwischen der 5-Methylcytosin Immunofärbung und der C-Bänderung wie unter 4.1 ist nicht möglich, da hierzu derselbe Zellkern mittels beider Färbungen untersucht werden müsste.

Das Vorkommen von Chromozentren, welche größtenteils mit hypermethylierten DNA-Bereichen übereinstimmen, führt zu der Frage, wie konstitutives Heterochromatin und hypermethylierte DNA innerhalb eines Zellkerns angeordnet sind. Die räumliche Organisation der einzelnen Chromosomen in Interphasezellkernen erfolgt in Chromosomenterritorien: Jedes Chromosom befindet sich in einem separaten Bereich innerhalb des Zellkerns (Dixon et al., 2016). Bislang konnten jedoch keine klaren Prinzipien definiert werden, nach denen die Positionierung der Chromosomenterritorien erfolgt. Vielmehr scheint es nach jeder Zellteilung eine erneute, zufällige Verteilung der Territorien zu geben (Dixon et al., 2016), wobei am ehesten eine radiale Anordnung der Chromosomen präferiert wird (Cremer and Cremer, 2010). Außerdem scheinen genarme Chromosomen in der vorwiegend heterochromatischen Peripherie und genreiche Regionen im euchromatischen Zentrum platziert zu werden (Sexton and Cavalli, 2015).

Ob oder wie DNA-Methylierung die nukleäre Architektur beeinflusst, ist aktuell noch weitestgehend ungeklärt. Matarazzo et al. (2007) stellten fest, dass DNA-Hypomethylierung in begrenzten Bereichen des Genoms zu ausgedehnten Veränderungen in der Organisation der Chromosomenterritorien führt.

Aufschlussreich könnten somit weitere Untersuchungen an hypermethylierten Regionen der DNA sein, die eine dreidimensionale Anordnung innerhalb des Zellkerns erkennen lassen.

4.3 Zellkerne aus Testismaterial und Meiose-Stadien

Chronologisch steht zu Beginn der Spermatogenese die mitotische Zellteilung von Spermatogonien an. Die gefundene Metaphase aus Abb. 6a weist mit 18 Fluoreszenzsignalen im Gegensatz zu jenen aus dem Knochenmark und aus der Zellkultur deutlich weniger Signale auf. Durch die Überlagerung ist es nicht möglich einen Karyotyp zu legen und Rückschlüsse darauf zu ziehen, welche Chromosomen methyliert sind oder welches Chromosom fehlt. Die C-Bänderung in Abb. 6b liefert übereinstimmende Ergebnisse mit denjenigen des Knochenmarks: Das Y-Chromosom ist in seiner Gesamtheit gefärbt und die übrigen 39 Chromosomen tragen eine C-Bande am Zentromer. Somit fällt auch beim Vergleich zwischen der 5-Methylcytosin Immunofärbung (Abb. 6a) und der C-Bänderung (Abb. 6b) auf, dass nicht jedes Chromosom im Bereich des konstitutiven Heterochromatins hypermethyliert ist. Dies unterstützt wiederum die These, dass die Bildung von konstitutivem Heterochromatin nicht auf DNA-Methylierung angewiesen ist (s. 4.1).

DNA-Methylierung spielt auch während der Reifung von Keimzellen eine wichtige Rolle und unterscheidet sich geschlechtsspezifisch. Bereits während der embryonalen Entwicklung erfolgt eine Demethylierung primordialer Keimzellen mit anschließender de-novo-Methylierung. In männlichen Keimzellen, auch Gonozyten genannt, ist die komplette Neu-Methylierung bei Geburt abgeschlossen (Stewart et al., 2016). Die Demethylierung in männlichen, primordialen Keimzellen erfolgt in zwei Phasen. Zunächst kommt es zu einer genomweiten Demethylierung während der Migration der Gonozyten mit Erhalt der Methylierung in spezifischen Regionen (Seisenberger et al., 2012). Als

Migration wird hierbei die Einwanderung der Urkeimzellen von der Dottersackwand in die Genitalleiste bezeichnet (Brand-Saberi and Ulfig, 2017). Während der genomweiten Demethylierung lässt sich ebenfalls die verminderte Transkription der de-novo-Methyltransferasen DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L beobachten. Von dieser globalen Demethylierung ausgenommen sind CpG-Inseln in Promotoren von keimzellspezifischen Genen, CpG-Inseln des X-Chromosoms sowie unterschiedlich methylierte Regionen geprägter Gene. Erst bei Eintritt in die Genitalleisten werden diese spezifischen Regionen demethyliert (Seisenberger et al., 2012). Die de-novo-Methylierung der Gonozyten erfolgt anschließend bis zur Geburt und korreliert dabei mit Histon-Modifikationen. Die Trimethylierung des Lysins an Position 36 des Histons H3 (H3K36me3) führt hierbei zu einer Zunahme der DNA-Methylierung mittels DNMT3a und DNMT3b. Im Gegensatz dazu führt eine Di- oder Trimethylierung des Lysins an Position 4 des Histons H3 (H3K4me2 und H3K4me3) zu einem Ausbleiben der DNA-Methylierung (Stewart et al., 2016). Die sich hieraus ergebende Methylierung unterscheidet sich maßgeblich zwischen männlichen und weiblichen Keimzellen und betrifft auch geprägte Gene, die hier ihr geschlechtsspezifisches Muster erhalten (Stewart et al., 2016, Zeng and Chen, 2019).

Während der Neu-Methylierung verbleiben die männlichen primordialen Keimzellen in der G₁-Phase. Nach Geburt und Abschluss der de-novo-Methylierung kommt es zur Proliferation und im weiteren Verlauf zur Differenzierung der Gonozyten (Stewart et al., 2016). Bei dieser Neu-Methylierung entstehen außerdem neue Methylierungsmuster, welche sich maßgeblich von denen somatischer Zellen unterscheiden und durch Hypomethylierung gekennzeichnet sind (Oakes et al., 2007b).

Eine weitere genomweite Demethylierung erfolgt kurz nach der Befruchtung: die vererbte Methylierung der Gameten wird gelöscht. Hierbei gibt es lediglich wenige Ausnahmen, darunter die geprägten Gene. Im Fall des paternalen Genoms kommt es zu einer aktiven Demethylierung, wohingegen dies beim maternalen Genom passiv erfolgt. Zum Zeitpunkt der Einnistung kommt es zur Etablierung des neuen embryonalen Methylierungsmusters (Zeng and Chen, 2019).

Die Unterschiede in der 5-Methylcytosin Immunofärbung zwischen der spermatogonialen Metaphase und denjenigen aus Knochenmark und Zellkultur könnten daher durch die unterschiedlichen Methylierungsmuster von Keimzellen und somatischen Zellen zu erklären sein. Dabei findet sich die von Oakes et al. (2007b) beschriebene Hypomethylierung von Keimzellen auch in der vorliegenden Arbeit.

Technische Fehler können beim Vorliegen von nur einer spermatogonialen Metaphase nicht ausgeschlossen werden, jedoch liefert die 5-Methylcytosin Immunofärbung verlässliche Ergebnisse an den Zellkernen aus Testismaterial und Meiose-Stadien. Weitere Untersuchungen mittels der hier angewendeten 5-Methylcytosin Immunofärbung an mitotisch aktiven Spermatogonien könnten daher aufschlussreich sein.

Die primären Spermatozyten (Abb. 7a und b) weisen ein homogenes Erscheinungsbild auf: eine geringere Intensität in der DAPI-Färbung mit Chromozentren und deutliche Fluoreszenzsignale, die in ihrer Größe variieren. Chronologisch folgt nun die erste Reifeteilung (Abb. 9a bis g), aus welcher sekundäre Spermatozyten hervorgehen. In der vorliegenden Arbeit sind Spermatozyten II nicht zu finden. Generell treten Spermatozyten II nur als kurzes Übergangsstadium für wenige Stunden auf, da die zweite Reifeteilung direkt auf die erste folgt (Lüllmann-Rauch, 2009). Nach der zweiten Reifeteilung (Abb. 9h bis j) entstehen Spermatiden (Abb. 7c und d). Auch diese zeigen sich homogen mit intensiver DAPI-Färbung und einem deutlichen, randständigen Fluoreszenzsignal. Durch weitere Differenzierung entstehen Spermatozoen (Abb. 7e und f) mit ebenfalls einheitlichem Erscheinungsbild: Im Bereich der Rundung findet sich ein großes Signal und randständig liegen weitere, sehr kleine Signale bei gleichmäßig hoher DAPI-Intensität.

Anhand der vorliegenden Abbildungen lässt sich die Differenzierung sowie die Kernkondensierung nachvollziehen. Die anfänglich großen Kerne werden kleiner und erhalten ihre spezifische Form. Auch das Fluoreszenzsignal konzentriert sich auf bestimmte Bereiche, was somit für hypermethylierte DNA gilt.

Die Sertoli-Zellen lassen sich anhand ihrer charakteristischen Chromozentren identifizieren. Knapp 85% der Sertoli-Zellen besitzen zwei Chromozentren, typischerweise an gegenüberliegenden Seiten des Nukleolus (Guttenbach et al., 1996). Gut 13% der Zellen besitzen ein großes Chromozentrum und bei den übrigen 2% finden sich drei Chromozentren (Guttenbach et al., 1996). Bei den Sertoli-Zellen mit einem Chromozentrum deckt sich dieses mit dem Fluoreszenzsignal (Abb. 7g und h). In Abb. 3.6i findet sich ein schwaches Signal am größeren Chromozentrum und in Abb. 3.7j zeigen sich zwei schwache Signale deckungsgleich mit zwei der drei Chromozentren. Hypermethylierte DNA findet sich also ausschließlich im Bereich der Chromozentren. Gibt es jedoch zwei oder drei Chromozentren, sind diese nicht zwangsläufig hypermethyliert. Bei dem Zellkern in Abb. 7j lässt sich außerdem der zentral gelegene Nukleolus erahnen.

Konstitutives Heterochromatin lässt sich auch an Spermatozoen und Sertoli-Zellen mittels C-Bänderung nachweisen. In Spermatozoen zeigen sich viele kleine, deutliche Signale entweder mittig oder randständig (Abb. 8a und b). Durch die zweidimensionale Betrachtungsweise ist jedoch die räumliche Zuordnung zur Zellkernhülle oder Zellkernmitte nicht möglich. Das Fehlen von starken Signalen und damit von konstitutivem Heterochromatin im Bereich des Akrosoms deckt sich mit dem Fehlen von Fluoreszenzsignalen in diesem Bereich (Abb. 8a und b sowie Abb. 7e und f). Im Bereich der Rundung, wo die Fluoreszenzsignale deutlich auftreten, finden sich keine positiven C-Banden. Eine Übereinstimmung zwischen C-Banden und Fluoreszenzsignalen zeigt sich lediglich im scheinbaren Randbereich der Zellkerne. Im Bereich der mittig gelegenen, deutlichen C-Banden lassen sich jedoch keine korrespondierenden Fluoreszenzsignale detektieren. Ähnliches zeigten Yamagata et al. (2007) in ihren Analysen: Zentromerische und perizentromerische Regionen in Pachytän-Spermatozyten und Spermatiden sind hypomethyliert, im Gegensatz zum hypermethylierten Status in somatischen Zellen.

Die Sertoli-Zellen zeigen auch in der C-Bänderung die spezifischen Chromozentren (Abb. 8c und d). Hier findet sich eine Übereinstimmung zwischen

den Chromozentren in der DAPI-Färbung und der C-Bänderung. Somit lassen sich auch die Vergleiche mit den Fluoreszenzsignalen auf die C-Bänderung übertragen: Hypermethylierte DNA findet sich im Bereich des konstitutiven Heterochromatins, wobei das konstitutive Heterochromatin nicht in jedem Fall methyliert ist. In Abb. 8d lässt sich zudem erneut der Nukleolus zwischen den beiden Chromozentren erkennen.

Anhand von Abb. 9 lassen sich die erste und zweite meiotische Teilung nachvollziehen. Die Stadien der Prophase I in Abb. 9a, b, c und d zeigen im Verlauf die Kondensation sowie die Paarung der Chromosomen. Bemerkenswerterweise finden sich hier mit Ausnahme des Bouquet-Stadiums in Abb. 9b, wo es zu einer Zusammenlagerung der Signale kommt, jeweils elf Fluoreszenzsignale. Der Methylierungsgrad scheint über die Prophase I hinweg stabil zu sein.

Im Gegensatz dazu weisen die ausgewählten Metaphasen I eine unterschiedliche Anzahl an Fluoreszenzsignalen auf: insgesamt 26 Signale in Abb. 9e, 14 Signale in Abb. 9f und 19 Signale in Abb. 9g. Anzahlmäßig finden sich in der Metaphase I also mehr Signale als in der Prophase I. In der Metaphase I ist zudem die Verteilung auf einzelne Chromosomen oder Paare variabel. Das eindeutig identifizierbare Sexbivalent weist in Abb. 9e und f ein Signal am freien Ende des längeren Chromosoms, also am X-Chromosom, auf. In Abb. 9g fehlt dieses Signal. Das Y-Chromosom trägt in keinem Fall ein Signal.

Auch in der Metaphase II zeigt sich kein einheitliches Bild. Die roten Fluoreszenzsignale variieren in Zahl und Stärke. Aufgrund der Auftrennung der homologen Chromosomen sind die Geschlechtschromosomen nicht erkennbar. Als Gründe für die unterschiedliche Anzahl an Fluoreszenzsignalen kommen neben technischen Fehlern Veränderungen der DNA-Methylierung im Rahmen der Meiose infrage. In der gefundenen spermatogonialen Metaphase finden sich mit 18 Fluoreszenzsignalen mehr Signale als in der Prophase I. So scheint es vor der Prophase I, welche hier einen stabilen Methylierungsgrad aufweist, zu einer weiteren Demethylierung gekommen zu sein und im weiteren Verlauf zu einer Zunahme der Methylierung.

Gaysinskaya et al. (2018) fanden in ihren Analysen eine Genom-weite vorübergehende Verminderung der DNA-Methylierung während der Prophase I. Ein initialer Abfall der DNA-Methylierung fand sich in Zellen des Präleptotän. Dabei gehen die Autoren von einem passiven, an die DNA-Replikation gekoppelten Mechanismus aus. Die verminderte globale Methylierung war bis ins Pachytän nachweisbar. Weitere Studien zeigten, dass Veränderungen des normalen Methylierungsmusters in der Meiose die meiotische Rekombination beeinflussen (Maloisel and Rossignol, 1998, Yelina et al., 2015). Für den Pilz *Ascobolus immersus* konnte gezeigt werden, dass DNA-Methylierung die homologe Rekombination stark hemmt (Maloisel and Rossignol, 1998). Daher könnte die vorübergehende Verminderung der DNA-Methylierung in der Prophase I die dort stattfindenden Prozesse erleichtern (Gaysinskaya et al., 2018).

Auch Oakes et al. (2007a) gehen von einer passiven, replikationsbedingten Demethylierung aus. Jedoch war sowohl die de-novo-Methylierung als auch die Demethylierung in den dort untersuchten Zellen im Pachytän abgeschlossen. Die gefundenen Polymorphismen in der Metaphase I und II könnten einerseits damit zu erklären sein, dass sie jeweils aus zeitlich unterschiedlichen Phasen stammen und es im Verlauf zu einer weiteren Zunahme der Methylierung kommt. In der Maus ist die Dauer der Metaphase I und II zusammen mit ca. 20,8 Stunden jedoch relativ kurz im Vergleich zu den übrigen Phasen der Meiose, deren Gesamtdauer mit 333,2 Stunden angegeben wird (Adler, 1996). Damit wäre auch die Zeit für Veränderungen der Methylierung eher knapp bemessen.

Andererseits wäre auch ein nicht einheitliches Methylierungsmuster in diesen Stadien als Erklärung möglich. Denkbar wäre dies, wenn es im weiteren Verlauf der Zelldifferenzierung zur Remethylierung käme, da reife Spermien Genome mit ca. 90% methylierten CpGs den höchsten Methylierungsgrad von allen Zelltypen in Säugetieren besitzen (Zeng and Chen, 2019). Besonders wichtig bei Veränderungen der DNA-Methylierung während der Meiose ist, dass die väterliche genetische Prägung erhalten bleibt. Wie bereits erwähnt, wird diese genetische Prägung vor Geburt etabliert und über viele mitotische Zellteilungen bis zum Eintritt in die Meiose beibehalten (Zeng and Chen, 2019).

Auch mittels C-Bänderung sind die Meiose-Stadien zu erkennen. In der Prophase I (Abb. 10a, b und c) lassen sich jeweils annähernd 40 Signale ausmachen. Die genaue Bestimmung der Anzahl ist aufgrund von Überlagerungen nicht möglich. Das Y-Chromosom, welches auch hier in seiner Gesamtheit stärker gefärbt ist als die übrigen Chromosomen, weist zusätzlich eine deutliche C-Bande auf. In der Metaphase I finden sich 39 (Abb. 10d) bzw. 40 (Abb. 10e) C-Banden. Je nachdem ob ein X- oder Y-Chromosom in der Metaphase II vorhanden ist, zeigen sich 20 (Abb. 10f und g) oder 19 (Abb. 10h und i) C-Banden. Damit lässt sich eine Übereinstimmung zu den Metaphasen aus dem Knochenmark feststellen: Jedes Chromosom trägt eine C-Bande, wobei das Y-Chromosom insgesamt stärker angefärbt ist und in Abb. 10a, b, c und d eine starke C-Bande aufweist. Das Fehlen einzelner Signale lässt sich sowohl für die Metaphase I in Abb. 10d als auch für die Stadien der Prophase I in Abb. 10a, b und c mit Überlagerungen erklären. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen den Meiose-Stadien und den mitotischen Metaphasen besteht darin, dass sich die C-Banden im Bereich der akrozentrischen Zentromere befinden. Das Vorkommen von konstitutivem Heterochromatin ist also stabil während der Meiose und entspricht dem von somatischen Zellen.

Gleichzeitig bedeutet dies eine Diskrepanz zwischen dem Vorkommen von konstitutivem Heterochromatin und Hypermethylierung. Treten Fluoreszenzsignale in der Metaphase I auf, so befinden sie sich meist im Bereich der Zentromere. Ausnahmen hiervon finden sich bei zwei Chromosomenpaaren in Abb. 9e, welche das Signal scheinbar im Bereich der Verbindung aufweisen. Als Erklärung hierfür besteht die Möglichkeit, dass es sich um sehr kleine Chromosomen handelt und homologe Zentromere quasi nebeneinander liegen. In der Metaphase II befinden sich die Fluoreszenzsignale ausnahmslos im Bereich der Zentromere.

Wie auch schon in den vorherigen Abschnitten gilt, dass bis auf das Sexbivalent keine Zuordnung zu einem bestimmten Chromosomenpaar möglich ist. Die Zuordnung zu bestimmten Chromosomenpaaren beispielsweise mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung könnte zeigen, welche Chromosomenpaare

hypermethylierte Zentromere aufweisen und ob dies von Zelle zu Zelle variiert oder ob konstante Muster zu erkennen sind.

4.4 Methode

Um bei der 5-Methylcytosin Immunofärbung gute Ergebnisse zu erzielen, spielt die Dauer der UV-Bestrahlung eine entscheidende Rolle. Eine zu lange Bestrahlung führt zu einer starken Denaturierung der DNA und damit zur Veränderung der Morphologie der Chromosomen, wohingegen eine zu kurze Bestrahlung zu einer Signalminderung führt, da der verwendete primäre Antikörper nur Einzelstrang-DNA binden kann. In den Experimenten am Indischen Muntjak von Schmid et al. (2015a), nach deren Methode hier gearbeitet wurde, zeigte eine Bestrahlungsdauer von drei Stunden die besten Ergebnisse. Auch bei der Maus lieferte eine UV-Bestrahlung von drei Stunden gute Ergebnisse. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass im Fall einer nicht ausreichenden Denaturierung hypermethylierte DNA-Bereiche nicht erkannt wurden. Außerdem gilt, wie bereits unter 3.1, 3.3 und 4.2 erwähnt, dass scheinbare Polymorphismen eher durch Unterschiede beim Antikörpernachweis als durch tatsächliche Unterschiede der Methylierung zu begründen sind.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels 5-Methylcytosin Immunofärbung zytogenetische Analysen an Metaphasechromosomen aus der Mitose, an Interphase-Zellen verschiedener Organe und an Meiose-Stadien der Maus (*Mus musculus*) zur Detektion hypermethylierter DNA durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine C-Bänderung an Metaphasechromosomen und Meiose-Stadien zum Nachweis von konstitutivem Heterochromatin.

Die Metaphasechromosomen zeigen bis auf das Chromosomenpaar 15 und das Y-Chromosom eine Hypermethylierung im Bereich des Zentromers. Konstitutives Heterochromatin findet sich bei allen Chromosomen im Bereich des Zentromers und beim Y-Chromosom auch darüber hinaus. In Bezug auf das Fehlen von DNA-Hypermethylierung beim Chromosom 15 unterscheiden sich die hiesigen Ergebnisse von den bisher bekannten.

Interphase-Zellen zeigen ein variables Bild, insbesondere in Bezug auf Hypermethylierung und dem Vorkommen von Chromozentren. Hierbei finden sich Chromozentren sowohl mit als auch ohne Hypermethylierung. Die gefundenen Unterschiede zwischen den Zellkernen sind durch Veränderungen der DNA-Methylierung während der Zelldifferenzierung zu erklären, wohingegen Ähnlichkeiten zwischen Zellkernen unterschiedlicher Organe aller Wahrscheinlichkeit nach auf denselben Gewebetyp zurückzuführen sind.

Die Meiose-Stadien weisen im Gegensatz zu den Metaphasechromosomen eine verminderte Hypermethylierung auf, welche in der Prophase I am stärksten ausgeprägt ist. Zudem sind die gefundenen Methylierungsmuster sowohl in der Metaphase I als auch in der Metaphase II uneinheitlich. Das Vorkommen von konstitutivem Heterochromatin bei den Meiose-Stadien entspricht allerdings dem der Metaphasechromosomen. Eine Zuordnung zu bestimmten Chromosomen war jedoch größtenteils nicht möglich. Lediglich die Gonosomen konnten teilweise identifiziert werden.

Insgesamt bestätigt sich in dieser Arbeit die bekannte Veränderung von Methylierungsmustern während der Zelldifferenzierung. Für alle untersuchten

Zellen und Stadien gilt außerdem, dass konstitutives Heterochromatin nicht zwangsläufig hypermethyliert ist.

Weitere zytogenetische Analysen bezüglich der DNA-Methylierung mit Nachweis spezifischer Chromosomen sowohl in der Mitose und besonders in der Meiose könnten sehr aufschlussreich sein. Ebenso könnte der Nachweis spezifischer Zelltypen an Interphase-Zellen hinsichtlich der Methylierungsmuster relevante Ergebnisse liefern.

6. Literaturverzeichnis

- ABRAMOWITZ, L. K. & BARTOLOMEI, M. S. 2012. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev*, 22, 72-8.
- ADLER, I.-D. 1996. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 352, 169-172.
- AMIR, R. E., VAN DEN VEYVER, I. B., WAN, M., TRAN, C. Q., FRANCKE, U. & ZOGHBI, H. Y. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 23, 185-8.
- BARTOLOMEI, M. S. 2009. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev*, 23, 2124-33.
- BERGMANN, M. 2005. [Spermatogenesis--physiology and pathophysiology]. *Urologe A*, 44, 1131-2, 1134-8.
- BESTOR, T. H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9, 2395-402.
- BI, X. 2014. Heterochromatin structure: lessons from the budding yeast. *IUBMB Life*, 66, 657-66.
- BIRD, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6-21.
- BIRD, A. P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-13.
- BOURC'HIS, D., XU, G. L., LIN, C. S., BOLLMAN, B. & BESTOR, T. H. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, 294, 2536-9.
- BRAND-SABERI, B. & ULFIG, N. 2017. Die Genitalorgane. In: ULFIG, N. & BRAND-SABERI, B. (eds.) *Kurzlehrbuch Embryologie*. 3., aktualisierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- BRERO, A., EASWARAN, H. P., NOWAK, D., GRUNEWALD, I., CREMER, T., LEONHARDT, H. & CARDOSO, M. C. 2005. Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. *The Journal of cell biology*, 169, 733-743.
- BUCHOVECKY, C. M., TURLEY, S. D., BROWN, H. M., KYLE, S. M., MCDONALD, J. G., LIU, B., PIEPER, A. A., HUANG, W., KATZ, D. M.,

- RUSSELL, D. W., SHENDURE, J. & JUSTICE, M. J. 2013. A suppressor screen in *Mecp2* mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. *Nat Genet*, 45, 1013-1020.
- CHAHROUR, M., JUNG, S. Y., SHAW, C., ZHOU, X., WONG, S. T., QIN, J. & ZOGHBI, H. Y. 2008. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*, 320, 1224-9.
- CHEN, Z.-X., MANN, J. R., HSIEH, C.-L., RIGGS, A. D. & CHÉDIN, F. 2005. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95, 902-917.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52, 198-236.
- COHEN, P. E. & POLLARD, J. W. 2001. Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays*, 23, 996-1009.
- CREMER, T. & CREMER, M. 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2, a003889-a003889.
- CSANKOVSKI, G., NAGY, A. & JAENISCH, R. 2001. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*, 153, 773-84.
- DEATON, A. M. & BIRD, A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25, 1010-22.
- DILLON, N. & FESTENSTEIN, R. 2002. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet*, 18, 252-8.
- DIXON, J. R., GORKIN, D. U. & REN, B. 2016. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. *Molecular cell*, 62, 668-680.
- ESTELLER, M. & HERMAN, J. G. 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*, 196, 1-7.
- ESTELLER, M., SILVA, J. M., DOMINGUEZ, G., BONILLA, F., MATIAS-GUIU, X., LERMA, E., BUSSAGLIA, E., PRAT, J., HARKES, I. C., REPASKY, E. A., GABRIELSON, E., SCHUTTE, M., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2000. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92, 564-9.
- FELSENFELD, G. 2014. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.

- FRISO, S., CHOI, S. W., GIRELLI, D., MASON, J. B., DOLNIKOWSKI, G. G., BAGLEY, P. J., OLIVIERI, O., JACQUES, P. F., ROSENBERG, I. H., CORROCHER, R. & SELHUB, J. 2002. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5606-11.
- GAYSINSKAYA, V., MILLER, B. F., DE LUCA, C., VAN DER HEIJDEN, G. W., HANSEN, K. D. & BORTVIN, A. 2018. Transient reduction of DNA methylation at the onset of meiosis in male mice. *Epigenetics & Chromatin*, 11, 15.
- GRAW, J. 2015. *Genetik*, Springer Berlin Heidelberg.
- GREWAL, S. I. & JIA, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, 8, 35-46.
- GRISWOLD, M. D. 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, 96, 1-17.
- GUÉNET, J. L. 2011. Animal models of human genetic diseases: do they need to be faithful to be useful? *Mol Genet Genomics*, 286, 1-20.
- GUTTENBACH, M., MARTINEZ-EXPOSITO, M. J., ENGEL, W. & SCHMID, M. 1996. Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice. *Biol Reprod*, 54, 980-6.
- GUY, J., GAN, J., SELFRIDGE, J., COBB, S. & BIRD, A. 2007. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science*, 315, 1143-7.
- GUY, J., HENDRICH, B., HOLMES, M., MARTIN, J. E. & BIRD, A. 2001. A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, 27, 322-6.
- HAAF, T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol*, 310, 13-22.
- HATA, K., OKANO, M., LEI, H. & LI, E. 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129, 1983-93.
- HERMANN, A., GOWHER, H. & JELTSCH, A. 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 61, 2571-87.

- HERNANDEZ-SAAVEDRA, D., STRAKOVSKY, R. S., OSTROSKY-WEGMAN, P. & PAN, Y. X. 2017. Epigenetic Regulation of Centromere Chromatin Stability by Dietary and Environmental Factors. *Adv Nutr*, 8, 889-904.
- JAENISCH, R. & BIRD, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl, 245-54.
- JAHN, D., JAHN, M., KRONBERG, I., LANGER, T., NETHE-JAENCHEN, R., SCHLATTER, H., SCHULTZE, B., SIEMENS, J., SOPPA, J. & WOLF, K. W. 2010. Genetik. 2010 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- JELTSCH, A. 2002. Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*, 3, 274-293.
- JONES, M. J., GOODMAN, S. J. & KOBOR, M. S. 2015. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*, 14, 924-32.
- JONES, P. A. & BAYLIN, S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3, 415-28.
- JONES, P. L., VEENSTRA, G. J., WADE, P. A., VERMAAK, D., KASS, S. U., LANDSBERGER, N., STROUBOULIS, J. & WOLFFE, A. P. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19, 187-91.
- KAISER, S., JURKOWSKI, T. P., KELLNER, S., SCHNEIDER, D., JELTSCH, A. & HELM, M. 2016. The RNA methyltransferase Dnmt2 methylates DNA in the structural context of a tRNA. *RNA Biol*, 1-11.
- KERR, G. W., SARKAR, S. & ARUMUGAM, P. 2012. How to halve ploidy: lessons from budding yeast meiosis. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3037-51.
- LEE, HEATHER J., HORE, TIMOTHY A. & REIK, W. 2014. Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. *Cell Stem Cell*, 14, 710-719.
- LEE, J. H., VOO, K. S. & SKALNIK, D. G. 2001. Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *J Biol Chem*, 276, 44669-76.
- LEE, J. T. & BARTOLOMEI, M. S. 2013. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell*, 152, 1308-23.
- LI, E., BESTOR, T. H. & JAENISCH, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69, 915-26.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2009. *Histologie*, Thieme.

- MALOISEL, L. & ROSSIGNOL, J. L. 1998. Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascombolus*. *Genes & development*, 12, 1381-1389.
- MATARAZZO, M. R., BOYLE, S., D'ESPOSITO, M. & BICKMORE, W. A. 2007. Chromosome territory reorganization in a human disease with altered DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 16546-16551.
- MAYER, R., BRERO, A., VON HASE, J., SCHROEDER, T., CREMER, T. & DIETZEL, S. 2005. Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC cell biology*, 6, 44-44.
- MILLER, O. J., SCHNEDL, W., ALLEN, J. & ERLANGER, B. F. 1974. 5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature*, 251, 636-7.
- OAKES, C. C., LA SALLE, S., SMIRAGLIA, D. J., ROBAIRE, B. & TRASLER, J. M. 2007a. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology*, 307, 368-379.
- OAKES, C. C., LA SALLE, S., SMIRAGLIA, D. J., ROBAIRE, B. & TRASLER, J. M. 2007b. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 228.
- OHKURA, H. 2015. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A. & LI, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247-57.
- LOUD, J. L., DE JONG, J. H. & DE ROOIJ, D. G. 1979. A sequential analysis of meiosis in the male mouse using a restricted spermatocyte population obtained by a hydroxyurea/triaziquone treatment. *Chromosoma*, 71, 237-48.
- PAIGEN, K. 2003. One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. II. The molecular revolution (1981-2002). *Genetics*, 163, 1227-35.
- PARDUE, M. L. & GALL, J. G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168, 1356-8.
- PAWLOWSKI, W. P. & CANDE, W. Z. 2005. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol*, 15, 674-81.

- PODGORNAYA, O. I., OSTROMYSHENSKII, D. I. & ENUKASHVILY, N. I. 2018. Who Needs This Junk, or Genomic Dark Matter. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83, 450-466.
- REIK, W., DEAN, W. & WALTER, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-93.
- RIGGS, A. D., MARTIENSSEN, R. A. & RUSSO, V. E. A. 1996. *Introduction. In Epigenetic mechanisms of gene regulation (ed. Russo VEA, et al.)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- RULANDS, S., LEE, H. J., CLARK, S. J., ANGERMUELLER, C., SMALLWOOD, S. A., KRUEGER, F., MOHAMMED, H., DEAN, W., NICHOLS, J., RUGG-GUNN, P., KELSEY, G., STEGLE, O., SIMONS, B. D. & REIK, W. 2018. Genome-Scale Oscillations in DNA Methylation during Exit from Pluripotency. *Cell systems*, 7, 63-76.e12.
- SAKSOUK, N., BARTH, T. K., ZIEGLER-BIRLING, C., OLOVA, N., NOWAK, A., REY, E., MATEOS-LANGERAK, J., URBACH, S., REIK, W., TORRES-PADILLA, M. E., IMHOF, A., DEJARDIN, J. & SIMBOECK, E. 2014. Redundant mechanisms to form silent chromatin at pericentromeric regions rely on BEND3 and DNA methylation. *Mol Cell*, 56, 580-94.
- SAKSOUK, N., SIMBOECK, E. & DÉJARDIN, J. 2015. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics & Chromatin*, 8, 3.
- SALOMON, R., KAYE, A. M. & HERZBERG, M. 1969. Mouse nuclear satellite DNA: 5-methylcytosine content, pyrimidine isoplith distribution and electron microscopic appearance. *J Mol Biol*, 43, 581-92.
- SANCHEZ, F. & SMITZ, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1896-912.
- SCHMID, M. & STEINLEIN, C. 2016. Chromosome Banding in Amphibia. XXXIII. Demonstration of 5-Methylcytosine-Rich Heterochromatin in Anura. *Cytogenet Genome Res*, 148, 35-43.
- SCHMID, M. & STEINLEIN, C. 2017. The Hypermethylated Regions in Avian Chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 151, 216-227.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., LOMB, C., SPERLING, K. & NEITZEL, H. 2015a. 5-Methylcytosine-Rich Heterochromatin in the Indian Muntjac. *Cytogenet Genome Res*, 147, 240-6.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., YANO, C. F. & CIOFFI, M. B. 2015b. Hypermethylated Chromosome Regions in Nine Fish Species with Heteromorphic Sex Chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 147, 169-78.

- SEISENBERGER, S., ANDREWS, S., KRUEGER, F., ARAND, J., WALTER, J., SANTOS, F., POPP, C., THIENPONT, B., DEAN, W. & REIK, W. 2012. The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. *Molecular Cell*, 48, 849-862.
- SEXTON, T. & CAVALLI, G. 2015. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell*, 160, 1049-1059.
- SHIOTA, K. 2004. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res*, 105, 325-34.
- SHIOTA, K., KOGO, Y., OHGANE, J., IMAMURA, T., URANO, A., NISHINO, K., TANAKA, S. & HATTORI, N. 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells*, 7, 961-9.
- STEWART, K. R., VESELOVSKA, L. & KELSEY, G. 2016. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics*, 8, 1399-1413.
- SUELVES, M., CARRIO, E., NUNEZ-ALVAREZ, Y. & PEINADO, M. A. 2016. DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation. *Brief Funct Genomics*, 15, 443-453.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*, 75, 304-6.
- VAN DEN VEYVER, I. B. 2002. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr*, 22, 255-82.
- WADDINGTON, C. H. 1940. The genetic control of wing development in *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 41, 75-139.
- WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S. E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K., BECK, S., BERRY, E., BIRREN, B., BLOOM, T., BORK, P., BOTCHERBY, M., BRAY, N., BRENT, M. R., BROWN, D. G., BROWN, S. D., BULT, C., BURTON, J., BUTLER, J., CAMPBELL, R. D., CARNINCI, P., CAWLEY, S., CHIAROMONTE, F., CHINWALLA, A. T., CHURCH, D. M., CLAMP, M., CLEE, C., COLLINS, F. S., COOK, L. L., COPLEY, R. R., COULSON, A., COURONNE, O., CUFF, J., CURWEN, V., CUTTS, T., DALY, M., DAVID, R., DAVIES, J., DELEHAUNTY, K. D., DERI, J., DERMITZAKIS, E. T., DEWEY, C., DICKENS, N. J., DIEKHANS, M., DODGE, S., DUBCHAK, I., DUNN, D. M., EDDY, S. R., ELNITSKI, L., EMES, R. D., ESWARA, P., EYRAS, E., FELSENFELD, A., FEWELL, G. A., FLICEK, P., FOLEY, K., FRANKEL, W. N., FULTON, L. A., FULTON, R. S., FUREY, T. S., GAGE, D., GIBBS, R. A., GLUSMAN, G., GNERRE, S., GOLDMAN, N.,

- GOODSTADT, L., GRAFHAM, D., GRAVES, T. A., GREEN, E. D., GREGORY, S., GUIGO, R., GUYER, M., HARDISON, R. C., HAUSSLER, D., HAYASHIZAKI, Y., HILLIER, L. W., HINRICHS, A., HLAVINA, W., HOLZER, T., HSU, F., HUA, A., HUBBARD, T., HUNT, A., JACKSON, I., JAFFE, D. B., JOHNSON, L. S., JONES, M., JONES, T. A., JOY, A., KAMAL, M., KARLSSON, E. K., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-62.
- WEBER, M. & SCHÜBELER, D. 2007. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 273-280.
- WUTZ, A. 2011. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat Rev Genet*, 12, 542-53.
- XIA, L., MA, S., ZHANG, Y., WANG, T., ZHOU, M., WANG, Z. & ZHANG, J. 2015. Daily Variation in Global and Local DNA Methylation in Mouse Livers. *PLOS ONE*, 10, e0118101.
- YAMAGATA, K., YAMAZAKI, T., MIKI, H., Ogonuki, N., INOUE, K., OGURA, A. & BABA, T. 2007. Centromeric DNA hypomethylation as an epigenetic signature discriminates between germ and somatic cell lineages. *Developmental Biology*, 312, 419-426.
- YELINA, N. E., LAMBING, C., HARDCASTLE, T. J., ZHAO, X., SANTOS, B. & HENDERSON, I. R. 2015. DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Genes & development*, 29, 2183-2202.
- YUSUFZAI, T. M. & WOLFFE, A. P. 2000. Functional consequences of Rett syndrome mutations on human MeCP2. *Nucleic Acids Res*, 28, 4172-9.
- ZENG, Y. & CHEN, T. 2019. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes*, 10, 257.

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ba(OH) ₂ x 8 H ₂ O	Bariumhydroxid-Octahydrat
Ba(OH) ₂	Bariumhydroxid
BaCO ₃	Bariumcarbonat
BSA	Bovine Serum Albumin
BRCA	breast cancer (Brustkrebs)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Anzahl der Chromatiden
CCD	charge-coupled device
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid
DNMT	DNA-Methyltransferase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
M	molar
MeCP	Methyl-CpG bindendes Protein
MBD	Methyl-CpG binding domain Protein
N	Stoffmenge
n	Ploidiegrad von Chromosomensätzen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
S.	Seite

s.	siehe
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SSC	Saline Sodium Citrate
tRNA	Transfer-RNA
TIFF	Tagged Image File Format
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanat
UV	ultraviolet
w/o	without (ohne)
Xist	X-inactive specific transcript

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Karyotypen von Knochenmarkszellen einer männlichen Maus. **a, b** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung. **c, d** C-Bänderung.

Abb. 2 Karyotypen von Peritoneumszellen einer weiblichen Maus. **a, b** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung.

Abb. 3 Interphasezellkerne aus dem Knochenmark einer männlichen Maus. **a, b** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung. **c, d** C-Bänderung.

Abb. 4 Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Interphasezellkernen. **a, b** Milz, **c, d** Niere, **e, f** Peritoneum, **g, h** Lunge, **i, j** Dünndarm, **k, l** Skelettmuskel, **m, n** Gehirn, **o, p** Zellkultur des Peritoneums.

Abb. 5 a, b Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Interphasezellkernen der Leber.

Abb. 6 Spermatogoniale Metaphase. **a** Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung. **b** C-Bänderung mit Kennzeichnung des Y-Chromosoms.

Abb. 7 Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Zellkernen aus Testismaterial der Maus. **a, b** Primäre Spermatozyten, **c, d** Spermatisden, **e, f** Spermatozoen, **g, h, i, j** Sertoli-Zellen.

Abb. 8 C-Bänderung an Zellkernen aus Testismaterial der Maus. **a, b** Spermatozoen, **c, d** Sertoli-Zellen.

Abb. 9 Immunofärbung gegen 5-Methylcytosin mit DAPI-Gegenfärbung an Meiose-Stadien. Stadien der Prophase I: **a** Leptotän, **b** Bouquet, **c** Pachytän, **d** Diplotän. **e, f, g** Metaphase I mit Kennzeichnung des Sexbivalents. **h, i, j** Metaphase II.

Abb. 10 C-Bänderung an Meiose-Stadien. Stadien der Prophase I: **a** Zygotän, **b** Pachytän, **c** Übergang Diplotän mit Kennzeichnung des Y-Chromosoms. **d, e** Metaphase I mit Kennzeichnung des Sexbivalents. Metaphase II: **f, g** mit X-Chromosom, **h, i** mit Kennzeichnung des Y-Chromosoms.

III. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Thomas Haaf und dem leider zu früh verstorbenen Prof. Dr. rer. biol. hum. Michael Schmid für die Unterstützung und Überlassung des Themas dieser Dissertation. Damit einhergehend danke ich dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien, sodass mir praktisches und wissenschaftliches Arbeiten ermöglicht wurde.

Mein besonderer Dank gilt Dipl.-Ing. Claus Steinlein für die fachliche und organisatorische Unterstützung zum erfolgreichen Gelingen dieser Dissertation. Zudem bedanke ich mich bei PD Dr. rer. nat. Martina Guttenbach für die konstruktive Unterstützung in der finalen Phase der vorliegenden Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich an dieser Stelle herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts der Humangenetik für das stets freundliche, angenehme und kollegiale Miteinander.

Danken möchte ich zudem meinen Eltern Carola und Andreas Kirsch zur Ermöglichung des Studiums sowie meinem Ehemann Simon Kiene für die Unterstützung auf diesem Weg.